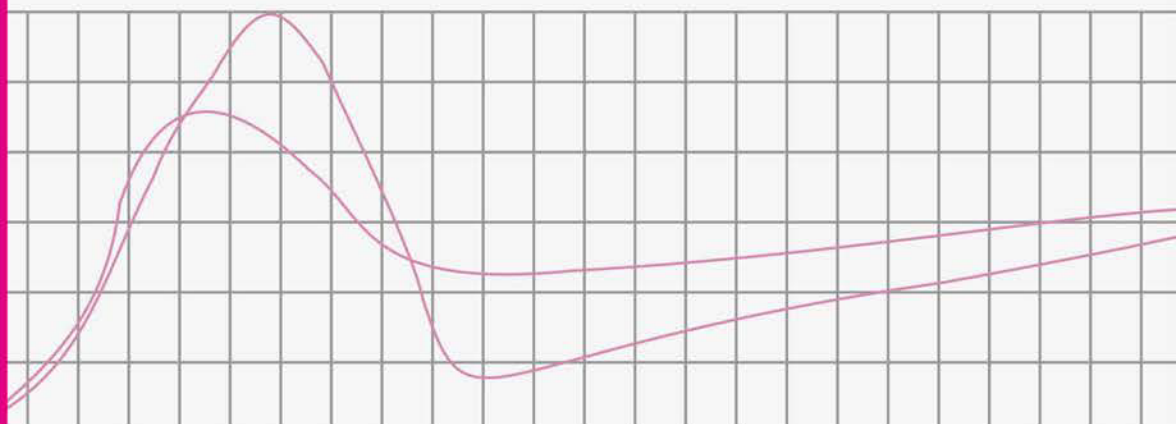
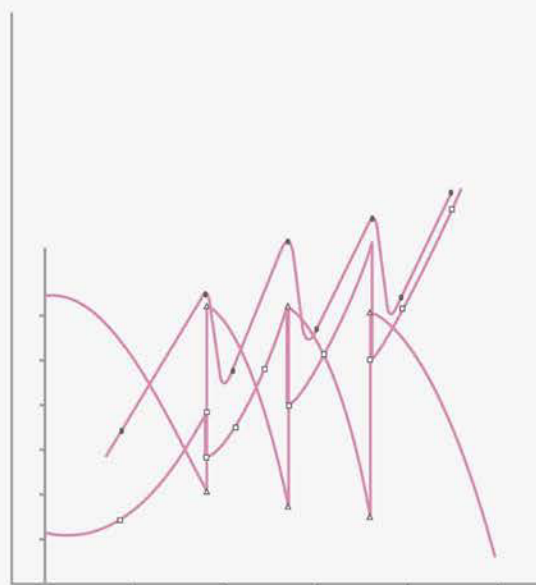


BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS

RAMON PARÉS
ANTONIO JUÁREZ



EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS

RAMON PARÉS I FARRÀS

Catedrático de Microbiología de la Universitat de Barcelona

ANTONIO JUÁREZ GIMÉNEZ

Catedrático de Microbiología de la Universitat de Barcelona



EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Barcelona - Bogotá - Buenos Aires - Caracas - México

Bioquímica de los microorganismos

Copyright © Ramon Parés i Farràs y Antonio Juárez Giménez

Edición en e-book:

© Editorial Reverté. S.A., 2012

ISBN: 978-84-291-9187-5

Edición en papel:

© Editorial Reverté. S.A., 1997

ISBN: 978-84-291-7454-0

Propiedad de:

EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Loreto, 13-15, Local B

08029 Barcelona

Tel: (34) 93 419 33 36

Fax: (34) 93 419 51 89

reverte@reverte.com

www.reverte.com

Reservados todos los derechos. La reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos, queda rigurosamente prohibida sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas por las leyes.

INTRODUCCIÓN

UNA TEORÍA DE LOS MICROBIOS EN CULTIVO PURO

Este libro de “Bioquímica de los microorganismos” se enmarca deliberadamente dentro de una abstracción, la cual comprende la consideración exclusiva del cultivo puro, un crecimiento balanceado de la biomasa microbiana como un tipo de catalizador particular y unos cambios definidos de composición del medio de cultivo, incluyendo tanto el medio propiamente dicho como la atmósfera circundante. En el contexto de esta abstracción puede desarrollarse un discurso razonablemente coherente de una gran parte de lo que sabemos de los microorganismos en cuanto a su diversidad y actividad química. El desarrollo de esta abstracción es el resultado de una estrategia que persigue una comprensión del sistema microbio-medio que pueda servir de base para abordar cualquier otro aspecto del desarrollo microbiano, partiendo de unos conocimientos directamente comprobables que estructuran una teoría de los microbios en cultivo puro.

Como puede verse al examinar el índice de este libro, esta teoría comprendería la cinética del crecimiento de la biomasa microbiana (parte B, capítulo 3), la generación de productos en el medio (C y H) y la intervención de oxidantes y reductores presentes en el mismo (D, E y F), incluyendo la utilización de los compuestos C_1 (E, capítulo 19) y la utilización y producción de energía radiante (G). La parte A y lo relativo a la composición química de la parte B (capítulo 2) pueden considerarse introductorias.

Una vez redactado el texto se ha considerado útil añadir los Apéndices A y B, que constituyen un complemento para facilitar la comprensión de la obra. Por una parte, el Apéndice A es un corolario de la teoría del cultivo puro de microorganismos. Quizás con él pueda entenderse mejor que los grandes y complejos mapas metabólicos no son esenciales para el microbiólogo realmente interesado por la actividad química que tiene lugar en los diferentes cultivos que obtiene y

maneja. Por otra parte, las láminas a color del Apéndice B pretenden ser una ayuda tanto para relacionar diferentes vías metabólicas o grupos fisiológicos de microorganismos, como para mostrar estas relaciones a un auditorio en un momento dado. Con esta última finalidad también se han editado las mismas láminas en forma de transparencias que pueden ser adquiridas adicionalmente al libro.

Dado el planteamiento señalado, se excluyen muchos otros aspectos, como los relativos a la ecología microbiana, la biosíntesis y la genética de poblaciones. El mismo metabolismo de las reservas y la formación de metabolitos secundarios se tratan sólo marginalmente, así como los sistemas de regulación metabólica. Este estudio se basa fundamentalmente en aquellas propiedades fenotípicas de los microbios que determinan los cambios químicos del medio cuando crecen en cultivo puro, dejando otros muchos aspectos en segundo plano. Por lo tanto, recoge como un todo lo que solamente constituye un aspecto parcial de la biología microbiana. Un tratamiento análogo en un marco más amplio tomaría una envergadura excesiva, tanto para el objetivo establecido por los autores como para su propia capacidad.

El prerrequisito para la comprensión de esta "Bioquímica de los microorganismos" es efectivamente el conocimiento de una microbiología general y el de una bioquímica básica. Consecuentemente, está situado a nivel de los segundos y terceros ciclos de la actual enseñanza universitaria en varias de sus ramas, como pueden ser los estudios de Biología, Química, Medicina, Farmacia y Veterinaria. Específicamente, está pensado para que sea de interés para los alumnos que cursan la Licenciatura de Bioquímica u otras carreras más o menos afines.

Este libro no ha nacido *in vacuo*. En realidad sólo se ha escrito como consecuencia de una historia determinada que posiblemente es su verdadera justificación. Todo comenzó en la década de los cincuenta, cuando la enseñanza de la microbiología estaba vinculada al mundo de las enfermedades infecciosas o bien a la fisiología vegetal, quizás con la importante excepción de la escuela de Delf. De hecho, es en esa época cuando, junto a grandes avances experimentales, se llega a un convencimiento general de la importancia del microbio para los problemas fundamentales de la biología, así como para toda la economía del hombre. Es el periodo en el que, gracias a los trabajos de J. Buder, se empieza a comprender la fisiología de las bacterias rojas del azufre, dentro de la duda de si eran verdaderas fotosintéticas como había sugerido Engelmann, o si se trataba de un tipo particular pigmentado de bacterias quimiosintéticas oxidadoras del azufre, como las descubiertas por Winogradsky. En realidad en los años cincuenta todavía sabíamos relativamente poco, tanto de la fotosíntesis bacteriana como de la misma fijación autotrófica de CO₂, pero ya se había llegado al convencimiento de que el rasgo general de las reacciones metabólicas era la transhidrogenación, lo cual hacía suponer que el sulfuro de hidrógeno actuaría en las bacterias rojas del azufre como un reductor, de forma análoga a la función del agua en la fotosíntesis vegetal.

En los años cincuenta se sabía bastante de las fermentaciones y de la oxidación de los hidratos de carbono. Sin embargo, es justamente

cuando F. Lynen da las pruebas concluyentes de la condensación del acetato activo para la formación de los ácidos grasos, cerrando una serie de estudios, entre los que destacaban los trabajos llevados a cabo por Lipmann y Barker, donde los resultados obtenidos en el músculo y con los microorganismos llegaron a una feliz conjunción, constituyendo un brillante capítulo de lo que dentro del estilo del pensamiento de la época se llamó bioquímica unitaria.

En el contexto referido, fue durante este tiempo cuando el autor de estas líneas empezó a trabajar en varios aspectos de la bioquímica de la levadura, especialmente en el transporte de glucosa a través de la membrana, y en la formación y utilización del glucógeno. Trabajar con la levadura para iniciarse en la "Bioquímica de los microorganismos" era obligado, por cuanto todo había empezado con este microorganismo y, a través de casi un siglo, la mitad de lo que se había llegado a saber lo habíamos aprendido trabajando con levaduras.

Fue hacia finales de la década de los cincuenta cuando casualmente se encomendó al que suscribe la traducción al castellano del capítulo "Bacterial metabolism" de la McGraw-Hill "Encyclopedia of Science and Technology", escrito por C. B. van Niel. Casi al mismo tiempo, por sugerencia de uno de sus profesores en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, leyó "The Microbes Contribution to Biology", la edición de un célebre curso dado por A. J. Kluyver y C. B. van Niel. Estas dos lecturas son la raíz profunda del presente libro, cuyo efecto es patente todavía en sus páginas, a pesar de los treinta y cinco años transcurridos. De hecho, como después se ha podido comprobar, la obra referida en segundo lugar ha marcado a muchos microbiólogos de toda una generación en el mundo entero.

Desde 1960 a 1964 la "Academic Press" publicó los cinco volúmenes sobre "The Bacteria. A Treatise on Structure and Function", bajo la dirección de I. C. Gunsalus y Roger Y. Stanier, los cuales constituyen un hito en la historia de la literatura microbiológica. Esta obra es indudablemente otra fuente básica que podría citarse en casi todos los capítulos del presente libro.

La referencias bibliográficas que se acaban de referir constituyeron el fundamento sobre el que se desarrolló el curso de Metabolismo bacteriano (Ampliación de Microbiología) de la Licenciatura de Biología en la Universidad de Barcelona durante toda la década de los sesenta. No obstante, los trabajos de investigación que se iban llevando a cabo paralelamente, principalmente sobre las bacterias del ácido acético y las bacterias del ácido fórmico, dejaron una huella indiscutible en la enseñanza, como posteriormente ocurriría como consecuencia de los trabajos sobre bacterias del gas detonante, sobre la utilización de materia orgánica por *Chlorella* y sobre *Bifidobacterium*. Las grandes revisiones, las lecturas de artículos especializados y la misma discusión personal tuvieron también su repercusión sobre las sucesivas reestructuraciones del curso de "Metabolismo bacteriano" que siguió en la década de los setenta. Precisamente fue en este tiempo cuando el "Bacterial Metabolism" de H. W. Doelle (1975) contribuyó especialmente a una nueva y profunda reestructuración y ampliación del programa del curso referido.

También la obra de Gottschalk sobre el mismo título, menos extensa pero más didáctica, fue especialmente tenida en cuenta para que, finalmente, se llegara a redactar un extenso curso de metabolismo bacteriano, que con el título de “Ampliación de microbiología I: Actividad química”, se publicó en 1982 por “Edicions de la Universitat de Barcelona”.

FUENTES BIBLIOGRÁFICAS BÁSICAS

- KLUYVER, A. J. y VAN NIEL, C. B. *The Microbe's contributions to Biology*. Cambridge (Mass.), 1956.
- VAN NIEL, C. B. *Metabolismo bacteriano*. Enciclopedia Salvat de la Ciencia y la Tecnología. Vol. 8. Salvat, S. A. Barcelona, 1964.
- GUNSALUS, I. C. y STANIER, R. Y. *The Bacteria*. A Treatise on Structure and Function. (5 vol.) Academic Press. New York, 1960-1964.
- DOELLE, H. W. *Bacterial Metabolism*. Academic Press. London and New York (2nd edition), 1975.
- GOTTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag. New York, 1985.
- PARES, R. *Ampliación de microbiología I: Actividad Química*. Edicions de la Universitat de Barcelona, 1982.

GÉNESIS DEL PRESENTE TEXTO

La reforma de los planes de estudios universitarios de los años noventa y la creación de la Licenciatura de Bioquímica han hecho repensar la materia impartida durante tantos años para dar forma a este texto, centrado en un campo más restringido, y con una estructuración diferente. Como es obvio, se han incorporado los conocimientos obtenidos en los últimos diez años a partir de las fuentes que se indican específicamente en cada capítulo. Para el resto, puede servir lo que acabo de señalar más arriba.

El Prof. A. Juárez, primero brillante alumno y colaborador, y después excelente profesor de microbiología ha sido determinante para tomar la decisión de llevar a cabo el replanteamiento aludido y la elaboración conjunta del presente texto. Este hecho podría considerarse natural dadas las circunstancias de nuestra cooperación en la enseñanza del metabolismo microbiano y la naturaleza misma de su currículum investigador, especialmente en su primera etapa de Barcelona, antes de sus interesantes trabajos sobre regulación de la expresión génica. Desgraciadamente, estos últimos se hallan en el contexto de una historia diferente a la que ha servido para diseñar esta “Bioquímica de los microorganismos”. No obstante, se está en el convencimiento de que la participación de dos autores de diferente generación es extraordinariamente positiva para dibujar, aunque sea parcialmente, una etapa de la evolución de nuestro conocimiento de los microbios tan activa como la correspondiente a los últimos cincuenta años.

Los autores quieren manifestar su agradecimiento a la Dra. Mercedes Mouriño por su ayuda en la revisión del texto original así como a la Editorial Reverté por su interés en la publicación de este libro y la eficaz labor realizada por su competente equipo técnico.

Ramon Parés

ÍNDICE ANALÍTICO

INTRODUCCIÓN **V**

UNA TEORÍA DE LOS MICROBIOS EN CULTIVO PURO	V
FUENTES BIBLIOGRÁFICAS BÁSICAS	VIII
GÉNESIS DEL PRESENTE TEXTO	VIII

PARTE A: EL METABOLISMO MICROBIANO **1**

CAPÍTULO 1: INTEGRACIÓN DE LA TOTALIDAD DE LAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LA BIOFASE **3**

1.1 LA QUÍMICA DEL CULTIVO PURO	4
1.2 ACTIVIDAD QUÍMICA Y GRUPOS TAXONÓMICOS	5
1.3 LA ACTIVIDAD DE LA BIOFASE	6
1.4 EL SUMINISTRO ENERGÉTICO	7
1.5 LA REGULACIÓN METABÓLICA	9
1.6 EL PRINCIPIO DE LA BIOQUÍMICA UNITARIA	10

PARTE B: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CRECIMIENTO DE LA BIOMASA MICROBIANA **13**

CAPÍTULO 2: COMPOSICIÓN QUÍMICA **15**

2.1 LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	16
2.2 CONTENIDO DE AGUA DE LA BIOFASE	17
2.3 COMPOSICIÓN ELEMENTAL	18
2.4 FRACCIÓN ÁCIDO-SOLUBLE	18
2.5 PROTEÍNAS	19
2.6 ÁCIDOS NUCLEICOS	19

2.7	LÍPIDOS	20
2.8	HIDRATOS DE CARBONO	20
2.9	MOLÉCULAS EXCLUSIVAS DE LAS BACTERIAS	21
2.10	OTROS COMPONENTES MOLECULARES DE LA BIOMASA MICROBIANA	25
2.11	CONCLUSIONES GENERALES SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BIOFASE	27
	BIBLIOGRAFÍA	27

CAPÍTULO 3: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO 29

3.1	CULTIVO DISCONTINUO ("BATCH CULTURE")	30
3.2	CULTIVO CONTINUO	34
	BIBLIOGRAFÍA	36

PARTE C: PRODUCTOS FINALES DEL CATABOLISMO 37

CAPÍTULO 4: ETANOL 39

4.1	LAS LEVADURAS	40
4.2	ALGUNAS REFERENCIAS HISTÓRICAS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS LEVADURAS A LA BIOQUÍMICA	42
4.3	EFFECTO PASTEUR	43
4.4	CULTIVO, SISTEMAS CELULARES Y EXTRACTOS	44
4.5	FERMENTACIONES DE LA GLUCOSA	45
4.5.1	Fermentación alcohólica	45
4.5.2	Fermentación glicérica con sulfito	47
4.5.3	Fermentación aceto-glicérica	47
4.5.4	Fermentación pirúvico-glicérica	48
4.6	ACEITE DE FUSEL Y ÁCIDO SUCCÍNICO	48
4.7	DESARROLLO AEROBIO	50
4.8	ASIMILACIÓN OXIDATIVA Y FERMENTATIVA DE LA GLUCOSA	50
4.9	FERMENTACIÓN ENDÓGENA	52
	BIBLIOGRAFÍA	52

CAPÍTULO 5: ÁCIDO ACÉTICO 53

5.1	EL VINAGRE	54
5.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO	55
5.3	CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ACETATO	56
5.4	OXIDACIÓN DEL ETANOL	60
5.5	OXIDACIÓN DE ALCOHOLES PRIMARIOS	61
5.6	CETOGÉNESIS	62
5.7	OXIDACIÓN DE POLIALCOHOLES	62
5.8	OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS LÁCTICO Y PIRÚVICO	63
5.9	OXIDACIÓN DE AZÚCARES	63
5.9.1	El sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	63
5.9.2	Vía de Entner-Doudoroff	64
5.9.3	Ciclo de la hexosa monofosfato o vía de Warburg-Dickens	66

5.9.4	Formación de gluconato	66
5.9.5	Utilización del gluconato	69
5.9.6	El sistema de las fosfocetolasas	69
5.10	MODELOS DEL METABOLISMO OXIDATIVO DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO	71
5.11	FORMACIÓN DE CELULOSA	71
	BIBLIOGRAFÍA	72

CAPÍTULO 6: ÁCIDO LÁCTICO 73

6.1	EL ÁCIDO LÁCTICO COMO PRODUCTO DE FERMENTACIÓN	74
6.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO LÁCTICO	74
6.3	FERMENTACIONES LÁCTICAS DE HEXOSAS Y PENTOSAS	77
6.4	BALANCES DE FERMENTACIÓN	79
6.5	FERMENTACIONES LÁCTICAS DE LA FRUCTOSA	82
6.6	FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LA DESOXIRRIBOSA	83
6.7	COFERMENTACIÓN DE LA LACTOSA Y LA TREONINA	83
6.8	FERMENTACIÓN DEL MALATO	85
6.9	FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL TARTRATO	86
	BIBLIOGRAFÍA	87

CAPÍTULO 7: ÁCIDO PROPIÓNICO 89

7.1	EL ÁCIDO PROPIÓNICO COMO PRODUCTO DE FERMENTACIÓN	90
7.2	REACCIÓN DE SWICK Y WOOD	91
7.3	FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTATO	91
7.3.1	Vía metabólica de <i>Propionibacterium</i> y <i>Veillonella</i>	91
7.3.2	Formación de propionato en <i>C. propionicum</i> y <i>Megasphaera elsdenii</i>	91
7.4	FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DE LA GLUCOSA	92
	BIBLIOGRAFÍA	94

CAPÍTULO 8: ÁCIDO BUTÍRICO 95

8.1	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO Y DE DISOLVENTES NEUTROS POR FERMENTACIÓN: PERSPECTIVA HISTÓRICA	96
8.2	VÍAS METABÓLICAS UTILIZADAS POR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO	97
8.3	FORMACIÓN DE ACETATO POR FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS	99
8.4	FORMACIÓN DE ACETATO POR REDUCCIÓN DIRECTA DE CO ₂	101
8.5	BACTERIAS ACETÓGENAS	103
8.6	LA VÍA DE WOOD PARA LA FIJACIÓN AUTOTRÓFICA DE CO ₂	103
8.7	LA GENERACIÓN DE ENERGÍA EN LAS BACTERIAS ACETÓGENAS	106
8.8	OTRAS VÍAS METABÓLICAS UTILIZADAS POR LAS BACTERIAS ACETÓGENAS	107
8.8.1	Sistemas dependientes del tetrahidrofolato	107
8.8.2	Reducción indirecta del CO ₂	107
8.9	FERMENTACIÓN DEL ETANOL POR <i>Clostridium kluyveri</i>	108
8.10	FORMACIÓN DE BUTIRATO A PARTIR DE GLUCOSA	109
8.11	FORMACIÓN DE ACETONA Y BUTANOL	110

8.12	OTROS PRODUCTOS FINALES DE FERMENTACIÓN PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO	110
8.13	PRODUCCIÓN DE SUCCINATO POR MICROORGANISMOS	112
	BIBLIOGRAFÍA	114

CAPÍTULO 9: ÁCIDO FÓRMICO 115

9.1	EL GRUPO ENTÉRICO	116
9.2	EL DESARROLLO DE LA BIOLOGÍA DE <i>Escherichia coli</i>	119
9.3	LA FERMENTACIÓN ÁCIDO MIXTA	121
9.3.1	Formación de etanol	122
9.3.2	Formación de acetato	124
9.3.3	Formación de CO ₂ y H ₂ a partir del formiato	124
9.3.4	Formación de succinato	125
9.3.5	Formación del lactato	125
9.4	LA FERMENTACIÓN 2,3-BUTILENGLICÓLICA	127
9.4.1	Formación de acetoina	127
9.4.2	Formación de 2,3-butanodiol (2,3-butilenglicol)	129
9.5	FORMACIÓN DE TRIMETILENGLICOL	130
	BIBLIOGRAFÍA	131

CAPÍTULO 10: AMONÍACO 133

10.1	CLOSTRIDIOS PUTREFACTIVOS	134
10.2	FERMENTACIONES DE UN SOLO AMINOÁCIDO	134
10.2.1	Arginina	135
10.2.2	Histidina y ácido glutámico	136
10.2.3	Glicina	137
10.2.4	Serina	138
10.2.5	Treonina	138
10.2.6	Triptófano	139
10.2.7	Lisina	139
10.2.8	Ornitina	141
10.2.9	Cisteína y metionina	141
10.3	DESCARBOXILACIÓN DE AMINOÁCIDOS	142
10.4	FERMENTACIÓN ACOPLADA DE DOS AMINOÁCIDOS	142
10.5	FERMENTACIÓN DE UN AMINOÁCIDO JUNTO A UN CETOÁCIDO	145
10.6	FERMENTACIÓN DE LA PURINA	147
10.7	FERMENTACIÓN DE LA PIRIMIDINA	147
10.8	FERMENTACIÓN DE LA ALANTOÍNA	149
10.9	FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO NICOTÍNICO	149
	BIBLIOGRAFÍA	149

CAPÍTULO 11: METANO 151

11.1	BACTERIAS METANÓGENAS	152
11.2	REDUCCIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO	155
11.3	EL SISTEMA DE LA METILREDUCTASA	157
11.4	LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA	159
	BIBLIOGRAFÍA	159

12.1	EL GAS SILVESTRE	162
12.2	EL CO ₂ COMO CATABOLITO	163
12.3	EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (CAT)	163
12.4	SISTEMAS ENZIMÁTICOS DEL CAT	164
12.5	ESTEQUIOMETRÍA DEL CICLO	167
12.6	REACCIONES ANAPLERÓTICAS	168
12.7	CICLO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO	170
	BIBLIOGRAFÍA	171

PARTE D: OXIDANTES INORGÁNICOS 173**CAPÍTULO 13: OXÍGENO MOLECULAR** 175

13.1	RESPIRACIÓN AEROBIA	176
13.2	ASIMILACIÓN DE O ₂	177
13.3	OXIDASAS Y PEROXIDASAS	178
13.4	SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CITOCROMO c PEROXIDASA	179
13.5	LAS FLAVOPROTEÍNAS AUTOOXIDABLES	179
13.6	BALANCE ENERGÉTICO DE LAS REACCIONES OXIDATIVAS	180
13.7	LA CADENA RESPIRATORIA	181
13.8	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	188
	BIBLIOGRAFÍA	189

CAPÍTULO 14: NITRATO 191

14.1	DESNITRIFICACIÓN Y RESPIRACIÓN DEL NITRATO	192
14.2	BACTERIAS DESNITRIFICANTES	193
14.3	FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA DESNITRIFICACIÓN	194
14.4	LA RESPIRACIÓN DEL NITRATO EN LAS BACTERIAS FACULTATIVAS	195
14.4.1	Catabolismo de la glucosa	196
14.4.2	Respiración del nitrato y fermentación	197
14.4.3	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)	197
14.4.4	Respiración anaerobia	198
14.4.5	Mutantes clorato resistentes	198
14.4.6	Metabolismo del nitrito	198
	BIBLIOGRAFÍA	199

CAPÍTULO 15: SULFATO 201

15.1	REDUCTORES DE SULFATO Y BACTERIAS SULFURÓGENAS	202
15.2	REDUCCIÓN DEL SULFATO CON LACTATO	204
15.3	HIDROGENASAS Y TRANSPORTADORES DE ELECTRONES	205
15.4	REDUCCIÓN DEL SO ₄ ²⁻ CON H ₂	205
15.5	METABOLISMO DEL CARBONO EN LOS SULFATO REDUCTORES	208
15.6	BISULFITO REDUCTASAS	210
	BIBLIOGRAFÍA	211

PARTE E: REDUCTORES ORGÁNICOS Y COMPUESTOS C₁ 213

CAPÍTULO 16: COMPUESTOS ALIFÁTICOS 215

16.1	ATAQUE PRIMARIO DE LAS FUENTES ORGÁNICAS DE PODER REDUCTOR	216
16.2	OXIDACIÓN DE ALCANOS Y ALQUENOS	216
16.3	SISTEMA DE LA ω -HIDROXILASA	218
16.4	OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	218
16.5	LA α -OXIDACIÓN	218
16.6	LA β -OXIDACIÓN	219
16.7	FORMACIÓN DE PROPIONIL-CoA	220
16.8	OXIDACIÓN A ω -HIDROXIÁCIDOS	221
	BIBLIOGRAFÍA	222

CAPÍTULO 17: COMPUESTOS AROMÁTICOS 223

17.1	PROCESOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS	224
17.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN AEROBIA	224
17.3	LA ORTO-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO	224
17.4	LA META-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO	226
17.5	OXIDACIÓN DEL GENTISATO	228
17.6	OXIDACIÓN DEL D-MANDELATO Y OTROS PRECURSORES DEL CATECOL	229
17.7	OXIDACIÓN DEL <i>p</i> -HIDROXIBENZOATO Y OTROS PRECURSORES DEL ÁCIDO PROTOCATÉQUICO	231
17.8	RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VÍAS DE OXIDACIÓN AEROBIAS DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS	232
17.9	INDUCCIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	233
17.10	DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	234
17.10.1	Obtención de metabolitos centrales a partir de intermediarios activados	236
17.10.2	Fotometabolismo anaerobio	237
17.10.3	Catabolismo por desnitrificantes	238
17.10.4	Fermentación	239
17.10.5	Degradación por reductores de sulfatos	239
17.10.6	Metabolismo en condiciones metanogénicas	239
	BIBLIOGRAFÍA	240

CAPÍTULO 18: COMPUESTOS NITROGENADOS 241

18.1	DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS	242
18.2	DEGRADACIÓN OXIDATIVA DE LOS AMINOÁCIDOS	242
18.2.1	Aminoácido oxidasas	242
18.2.2	Deshidrogenasas	243
18.2.3	Aspartasa	243
18.3	OXIDACIÓN DE LA HISTIDINA	243
18.4	OXIDACIÓN DE LA HIDROXIPROLINA	244

18.5	OXIDACIÓN DEL TRIPTÓFANO	245
18.6	OXIDACIÓN DE LA TREONINA	248
18.7	OXIDACIÓN DE PURINAS Y PIRIMIDINAS	249
18.8	OXIDACIÓN DE LA VITAMINA B ₆	251

CAPÍTULO 19: COMPUESTOS C₁ COMO SUSTRATOS 253

19.1	CRECIMIENTO SOBRE COMPUESTOS DE UN SOLO ÁTOMO DE CARBONO	254
19.2	CICLO REDUCTOR DE LAS PENTOSAS	254
19.3	UTILIZACIÓN DEL FORMIATO POR EL CICLO DE CALVIN	257
19.4	CICLO REDUCTOR DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO	258
19.5	FIJACIÓN DE CO ₂ EN <i>CHROMATIUM</i>	259
19.6	BACTERIAS METILOTROFAS	260
19.7	OXIDACIÓN DEL METANO	263
19.8	VÍAS DE LA RIBULOSA-5-P Y DE LA SERINA	265
19.9	CRECIMIENTO SOBRE METILAMINA	267
	BIBLIOGRAFÍA	268

PARTE F: REDUCTORES INORGÁNICOS 269

CAPÍTULO 20: COMPUESTOS REDUCIDOS DE NITRÓGENO 271

20.1	QUIMIOLITOTROFISMO	272
20.2	LAS BACTERIAS NITRIFICANTES	273
20.3	EL GRUPO NITROSO	274
20.4	EL GRUPO NITRO	276
20.5	OBTENCIÓN DEL PODER REDUCTOR POR LAS BACTERIAS QUIMIOLITOTROFAS	278
20.6	EFFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES	278
	BIBLIOGRAFÍA	280

CAPÍTULO 21: COMPUESTOS DE HIERRO Y DE AZUFRE 281

21.1	OXIDACIÓN DEL HIERRO	282
21.2	OXIDACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE	285
21.3	CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO Y HETEROTRÓFICO	285
21.4	VÍAS DE OXIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE	286
21.5	CADENAS RESPIRATORIAS EN LOS TIOBACILOS. GENERACIÓN DE ATP Y DE PODER REDUCTOR	288

CAPÍTULO 22: HIDRÓGENO MOLECULAR 291

22.1	LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO Y OTROS AUTOTROFOS FACULTATIVOS	292
22.2	TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO	292

22.3	CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO	293
22.3.1	Características generales del crecimiento autotrófico de las bacterias del H ₂	293
22.3.2	El sistema de la hidrogenasa	294
22.3.3	Asimilación del CO ₂	295
22.4	ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO	296
22.5	CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO	296
22.6	OXIDACIÓN DEL MONÓXIDO DE CARBONO	297
22.7	OXIDACIÓN DEL H₂ EN <i>PARACOCCLUS DENITRIFICANS</i>	297
22.8	OXIDACIÓN DEL HIDRÓGENO EN <i>DESULFOVIBRIO</i>	298
	BIBLIOGRAFÍA	299

PARTE G: ENERGÍA RADIANTE 301

CAPÍTULO 23: FOTOFOSFORILACIÓN Y FOTOMETABOLISMO 303

23.1	FOTOSÍNTESIS VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS BACTERIANA. PERSPECTIVA HISTÓRICA	304
23.2	FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA Y ANOXIGÉNICA EN EL MUNDO MICROBIANO	307
23.3	GRUPOS DE BACTERIAS FOTOTROFAS	307
23.4	BACTERIAS PÚRPURA	308
23.5	BACTERIAS VERDES	311
23.6	FISIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO FOTOTRÓFICO EN LAS BACTERIAS PÚRPURA Y VERDES	311
23.7	LA FOTOSÍNTESIS DE LAS CIANOBACTERIAS	313
23.8	EL FOTOMETABOLISMO DE LAS HALOBACTERIAS	317
23.9	BIOLUMINISCENCIA EN LAS BACTERIAS	318
	BIBLIOGRAFÍA	320

PARTE H: METABOLISMO SECUNDARIO 321

CAPÍTULO 24: METABOLITOS SECUNDARIOS: COMPOSICIÓN, PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD 323

24.1	DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO SECUNDARIO	324
24.2	TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	326
24.2.1	Composición química	326
24.2.2	Actividad	329
24.3	FUNCIONES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	331
24.4	REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO	333
24.4.1	Cinética de formación de los metabolitos secundarios	333
24.4.2	Inducción y represión de la síntesis de metabolitos secundarios	335
24.4.3	Genética del metabolismo secundario. Superproducción de metabolitos secundarios	337
24.5	MACROMOLÉCULAS ESPECÍFICAS COMO METABOLITOS SECUNDARIOS	338
	BIBLIOGRAFÍA	338

**APÉNDICE: GRUPOS FISIOLÓGICOS Y DIVERSIDAD
BACTERIANA 341**

- A.1 EL TIPO CULTURAL COMO PIEZA BÁSICA DEL TRABAJO
BIOQUÍMICO 342**
- A.2 LA IDEALIZACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS Y LA UNIDAD DE LA
ACTIVIDAD QUÍMICA DEL CULTIVO PURO 343**
- A.3 GRUPOS FISIOLÓGICOS Y TAXONOMÍA 344**

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS Y AUTORES 347

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MICROORGANISMOS CITADOS 363

**ASPECTOS COMPARATIVOS DE DIFERENTES VÍAS
METABÓLICAS Y DE DIFERENTES GRUPOS FISIOLÓGICOS
MICROBIANOS 367**

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

P**ARTE **A

EL METABOLISMO MICROBIANO

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

INTEGRACIÓN DE LA TOTALIDAD DE LAS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LA BIOFASE

1.1 LA QUÍMICA DEL CULTIVO PURO	4	
1.2 ACTIVIDAD QUÍMICA Y GRUPOS TAXONÓMICOS		5
1.3 LA ACTIVIDAD DE LA BIOFASE	6	
1.4 EL SUMINISTRO ENERGÉTICO	7	
1.5 LA REGULACIÓN METABÓLICA	9	
1.6 EL PRINCIPIO DE LA BIOQUÍMICA UNITARIA		10

1.1 LA QUÍMICA DEL CULTIVO PURO

En condiciones naturales, los microorganismos se desarrollan en diferentes hábitats y frecuentemente en poblaciones mezcladas o junto a otros seres vivos. Sin embargo, la mayor parte de la información que poseemos de los microorganismos se deriva del estudio de cultivos puros de los mismos. Sin duda, este hecho constituye una limitación, pero es dudoso que sin la práctica del aislamiento y mantenimiento de líneas clonales la microbiología hubiera llegado a constituirse como tal.

La bioquímica de los microorganismos se centra fundamentalmente en el estudio de sistemas constituidos por una biofase reducida a un conjunto de individuos idénticos, el medio propiamente dicho y una fase gaseosa. En un medio constante, cualquiera de los infinitos cultivos puros que pueden obtenerse a partir del mismo aislamiento inicial son idénticos. Este conjunto de cultivos constituyen la cepa:

$$\text{cepa} = C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_n$$

y, en todo caso, $C_m \equiv C_n$ (m , sería cualquier cultivo entre C_1 y C_n). En realidad, esto sólo se cumple aproximadamente, porque en ciertos casos pueden aparecer variaciones en la descendencia clonal, y en el cultivo discontinuo han de considerarse los efectos que las variaciones del medio pueden tener sobre la población microbiana durante su crecimiento. Sin embargo, estos fenómenos pueden ser minimizados en la práctica de tal modo que no se altere la validez del principio establecido.

El cultivo puro es un sistema dinámico que puede caracterizarse en función del aumento de la biomasa, de la formación de nuevos productos que se acumulan en el medio y de la desaparición o consumo de componentes originales del mismo. En estos dos últimos casos se incluye también la atmósfera circundante. Todo esto se puede poner claramente de manifiesto separando las células y analizando el medio y la atmósfera a lo largo del tiempo.

Existen muchas formas de medir la biomasa. Las células pueden separarse por centrifugación y lavarse para obtener luego su peso seco, el correspondiente a una muestra del cultivo. Muchos otros métodos, como el del recuento celular, de la densidad óptica o del carbono total de la fracción celular, pueden ser utilizados de acuerdo al planteamiento de un determinado experimento. También existe toda una amplia metodología analítica aplicable tanto al medio de cultivo propiamente dicho como a la atmósfera que forma parte del sistema. En este libro no se hace una descripción sistemática de las técnicas de análisis aludidas, pero se habla de ellas con mayor o menor detalle según los diferentes casos, y, si es necesario un conocimiento más preciso, se remite al lector a libros o manuales específicos. En relación con la evolución de la biomasa en el cultivo puro, en este libro se consideran separadamente los siguientes aspectos que pueden tener lugar durante el desarrollo microbiano: *evolución de la biomasa microbiana*; *formación de nuevos productos*; *desaparición de sustratos orgánicos*; y *transformaciones de compuestos inorgánicos*. Se tratan también de un modo relativamente independiente la *utilización de compuestos de un solo átomo de carbono* y la *formación de produc-*

tos especiales denominados *metabolitos secundarios*, los cuales no tienen relación aparente con el desarrollo de la biofase.

El metabolismo microbiano tiene un alcance mayor que el comprendido en los temas señalados, abarcando la integración de la totalidad de las transformaciones químicas que se realizan en el microbio. Aparte de la biosíntesis y la regulación metabólica, dentro del metabolismo se incluyen los fenómenos de permeabilidad, la diferenciación celular y molecular, el trabajo osmótico, la motilidad, los tactismos, la luminiscencia y el mantenimiento de la forma y estructura en ausencia de crecimiento. Estos aspectos, junto a la reproducción, el crecimiento celular y la adaptación, son parte del metabolismo por cuanto presuponen de algún modo determinados cambios químicos. En todo caso, son materias que exceden al programa desarrollado en este libro, el cual, en líneas generales, se centra particularmente en las transformaciones químicas mayoritarias y, especialmente, en las relacionadas con el suministro energético.

1.2 ACTIVIDAD QUÍMICA Y GRUPOS TAXONÓMICOS

Las condiciones del cultivo y la actividad de los microorganismos difieren de un caso a otro. De este modo puede reconocerse una diversidad importante de microorganismos, cada uno con características peculiares. Estos aspectos son relevantes en relación con la distribución taxonómica de los diferentes microorganismos, si bien la caracterización completa requiere del conocimiento de otros aspectos relativos a su forma y estructura, propiedades antigénicas y genéticas, características de los ácidos nucleicos y de otras moléculas estructurales.

El grupo taxonómico básico es la especie. En microbiología la especie queda generalmente definida por una cepa tipo. Todas las cepas lo suficientemente semejantes a una cepa tipo se incluyen en una misma especie, mientras que las cepas lo suficientemente distintas de esta cepa tipo se comprenden en otras especies. Esto siempre puede implicar criterios subjetivos que exigen un cierto compromiso provisional. Las especies parecidas se incluyen en el mismo género, y así se forman sucesivamente categorías superiores. Por lo que respecta a la relación entre actividad química y grupos taxonómicos, hay que considerar que una misma actividad química puede hallarse en microorganismos muy diferentes. No obstante, existe una relación significativa entre los grupos de microorganismos que presentan actividades químicas globales equivalentes y la proximidad taxonómica de los mismos.

La bioquímica de los microorganismos, como disciplina independiente, presenta una obvia intersección entre microbiología y bioquímica. Esto se refleja en el gran número de publicaciones al respecto que aparecen tanto en revistas de microbiología como en revistas de bioquímica. En los tratados y manuales de microbiología y de bioquímica también se desarrollan algunos temas comunes. La característica de la bioquímica de los microorganismos que este libro pretende asumir es la de sistematizar una parte del conocimiento de la química biológica desde la perspectiva de los distintos grupos de microorganismos particulares.

El concepto de microorganismos que se utiliza aquí está de acuerdo con todo lo que se ha referido más arriba. Evidentemente se trata de organismos generalmente de tamaño microscópico, pero fundamentalmente interesan aquellos que permiten obtener una información importante a través del estudio de cultivos puros. No hay que olvidar que un cultivo puro está constituido por una población enorme de individuos iguales que viven sobre un medio uniforme y que se multiplican con un tiempo de generación relativamente muy corto. En este sentido se incluyen igualmente bacterias, levaduras y algas unicelulares. También podría comprender a los protozoos, e incluso a cultivos de células de organismos superiores, aunque aquí no se hace referencia a ellos.

1.3 LA ACTIVIDAD DE LA BIOFASE

El metabolismo microbiano comprende miles de transformaciones distintas, incluso considerando exclusivamente las que se llevan a cabo en una sola cepa bacteriana. De hecho, aunque pudieran hacerse todas a la vez, no constituirían por sí mismas el metabolismo, porque para ello se requiere una integración. El rasgo más distintivo de la integración del metabolismo es que dichas transformaciones se llevan a cabo en una **estructura altamente organizada** y que gracias a su actividad esta estructura organizada se perpetúa e incrementa, manteniéndose fundamentalmente idéntica a sí misma. Sin estructura no hay metabolismo, y sin metabolismo no hay estructura. Este aparente círculo vicioso en el que parecen estar la estructura y la actividad química del protoplasma se considera que es el resultado de un largo proceso de evolución a partir de una actividad muy simple relacionada con una estructura también muy simple. Actualmente esta actividad es muy compleja y tiene lugar en una estructura también muy compleja, y ambas están diversificadas de forma irreversible.

Otra característica fundamental de la integración de la actividad química es que todas las reacciones aparecen ordenadas en secuencias muy bien definidas en las que el producto final de una es el sustrato de la siguiente. Estas secuencias de reacciones se llaman **vías metabólicas** y algunas se inician en algún material del medio exterior, que debe pasar al protoplasma a través de las envueltas celulares. Otras terminan en productos que se liberan al medio exterior.

Cada cambio químico aislado de una vía metabólica está catalizado por un enzima. Muchos tipos de cambios requieren además un coenzima y, ocasionalmente, otros factores menos específicos, como por ejemplo la presencia de determinados iones. El **cambio químico realizado en una sola etapa** es muy simple y generalmente reversible. Existe un número relativamente reducido de cambios de este tipo, que pueden limitarse prácticamente a transferencias inter o intramoleculares de $-2H$, $-PO_3H_2$, $-NH_2$, $-SH$, CH_3CO- , $-CH_3$, aminoácidos y a carboxilaciones o descarboxilaciones. Concomitantemente pueden romperse o formarse nuevos enlaces $C-C$.

Muchas vías metabólicas tienen **carácter cíclico**, esto es: cualquier producto de la misma puede considerarse el final y el punto de partida.

Casi todas las vías metabólicas están relacionadas unas con otras y un mismo intermediario puede obtenerse por distintos caminos. No se puede actuar sobre una secuencia de reacciones sin afectar al resto.

Clásicamente, las vías metabólicas pueden tener una **función catabólica** o **anabólica**. Estrictamente, las primeras serían aquellas que partiendo de ciertos materiales exteriores terminan en otros productos más simples que se devuelven totalmente al medio exterior. La única finalidad de estas vías sería la producción de energía. Los productos finales son de menor peso molecular y globalmente la reacción tiene carácter oxidante.

La secuencia bioquímica de carácter anabólico conduce al incremento de protoplasma y por lo tanto supone siempre un balance de materia positivo para la fracción celular. Tiene carácter reductor y forma moléculas de mayor peso molecular que las de partida.

Alternativamente, también puede hacerse una separación en tres clases de vías metabólicas. Las de clase I comprenden **reacciones puramente degradativas** que conducen a productos finales que se liberan al exterior o a subunidades que son utilizadas ulteriormente para la biosíntesis; son sistemas fundamentalmente exoergónicos. Las vías metabólicas de la clase II tienen carácter biosintético y sus productos finales son **subunidades** y **coenzimas**. Las de clase III conducen a la **formación de macromoléculas** específicas a partir de subunidades. Estas macromoléculas son proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de envueltas.

En los microorganismos encontramos una gran diversidad de otras vías metabólicas que conducen a la formación de materiales que no forman ninguna estructura esencial para la célula bacteriana. Estos materiales se encuentran en proporción variable y generalmente pueden ser reutilizados para la formación de subunidades destinadas a la biosíntesis o para la obtención de energía, sin participación de ningún sustrato exterior. Se trata de los **metabolitos de reserva**.

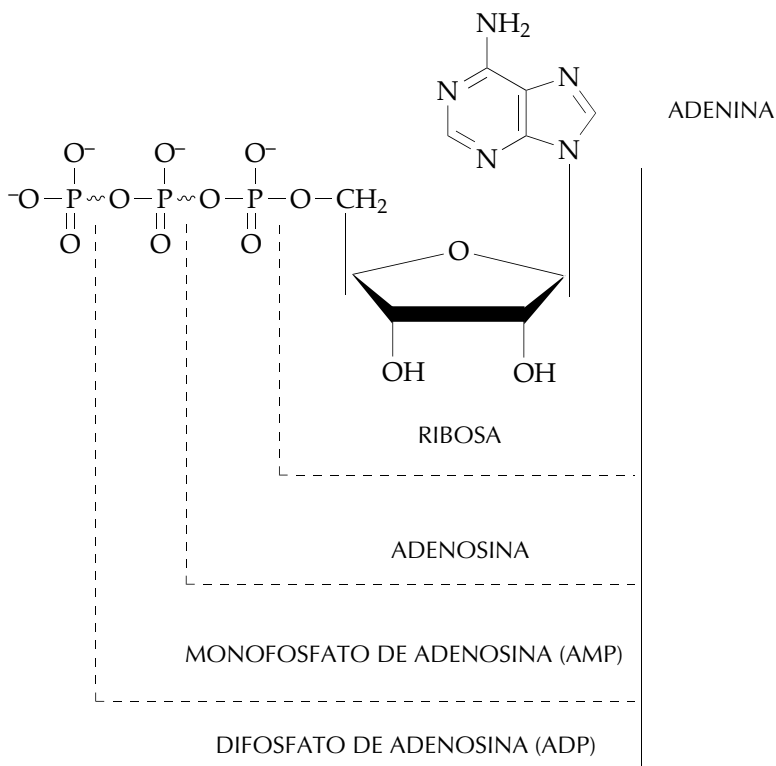
En determinadas condiciones de crecimiento muchos microorganismos pueden también dar lugar a la formación de grandes cantidades de algunos productos que no tienen función estructural ni de reserva. Generalmente se liberan al medio exterior, pero no son productos finales de reacciones degradativas sino de vías biosintéticas específicas. Entre ellos se encuentran antibióticos y otras sustancias que pueden ser de utilidad para el hombre. En algunos casos pueden ser artefactos metabólicos, pero en otros pueden tener sentido adaptativo. De forma general, estos productos se denominan **metabolitos secundarios**.

1.4 EL SUMINISTRO ENERGÉTICO

Las reacciones biosintéticas requieren suministro energético. Este suministro suele llevarse a cabo generando un sustrato activado con el cual la reacción puede tener lugar espontáneamente. Para la formación de sustratos activados es esencial la producción de dadores de energía libre cuyo tipo más general es el ATP.

Parte A: EL METABOLISMO
MICROBIANO

Capítulo 1: INTEGRACIÓN DE LA
TOTALIDAD DE LAS
TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE
LA BIOFASE



Trifosfato de adenosina (ATP)

Las reacciones biosintéticas son muy parecidas no sólo entre distintos microorganismos sino incluso a las de los organismos pluricelulares. Mucha mayor diversidad encontramos en los **sistemas suministradores de energía**, los cuales pueden ser divididos en tres grandes tipos: la **fotosíntesis**, la **oxidación de compuestos inorgánicos** y el **catabolismo** o **metabolismo degradativo de sustratos orgánicos**.

En general, la actividad química que conduce a la producción de energía es cuantitativamente mayoritaria. Además, si se comparan las bacterias o las levaduras con las células de los organismos superiores, en las primeras existe de modo característico una proporción aún mayor respecto de la actividad química total.

La biosíntesis es totalmente dependiente de la integridad metabólica, esto es, de la estructura y del sistema químico suministrador de energía. En cambio, la actividad de este último puede tener lugar en ausencia de biosíntesis y se mantiene en gran parte en los sistemas libres de células.

De acuerdo con el segundo principio de la termodinámica, cuando una reacción química libera energía, sólo una parte de la misma, llamada energía libre (ΔG), puede ser utilizada para desarrollar trabajo. El resto se pierde en forma de calor.

Las reacciones químicas reversibles ocurren espontáneamente en el sentido en el cual el cambio de energía libre sea negativo. Si todos

los productos están presentes en concentración molar, ΔG se llama energía libre específica (ΔG°), que está relacionada con la constante de equilibrio

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta y K la constante de equilibrio. Si K es mayor que 1, ΔG° será negativo y esto indica que la formación de los productos en el sentido considerado está favorecida. Si K es menor que 1, ΔG° será positivo y entonces la reacción no puede producirse. Esto es, si se aumenta la cantidad de alguno de los productos, se lleva a cabo en sentido opuesto hasta restablecer el equilibrio. Para una estequiometría determinada, el valor de ΔG° puede ser calculado de la diferencia entre $\sum \Delta G^\circ$ de los productos finales y $\sum \Delta G^\circ$ de los productos reaccionantes.

Cuando el ATP da lugar a la formación de un compuesto activado, el nivel de energía libre de este último aumenta, lo cual determina una situación termodinámicamente favorable en comparación con el sustrato sin activar. El valor de ΔG° pasa de un valor positivo a un valor negativo relativamente grande. Estos compuestos activados son intermediarios fosforilados.

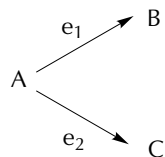
En la biosíntesis intervienen otros intermediarios que tienen un efecto activador parecido al ATP. En su formación participa generalmente el ATP, pero algunas veces se forman directamente como resultado de reacciones catabólicas. A este grupo pertenecen el GTP, UTP, CTP, dTTP (desoxitimidina trifosfato) y acetil-CoA.

1.5 LA REGULACIÓN METABÓLICA

Otra característica de la integración de la actividad química del protoplasma es su capacidad de modificarse ordenadamente según sean las condiciones del medio exterior. Estos cambios tienen sentido adaptativo y se llevan a cabo mediante mecanismos de regulación diversos.

Los mecanismos más sencillos de regulación metabólica son:

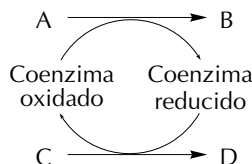
- a) El *bypass* metabólico. En este mecanismo dos enzimas compiten por un mismo sustrato.



- b) La represión de la síntesis de un enzima o la inhibición de su actividad. La inhibición de la actividad suele afectar al enzima que cataliza la primera etapa de una vía metabólica, y está controlada por el producto final de la misma (regulación *feedback*). Cuando crecen en un medio sintético, los microorganismos sintetizan en cantidades adecuadas todas las subunidades necesarias para la biosíntesis de macromoléculas, pero, por la exis-

tencia de este tipo de mecanismo, dejan de sintetizar una subunidad si ésta se añade al medio de cultivo. Por lo que respecta a la síntesis de enzimas implicados en procesos catabólicos, éstos sólo suelen sintetizarse cuando el sustrato catabólico está presente. Cuando hay dos sustratos, la bacteria utiliza primero uno y después el otro. El enzima que se sintetiza primero es siempre el que actúa sobre el sustrato que produce un crecimiento más rápido.

- c) Otro sistema de regulación metabólica es el de reacciones acopladas por un coenzima común. En este sistema, la forma del coenzima que requiere una reacción es la que se produce después de actuar en la otra.



- d) Todo el metabolismo se desarrolla en un sistema altamente heterogéneo y muchas actividades están localizadas en determinados orgánulos. Por lo tanto, la síntesis de los mismos regulará la intensidad de aquéllas. Tal es el caso de la síntesis proteica y la síntesis de RNA ribosómico.

Al considerar los aspectos estructurales hay que mencionar que las envueltas celulares tienen una capacidad importante de regular la entrada de productos al citoplasma y la salida de productos desde él. En algunos casos las bacterias son capaces de modificar la estructura de los compuestos que constituyen el medio exterior, generalmente degradándolos para obtener un conjunto de compuestos más heterogéneo y de estructura más sencilla, pero también formando cápsulas y limos. Esto les permite estar en contacto directo con un medio más favorable para conseguir un desarrollo mayor y más eficaz que el que correspondería a un medio de la misma composición pero de concentración homogénea.

Considerada en sí misma, la actividad química de las bacterias parece tener como objetivo único el uso de los nutrientes disponibles para conseguir formar cuanto antes dos células idénticas a la de partida. La coordinación de la actividad química y la existencia de los diversos mecanismos de regulación dan la impresión de que las bacterias están programadas para tal fin.

1.6 EL PRINCIPIO DE LA BIOQUÍMICA UNITARIA

La bioquímica empezó con el estudio de la fermentación alcohólica con extractos de levadura. El estudio de la glucólisis *in vitro* e *in vivo* se basó en dos materiales de trabajo: la levadura y el músculo. Esto seguramente fue el principio de la bioquímica comparada. Principalmente

gracias a la visión de Kluyver y Van Niel, hacia los años 30 se llegó al convencimiento de que las vías metabólicas de los distintos organismos tenían muchos aspectos comunes, independientemente de su naturaleza vegetal, animal o microbiana. Es por ello que de una forma general el metabolismo microbiano ha constituido un modelo cuyos resultados no sólo han servido para comprender mejor la actividad química de las bacterias sino la de toda la materia viva. En gran parte ha sido así porque el uso de las bacterias como material de experimentación es mucho más favorable que el de otros organismos y porque una parte de la historia de la biología, que va desde finales del pasado siglo hasta los años 40, está profundamente marcada por la huella de una fructífera interacción entre bioquímica y microbiología.

La semejanza entre las distintas vías metabólicas aboga en favor de una unidad de esquema de organización de todos los seres vivos y también en favor de su parentesco. Se considera que las secuencias bioquímicas son el resultado de una historia evolutiva paso a paso, en la cual ha sido la selección natural la que ha potenciado los modelos de organización más eficaces que pueden surgir de pequeñas variaciones dentro de una población homogénea. La evolución bioquímica tiene el mismo carácter neodarwiniano que la evolución morfológica.

Las grandes líneas de la evolución bioquímica ya se manifestaron en la organización de los procariotas. Dentro de ella encontramos la mayor simplicidad, la mayor diversidad y, en cierto sentido, la mayor complejidad. La inventiva bioquímica en la evolución biológica de los eucariotas ha sido importante pero relativamente menor. De aquí el gran interés del metabolismo bacteriano para la bioquímica comparada. También en ella encontramos una mejor comprensión de la diversidad de las bacterias, dada su relativa simplicidad morfológica y la práctica ausencia de testimonios fósiles.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

P*ARTE *B

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CRECIMIENTO DE LA BIOMASA MICROBIANA

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

2.1	LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	16
2.2	CONTENIDO DE AGUA DE LA BIOFASE	17
2.3	COMPOSICIÓN ELEMENTAL	18
2.4	FRACCIÓN ÁCIDO-SOLUBLE	18
2.5	PROTEÍNAS	19
2.6	ÁCIDOS NUCLEICOS	19
2.7	LÍPIDOS	20
2.8	HIDRATOS DE CARBONO	20
2.9	MOLÉCULAS EXCLUSIVAS DE LAS BACTERIAS	21
2.10	OTROS COMPONENTES MOLECULARES DE LA BIOMASA MICROBIANA	25
2.11	CONCLUSIONES GENERALES SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BIOFASE	27
	BIBLIOGRAFÍA	27

2.1 LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La cantidad de células disponible para el análisis depende de la concentración celular final obtenida y del volumen de los cultivos. El crecimiento microbiano cesa por agotamiento del sustrato, o porque éste deja de ser utilizable, y también a causa de que la acumulación de productos metabólicos alcanza niveles inhibidores. Para obtener el crecimiento máximo debe explotarse al máximo la capacidad metabólica del microorganismo, principalmente en relación con la fuente de energía, y, además, hay que eliminar o neutralizar los productos que se acumulan en el medio. La consecución de estos objetivos requiere un planteamiento diferente según sea el microorganismo.

Cuando la fuente de energía es un sustrato orgánico que puede ser oxidado completamente, lo primero es encontrar la cantidad adecuada del mismo y el suministro de oxígeno necesario. Así, por ejemplo, con *E. coli* creciendo en caldo ordinario (5 g de peptona y 3 g de extracto de carne por litro) se obtienen alrededor de 2×10^8 células/ml en la fase estacionaria del crecimiento o 5×10^9 cuando el medio esta dotado de agitación o aireación,. Esto significa que se obtiene poco más de 1 g de peso seco por litro o una producción del 15%, referida a la cantidad de nutrientes convertida en biomasa. En un medio constituido por un 2% de hidrolizado de caseína y un 1% de glucosa, con *Brucella suis*, que es bastante más pequeña que *E. coli*, se obtienen 8×10^{10} células/ml, lo que significa de 5 a 10 g/l de peso seco. En estos casos, son importantes la buena circulación del oxígeno con difusores apropiados, la agitación y la prevención de la formación de espuma con antiespumantes no tóxicos.

A menudo resultan apropiados para grandes producciones los medios de composición química definida en los que se pueda conseguir una utilización completa del sustrato energético y el mantenimiento del pH con un tampón apropiado. Evidentemente, el medio sintético debe contener las fuentes de N, S y P adecuadas, así como los factores de crecimiento necesarios para conseguir el máximo rendimiento. De este modo, con la misma *Brucella suis*, se puede alcanzar una concentración final de 10^{11} células/ml.

En los medios sintéticos puede aumentarse la producción utilizando una mezcla de sustratos. Así, con *Serratia marcescens*, que oxida tanto la glucosa como el citrato, se llegan a obtener 29 g/l de peso seco celular (2×10^{11} células/ml) con 57 g/l de glucosa y 20 g/l de ácido cítrico. El 40% del C asimilado se incorpora a la biomasa, en tanto que el resto es oxidado hasta CO_2 . Con *E. coli* se pueden obtener resultados semejantes utilizando, en lugar de citrato, malato u otro intermediario del ciclo de Krebs. Con levaduras se consiguen en medio sintético producciones de hasta 10 g/l de peso seco celular con la completa utilización de 100 g/l de glucosa.

Los sustratos oxidables pueden ser añadidos gradualmente para prevenir la inhibición del crecimiento debido a la alta presión osmótica. En sistemas de flujo continuo, bien regulados y con un reemplazamiento del medio no demasiado rápido, pueden obtenerse produccio-

nes de 13 g de peso seco $l^{-1} h^{-1}$ de levadura con completa utilización del azúcar. De todas formas, cuando se pretenden obtener producciones absolutas muy grandes, la construcción de fermentadores apropiados puede presentar problemas complejos de ingeniería en aspectos tales como la optimización del suministro de oxígeno, la mezcla del cultivo y la separación de las células.

Las altas producciones de bacterias aerobias y de levaduras conducen a una biofase que representa del 10 al 40% del volumen del cultivo. En estas circunstancias, los problemas de alimentación, aireación y separación celular pueden ser muy delicados, si bien en sí mismos no constituyen una limitación del crecimiento. Se ha de tener en cuenta que en el crecimiento de un cultivo sobre medios sólidos la producción alcanzada por gramo de nutriente utilizado no difiere de la que puede conseguirse con el mismo cultivo en medio líquido.

Con los microorganismos que crecen anaerobiamente o que sólo realizan una oxidación parcial del sustrato energético se plantean generalmente problemas más complicados. Cuando se producen ácidos, el control del pH es esencial y la naturaleza y concentración del tampón utilizado pueden ser críticos. Así, con las bacterias del ácido láctico se obtienen resultados mucho mejores con tampones de citrato o acetato que con fosfato o aminoácidos. El principio del doble sustrato es igualmente aplicable. Por ejemplo, el crecimiento de *Lactobacillus arabinosus* puede aumentar utilizando mezclas de glucosa y malato en lugar de glucosa sola. *Streptococcus faecalis* y *Saccharomyces cerevisiae* crecen anaerobiamente con glucosa, produciendo respectivamente 22 y 21 microgramos de peso seco celular por micromol de glucosa. Añadiendo arginina, en *S. faecalis* tenemos una producción adicional de 10 microgramos de peso seco por micromol de arginina. Estos crecimientos corresponden a producciones de alrededor del 12% en gramos de peso seco por gramo de glucosa y del 6% para la arginina. Ambos resultados muestran un crecimiento que depende de la capacidad de generar ATP a partir del sustrato. *S. faecalis* y *S. cerevisiae* obtienen 2 moles de ATP a partir de cada mol de glucosa fermentada, y *S. faecalis* obtiene 1 mol de ATP por mol de arginina fermentada a ornitina. En el desarrollo fermentativo siempre hay un crecimiento total fijo para cada microorganismo correspondiente a la utilización de una determinada cantidad de sustrato.

En conjunto es razonable asumir que no existe límite para la cantidad de células que se puede obtener por cultivo de microorganismos si se llegan a controlar suficientemente las condiciones óptimas de crecimiento. Sin embargo, las características metabólicas de algunos microorganismos hacen que su cultivo presente dificultades prácticamente infranqueables. Así, las bacterias del hierro requieren a la vez oxígeno y hierro en estado reducido, lo cual es muy difícil de conseguir en el laboratorio. En realidad, representan una adaptación marginal en el seno de medios bióticos naturales complejos.

2.2 CONTENIDO DE AGUA DE LA BIOFASE

Tal y como ha sido comentado anteriormente, las células pueden ser separadas del medio por centrifugación o filtración y posterior lavado. La biomasa húmeda obtenida pierde por secado a 105 °C de un 70 a un 90% de agua, según el microorganismo y las condiciones de crecimiento, una cantidad inferior a la que se encuentra en organismos superiores (90%).

Hay un agua intercelular y otra intracelular. La primera puede variar según el método de obtención de la masa húmeda y de los productos hidrofílicos (polisacáridos) o hidrofóbicos (lípidos) que se encuentren sobre las paredes celulares. El agua intercelular puede ser determinada por medio de proteínas marcadas isotópicamente, las cuales no penetran en la célula. Puede representar un 10-20% del volumen total de la masa húmeda.

2.3 COMPOSICIÓN ELEMENTAL

El análisis elemental se practica por los métodos de la química orgánica sobre una alícuota de la materia seca obtenida del crecimiento total de un cultivo. Para nuestro objetivo, el detalle de la composición elemental no tiene demasiado interés. Podemos señalar que proporciona un resultado global típico de la materia viva y que difiere poco de un microorganismo a otro. Como valores medios se obtiene un 50% de carbono, 20% de oxígeno, 14% de nitrógeno, 8% de hidrógeno, 3% de fósforo, 2% de potasio, 1% de azufre, 0,05% de calcio, magnesio y cloro, 0,2% de hierro y un total de elementos traza del 0,3% que comprenden manganeso, cobalto, cobre, zinc y molibdeno. A partir de estos datos se puede anticipar que la biomasa microbiana está formada de materia orgánica.

2.4 FRACCIÓN ÁCIDO-SOLUBLE

Es la que se obtiene por extracción con ácido tricloracético al 5% o ácido perclórico al 10% en frío, para minimizar la hidrólisis. Contiene moléculas orgánicas de bajo peso molecular y iones inorgánicos.

TABLA 2.1 Tipos y número aproximado de moléculas distintas de la fracción ácido-soluble.

Tipos de moléculas	Número de tipos
Aminoácidos, precursores y derivados	120
Nucleótidos, precursores y derivados	100
Ácidos grasos y sus derivados	50
Azúcares y sus precursores	250
Quinonas, poliisoprenoides, porfirinas, vitaminas, otros coenzimas, grupos prostéticos y sus precursores	300

Las moléculas orgánicas representan en *E. coli* unos 8 fg (femtogramos, 10^{-15} g) por célula. Hay centenares de tipos diferentes de moléculas que incluyen precursores de macromoléculas, intermediarios metabólicos y cofactores de enzimas (tabla 2.1).

La fracción ácido-soluble comprende un 8% del C total y un 20% del fósforo. Constituye una especie de medio interno en el que muchos compuestos están enormemente más concentrados que en el medio externo. Esto determina una alta presión osmótica, variable de un caso a otro (*Staphylococcus aureus*: 20-25 atmósferas, *E. coli*: 5-6 atmósferas). Hay que resaltar que esta fracción no presenta fragmentos de las grandes moléculas estructurales (proteínas y ácidos nucleicos). Su eventual liberación puede ir seguida de hidrólisis hasta pequeños fragmentos.

Los aniones más abundantes dependen de la composición del medio, pero siempre incluyen sulfato, fosfato y cloruro. El catión más abundante es el K^+ , que es el factor inorgánico más importante en la regulación de la presión osmótica. El Na^+ está ausente o se halla en pequeña proporción. También se encuentran concentraciones reducidas de NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} - Fe^{3+} , y, a concentraciones aún más bajas, Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} . El conjunto de moléculas inorgánicas sólo alcanza alrededor del 1% del peso seco, pero sus funciones son esenciales para el crecimiento.

2.5 PROTEÍNAS

Las proteínas pueden separarse de la fracción ácido-insoluble en caliente. Representan alrededor del 50% del peso seco de las células. Contienen el 60% del carbono celular y el 70% del azufre. Se cree que de un 15 a un 20% de las proteínas son, probablemente, lipoproteínas.

Se ha estimado que el número total de polipéptidos diferentes que se encuentran en *E. coli* es del orden de 1800, con un peso molecular medio de 40 kDa. El total de moléculas proteicas puede llegar a 2,5 millones por célula.

2.6 ÁCIDOS NUCLEICOS

Se pueden separar de la fracción alcohol-éter insoluble con ácido tricloroacético al 5% (30 min a 90 °C). Los dos componentes, RNA y DNA, pueden ser estimados colorimétricamente después de una hidrólisis sin ulterior separación. Las fracciones de RNA y DNA pueden separarse por su solubilidad selectiva en soluciones salinas, por hidrólisis alcalina del RNA, o por digestión con RNAsa o DNAsa seguida de una precipitación alcohólica de la fracción no digerida.

Las células de muchos microorganismos son muy ricas en RNA. En las bacterias y levaduras constituye el 20-25% del peso seco. El RNA preponderante es el ribosómico (rRNA) que se presenta en varias especies moleculares (23S, 16S y 5S) y constituye el 80% del RNA total. El RNA de transferencia (tRNA) constituye el 15% del total y tiene un peso molecular del orden de 25 kDa. Existen diferentes tipos de tRNA; así, por ejemplo, se estima que en *E. coli* hay unas 60 moléculas diferentes. Pero la abundancia de moléculas diferentes de tRNA varía

mucho de un microorganismo a otro. El conjunto de las poblaciones de RNA ribosomal y de transferencia recibe el nombre de RNA estable. Ello es así en contraposición al RNA mensajero (mRNA), que presenta generalmente una vida media corta (entre 0,5 y 10 min). Este último es el menos abundante (4% del RNA total).

La elevada proporción de RNA total y la baja estabilidad del mRNA son dos características asociadas al relativamente rápido crecimiento de muchos microorganismos.

El material genético de las bacterias está ordenado en una sola molécula de DNA llamada cromosoma. Además, las bacterias también pueden tener otras moléculas de DNA independientes, llamadas plásmidos, relativamente más pequeñas. Estas últimas constituyen una fracción variable y no esencial del genoma de la célula bacteriana. En los organismos eucariotas el DNA se encuentra en estructuras mucho más complejas que comprenden varios cromosomas propiamente dichos, puesto que el nombre de cromosoma se aplica en las bacterias solamente en sentido análogo.

El cromosoma de *E. coli* se conoce con notable precisión. Representa 9 femtogramos por célula y está formado por una doble cadena de DNA cerrada covalentemente que contiene unos 4 720 000 pares de bases. Totalmente extendida alcanzaría 1 mm de longitud. Sin embargo, dentro de la célula se encuentra convenientemente plegada de modo que su longitud es unas 500 veces menor.

2.7 LÍPIDOS

La fracción ácido-insoluble puede ser tratada con alcohol o alcohol-éter a 40-50 °C para extraer algunos lípidos. Sin embargo, otras moléculas de este tipo sólo se separan con disolventes después de una enérgica hidrólisis con HCl concentrado (6 N a 100 °C durante varias horas). Claramente, la mayor parte de estos lípidos deben formar parte de estructuras moleculares más complejas de la pared celular o de la membrana protoplasmática.

En *E. coli* los lípidos totales contienen del 10 al 15% del carbono total de la célula y una proporción semejante del peso seco. Se encuentran repartidos entre la pared celular y la membrana protoplasmática. Algunas bacterias acumulan poli- β -hidroxibutirato, que es una eficaz reserva energética. En las micobacterias se encuentran lípidos estructurales especiales que pueden llegar a constituir el 10% del peso seco.

Excluyendo el lipopolisacárido, los lípidos de *E. coli* son fosfolípidos (fig. 2.1). Los ácidos grasos más frecuentes que se encuentran en estas moléculas son el palmítico (43%), el palmitoleico (33%) y el cis-vaccénico (25%).

2.8 HIDRATOS DE CARBONO

Se encuentran formando parte de los ácidos nucleicos, en oligosacáridos de la fracción ácido-soluble, como polisacáridos extracelulares (cápsulas y limos) y formando parte de moléculas complejas en la pared celular.

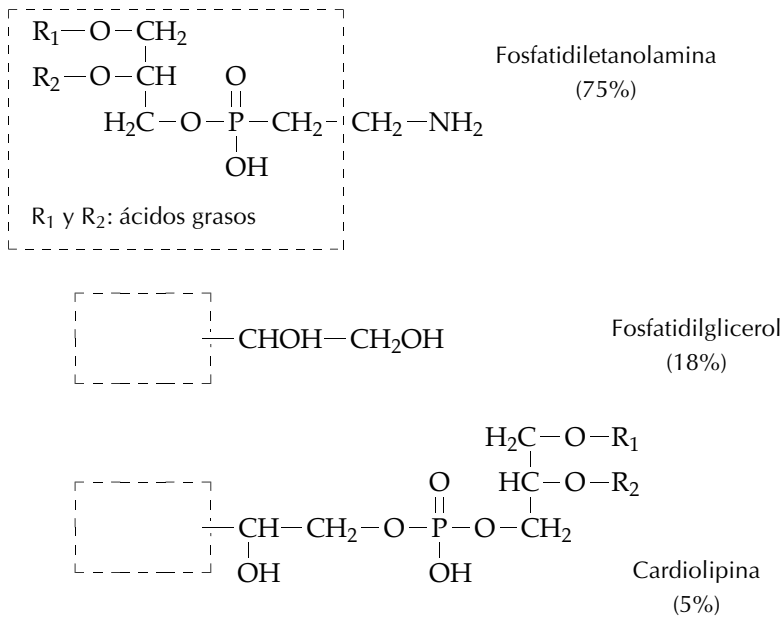


Figura 2.1 Fosfolípidos de *Escherichia coli*.

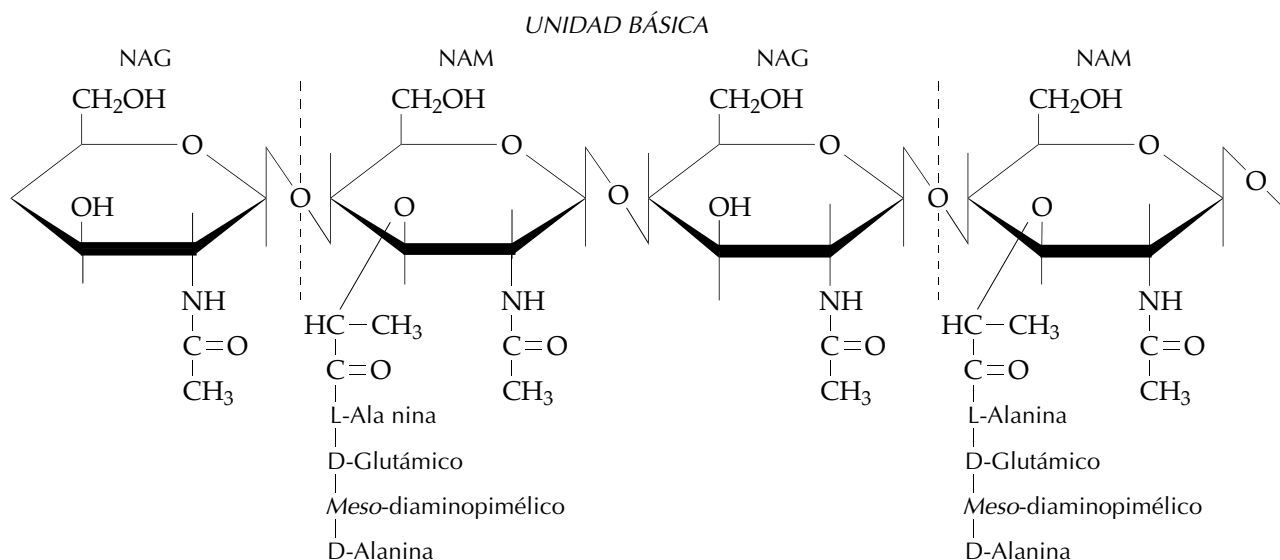
También se encuentran polisacáridos como reserva energética en forma de gránulos. En *Clostridium* se acumula almidón o granulosa, y en las enterobacteriáceas y las levaduras se acumula una sustancia análoga al glucógeno. Son reservas energéticas que pueden almacenarse en gran cantidad cuando se dispone de sustrato en el medio exterior y el crecimiento está impedido por falta de algún nutriente imprescindible. Un caso particular es el de *Acetobacter xylinum*, que forma celulosa que es extruida al medio en forma de fibras. Esto constituye un fenómeno único en el mundo procariota.

2.9 MOLÉCULAS EXCLUSIVAS DE LAS BACTERIAS

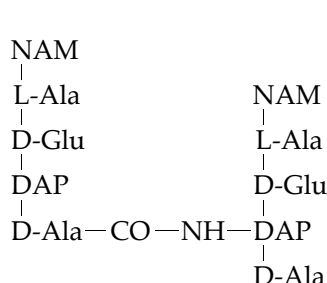
Todos los componentes de la biomasa microbiana referidos antes se encuentran también, en líneas generales, en cualquier tipo de materia viva. Las bacterias presentan además cuatro moléculas importantes en exclusividad: la mureína, el lipopolisacárido, los ácidos teicoicos y los ácidos lipoteicoicos.

La mureína es un peptidoglicano que se encuentra en todas las bacterias, con excepción de las arqueobacterias y los mollicutes (micoplasmas). Constituye la mayor parte de la pared celular y es responsable de la forma de la célula y de su integridad estructural, proporcionando rigidez a la misma.

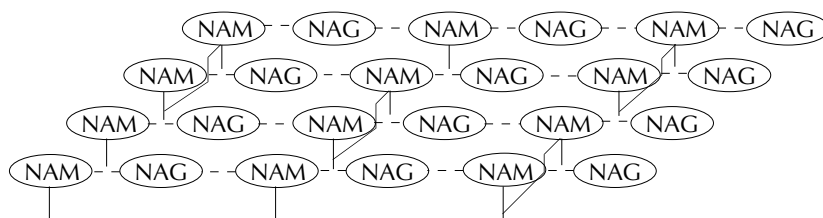
La mureína está compuesta de restos de *N*-acetilglucosamina (NAG) y de ácido *N*-acetil murámico (NAM), unidos alternativamente por enlaces β -1,4-glucosídicos. Hay un tetrapéptido unido al NAM que puede unirse a su vez con el tetrapéptido de una cadena adyacente (fig. 2.2).



(a)



(b)



(c)

NAM: ácido *N*-acetil murámico

NAG: *N*-acetilglucosamina

Figura 2.2 Diagrama de la mureína de *E. coli*. (a) Esquema de la unidad básica repetida del peptidoglicano. (b) Enlace peptídico que posibilita la unión de cadenas lineales. (c) Estructura de la red formada por cadenas de peptidoglicano unidas por enlaces peptídicos. Algunas cadenas peptídicas quedan libres.

La estructura del lipopolisacárido (LPS) varía de una bacteria a otra, e incluso entre diferentes cepas, pero se presenta en todas las bacterias gramnegativas. Una subunidad del lipopolisacárido de *Salmonella* podría representarse como se indica en la figura 2.3.

El lípido A es un disacárido de glucosamina fosforilado y esterificado con distintos ácidos grasos (R_{12} : dodecanoico, R_{14} : tetradecanoico, R_{16} : hexadecanoico y OH- R_{14} : 3-hidroxitetradecanoico). El núcleo es un oligosacárido que comúnmente incluye L-glicero-d-manoheptosa y ácido ceto-desoxi-octanoico (3-desoxi-D-manooctulosómico). El lípido A y el núcleo correspondientes al LPS de las distintas enterobacteriáceas parecen ser semejantes. La cadena O, que es

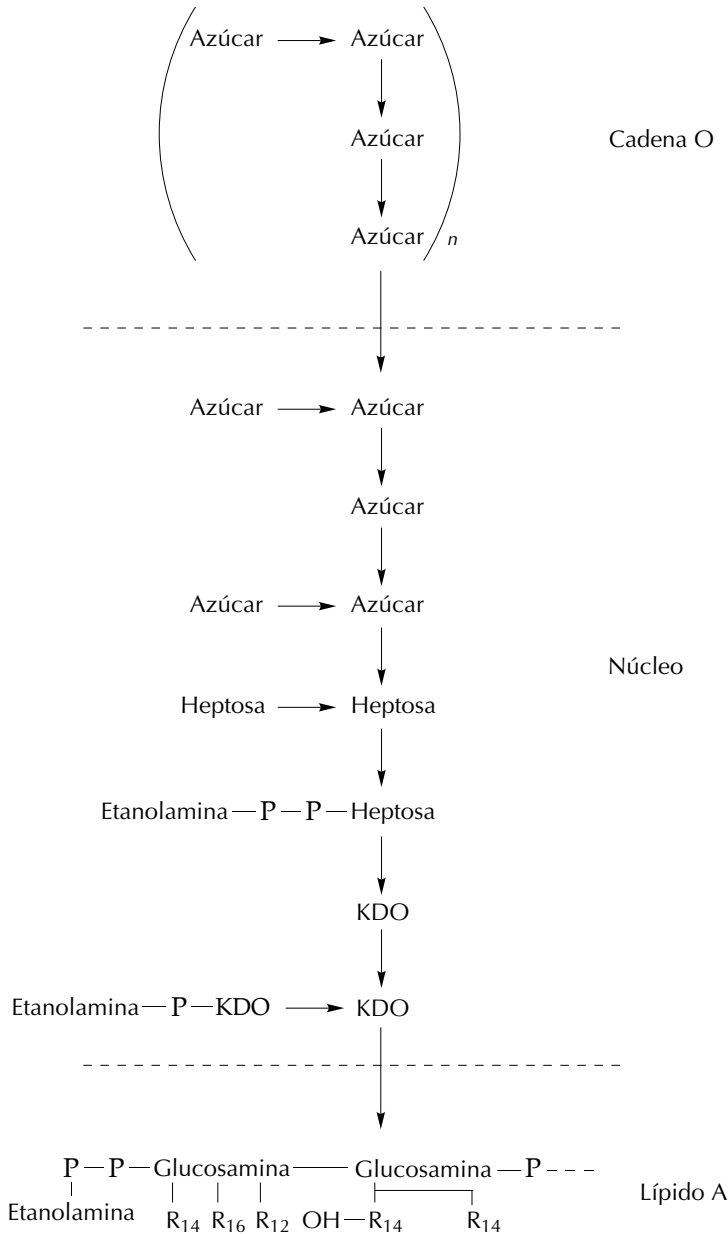


Figura 2.3 Subunidad del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella* (véase texto).

específica de cada cepa, tiene mayor longitud que el núcleo y está formada por la repetición de varias subunidades de tri-, tetra- o pentasacáridos, constituidos por azúcares poco comunes.

Las bacterias grampositivas no tienen LPS, pero pueden presentar ácidos teicoicos asociados a la mureína. Se trata de polímeros del glicerol o del ribitol unidos por enlaces fosfodiéster y con uno o más aminoácidos como sustituyentes (fig. 2.4).

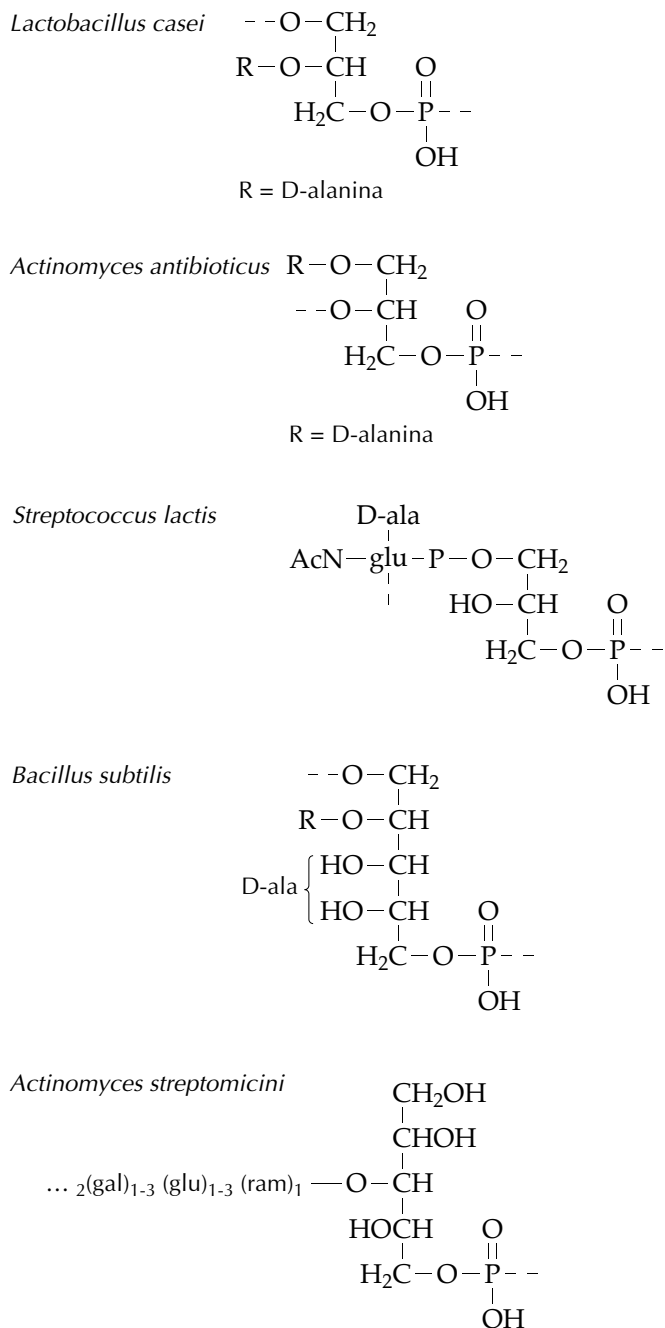


Figura 2.4 Ejemplos de ácidos teicoicos.

Más recientemente (1987-1993), se ha descrito otro tipo de moléculas complejas que se encuentran en muchas bacterias grampositivas. Se trata de los llamados ácidos lipoteicoicos (LTA) y los lipoglucanos, los cuales tienen carácter macroanfílico y están anclados en la membrana

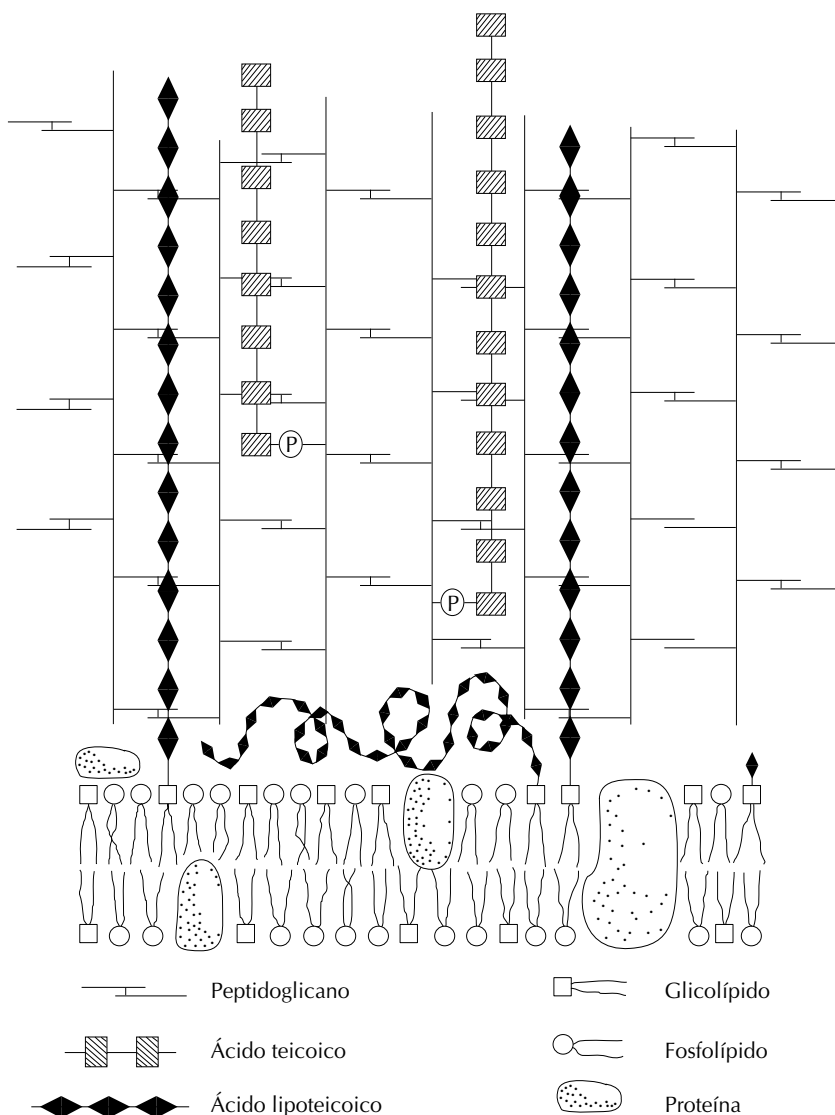


Figura 2.6 Modelo del complejo membrana protoplasmática-pared celular en las bacterias grampositivas. Los LTA están anclados hidrofólicamente, en tanto que los ácidos teicoicos (TA) se unen covalentemente al peptidoglicano.

También en muchas bacterias podemos encontrar ácido fosfórico altamente polimerizado. Los gránulos de polimetáfosfato son una reserva energética. Son conocidos como volutina o gránulos metacromáticos por su característica de cambiar el color de los colorantes que incorporan en las preparaciones microscópicas.

Otra molécula que sólo se halla en las bacterias es el ácido dipicolínico (ácido piridín-2-6-dicarboxílico), encontrado en las esporas de *Clostridium* y *Bacillus* (10-15% del peso seco de las esporas). Durante la germinación se libera al medio.

La biomasa microbiana que se obtiene a partir de cultivos puros es químicamente compleja. No obstante, actualmente existen recursos analíticos suficientes para definir cuantitativa y cualitativamente cualquier tipo de molécula presente en la misma. Ello no impide reconocer que la definición precisa de una molécula de LPS o de LTA sea un problema de gran complejidad.

Es sumamente importante tener presente que para una cepa determinada, un medio de cultivo definido y unas condiciones de desarrollo constantes, se encuentra siempre la misma composición. En cambio, ésta puede variar de un microorganismo a otro. Los cambios relativos al medio y a las condiciones de cultivo son reversibles y pueden ser predecibles.

Una gran parte de la composición química de los microorganismos es semejante a la de otros organismos. Sin embargo, aquéllos presentan algunas características peculiares que merecen ser tenidas en cuenta: el alto contenido de ARN y la presencia de moléculas específicas de alto significado fisiológico como la mureína, el LPS, los AT y los LTA. Aparte de esto, pueden encontrarse singularidades menores que caracterizan a algunos microorganismos particulares.

BIBLIOGRAFÍA

- SOKATCH, J. R. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Academic Press. New York and London 1969.
- REAVELEY, D. A. y BURGE, R. F. *Walls and Membranes in Bacteria*. *Advances in Microbial Physiol.* (Ed. by a. H. Rose and D. W. Tempest). v. 7. Academic Press. New York and London, 1972.
- NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J., SCHACHTER, M. *Physiology of the Bacterial cell. A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 1990.
- FISCHER, W. *Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids*. *Handbook Lipid Resch.* 1990; 6:123.
- FISCHER, W. *Lipoteichoic acids and lipoglycans*. En "Bacterial Cell Wall" (J.-M. Gluysen y R. Hakenbeck, eds.). Elsevier Science B. V. Amsterdam 1994.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

3

CINÉTICA DEL CRECIMIENTO

3.1 CULTIVO DISCONTINUO ("BATCH CULTURE")	30
3.2 CULTIVO CONTINUO	34
BIBLIOGRAFÍA	36

3.1 CULTIVO DISCONTINUO ("BATCH CULTURE")

Cuando una fracción de células de un cultivo puro es inoculada en un determinado volumen de medio fresco, después de una incubación, se produce un incremento de la biomasa hasta un valor máximo denominado crecimiento total. Este proceso comporta crecimiento celular propiamente dicho y aumento del número de células por autoduplicación. La biomasa es un catalizador de una reacción que produce más biomasa idéntica a la de partida.

Para poder cuantificar el aumento del número de células de la población, es importante limitarnos aquí a microorganismos que se multiplican por división binaria, tal y como sucede con la mayoría de las bacterias. Si consideramos el crecimiento de una única célula en condiciones ambientales que no imponen ninguna restricción a su multiplicación, el crecimiento de dicha célula, que se divide de forma binaria, sigue una progresión geométrica de base 2, es decir:

$$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \dots 2^n$$

Si la población inicial, en vez de estar formada por una célula, está formada por N_0 células, el número final de células que habrá en un momento dado (N_1) dependerá, obviamente, del número de generaciones que hayan tenido lugar (n), y será:

$$N_1 = N_0 \cdot 2^n \quad (1)$$

o, tomando logaritmos:

$$\log N_1 = \log N_0 + n \cdot \log 2 \quad (2)$$

Conociendo experimentalmente N_0 y N_1 , el número de generaciones n puede determinarse por la ecuación:

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \quad (3)$$

Como el $\log 2$ es igual a 0,301, puede escribirse también:

$$n = 3,32 (\log N_1 - \log N_0) \quad (4)$$

Estos cálculos permiten determinar con facilidad el número de generaciones que ha tenido lugar en una población que ha incrementado su número de células de N_0 a N_1 . Es importante resaltar aquí que estas fórmulas son válidas para cualquier organismo vivo que prolifere por división binaria.

El factor que puede introducirse ahora hace referencia al tiempo necesario para que N_0 células se conviertan en N_1 . Este factor sí que es característico de cada microorganismo y puede variar enormemente de uno a otro. La introducción del factor tiempo (t) implica necesaria-

mente la aparición del concepto de velocidad de multiplicación (R), o número de generaciones por unidad de tiempo:

$$R = \frac{n}{t} \quad (5)$$

Si el valor de n se obtiene de la ecuación (4), tenemos:

$$R = \frac{3,32(\log N_1 - \log N_0)}{t} \quad (6)$$

Un concepto que suele utilizarse para caracterizar el crecimiento microbiano es el llamado tiempo de generación g que es el tiempo necesario para que se duplique la población:

$$g = 1/R = t/n \quad (7)$$

El planteamiento matemático realizado hasta ahora es un modelo teórico, que si bien nos posibilita una aproximación interesante para la determinación de una serie de parámetros que caracterizan el crecimiento microbiano, presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, hay que tener en cuenta que no todas las células de un cultivo se dividen, por lo que, en conjunto, el cultivo presentará un valor de g algo mayor que el calculado a partir de la ecuación (7).

Una aproximación matemática más precisa se basa en considerar el mismo sistema referido anteriormente, es decir, células creciendo en condiciones no restrictivas, como un sistema autocatalítico y analizar los cambios que se producen en la biomasa en intervalos infinitesimales de tiempo en lugar de estudiar el promedio de cambios en el número de células que tienen lugar a lo largo de un periodo de tiempo. En estas condiciones, el aumento de biomasa a lo largo del tiempo es proporcional a la biomasa existente, por lo que sigue la cinética de una reacción de primer orden.

En términos matemáticos, esto puede expresarse como:

$$dN/dt = \mu N \quad (8)$$

Aquí y en adelante, N puede ser cualquier parámetro que refleje la biomasa, como el número de células, pero también podría ser la cantidad de proteína, de ácidos nucleicos, etc. Por otro lado, t es el tiempo y μ una constante de proporcionalidad que se denomina constante de la fase de crecimiento o velocidad específica de multiplicación. Es importante mencionar aquí que μ no es la velocidad de crecimiento (dN/dt), sino un valor que refleja la capacidad del microorganismo de incrementar su biomasa en un medio determinado.

Si integramos la ecuación (8) entre N_0 y N_1 , tenemos:

$$\ln (N_1/N_0) = \mu t \quad (9)$$

También con este planteamiento matemático puede calcularse el tiempo de generación, g , a partir de la ecuación (9). Si g es el tiempo necesario para la duplicación de la población, tendremos que $N_1 = 2 N_0$ y $t = g$. Sustituyendo:

$$\ln 2 = \mu \cdot g, \quad \text{o} \quad g = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,693/\mu \quad (10)$$

Si comparamos las ecuaciones (7) y (10):

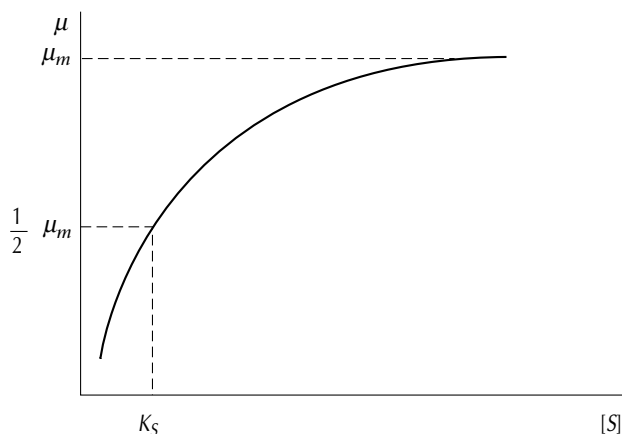
$$g = 1/R \quad g = 0,693/\mu$$

entonces:

$$\mu = 0,693 \cdot R$$

Esto significa que R es mayor que μ . Este hecho hay que interpretarlo pensando que μ refleja la tasa de crecimiento instantánea, y que esta se toma como si se mantuviese constante desde el momento en que una célula resultante de una división empezase a crecer. En la práctica, al final del ciclo celular, la tasa de síntesis de biomasa es prácticamente el doble que al principio. Por ello R , que representa el promedio de lo que ocurre durante el periodo de duplicación, es mayor que μ .

Otra pregunta interesante es si μ varía con la concentración del sustrato de crecimiento ($[S]$). Si los valores de μ obtenidos con diferentes concentraciones de sustrato se representan gráficamente, se obtiene:



La curva obtenida es muy parecida a la descrita para la catálisis enzimática. Monod demostró que la ecuación de esta curva es:

$$\mu = \mu_m \times \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (11)$$

donde μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento para valores de $[S]$ no muy alejados de aquellos para los que deja de ser limitante para el crecimiento. K_s es la constante de saturación, igual a la

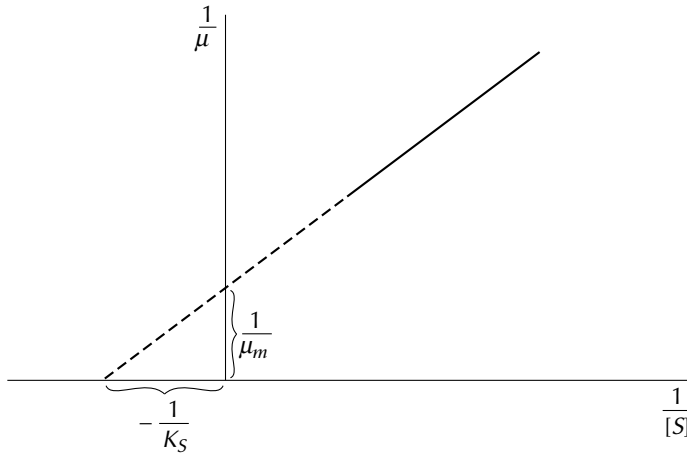


Figura 3.1 Determinación de la K_s para un sustrato determinado.

concentración de sustrato que reduce la velocidad específica de crecimiento a $\frac{1}{2} \mu_m$.

La ecuación (11) se parece mucho a la ecuación de Michaelis-Menten para la cinética de los sistemas enzimáticos. De este modo también puede aplicarse el método de Lineweaver-Burk para la determinación más precisa de K_s y μ_m . La ecuación (11) puede expresarse también como:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s + [S]}{\mu_m \times [S]} = \frac{1}{[S]} \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} \quad (12)$$

Llevando a una gráfica los valores de $1/\mu$ como ordenadas y los de $1/[S]$ como abscisas, puede calcularse la K_s (fig. 3.1).

A la hora de establecer una relación entre la concentración de sustrato y la tasa de crecimiento bacteriana, es muy importante tener en cuenta que las bacterias incorporan la mayoría de los nutrientes por mecanismos de transporte activo o de translocación de grupo. Ello implica que incluso cuando un nutriente está notablemente diluido en el medio, su concentración citoplasmática es máxima. Por ello, bajas concentraciones de sustrato proporcionan ya una μ_m . Así, *Escherichia coli* ya crece con una tasa máxima de crecimiento en medios con una concentración de glucosa de 0,004 mM (0,72 mg · l⁻¹).

Monod también demostró experimentalmente que existe una relación constante entre el crecimiento de un cultivo y la cantidad de sustrato utilizado:

$$dN/dt = Y dS/dt \quad (13)$$

Donde Y es el llamado factor de producción. Durante la fase exponencial:

Y = peso de biomasa formada/peso de sustrato consumido

Cuando se conocen los valores de μ_m , K_s e Y se tiene una descripción cuantitativa completa del desarrollo de un ciclo del cultivo discontinuo.

3.2 CULTIVO CONTINUO

En la práctica, las condiciones de crecimiento no restrictivas indicadas en el apartado anterior solamente perduran durante un tiempo limitado. Tanto el agotamiento de los nutrientes como la producción de metabolitos inhibidores del crecimiento por parte de la biomasa en desarrollo producen condiciones en las que el crecimiento microbiano cesa. Una alternativa para mantener la población indefinidamente en crecimiento en condiciones no restrictivas lo constituye el cultivo continuo. El cultivo continuo se inicia del mismo modo que el discontinuo. Si cuando se alcanza la fase logarítmica se añade medio fresco a una velocidad adecuada para mantener la densidad de población en un valor constante e inferior al valor máximo de la fase estacionaria, el crecimiento puede continuar indefinidamente. Sin embargo, la velocidad de entrada y el volumen de cultivo crecerán exponencialmente con la biomasa, a no ser que se vaya eliminando un volumen de cultivo igual al del medio fresco que va entrando. El sistema de volumen constante tiene un intercambio energético fijo y la biofase produce un mínimo de entropía.

En un quimiostato los microorganismos crecen a una velocidad específica constante inferior a μ_m . En el recipiente de cultivo, que tiene un volumen V , entra un flujo constante F de medio de cultivo fresco. Este medio tiene todos los nutrientes a una concentración no limitante, a excepción de uno que se halla a una concentración limitante para una velocidad de crecimiento determinada. El volumen V se mantiene constante porque simultáneamente se elimina un flujo F de medio modificado por la actividad metabólica que además lleva células producto del crecimiento. El caudal de entrada F , determina la velocidad de dilución:

$$D = F/V$$

La velocidad específica de multiplicación μ depende de la dilución, esto es, del número de volúmenes de cultivo que pasan por el recipiente de cultivo en la unidad de tiempo. Si la dilución es constante, la concentración de sustrato también será constante y habrá una velocidad específica de crecimiento $\mu = D$ que determina un estado estacionario que puede mantenerse indefinidamente.

La concentración efectiva de sustrato puede expresarse por:

$$[S]_x = [S]_0 - [S]$$

donde $[S]_0$ es la concentración de sustrato en el depósito de medio fresco y $[S]$ la concentración en el recipiente de cultivo. Si $[S]_x = 0$, el sustrato no es utilizado y no hay crecimiento. Para que haya crecimiento, $[S]_x$ debe ser mayor que 0. Aumentando $[S]_0$, puede conseguirse un valor de $[S]$ que dé una μ próxima a μ_m .

La velocidad específica de crecimiento μ será próxima a μ_m si pueden satisfacerse las siguientes condiciones: (a) medio de cultivo perfectamente agitado, (b) cultivo homogéneo, (c) que las propiedades del cultivo sean prácticamente constantes a altas concentraciones de

sustrato ($S \gg K_s$) y (d) que todos los demás componentes del medio estén en exceso. Recordando la ecuación (8):

$$dN/dt = \mu N$$

Si μN es ahora compensado por la salida de biomasa del volumen de cultivo DN , el cambio neto de concentración de biomasa con el tiempo será:

$$\begin{aligned} \text{Incremento} &= \text{Crecimiento} - \text{Pérdida} \\ dN/dt &= \mu N - DN \\ dN/dt &= N(\mu - D) \end{aligned} \quad (14)$$

Si $\mu > D$, dN/dt será positivo y la concentración de microorganismos en el cultivo aumentará con el tiempo. Si $\mu < D$, dN/dt será negativo y la concentración celular disminuirá, esto es, el cultivo se irá lavando fuera del recipiente de cultivo. Únicamente cuando $\mu = D$ será $dN/dt = 0$ y la concentración de microorganismos en el recipiente de cultivo permanecerá constante. Esta es la situación de estado estacionario, en la que:

$$D = \mu = \mu_m \times \left(\frac{[S]}{K_s + [S]} \right) = \frac{\ln 2}{g} \quad (15)$$

El estado estacionario no es difícil de conseguir, porque, al estar limitada por el suministro del sustrato, la velocidad específica de crecimiento cambiará con la dilución. Si esta última es constante, el sistema tiende a equilibrarse.

Cuando la velocidad de dilución aumenta, $D > \mu$ y, entonces, dX/dt se hace negativo y la biomasa decrece. Esto conduce a una menor utilización sustrato, lo cual, para $\mu < \mu_m$, conduce a un aumento de la velocidad de crecimiento por incremento de $[S]$. La velocidad de crecimiento no puede sobrepasar μ_m y, por lo tanto, hay una dilución crítica D_c por encima de la cual el cultivo será definitivamente lavado.

Puesto que μ depende de $[S]$, es necesario considerar no sólo el efecto de la dilución sobre la velocidad específica de crecimiento, sino también el efecto de la dilución sobre la concentración de sustrato $[S]$ y la biomasa (N) en el cultivo.

El sustrato entra en el recipiente de cultivo a la concentración $[S]_0$, es consumido por el microorganismo y emerge en el efluente a la concentración $[S]$. De este modo, el cambio neto en la concentración de sustrato es:

$$\begin{aligned} \text{Incremento de sustrato} &= \text{Entrada} - \text{Salida} - \text{Consumo} \\ d[S]/dt &= D[S]_0 - D[S] - (\text{Crecimiento/Producción}) \\ d[S]/dt &= D[S]_0 - D[S] - (\mu N/Y) \end{aligned}$$

Reordenando la ecuación y sustituyendo μ por la ecuación (11):

$$\frac{d[S]}{dt} = D([S]_0 - [S]) - \frac{\mu_m \times N}{Y} \left(\frac{[S]}{K_s + [S]} \right) \quad (16)$$

De modo semejante, μ puede ser sustituida en la ecuación (14), con lo cual tendremos:

$$\frac{dN}{dt} = N \left[\mu_m \left(\frac{[S]}{K_s + [S]} \right) - D \right] \quad (17)$$

Las ecuaciones, (16) y (17) definen cuantitativamente el comportamiento del cultivo en el quimiostato y la capacidad autorreguladora del sistema.

En estado estacionario, las ecuaciones (16) y (17) son 0 y por lo tanto, los valores de N y $[S]$ pueden ser calculados. En la ecuación (16) tenemos:

$$D([S]_0 - [S]) = \frac{\mu_m N}{Y} \left(\frac{[S]}{K_s + [S]} \right)$$

y en (17):

$$D = \mu_m ([S]/(K_s + [S]))$$

con lo que, operando:

$$[S] = K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \quad (18)$$

y

$$N = Y \left[[S]_0 - K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right] \quad (19)$$

Los valores de K_s , μ_m e Y pueden determinarse en un cultivo discontinuo y aplicarse a las ecuaciones (18) y (19). Entonces pueden variarse $[S]_0$ y D para obtener un gran número de estados estacionarios para distintas concentraciones celulares (N). La única restricción es que $[S]_0$ debe permanecer dentro del margen que permita que el sustrato sea el factor limitante del crecimiento.

El quimiostato controla la velocidad de crecimiento con ayuda de dilución y una sustancia limitante del crecimiento. Para diluciones grandes la estabilidad de la población es difícil. Cuando la velocidad de crecimiento no resulta estrechamente ligada a la densidad de población, el estado estacionario tampoco resulta fácil. Entonces puede utilizarse otro recurso que permite una regulación directa de la densidad de población mediante una célula fotoeléctrica que emite señales al desviarse de una determinada turbidez, las cuales permiten aumentar o disminuir la entrada de medio fresco para volver al valor deseado. Esto constituye el fundamento del cultivo continuo en el turbidostato, que puede utilizarse en conjunción con el quimiostato incluso cuando el sustrato no es el factor limitante del crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Deuxième édition. Hermann. Paris 1958.
- TEMPEST, P. W. The continuous cultivation of microorganisms. I. Theory of the chemostat. En "Methods in Microbiology" (J. R. Norris y D. W. Ribbons, eds.), vol. 2, p. 259. Academic Press, New York. 1970.

P_{ARTE} C

PRODUCTOS FINALES DEL CATABOLISMO

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

4.1	LAS LEVADURAS	40
4.2	ALGUNAS REFERENCIAS HISTÓRICAS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS LEVADURAS A LA BIOQUÍMICA	42
4.3	EFFECTO PASTEUR	43
4.4	CULTIVO, SISTEMAS CELULARES Y EXTRACTOS	44
4.5	FERMENTACIONES DE LA GLUCOSA	45
4.5.1	Fermentación alcohólica	45
4.5.2	Fermentación glicérica con sulfito	47
4.5.3	Fermentación aceto-glicérica	47
4.5.4	Fermentación pirúvico-glicérica	48
4.6	ACEITE DE FUSEL Y ÁCIDO SUCCÍNICO	48
4.7	DESARROLLO AEROBIO	50
4.8	ASIMILACIÓN OXIDATIVA Y FERMENTATIVA DE LA GLUCOSA	50
4.9	FERMENTACIÓN ENDÓGENA	52
	BIBLIOGRAFÍA	52

4.1 LAS LEVADURAS

Desde hace tiempo existe un acuerdo general en denominar levaduras a los hongos que presentan predominantemente carácter unicelular. La reproducción vegetativa tiene lugar habitualmente por gemación. En comparación con los otros grandes grupos de microorganismos, las levaduras presentan escasa diversidad (39 géneros, 350 especies). No constituyen una unidad taxonómica propiamente dicha. Este grupo está formado por especies relacionadas con distintos grupos de hongos filamentosos. Muchos hongos pueden presentar dos fases: micelial y unicelular. Las levaduras sólo se presentan en forma de células aisladas o, como mucho, pseudomicelios. Se reproducen por ascosporas o sólo asexualmente por gemación o división binaria. Las características generales de las levaduras por las que se las diferencia entre sí son más bien fisiológicas que morfológicas. En observación microscópica se las distingue a primera vista de las algas por no poseer pigmentación verde, de los protozoos por presentar pared rígida y ser inmóviles, y de las bacterias por presentar un tamaño mucho mayor.

Las levaduras son organismos eucariotas. En la figura 4.1 se representa un diagrama de una célula de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) en reposo divisional. La figura 4.2 representa la estructura molecular del principal componente de la pared celular de las algas, las levaduras y las bacterias.

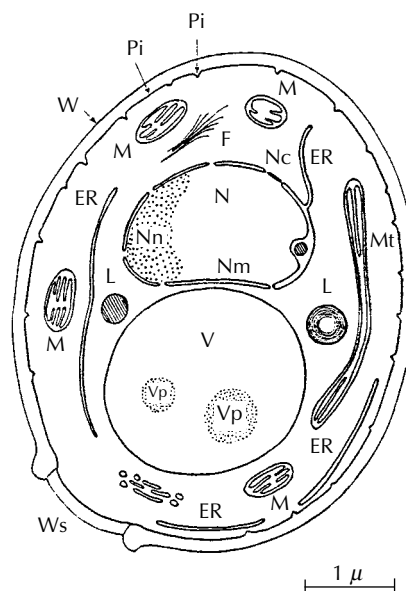


Figura 4.1 Diagrama de una célula de levadura de pan en reposo divisional. ER indica retículo endoplasmático; F, filamentos; G, aparato de Golgi; L, gránulo de lípidos (esferosoma); M, mitocondrias; Mt, mitocondrias filiformes; N, núcleo; Nc, placa centriolar; Nm, membrana nuclear; Nn, nucleolo; Pi, invaginación; Pl, plasmalema; V, vacuola; Vp, gránulo de polimetáfosfato (volutina); W, pared celular; y Ws, cicatriz de gemación.

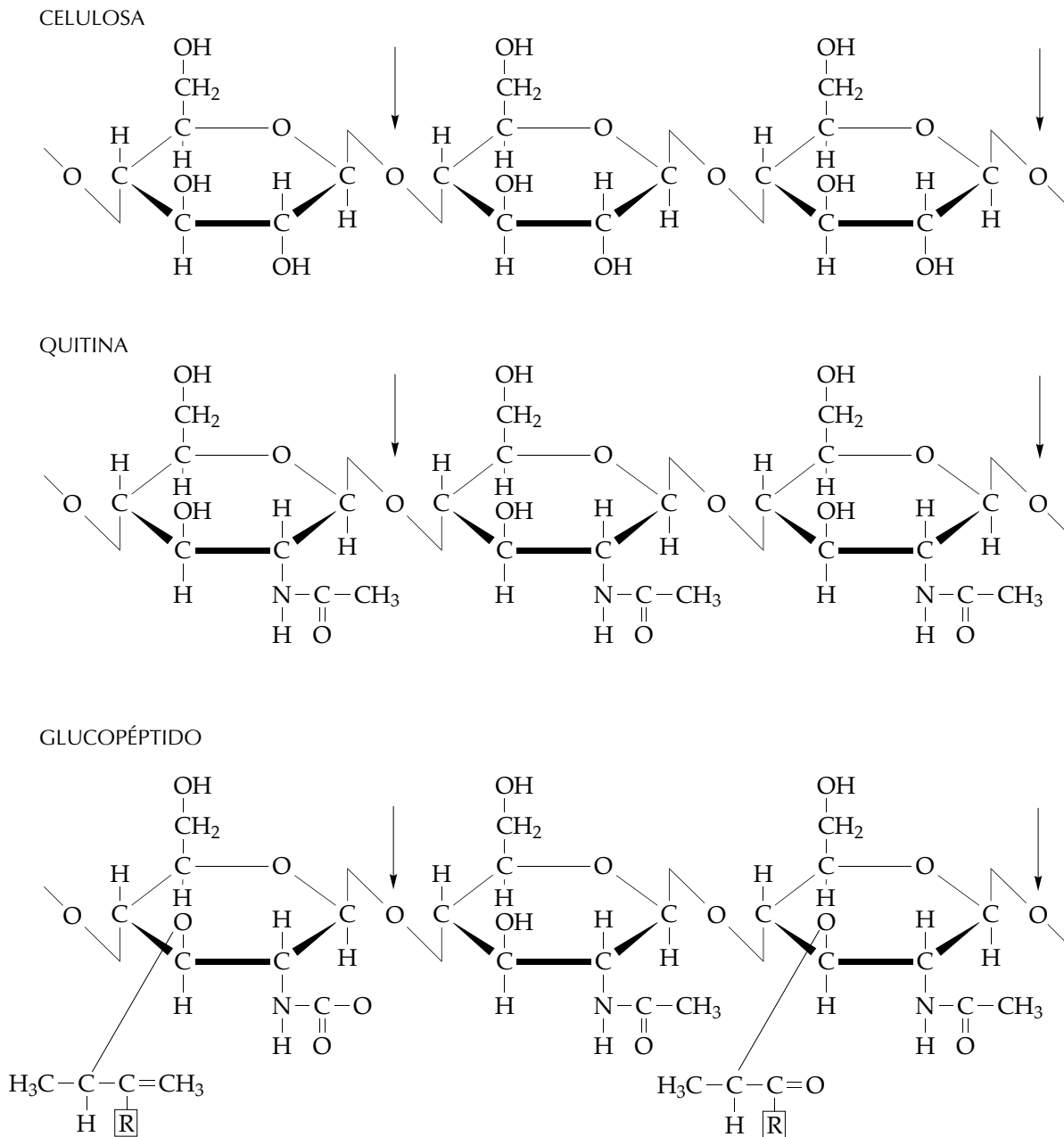


Figura 4.2 Estructura molecular comparativa del principal componente de la pared celular de las algas, las levaduras y las bacterias. Las flechas definen la unidad estructural.

Las levaduras se siguen considerando separadamente de los hongos en función de su mayor actividad metabólica ($\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), de su crecimiento más rápido y de su mayor efectividad como biocatalizadores. Su manipulación en el laboratorio es similar a la de las bacterias y puede aplicarse a ellas el principio del cultivo puro. Su distribución en la naturaleza es parecida a la de las bacterias.

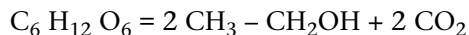
4.2 ALGUNAS REFERENCIAS HISTÓRICAS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS LEVADURAS A LA BIOQUÍMICA

Clásicamente, se ha considerado que las levaduras son los microorganismos más vinculados al progreso y bienestar humano. Esto ha sido así debido principalmente a su capacidad de convertir eficientemente azúcares, como los que se encuentran en mostos de uva, frutas, cebada y otros cereales y leche en alcohol y CO₂. Se ha dicho que la levadura es la “planta” más antigua que ha sido cultivada. Se sabe que la fabricación del pan y la cerveza ya se practicaban en Tebas durante la XI dinastía, 2000 años antes de Cristo. Tales procesos se han venido desarrollando ininterrumpidamente hasta nuestros días.

Saccharomyces cerevisiae y algunas especies próximas han sido microorganismos muy utilizados tanto en microbiología industrial (bebidas fermentadas, pan y, ocasionalmente, glicerina y grasa) como en todo el desarrollo de la Bioquímica. A esto último ha contribuido la facilidad de disponer de levaduras de pan o de cerveza prácticamente puras y en unas condiciones excepcionalmente favorables de mantenimiento y cultivo. Probablemente, el primero que vio una célula de levadura fue A. van Leewenhoek en 1680, según se desprende de alguna de sus cartas enviadas a la Royal Society. En el siglo XVIII, Linneo, el creador de la sistemática moderna, se interesó por la fermentación alcohólica, pero hubo que esperar hasta mediados del siglo XIX para obtener los primeros avances importantes en el conocimiento de la fisiología y bioquímica de las levaduras. En 1897, los hermanos Büchner obtuvieron el primer extracto de levadura, con el que pudieron fermentar la glucosa sin la presencia de células. Por este motivo esta fecha se considera como la del nacimiento de la Bioquímica.

Cagniard-Latour demostró en 1837 que la levadura se multiplica durante la fermentación alcohólica y fue quien primero le atribuyó una naturaleza vegetal. Schwann la llamó “zuckerpilz” (hongo del azúcar), de lo que se deriva el nombre de *Saccharomyces* dado más tarde por Kutzing.

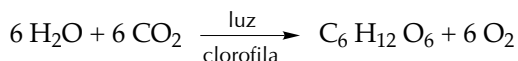
El proceso químico de la fermentación alcohólica fue establecido por Gay-Lussac a principios del siglo XIX:



Constituye la tercera estequiometría de la química biológica, después del proceso respiratorio de Lavoisier



y la fotosíntesis:



a la última de las cuales se llega también a fines del siglo XVIII gracias a los trabajos de Priestley, Ingenhouz, Senebier y Saussure. Por lo que se refiere a la fermentación alcohólica, a mediados del siglo pasado se

estableció una apasionada discusión entre los grandes químicos orgánicos, como Liebig, Wöhler y Berzelius, que consideraban que el crecimiento de la levadura era un fenómeno secundario, y los partidarios de la llamada teoría vitalista, la cual establecía que la fermentación era una actividad química ligada a la vida. En 1857 Pasteur asoció fermentación y microbio de forma totalmente convincente y estableció la fermentación como una forma de vida anaerobia en la que el suministro energético se deriva de la degradación parcial de la materia orgánica. Los trabajos memorables a este respecto son “Etudes sur le Vin” (1866) y “Etudes sur la Bier” (1876). Después de las obras Pasteur destacan las de Hansen y Jörgenson (1886) y Guillermond (1912). Para el conocimiento actual de las levaduras son básicas las obras de Rose (1969) y Lodder (1970).

Es ilustrativo recordar que el nombre de fermentación es muy antiguo y significa ebullición a temperatura ambiente. También es interesante señalar que el nombre de fermento es sinónimo de levadura y, en menor grado, de microbio.

4.3 EFECTO PASTEUR

Pasteur fue el primero en comprobar que, si se suministra suficiente oxígeno, la levadura crece sobre glucosa sin producir alcohol. En este caso, sigue el proceso respiratorio:



El cese en la producción de alcohol viene acompañado de una disminución en el consumo de glucosa.

Como otros microorganismos, muchas levaduras son facultativas y la fermentación sólo tiene lugar cuando falta el oxígeno. Sin embargo, en los medios azucarados en presencia de aire se pasa espontáneamente al proceso anaerobio porque el consumo de oxígeno es muy alto, por lo que se agota rápidamente. Además, la abundante producción de CO_2 suele desplazar el aire de la atmósfera, dificultando la disolución del oxígeno. En muchas bacterias anaerobias facultativas, como *E. coli*, ocurre lo mismo en las condiciones habituales de cultivo.

Cuando la concentración de glucosa es el factor limitante del crecimiento se obtiene mucha más biomasa en aerobiosis. En este caso la producción celular y de CO_2 por gramo de glucosa consumida es mayor que en la fermentación. Si hay sustrato en exceso, el crecimiento es igual tanto aerobia como anaerobiamente, pero entonces la producción absoluta de CO_2 es mucho mayor en la fermentación.

El cambio de energía libre para la completa oxidación de un compuesto orgánico es mucho mayor que para su fermentación. La completa oxidación de 1 mol de glucosa libera 688 kcal, en tanto que las distintas fermentaciones que puede experimentar esta cantidad de glucosa sólo producen como máximo unas 10 kcal. Las fosforilaciones características de la fermentación de los compuestos orgánicos también tienen lugar durante la respiración aerobia de los mismos, pero

en este último caso la cantidad de ATP que se produce en total procede fundamentalmente de la fosforilación oxidativa.

La paradoja del efecto Pasteur consiste en que se produce más biomasa con menor consumo de sustrato. Ello es simplemente consecuencia de lo que acabamos de señalar. La producción total de ATP por mol de sustrato respirado es mucho mayor que la que pueda obtenerse por fermentación de igual cantidad del mismo compuesto. Además, en el efecto Pasteur interviene un mecanismo de regulación metabólica que determina que la cantidad máxima de glucosa que puede ser absorbida disminuya en condiciones aerobias.

4.4 CULTIVO, SISTEMAS CELULARES Y EXTRACTOS

Las levaduras crecen bien en un medio constituido por un azúcar, NH_4Cl , Na_2SO_4 , K_2HPO_3 y extracto de levadura. El pH más favorable se halla entre 3,5 y 4,5. Se conocen varios medios sintéticos, como los de Devereux y Taner, Fulmer y Nelson, y el de Mayer. Estos medios son también adecuados para muchos otros hongos. Las bacterias habituales se desarrollan mal o no crecen en estos medios, principalmente debido al bajo pH.

Para estudiar la actividad química de las levaduras pueden utilizarse sistemas de células enteras. Se manejan fácilmente porque se lavan y sedimentan sin dificultad por centrifugación. Resisten bien en agua destilada y soluciones salinas como el Ringer 1/4. Si a una suspensión celular de este tipo se le añade glucosa u otro azúcar, tiene lugar inmediatamente una activa fermentación hasta el agotamiento del sustrato. No obstante, no hay crecimiento, puesto que la biosíntesis está prácticamente bloqueada por falta de las fuentes de N, P y S. El sistema de células enteras no proliferante o en reposo divisional permite separar prácticamente el sistema suministrador de energía del biosintético.

Si la concentración de azúcar es el factor limitante del crecimiento en un cultivo proliferante, entonces podemos tener un desarrollo equilibrado en el cual el número de células, el peso seco, el nitrógeno celular, el RNA y el DNA se incrementan a la misma velocidad. Esto no ocurre cuando el sustrato está en exceso, ya que entonces se producen velocidades diferentes de incremento de uno o varios de estos parámetros.

El crecimiento y la actividad química de la levadura en un cultivo dependen del medio en que ha sido preparado el inóculo. Por esto, para trabajar en un sistema de células enteras hay que hacer previamente varias resiembras en el mismo medio con el sustrato como factor limitante. De esta manera, utilizando glucosa como sustrato, puede estudiarse su degradación fermentativa con formación de etanol y CO_2 .

Los extractos o sistemas libres de células son imprescindibles para estudiar las reacciones intermedias de la fermentación y obtener enzimas aislados. El primer extracto de levadura obtenido por los hermanos Büchner se preparaba tratando las células con arena y extrayendo con agua y filtración a alta presión. Levedev obtuvo extractos activos lavando la levadura con agua, secando a 20-30°C y haciéndola pasar por un tamiz fino antes de secarla de nuevo a la misma temperatura. Este preparado le permitía obtener el extracto activo mezclándolo con

agua en la proporción 1:3 e incubando a 37°C durante 3 horas. Finalmente, se filtra y se mantiene frío a alrededor de 0°C hasta su uso. Los extractos comerciales de levadura no suelen ser activos y se preparan por autólisis a 37°C durante 24 h, añadiendo un poco de cloroformo y con agitación suave. Luego se filtran o clarifican por centrifugación y se concentran por destilación al vacío.

Los extractos de levadura fermentan la glucosa durante un corto tiempo. Si se añade fosfato, la fermentación prosigue. Esto constituyó un fenómeno clave que condujo a Harden y Young al descubrimiento de fosfatos orgánicos en la primera etapa de la fermentación de la glucosa. Aparte del efecto de la adición de fosfatos a los extractos que fermentan glucosa, otros tres recursos experimentales resultaron básicos para desenmarañar el mecanismo de fermentación alcohólica por la levadura:

1. El método de fijación de Neuberg. En este método se emplea sulfato cálcico para fijar el acetaldehído según se va formando. En consecuencia no aparece etanol. Como el acetaldehído actúa como aceptor de hidrógeno en la fermentación alcohólica (ver figura 4.3), otras moléculas adoptan su papel. En concreto, la dihidroxiacetona fosfato acepta hidrógeno, formándose entonces glicerina.
2. Inhibidores selectivos. Cuando se añade ácido monoiodoacético a un extracto que contiene una hexosa difosfato, se forma, como sucede en ausencia del mismo, una mezcla de triosas fosfato, pero no tiene lugar la oxidación de los mismos a ácido fosfoglicérico. Sin embargo, el ácido monoiodoacético no retarda la descomposición del ácido fosfoglicérico. Por otra parte, el fluoruro sódico impide que el ácido fosfoglicérico se desdoble en piruvato y fosfato, pero no impide la oxidación de la triosa fosfato. La adición de alguno de estos inhibidores al extracto posibilita la acumulación de alguno de los intermediarios en el proceso de fermentación de la glucosa.
3. Diálisis. Teniendo en cuenta que el ácido adenílico y el Mg^{2+} , así como el NAD^+ , son dializables, esta operación inactiva el extracto crudo de forma reversible. El mismo no puede volverse a activar si se ha calentado a 60°C.

4.5 FERMENTACIONES DE LA GLUCOSA

Podemos considerar cuatro tipos de fermentación de la glucosa por la levadura, tres de ellos en un sistema de células enteras en condiciones limitantes de sustrato y el cuarto a partir de extracto seco.

4.5.1 Fermentación alcohólica

Es la transformación cuantitativa de la glucosa en etanol y CO_2 . Aparte la levadura, solamente se ha encontrado en *Zymomonas mobilis*, aunque este microorganismo sigue una ruta metabólica completamente distinta (ver Lámina 1). En la figura 4.3 se presentan las distintas etapas comprendidas en la fermentación alcohólica de la glucosa por la levadura.

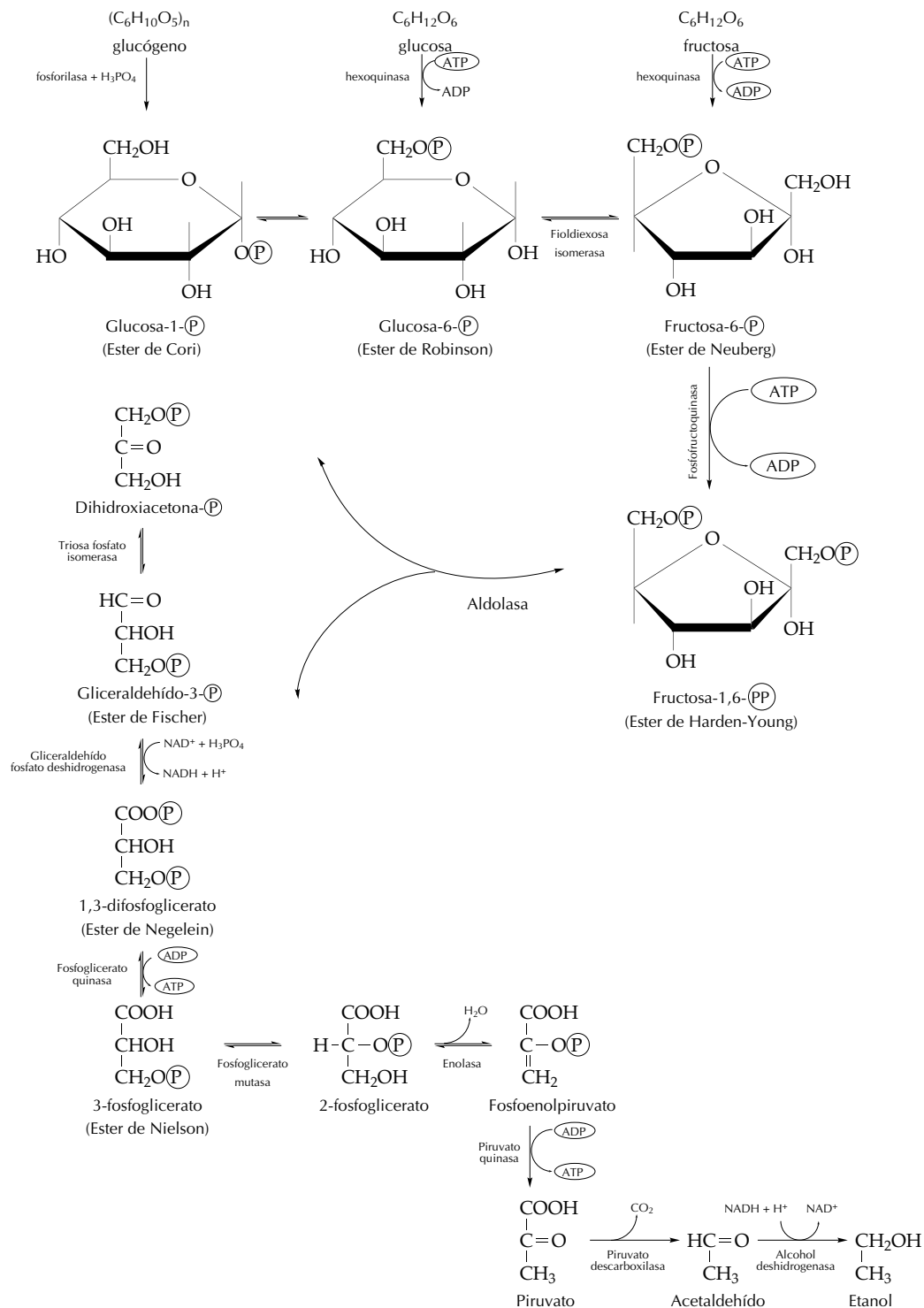


Figura 4.3 Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura.

Desde la glucosa hasta la síntesis de piruvato, se trata de una vía metabólica idéntica a la glucólisis muscular, denominada vía de las triosas o de Embden-Meyerhof. Las etapas fundamentales de la misma son:

1. Formación de hexosas fosfato.
2. Formación de triosas fosfato.
3. Oxidación del gliceraldehído-3 (P).
4. Formación del piruvato.
5. Descarboxilación del piruvato.
6. Reducción del acetaldehído.

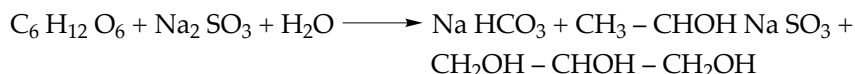
Por otra parte, hay que considerar tres tipos de reacciones fundamentales:

1. Transferencia de grupos fosfato.
2. Transferencias de H^+ .
3. Roturas del enlace $C-C$.

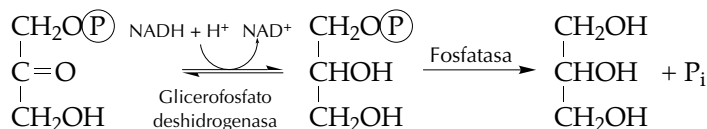
El enzima característico de la vía de Embden-Meyerhof es la fosfofructoquinasa.

4.5.2 Fermentación glicérica con sulfito

En sus estudios sobre el vino y la cerveza, Pasteur encontró que en la fermentación alcohólica siempre se produce una pequeña cantidad de glicerina. Este proceso puede aumentarse, tal como realizó Neuberg, añadiendo sulfito al sistema a fin de fijar el acetaldehído, lo que provoca que se produzca un mol de glicerina por cada mol de glucosa fermentada:

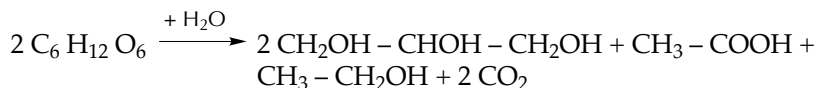


En estas condiciones, al no poder utilizar el acetaldehído como aceptor de hidrógeno, la reoxidación del NADH se hace a partir de la dihidroxiacetona fosfato, generándose entonces glicerina:

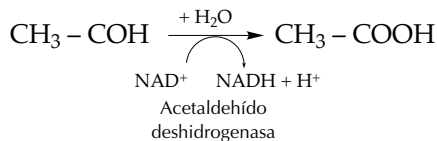


4.5.3 Fermentación aceto-glicérica

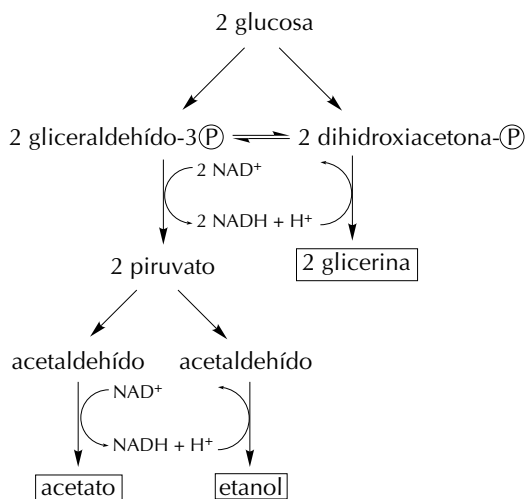
En medio alcalino varían los productos finales de la fermentación de la glucosa por la levadura, produciéndose por cada dos moles de glucosa fermentados, dos moles de glicerina, uno de ácido acético y uno de etanol:



En estas condiciones, la fermentación de dos moles de glucosa genera tres moles de NADH, dos de ellos formados en la oxidación del gliceraldehído-3(P) y uno en la transformación de un mol de acetaldehído a acetato:



La reoxidación de los tres moles de NADH tiene lugar con la formación de glicerina (2 moles) y etanol (1 mol).



4.5.4 Fermentación pirúvico-glicérica

Si la fermentación se realiza con extracto seco redissuelto en solución de glucosa, los productos finales obtenidos son piruvato y glicerina:

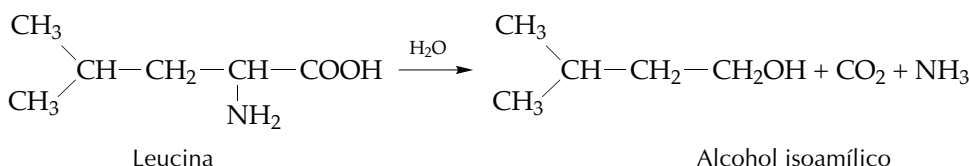
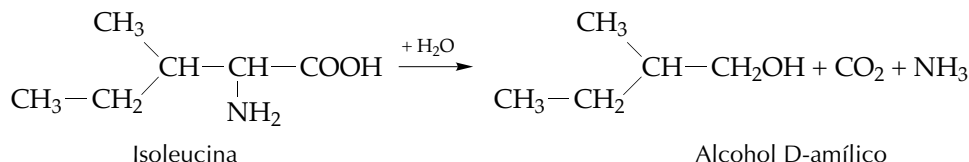


En estas condiciones, el piruvato no se decarboxila y, de este modo, no genera acetaldehído, por lo que la reoxidación del NADH se lleva a cabo en la reacción anteriormente ya comentada de la dihidroxiacetona fosfato, que es transformada en glicerina.

4.6 ACEITE DE FUSEL Y ÁCIDO SUCCÍNICO

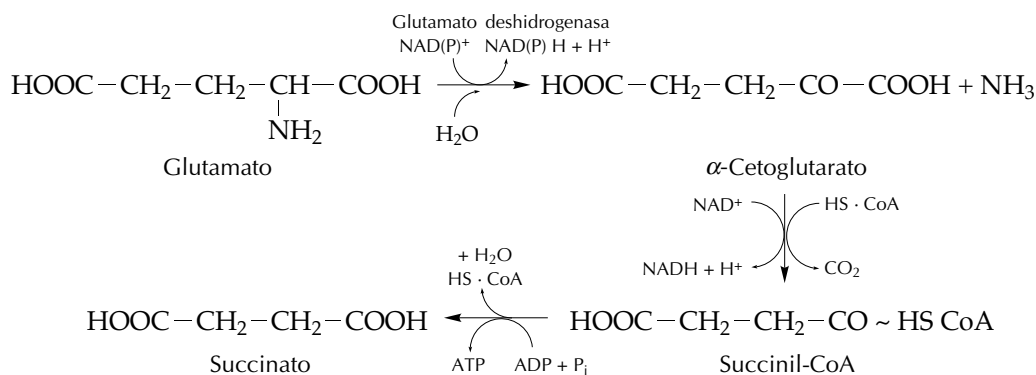
Durante la fermentación alcohólica de la levadura se pueden producir también ciertas cantidades de otros productos, siempre minoritarios, que no se derivan de la transformación de la glucosa, pero que tampoco se producen si no hay fermentación. El aceite de fusel, que constituye del 0,1 al 0,7% del destilado de algunos mostos fermentados,

está constituido principalmente por una mezcla de los alcoholes D-amílico e isoamílico, con trazas de alcoholes isobutílico y propílico normal y algunos ésteres y aldehídos. Ehrlich demostró que los alcoholes amílico e isoamílico se derivan de aminoácidos del medio o de proteínas de la propia levadura:



La formación de los alcoholes a partir de los aminoácidos puede demostrarse añadiendo éstos al medio de fermentación y determinando la aparición de los alcoholes. No se producen en ausencia de levadura ni sin fermentación del azúcar. La producción de sustancias ópticamente activas durante la fermentación ya fue señalada por Pasteur, quien la consideró como una prueba más de la naturaleza biológica del proceso, dado que sólo en este tipo de fermentaciones tiene lugar la síntesis asimétrica, a diferencia de la síntesis orgánica que siempre produce el racémico.

En la fermentación alcohólica también puede producirse ácido succínico, el cual se deriva del ácido glutámico. En este caso, el ácido succínico se forma por la glutamato deshidrogenasa y enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico:



Sistema de la α -cetoglutarato deshidrogenasa

4.7 DESARROLLO AEROBIO

Algunas especies de levadura son estrictamente aerobias, pero generalmente tienen carácter facultativo. El desarrollo aerobio depende de un suministro de oxígeno suficiente y de la concentración de azúcar, ya que en condiciones anaerobias la velocidad de consumo del sustrato puede ser mucho más alta. Las pentosas sólo se utilizan aerobiasmente siguiendo la vía de Warburg-Dickens (ver capítulo 5).

4.8 ASIMILACIÓN OXIDATIVA Y FERMENTATIVA DE LA GLUCOSA

Las levaduras, tanto cuando metabolizan oxidativamente como fermentativamente la glucosa, pueden asimilar una parte de la misma, acumulándola en la biomasa celular en forma de glucógeno, grasa, etc. La asimilación de la glucosa puede tener lugar también en sistemas no proliferantes, donde se excluye la utilización de una parte del sustrato para la biosíntesis.

En un sistema no proliferante de células de levadura, puede obtenerse una fermentación activa de la glucosa con concentraciones del 5 al 10% a 30 °C y pH 3-4. En soluciones más diluidas de azúcar es también fácil obtener un rápido consumo aerobio. La fermentación alcohólica y el proceso respiratorio permiten esperar, respectivamente, una producción de 44,8 ml de CO₂ o un consumo de 134,4 ml de O₂ por milimol de glucosa utilizada. Sin embargo, la determinación experimental de estos parámetros muestra que se obtiene menos CO₂ y se consume menos O₂ de los esperado. Barker fue el primero que, estudiando el alga *Prototheca zophii*, observó que sólo se consumía un 30% del oxígeno correspondiente al teórico necesario para mineralizar el acetato incorporado del medio. Como no había acetato intracelular ni intermediarios de su oxidación, concluyó que había una asimilación oxidativa del acetato que debía conducir a la formación de reservas del tipo (CH₂O). Pickett y Clifton demostraron que cuando *Saccharomyces cerevisiae* utiliza glucosa aerobiasmente también consume solamente el 50% del O₂ necesario para la respiración del azúcar tomado del medio. Poco más tarde, van Niel y Anderson pusieron de manifiesto que durante la fermentación con exceso de sustrato sólo se producía el 35% del CO₂ teórico. En los sistemas no proliferantes, siempre y cuando el sustrato se encuentre en exceso, las levaduras dan lugar a una asimilación oxidativa o fermentativa de una fracción de la glucosa que se incorpora del medio. Se ha demostrado citológica y químicamente que esta glucosa se transforma en una sustancia muy parecida al glucógeno del músculo.

La asimilación de glucosa puede valorarse fácilmente midiendo los azúcares totales después de recuperar las células del cultivo, lavarlas e hidrolizarlas. Si se utiliza glucosa al 10%, un resultado característico se refleja en la tabla 4.1.

TABLA 4.1 Proporción de azúcares totales en células de levadura recuperadas a diferentes intervalos de tiempo del medio de cultivo.	
Azúcares totales (%/peso seco)	Tiempo de incubación (min)
6,2	0
8	15
10,4	30
10,9	50
12	60

La formación de glucógeno tiene lugar a partir de la glucosa-1-Ⓟ:

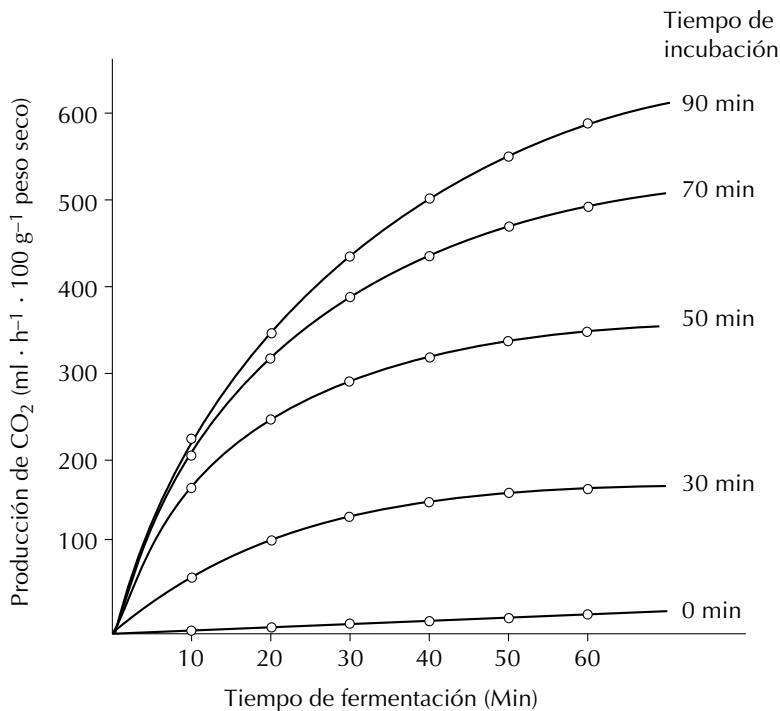
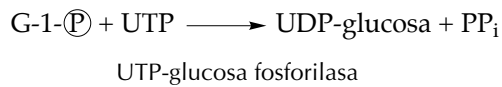
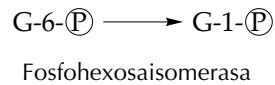
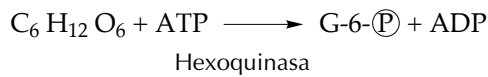


Figura 4.4 Intensidad de la fermentación endógena en función del tiempo de incubación.

La UDP-glucosa se polimeriza formándose un α -1,4-glucano con la UDP-glucano sintasa. Posteriormente se ramifica rompiéndose enlaces 1,4 y uniéndose de nuevo por enlaces 1,6, por efecto de una amilo-1,6-glucosidasa.

Algunas levaduras acumulan también grasa como consecuencia de la asimilación de la glucosa. La grasa de las levaduras está constituida por una mezcla de lípidos.

4.9 FERMENTACIÓN ENDÓGENA

Las reservas formadas por asimilación de la glucosa pueden utilizarse en ausencia de sustrato exterior. La producción de CO_2 por una suspensión de células lavadas a pH 3-4 después de diferentes tiempos de incubación en glucosa al 10% es del tipo representado en la figura 4.4. La intensidad de la fermentación aumenta con el tiempo de incubación y, en consecuencia, en función de la cantidad de reserva acumulada. En condiciones basales se consumen por fermentación endógena 60 mg de glucógeno/h por cada 100 g de peso seco. Después de 1 h de incubación en glucosa al 10%, se pasa a 2000 mg/h por cada 100 g. Esta diferente velocidad de fermentación del glucógeno basal (previamente acumulado) y del de nueva síntesis ha hecho pensar que quizás se trate de dos tipos de glucógeno diferentes. De hecho, hay evidencias que indican que las levaduras pueden sintetizar dos tipos diferentes de moléculas de glucógeno.

El carácter endógeno de la fermentación puede ponerse de manifiesto mediante el uso de inhibidores. El nitrato de uranilo a concentración de 4×10^{-5} M no penetra en la célula, pero inhibe en un 80% la utilización de la glucosa exterior. No obstante, no afecta en absoluto a la fermentación endógena. En cambio, el fluoruro sódico, que a una concentración 10^{-2} M penetra en la célula impidiendo la formación de piruvato, inhibe un 80% tanto la utilización de la glucosa exterior como la fermentación endógena. El DNP (dinitrofenol) a una concentración 3×10^{-4} M, como la azida sódica o la aureomicina, inhiben tanto la asimilación oxidativa de la glucosa como la fermentativa.

Las reseñas que se refieren en este capítulo acerca del metabolismo de las levaduras ponen de manifiesto que el sistema no proliferante, ya esté en una fase metabólica oxidativa o fermentativa, no se halla ni mucho menos restringido a la oxidación de la glucosa hasta CO_2 o a su fermentación hasta etanol y CO_2 , sino que pueden existir de forma alternativa o concomitante a estos procesos otras actividades metabólicas que provocan la aparición en el medio externo de diferentes tipos de metabolitos o incluso la acumulación intracelular de reservas.

BIBLIOGRAFÍA

- LOODER, J. The Yeasts (J. Looder, ed.). North-Holland Publishing Co. Amsterdam 1970.
- ROSE, A. H. y HARRISON, J. S. The Yeasts. 3 vols. Academic Press. London and New York. 1969.

5.1	EL VINAGRE	54
5.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO	55
5.3	CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ACETATO	56
5.4	OXIDACIÓN DEL ETANOL	60
5.5	OXIDACIÓN DE ALCOHOLES PRIMARIOS	61
5.6	CETOGÉNESIS	62
5.7	OXIDACIÓN DE POLIALCOHOLES	62
5.8	OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS LÁCTICO Y PIRÚVICO	63
5.9	OXIDACIÓN DE AZÚCARES	63
5.9.1	El sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	63
5.9.2	Vía de Entner-Doudoroff	64
5.9.3	Ciclo de la hexosa monofosfato o vía de Warburg-Dickens	66
5.9.4	Formación de gluconato	66
5.9.5	Utilización del gluconato	69
5.9.6	El sistema de las fosfocetolasas	69
5.10	MODELOS DEL METABOLISMO OXIDATIVO DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO	71
5.11	FORMACIÓN DE CELULOSA	71
	BIBLIOGRAFÍA	72

5.1 EL VINAGRE

El vinagre se conoce hace milenios. Puede definirse como un condimento hecho a partir de sustancias que contienen azúcares o féculas y que experimentan una fermentación alcohólica seguida de fermentación acética. Contiene unos 4 g de ácido acético/100 ml. Además tiene pequeñas cantidades de etanol, glicerina, ésteres, azúcares, pentosas, sales minerales y otras sustancias. Su composición depende de la materia prima, del proceso de obtención y de la maduración. La FDA americana distingue: vinagre de sidra o manzana, de vino o uva, de malta, de melazas, de glucosa y vinagre destilado.

Existen distintos sistemas de fabricación. El método llamado de Orleans, que utiliza barriles de unos 200 litros llenos de vino hasta una tercera parte, es el más antiguo. Produce de 10 a 15 litros de vinagre cada cuatro o cinco semanas. Es lento y caro, pero puede producir los vinagres de mesa de mejor calidad. La madre del vinagre es la película que se forma sobre la superficie del medio. Esta película va transformando el vino en vinagre desde la superficie hacia el fondo. Se van añadiendo de 10 a 15 litros de vino cada cuatro o cinco semanas, a medida que se separa un mismo volumen de vinagre. Hay que vigilar la aireación y que no se hunda la película superficial. Existen procesos rápidos, como el de Boerhave o alemán, en los que se hace pasar el vino a través de bagazo de manzanas u otros soportes porosos. El generador de Fings utiliza virutas de haya y puede producir 300 litros de vinagre destilado por día. El acetator es un tipo de fermentador que permite un cultivo en profundidad que da también altos rendimientos.

Persson (1822) designó a la película superficial que se forma sobre el vino con el nombre de *Micoderma*, considerando que se trataba de un hongo relacionado con las levaduras. Pasteur (1868) atribuyó la formación de vinagre a una fermentación acética del etanol por una bacteria o fermento de crecimiento en superficie que denominó *Micoderma aceti*. En realidad el micoderma contiene una flora compleja dentro de un limo fibroso que incluye burbujas de CO₂ que facilitan su flotación. Eventualmente puede contener incluso gusanos nematodos (*Anguilula aceti*). Existe también el *Micoderma vini* que no forma vinagre, constituido por una flora compleja en la que dominan levaduras aerobias.

Hansen (1878) fue el primero en demostrar que la transformación del etanol en ácido acético la realizan unas bacterias particulares de las cuales hay varios tipos y que en conjunto se denominan actualmente **bacterias del ácido acético**. Hansen obtuvo el cultivo puro de varias de ellas. Realizó la fermentación acética del etanol con cultivos puros y mixtos y puso claramente de manifiesto la necesidad de oxígeno, lo que ponía en entredicho el concepto de “fermentación acética”, puesto que en rigor el término “fermentación” es sólo aplicable a procesos anaerobios.

El conocimiento actual de las bacterias del ácido acético se basa fundamentalmente en los trabajos de Frateur (1960), Asai (1964), De Ley (1970) e Izuka Komazata (1980).

TABLA 5.1 Características diferenciales de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*.

Características	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Flagelación	Polar o ninguna	Peritrica o ninguna	Polar
Crecimiento a pH 4,5	+	+	–
Oxidación de:			
Etanol a ácido acético a pH 4,5	+(M)	+(F)	–
Ácido acético a CO ₂	–	+	d
Lactato a CO ₂	–	+	+
Glucosa a gluconato	+	d	d
Aminoácidos por células en reposo	–	+	+
Ciclo de Krebs	–	+	+
Producción de 5-cetogluconato	+	d	–
Cetogénesis	+	d	–
Quinonas Q ₁₀	+	–	
Quinonas Q ₉	–	+	
Hidrólisis de:			
Lactosa y almidón	–	–	d
Gelatina	–/D	–	d
Pigmentos verdosos y/o fluorescentes	–	–	d

* M, moderado; F, fuerte; D, débil; d, variable según la cepa.

5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

Se trata de bacterias gramnegativas (grampositivas en cultivos viejos), bacilares o pleomórficas y estrictamente aerobias. Se distribuyen en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, según tengan o no capacidad de oxidar el acetato (presencia del ciclo de Krebs funcional). Pueden considerarse filogenéticamente próximas al grupo *Pseudomonas*. En la tabla 5.1 se reseñan las características diferenciales.

Además de la fermentación acética, pueden formarse ácido glucurónico de la glucosa, sorbosa del sorbitol, dihidroxiacetona de la glicerina y 5-cetogluconato de la glucosa. Las bacterias del ácido acético oxidan muchos alcoholes y ácidos orgánicos como el pirúvico y el láctico; algunas de ellas producen celulosa (caso único en las bacterias). *Gluconobacter* es siempre catalasa positivo, pero dentro del género *Acetobacter* la prueba de la catalasa puede dar una reacción débil o incluso nula (*A. peroxydans*). La característica metabólica que define al grupo es la capacidad de utilizar una gran diversidad de sustratos y la incapacidad de oxidarlos completamente. A pesar de tratarse de microorganismos aerobios, acumulan en el medio en que crecen una gran cantidad de catabolitos diferentes.

Las bacterias del ácido acético pueden aislarse fácilmente del vinagre y también del vino, la cerveza o los zumos de frutas agriados. Para su aislamiento, basta con centrifugar un volumen de uno de estos medios, resuspender el sedimento en Ringer 1/4 y sembrar diluciones sucesivas de la suspensión en placas de agar que contengan 0,05% de triptona, 2% de glucosa 1% de CaCO₃ y 20% de extracto de carne.

Después de una incubación a 30 °C durante 2 ó 3 días, las colonias que forman las bacterias del ácido acético pueden reconocerse porque clarifican el medio a su alrededor (disolución de la dispersión de CaCO_3) formando un halo. Pueden repicarse sobre el mismo medio para obtener subcultivos. La gran cantidad de extracto de carne que se añade al medio se justifica en función de la necesidad de asegurar el suministro de una serie de factores de crecimiento que en el extracto de carne se hallan más o menos diluidos.

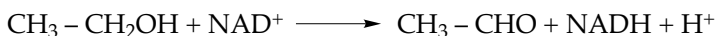
Existe un método sencillo y elegante que permite diferenciar rápidamente los tres grupos de bacterias reseñados anteriormente (*Pseudomonas*, *Acetobacter* y *Gluconobacter*). Para ello, se preparan tubos con 6,5 ml de un medio formado por extracto de levadura (3%), agar (2%) y verde de bromocresol (1 ml/l de una solución al 2,2%). Después de esterilizar el medio y antes de que solidifique, se añade a cada tubo 1 ml de etanol al 15%. Se permite la solidificación de los tubos en posición inclinada y se inocula en estría, incubándose a 28 °C. A medida que el crecimiento alrededor de la estría se hace ostensible, pueden producirse cambios en el color del medio, inicialmente verde. *Gluconobacter* provoca el cambio a amarillo. *Acetobacter* vira inicialmente el medio a amarillo, para volver más tarde al color verde inicial. En cambio, el crecimiento de *Pseudomonas* en este medio no provoca en ningún momento un cambio de color del mismo.

5.3 CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ACETATO

Para un estudio elemental de la cinética de producción de acetato por las bacterias del ácido acético hay que determinar como mínimo cuatro parámetros: las concentraciones de acetato, de etanol y de glucosa, y también el crecimiento.

La concentración de ácido acético en soluciones del mismo puede determinarse por simple volumetría con NaOH 0,5 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Otra alternativa es realizar previamente una destilación a volumen constante a pH 4,5. No obstante, para el tipo de estudio que aquí se comenta, resulta mejor la cromatografía de gases, después de extracción metanólica y oxidación con ácido sulfúrico. El destilado a baño maría se lleva a un volumen determinado con metanol, se añaden unas gotas de ácido sulfúrico y se inyecta una pequeña alícuota. El cromatograma que se obtiene presenta tres picos, que corresponden a metóxido de metilo, acetato de metilo y metanol. Se obtiene el calibrado con patrones de acetato.

El etanol suele determinarse por el método de Buchner y Redetzki, basado en la reacción de la alcohol deshidrogenasa:



La concentración de etanol se determina en función de la variación de absorbancia a 340 nm debida a la reducción del NAD^+ .

La glucosa se determina por la reacción de la glucosa oxidasa:



El peróxido de hidrógeno producido se determina colorimétricamente.

El crecimiento puede seguirse por la absorbancia a 400 nm.

Los inóculos para el estudio se obtienen mediante cultivos de 48 h incubados a 30 °C en el siguiente medio: triptona 0,5%; glucosa 2%; CaCO_3 1% y extracto de hígado 10%. El medio de ensayo (100 ml) puede estar constituido por extracto de levadura (0,1%) juntamente con cantidades de etanol, acetato sódico o glucosa y 10 ml de inóculo en frascos de Roux. Las cepas de *Pseudomonas* y *Gluconobacter* se incuban a 30 °C y las de *Acetobacter* a 26 °C.

Con etanol al 4,5% pueden obtenerse las curvas de producción de acetato indicadas en la figura 5.1. Los cultivos de *Pseudomonas* no producen acetato, pero en ellos puede seguirse el consumo de etanol, el cual es posible simultanear con el de acetato.

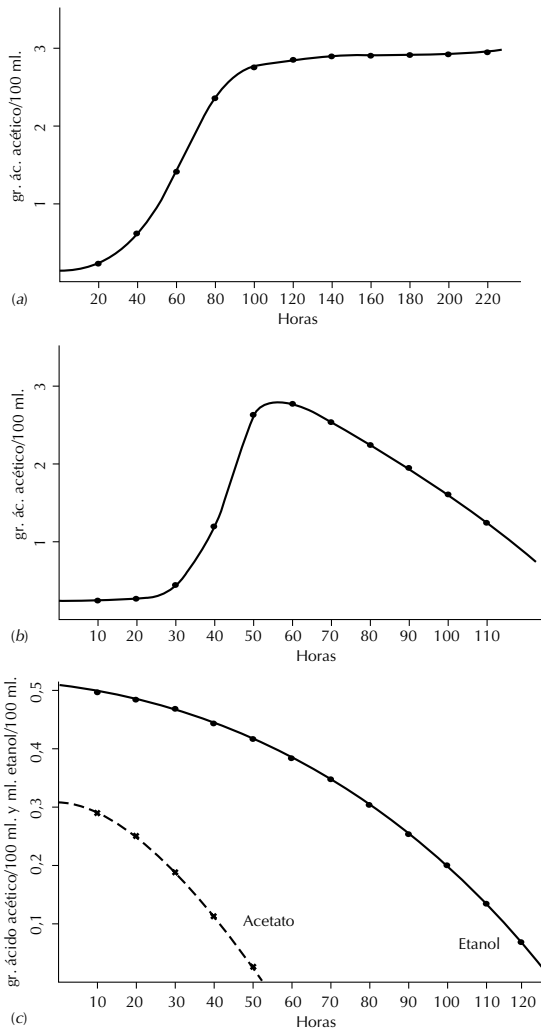


Figura 5.1 Producción de acetato por *Gluconobacter* (a) y *Acetobacter* (b). En (c) se representa el consumo de acetato y etanol por *Pseudomonas*.

En *Acetobacter*, la concentración de etanol puede aumentarse como máximo hasta el 7%, concentración que ya inhibe el crecimiento. La concentración de acetato producido sólo puede llegar al 5%, ya que por encima de esta concentración inhibe su propia oxidación, pero no impide que siga oxidándose el etanol (figura 5.2). Si se añade etanol cuando se está utilizando el acetato, la oxidación de éste se para inmediatamente. Por lo tanto, el etanol ejerce una inhibición de la oxidación del acetato. Si se observan las curvas de crecimiento, puede detectarse un típico fenómeno de diauxia, con una fase de reposo al pasar de la utilización de uno a otro sustrato, lo cual sugiere un efecto represor de la síntesis de los enzimas necesarios en uno y otro caso. De todas formas, a partir de una concentración de etanol del 5% se obtiene una producción de acetato idéntica en *Gluconobacter* y *Acetobacter*.

Por adiciones sucesivas de etanol pueden obtenerse concentraciones de hasta el 13% de acetato, tal como se indica en la figura 5.3a. *Acetobacter aceti*, creciendo sobre glucosa, produce acetato que luego es utilizado simultáneamente con el azúcar, si bien se mantiene una cierta cantidad de ácido mientras hay glucosa disponible (figura 5.3b).

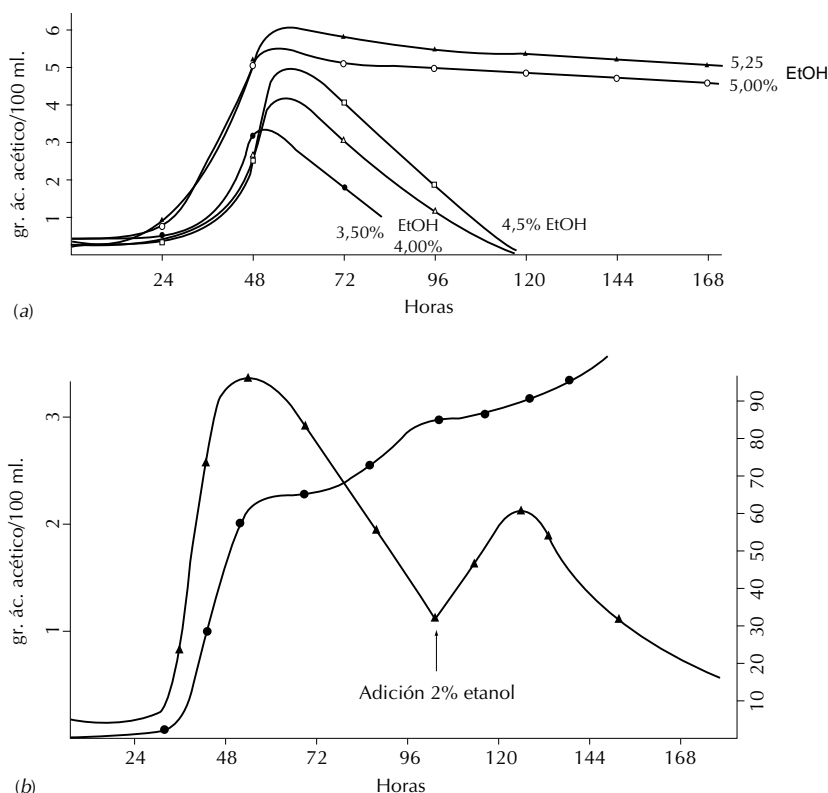


Figura 5.2 (a) Efecto de la concentración de etanol en el medio sobre la producción y consumo de ácido acético por *Acetobacter aceti*. (b) Producción y consumo de ácido acético (□) por *Acetobacter aceti* a lo largo del crecimiento (△). Efecto de la adición de etanol.

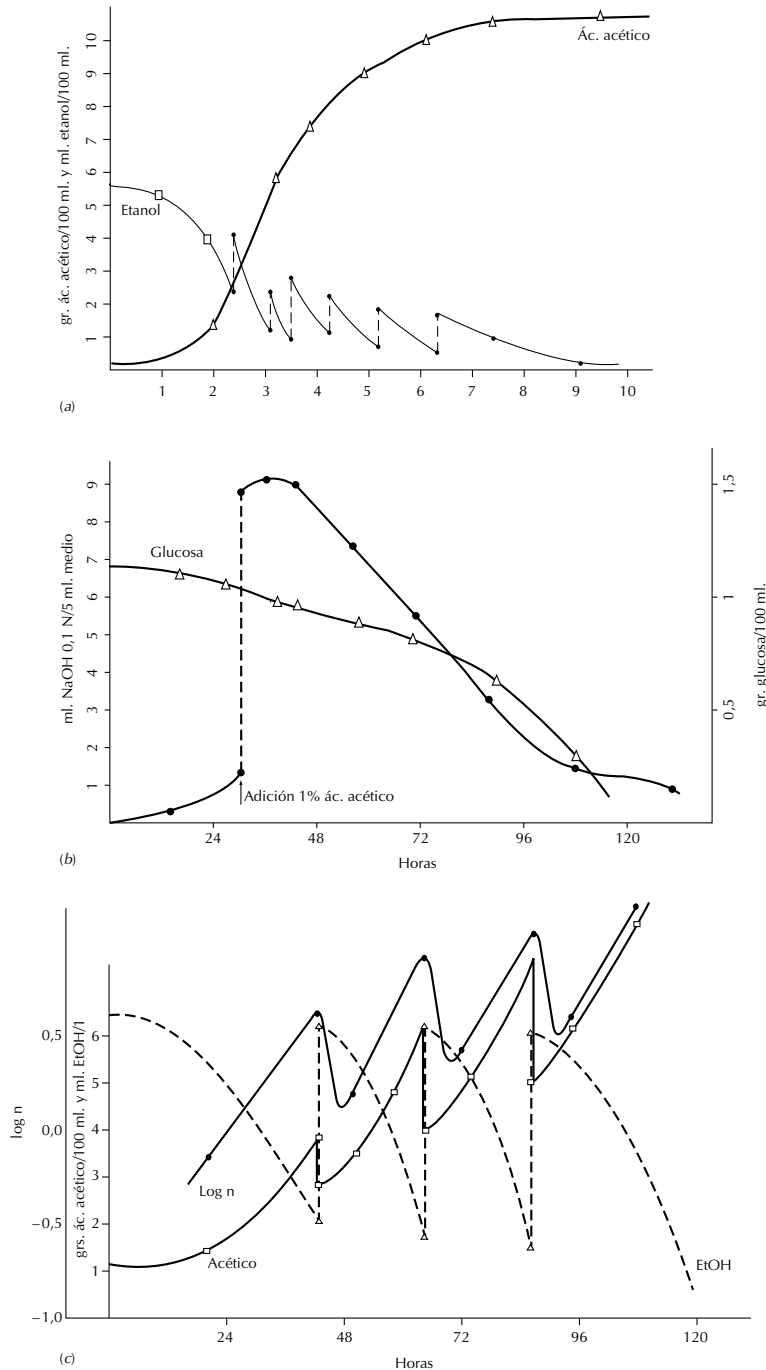
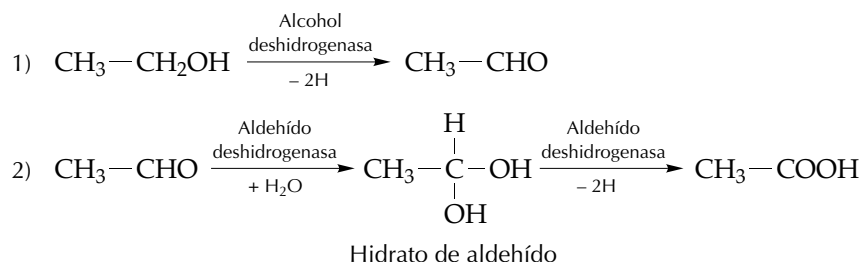


Figura 5.3 (a) Producción de ácido acético (Δ) por *Acetobacter aceti* con adiciones sucesivas de etanol (\square) al medio de cultivo. (b) Consumo de glucosa (Δ) y ácido acético (\bullet) por *Acetobacter aceti*. (c) Efecto de la adición de etanol al medio. Efecto sobre el crecimiento (\bullet) y la producción de acetato (\square) de adiciones sucesivas de vino (Δ) a un cultivo en fermentador de *Acetobacter aceti*.

5.4 OXIDACIÓN DEL ETANOL

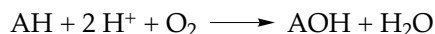
La oxidación del etanol por las bacterias del ácido acético tiene lugar en dos etapas, llevando la primera de ellas a la producción de acetaldehído y la segunda a acetato:



La reacción global de la fermentación acética



es una oxidación sin producción de CO_2 , por lo que aparentemente correspondería a una asimilación de oxígeno por una reacción monooxigenásica (ver capítulo 13).



En realidad se trata de dos reacciones deshidrogenásicas en las cuales los 4 H van a formar 2 H_2O con O_2 por una cadena respiratoria que comprende la citocromo oxidasa. Una de las dos moléculas de agua es requerida para la oxidación del acetaldehído.

Tal como se ha comentado anteriormente, las especies del género *Gluconobacter* no tienen ciclo del ácido cítrico funcional y acumulan acetato. Las del género *Acetobacter* sólo acumulan acetato mientras hay alcohol en el medio, pero luego pueden oxidar el acetato hasta CO_2 . En el género *Pseudomonas* la oxidación del acetato tiene lugar simultáneamente con la del etanol. La capacidad de oxidar el acetato no es uniforme en todos los miembros del género *Acetobacter*. Así, *A. peroxydans* oxida el acetato muy lentamente. Si se trabaja con extractos crudos de esta bacteria, al añadir etanol como sustrato se obtiene acetato junto a intermediarios del ciclo de Krebs, lo que sugiere que existe la capacidad de oxidar el acetato transfiriendo los electrones hasta la cadena respiratoria, que no es funcional en el extracto crudo. En tales extractos se ha podido poner en evidencia la existencia de una alcohol deshidrogenasa NAD^+ dependiente muy parecida a la de los organismos superiores. En cambio, la oxidación del acetaldehído se lleva a cabo por una citocromo c_{553} reductasa sin la intervención del NAD^+ .

En los miembros del género *Gluconobacter*, tanto la oxidación del etanol como la del acetaldehído están ligadas directamente a la citocromo c_{553} reductasa y tienen un pH óptimo entre 5,7 y 6,2. En la sub-

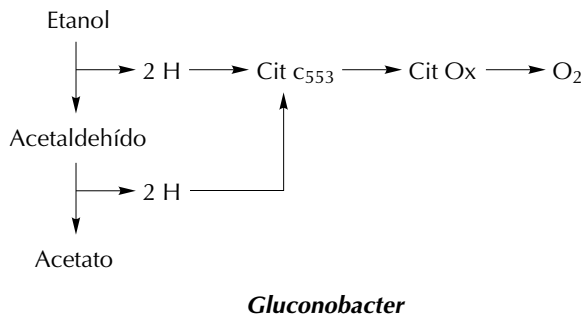
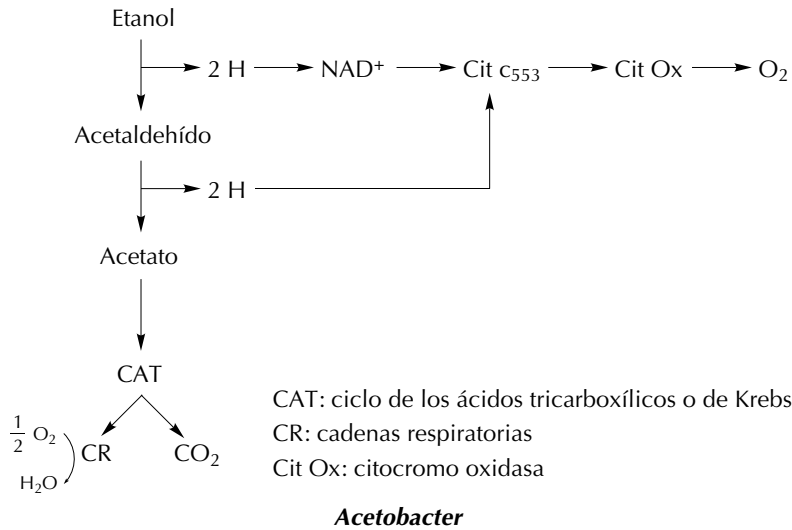


Figura 5.4 Oxidación del etanol en *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Nótese que *Gluconobacter* no requiere la participación del NAD⁺.

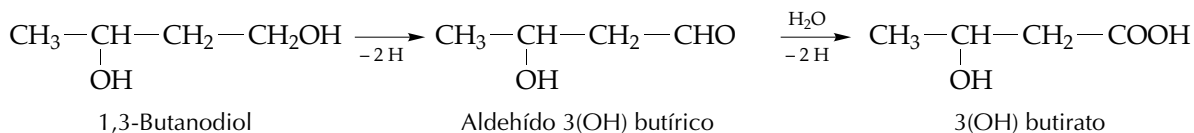
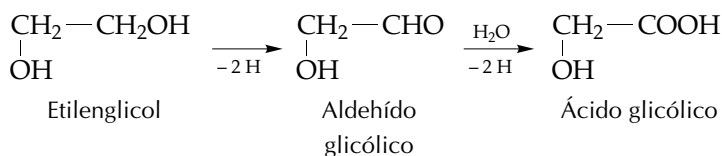
especie *suboxydans* de *G. oxydans* el pH óptimo se halla entre 3,7 y 4,7, como en la mayoría de los miembros del género *Acetobacter*. Esto sugiere que en las bacterias del ácido acético el transporte de hidrógeno desde el etanol y el acetaldehído puede depender de enzimas diferentes. En términos generales la oxidación del etanol en *Gluconobacter* y *Acetobacter* puede representarse como se indica en la figura 5.4.

En *Acetobacter*, la alcohol deshidrogenasa moviliza todo el NAD⁺ mientras hay alcohol disponible. El ciclo de Krebs se paraliza al no disponer de NAD⁺.

5.5 OXIDACIÓN DE ALCOHOLES PRIMARIOS

Las bacterias del ácido acético pueden oxidar otros alcoholes primarios además del etanol. Así, por ejemplo, la oxidación del etilenglicol

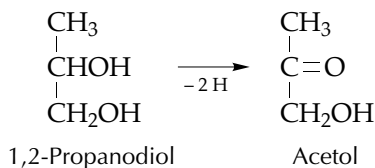
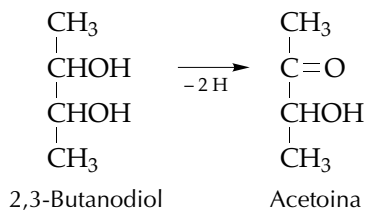
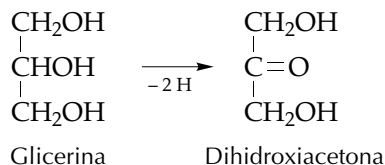
y del 1,3-butanodiol llevan a la producción de ácido glicólico y 3-hidroxibutirato respectivamente:



Los alcoholes de más de cinco átomos de carbono son tóxicos y sólo se oxidan a muy bajas concentraciones.

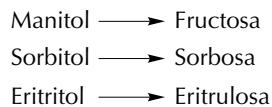
5.6 CETOGÉNESIS

Las bacterias del ácido acético convierten muchos alcoholes secundarios en cetonas. Los siguientes ejemplos son característicos:



5.7 OXIDACIÓN DE POLIALCOHOLES

Muchas bacterias del ácido acético oxidan alcoholes a azúcares. De este modo tenemos:

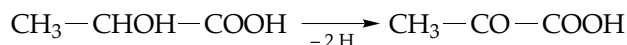


La sorbosa, mediante una serie de oxidaciones, es transformada químicamente en ácido 2-ceto-L-gulónico, que mediante un tratamiento ácido se convierte en ácido ascórbico (vitamina C). Actualmente, la producción comercial de vitamina C se realiza a partir de la D-glucosa, en un proceso que comprende diferentes transformaciones químicas y una etapa fermentativa, la oxidación del sorbitol a sorbosa, que es catalizada por *Gluconobacter oxydans*.

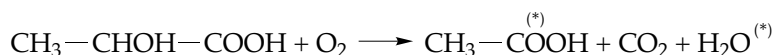
5.8 OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS LÁCTICO Y PIRÚVICO

Hay miembros de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* que oxidan el ácido láctico (α -hidroxiácido). Se conocen dos modalidades:

1. Oxidación a piruvato. Se han identificado varias láctico deshidrogenasas estereoespecíficas. Algunas utilizan NAD^+ , pero otras dependen del FAD o del citocromo c:



2. Oxidación directa a acetato. Tiene lugar a través de una monooxigenasa u oxidasa de función mixta:



(*) oxígeno procedente de O_2

El ácido pirúvico también es transformado en acetato por muchas bacterias del ácido acético. Al igual que en las levaduras, y a diferencia del resto de las bacterias, no se sigue una descarboxilación oxidativa, sino una reacción catalizada por una piruvato descarboxilasa que origina directamente CO_2 y acetaldehído. Este último es luego oxidado a acetato según se ha descrito.

5.9 OXIDACIÓN DE AZÚCARES

Las bacterias del ácido acético oxidan pentosas y hexosas, pero a diferencia de los miembros del género *Pseudomonas*, no utilizan triosas.

5.9.1 El sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Es el más utilizado para la oxidación de las hexosas. Comprende tres reacciones que transforman un mol de glucosa-6-fosfato en un mol de ribulosa-5-fosfato con formación de dos moles de NADPH (fig. 5.5). La descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato se realiza probablemente en dos etapas (fig. 5.6).

En todos los casos la producción de energía tiene lugar en la reoxidación del NADPH. Esto condiciona una baja disponibilidad de NAD^+ , que queda todo en forma reducida parando el ciclo de Krebs cuando éste es funcional, tal como sucede en los miembros del

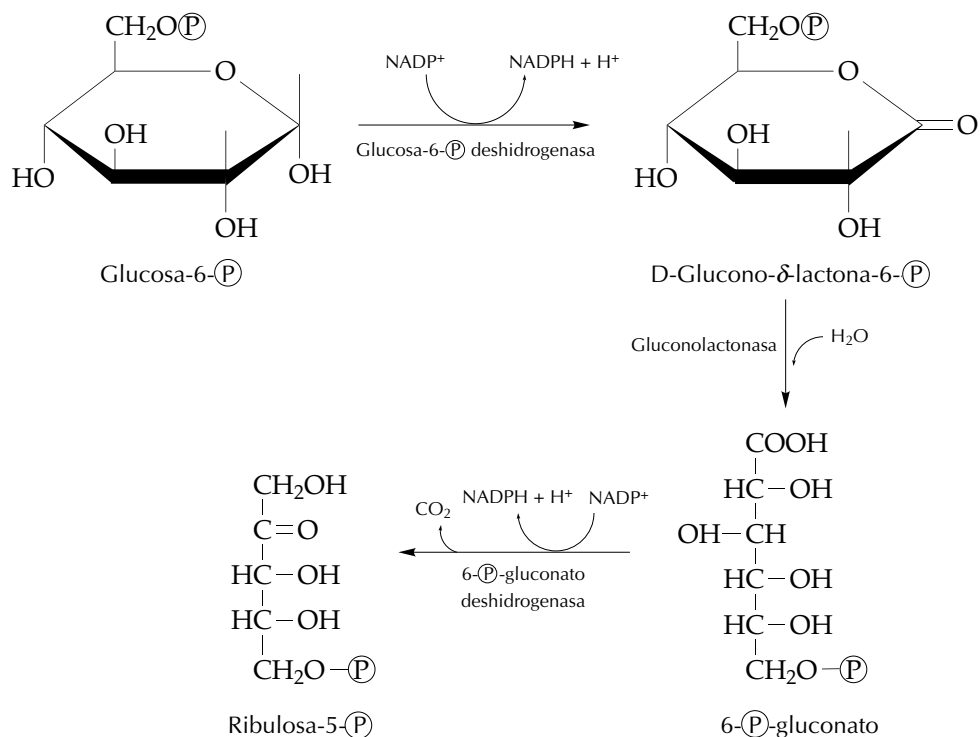


Figura 5.5 Las dos etapas de la descarboxilación oxidativa del sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

género *Acetobacter*. En general, la reoxidación de coenzimas se realiza a través de una cadena respiratoria que contiene quinonas, citocromo *c* y *a*, pero no citocromo *b*. En *Gluconobacter* sólo se presentan la quinona Q_{10} y el citocromo *c*. En todos los casos se presenta la citocromo oxidasa. La fosforilación oxidativa tiene lugar en la reoxidación del citocromo *c* y de la citocromo oxidasa con un rendimiento de $\text{P/O} = 2$ (4 moles de ATP/mol O_2).

5.9.2 Vía de Entner-Doudoroff

En *Gluconobacter oxydans* ssp. *melanogenes*, el 6-fosfogluconato puede deshidratarse a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. Este compuesto puede desdoblarse luego en piruvato y gliceraldehído-3-P mediante una aldolasa (fig. 5.6). Mediante esta ruta se produce menos NADPH que en la situación en la que el 6-fosfogluconato es descarboxilado a ribulosa-5-P. Adicionalmente, el gliceraldehído-3-P se oxida a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof, decarboxilándose en ambos casos el piruvato y originando acetato tal como ha sido descrito anteriormente. Esta vía se conoce como vía de Entner-Doudoroff, y es la misma utilizada por *Zymonomas mobilis* para llevar a cabo una fermentación alcohólica con una estequiometría similar a la de las levaduras (ver capítulo 6 o Lámina 1).

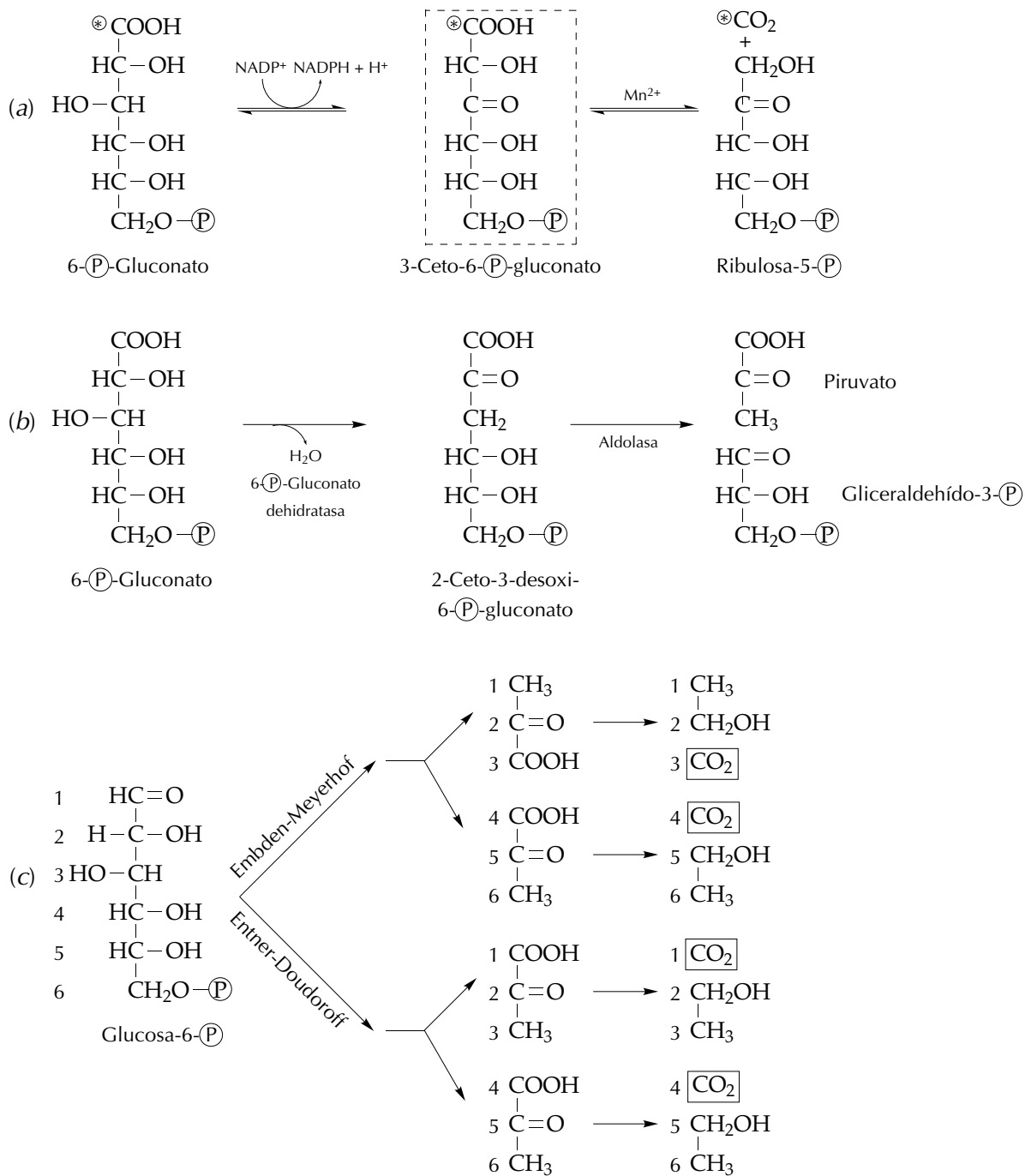


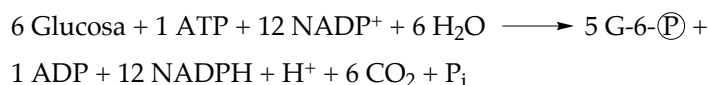
Figura 5.6 Las dos vías del 6-(P)-gluconato. (a) sistema de la 6-(P)-gluconato deshidrogenasa (b) reacción clave de la vía de Entner-Doudoroff (c) origen de los átomos de C de las moléculas de CO₂ formadas en la fermentación alcohólica de la glucosa por las levaduras (vía de Embden-Meyerhof) y *Zymonomas mobilis* (vía de Entner-Doudoroff) (ver Láminas 1 y 3).

5.9.3 Ciclo de la hexosa monofosfato o vía de Warburg-Dickens

Si la degradación de la glucosa utilizando el sistema de la glucosa-6-(P)-deshidrogenasa (ver apartado 5.9.1) conduce a la formación de ribulosa-5-(P), la misma puede convertirse en xilulosa-5-(P) y ribosa-5-(P) (fig. 5.7). A partir de la xilulosa-5-(P), algunas bacterias del ácido láctico (ver capítulo 6) pueden producir acetilfosfato y gliceraldehído-3-(P). El gliceraldehído-3-(P) es transformado en lactato siguiendo la vía de Embden-Meyerhof. Esta vía metabólica, anaerobia, que fermenta la glucosa produciendo lactato y etanol, es conocida como vía de la pentosa, y se caracteriza por la presencia de la pentosa fosfoacetolasa que cataliza la transformación de la xilulosa-5-(P) en acetilfosfato y gliceraldehído-3-(P) (ver capítulo 6 y Láminas 2 y 3).

La ribosa-5-(P) es importante como precursor para la biosíntesis de las purinas, las pirimidinas y los aminoácidos aromáticos, pero en el contexto del metabolismo de hexosas y pentosas por las bacterias del ácido acético se utiliza en su mayor parte juntamente con xilulosa-5-(P) para generar gliceraldehído-3-(P) y sedoheptulosa-7-(P) a través de la transcetolasa (fig. 5.7). Posteriormente, una serie de transformaciones llevan a producir bien una triosa-(P) (que puede ser degradada por la vía de Embden-Meyerhof) o una hexosa-(P) que entra nuevamente en el ciclo.

El ciclo de la hexosa monofosfato puede mineralizar la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 \longrightarrow 6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$), siempre que a través de las cadenas respiratorias se reoxida el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ y se regenere el ATP. En la figura 5.8 se representa la forma en la que se utilizan las reacciones de las figs. 5.6a y 5.7 para verificar este proceso de acuerdo con el balance global:

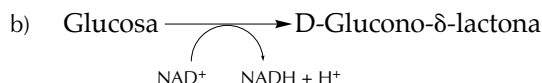


5.9.4 Formación de gluconato

Gluconobacter oxydans ssp. *suboxydans* presenta dos glucosa deshidrogenasas:



que aparentemente es idéntica a la glucosa oxidasa que trabaja con DPI (2,6-dinitrofenol indofenol) como aceptor de hidrógeno en lugar de O_2 , y:



En ambos casos, la gluconolactona se hidroliza a gluconato (fig. 5.9).

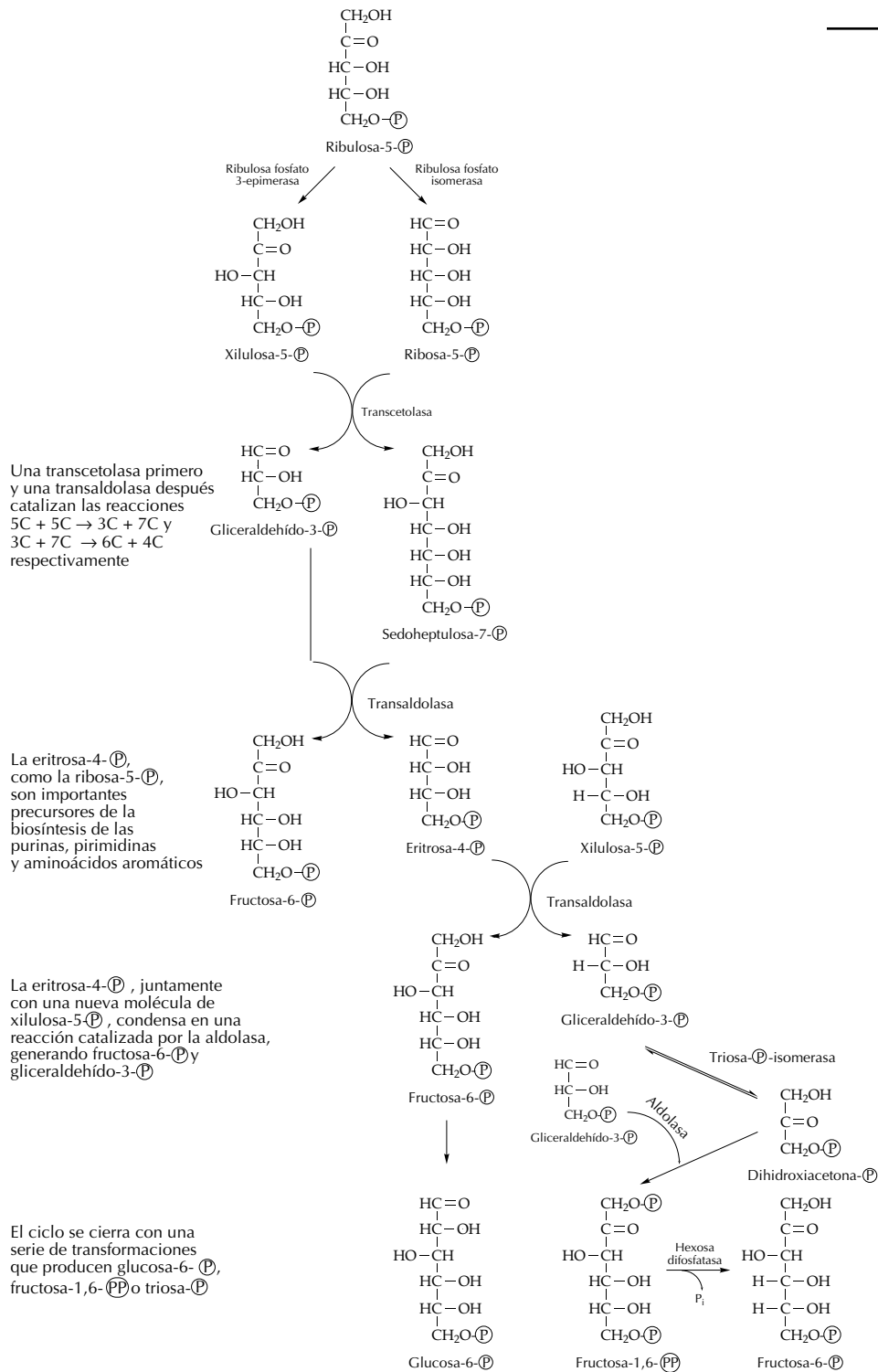
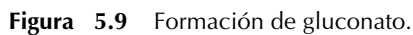
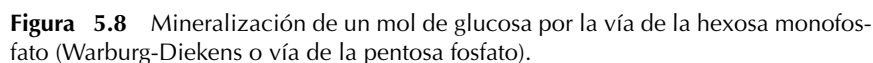
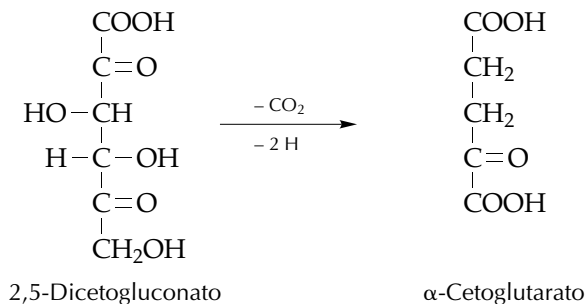


Figura 5.7 Transformaciones de la ribulosa-5-P.



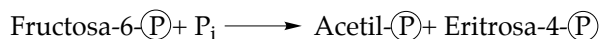
En algunos casos el gluconato se oxida con NADP^+ a 2-cetogluconato o a 5-cetogluconato y luego, a 2,5-dicetogluconato. *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans* puede transformar el 2,5-dicetogluconato en α -cetoglutarato, previa descarboxilación y pasando por una serie de intermediarios que no están caracterizados.



Acetobacter aceti ssp. *xylinum* tiene una glucoquinasa que permite pasar el gluconato a fosfogluconato con ATP. De este modo puede continuar la vía de Warburg-Dickens cortocircuitando la reacción de la glucosa-6-(P)-deshidrogenasa. Esta glucoquinasa también se ha encontrado en *Bifidobacterium*.

5.9.6 El sistema de las fosfocetolasas

Acetobacter aceti ssp. *xylinum* puede formar acetil-(P) a partir de fosfato inorgánico y fructosa-6-(P):



Esto es debido a la acción de la fosfohexosa fosfocetolasa. Este enzima sólo se ha encontrado además en *Bifidobacterium* (ver capítulo 6 y Lámina 2). El acetil-(P) genera ATP mediante la acetil-(P) quinasa:



En conjunción con la fosfopentosa fosfocetolasa, enzima mucho más difundido, la fosfohexosa fosfocetolasa permite una conversión de la fructosa-6-(P) en tres moléculas de acetato con la formación de tres de ATP (fig. 5.10, Lámina 2).

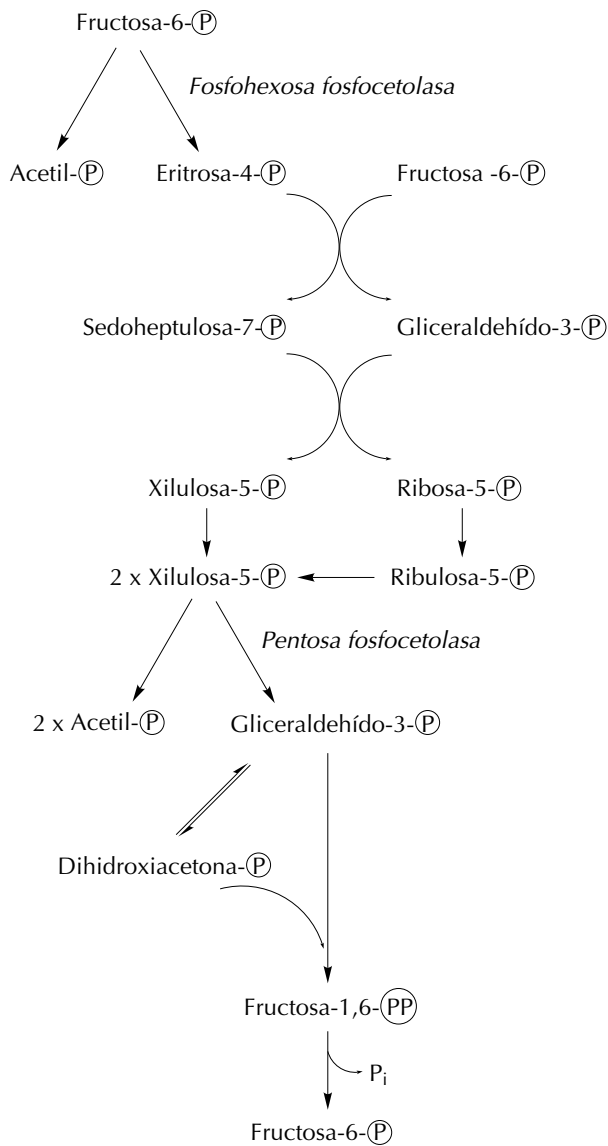


Figura 5.10 Sistema de las fosfocetolasas en las bacterias del ácido acético.

Las alternativas consideradas permiten resumir el metabolismo de los glúcidos en las bacterias del ácido acético mediante el esquema que se muestra en la figura 5.11.

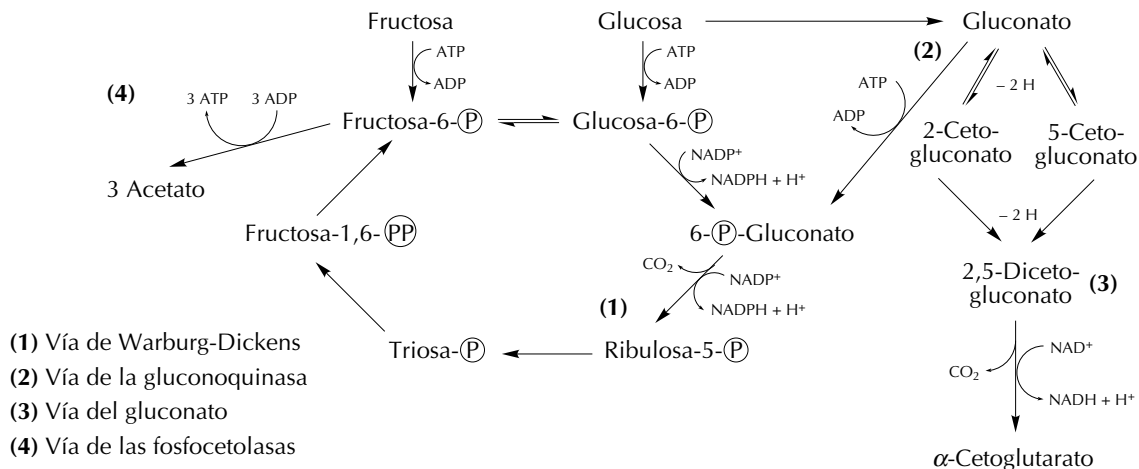


Figura 5.11 Resumen del metabolismo de los glúcidos en las bacterias del ácido acético.

5.10 MODELOS DEL METABOLISMO OXIDATIVO DE LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

El género *Acetobacter* fue dividido por Frateur en tres grupos: peroxydans (*A. peroxydans* y *A. paradoxum*); oxydans (*A. pasteurianus*, *A. levanicux*, *A. ascendens* y *A. raucus*) y mesoxydans (*A. aceti*, *A. xylinum* y *A. mesoxydans*). Actualmente se aceptan sólo tres especies: *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. peroxydans*. Las demás serían subespecies.

Con el género *Gluconobacter* y con las tres especies de *Acetobacter* pueden hacerse cuatro modelos metabólicos distintos (fig. 5.12). Los detalles de las transformaciones comprendidas en los mismos pueden entenderse fácilmente con lo que se ha descrito más arriba. La acetoina ($\text{CH}_3\text{—CHOH—CO—CH}_3$) se forma a partir del piruvato y acetaldehído por la acetoina sintasa de forma semejante a lo que realizan algunas bacterias del ácido láctico (ver capítulo 6).

5.11 FORMACIÓN DE CELULOSA

Desde hace tiempo se sabe que una singularidad de las bacterias del ácido acético es la de producir celulosa, la cual no se da en ninguna otra bacteria. Este producto, un β (1 \rightarrow 4) glucano, sólo ha podido ser detectado en *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* y tiene menos peso molecular que la celulosa vegetal. Glaser (1958) consiguió obtenerlo con el extracto celular que contiene la fracción microparticulada. La celulosa se forma con la celulosa sintasa a partir de UDP-glucosa. Esta última se forma con la UDP-glucosa pirofosforilasa:



La síntesis de la celulosa es endocelular, pero luego se secreta al medio externo donde forma una malla fibrosa que retiene burbujas de CO_2 .

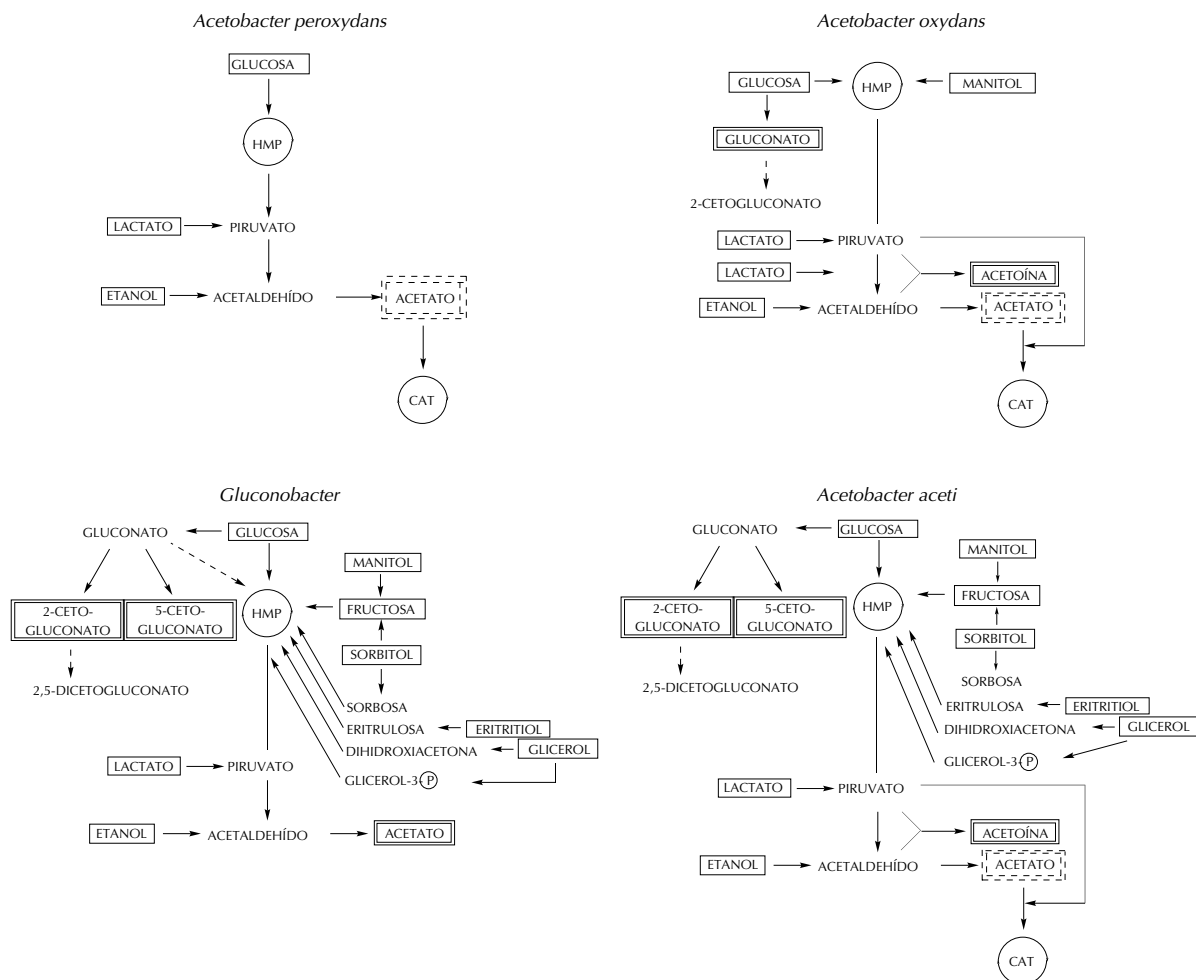


Figura 5.12 Modelos metabólicos de los cuatro tipos principales de bacterias del ácido acético. Las flechas con línea discontinua indican procesos no demostrados completamente. Con recuadro sencillo se indican los compuestos utilizados como sustratos. Con recuadro doble, los productos finales de la actividad metabólica. Con recuadro doble discontinuo, productos finales que son posteriormente reutilizados. HMP, vía de la hexosa monofosfato. CAT, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

BIBLIOGRAFÍA

- FRATEUR, J. "La cellule", fascs, 3, 334, 353, 358, 367 y 382. (1950).
- ASAI, T. Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore (1968).
- SWINGS, J. y DE LEY: The Genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. En The Prokaryotes (Stars, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel, eds.). Springer Verlag. Berlin (pp. 771–778) (1981).
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vo. 1, pp. 267–275. Williams and Wilkins. Baltimore/London. (1984).

6.1	EL ÁCIDO LÁCTICO COMO PRODUCTO DE FERMENTACIÓN	74	
6.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO LÁCTICO	74	
6.3	FERMENTACIONES LÁCTICAS DE HEXOSAS Y PENTOSAS	77	
6.4	BALANCES DE FERMENTACIÓN	79	
6.5	FERMENTACIONES LÁCTICAS DE LA FRUCTOSA		82
6.6	FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LA DESOXIRRIBOSA	83	
6.7	COFERMENTACIÓN DE LA LACTOSA Y LA TREONINA	83	
6.8	FERMENTACIÓN DEL MALATO	85	
6.9	FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL TARTRATO		86
	BIBLIOGRAFÍA	87	

6.1 EL ÁCIDO LÁCTICO COMO PRODUCTO DE FERMENTACIÓN

El ácido láctico o ácido α -OH-propiónico $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, es el responsable de la leche agriada que el hombre conoce desde hace miles de años, igual que los efectos de las levaduras y los de las bacterias del ácido acético (capítulos 4 y 5). También aquí, el ácido láctico es consecuencia del desarrollo de un tipo peculiar de microorganismos englobados en un grupo denominado bacterias del ácido láctico.

El ácido láctico fue aislado e identificado por Scheele en 1780, reconociéndose como un producto de fermentación por Blondeaur en 1847. Pasteur en 1855 publicó su célebre memoria titulada “Mémoire sur la fermentation appelée lactique”, la cual se considera la base de la teoría microbiana de la fermentación. Lister en 1877 obtiene el cultivo puro de *Streptococcus lactis*, el primero de una bacteria láctica. Pocos años después, en 1881, Littleton iniciaría la producción industrial de este ácido por fermentación.

Las bacterias del ácido láctico intervienen en la preparación de muchos alimentos, como la col ácida (“sauerkraut”), los embutidos curados, pepinillos y análogos y las aceitunas aliñadas. También son esenciales para la obtención de la leche ácida, el kéfir, el yogur y los forrajes ensilados. Forman parte del proceso de fabricación de muchos quesos, solas o en conjunción con hongos y propionibacterias. Hay también bacterias del ácido láctico que son patógenas.

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico, lo cual da lugar a actividad óptica. Hay dos estereoisómeros el D(–) y el L(+), además del racémico, ópticamente inactivo. Esta es una característica taxonómica importante, puesto que cada especie produce un tipo de ácido láctico. A menudo, en el proceso industrial se obtiene el racémico por efecto de racemasas exógenas procedentes de otras bacterias contaminantes (p. ej.: *Clostridium acetobutylicum*).

La estequiometría clásica de la fermentación láctica es



Este proceso tiene lugar también en el músculo (glucólisis anaerobia). No hay que olvidar que el músculo de paloma y la levadura fueron los materiales básicos utilizados para el esclarecimiento de la denominada vía de Embden-Meyerhof, uno de los pilares de toda la bioquímica.

6.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO LÁCTICO

Las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista taxonómico. Tienen como característica común la de producir ácido láctico como catabolito único o mayoritario (más de la mitad) en la fermentación de los azúcares. Los miembros más característicos son cocos o bacilos grampositivos, inmóviles y catalasa negativos.

Los cocos grampositivos se distribuyen en tres grupos: aerobios, facultativos y anaerobios. Los primeros se distinguen por una prueba de oxidación/fermentación, como la de Hugh y Leifson, que da +/–, a

diferencia de los facultativos que dan +/- . Los anaerobios sólo se desarrollan en anaerobiosis estricta. Sin embargo, dentro de los facultativos debemos distinguir aquellos que tienen la capacidad de alternar un metabolismo oxidativo aerobio con otro fermentativo, de aquellos otros que nunca pueden utilizar el O_2 como aceptor final de electrones, pero que fermentan indistintamente en presencia y en ausencia de aire. Este último caso es el de las bacterias lácticas incluidas dentro del grupo de cocos grampositivos facultativos. En cambio, los estafilococos son verdaderos facultativos, capaces de presentar dos fisiologías alternativas, como ocurre con la mayor parte de las levaduras.

Algunos cocos del grupo láctico crecen mal en condiciones estrictamente anaerobias, aunque nunca utilizan el O_2 . Otros crecen bien sólo a bajas presiones parciales de oxígeno y por ello se les denomina microaerófilos. Finalmente, muchas bacterias lácticas crecen mejor en una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO_2 y algunas no crecen sin este requisito.

Otra característica de las bacterias del ácido láctico, que abarca tanto a cocos como a bacilos, es la de presentar unos requerimientos nutritivos complejos. Esto lleva a la necesidad de utilizar medios especiales como el de agar sangre, el de Edwards, el de jugo de tomate o el de Rogosa. Las características comunes de todos estos medios son la presencia de azúcar, la adición de productos naturales complejos apropiados a cada caso y, para el aislamiento, la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento de otros microorganismos. Es esencial tener en cuenta que en las bacterias lácticas el azúcar se utiliza sólo como fuente de energía, en tanto que el carbono para el crecimiento se toma de aminoácidos.

En la tabla 6.1 se consignan las características diferenciales de los distintos géneros de cocos grampositivos facultativos. De todos ellos, pertenecen al grupo láctico los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aerococcus*. Es interesante señalar que tanto en el primero como en el cuarto puede presentarse pseudocatalasa, enzima que desdobra el peróxido de hidrógeno como la catalasa, pero que no es un enzima hemínico. Esto se pone de manifiesto por la reacción negativa de la bencidina. En cambio, algunos estreptococos pueden sintetizar citocromo y dar bencidina positiva y catalasa negativa. Para ello se requiere que el medio de cultivo tenga el grupo hemo, cosa normal en el medio de agar sangre que se utiliza frecuentemente.

Por lo que respecta a las bacterias lácticas de morfología bacilar, se agrupan actualmente en una sola familia de bacilos grampositivos no esporógenos. Se trata de unas bacterias catalasa negativas y, por lo tanto, estrictamente fermentativas, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Son bacterias que se presentan en formas que van desde cocobacilos distribuidos irregularmente a bacilos largos en cadenas, con tendencia pleomórfica considerable.

En la tabla 6.2 se consignan las propiedades diferenciales de los miembros de los géneros de bacilos grampositivos no esporógenos, dentro de los cuales se encuentra el género *Lactobacillus*, único que podemos incluir en el grupo láctico.

TABLA 6.1 Características diferenciales de los distintos géneros de cocos grampositivos facultativos.

Características	Géneros facultativamente anaerobios						
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Stomatococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Gemella</i>
Distribución predominante (aparte de células individuales)	Grupos, parejas ¹	Racimos, algunas parejas	Cadenas, parejas	Parejas, cadenas	Tétradas, algunas parejas	Tétradas, parejas	Parejas, cadenas cortas
Aerobios estrictos	—	—	—	—	—	—	—
Anaerobios facultativos o microaerófilos	+	+	+	+	+	+ ²	+ ³
Anaerobios estrictos	—	—	— ⁴	—	—	—	—
Catalasa	+ ⁵	— (débil)	— ⁶	—	—	— ⁶	—
Citocromo presente	+	+	— ⁷	—	—	—	— ⁷
Principales productos de la fermentación de hidratos de carbono en condiciones anaerobias	Lactato	ND (ácido)	Lactato	Lactato, etanol	Lactato	ND (ácido)	ND

¹ Raramente estrictamente aerobios² Crecen mejor a una concentración reducida de oxígeno, algunas veces no crecen anaerobiamente.³ Débil crecimiento anaerobio.⁴ Raramente estrictamente anaerobio.⁵ Raramente negativos.⁶ Algunas veces presentan una débil reacción de catalasa o pseudocatalasa.⁷ En condiciones aerobias, algunas cepas sintetizan citocromo en medios suplementados con hemina.

ND: No determinado.

TABLA 6.2 Características diferenciales de los bacilos grampositivos no esporógenos.

Características	Anaerobios facultativos Catalasa-negativos		Anaerobios facultativos Catalasa-positivos		Aerobios		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Brochothrix</i>	<i>Listeria</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Renibacterium</i>
Morfología celular	Bacilos, usualmente rectos, algunas veces cocobacilos	Bacilos delgados, a menudo filamentosos	Bacilos delgados, a menudo filamentosos	Bacilos cortos, a menudo cadenas cortas y filamentosos	Bacilos en cadenas, cocos en cultivos viejos	Bacilos cortos en cadenas	Bacilos cortos, a menudo en parejas
Bacilos multicelulares (tricomas)	—	—	—	—	—	+	—
Diámetro de los bacilos (micras)	0,5-1,1 ^a	0,2-0,5	0,6-0,8	0,4-0,5	0,7-0,9	1,4-3,2	0,3-1,0
Motilidad (por flagelación peritrica, si son móviles)	— ^b	—	—	+ ^c	+ ^d	+ ^d	—
Aerobios	—	—	—	—	+	+	+
Anaerobios facultativos o microaerófilos	+	+	+	+	—	—	—
Catalasa	— ^e	—	+	+	+	+	+
Principales productos de fermentación a partir de hidratos de carbono	Principalmente lactato, pero pueden producir algo de acetato, etanol, CO ₂	Lactato	Principalmente lactato	Lactato	NC	NC	NC

^a A veces hasta 1,6 μm.^b Raramente móviles.^c A 20-25 °C; poco móviles a 37 °C.^d Raramente móviles^e Algunas cepas débilmente positivas.

NC: No considerados para su distinción.

TABLA 6.3 Propiedades distintivas de los cinco géneros de bacterias del ácido láctico.

Forma	Fermentación	Catalasa	Género
Cocos en cadenas o parejas	Homoláctica	–	<i>Streptococcus</i>
Cocos en cadenas o parejas	Heteroláctica	–	<i>Leuconostoc</i>
Cocos en tétradas	Homoláctica (D,L-láctico)	–	<i>Pediococcus</i>
Cocos en tétradas	Homoláctica (D-láctico)	± (pseudocatalasa si la reacción es positiva)	<i>Aerococcus*</i>
Bacilos usualmente en cadenas	Homo o heterolácticos	–	<i>Lactobacillus</i>

* Microaerófilos. Algunas cepas no crecen en anaerobiosis estricta.

El ácido láctico puede ser también producido en mayor o menor proporción por bacterias que no suelen incluirse en el grupo láctico. Además de los bacilos grampositivos no esporógenos señalados en la tabla 6.2, podemos añadir *Bifidobacterium*, y algunas especies de *Bacillus*, *Clostridium perfringens*, *Butyribacterium rettgeri*, especies de *Microbacterium* y muchas bacterias entéricas.

Desde el punto de vista bioquímico, la clasificación fundamental de las verdaderas bacterias del ácido láctico, de acuerdo con lo que establecieron Kluver y Donker, es la de las homofermentativas que sólo producen ácido láctico de la glucosa y las heterofermentativas, en las que se producen otros catabolitos entre los que siempre se encuentra el CO₂. El carácter gasogénico de la fermentación de la glucosa es muy fácil de poner de manifiesto y, juntamente con la morfología y otras pocas características, permite determinar cada uno de los cinco géneros en los que podemos distribuir las bacterias del ácido láctico (tabla 6.3).

6.3 FERMENTACIONES LÁCTICAS DE HEXOSAS Y PENTOSAS

De acuerdo con lo señalado en el apartado anterior existen bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras utilizan las hexosas siguiendo la vía de Embden-Meyerhof. Sin embargo, hay homofermentativas obligadas y facultativas. Estas últimas tienen glucosa-6-P-deshidrogenasa y siguen la vía de la pentosa. El que utilicen una u otra vía, alternativa o simultáneamente, depende de las condiciones de cultivo.

Las bacterias lácticas heterofermentativas propiamente dichas producen siempre, además de ácido láctico, otros productos finales de la fermentación heteroláctica.

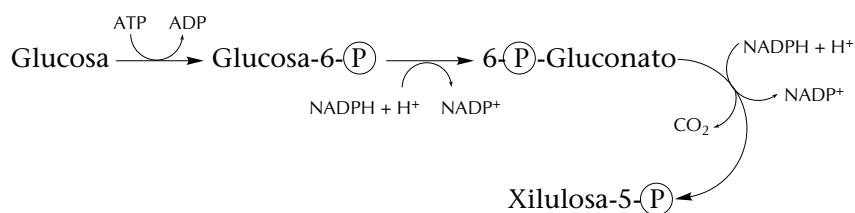
Entre todas las bacterias pueden distinguirse los siguientes tipos de fermentaciones heterolácticas:

1. Tipo *Leuconostoc*. La fermentación típica de 1 mol de glucosa da lugar a un mol de ácido láctico, un mol de CO_2 , y otro de etanol. En algunos casos se produce glicerina y acetato en pequeña proporción, disminuyendo el lactato y el etanol.
2. Tipo *Bifidobacterium*. La fermentación de glucosa produce acetato y lactato, así como trazas de fórmico.
3. Tipo entérico. La fermentación produce lactato, junto a fórmico, acetato y, eventualmente, succinato.
4. Tipo *C. perfringens*. Producción de ácido láctico junto a ácido butírico.
5. Tipo *Propionibacterium*. Producción mayoritaria de ácido propiónico junto a trazas de láctico y succínico.
6. Tipo *Actinomyces*. Producción mayoritaria de ácido succínico y láctico con pequeñas cantidades de acético o fórmico.

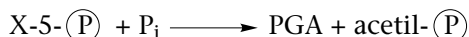
De todos estos grupos heterofermentativos, solamente *Leuconostoc* pertenece al grupo de las bacterias lácticas.

La formación de ácido láctico siempre tiene lugar por reducción del ácido pirúvico, mediante la deshidrogenasa láctica. Se conocen varios tipos de enzima según el estereoisómero producido y según sean dependientes del $\text{NADH} + \text{H}^+$ o del FADH_2 . La mayor parte se halla en la fracción soluble pero también se han encontrado algunos en la fracción microparticulada.

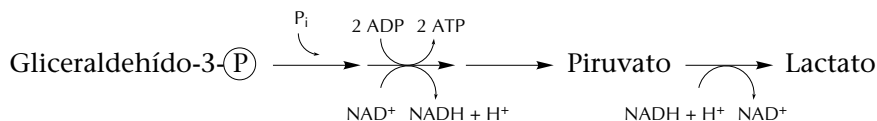
La fermentación homoláctica de la glucosa es una conversión de un mol de azúcar en dos de ácido láctico. En la fermentación heteroláctica tenemos una formación de xilulosa-5-fosfato (X-5-P) por el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa:



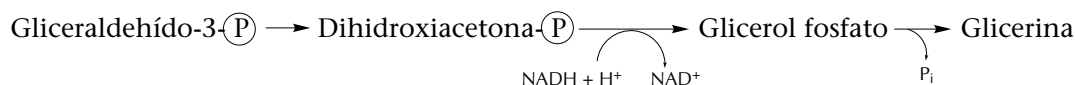
La X-5-P es el intermediario clave de la llamada vía de la pentosa, paralelamente a las denominaciones frecuentemente utilizadas de las vías de la hexosa monofosfato (Warburg-Dickens o vía de la pentosa fosfato) y de la hexosa difosfato (Embden-Meyerhof o de las triosas) (ver Lámina 3). El enzima característico es la fosfopentosa fosfocetolasa:



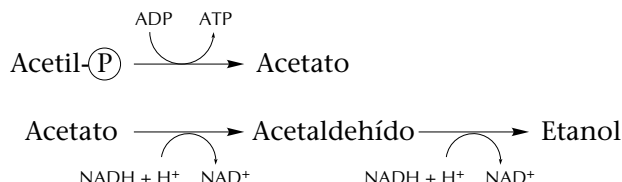
El gliceraldehído-3-(P) (GA-3-(P)) es transformado en lactato por la vía de Embden-Meyerhof:



La fosfotriosa isomerasa puede dar origen a glicerina como sistema de reoxidación de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$, según ya ha sido comentado:



El acetil-P puede dar origen a acetato y a etanol, según reacciones que también se han descrito:



En la fermentación láctica de las pentosas se hace innecesario el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y no se produce CO_2 :



El único NAD^+ que se reduce en la oxidación del fosfogliceraldehído se reoxida en la formación de lactato.

Bifidobacterium puede transformar una molécula de glucosa en tres de acetato (capítulo 5), pero normalmente se forman tres moles de acetato y dos de lactato por cada dos moles de glucosa. Por esta razón, los miembros del género *Bifidobacterium* se incluyeron durante algún tiempo en el grupo láctico. En la vía que utiliza *Bifidobacterium*, además de la pentosa fosfocetolasa es característica una hexosa fosfocetolasa (fig. 6.1 y Láminas 2 y 3).

Muchas cepas de las especies de *Bifidobacterium* producen un exceso de ácido acético con respecto al esquema metabólico de la figura 6.1. El ácido acético procede del desdoblamiento del ácido pirúvico en ácido acético y ácido fórmico, como hacen las bacterias entéricas. Además, esto conlleva que cierta cantidad de ácido acético se reduzca a etanol para equilibrar el balance de óxido-reducción.

Otros tipos de bacterias heterofermentativas que producen ácido láctico serán consideradas más adelante (capítulos 7, 8 y 9).

6.4 BALANCES DE FERMENTACIÓN

Cuando en una fermentación se producen varios productos finales y la bacteria dispone de diferentes alternativas para reoxidar el NADH , no existe *a priori* una estequiometría definida. En cada caso concreto, según sea la bacteria y las condiciones de cultivo, puede cuantificarse tanto el consumo de glucosa (u otro sustrato) como la producción de productos finales. Entre el primero y los últimos deberá poder establecerse un balance correcto de carbono, de óxido-reducción y de moléculas de un solo átomo de carbono. Un ejemplo concreto puede ser el de la fermentación heteroláctica de la glucosa por una cepa de *Lacto-*

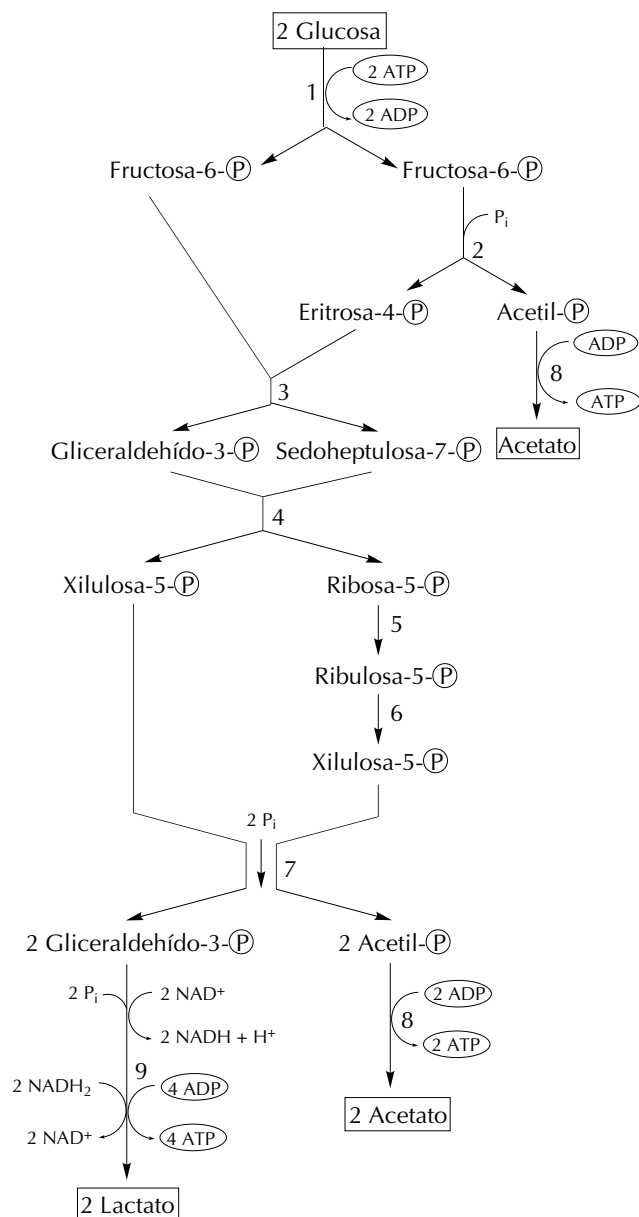


Figura 6.1 Formación de acetato y lactato por *Bifidobacterium*. 1, hexoquinasa y glucosa-6-fosfatoisomerasa; 2, fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa; 3, transaldolasa; 4, transcetolasa; 5, ribosa-5-fosfato isomerasa; 6, ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; 7, xilulosa-5-fosfato fosfoacetolasa; 8, acetato quinasa; 9, enzimas como en la vía homofermentativa.

TABLA 6.4 Balance de una fermentación de la glucosa por <i>Lactobacillus buchneri</i> (véase texto).								
	A	B	C	D	E		F	
Glucosa utilizada	112,2	100	600	0	-	-	-	
Productos formados:								
Ác. láctico	89,2	80	240	0	-	-	-	
Ác. acético	19,7	17,56	35,12	0	-	-	17,56	
Etanol	78,9	70,38	140,76	-2	-	140,76	70,38	
CO ₂	95,1	84,82	84,82	+2	169,4	-	-	
Glicerol	43,5	38,80	116,40	-1	-	38,80	-	
			Σ		Σ	Σ	Σ	
			617,10		169,4	179,56	87,94	
			$\% \text{ C recuperado } \frac{617,10}{600} \times 100 = 102,7$					
			$\text{Balance O/R (\%)} \frac{169,4}{179,56} \times 100 = 94,47$					
			$\% \text{ de CO}_2 \text{ recuperado } \frac{84,82}{87,94} \times 100 = 96,5$					

bacillus buchneri (tabla 6.4). Para calcular el balance puede seguirse la siguiente pauta:

- Glucosa utilizada y productos formados en milimoles.
- Expresar las cantidades de sustrato fermentadas y las de productos finales formados en milimoles de productos formados por 100 milimoles de sustrato (C₆) utilizado (tabla 6.4B).
- Calcular los milimoles de carbono en el sustrato y en los productos finales (tabla 6.4C).

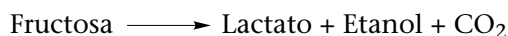
La suma de los milimoles de C de los productos obtenidos dividido por los del sustrato utilizado ($\times 100$) nos permitirá conocer el % de carbono recuperado. Dado los errores admisibles en las determinaciones analíticas puede admitirse un $\pm 5\%$ no significativo.

- Determinar el estado de óxido-reducción del sustrato y de los productos finales sobre la base de que una relación del H/O = 2 es un estado de O/R = 0. Por cada 2 H en exceso tendremos una unidad negativa y por cada dos en defecto una positiva.
- Multiplicar los milimoles de producto final por 100 mmol de sustrato por el número de óxido-reducción, colocando los resultados de los productos oxidados en una columna y los de los reducidos en otra. Calcular el balance porcentual O/R.
- Calcular los milimoles de CO₂ que deben producirse atendiendo a las cantidades de los distintos productos finales obtenidos. En el presente caso 1 mmol de CO₂ por cada mmol de moléculas de C₂. Calcular el % de CO₂ recuperado respecto al que debería obtenerse.

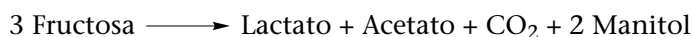
Los balances de fermentación no sólo permiten aceptar como correctos unos resultados experimentales, sino que contienen una información importante con respecto a las reacciones químicas que han tenido lugar.

6.5 FERMENTACIONES LÁCTICAS DE LA FRUCTOSA

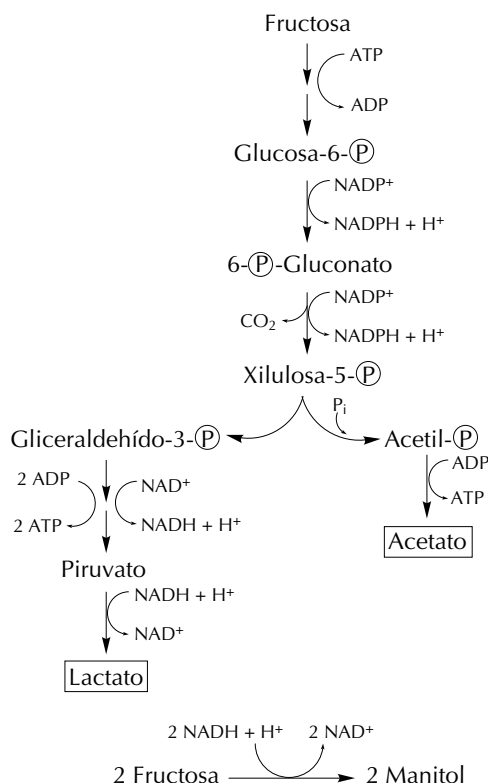
Lactobacillus plantarum, que es homofermentativo facultativo, fermenta la fructosa siguiendo el modelo heterofermentativo:



En cambio, *Lactobacillus brevis*, que es heterofermentativo obligado, produce una fermentación del mismo azúcar de acuerdo con la siguiente estequiometría:

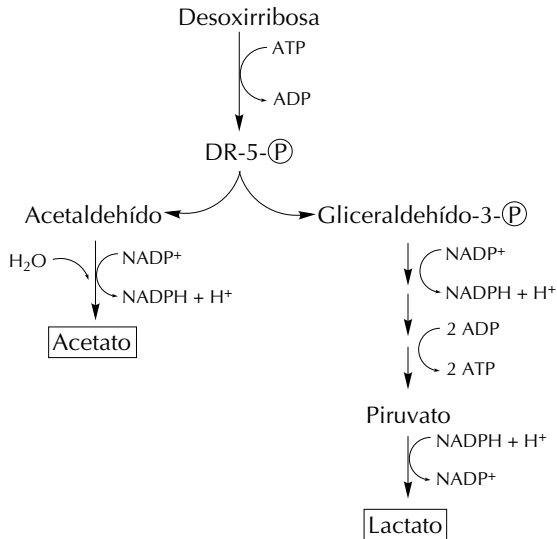


El esquema de fermentación correspondiente sería:



Para la transferencia de H intervienen el NADP^+ y el NAD^+ . Los aceptores finales de hidrógeno son el piruvato (deshidrogenasa láctica) y dos moles del propio sustrato (manitol deshidrogenasa) por mol de fructosa fermentada hasta los demás productos finales, a fin de compensar los dos moles de coenzimas reducidos que se produce en exceso.

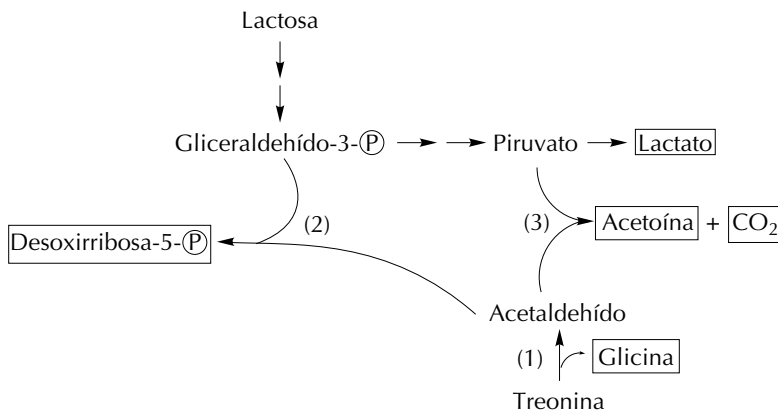
L. plantarum fermenta la arabinosa y la xilulosa, pero no a la desoxirribosa. Sin embargo, en presencia de glucosa se induce la síntesis de aldolasa de la desoxirribosa-5- P (enzima diferente de la fosfopentosa-afosfo-cetolasa), con lo cual tenemos:



Se requiere la fermentación simultánea de glucosa para que proporcione aceptores de electrones, con formación de lactato, glicerina, CO_2 y etanol.

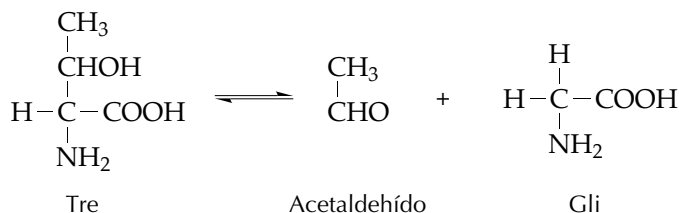
6.7 COFERMENTACIÓN DE LA LACTOSA Y LA TREONINA

Los estreptococos del grupo N de Lancefield o estreptococos lácticos están constituidos por *S. raffinolactis* y *lactis*. Esta última especie se subdivide en tres subespecies: *lactis*, *diacetylactis* y *cremoris*, las cuales fermentan la lactosa y la treonina según el esquema siguiente:

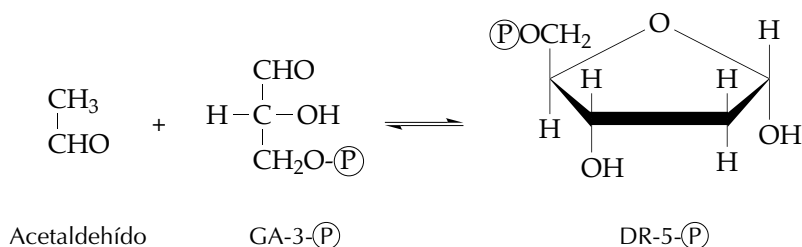


En esta cofermentación, la cual puede tener lugar espontáneamente en el suero de leche, se presentan tres reacciones características:

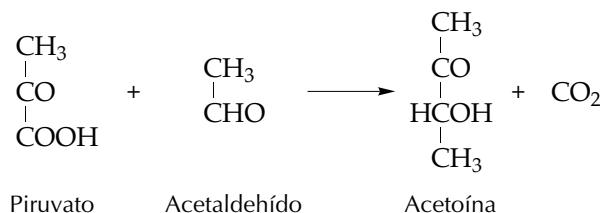
1. Reacción de la serina hidroximetil transferasa:



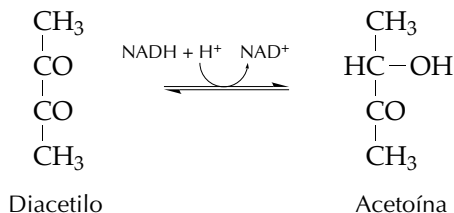
2. Reacción de la desoxirribosafosfato aldolasa (véase también en 6.6):



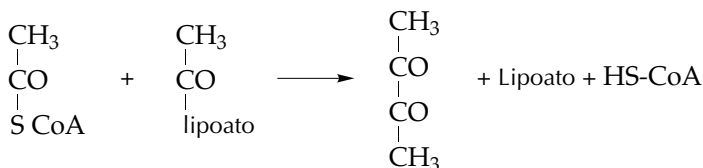
3. Reacción de la acetoína sintasa:



En *S. diacetylactis* se ha demostrado que la acetoína se forma a partir del diacetilo por acción de la acetoín deshidrogenasa



El diacetilo se produce por descarboxilación del piruvato

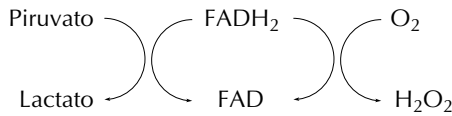


Para la formación de acetil-CoA y acetil-lipoato a partir de dos moléculas de piruvato se requiere pirofosfato de tiamina ((OH) TPP). Se forman dos moles de CO_2 (véase descarboxilación oxidativa anaerobia en el capítulo 7). No se requiere NAD^+ para la reoxidación del lipoato. El material genético que codifica los enzimas que forman diacetilo en *S. lactis* ssp. *diacetylactis* se localiza en un plásmido.

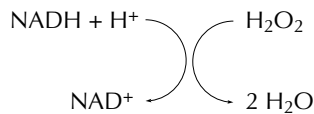
El acetaldehído formado por la serina hidroximetil transferasa a partir de la treonina también se reduce a etanol por la alcohol deshidrogenasa, lo cual permite reoxidar NADH^+ y cuadrar el balance O/R.

En condiciones anaerobias, los estreptococos del grupo N convierten un 96% de la glucosa presente en lactato, siendo minoritaria la cofermentación.

Se ha demostrado la presencia de dos láctico deshidrogenasas, una NAD^+ y otra FAD dependientes. En presencia de oxígeno el FADH_2 produce H_2O_2 por autooxidación:



Consecuentemente se para el crecimiento por efecto del H_2O_2 . Sin embargo, hay una peroxidasa que destruye el peróxido de hidrógeno con NADH:



Esto da lugar a cierta aerotolerancia.

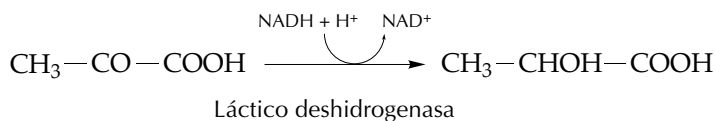
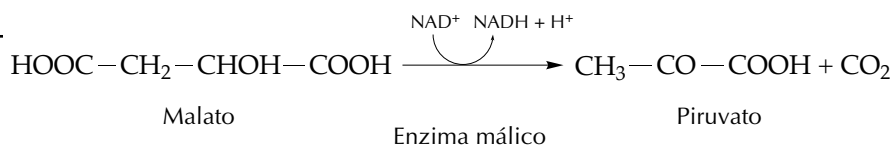
La formación de diacetilo por los estreptococos lácticos tiene mucha importancia en la fabricación de la mantequilla.

6.8 FERMENTACIÓN DEL MALATO

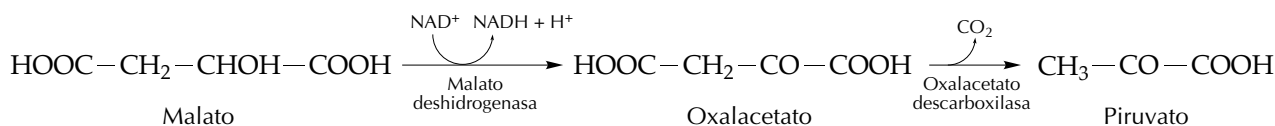
El ácido málico es un sustrato común de muchas bacterias del ácido láctico, lo cual tiene importancia en la industria del vino.

Durante el primer año, los vinos tintos sufren una segunda fermentación denominada maloláctica, causada por diversas bacterias del ácido láctico. El ácido málico, que es uno de los principales componentes del zumo de uva, se convierte en ácido láctico y CO_2 . Esto lleva a una reducción de la acidez que mejora las cualidades organolépticas.

La formación del lactato a partir del malato puede tener lugar bien en dos etapas o bien directamente. En el primer caso, tenemos:

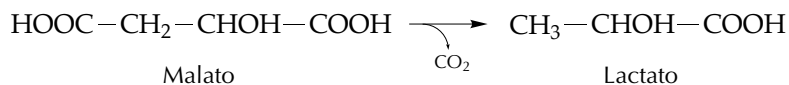


La primera reacción puede tener lugar, a su vez, en dos pasos:



puesto que la oxalacetato descarboxilasa se halla presente en extractos libres de células (*L. plantarum*).

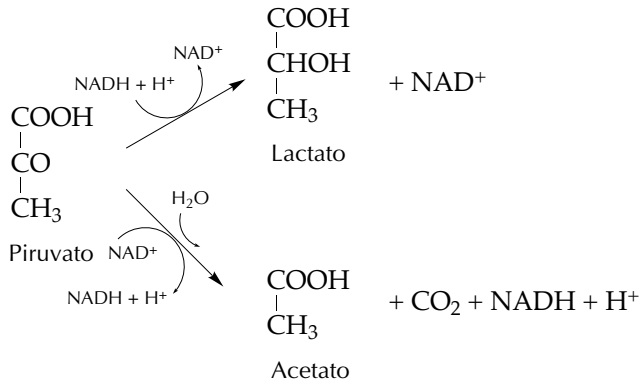
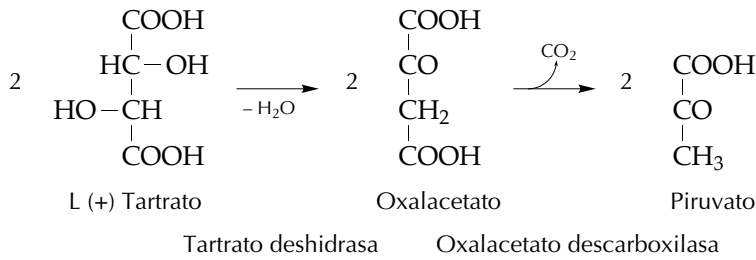
La formación directa se basa en el hecho de que la formación de lactato puede tener lugar sin pasar por piruvato. Así, en extractos de *L. plantarum* sin láctico deshidrogenasa se obtiene L (+) lactato y CO₂ a partir de L (+) malato. Además, en *Leuconostoc mesenteroides* de L (+) malato se forma L (+) lactato, mientras que con piruvato se forma D (-) lactato. Tendríamos pues una descarboxilación no oxidativa



La fermentación maloláctica es un proceso lento que puede intervenir como regulación de la vía de Embden-Meyerhof.

6.9 FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL TARTRATO

Al igual que el malato, el tartrato es un buen sustrato para muchas bacterias lácticas, lo cual también tiene cierto papel en la fabricación del vino.



La formación de acetato tendría lugar a través de acetyl-CoA con producción de $\text{NADH} + \text{H}^+$, al igual que en las bacterias del ácido propiónico (ver capítulo 7). La proporción de lactato/acetato permite equilibrar el balance O/R, sobre todo en los procesos de cofermentación.

L. plantarum creciendo sobre glucosa y tartrato presenta un desarrollo diaúxico, el cual no tiene lugar en *L. brevis* que utiliza simultáneamente los dos sustratos. Sin embargo, en esta bacteria el tartrato no genera ácido láctico, lo cual sugiere la existencia de otra vía metabólica no conocida.

BIBLIOGRAFÍA

- TAUBER, M. y GEIS, A. The family *Streptococcaceae* (New Medical Aspects). En *The Prokaryotes* (Starr, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel, eds.). Springer Verlag. Berlin. (pp. 1613–1630), 1981.
- SHARPE, M. ELISABETH. The genus *Lactobacillus*. En *The Prokaryotes* (Starr, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel, eds.). Springer Verlag. Berlin. (pp. 1655–1680). 1981.
- RAŠIĆ, JEREMIA L. J. y KURMANN, S. A. The Fermentation of Hexoses. In *Bifidobacteria and Their Role* (pp. 35–42). Birkhäuser Verlag. Basel/Boston/Stuttgart. 1983.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore/London. 1984.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

7.1	EL ÁCIDO PROPIÓNICO COMO PRODUCTO DE FERMENTACIÓN	90
7.2	REACCIÓN DE SWICK Y WOOD	91
7.3	FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTATO	91
7.3.1	Vía metabólica de <i>Propionibacterium</i> y <i>Veillonella</i>	91
7.3.2	Formación de propionato en <i>C. propionicum</i> y <i>Megasphaera elsdenii</i>	91
7.4	FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DE LA GLUCOSA	92
	BIBLIOGRAFÍA	94

El ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) fue aislado por Nöllner en 1841 a partir de productos de fermentación del ácido tartárico. Más tarde (1876, 1884), Fitz puso de manifiesto la existencia de bacterias que producen ácido propiónico a partir del malato cálcico y del lactato cálcico.

Los primeros estudios sobre la fermentación propiónica de azúcares se deben a Orla-Jensen (1889), quien reveló que era la causa de la formación de ojos en el queso de Emmenthal. Shelman y Saw (1923, 1924) obtuvieron cultivos puros de bacterias del ácido propiónico que serían útiles para asegurar la formación de ojos en la fabricación del queso de Emmenthal cuando esta industria se extendió a otros países distintos de su lugar de origen. Virtanen (1925) fue el primero en investigar el mecanismo de fermentación posiblemente responsable tanto de la producción de ácido propiónico como de la formación concomitante de CO_2 , procesos ambos implicados en la producción de este tipo de queso. Finalmente, los estudios taxonómicos de Van Niel permitieron definir el género *Propionibacterium* en el que se incluyen todas las bacterias del grupo propiónico propiamente dicho. Las propionibacterias constituyen una familia de bacterias corineformes dentro de los bacilos grampositivos no esporógenos, y tienen un perfil intermedio entre el grupo láctico, las corinebacterias y los actinomicetos. Desde el punto de vista bioquímico, la distinción fundamental con respecto a las bacterias del ácido láctico se halla precisamente en la capacidad de usar el ácido láctico como sustrato. No obstante, en la fermentación de los azúcares por propionibacterias, este ácido puede formarse junto al propiónico y otros ácidos orgánicos como el acético, el butírico y el fórmico. Los miembros del género *Propionibacterium* son anaerobios, pero generalmente toleran la presencia de aire, sobre todo en cultivos en los que se utiliza un inóculo abundante.

El ácido propiónico no es un catabolito exclusivo de este grupo. También lo producen los miembros del género *Veillonella* a partir del lactato. Se trata de un grupo de cocos anaerobios gramnegativos (Prévot, 1933), que no fermentan azúcares. También hay un bacilo grampositivo esporógeno, que presenta esporas subterminales del mismo diámetro que la célula vegetativa, el cual produce a partir de azúcares ácido propiónico junto con otros ácidos orgánicos. Se trata de *Clostridium propionicum*, descrito por Cardon y Barker (1946). Finalmente, existe un grupo de cocos gramnegativos incluido dentro de la familia de las Veilloneláceas, que también produce ácido propiónico del lactato y que puede fermentar azúcares, a diferencia del género *Veillonella*. Son los miembros de *Megasphaera elsdenii*, descritos por Elsden (1956), Gutiérrez (1959) y Rogosa (1971).

En conjunto, se puede considerar al ácido propiónico como un catabolito mayoritario resultante de la heterofermentación de diversos sustratos, según se señala en la tabla 7.1.

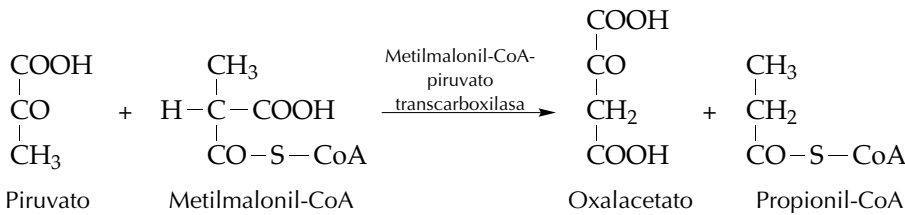
Algunos de los organismos citados también pueden producir ácido propiónico a partir de polialcoholes, aminoácidos y otros ácidos orgánicos distintos del ácido láctico.

TABLA 7.1 Sustratos utilizables por los microorganismos productores de ácido propiónico.

Organismo productor	Sustrato	
	Lactato	Azúcares
<i>Propionibacterium</i>	+	+
<i>Clostridium propionicum</i>	+	+
<i>Veillonella</i>	+	-
<i>Megasphaera</i>	+	+

7.2 REACCIÓN DE SWICK Y WOOD

Swick y Wood descubrieron una reacción que es fundamental en la producción de ácido propiónico por *Propionibacterium* y *Veillonella*, tanto en la fermentación de azúcares como del lactato:



La fuente de metilmalonil-CoA es el propio oxalacetato, que también puede derivarse del piruvato por otra reacción independiente, a través de fosfoenolpiruvato como producto intermedio (ver apartados 7.3 y 7.4).

7.3 FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DEL LACTATO

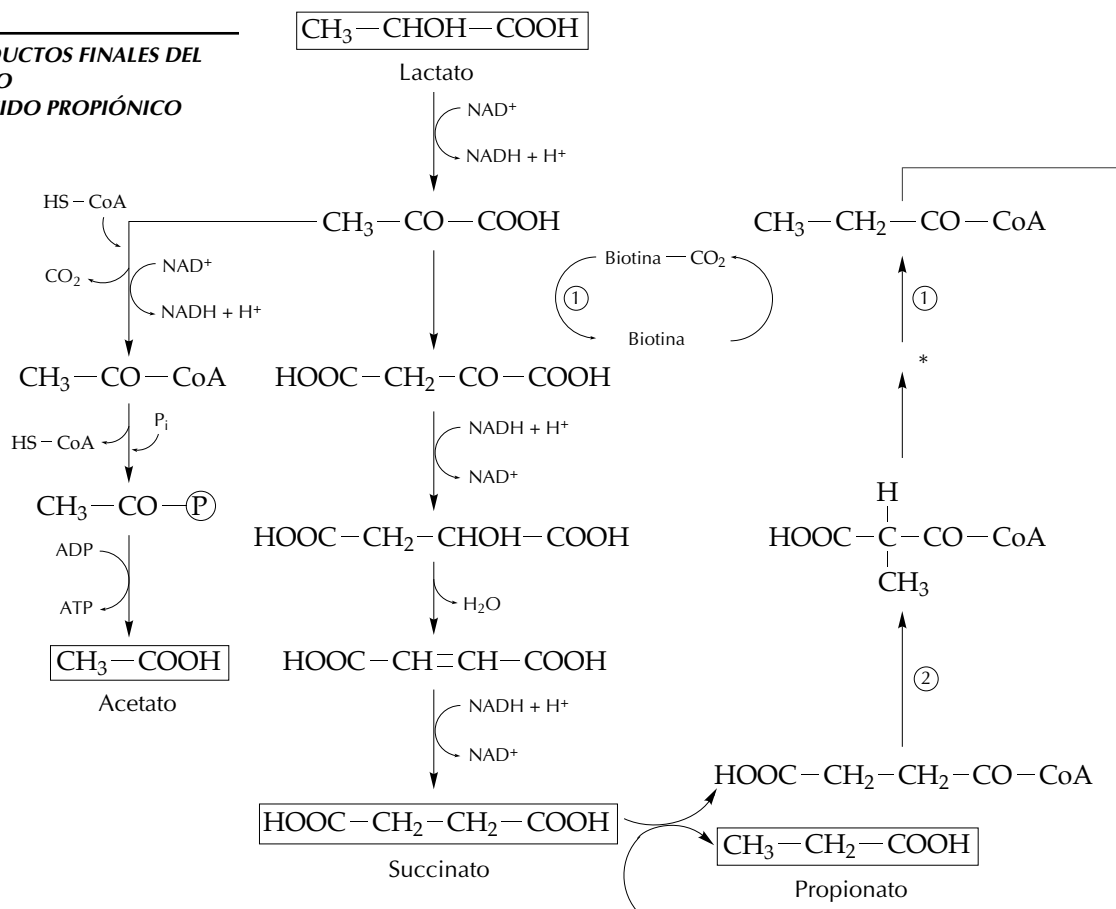
El ácido láctico es un sustrato común a todas las bacterias que producen ácido propiónico. Sin embargo, este último se forma siguiendo dos vías diferentes según el tipo de microorganismo.

7.3.1 Vía metabólica de *Propionibacterium* y *Veillonella*

Además de ácido propiónico se forma acetato, succinato y CO₂. La vía metabólica se representa en la figura 7.1.

7.3.2 Formación de propionato en *C. propionicum* y *Megasphaera elsdenii*

En estos microorganismos la formación de ácido propiónico no va acompañada de succinato, pero sí de acetato y de CO₂ (fig. 7.2).



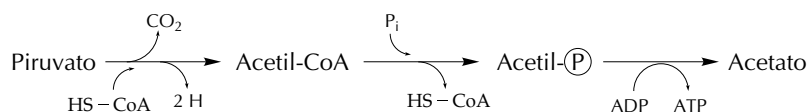
* El sustrato de la transcarboxilasa no es el D-Metilmalonil-CoA, sino el L-Metilmalonil-CoA.

Por ello, una racemasa actúa sobre el producto de la metilmalonil-CoA mutasa.

Figura 7.1 Formación de propiónico en *Propionibacterium* y *Veillonella*. Tal como puede observarse en la figura, el propiónico tiene su origen en una reacción de transcarboxilación (reacción de Swick y Wood). Enzimas característicos de la vía son la (S) metilmalonil-CoA-piruvato transcarboxilasa (1), un enzima de elevado peso molecular (aprox. 80000 da), y la metilmalonil-CoA mutasa (2), que reordena el esqueleto carbonado del succinil-CoA. Nótese que el acetato y el CO_2 que pueden acompañar al propionato tienen su origen en el piruvato.

7.4 FERMENTACIÓN PROPIÓNICA DE LA GLUCOSA

En todos los ejemplos conocidos, la glucosa es degradada hasta piruvato por la vía de Embden-Meyerhof. Una parte del piruvato es descarboxilada al igual que sucede en la fermentación propiónica del lactato:



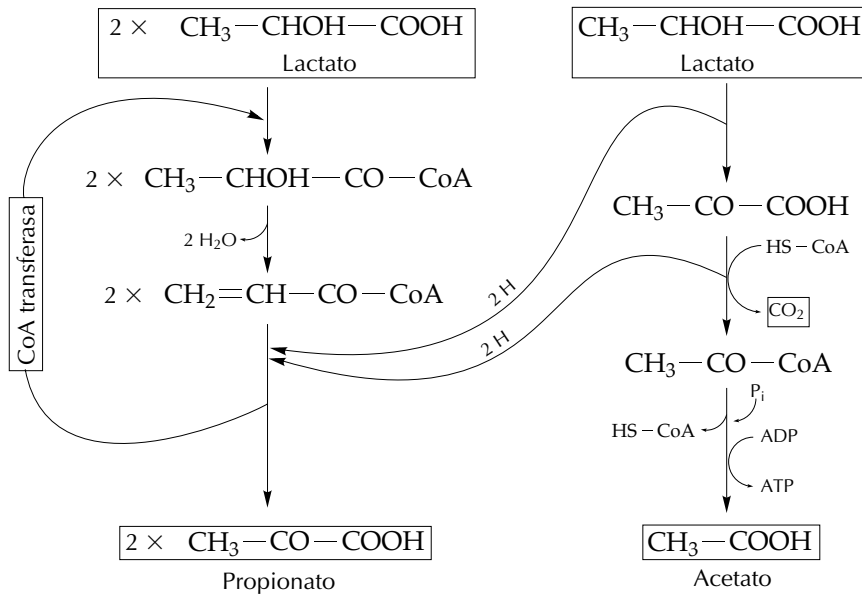
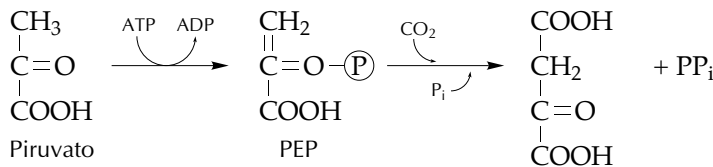
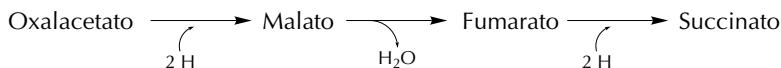


Figura 7.2 Formación de propionato, acetato y CO₂ a partir de lactato por *Clostridium propionicum* y *Megasphaera elsdenii*. El proceso de formación de acrilil-CoA no está todavía bien establecido. La oxidación de lactato a acetato proporciona el poder reductor para la reducción del acrilil-CoA. Una flavoproteína transportadora de electrones reducida actúa de dador de hidrógeno.

Otra fracción del piruvato pasa a oxalacetato por la reacción de Wood-Werkman, en la cual el ácido pirúvico es fosforilado a fosfoenolpiruvato con ATP y la piruvato fosfotransferasa. En las propionibacterias, una carboxitransefosforilasa carboxila el fosfoenolpiruvato para dar oxalacetato:



En *Propionibacterium*, el oxalacetato genera succinato:



El succinato, o bien se acumula parcialmente y es excretado al medio, o bien pasa a metilmalonil-CoA (ver fig. 7.1), el cual, a través de la reacción de Swick-Wood, reacciona con el piruvato para dar oxalacetato y propionil-CoA. Sin embargo, en *Bacteroides* sp., *Ruminococcus flavofaciens* y *Succinomonas amylolytica* no tiene lugar la reacción de transcarboxilación, y la vía lleva solamente a la formación de succinato.

Clostridium propionicum y *Megasphaera elsdenii* oxidan la glucosa hasta piruvato por la vía de Embden-Meyerhof, y, siguiendo la vía del acrilato (fig. 7.2), producen acetato, CO₂ y propionato a partir del piruvato.

Al igual que en algunas bacterias del ácido láctico, el acetil-CoA se forma por descarboxilación oxidativa del piruvato con reducción de NAD⁺, a diferencia de la mayoría de las bacterias del ácido láctico, que utiliza para la formación de acetato la fosfopentosa fosfoacetolasa.

BIBLIOGRAFÍA

- SWICK, R. W. y WOOD, H. G. The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 46, 28, 1960.
- ALLEN, S. H. G., KELLERMEYER, R. V., STJERNHOLM R. y WOOD, H. G. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *J. Bacteriol.* 87, 171, 1964.
- BALDWIN, R. L., WOOD, H. G. y EMERGY, R. S. Lactate metabolism by *Peptostreptococcus elsdenii*. Evidence for lactyl-coenzyme A dehydrase. *Biochim. Biophys. Acta*, 97, 222, 1965.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore/London 1984.

8.1	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO Y DE DISOLVENTES NEUTROS POR FERMENTACIÓN: PERSPECTIVA HISTÓRICA	96
8.2	VÍAS METABÓLICAS UTILIZADAS POR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO	97
8.3	FORMACIÓN DE ACETATO POR FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS	99
8.4	FORMACIÓN DE ACETATO POR REDUCCIÓN DIRECTA DE CO ₂	101
8.5	BACTERIAS ACETÓGENAS	103
8.6	LA VÍA DE WOOD PARA LA FIJACIÓN AUTOTRÓFICA DE CO ₂	103
8.7	LA GENERACIÓN DE ENERGÍA EN LAS BACTERIAS ACETÓGENAS	106
8.8	OTRAS VÍAS METABÓLICAS UTILIZADAS POR LAS BACTERIAS ACETÓGENAS	107
8.8.1	Sistemas dependientes del tetrahidrofolato	107
8.8.2	Reducción indirecta del CO ₂	107
8.9	FERMENTACIÓN DEL ETANOL POR <i>Clostridium kluyveri</i>	108
8.10	FORMACIÓN DE BUTIRATO A PARTIR DE GLUCOSA	109
8.11	FORMACIÓN DE ACETONA Y BUTANOL	110
8.12	OTROS PRODUCTOS FINALES DE FERMENTACIÓN PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO	110
8.13	PRODUCCIÓN DE SUCCINATO POR MICROORGANISMOS	112
	BIBLIOGRAFÍA	114

8.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO Y DE DISOLVENTES NEUTROS
POR FERMENTACIÓN: PERSPECTIVA HISTÓRICA

Wurtz, en 1852, describió el butanol como un componente de los medios de fermentación. Pasteur (1861) fue el primero en señalar la existencia de un fermento butírico específico que podía sustituir a las bacterias lácticas en los medios contaminados. Debido a su movilidad, pensó inicialmente que era un infusorio y, en todo caso, pudo establecer que el oxígeno constituía un elemento letal para su desarrollo. Fitz, entre 1876 y 1884, publicó una serie de trabajos en los que muestra que unas bacterias esporógenas anaerobias estrictas pueden producir ácido butírico y disolventes neutros a partir de azúcares y otros sustratos como el ácido láctico y la glicerina. Estas bacterias, estudiadas también por muchos otros autores, recibieron diversas denominaciones antes de que prácticamente todas ellas fueran incluidas en el género *Clostridium*. En 1902, Winogradsky describió *C. pasteurianum*, que a partir de sacarosa o glucosa produce etanol, butanol, acetato, butirato, CO₂ e hidrógeno. Además, esta bacteria fija nitrógeno molecular. La acetona como producto de fermentación fue descubierta por Schardinger en 1905, la cual era producida por *Bacillus macerans*, que no produce ni ácido butírico ni butanol.

La utilización industrial de las bacterias del ácido butírico tuvo su origen en el hecho de que, ante el temor de que el caucho natural se agotara, se promovió la obtención de caucho sintético. La polimerización del butadieno se consideró un buen sistema y éste puede obtenerse del butanol. Un método alternativo era la polimerización del isopreno, el cual se deriva del alcohol isoamílico. Este último es el producto mayoritario del aceite de fusel que se produce en la fermentación alcohólica (ver capítulo 4).

En 1911, Fernbach y Weizmann desarrollaron un proceso industrial que utilizaba el bacilo de Fitz y fécula de patata como sustrato. Más tarde Weizmann, utilizando *C. acetobutylicum*, obtuvo mejores resultados, con una producción adicional de acetona importante para la fabricación de cordita, un explosivo muy utilizado durante la Primera Guerra Mundial. Después, la producción de butanol por fermentación volvió a ser importante para la fabricación de esmaltes para automóviles. En realidad, el desarrollo de los procesos referidos anteriormente implicó el que se avanzase tanto en el conocimiento básico de la microbiología como en el de la tecnología de fermentaciones, conocimientos que luego han sido útiles para otros objetivos. No obstante, el interés económico de la producción de disolventes por fermentación ha desaparecido prácticamente desde la década de los 70.

Las bacterias a las que hacen referencia los estudios anteriores pueden distribuirse en cuatro grupos: el constituido por microorganismos que sólo producen ácido butírico, acético, CO₂ e H₂; el de aquellos que además generan etanol; el de los que producen acetona y butanol; y el de aquellos otros que produce butanol e isopropanol. También puede incluirse *Bacillus macerans*, que genera acetona y etanol pero que no produce ni ácido butírico ni butanol. Adicionalmente produce formiato, lo cual nunca tiene lugar en las fermentaciones que producen ácido butírico.

Las bacterias del ácido butírico están constituidas por miembros del género *Clostridium*, y por *Butyribacterium rettgeri* y *Sarcina maxima*. Los clostridios son bacilos gram positivos esporógenos que pueden presentar forma de mazo o raqueta debido a que la espora terminal es más ancha que la célula vegetativa. Muchos son activamente móviles y tienen una ligera tendencia a formar filamentos y cadenas. Son anaerobios estrictos y tienen que cultivarse en medios reductores en agar blando o en atmósfera de CO₂ o H₂. Se pueden subdividir en dos grandes grupos: los clostridios sacarolíticos y los proteolíticos. Las especies sacarolíticas utilizan azúcares para formar ácido butírico, ácido acético y alcoholes. En el medio de carne cocida de Robertson estas bacterias lo vuelven rojo y producen gas (CO₂ e H₂). Las especies proteolíticas atacan aminoácidos y no pueden utilizar azúcares. Estas bacterias ennegrecen el medio de Robertson, digieren la carne y producen un olor desagradable. Existe algún tipo intermedio como *Clostridium perfringens* pero, a excepción de esta especie, sólo se incluyen en el grupo de las bacterias del ácido butírico a las especies sacarolíticas. *Butyribacterium rettgeri* es la actual denominación de *Eubacterium limosum*, y está incluido dentro de las Propionibacteriáceas anaerobias con carácter obligado y que producen ácido butírico. *Sarcina maxima*, que también produce ácido butírico, es un coco grampositivo que se presenta frecuentemente en paquetes de ocho células. Esta especie es estrictamente anaerobia y está incluida en la familia de las peptocócáceas.

En la tabla 8.1 se indican los productos finales de la fermentación de la glucosa por diferentes bacterias del ácido butírico y en la figura 8.1 un esquema general de las vías metabólicas utilizadas para su formación, el cual tiene carácter orientativo. En los apartados siguientes se estudiarán con más detalle todas las etapas señaladas a partir del piruvato.

TABLA 8.1 Productos finales de la fermentación de la glucosa por bacterias del ácido butírico.							
Productos	moles/100 moles de glucosa fermentada						
	C. <i>butyricum</i>	C. <i>tyrobutiricum</i>	C. <i>* perfringens</i>		C. <i>acetobutylicum</i>	C. <i>butylicum</i>	B. <i>rettgeri</i>
Ácido butírico	76	73	9	34	4	17	29
Ácido acético	42	28	15	60	14	17	88
Ácido láctico	-	-	160	33	-	-	107
CO ₂	188	190	24	176	221	203	48
H ₂	235	182	21	214	135	77	74
Etanol	-	-	10	26	7	-	-
Butanol	-	-	-	-	56	58	-
Acetona	-	-	-	-	22	-	-
Acetoína	-	-	-	-	6	-	-
Isopropanol	-	-	-	-	-	12	-
% C recuperado	96	91	98	97	99	96	110
Balance O/R	0,97	1,16	0,81	1,05	1,01	1,06	0,74

* La primera columna se refiere a un medio deficiente en hierro.

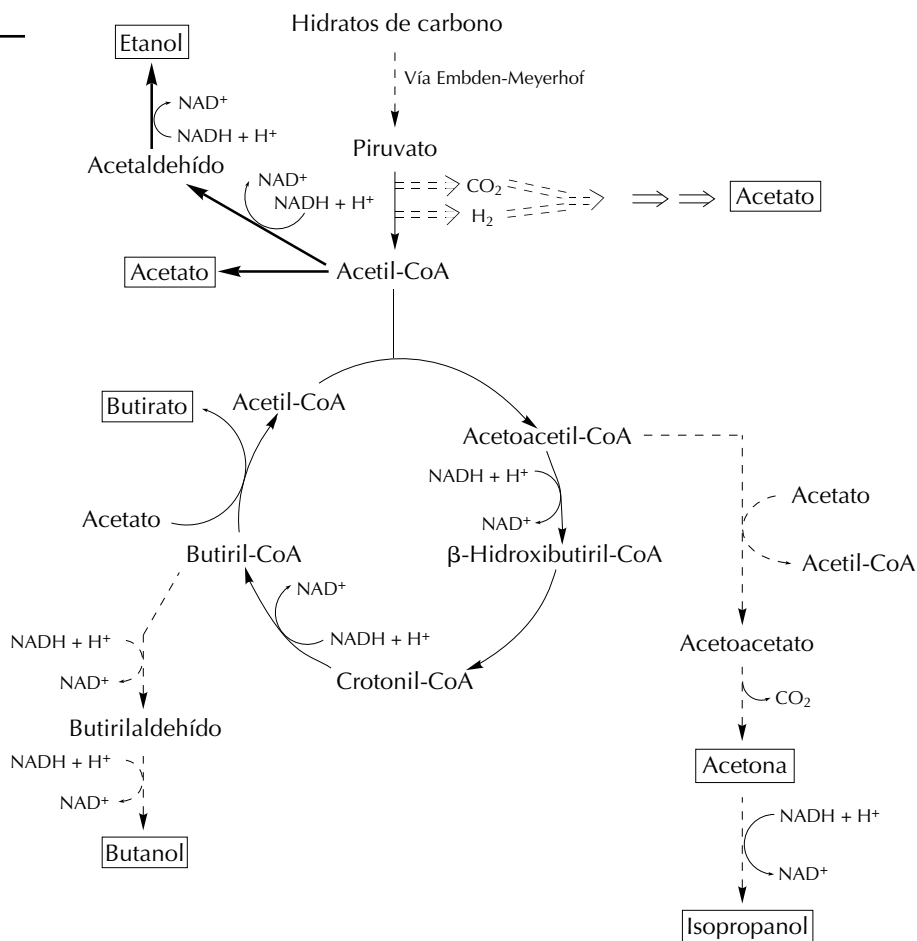
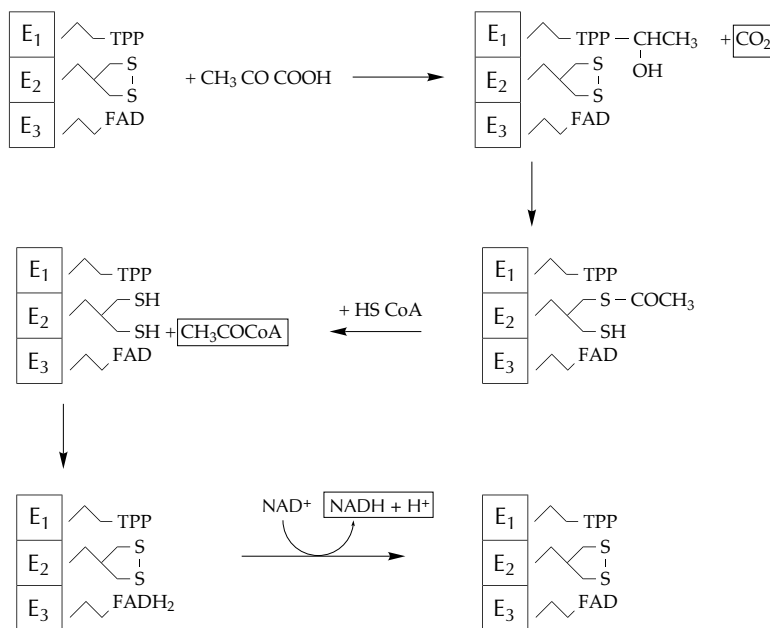


Figura 8.1 Esquema metabólico de la formación de los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono por las bacterias del ácido butírico. En trazo sencillo, producción de butirato. En trazo grueso, producción de acetato y etanol a partir del acetil-CoA. En trazo sencillo discontinuo, producción de butanol, acetona e isopropanol. En doble trazo discontinuo, producción de acetato a partir de CO_2 e H_2 . Los productos finales se muestran en un recuadro.

En la figura 8.1 puede comprobarse que, además de producir butírico o metabolitos derivados característicos de la misma vía metabólica (como el butanol, la acetona o el isopropanol, que aparecen en el medio de cultivo de algunas cepas como consecuencia de la acidificación del mismo), producen siempre acetato. De hecho, la producción de acetato es una característica del grupo de las bacterias del ácido butírico. Debido a la importancia de este tipo de metabolismo en este grupo de microorganismos, se describe en este capítulo de forma global la producción de acetato como producto final del metabolismo bacteriano. El grupo de bacterias acetogénicas incluye también una serie de microorganismos que pueden asimilar autotróficamente el CO_2 formando acetato.

En general, en el mundo microbiano la formación de acetato por fermentación puede tener lugar bien por la formación de acetyl-P a través de las fosfoacetolasas, o bien por descarboxilación del piruvato. En el primer caso se encuentran las bacterias del ácido acético, las bacterias heterofermentativas del ácido láctico y los miembros del género *Bifidobacterium*, todos los cuales pueden producir acetato a partir de hexosas y pentosas a través de esta vía (ver capítulos 5 y 6). La 6-fosfohexosa-fosfoacetolasa sólo se ha detectado en alguna bacteria del ácido acético y en *Bifidobacterium*. La presencia de este enzima posibilita transformar las hexosas en ácido acético exclusivamente (como es el caso de *A. xylinum* y muchas especies de *Bifidobacterium*).

El ácido pirúvico puede producir ácido acético por descarboxilación (ver Lámina 4). Como ya ha sido señalado (capítulos 4 y 5), en las levaduras y en las bacterias del ácido acético se encuentra una descarboxilasa que produce directamente acetaldehído y CO_2 a partir de piruvato. El acetaldehído pasa a acetato bien mediante una deshidrogenasa dependiente de NAD^+ o bien a través de un sistema ligado al citocromo c_{553} sin otros cofactores (ver capítulo 5). Otros muchos microorganismos aerobios y facultativos descarboxilan oxidativamente el piruvato para producir acetato mediante reacciones más complejas. Por ejemplo, en *E. coli* se ha descrito un complejo enzimático formado por tres elementos: E_1 :piruvato deshidrogenasa ligada al TPP; E_2 :dihidrolipoato transacetilasa y E_3 :dihidrolipoato deshidrogenasa ligada al FAD. Este complejo recibe el nombre de piruvato deshidrogenasa (ver Lámina 4). La descarboxilación del piruvato tendría lugar a través de las siguientes etapas:

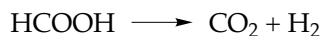


El enzima flavínico se reoxidaría con NAD^+ , lo cual no es muy frecuente, estando este último ligado a un citocromo para su reoxidación a través de la cadena de transporte de electrones hasta el oxígeno molecular.

En bacterias facultativas, como *E. coli* y *B. macerans*, el complejo de la piruvato deshidrogenasa es drásticamente inhibido en ausencia de oxígeno. Su función queda sustituida por la piruvato-formiato liasa que no requiere NAD^+ y produce acetil-CoA y formiato.



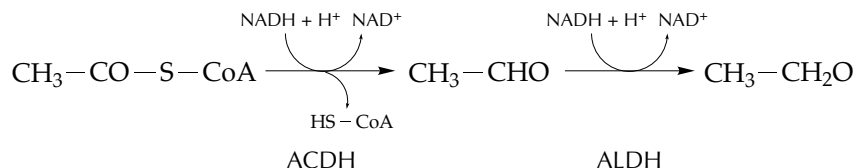
El formiato puede acumularse o desdoblarse parcial o totalmente en CO_2 y H_2 por acción de la formiato-hidrógeno liasa (ver capítulos 9 y 14).



El acetil-CoA se transforma en acetato por el sistema de la fosfo-trans-acetilasa y la acetoquinasa que ya ha sido comentado



Sin embargo, también puede dar etanol por la acetaldehído deshidrogenasa (ACDH) y la alcohol deshidrogenasa (ALDH)



Todo el sistema resulta mucho más eficiente para poder aumentar el consumo de sustrato, existiendo suficientes recursos para reoxidar el $\text{NADH} + \text{H}^+$. La formación de ácido fórmico por descarboxilación del piruvato también tiene lugar en *Clostridium acidi-urici*, lo cual es una excepción dentro de los miembros de este género.

En los géneros *Clostridium* y *Desulfovibrio* (en ausencia de sulfato) no se forma ácido fórmico y el sistema de descarboxilación incluye ferredoxina y biotina como cofactores. El sistema enzimático recibe el nombre de piruvato-ferredoxina oxidorreductasa y la reacción que cataliza suele denominarse ruptura fosforoclástica del piruvato (fig. 8.2 y Lámina 4). *C. acidi-urici* es una excepción dentro del género *Clostridium*, ya que utiliza el sistema que da lugar a formiato.

Aparte de los sistemas de descarboxilación del piruvato descritos, es importante resaltar que el enzima CoA transacetilasa puede actuar conjuntamente con el lipoato transacetilasa en las bacterias que producen acetoina. No se necesita NAD^+ para la reoxidación del lipoato, tanto si se produce acetolactato como diacetilo. En las propionibacterias se forma acetil lipoato a partir de acetaldehído activo ($\text{CH}_3\text{—CHOH—TPP—E}$), regenerándose E—TPP . El acetil lipoato reacciona con el CoA, formando

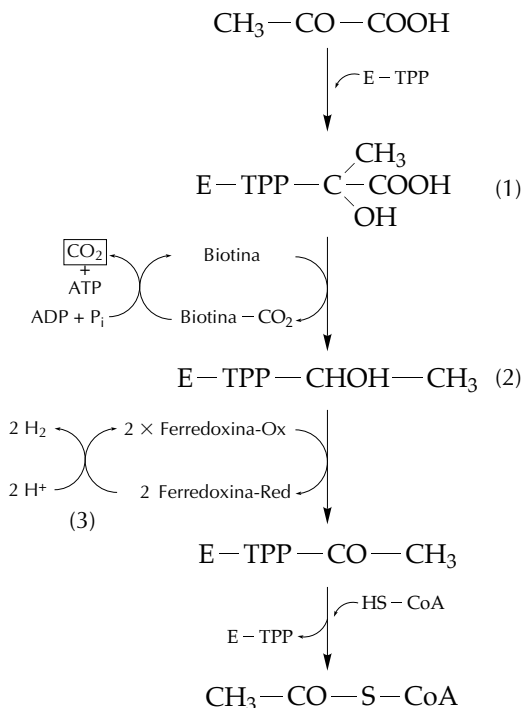


Figura 8.2 Descarboxilación del piruvato por el complejo piruvato-ferredoxina oxidorreductasa. El piruvato interacciona con el enzima (E-TPP, que contiene pirofosfato de tiamina) siendo descarboxilado (1). El complejo lactil-enzima es entonces oxidado, generándose acetil-CoA (2). Los dos electrones son transferidos a la ferredoxina, que se reduce. Debido al bajo potencial redox de ésta ($E'_0 = -0,41 \text{ V}$), una hidrogenasa puede oxidarla generando hidrógeno (3).

acetil-CoA. En este caso el lipoato se reoxida con NAD^+ , no formándose hidrógeno. Esto es lo que puede ocurrir en la formación de acetato a partir de piruvato en algunas bacterias del ácido láctico, así como en la fermentación del lactato por las bacterias del ácido propiónico.

8.4 FORMACIÓN DE ACETATO POR REDUCCIÓN DIRECTA DE CO₂

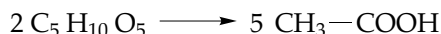
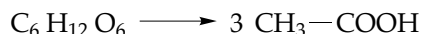
Tal y como ha sido referido anteriormente, el acetato puede originarse tanto en procesos fermentativos de sustratos orgánicos como en el desarrollo aerobio de diversos microorganismos que crecen utilizando materia orgánica. Con independencia de estos dos tipos de microorganismos formadores de acetato, existen también las bacterias denominadas propiamente acetogénicas, las cuales sintetizan este ácido a partir de CO₂ y/o de otros precursores de un solo átomo de carbono. Este grupo incluye las bacterias del ácido butírico que catalizan esta síntesis.

Los primeros datos de la síntesis de acetato a partir de CO₂ se deben a Fischer (1932), quien obtuvo un cultivo bacteriano que producía acetato al inocularlo a lodos de aguas residuales después de una incubación en atmósfera de hidrógeno. Wieringa (1940) descubrió

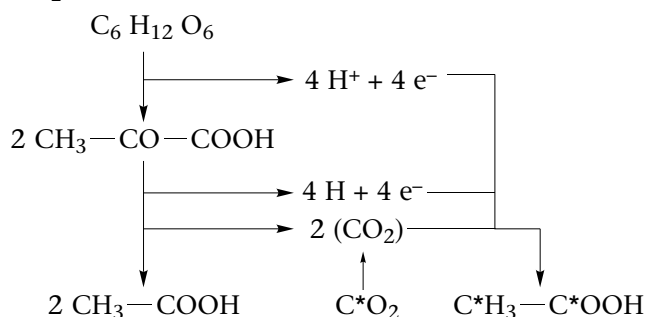
Clostridium acetivum, que convierte los azúcares en acetato y lo sintetiza a partir de CO₂ y H₂:



La denominada bacteria de Wieringa se perdió y no pudo ser recuperada hasta 1981 por M. Braun, F. Mayer y G. Gottschalk a partir de una preparación de esporas que se guardaba en el laboratorio de H. A. Barker. De hecho, durante todo este periodo prácticamente la única bacteria acetógena estudiada fue *Clostridium thermoaceticum*, la cual convierte los azúcares en acetato:



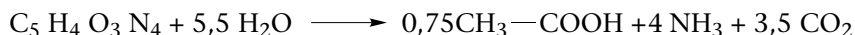
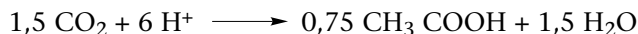
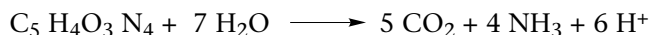
El acetato deriva tanto de la fermentación como de la síntesis a partir de CO₂:



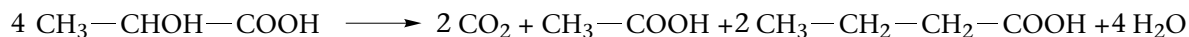
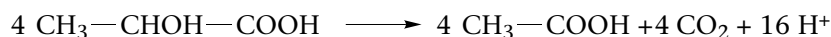
C* es ¹⁴C en la atmósfera de H₂/CO₂ en la que se lleva a cabo la incubación de *C. thermoaceticum*.

La fracción de radiactividad encontrada en el acetato está de acuerdo con el esquema metabólico señalado. Conviene recordar que la transformación global de una molécula de glucosa en tres de acetato también tiene lugar en *Acetobacter xylinum* y en *Bifidobacterium* (caps. 5 y 6) pero la vía metabólica es completamente diferente y no implica reducción de CO₂.

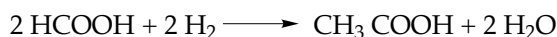
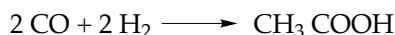
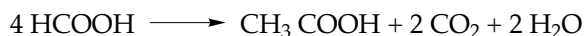
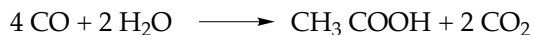
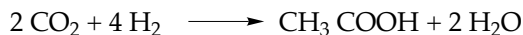
La reacción de Wieringa también se ha demostrado en *Clostridium acidi-urici* cuando fermenta la purina, según la siguiente estequiometría:



Del mismo modo, la síntesis de acetato a partir de CO₂ se lleva a cabo en la fermentación del lactato por *Butyribacterium rettgeri*



Durante muchos años se creyó que *Clostridium thermoaceticum* no tenía hidrogenasa y que sólo podía utilizar el CO_2 como aceptor final de electrones en la fermentación. Sin embargo, Drake en 1982 demostró la presencia de este enzima y consiguió que esta bacteria, creciendo en atmósfera de H_2/CO_2 , produjera acetato a partir de CO_2 , CO , HCOOH o CH_3OH según las siguientes estequiometrías:



C. thermoaceticum y otras bacterias acetógenas pueden crecer en una atmósfera de H_2/CO_2 . Ello supone que son capaces de oxidar el H_2 como las bacterias del gas detonante (ver capítulo 22) utilizando CO_2 como oxidante y además realizan también un desarrollo autotrófico. Sin embargo, estas bacterias carecen de ribulosa difosfato carboxilasa, enzima clave del ciclo de Calvin, que es el utilizado para la fijación de CO_2 por las verdaderas bacterias del hidrógeno, las cuales no pueden utilizar este compuesto como aceptor final de electrones. Las bacterias acetogénicas forman acetyl-CoA como primer producto de la fijación autotrófica del CO_2 , el cual es un intermediario de la síntesis del acetato.

8.5 BACTERIAS ACETÓGENAS

Se consideran bacterias homoacetógenas aquellas que producen tres moles de acetato por mol de glucosa. En otros casos puede formarse acetato por reducción del CO_2 junto a otros productos de fermentación. Tales microorganismos constituyen el grupo de las bacterias heteroacetógenas. Independientemente, tenemos una formación de acetato que no incluye la reducción de CO_2 .

La mayor parte de las bacterias homoacetógenas son capaces de crecer de forma autotrófica en una atmósfera de CO_2/H_2 , pero en algunos casos se requiere la adición de extracto de levadura y/o vitaminas. Los metales son esenciales para el crecimiento de las acetógenas, pero sólo a nivel de trazas. En la tabla 8.2 se presentan las bacterias acetógenas más estudiadas hasta ahora.

8.6 LA VÍA DE WOOD PARA LA FIJACIÓN AUTOTRÓFICA DE CO_2

El actual conocimiento de la vía de síntesis de acetato desde CO_2 en *C. thermoaceticum* se representa en la figura 8.3. Se conoce con el nombre de vía de Wood porque los trabajos de este autor y sus cola-

TABLA 8.2 Propiedades de algunas bacterias homoacetógenas y de otras acetógenas.

	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	G + C (%)	Crecimiento sobre C ₁				Aislado de
				CO ₂ /H ₂	CO	CH ₃ OH/CO ₂	HCOOH	
Homoacetógenas								
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	37	7,6-7,8	37	+ ^a	nd	–	nd	Cienaga
<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	27	7	38	+	nd	+	+	Lodo
<i>A. wieringae</i>	30	7,2-7,8	43	+	nd	nd	+	Aguas residuales
<i>A. boodii</i>	30	nd	39	+	+	+	+	Estuario marino
<i>Acetogenium kivui</i>	66	6,4	38	+	nd	–	+	Sedimento lacustre
<i>Clostridium aceticum</i>	30	8,3	33	+	nd	–	+	Aguas residuales
<i>C. formicoaceticum</i>	37	7,2-7,8	34	– ^c	nd	+	– ^c	Lodo aguas residuales
<i>C. magnum</i>	31	7,0	29	–	nd	–	–	Lodo anaerobio
<i>C. thermoaceticum</i>	60	6,8	54	+	+	+	+	Estiércol de caballo
<i>C. thermoautotrophicum</i>	60	5,7	54	+	+	+	+	Lodo, soil
<i>C. CV-AA1</i>	30	7,5	42	+	nd	+	nd	Sedimento
<i>Sporomusa acidovorans</i>	35	6,5	42	+	nd	+	+	Residuo de destilería
<i>S. ovata</i>	34	6,3	42	+	nd	+	+	Lodo
<i>S. spheroides</i>	36	6,5	47	+	nd	+	+	Lodo
Otras acetógenas								
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ^d	39	7,5	49	+	+	+	+	Aguas residuales
<i>Eubacterium limosum</i> ^e	39	7,2	49	+	+	+	nd	Estiércol de rumiantes
<i>Peptostreptococcus productus</i>	37			+	+	–	–	Aguas residuales
<i>Desulfotomaculum orientis</i> ^g	37	nd	nd	+	+	+	+	?
<i>Desulfovibrio baarsii</i> ^h	37	nd	nd	+	+	–	+	Lodo

^a Requiere extracto de levadura.

^b Produce butirato y acetato.

^c Se produce butirato y caproato además de acetato. Se trata de un nuevo aislamiento de una antigua bacteria conocida como *Butyribacterium rettgeri*.

^d Se produce a partir de la glucosa, H₂, acetato, lactato y succinato, siendo el principal producto acetato con CO o CO₂/H₂.

^e Se produce butirato y caproato además de acetato.

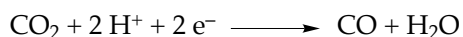
^f A partir de glucosa con CO o con CO₂/H₂ se produce H₂, acetato, lactato y succinato. El acetato es el producto mayoritario.

^g Se forma butirato en el crecimiento sin SO₄^{2–}. Nutalya formiato en lugar de H₂.

nd: no determinado.

boradores se consideran fundamentales para el esclarecimiento de la misma, si bien también se denomina vía de los corrinoides. Algunos enzimas son exclusivos de esta vía metabólica: la formiato deshidrogenasa (que contiene tungsteno, selenito y hierro); la monóxido de carbono deshidrogenasa (que tiene níquel, cinc y hierro); la proteína corrinóide (que es un derivado de la vitamina B₁₂), y una metil-transferasa. Los intermediarios metabólicos más importantes son el formiato, los portadores de C₁ del tetrahidrofolato y el metil corrinóide.

La fermentación de una molécula de glucosa daría dos moléculas de piruvato. De éstas se derivan dos de acetyl-CoA. Por otra parte, las dos moléculas de CO₂ resultantes de la descarboxilación del piruvato seguirían dos caminos diferentes para acabar produciendo la tercera molécula de acetyl-CoA. Una de las moléculas forma metil-tetrahidrofolato (CH₃—H₄ folato), mientras que la otra participa en la reacción de la monóxido de carbono deshidrogenasa:



Co-metilcobórico. Estos compuestos son los precursores del acetyl-CoA y no se encuentran libres, sino unidos a una proteína.

Dickert y Thauer descubrieron en 1978 la deshidrogenasa del monóxido de carbono en *C. thermoaceticum* y *C. formicoaceticum*, la cual lleva níquel. De este modo, el CO puede sustituir al piruvato o al CO₂ como precursor del grupo CH₃ del acetato. Más interesante es todavía una fracción aislada por Drake y Wood en 1981, la cual contiene una metiltransferasa que puede sintetizar acetyl-CoA a partir de monóxido de carbono utilizando ATP y metiltetrahidrofolato. De esta forma el CO, al igual que el CO₂, puede formar tanto el grupo metilo como el carboxilo del acetato.

8.7 LA GENERACIÓN DE ENERGÍA EN LAS BACTERIAS ACETÓGENAS

Cuando las bacterias acetógenas crecen con glucosa, transformándola en acetato, la acetoquinasa es responsable de la formación de ATP (fig. 8.3). Por otra parte, la reacción de formación de metil-tetrahidrofolato implica un consumo de ATP. Si bien existe una formación neta de ATP al crecer con glucosa, el crecimiento con CO₂/H₂ requiere una generación adicional de energía.

En muchas bacterias acetógenas se ha demostrado la presencia de hidrogenasa. Al parecer hay dos hidrogenasas, una soluble en el citoplasma y otra fijada a la membrana. La primera se utilizaría para reoxidar el NADH, produciéndose hidrógeno. La segunda reciclaría el hidrógeno, formándose ATP por el sistema de la ATPasa. Cuando crece con azúcares, este sistema genera ATP con independencia del que se obtiene degradando la glucosa hasta piruvato. Cuando el crecimiento se realiza sobre CO₂/H₂, la hidrogenasa citoplasmática no parece necesaria y, de hecho, hay evidencia experimental de que este sistema sólo se induce por la presencia de sustratos orgánicos. En atmósfera de CO₂/H₂ funcionaría únicamente el sistema catalizado por la hidrogenasa ligada a membrana y el sistema de la ATPasa (fig. 8.4).

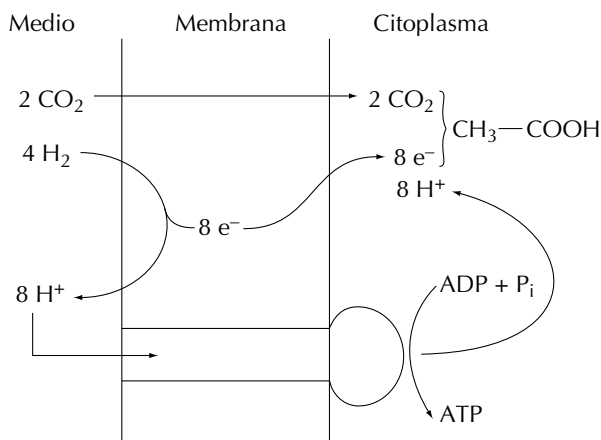
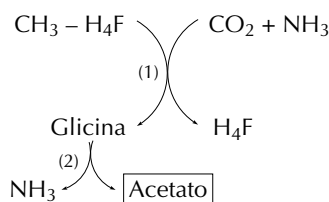


Figura 8.4 Esquema de los sistemas de transporte de electrones y transposición de protones-ATPasa en las bacterias acetógenas creciendo con CO₂/H₂.

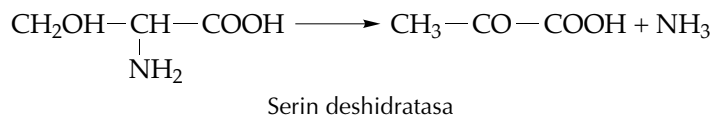
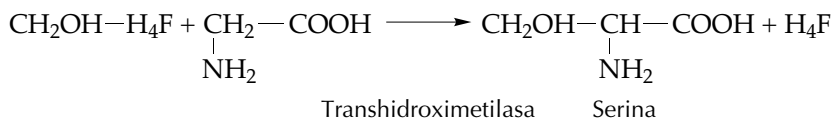
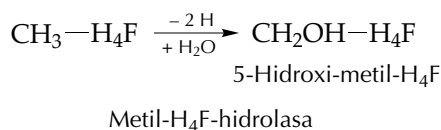
En las bacterias acetógenas pueden encontrarse otros mecanismos bioquímicos que conducen a la formación de acetato a partir de diversos compuestos orgánicos y CO_2 .

8.8.1 Sistemas dependientes del tetrahidrofolato

A partir de metiltetrahidrofolato, amoníaco y CO_2 puede sintetizarse glicina, en una reacción catalizada por la glicincarboxilasa (1). La glicina puede convertirse en acetato mediante la glicina reductasa (2). Por otra parte, el metiltetrahidrofolato puede dar lugar a piruvato, el cual se descarboxila posteriormente, dando acetato:



La glicina formada por la glicincarboxilasa puede también incorporar un grupo metilo del tetrahidrofolato, generándose finalmente piruvato, el cual es descarboxilado a acetato.

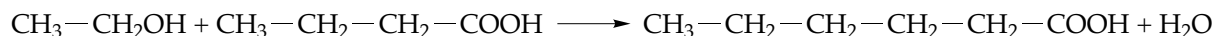
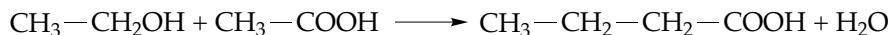


8.8.2 Reducción indirecta del CO_2

Existen indicios consistentes de que el piruvato puede ser el intermediario para una conversión cuantitativa de un mol de glucosa en tres de acetato según la siguiente vía:



La fermentación butírica más simple es la realizada por *C. kluyveri*, que convierte el etanol y el acetato en ácido butírico y caproico:



El estudio de esta fermentación resultó esencial para conocer el mecanismo de formación de butirato en todas las bacterias del ácido butírico (fig. 8.5). El acetil-CoA se incorpora a la vía para formar acetoacetil-CoA. El ácido caproico se forma por una serie de reacciones análogas en las que el butiril-CoA reemplaza al acetil-CoA. Es importante resaltar que no todos los hidrógenos que se derivan de la oxidación del etanol a acetato son transferidos al NAD^+ . Parte, posiblemente vía ferredoxina, es transferida a la hidrogenasa, produciéndose hidrógeno molecular.

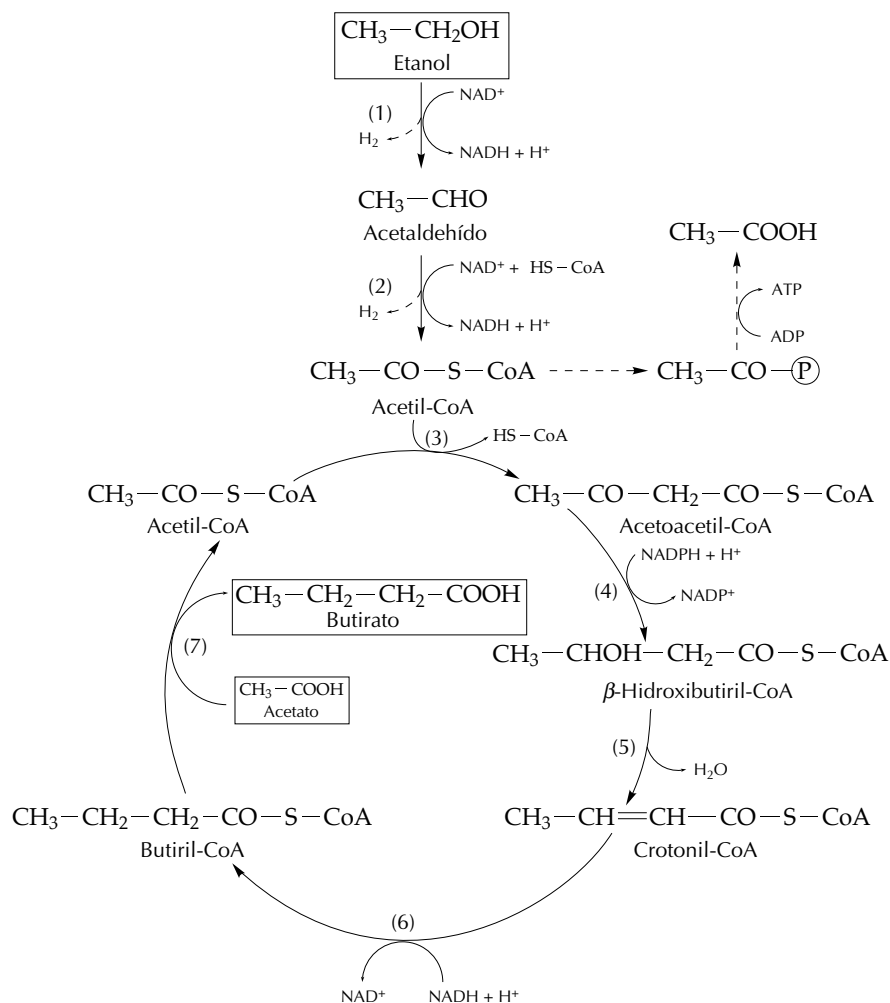


Figura 8.5 Producción de butirato a partir de etanol y acetato por *C. kluyveri*. La condensación de dos moléculas de acetyl-CoA para generar acetoacetyl-CoA es una reacción clave. El acetoacetyl-CoA es entonces reducido hasta butirato. (1) Alcohol deshidrogenasa. (2) Acetaldehído deshidrogenasa. (3) Tiolasa. (4) β -Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (específico de NADP). (5) Crotonasa. (6) Butiril-CoA deshidrogenasa. (7) CoA transferasa. En este sistema, la oxidación de etanol a acetyl-CoA puede también generar hidrógeno, por lo que parte del acetyl-CoA formado puede utilizarse en vez de para reoxidar coenzimas (vía de formación de butirato), para formar ATP (reacciones señaladas en trazo discontinuo).

Si se transforman a moles de etanol en acetato, formándose b moles de hidrógeno y $2(a - b)$ moles de $\text{NADH} + \text{H}^+$, los mismos se reoxidan, transformándose $2(a - b)$ moles de acetyl-CoA en butírico. b moles de acetyl-CoA producen acetato, generándose b moles de ATP.

8.10 FORMACIÓN DE BUTIRATO A PARTIR DE GLUCOSA

En las distintas fermentaciones de la glucosa por parte de las bacterias del ácido butírico hay siempre unos productos finales en proporción variable: acetato, butirato, CO_2 e H_2 . De hecho, algunos microorganis-

mos como *C. butyricum* sólo se producen estos cuatro catabolitos. En una etapa inicial de la fermentación sólo se forma acetato, CO_2 e H_2 . El pH baja rápidamente y cada vez resulta más difícil reoxidar el $\text{NADH} + \text{H}^+$. Entonces se inicia la formación de butirato, que sigue aumentando a costa del ácido acético formado inicialmente, cuya concentración disminuye. El pH se estabiliza y la fermentación puede proseguir porque la formación de butirato permite equilibrar el balance O/R.

La vía metabólica utilizada para la formación de butirato es la misma que en *C. klyveri* a partir del acetil-CoA (fig. 8.5), al cual se llega desde el azúcar que se utiliza como sustrato, que es degradado a piruvato por la vía de Embden-Meyerhof. El piruvato es decarboxilado a acetil-CoA por la reacción fosforoclástica, produciéndose por tanto H_2 .

8.11 FORMACIÓN DE ACETONA Y BUTANOL

Clostridium acetobutylicum produce disolventes neutros (acetona, butanol y etanol) junto a butirato, acetato, CO_2 e H_2 en la fermentación de azúcares. Es la llamada fermentación acetona-butanol que ha sido objeto de gran atención a escala industrial.

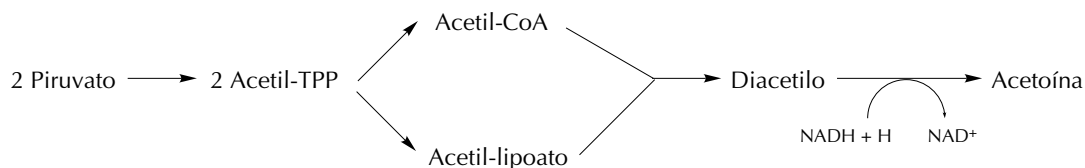
En la primera etapa de la fermentación se producen los ácidos. Luego aparecen los disolventes, haciéndose constante el pH del medio y aumentando la producción de CO_2 con respecto al H_2 , así como la producción total de gases. Esto es debido a la formación de acetona. El acetoacetyl-CoA se convierte en acetoacetato que luego se descarboxila dando acetona y CO_2 (fig. 8.6). A fin de compensar el bloqueo en la reoxidación de NADH que se produce al transformarse parte del acetoacetyl-CoA en acetona, parte del acetoacetylCoA se convierte en butirilCoA. El mismo se reduce a butiraldehído con la misma aldehído deshidrogenasa que reduce el acetyl-CoA a acetaldehído. Posteriormente, la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH + H^+ convierte el butiraldehído en butanol (fig. 8.6).

Asimismo el butirato del medio puede incorporarse, transformándose en butiril-CoA y finalmente en butanol. Ello conlleva un aumento del pH del medio.

8.12 OTROS PRODUCTOS FINALES DE FERMENTACIÓN PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO

Además de los productos referidos hasta ahora, en el medio resultante de la fermentación de las bacterias butíricas pueden encontrarse, en mayor o menor cantidad, acetoína, isopropanol, etanol, lactato y succinato.

C. acetobutylicum puede formar una pequeña cantidad de acetoína del mismo modo que las bacterias del ácido láctico (capítulo 6):



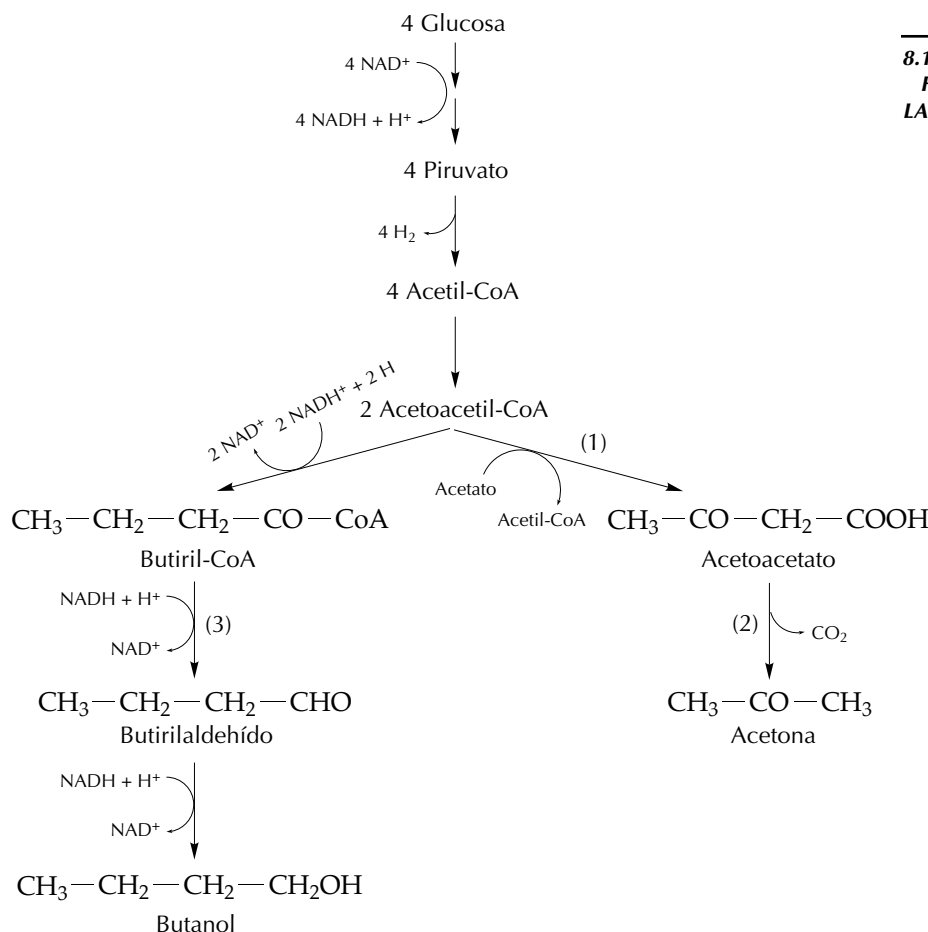
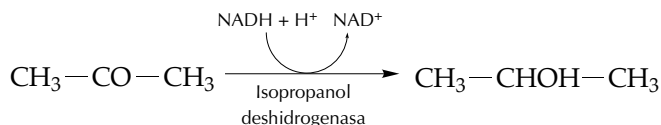


Figura 8.6 Producción de acetona y butanol. (1) CoA transferasa. (2) Acetoacetato descarboxilasa. (3) Butirilaldehído deshidrogenasa. (4) Butanol deshidrogenasa.

La acetoina sólo se forma directamente del piruvato y del acetaldehído en las bacterias del ácido acético.

C. butylicum, especie afín a *C. acetobutylicum*, es la única que forma isopropanol a partir de acetona como precursor:



C. butylicum no produce etanol ni acumula acetona.

C. acetobutylicum y *C. perfringens* producen también algo de etanol. El acetil-CoA se reduce a etanol a través de acetaldehído.

Bacillus macerans es un esporógeno facultativo que fermenta hidratos de carbono produciendo etanol, acetona, acetato, CO₂ e H₂. La descarboxilación del piruvato sigue el modelo entérico, produciendo

ácido fórmico y acetyl-CoA. A diferencia de las levaduras, no dispone de piruvato descarboxilasa, que produce directamente CO_2 y acetaldehído. *B. macerans* carece de los enzimas que posibilitan formar butirato a partir de acetyl-CoA. La producción de acetona y etanol sigue la misma vía que en *C. acetobutylicum*.

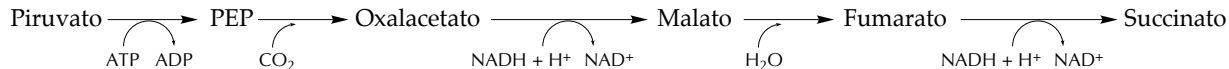
En el sobrenadante de cultivos de *C. perfringens* y *Butyrubacterium rettgeri* aparece lactato, que se forma a partir del piruvato con una lactato deshidrogenasa NADH dependiente. En el primero se incrementa su producción en condiciones de deficiencia de hierro.

C. kluyveri forma también succinato, lo que disminuye la relación CO_2/H_2 .

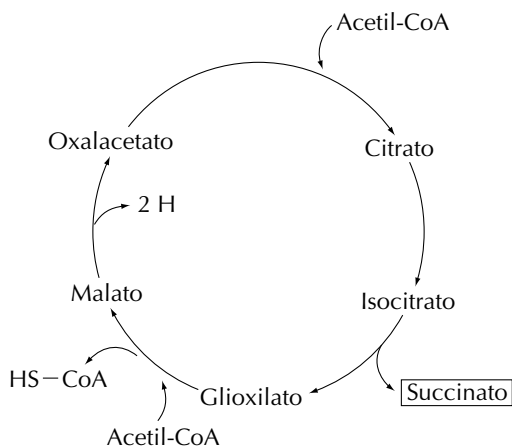
8.13 PRODUCCIÓN DE SUCCINATO POR MICROORGANISMOS

El succinato puede aparecer como producto final de fermentación siguiendo tres vías diferentes. *C. kluyveri* utiliza la vía del malonato, vía que también utilizan las bacterias entéricas. El sustrato es el acetyl-CoA que, mediante dos carboxilaciones, acaba transformándose en succinato (fig. 8.7).

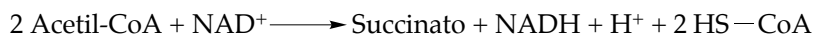
Otra alternativa metabólica para la producción de succinato la constituye la ya descrita para las bacterias del ácido propiónico (capítulo 6), la cual es también utilizada por las enterobacterias como la del malonato.



Finalmente, la vía del ácido glioxílico también puede llevar a la producción de succinato en bacterias que pueden utilizar el acetato como única fuente de carbono:



De este modo,



8.13 PRODUCCIÓN DE SUCCINATO POR MICROORGANISMOS

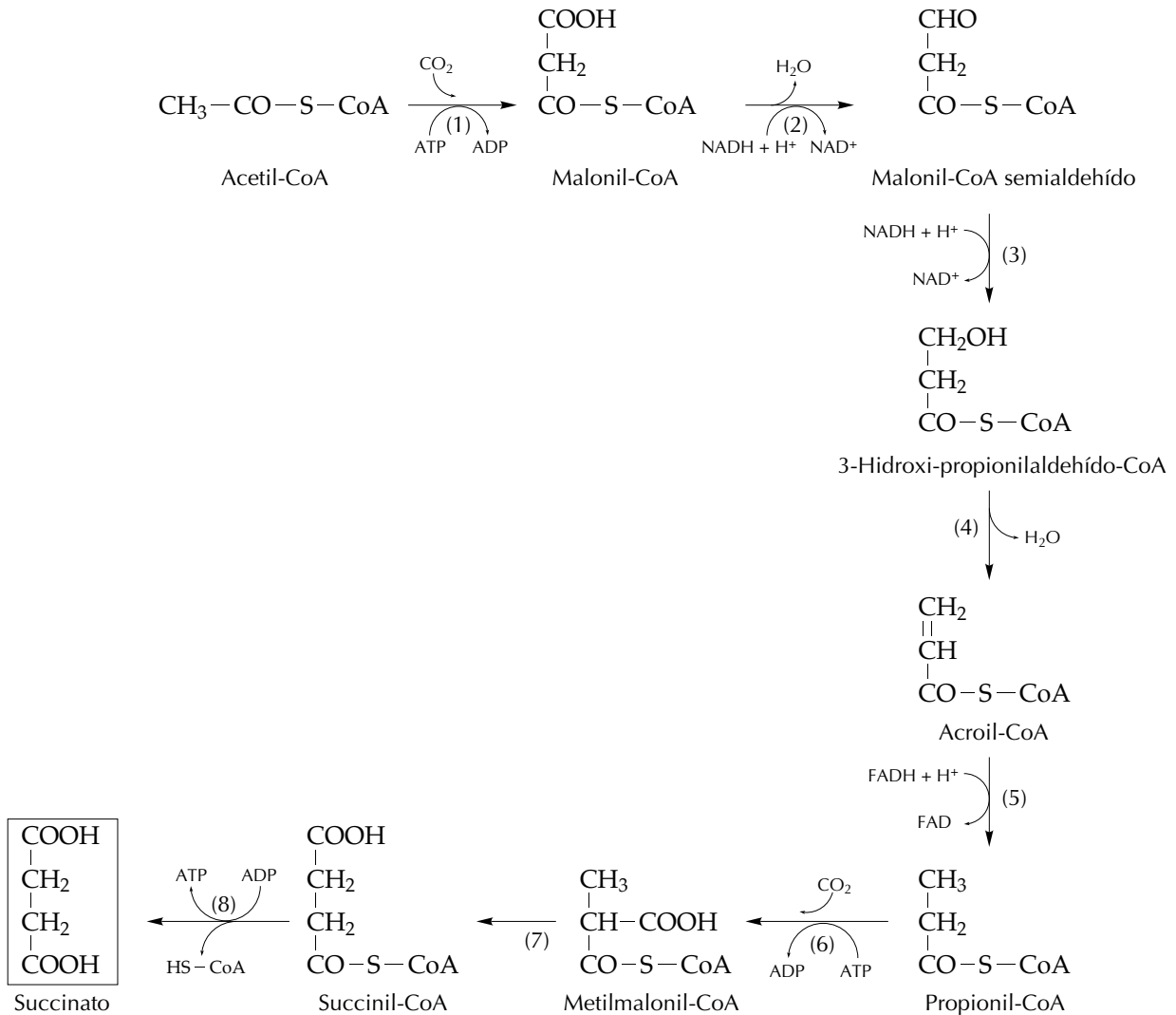
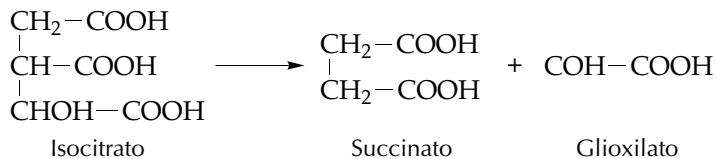


Figura 8.7 Formación de succinato por *Clostridium kluyveri*. (1) Acetil-CoA carboxilasa. (2) Malonil-CoA semialdehído deshidrogenasa. (3) 3-Hidroxi-propionilaldehído-CoA deshidrogenasa. (4) Acroil-CoA hidratasa. (5) Propionil-CoA deshidrogenasa. (6) Propionil-CoA carboxilasa. (7) Metilmalonil-CoA mutasa. (8) Succinil-CoA sintetasa.

La reacción clave en este caso es la catalizada por la isocitrato liasa:



BIBLIOGRAFÍA

- JONES, D. T. y WOODS, D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*. Vol. 50, Nº 4, p. 484–524. 1986.
- KJUNGDAHL, L. G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:415–50. 1986.

9.1	EL GRUPO ENTÉRICO	116
9.2	EL DESARROLLO DE LA BIOLOGÍA DE <i>Escherichia coli</i>	119
9.3	LA FERMENTACIÓN ÁCIDO MIXTA	121
9.3.1	Formación de etanol	122
9.3.2	Formación de acetato	124
9.3.3	Formación de CO ₂ y H ₂ a partir del formiato	124
9.3.4	Formación de succinato	125
9.3.5	Formación del lactato	125
9.4	LA FERMENTACIÓN 2,3-BUTILENGLICÓLICA	127
9.4.1	Formación de acetoína	127
9.4.2	Formación de 2,3-butanodiol (2,3-butilenglicol)	129
9.5	FORMACIÓN DE TRIMETILENGLICOL	130
	BIBLIOGRAFÍA	131

9.1 EL GRUPO ENTÉRICO

Se incluye dentro del grupo entérico una serie extensísima de cepas cuyo rasgo metabólico común es el carácter fermentativo facultativo. Todas ellas están constituidas por pequeños bacilos gramnegativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Cuando fermentan azúcares suelen ser gasogénicos, pero hay algunas cepas que no producen gas. Son catalasa positivas, oxidasa negativas y, con muy pocas excepciones reducen los nitratos a nitritos.

Todas las bacterias entéricas crecen bien en los medios bacteriológicos convencionales en condiciones aerobias, pero algunos miembros presentan condiciones especiales de crecimiento. Los aminoácidos presentes en el extracto de carne y en la peptona proporcionan la principal fuente de poder reductor. En condiciones anaerobias, su desarrollo es dependiente de la presencia de un aceptor de electrones apropiado, el cual puede ser un producto de la fermentación de los azúcares, pero pueden también utilizar fumarato y nitrato como aceptores finales de electrones en un sistema que comprende citocromos.

El sustrato fermentable por excelencia es la glucosa, pero pueden fermentar otros muchos azúcares y polialcoholes. Algunos miembros atacan incluso polisacáridos, como los de los géneros *Erwinia* y *Benckea*. Muchas cepas del grupo entérico son capaces de crecer en un medio mineral al que se añade un azúcar.

Cuando el nivel de oxígeno disponible es alto, funciona una sola cadena respiratoria constituida por NAD-deshidrogenasa, ubiquinona, citocromos *b* y citocromo oxidasa. El oxígeno accesible puede disminuir como consecuencia del rápido crecimiento y entonces aparece citocromo *a* y un citocromo *d* que actúa de oxidasa terminal. Al mismo tiempo, se sintetiza menaquinona (MQ). El grupo de citocromos utilizado para la respiración con fumarato en ausencia de oxígeno está constituido por citocromo *b*₅₅₅, citocromo *b*₅₅₈, citocromo *a* y citocromo *d*. En algunas condiciones puede haber una cierta promiscuidad metabólica entre diversos sistemas de transporte de electrones (fig. 9.1).

Las bacterias entéricas tienen un ciclo del ácido tricarboxílico funcional. Sin embargo, la α -cetoglutarato deshidrogenasa es muy sensible a las condiciones anaerobias, pudiendo disminuir su actividad hasta interrumpir el ciclo. Entonces el crecimiento sólo puede proseguir fermentativamente. En este caso, se acumulan en el medio una serie de catabolitos orgánicos. De acuerdo con la naturaleza de los mismos, las bacterias entéricas pueden dividirse en tres grandes grupos:

1. Las productoras de una mezcla de ácidos orgánicos (rojo de metilo +, Voges-Proskauer -).
2. Las productoras de productos finales del catabolismo neutros y, en especial, de 2,3-butanodiol (rojo de metilo -, Voges-Proskauer +).
3. Las que pueden reducir la glicerina a trimetilenglicol (rojo de metilo +, Voges-Proskauer -).

Normalmente, la reacción del rojo de metilo y la de Voges-Proskauer son opuestas. Sin embargo, *Klebsiella edwawarsii* var *atlantae* y el

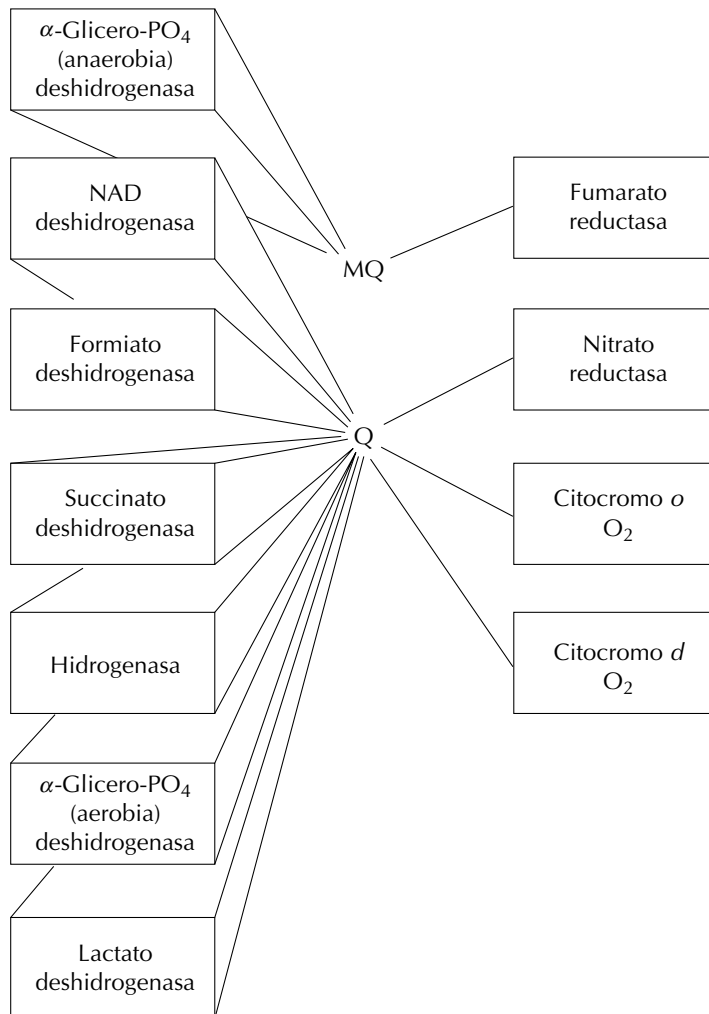


Figura 9.1 Sistemas respiratorios en el grupo entérico. Las deshidrogenasas primarias más importantes se refieren en los bloques dibujados a la izquierda de la figura. A la derecha se muestran en un recuadro las oxidasas más importantes. Unas y otras están unidas en la cadena de transporte de electrones por la menaquinona (MQ) o la ubiquinona (Q). La hidrogenasa puede funcionar como hidrogenasa y como oxidasa con la formiato deshidrogenasa. Los diferentes bloques pueden contener componentes diferentes de la cadena respiratoria (flavinas, centros Fe-SH, citocromos o Mo). No todos los sistemas están presentes en cada cepa. Su concentración está regulada por las condiciones de cultivo.

grupo *oxytoca* del mismo género son rojo de metilo + y Voges-Proskauer +. También los miembros del género *Enterobacter*, que son siempre rojo de metilo –, dan una reacción de Voges-Proskauer + cuando crecen con glucosa y – cuando crecen con glicerina (cuando se forma trimetilenglicol deja de formarse acetoína y 2,3-butilenglicol). En la tabla 9.1 se consignan los productos finales obtenidos de la fermentación de la glucosa en diferentes enterobacterias.

Productos finales	Productores de mezcla de ácidos				Productores de butanodiol						
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Escherichia aurescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter indologenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Serratia kiliensis</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
	pH 6,2	pH 7,8	Células en reposo				Anaerobio	Aerobio			
2,3-Butanodiol	0,3	0,3	-	-	19	58	64	53	47	-	75
Acetoína	0,06	0,2	-	-	-	2	2	8	4	2	-
Glicerol	1,4	0,3	-	-	4	-	1	1	2	2	-
Etanol	50	50	77	40	52	70	46	29	51	46	66
Formiato	2	86	121	70	68	54	48	3	3	2	134
Acetato	36	39	78	40	52	8	4	9	5	50	64
Lactato	80	70	20	80	10	6	10	21	34	104	23
Succinato	11	15	39	10	13	-	8	9	7	2	11
CO ₂	88	2		2	80	140	117	159	145	100	13
H ₂	75	26		-		11	-	0,2	59	91	-
Balance O/R	1,06	0,91	1,04			1,01	1,02	-	0,98	1,07	0,97
en mol/100 moles de glucosa fermentada											

En el grupo entérico son siempre funcionales las vías de Embden-Meyerhof y de Warburg-Dickens. Los enzimas característicos de una y otra se han confirmado en prácticamente todos los géneros. Parece razonable asumir que el metabolismo intermediario de los azúcares es el mismo para todas las bacterias entéricas y que los distintos modelos de fermentación se derivan de diferencias en el sistema enzimático que interviene en la degradación del ácido pirúvico.

Ya ha sido comentado (capítulo 8) que una característica de las descarboxilación anaerobia del piruvato en las bacterias del grupo entérico es la producción de ácido fórmico, el cual puede ser desdoblado en CO_2 e H_2 por el sistema de la formiato deshidrogenasa-hidrogenasa. La producción de ácido fórmico en todas ellas justifica llamarlas bacterias del ácido fórmico, sobre todo, teniendo en cuenta que la delimitación taxonómica de las enterobacteriáceas ha variado mucho en las últimas décadas y que es todavía imprecisa. Por lo que respecta a la descarboxilación del piruvato, la formación del formiato las diferencia de las bacterias del ácido butírico, las cuales forman H_2 directamente del piruvato. Hay algunas excepciones, como *Clostridium acidi-urici*, que utiliza el sistema entérico. Aparte de en el grupo entérico, el formiato también puede formarse en otras bacterias, como en los géneros *Bacillus* y *Sarcina*. En este último, *Sarcina maxima* utiliza el sistema clostridial y *S. ventriculi* el sistema entérico.

9.2 EL DESARROLLO DE LA BIOLOGÍA DE *Escherichia coli*

El grupo entérico está fundamentalmente incluido dentro de la familia de las enterobacterias. En la sección 5 del *Bergey's manual of systematic bacteriology* (1984), los bacilos gramnegativos anaerobios facultativos se subdividen en tres familias: Enterobacteriáceas, Vibrionáceas y Pasteureláceas (tabla 9.2). En el presente capítulo se hace referencia únicamente a bacterias incluidas en la primera familia, si bien hay géneros separados de ella que pueden presentar muchas características comunes. Existen incluso esporógenos facultativos como *Bacillus polymyxa* y *B. macerans*, que no están incluidos en la sección 5 y que, si no fuese por la formación de esporas, podrían confundirse a nivel metabólico con miembros del grupo entérico, sobre todo teniendo en cuenta que en estas especies la reacción de Gram suele ser negativa.

La historia del grupo entérico se inició hace largo tiempo partiendo del supuesto de que *Escherichia coli* era el organismo dominante de la flora fecal humana. Después del desarrollo de las técnicas de cultivo de anaerobios, ésto ha sido ampliamente desmentido. La población de *E. coli* en heces no excede de 10^8 células por gramo, en tanto que la flora bacteriana total sobrepasa las 10^{11} células por gramo. Lo que sigue siendo cierto es que la población de *E. coli* acompaña al hombre desde su nacimiento hasta su muerte.

Hay una cantidad enorme de cepas bacterianas patógenas que se asemejan mucho a *E. coli*, y otras tantas inocuas también muy parecidas y que, como ella, pueden encontrarse en aguas contaminadas. Dada la importancia sanitaria de algunos miembros del grupo enté-

TABLA 9.2 Algunas características diferenciales de las familias de bacilos gramnegativos facultativos.

Características	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>
Diámetro celular (μm)	0,3-1,5	0,3-1,3	0,2-0,3
Bacilos rectos	+	D	+
Bacilos curvados	–	D	–
Motilidad	D	+ ^a	–
Distribución flagelar (medios líquidos):			
Polar	–	+	
Lateral	+	–	
Prueba de la oxidasa	–	+ ^a	+ ^a
Requerimiento de Na ⁺ o estimula el crecimiento	–	D	–
Contienen el antígeno común de las enterobacterias	+	–	–
Las células contienen menaquinonas	D	D	–
Parásitos de mamíferos y aves	D	– ^a	+
Requerimiento del grupo hemo y/o nicotinamida adenina dinucleótido para el crecimiento	–	–	D
Patógenos de plantas	D	–	–
Requerimiento de fuentes orgánicas de nitrógeno	– ^a	– ^a	+

^a Pueden darse algunas excepciones.

D: Pueden presentarse frecuentemente.

rico, todos los aspectos de su biología han sido muy estudiados, habiéndose producido como consecuencia una taxonomía sobredimensionada en comparación con otros grupos de bacterias.

E. coli crece fácilmente y con rapidez en cultivo puro en condiciones muy cómodas para su manejo y estudio. Esto ha contribuido a que haya llegado a ser uno de los organismos más conocidos desde todos los puntos de vista, incluyendo el bioquímico. De esta manera, se ha tomado excesivamente como modelo aplicable a otras bacterias, las cuales en sus características propias han sido mucho menos estudiadas. En todo caso, el gran conocimiento de la biología de *E. coli* ha producido una visión sesgada de muchos otros aspectos, tanto de la bioquímica como de la genética microbiana, sobre todo en los manuales y obras de carácter general. Esto no quiere decir que *E. coli*, al igual que la levadura, la mosca *Drosophila*, el músculo de paloma y el propio hombre, entre otros, no haya constituido uno de los siste-

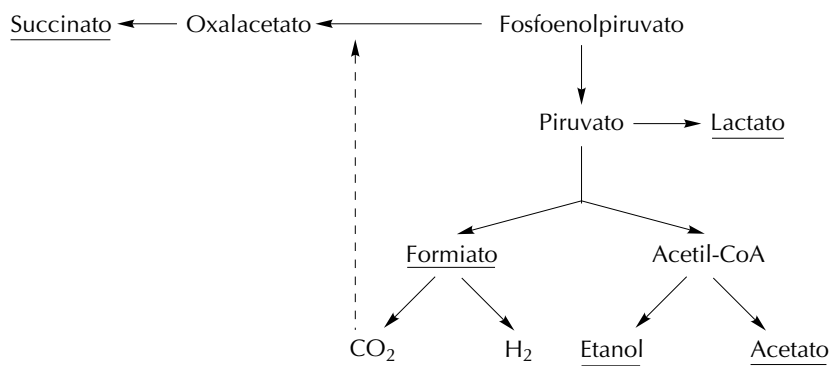
mas mediante los cuales se han logrado los mayores progresos en el conocimiento de los seres vivos.

La historia de las bacterias coliformes se remonta más de un siglo. En 1880 Fritsch descubre *Klebsiella pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis* como microorganismos característicos de la contaminación del agua por el hombre. Cinco años más tarde, Escherich añade su *Bacillus coli* como indicador de contaminación fecal. Wurtz en 1892 es el primero en valorar la producción de ácido en la fermentación de los azúcares. Durham en 1898 aplica un sencillo método para la determinación de la producción de gas. Después, se utiliza el patrón de fermentación de diferentes sustratos para multiplicar más o menos el número de tipos de coliformes, el cual llega a ser superior a 200. En medio de una cantidad ingente de información, Eijkman, realiza en 1904 un nuevo planteamiento y establece que la distinción fundamental entre los coliformes fecales y los de otro origen se encuentra en la producción de gas a partir de la glucosa a 46 °C. Smith, en 1895, ya había puesto de manifiesto que además, la relación CO_2/H_2 es de 1:1 para *B. coli* y de 2:1 para *B. aerogenes*. Clark y Lubs (1915) desarrollaron la prueba del rojo de metilo para detectar fácilmente la producción de ácido. Con anterioridad (1898), Voges y Proskauer habían puesto a punto la prueba para revelar los coliformes productores de 2,3-butanodiol.

En realidad, los estudios referidos constituyen el antecedente sobre el cual se desarrolló en los años siguientes el conocimiento del metabolismo fermentativo de las bacterias del grupo entérico.

9.3 LA FERMENTACIÓN ÁCIDO MIXTA

El miembro más característico de la familia de las enterobacteriáceas que da lugar a este tipo de fermentación es sin duda *Escherichia coli*. El metabolismo del piruvato puede esquematizarse como sigue:



Cada producto subrayado puede ser el dominante según las condiciones en las que transcurre la fermentación y el organismo.

Prescindiendo del lactato y del succinato, cada mol de piruvato genera un mol de acetil-CoA y otro de formiato. El acetil-CoA puede generar acetato o etanol, pero en todo caso

$$(\text{moles de piruvato}) = (\text{moles etanol}) + (\text{moles acetato})$$

Por lo tanto:

$$\text{moles (etanol + acetato)} = \text{moles de formiato}$$

Como el formiato se rompe en H_2 y CO_2 , en cantidades equimoleculares,

$$\text{moles formiato total} = \text{moles formiato presente} + \text{moles } \text{H}_2$$

Por lo tanto:

$$\text{moles (etanol + acetato)} = \text{moles formiato} + \text{moles } \text{H}_2$$

Esta equivalencia es sólo válida para el H_2 , puesto que todo él se deriva del formiato. Con el CO_2 no se cumple necesariamente, porque puede ser reutilizado en la producción de succinato. En realidad:

$$\text{moles de } \text{H}_2 = \text{moles de } \text{CO}_2 + \text{moles de succinato}$$

Los cálculos anteriores no tienen en cuenta el lactato y no son válidos para los productores de butanodiol, los cuales tienen una producción adicional de CO_2 . En la tabla 9.3 pueden observarse los valores encontrados para estos balances, los cuales confirman la vía metabólica.

9.3.1 Formación de etanol

El sistema de la piruvato descarboxilasa, característico de la levadura, que produce etanol a partir del piruvato (ver capítulo 4), sólo parece tener lugar en un representante del grupo entérico, *Erwinia amylovora*.

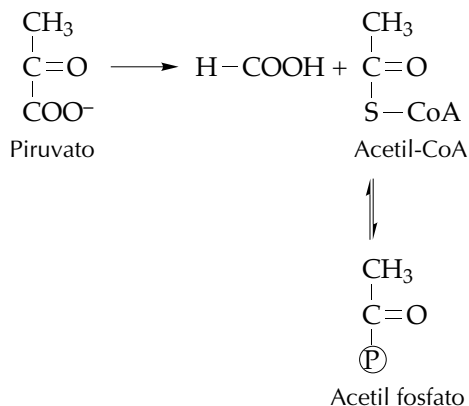
De forma general, en las enterobacteriáceas la descarboxilación del piruvato en condiciones anaerobias produce acetil-CoA o acetil-fosfato y formiato (ver 8.3 y Lámina 4). La piruvato formiato liasa requiere TPP, HS-CoA, lipoato, Mn^{2+} y Fe^{2+} . Se supone que el acetil-

TABLA 9.3 Productos finales de la fermentación de la glucosa por diferentes bacterias entéricas.

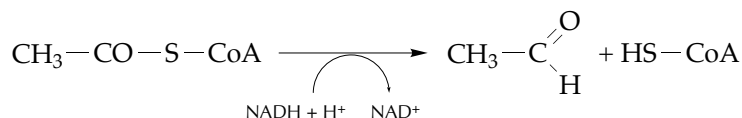
Organismo	Milimoles por 100 moles de glucosa			
	Etanol + acetato	H_2 + formiato	H_2	CO_2 + succinato
<i>E. coli</i>	90	90	0	15
<i>E. coli</i> (pH 6,2)	86	77	75	99
<i>E. coli</i> (pH 7,8)	89	112	26	17
<i>E. aureus</i>	80	70	0	10
<i>Erwinia carotovora</i>	120	130	0	10
<i>Serratia plymuthica</i>	56	62	60	156
<i>Serratia kiliensis</i> (a)	100	102	100	102
<i>Serratia kiliensis</i> (e)	96	93	91	102

(a) y (e) son distintas cepas de la misma especie.

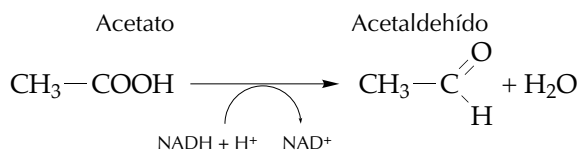
CoA se forma en primer lugar y la *fosfato acetil transferasa* da lugar a un equilibrio con acetilfosfato. La formación de este último se activa por el piruvato y se inhibe por el $\text{NADH} + \text{H}^+$ y el ATP:



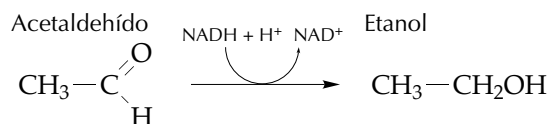
La formación de etanol tiene su origen en la producción de acetaldehído a partir del acetil-CoA mediante una aldehído deshidrogenasa NAD^+ dependiente:



Otro sistema alternativo es la formación a partir de acetato con una acetaldéhido deshidrogenasa diferente. Puede estar ligada al NAD^+ o al NADP^+ :



El acetaldehído formado no se acumula, y pasa a etanol con la alcohol deshidrogenasa. Este enzima actúa indistintamente sobre alcoholes primarios y secundarios. Requiere Zn^{2+} :



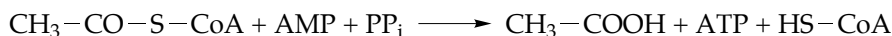
En la formación de etanol a partir del piruvato se reoxidan dos moles de NAD^+ .

9.3.2 Formación de acetato

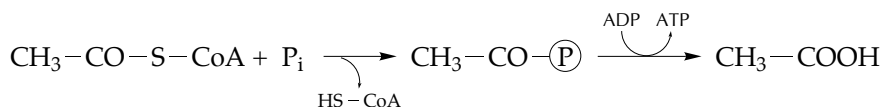
El acetil-CoA puede proporcionar acetato por dos caminos distintos. La acetil-CoA hidrolasa cataliza la transformación:



Por otra parte, la acetil-CoA sintetasa también produce acetato y además un mol de ATP a partir de AMP y pirofosfato:

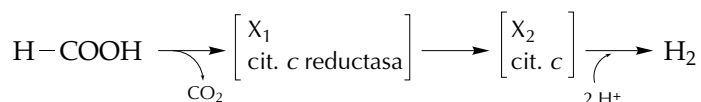


Finalmente, el acetato puede asimismo formarse a partir del acetil-fosfato, también con la formación de ATP pero ahora a partir de ADP y la acetato quinasa. Esta reacción va ligada a la de la fosfato acetil transferasa y es la más frecuente como productora de acetato en las enterobacteriáceas:



9.3.3 Formación de CO₂ y H₂ a partir del formiato

El complejo formiato hidrógeno liasa incluye dos reacciones catalizadas por la formiato deshidrogenasa soluble y una hidrogenasa unida a la membrana:



donde X₁ y X₂ son transportadores de e⁻. X₁ puede ser una citocromo c reductasa y X₂ un citocromo c de bajo potencial redox (c₅₅₂) que únicamente se produce en las bacterias coliformes durante el crecimiento anaerobio.

El sistema enzimático vinculado a la producción de H₂ molecular es distinto al de los clostridios, si bien falta todavía clarificar suficientemente las reacciones que comprende.

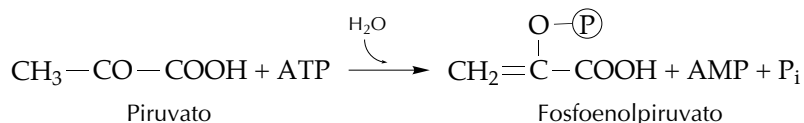
Aeromonas hydrophila tiene un metabolismo parecido al de las bacterias entéricas y produce un citocromo c de bajo potencial así como formiato deshidrogenasa cuando crece en condiciones aneróbicas. Los clostridios poseen ferredoxina, a excepción de *C. thermoaceticum*. La ferredoxina no se ha encontrado nunca en las bacterias entéricas y, en consonancia con este hecho, en *C. thermoaceticum* encontramos al único clostridio que produce formiato y tiene formiato deshidrogenasa. Sin embargo, no está todavía claro si el citocromo de bajo potencial es o no la propia ferredoxina. *C. acidi-urici* es otra excepción.

Algunas bacterias entéricas no tienen formiato deshidrogenasa y acumulan formiato. Generalmente son agasogénicas. Entre ellas encontramos a *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Proteus rettgeri* y *Serratia marcescens*.

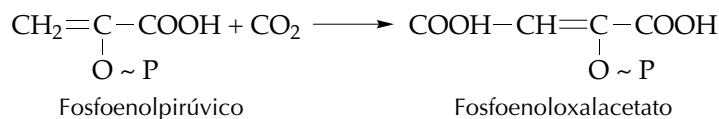
9.3.4 Formación de succinato

Las enterobacterias utilizan un sistema para la formación del succinato distinto al comprendido en el CAT, que es aerobio y distinto al mecanismo de los clostridios que ya ha sido referido.

El piruvato es fosforilado a fosfoenolpiruvato por la reacción de la fosfoenolpiruvato sintetasa que requiere Mg^{2+} , K^+ y ATP:



La fosfoenolpiruvato carboxilasa convierte al ácido fosfoenolpirúvico en fosfoenoloxalacetato:



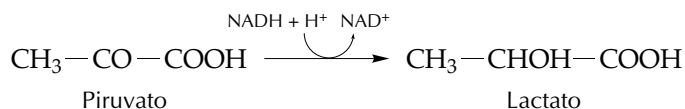
Esta reacción supone una introducción de un mol de CO_2 y va seguida de una transferencia del fosfato rico en energía al IDP, resultando la formación de ITP y oxalacetato. La conversión de oxalacetato en succinato tiene lugar a través de etapas idénticas a las del CAT.

Las enterobacteriáceas pueden cerrar el ciclo porque poseen malato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ que descarboxila oxidativamente al malato para dar piruvato. Sin embargo, esta reacción es utilizada en pequeña escala. La formación del succinato por las enterobacterias se representa en la figura 9.2.

E. coli y *Enterobacter* pueden además formar succinato por la misma vía que utilizan los clostridios y que ya ha sido descrita con anterioridad (capítulo 8). Esto sólo parece ser posible en muy pocas enterobacteriáceas y, por lo tanto, puede ser una característica de interés taxonómico. Esta vía del succinato se representa en la figura 9.3.

9.3.5 Formación del lactato

La producción del lactato se lleva a cabo por la acción de una lactato deshidrogenasa que también utiliza $\text{NADH} + \text{H}^+$ (L-lactato: NAD óxido reductasa y D-lactato NAD: óxido reductasa)



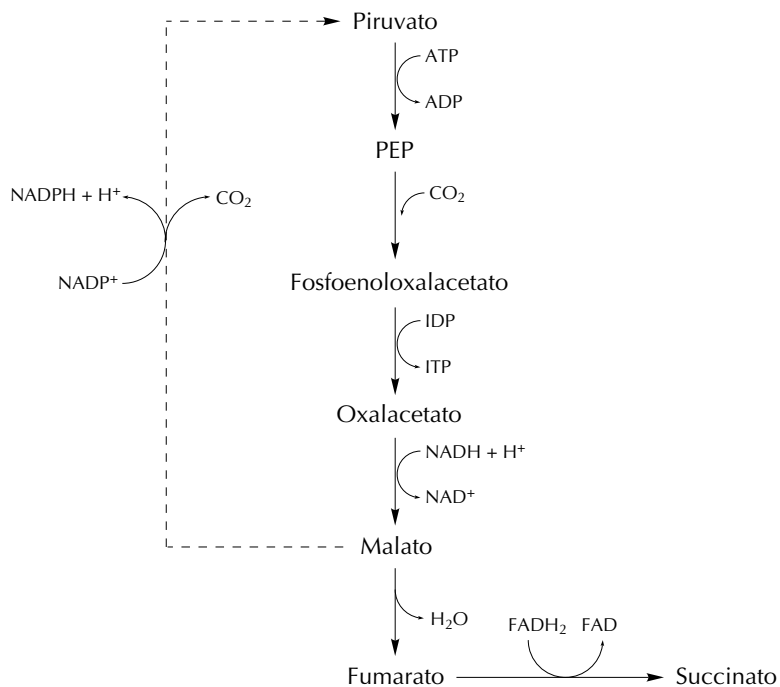


Figura 9.2 Formación de succinato por las enterobacterias.

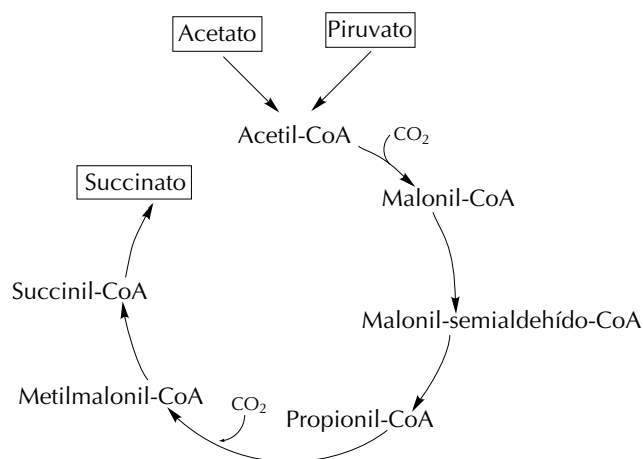
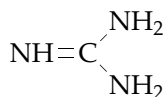


Figura 9.3 Formación de succinato por *E. coli* y *Enterobacter*.

La cantidad del lactato varía mucho. En *Serratia kiliensis* llega a constituir el 50% del piruvato catabolizado y en *Enterobacter aerogenes* no lo hay en absoluto. Además, la cantidad de lactato puede variar según las condiciones del desarrollo.

La reacción de Voges-Proskauer se basa en una reacción entre el núcleo de la guanidina que se halla presente en la creatina y en la peptona del medio y el diacetilo formado por la bacteria. Esta reacción tiene lugar en medio alcalino. Los productores de butanodiol también producen acetoína y estas dos sustancias se convierten en diacetilo cuando son oxidadas por el aire en una solución alcalina. Entonces la presencia de cualquiera de estos productos da lugar a una reacción Voges-Proskauer positiva.



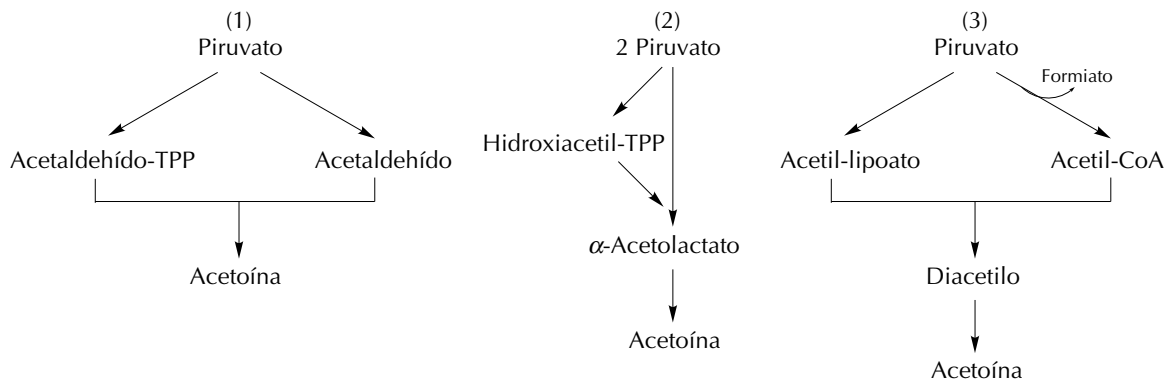
Núcleo de la guanidina

Los productores de 2,3-butilenglicol (butanodiol) pueden dividirse en dos grupos: el gasogénico y el agasogénico. Este último no tiene formiato deshidrogenasa y sólo forma CO_2 , que de ordinario queda disuelto en el medio. Dentro de este grupo encontramos los miembros del género *Serratia*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia carotovora* y *Beneckea alginolytica*. El grupo gasogénico produce más CO_2 que H_2 , a diferencia de los formadores de mezclas de ácidos. Comprende los miembros del género *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas hydrophila* y *Photobacterium phosphoreum*. La formación concomitante de ácidos es relativamente pequeña y el pH no desciende suficientemente para dar la reacción positiva del rojo de metilo. La tabla 9.1 permite comparar la producción de ácidos por las distintas bacterias entéricas a partir de la fermentación de la glucosa.

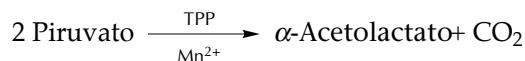
Además de las enterobacterias, otros grupos de microorganismos incluyen representantes que presentan una reacción de Voges-Proskauer positiva. Entre ellas, *Bacillus polymyxa* y algunas cepas de *Bacillus subtilis*, que producen 2,3 butanodiol. La reacción de Voges-Proskauer también se utiliza para el diagnóstico bioquímico de las especies de *Neisseria*.

9.4.1 Formación de acetoína

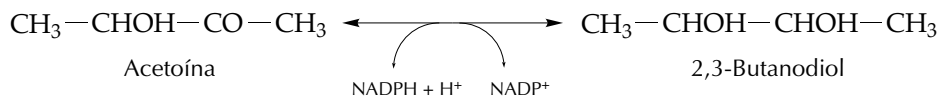
Los microorganismos producen acetoína (acetilmetilcarbinol) siguiendo tres vías diferentes.



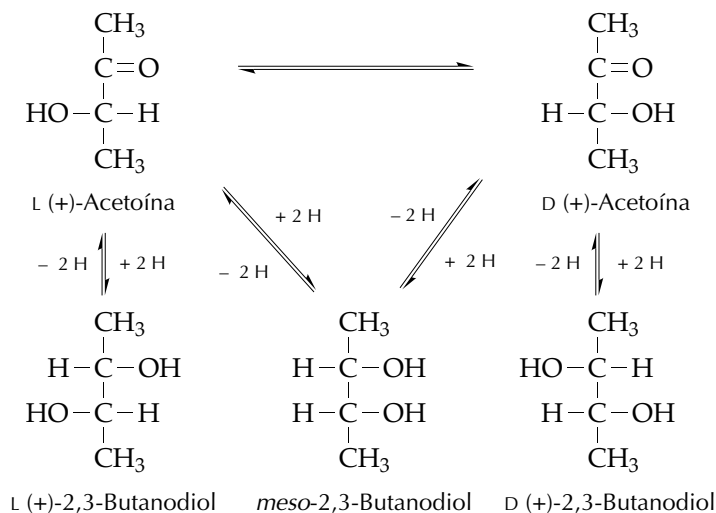
La segunda de ellas, que presenta como intermediario al α -acetolactato, tiene como enzima característico la α -acetolactato sintasa. Este enzima, que, además de encontrarse en las bacterias entéricas, también se halla en los miembros del género *Bacillus* que producen 2,3-butanodiol, cataliza la reacción:


$$\text{CH}_3-\text{CO}-\text{COOH} + (\text{H}) \text{TPP}-\text{E} \longrightarrow \text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{TPP}-\text{E} + \text{CO}_2$$
$$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{TPP}-\text{E} + \text{CH}_3-\text{CO}-\text{COOH} \longrightarrow \underset{\text{OH}}{\underset{|}{\underset{\text{Aceto|actato}}{\text{CH}_3-\text{C}}}-\text{CO}-\text{CH}_3} + (\text{H}) \text{TPP}-\text{E}$$
$$\begin{array}{ccc} \text{COOH} & & \\ | & & \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{CO} - \text{CH}_3 & \longrightarrow & \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CO} - \text{CH}_3 + \text{CO}_2 \\ | & & | \\ \text{OH} & & \text{OH} \\ \text{Acetolactato} & & \text{Acetoína} \end{array}$$
$$\begin{array}{l} \text{CH}_3\text{—CO—lipoato} + \text{CH}_3\text{—CO—S—CoA} \xrightarrow[\text{HS—CoA}]{\text{lipoato}} \text{CH}_3\text{—CO—CO—CH}_3 \\ \text{CH}_3\text{—CO—CO—CH}_3 \xrightarrow[\text{NAD}^+]{\text{NADH} + \text{H}^+} \text{CH}_3\text{—CHOH—CO—CH}_3 \end{array}$$

El butanodiol es un producto que resulta de la reducción de la acetoína

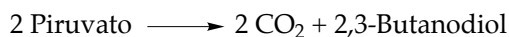


Taylor y Juni mostraron que hay varias butanodiol deshidrogenasas y que todas ellas son estereoespecíficas. *Bacillus polymyxa* contiene una D (-)-2,3-butanodiol deshidrogenasa, *Enterobacter aerogenes* y *Aeromonas hydrophila* contienen la L (+)-, y *Bacillus subtilis* contiene ambas D (-)- y L (+)-butanodiol deshidrogenasas. *Aeromonas hydrophila* tiene además una acetoín racemasa. Esto explica las distintas combinaciones de los tres isómeros que resultan de la fermentación 2,3-butilenglicólica. Cuando se hallan presentes las dos deshidrogenasas y no hay racemasa se forma el meso-2-butanodiol:



Es posible que los distintos tipos de butanodiol formados por cada especie constituyan una diferencia de valor taxonómico equivalente a la de los diferentes tipos de ácido láctico en las bacterias lácticas homofermentativas.

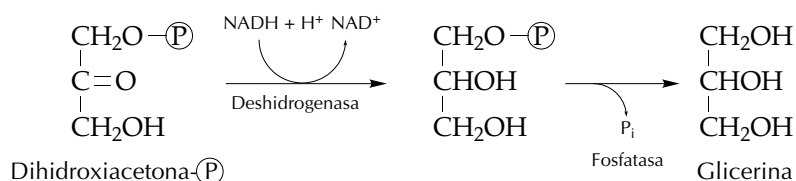
La reacción global para la producción de 2,3-butanodiol a partir de piruvato es:



9.5 FORMACIÓN DE TRIMETILENGLICOL

La glicerina puede ser un sustrato fermentable por varias enterobacterias y también puede ser producto final de la fermentación de azúcares.

Al igual que las levaduras las bacterias entéricas pueden acumular glicerina como producto final, tanto las que realizan una fermentación ácido-mixta como las que llevan a cabo la fermentación 2,3-butilenglicólica. La formación de glicerina se ve incrementada en condiciones que anulan o disminuyen la actividad de la formiato deshidrogenasa o de la deshidrogenasa alcohólica. El sustrato para la formación de glicerina es la dihidroxiacetona- P :



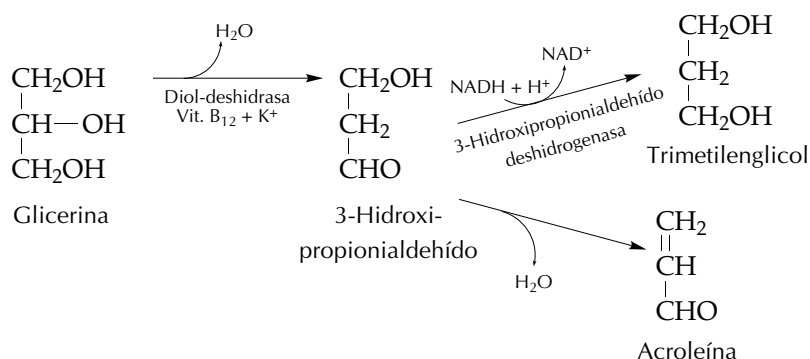
Por lo que respecta a la fermentación de la glicerina, ésta puede hacerse por dos vías independientes. Por un lado, la glicerina puede oxidarse a dihidroxiacetona y seguir la vía de Embden-Meyerhof.

El cambio de glucosa por glicerina como sustrato energético supone un incremento neto de los procesos oxidadores referidos al mismo número de carbonos metabolizados. Por lo tanto, la reoxidación de los coenzimas llevará como consecuencia la formación de mayor cantidad de productos reducidos finales. *Escherichia coli* es incapaz de fermentar la glicerina. Ello es así porque, para cumplir el balance de oxidorreducción (cada mol de glicerina genera dos moles de $\text{NADH} + \text{H}^+$ al transformarse en piruvato), todo el piruvato formado debería transformarse en acetil-CoA (mediante la piruvato formiato liasa) y éste en etanol. La existencia en el citoplasma de otras enzimas que transforman el acetil-CoA en acetato impide que se cumpla el balance de oxidorreducción.

Adicionalmente, la glicerina presente en el medio puede reducirse a trimetilenglicol. En esta reacción se reoxidan coenzimas, y la misma se lleva a cabo en presencia de otro sustrato fermentable. O, si el crecimiento se realiza exclusivamente con glicerina, parte de la misma se transforma en gliceraldehído-3- P , que sigue la vía de Embden-Meyerhof. De hecho, la reoxidación de coenzimas generados en la fermentación de la glicerina vía de Embden-Meyerhof puede realizarse en parte transformando glicerina en trimetilenglicol. En este caso, las dos vías que tienen como sustrato la glicerina compiten por la misma. La formación de trimetilenglicol estará compensada por una disminución de etanol o por un incremento de ácido acético.

Citrobacter freundii y algunas cepas de *Enterobacter aerogenes* deshidratan la glicerina mediante un enzima que en presencia de coenzima B_{12} y de iones K^+ convierte cualquier 1,2 diol en 2-desoxialdehído. Esta diol deshidratasa forma 3-hidroxipropionaldehído a partir de la

glicerina. El 3-hidroxi- β -hidroxipropionaldehído es reducido con $\text{NADH} + \text{H}^+$ a trimetilenglicol mediante una 3-hidroxi- β -hidroxipropionaldehído deshidrogenasa. El 3-hidroxi- β -hidroxipropionaldehído también puede ser deshidratado dando acroleína:



La acroleína, señalada por Voisenet como producto final de la fermentación de la glicerina en *Bacillus amaracrylus* (*B. polymixa*), también se ha encontrado en la fermentación de la glicerina por *Citrobacter freundii* y en *Enterobacter aerogenes*.

Mickelson y Werkman señalaron que la acroleína se formaba en una reacción lateral. Sobolov y Smiley demostraron que la acroleína se forma espontáneamente a partir del 3-hidroxi- β -hidroxipropionaldehído y que su presencia en pequeña cantidad junto al trimetilenglicol puede ser un artefacto.

Desde el punto de vista de sus propiedades fermentativas las enterobacteriáceas pueden ser separadas en tres grupos: las que producen una mezcla de ácidos, las que producen 2,3-butanodiol y las que producen trimetilenglicol, característica esta última de las bacterias del género *Citrobacter*.

BIBLIOGRAFÍA

- CLARK, H. F. y KABLER, P. W. The Physiology of the Coliform Group. En Principles and Applications in Aquatic Microbiology (H. Hekelekian y Norman C. Dondero, eds.). John Wiley and Sons, Inc. New York/London/Sydney. 1964.
- NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., BROOKS LOW, K., MAGASANIK, B., SCHAECHTER, M., UMBARGER, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. vol. I. Amer. soc. for Microbiol. Washington D. C. 1987.
- INGLEDEW, W. J. y POOLE, R. K. The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. Microbiological Review. 48, 3, pp. 222-271. 1984.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

10.1	CLOSTRIDIOS PUTREFACTIVOS	134
10.2	FERMENTACIONES DE UN SOLO AMINOÁCIDO	134
10.2.1	Arginina	135
10.2.2	Histidina y ácido glutámico	136
10.2.3	Glicina	137
10.2.4	Serina	138
10.2.5	Treonina	138
10.2.6	Triptófano	139
10.2.7	Lisina	139
10.2.8	Ornitina	141
10.2.9	Cisteína y metionina	141
10.3	DESCARBOXILACIÓN DE AMINOÁCIDOS	142
10.4	FERMENTACIÓN ACOPLADA DE DOS AMINOÁCIDOS	142
10.5	FERMENTACIÓN DE UN AMINOÁCIDO JUNTO A UN CETOÁCIDO	145
10.6	FERMENTACIÓN DE LA PURINA	147
10.7	FERMENTACIÓN DE LA PIRIMIDINA	147
10.8	FERMENTACIÓN DE LA ALANTOÍNA	149
10.9	FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO NICOTÍNICO	149
	BIBLIOGRAFÍA	149

10.1 CLOSTRIDIOS PUTREFACTIVOS

La capacidad de degradar anaerobiamente proteínas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos no está distribuida uniformemente por todos los grupos de bacterias. Las que tienen esta propiedad se llaman bacterias putrefactivas porque a menudo generan sustancias de olor desagradable. Una bacteria putrefactiva es la que puede llevar a cabo una degradación catabólica de un compuesto nitrogenado en condiciones aneróbicas. Ocasionalmente, este mismo compuesto puede suministrar el carbono y el nitrógeno necesarios para el desarrollo.

Las bacterias putrefactivas son sobre todo especies del género *Clostridium*, como *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. tetani* y *C. tetanomorphum*. Además de este género encontramos otras especies putrefactivas pertenecientes a grupos taxonómicos distintos, como las de los géneros *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Proteus*.

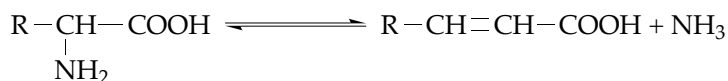
Las bacterias putrefactivas son alcalófilas y a su vez tienden a alcalinizar los medios de cultivo. Esto último es debido a que o bien se libera amoníaco con formación de ácidos débiles, o bien se liberan bases orgánicas. En este sentido existe una cierta contraposición con la fermentación propiamente dicha que es un proceso acidificante. Es conocido el hecho de que los organismos fermentadores y los putrefactivos son antagónicos y que, una vez que se ha desarrollado uno de ellos en un medio, difícilmente puede desarrollarse alguno del tipo opuesto.

Teniendo en cuenta que las macromoléculas proteicas no pueden penetrar dentro de la célula bacteriana, los microorganismos que se nutren de ellas liberan al medio exterior enzimas que las hidrolizan transformándolas o bien en aminoácidos o bien en péptidos de bajo peso molecular. Hay dos clases de enzimas proteolíticas: las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las primeras pueden romper la cadena polipeptídica en cualquier punto con una misma probabilidad, en tanto que las segundas sólo lo hacen por los extremos. Las exopeptidasas se subdividen en aminopeptidasas, que requieren un grupo amino terminal y son dependientes de un ion metálico para su actividad, y las carboxipeptidasas, que hidrolizan péptidos con un carboxilo terminal.

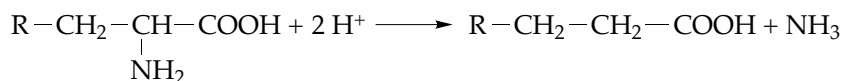
Los aminoácidos y varios compuestos heterocíclicos, productos de la hidrólisis de sustancias nitrogenadas más complejas, son los verdaderos sustratos del catabolismo fermentativo de los microorganismos putrefactivos.

10.2 FERMENTACIONES DE UN SOLO AMINOÁCIDO

La desaminación de un aminoácido puede ser llevada a cabo por las bacterias de distintas formas. Existe una desaminación por insaturación, siendo el producto final el ácido graso insaturado:



Normalmente, en anaerobios y facultativos cuando actúan anaerobiamente, se lleva a cabo una desaminación reductora:



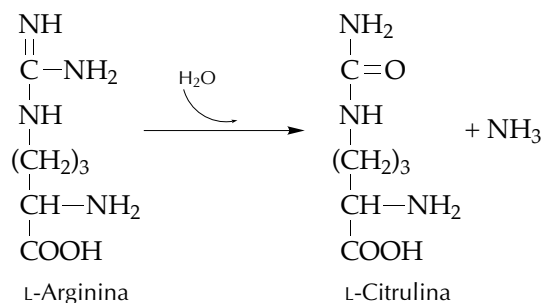
Los organismos que tienen hidrogenasa y que pueden utilizar el hidrógeno molecular como reductor, manifiestan preponderadamente este tipo de desaminación.

El compuesto resultante de la desaminación puede ser oxidado anaerobiamente. Para ello requiere un aceptor de electrones estable, el cual puede ser suministrado independientemente, como en la fermentación acoplada de aminoácidos, o puede resultar de la misma degradación metabólica del ácido orgánico. También puede producirse hidrógeno. En *Clostridium tetanomorphum* este hidrógeno puede dar lugar a una desaminación reductora.

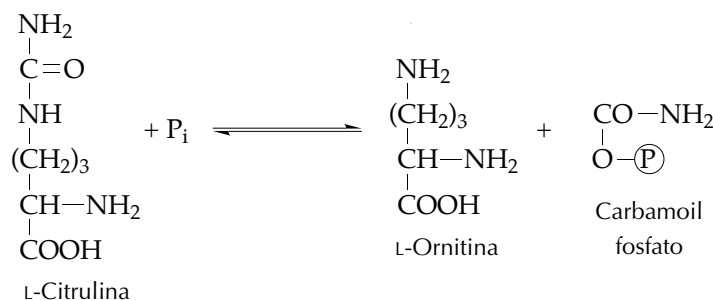
En general, la fermentación de aminoácidos produce como productos finales ácidos orgánicos, CO_2 , H_2 y NH_3 .

10.2.1 Arginina

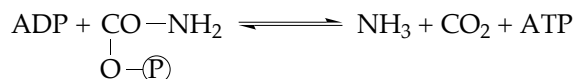
Una cepa de *Mycoplasma* aislada de cultivos celulares contaminados ha mostrado la propiedad de transformar rápidamente la arginina produciendo ATP. La L-arginina es primero desaminada por una arginina-desaminasa que la convierte en citrulina:



La ornitina-carbamoil-transferasa lleva a cabo la siguiente transformación de la L-citrulina con fosfato inorgánico:



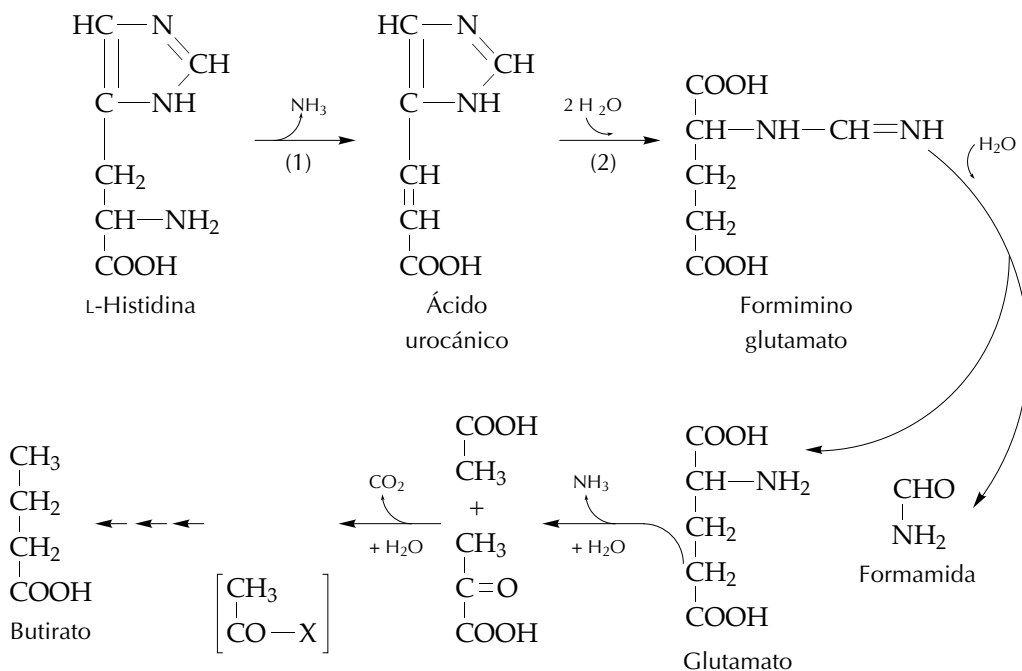
La siguiente reacción de la carbamato-quinasa es la que produce ATP:



Esta reacción a partir de la arginina ha podido ser demostrada en *Pseudomonas fluorescens* (lo que permite explicar la capacidad de crecimiento anaerobio en presencia de arginina de algunos representantes del género *Pseudomonas*), en *Halobacterium salinarium* y en *Clostridium botulinum*. Además, este último degrada la ornitina hasta ácidos volátiles.

10.2.2 Histidina y ácido glutámico

Clostridium tetanomorphum convierte la histidina en butirato, acetato, CO_2 , NH_3 y formamida. La primera reacción es una desaminación por insaturación catalizada por la L-histidina-amonio-liasa (1) que va seguida por el sistema de la urocanato hidratasa (2). La etapa siguiente desde el glutamato es aún oscura, pero se supone que está ligada al tetrahidrofolato (X). La rotura del glutamato es una desaminación reductora:



Clostridium tetanomorphum crece muy bien sobre glutamato. Su utilización (fig. 10.1) comprende una desaminación por insaturación catalizada por la metil aspartato amonio liasa. El ácido citramálico se forma por la mesaconato hidratasa. La citramalatoliasa da lugar a una reacción parecida a la de la aldolasa que convierte el citramalato en acetato y piruvato. El piruvato experimenta una descarboxilación oxi-

10.2 FERMENTACIONES DE UN SOLO AMINOÁCIDO

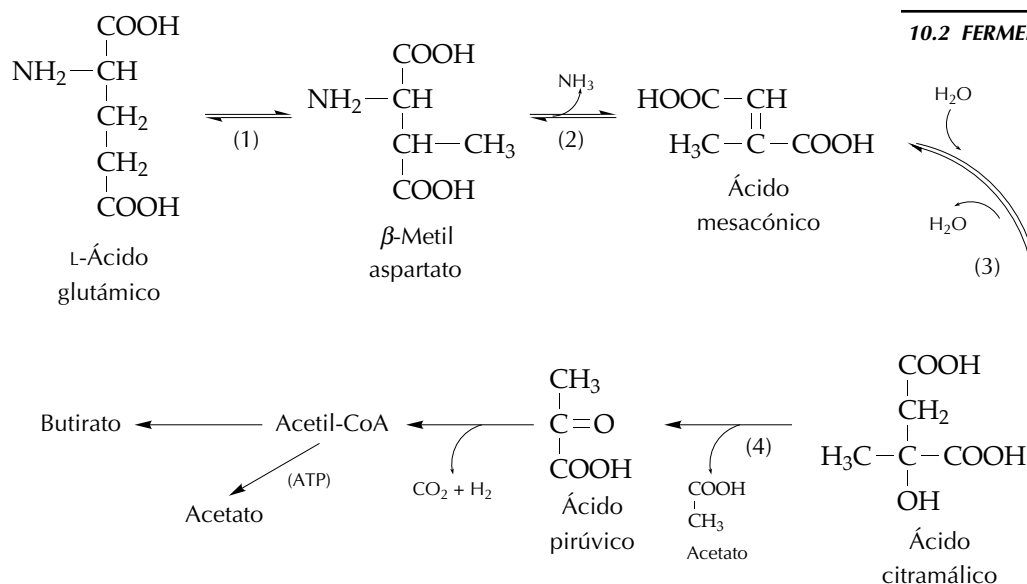


Figura 10.1 Fermentación del glutamato por *Clostridium tetanomorphum*. (1) Glutamato mutasa. (2) Metil aspartato amonio liasa. (3) Mesaconato hidratasa. (4) Citramalato liasa.

dativa que produce acetil-CoA, el cual da lugar a una fermentación butírica. Esta última etapa es la que produce energía.

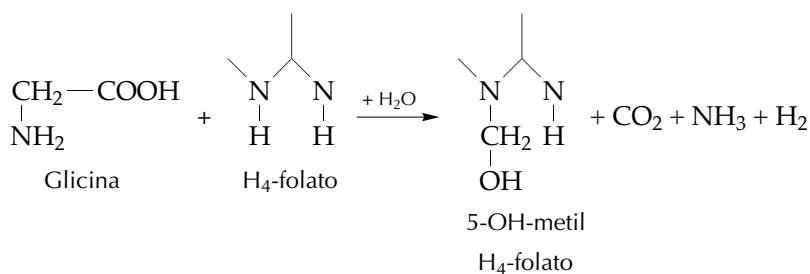
10.2.3 Glicina

Las únicas bacterias anaerobias que llevan a cabo una degradación de la glicina son *Diplococcus glycinophilus*, *Micrococcus anaerobius* y *Micrococcus variabilis*, en realidad cepas distintas de *Peptococcus anaerobius*:

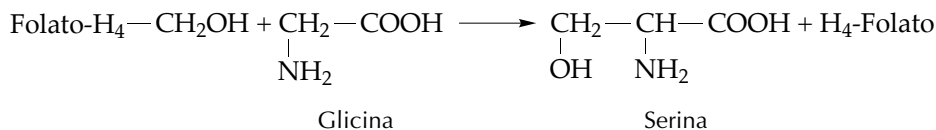


Puede liberarse hidrógeno molecular.

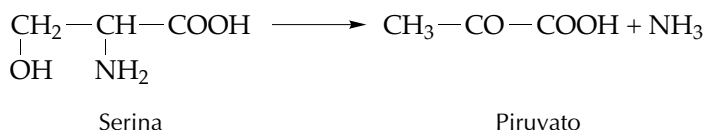
La primera reacción es una óxido-reducción con desprendimiento de CO_2 , NH_3 e hidrógeno. Requiere fosfato de piridoxal y NAD^+ como cofactores.



Una segunda molécula de glicina es ahora necesaria para regenerar el tetrahidrofolato, formándose serina. En realidad, con las dos reacciones, el H₄-folato se utiliza para transferir el grupo metilo de una glicina a otra molécula de glicina para producir serina:



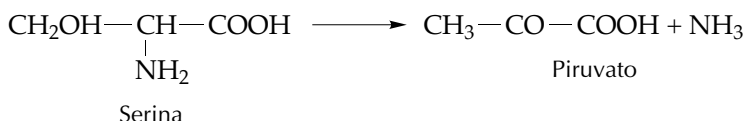
La desaminación de la serina produce piruvato:



El piruvato se reduce a acetato por la rotura fosforoclástica con formación de acetyl-CoA, acetyl-fosfato y acetato.

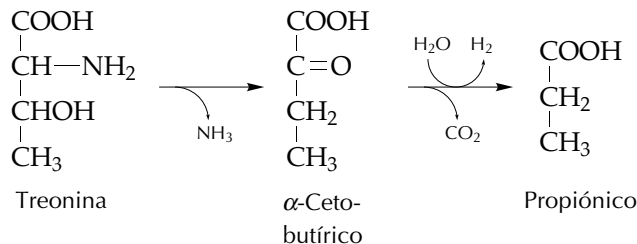
10.2.4 Serina

La desaminación se lleva a cabo por una serina-deshidratasa L-específica que puede actuar también sobre la L-treonina.

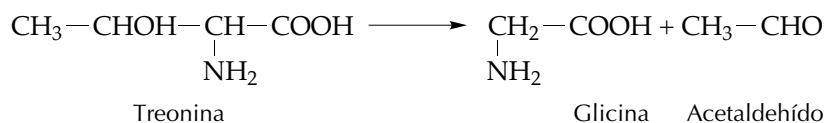


10.2.5 Treonina

Clostridium propionicum lleva a cabo una desaminación de la treonina a α-cetobutírico por una treonina-deshidratasa. La etapa ulterior forma propiónico por descarboxilación oxidativa con liberación de hidrógeno molecular:



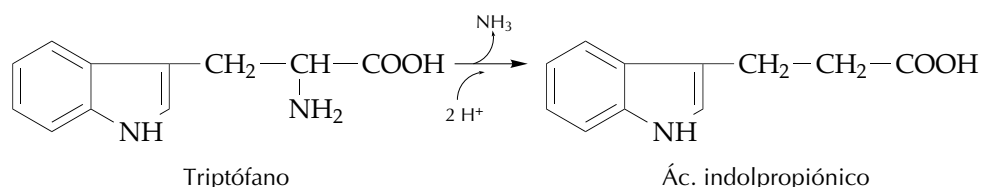
Clostridium pasteurianum utiliza una serina hidroximetiltransferasa, con lo que rompe la treonina en glicina y acetaldehído. El acetaldehído es reducido posteriormente a etanol con reoxidación de NAD⁺:



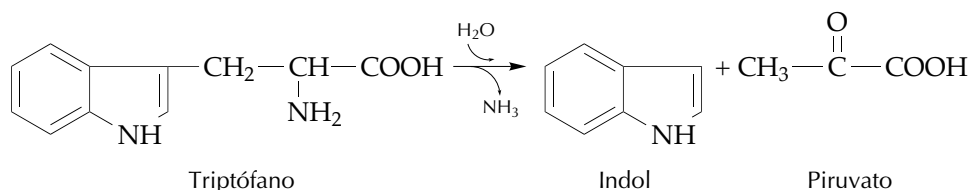
Peptococcus aerogenes forma α -cetobutírico que luego se reduce a butírico.

10.2.6 Triptófano

El triptófano es fermentado lentamente por *Clostridium sporogenes* con la formación de ácido indolpropiónico:



Muchas bacterias producen indol del triptófano, lo cual tiene un gran interés taxonómico. Esto es debido a la triptofanasa, que lleva a cabo una reacción de desaminación.



La prueba bioquímica que se utiliza para la demostración del indol se basa en la reacción coloreada que se produce en medio ácido con *p*-dimetilaminobenzaldehído. El indol se extrae del cultivo en agua de peptona con un pequeño volumen de xilol, añadiéndose luego el reactivo.

10.2.7 Lisina

Clostridium sticklandii y otros clostridios utilizan la lisina como única fuente de carbono en condiciones anaerobias. La vía metabólica se representa en la figura 10.2. La primera reacción, que requiere coenzima B₁₂ como cofactor, cambia el grupo amino de la posición 2 a la posición 3, dando β -lisina; o de la posición 6 a la 5, dando 2,5-diaminohexanoato. Ambos intermediarios se convierten en 3,5-diaminohexanoato que sufre una desaminación oxidativa, la cual forma 3-ceto-5-aminohexanoato. Esta reacción requiere NAD⁺. Sigue un desdoblamiento que produce acetato y β -aminobutiril-CoA. La desaminación subsiguiente tiene lugar con formación de butiril-CoA. Finalmente la desacilación produce ácido butírico y un mol de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

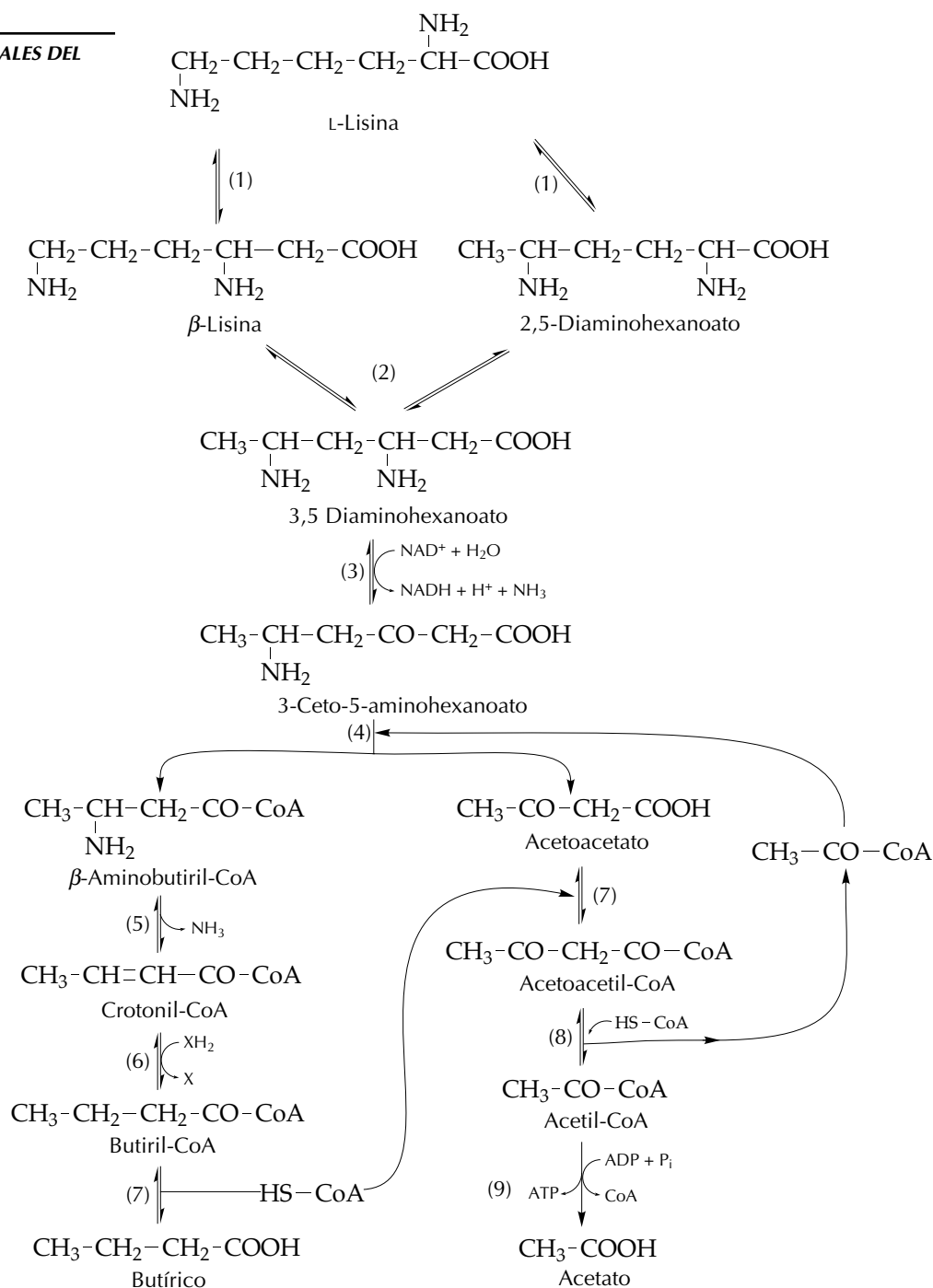
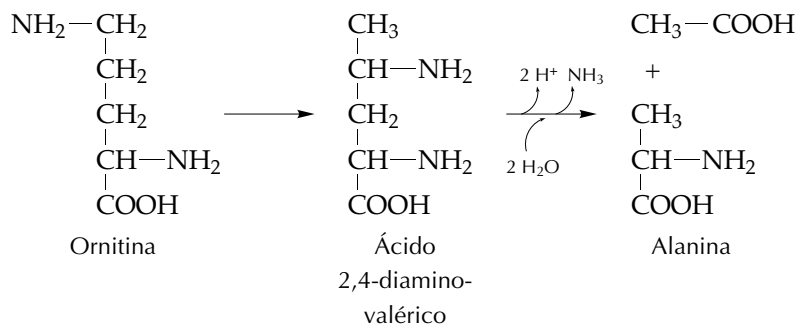
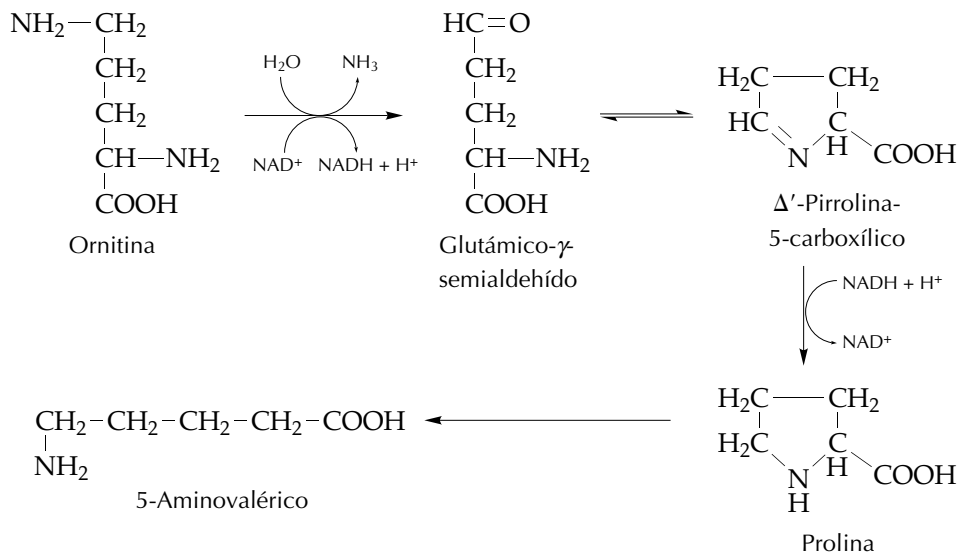


Figura 10.2 Fermentación de la lisina por los clostridios. (1) L-Lisina, 2,3-aminomutasa. (2) β -lisina mutasa. (3) 3,5-Diaminohexanoato deshidrogenasa. (4) Enzima que hidroliza el 3-ceto-5-aminohexanoato. (5) Desaminasa. (6) Butiril-CoA deshidrogenasa. (7) CoA transferasa. (8) β -cetotiolasa. (9) Fosfocetolasa acetato quinasa.

Clostridium sticklandii fermenta la ornitina por una vía parecida a la de la lisina. No tiene lugar la segunda desaminación, formándose acetato y alanina:

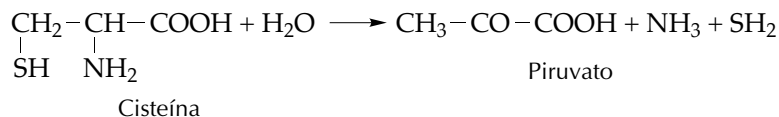


Clostridium botulinum tiene un sistema de fermentar la ornitina completamente diferente, que lleva a la formación de 5-aminovalerato.

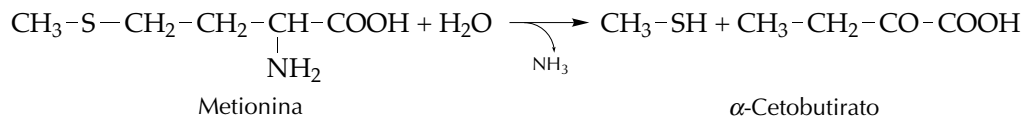


10.2.9 Cisteína y metionina

La fermentación de la cisteína por *Proteus vulgaris* y otras bacterias origina SH_2 , NH_3 y piruvato.



La metionina da metilmercaptano ($\text{CH}_3\text{—SH}$), NH_3 y α -cetobutirato:

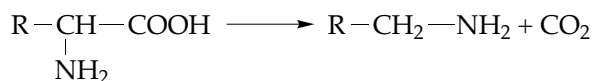


Tanto el SH₂ como el metilmercaptano contribuyen al olor putrefacto de las proteínas en descomposición.

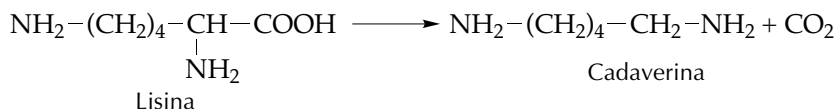
Los dos cetoácidos son ulteriormente descarboxilados oxidativamente a ácidos monocarboxílicos.

10.3 DESCARBOXILACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Cierto número de bacterias catalizan la descarboxilación de algunos aminoácidos según la reacción:



Los aminoácidos más frecuentemente descarboxilados de esta forma son la histidina, la tirosina, la arginina, la ornitina, la lisina, el triptófano y el glutamato. La descarboxilación de la lisina genera cadaverina, sustancia básica de olor muy desagradable:



La reacción de descarboxilación se lleva a cabo principalmente en medio relativamente ácido. Las bases producidas tienden a elevar el pH.

Las reacciones de descarboxilación de aminoácidos han sido utilizadas por su significación taxonómica.

En la tabla 10.1 se indican los aminoácidos fermentados por distintas bacterias anaerobias.

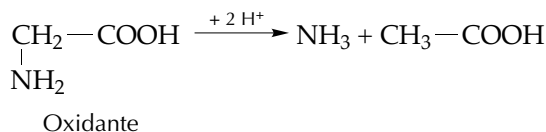
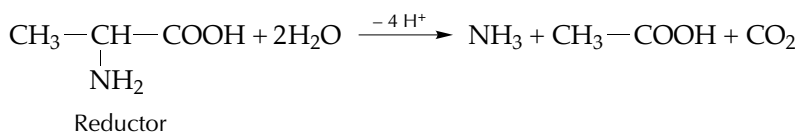
10.4 FERMENTACIÓN ACOPLADA DE DOS AMINOÁCIDOS

Muchos clostridios que crecen con hidrolizados de proteínas o con mezclas de aminoácidos obtienen su energía de una reacción de óxido-reducción acoplada entre dos aminoácidos o entre un aminoácido y un compuesto ternario. La reacción acoplada entre dos aminoácidos se denomina reacción de Stickland y se caracteriza porque los aminoácidos por separado no se descomponen en forma apreciable, en tanto que la apropiada pareja de aminoácidos lo hace con gran rapidez. Uno de los miembros es oxidado mientras que el otro es reducido:

TABLA 10.1 Aminoácidos fermentados por bacterias anaerobias.

Especies	Alanina	Arginina	Aspartato	Cisteína	Glutamato	Glicina	Histidina	Hidroxiprolina	Isoleucina	Leucina	Lisina	Metionina	Fenilalanina	Prolina	Serina	Triptófano	Treonina	Tirosina	Valina	Reacción de Stickland
<i>Clostridium botulinum</i>										±					+					+
<i>Clostridium cochlearium</i>					+												-			-
<i>Clostridium perfringens</i>			+	+	+								-		+		+			-
<i>Clostridium propionicum</i>	+	-	±	+	-	-	-	-		-	-	±	-	-	+	-	+			-
<i>Clostridium saccharobutyricum</i>			+		+		+						-		+		+			
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+		+	+	-	+	+	+		-	+
<i>Clostridium sticklandii</i>											+		+		+		+			+
<i>Clostridium tetani</i>	-		+		+	-	+						-	-	+					-
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	-	-	+	+	+	-	+	-		-	-	±	+	-	+	-		+	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>													-		-					
	-	±	±	+	+	-	+	-		-	+		-		-	-	+	+	-	-
<i>Pentococcus glycinophilus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
<i>Pentococcus aerogenes</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pentococcus anaerobius</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pentococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pentococcus prevotii</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pentococcus activus</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pentococcus asaccharolyticus</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>														+		+				

+, fermentación rápida; ±, fermentación lenta; -, no fermentado.



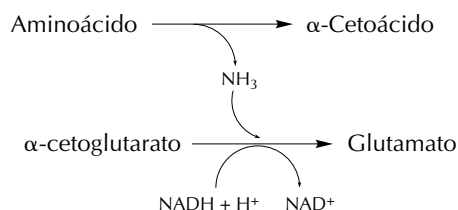
Las bacterias que utilizan la reacción de Stickland son clostridios proteolíticos, entre los que se encuentran:

<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. indolis</i>
<i>C. aerofaetidum</i>	<i>C. mitelmani</i>
<i>C. bifermentans</i>	<i>C. saprotoxicum</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>C. sordellii</i>
<i>C. caproicum</i>	<i>C. sporogenes</i>
<i>C. carnis</i>	<i>C. sticklandii</i>
<i>C. ghoni</i>	<i>C. valerianicum</i>
<i>C. histolyticum</i>	

Los aminoácidos que actúan como reductores pueden dividirse en tres grupos:

1. Aminoácidos alifáticos que son más reducidos que los α -cetoácidos (alanina, leucina, isoleucina, norleucina y valina).
2. Aminoácidos alifáticos con el mismo grado de oxidación que los α -cetoácidos (serina, treonina, cisteína, metionina, arginina, citrulina y ornitina).
3. Otros aminoácidos, generalmente menos oxidados que los α -cetoácidos (histidina, fenilalanina, triptófano, tirosina, aspartato y glutamato).

Es posible que en algunos casos se precise α -cetoglutarato, el cual quizás actúe en conjunción con la glutamato deshidrogenasa:



La vía oxidativa puede comprender este sistema de transaminación. El mecanismo de la reacción de Stickland se representa en la figura 10.3.

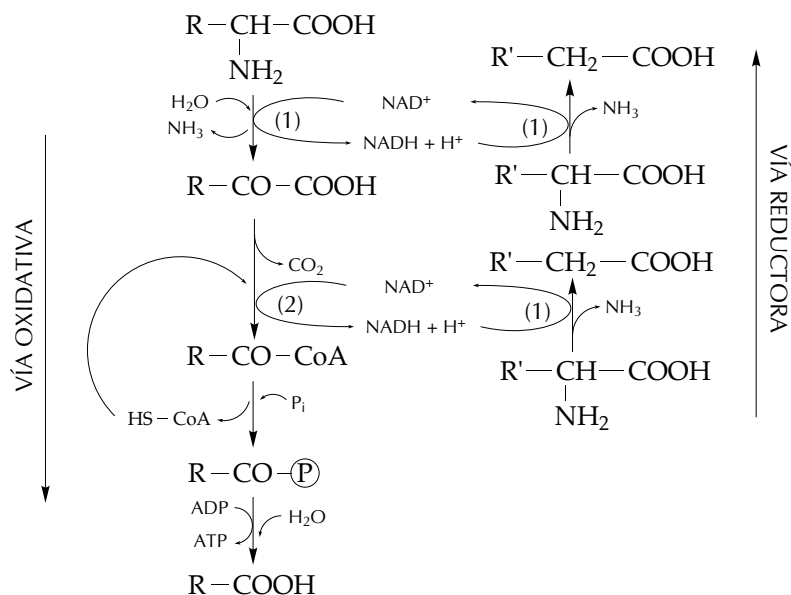
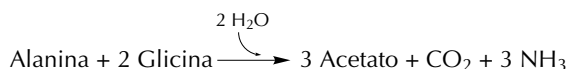
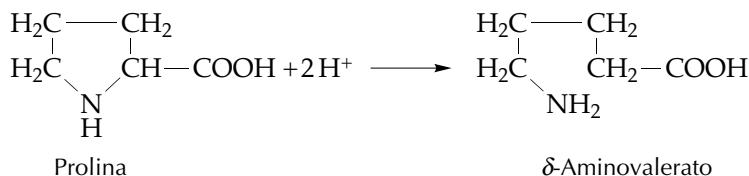


Figura 10.3 Reacción de Stickland. (1) Sistema de la L-aminoácido deshidrogenasa. (2) Sistema de la 2-cetoácido deshidrogenasa. Requiere lipoamida, TPP y HS-CoA. Si R es un grupo metilo y R' un átomo de hidrógeno, entonces el esquema representa la fermentación conjunta de la glicina y de la alanina que proporciona acetato y CO₂ según la siguiente estequiometría:



La reducción de la prolina o de la hidroxiprolina convierte el compuesto cíclico en otro lineal sin formación de NH₃.



10.5 FERMENTACIÓN DE UN AMINOÁCIDO JUNTO A UN CETOÁCIDO

Clostridium propionicum usa la reacción de Stickland para metabolizar la β-alanina a ácido propiónico, utilizando el piruvato como oxidante. El conjunto del sistema degradativo se representa en la figura 10.4.

Un sistema degradativo similar se encuentra en *Clostridium aminobutyricum* que convierte γ-aminobutirato en ácido butírico. Como en el caso anterior también se produce acetato (fig. 10.5).

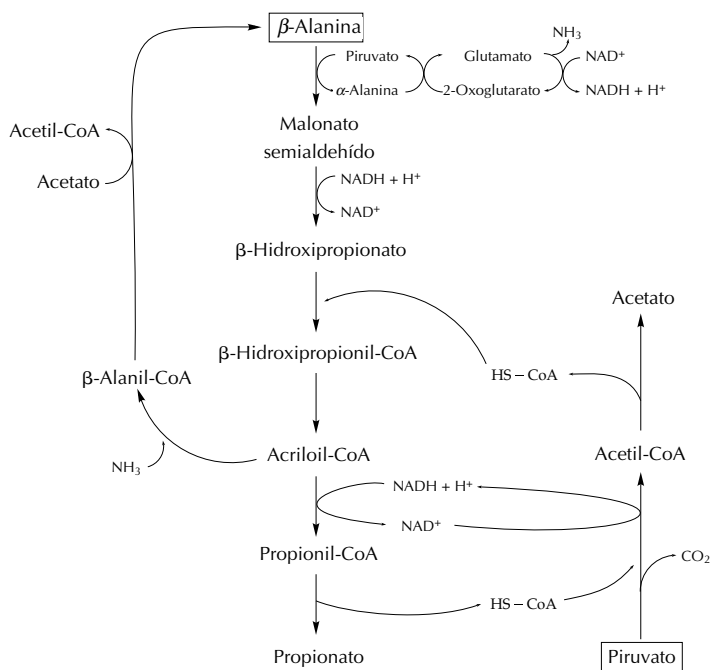


Figura 10.4 Fermentación de alanina y piruvato.

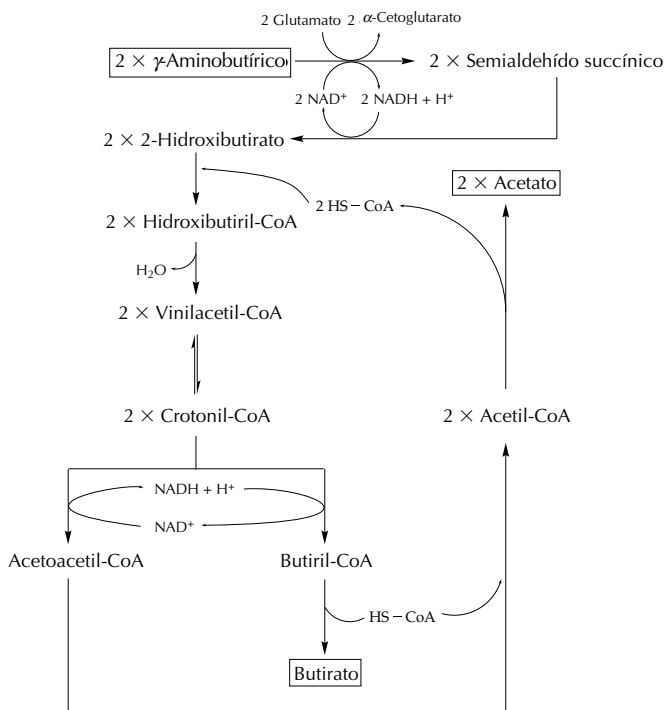
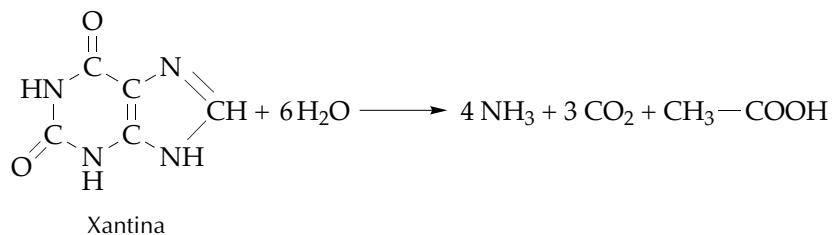


Figura 10.5 Fermentación del γ -aminobutirato por *Clostridium aminobutyricum*.

La llevan a cabo un número limitado de especies de *Clostridium* y *Micrococcus*. *C. acidi-urici* fermenta rápidamente el ácido úrico, la xantina y algunas otras purinas a NH_3 , CO_2 , acetato y cantidades muy pequeñas de glicocola y formiato.



Otras purinas fermentadas se convierten probablemente en xantina antes de que se abra el anillo. Las etapas de la fermentación se reseñan en la figura 10.6.

La fermentación implica la apertura del ciclo hexagonal, seguida por la conversión del anillo de la imidazolona en el compuesto lineal formiminoglicina. Esta última se convierte en glicina, ácido fórmico y NH_3 . El ácido fórmico se halla bajo una forma activada unido al ácido tetrahydrofolínico. Este complejo se reduce y la glicina se condensa con el formaldehído para formar serina. Luego este aminoácido es desaminado y reestructurado para formar piruvato, el cual finalmente produce acetato y CO_2 . Durante la oxidación del piruvato se genera probablemente fosfato de alta energía bajo la forma de acetyl-(P), el cual producirá ATP.

10.7 FERMENTACIÓN DE LA PIRIMIDINA

Las pirimidinas son probablemente fermentadas pasando previamente a ácido orótico. La realizan cepas de *Clostridium oroticum* y *Peptococcus aerogenes*.

Clostridium oroticum fermenta el ácido orótico lentamente con formación de NH_3 , CO_2 y uno o más ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos. En extractos libres de células, el ácido orótico se transforma en L-aspartico acompañado de una pequeña cantidad de 2,5-carboximetilhidantoína, compuesto este último que se forma espontáneamente por hidratación del ácido α -ureido succínico (fig. 10.7).

Peptococcus aerogenes puede fermentar el uracilo, la citosina y la timina. En estos últimos dos casos se acumula uracilo. Además se produce CO_2 , H_2 , acetato, lactato y NH_3 .

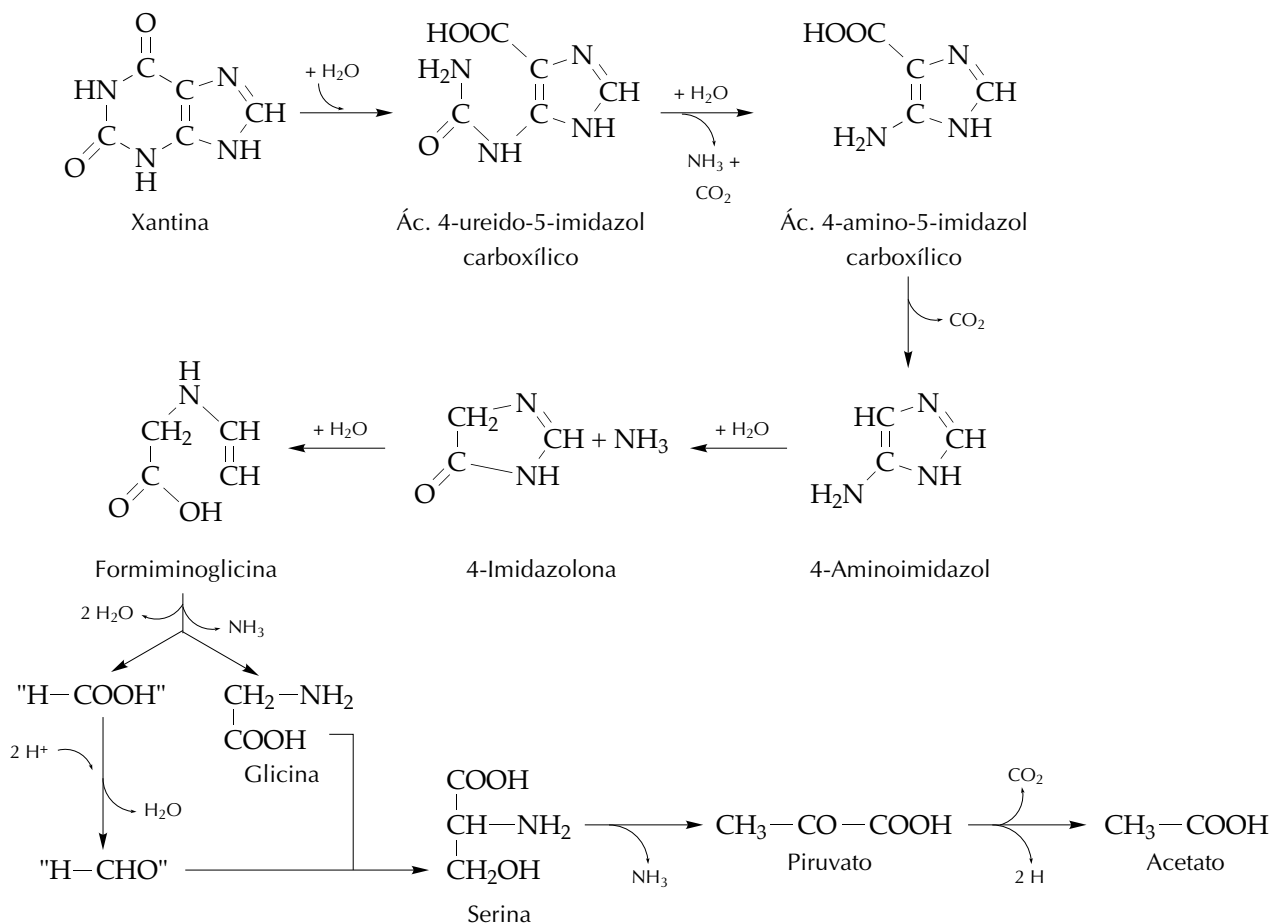


Figura 10.6 Etapas de degradación de la xantina.

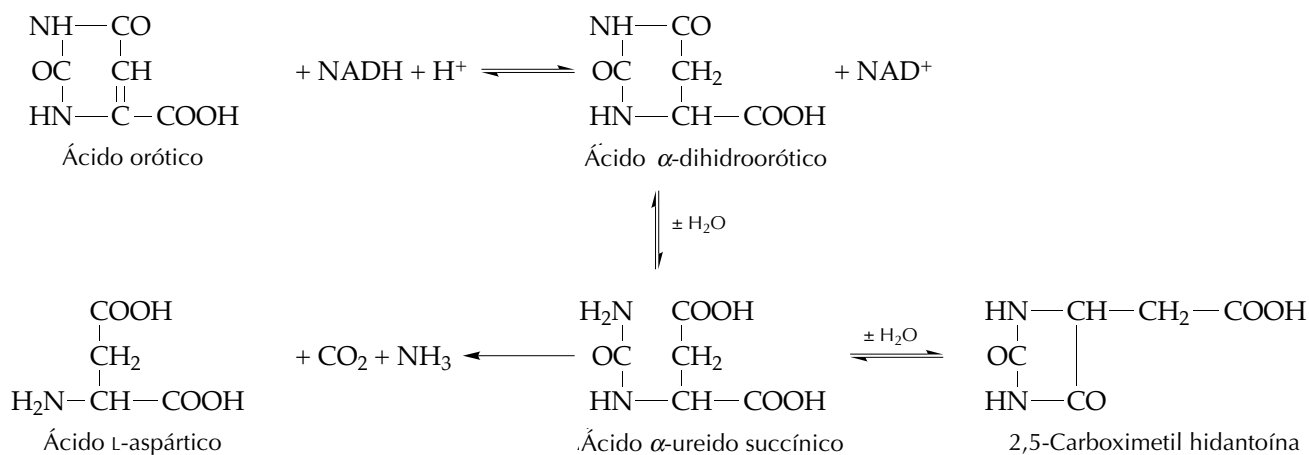
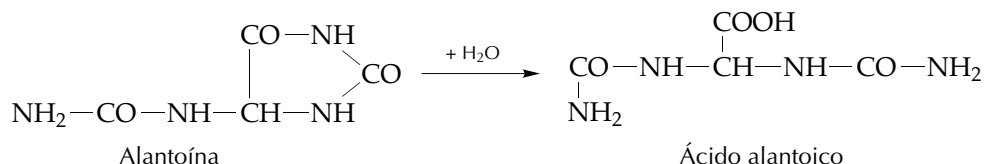


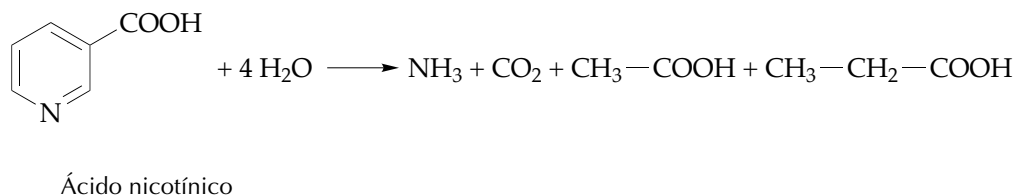
Figura 10.7 Fermentación del ácido orótico por *Clostridium orotium*.

Streptococcus allantoicus fermenta la alantoína en un medio que contenga una pequeña cantidad de extracto de levadura. Los productos finales son NH_3 , urea, ácido oxámico, CO_2 , formiato, acetato, glicolato y lactato. El ácido oxámico (monoamida del ácido oxálico), no había sido observado con anterioridad como producto natural. No se conoce exactamente la vía de la fermentación de la alantoína, pero probablemente el primer paso es la formación de ácido alantoico:



10.9 FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO NICOTÍNICO

Una especie no identificada del género *Clostridium* puede utilizar el ácido nicotínico como fuente de carbono, energía y nitrógeno. La mayor parte del ácido nicotínico genera NH_3 , acetato y propionato, según la estequiometría:



BIBLIOGRAFÍA

- VOGELS, G. S. y Van der DRIFT, C. Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 40, pp. 403–468. 1976.
- BARKER, H. A. Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 50, pp. 23–40. 1981.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

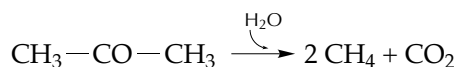
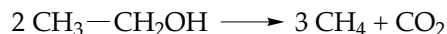
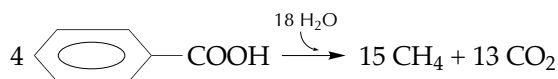
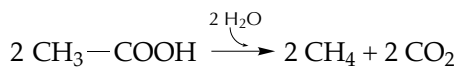
11.1	BACTERIAS METANÓGENAS	152	
11.2	REDUCCIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO		155
11.3	EL SISTEMA DE LA METILREDUCTASA	157	
11.4	LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA	159	
	BIBLIOGRAFÍA	159	

11.1 BACTERIAS METANÓGENAS

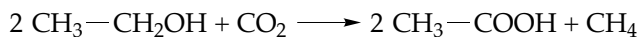
El metano (CH_4) es conocido desde el siglo XVIII como un gas que se desprende de ambientes anaerobios ricos en materia orgánica. Es el denominado gas de los pantanos, si bien en los mismos se halla mezclado con CO_2 y N_2 . Puede ser recogido y quemarse con facilidad. El metano es el resultado de la actividad de un grupo muy especializado de bacterias que convierten los productos de fermentación de otros microorganismos anaerobios (especialmente CO_2 , H_2 , formiato y acetato) bien en metano o bien en metano y CO_2 .

Las bacterias metanogénicas han sido relativamente poco estudiadas debido a la dificultad que presenta su aislamiento y mantenimiento en cultivo puro. Son bacilos o cocos, móviles o inmóviles, grampositivos o gramnegativos, estrictamente anaerobios, mucho más sensibles al oxígeno y los agentes oxidantes, como el nitrato, que las demás bacterias anaerobias. No pueden utilizar como reductores ni los aminoácidos ni los azúcares. La metanogénesis es obligada, y para reducir el CO_2 a metano sólo pueden oxidar H_2 , formiato, metanol, metilaminas o acetato, y posiblemente el etanol y el propanol en casos muy especiales.

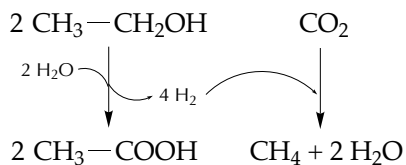
Se ha descrito una serie extensa de fermentaciones metánicas, pero no es seguro que las realice una sola bacteria del metano, sino más bien una asociación de una bacteria del metano con otra bacteria anaerobia. Algunos ejemplos clásicos de transformación de diferentes sustratos en metano son los siguientes (ver también Lámina 5):



Un cultivo metanogénico que había sido hace años uno de los más estudiados es el de *Methanobacillus omelianskii*, el cual lleva a cabo eficazmente la oxidación de alcoholes primarios y secundarios a metano con la reducción de CO_2 :

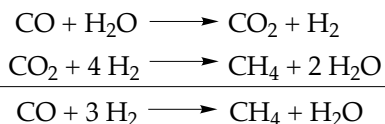


En realidad, el cultivo referido está formado por la asociación sinérgica de dos bacterias anaerobias que en conjunto realizan el siguiente metabolismo:

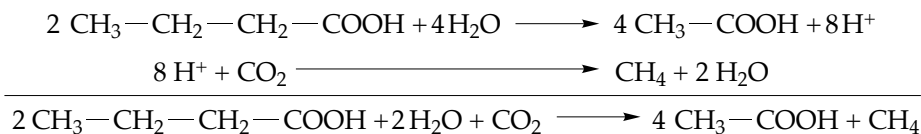


Una de ellas es una bacteria del metano, probablemente idéntica a *Methanobacterium formicicum* que forma metano con CO_2 e H_2 . La otra bacteria no está todavía identificada y es la que lleva a cabo la oxidación del etanol a acetato con formación de hidrógeno. Ninguna de las dos puede vivir a expensas de etanol y CO_2 . Sin la reducción de este último, la misma producción de H_2 inhibe el crecimiento de la bacteria asociada.

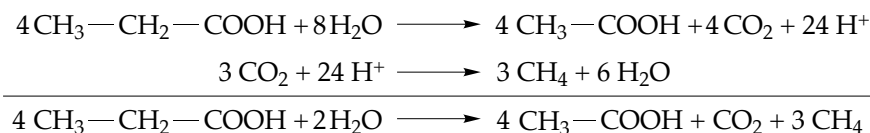
Methanobacterium formicicum oxida monóxido de carbono según la siguiente estequiometría:



Methanobacterium suboxidans oxida el ácido butírico:



Methanobacterium propionicum oxida el ácido propiónico:



En estos dos últimos casos puede tratarse de un fenómeno análogo a *Methanobacillus omelianskii*.

Las metanógenas son un grupo de arqueobacterias que desde el punto de vista bioquímico tienen la peculiaridad de presentar una serie de coenzimas que no se han encontrado en otras bacterias. El análisis el rRNA indica que las metanógenas se componen de tres grupos. El Grupo I incluiría *Methanobacterium* y *Methanobrevibacter*, el Grupo II *Metanococcus*, y el Grupo III los géneros *Methanospirillum* y *Methanosarcina*. Cada

**Parte C: PRODUCTOS FINALES DEL
CATABOLISMO**
Capítulo 11: METANO

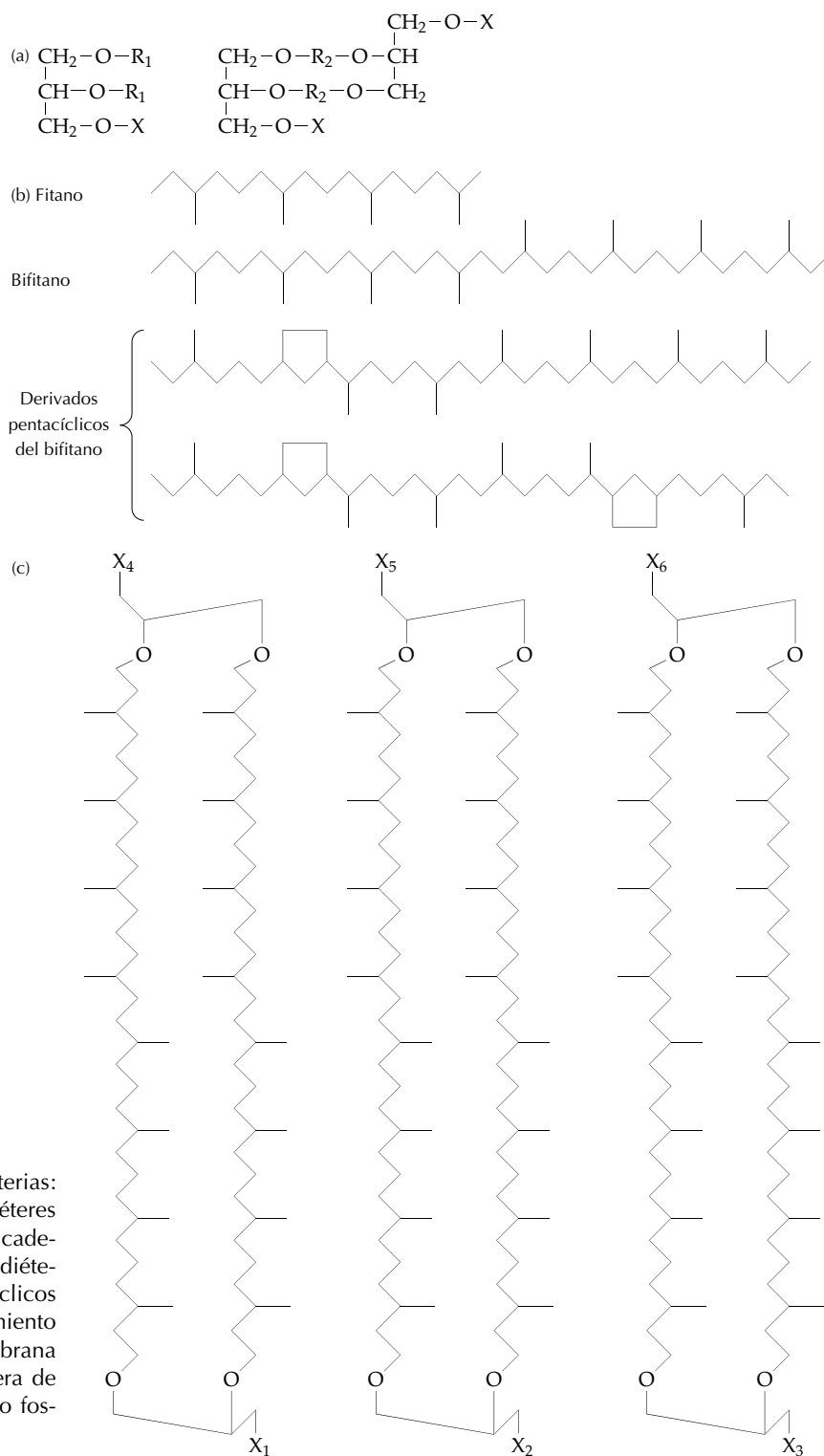


Figura 11.1 Lípidos de arqueobacterias: (a) estructura general de los diéteres (izquierda) y tetraéteres (derecha); (b) cadenas típicas de hidrocarburo: fitano (en diéteres), y bifitano y sus derivados pentacíclicos (en tetraéteres); (c) supuesto ordenamiento de tetraéteres para formar una membrana monocapa. X puede ser H o cualquiera de una variedad de derivados sacáridos o fosfato.

TABLA 11.1 Metanógenos.							
Grupo	Géneros representativos	% G + C	Lípidos característicos	Estructura de la pared celular	Gram	Motilidad	Sustratos utilizados
I	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i>	32–50 27–32	Diéteres C ₂₀ y Tetraéteres C ₄₀	Pseudomureína	+	–	H ₂ ; algunos usan formiato
II	<i>Methanococcus</i>	30–32	Diéteres C ₂₀	Proteína (trazas de glucosamina)	–	+	H ₂ ; formiato
III	<i>Methanospirillum</i>	45–47	Diéteres C ₂₀ y tetraéteres C ₄₀	Vaina proteica; material estructural desconocido	–	+	H ₂ ; formiato
	<i>Methanosarcina</i>	38–51	Diéteres C ₂₀	Heteropolisacárido	+	–	H ₂ ; formiato metanol; metilamina; acetato

grupo tiene además unas características peculiares de la pared celular y de la membrana, que, en todo caso, difieren considerablemente de las correspondientes a la generalidad de las bacterias (fig. 11.1 y tabla 11.1). Muchas bacterias metanógenas son termófilas y algunas, hipertermófilas. También se conocen otros miembros que son halófilos.

11.2 REDUCCIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO

Muchos metanógenos son capaces de reducir el anhídrido carbónico pasando sucesivamente a radicales formilo, metenilo, metileno y metilo, el cual se reduce a metano. La etapa más importante para la producción de energía es esta última. El suministro de electrones para las reacciones de reducción procede, según las especies, de la oxidación del hidrógeno, del formiato, del metanol, de metilaminas, del acetato y, en muy pocos casos, del metanol y del propanol. En los procesos referidos de reducción del CO₂ se han encontrado seis nuevos coenzimas (fig. 11.2).

La reducción del CO₂ tiene lugar sobre un radical C₁ unido a diferentes coenzimas según tiene lugar el proceso. El formilmetanofurano es el primer producto estable de la fijación de CO₂ (fig. 11.3, reacción 1). El grupo formilo es luego transferido a la tetrahidrometanopterina, una pterina exclusiva de los metanógenos, por acción de la formilmetanofurano: tetrahidrometanopterina formiltransferasa (fig. 11.3, reacción 2). Después el grupo formilo es convertido a un grupo metenilo por el enzima 5,10-meteniltetrahidrometanopterinciclohidrolasa (fig. 11.3, reacción 3). Entonces interviene el coenzima flavínico F₄₂₀ que suministra los electrones para la reducción del doble enlace del grupo metenilo para formar un grupo metileno, quedando el coenzima F₄₂₀ en su forma oxidada (fig. 11.3, reacción 4). Todas estas reacciones han sido puestas de manifiesto en preparados enzimáticos homogéneos.

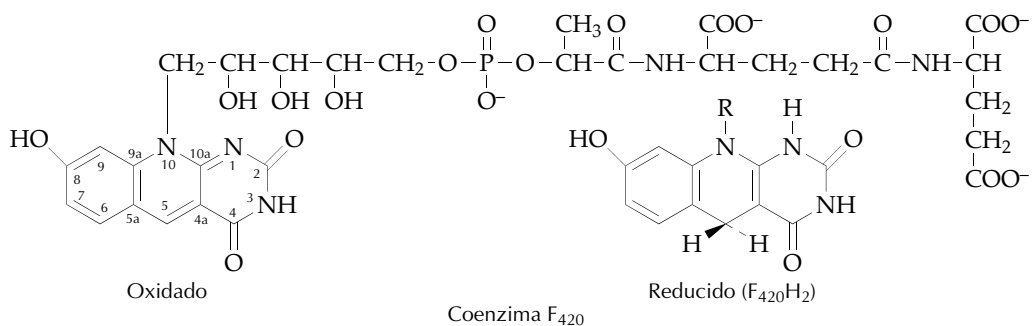


Figura 11.2 Coenzimas que participan en la metanogénesis.

11.2 REDUCCIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO

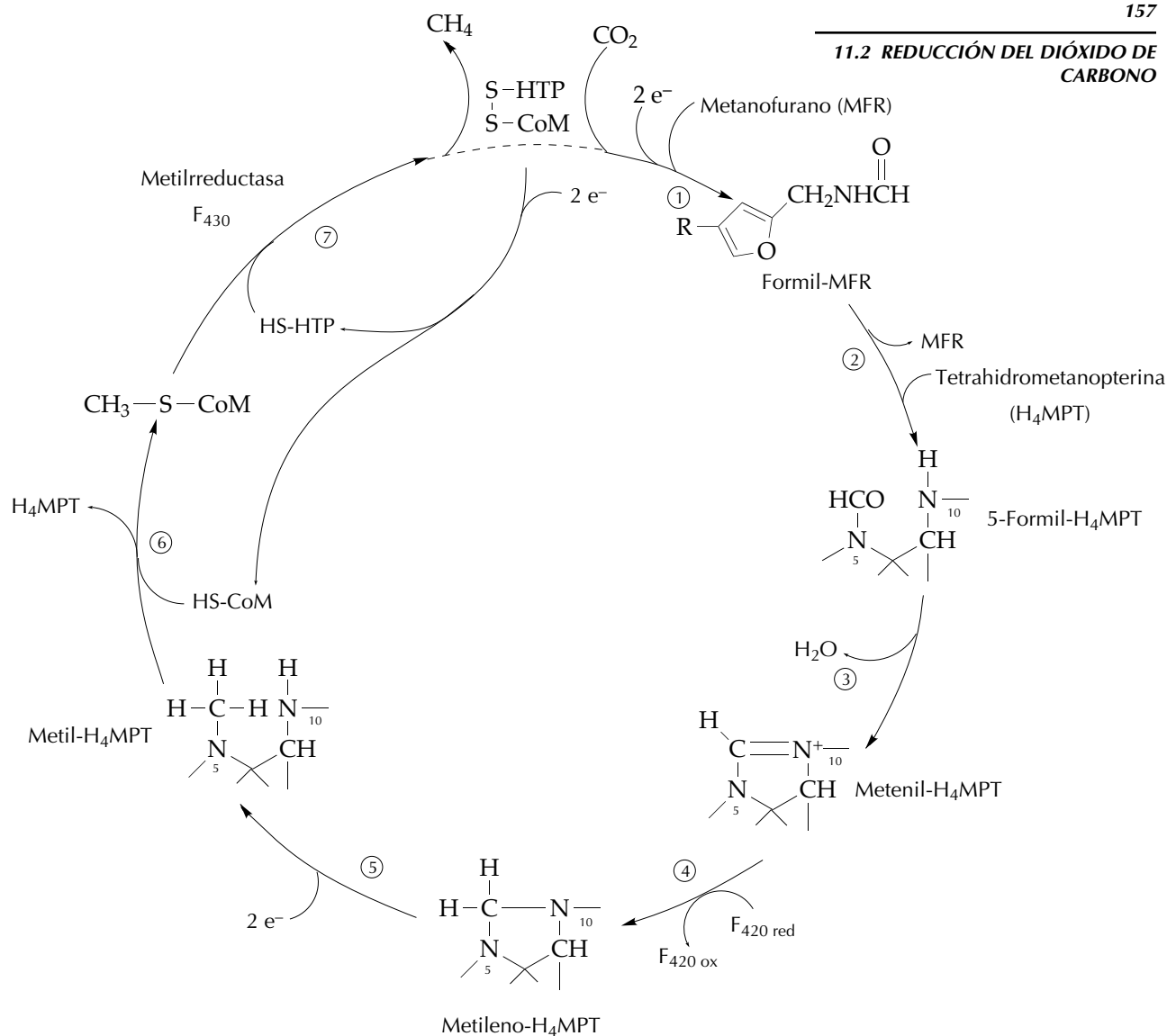


Figura 11.3 Ciclo de reducción del CO_2 a CH_4 en las bacterias metanogénicas. Las uniones de los grupos C_1 a los coenzimas se indican con el fragmento de este último que se localiza fácilmente en la figura 11.2. La unión entre las reacciones 7 y 1 es una parte del ciclo no completamente esclarecida.

El metileno- H_4MPT puede ser reducido químicamente a metil- H_4MPT y este último produce metano con extractos celulares de metanógenos. Las reacciones 5 y 6 de la figura 11.3 deben considerarse todavía especulativas, pero es seguro que está implicado el coenzima M (SH-CoM). Finalmente, la reacción 7 representa un esquema simplificado del proceso catalizado por la metil- CoM metilreductasa, que se comenta a continuación.

11.3 EL SISTEMA DE LA METILREDUCTASA

El coenzima M ($\text{HS}-\text{CoM}$, ácido 2-mercaptoetanosulfónico) fue el primero que se descubrió entre los nuevos cofactores que intervienen en la reducción del CO_2 a CH_4 . El material de partida fue *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Su forma metilada ($\text{CH}_3-\text{S}-\text{CoM}$) es el sustrato de la reacción 7 (fig. 10.3), llamado sistema del metilcoenzima M metilreductasa. Se trata de un complejo de fracciones proteicas y cofactores.

El sistema de la metilreductasa fue primeramente resuelto en tres fracciones denominadas A, B y C, de acuerdo con su orden de elución durante una cromatografía de intercambio iónico en condiciones anaerobias. A y C son fracciones proteicas, en tanto que B es el fosfato de 7-mercaptoetanoilteonina ($\text{HS}-\text{HTP}$) (fig. 11.3), una molécula dializable de pequeño tamaño. La fracción A ha sido resuelta en tres componentes proteicos (A_1 , A_2 y A_3) y FAD. Además, el ATP es necesario para restablecer la actividad, y la vitamina B_{12} y el coenzima F_{420} tienen efecto activador si bien no son imprescindibles. El sistema se inactiva aerobiamente y es extraordinariamente sensible al oxígeno.

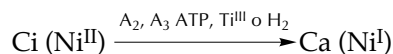
El componente C, la metilreductasa, consta de tres subunidades, y representa aproximadamente el 10% de la proteína celular, estando altamente conservada en todas las bacterias metanógenas. Todas las preparaciones homogéneas del componente C presentan un color amarillo característico que tiene un máximo de absorción a 421 nm y que decae paulatinamente hasta 440 nm. El componente cromofórico ha sido aislado; es una porfirina altamente reducida y es el primer componente tetrapirrólico unido a níquel que ha sido descrito en los seres vivos. Presenta el máximo de absorción a 430 nm, por lo que se le ha llamado factor F_{430} . La diferencia de longitud de onda entre los picos 421 y 430 se debe a las interacciones estructurales entre el grupo prostético y la proteína del componente C. Hay dos moléculas de F_{430} unidas a cada molécula del componente C, ambas funcionales. Adicionalmente, el componente C está unido a dos moléculas de coenzima M, que se incorporan al mismo únicamente bajo la forma de $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CoM}$. Finalmente, el componente C también está unido a dos $\text{HS}-\text{HTP}$.

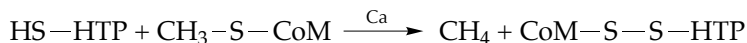
La reducción de $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CoM}$ con H_2 requiere, además del componente C, las fracciones proteicas A_1 , A_2 y A_3 , anteriormente mencionadas. Probablemente, A_1 es una hidrogenasa. El dador de electrones para la reducción del $\text{CH}_3-\text{S}-\text{CoM}$ es el $\text{HS}-\text{HTP}$. El heterodisulfuro de $\text{HS}-\text{HTP}$ y $\text{HS}-\text{CoM}$ ha sido identificado como el producto resultante de la reacción:



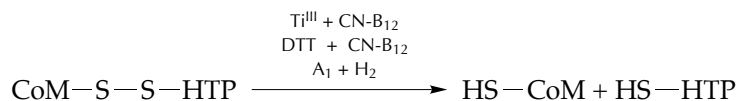
Un modelo que resume el conocimiento actual del sistema de la metilreductasa estaría constituido por tres reacciones:

- a) Reacción I. Conversión de la metilreductasa inactiva (Ci) a su estado activo (Ca) por reducción de Ni^{II} a Ni^{I}





- c) Reacción III. Regeneración de HS-CoM y HS-HTP por reducción del heterodisulfuro. Los electrones pueden ser proporcionados bien por el citrato de titanio III, bien por el ditiotreititol (en ambos casos en presencia de B₁₂), o bien una reacción enzimática catalizada por la proteína A₁ en presencia de H₂:



La relación del CH₃-S-CoM con la reducción del CO₂ a CH₄ fue descubierta por Gunsalus en la década de los setenta, pero el descubrimiento posterior del heterodisulfuro ha constituido un progreso importante para la comprensión de la reacción 7 y la confirmación de la vía cíclica de la figura 11.3. Sin embargo, la misma formación del formilmetanofurano es todavía poco conocida.

11.4 LA PRODUCCIÓN DE ENERGÍA

La reducción de CH₃-S-CoM por H₂ es un proceso exoergónico ($\Delta G'_0 = -85$ kJ) y es la fuente de energía para la síntesis de ATP. En *Methanosarcina barkeri* la metanogénesis a partir de metanol e H₂ tanto como la que tiene lugar a partir de acetato están vinculadas a la síntesis de ATP por una bomba de protones, indicando un mecanismo quimiosmótico para la síntesis de ATP. Por analogía, se piensa que este mecanismo es también aplicable a otros metanógenos. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el componente C se encuentra asociado a la membrana citoplasmática constituyendo un orgánulo denominado metanorreductosoma, lo que apoya al modelo quimiosmótico como el más probable para las bacterias metanogénicas. Por otra parte, ya ha sido señalado (capítulo 8) que la generación de ATP puede tener muchos aspectos comunes en acetógenas y metanógenas.

BIBLIOGRAFÍA

- KANDLER, O. Archeobacteria. New York. Gustav Fischer. 1982.
 ROUVIÈRE, P. E. y WOLFE, R. S. Novel Biochemistry of Methanogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 263, 17, pp. 7913-7916. 1988.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

12.1	EL GAS SILVESTRE	162
12.2	EL CO ₂ COMO CATABOLITO	163
12.3	EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍlicos (CAT)	163
12.4	SISTEMAS ENZIMÁTICOS DEL CAT	164
12.5	ESTEQUIOMETRÍA DEL CICLO	167
12.6	REACCIONES ANAPLERÓTICAS	168
12.7	CICLO DEL ÁCIDO GLIOXÍlico	170
	BIBLIOGRAFÍA	171

12.1 EL GAS SILVESTRE

A principios del siglo XVII, Van Helmont consiguió demostrar que en la “fermentación” se produce un “aire” idéntico al que se origina cuando se quema carbón de leña y como el que puede hacer irrespirable la atmósfera de las bodegas. Para este tipo particular de “aire” inventó el nombre de gas, que la ciencia posteriormente adoptaría definitivamente. Van Helmont estableció el concepto de que hay diferentes tipos de gases, pero sólo demostró plenamente la existencia del gas que denominó “gas silvestre”, que después se denominaría “gas fijo” y, más tarde, anhídrido carbónico, la molécula de carbono más oxidada (CO_2). El término fermentación alude originariamente a un desprendimiento espontáneo de gas semejante a la ebullición, pero que se lleva a cabo a temperatura ambiente. Fue primeramente aplicado al mosto de la uva, en el cual se produce el vino como resultado del proceso fermentativo.

En el siglo XVIII, Black demostró cuantitativamente que el gas desprendido por la piedra caliza cuando se trata con un ácido, puede ser reabsorbido por agua de cal, produciendo el material original con una ganancia de peso igual a la pérdida que primitivamente se había producido. Con ello se puso de manifiesto que un gas podía formar parte de un sólido, de lo que viene la denominación de “gas fijo”. Más tarde, a finales del siglo XVIII, Lavoisier demostró que este gas es el producto de combustión de la materia orgánica y que los seres vivos hacen la misma transformación en el denominado proceso respiratorio. Ingenhousz y Senebier, hacia la misma época, dejaron establecida la fotosíntesis vegetal, en la que se lleva a cabo justamente el proceso contrario a la respiración animal.

Los trabajos referidos de Black constituyen la base del desarrollo del análisis orgánico llevado a cabo más tarde por Liebig. Además, pudo comprobarse que muchas reacciones de la química orgánica consisten en un desprendimiento o una fijación de anhídrido carbónico.

En los capítulos precedentes ha sido reseñado que el CO_2 acompaña a muchos catabolitos microbianos característicos, si bien también puede ser utilizado para la formación de muchos productos finales del catabolismo, entre los que sobresalen el acetato y el metano. Los microorganismos que crecen aerobiamente pueden mineralizar diferentes sustratos orgánicos, produciéndose CO_2 como único catabolito. Sin embargo, también en estas condiciones puede formarse CO_2 junto a productos orgánicos parcialmente oxidados, e incluso puede ser inexistente en procesos estrictamente aerobios, como en la mal llamada fermentación acética. De hecho, el CO_2 es un catabolito habitual resultante del desarrollo microbiano sobre materia orgánica, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Si el balance global de materia entre el crecimiento y el medio puede expresarse como:



siendo X la biomasa ($X > X_0$), en muchos casos A es CO₂. Sin embargo, en otros el anhídrido carbónico es B. De esto se deduce que el CO₂ puede ser tanto el producto final oxidado como el oxidante inorgánico y, en este último caso, tanto para la producción de energía como para el suministro de carbono para el aumento de biomasa.

12.2 EL CO₂ COMO CATABOLITO

El CO₂ puede formarse en muchas reacciones de descarboxilación. En los procesos anaerobios se genera mayoritariamente en la descarboxilación del piruvato (capítulo 8.3) o del ácido 6-fosfogluconico (apartado 5.9.1). En las bacterias aerobias, el CO₂ también puede derivarse de la reacción catalizada por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, pero principalmente se forma de la mineralización del acetyl-CoA por la vía cíclica conocida con el nombre de ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), ciclo de Krebs o también ciclo del ácido cítrico. Los enzimas responsables de las dos descarboxilaciones que se dan a lo largo del ciclo son la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

12.3 EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍlicos (CAT)

El CAT es la vía metabólica más importante para la generación de ATP en las bacterias aerobias. La oxidación completa de una molécula de acetato a CO₂ genera tres moléculas de NADH + H⁺, una molécula de ATP y un par de e⁻. Estos últimos entran en las cadenas respiratorias directamente, reduciendo el FAD. Los nucleótidos de la piridina reducidos se reoxidan también a través de las cadenas respiratorias.

En las bacterias anaerobias se encuentra la mayor parte de los enzimas del CAT, pero éstos no tienen la capacidad de transformar el α -cetoglutarato en ácido succínico. El ciclo queda interrumpido en este punto y no es funcional como sistema terminal de oxidación.

Las bacterias autótrofas obligadas tampoco tienen un CAT funcional. Carecen de α -cetoglutarato deshidrogenasa y tienen niveles muy bajos de las deshidrogenasas succínica y málica.

El CAT tampoco es funcional en los metilótrofos obligados que tienen sistemas membranosos transversales al eje mayor como *Methylomonas*, *Methylobacter* y *Methylococcus*.

Además de sistema terminal de oxidación, el CAT tiene una importante función biosintética. A partir del ácido α -cetoglutarico se forma ácido glutámico, que es un compuesto clave para la biosíntesis de otros aminoácidos y para la asimilación de NH₃. El ácido fumárico es también el precursor del ácido aspártico y los aminoácidos que se derivan de él. El oxalacetato también es precursor del aspartato. Del succinil-CoA se derivan también las porfirinas, la lisina y la metionina (fig. 12.1).

Catabólicamente, el CAT funciona alimentándose exclusivamente de acetato activo. Sin embargo, en el desarrollo bacteriano tiene lugar simultáneamente su función biosintética. Como consecuencia de ello sufre un drenaje de varios intermediarios. La continuidad del ciclo

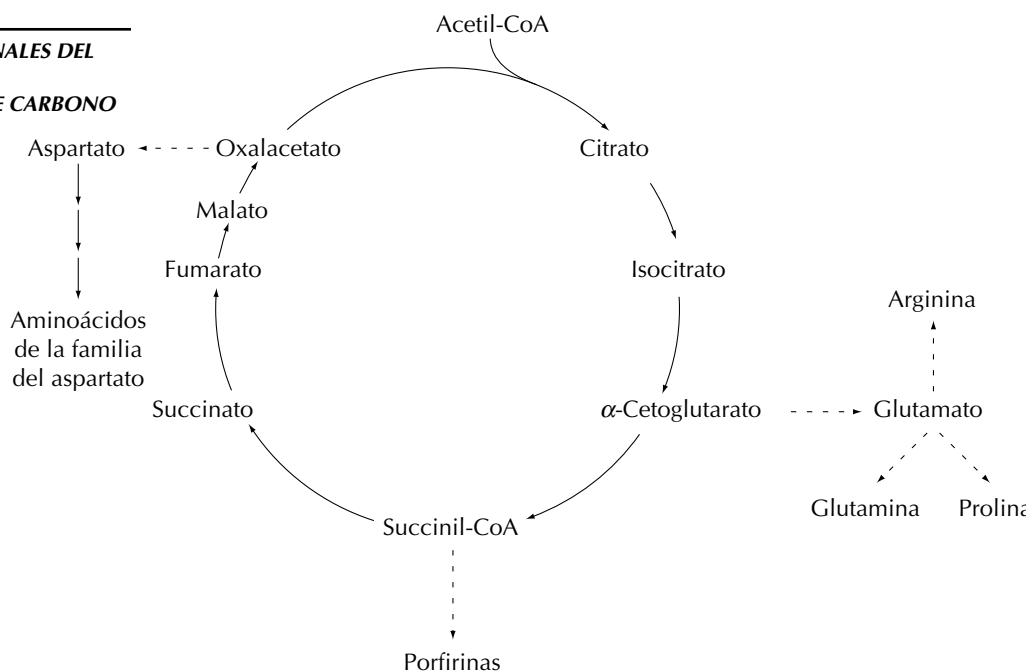


Figura 12.1 Metabolitos del CAT que son precursores biosintéticos. En trazo continuo se representan reacciones del ciclo y en trazo discontinuo reacciones biosintéticas.

metabólico puede exigir la formación de oxalacetato u otros intermediarios con independencia del suministro de acetato activo.

Cuando las bacterias crecen aerobiamente sobre hexosas y pentosas, el relleno de los intermediarios del CAT se lleva a cabo por las llamadas *reacciones anapleróticas*. Estas juegan un importante papel regulador entre el metabolismo biosintético y el energético. Las fuentes de oxalacetato son, de hecho, reacciones anapleróticas. Sin embargo, se hace referencia a ellas en un sentido más estricto cuando incluyen la asimilación de CO_2 para formar intermediarios C_4 del CAT.

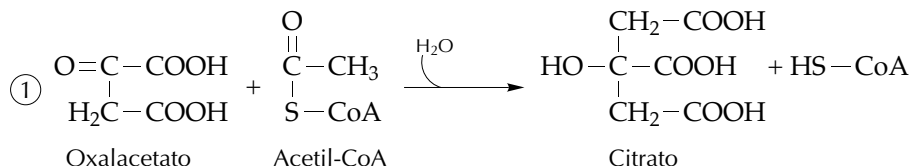
Cuando la fuente de carbono está constituida por ácidos grasos de cadena corta o por acetato, el suministro de oxalacetato se lleva a cabo por la vía del ácido glioxílico (ver apartado 12.7).

En algunas bacterias anaerobias el sistema que suministra energía comprende varias reacciones del CAT. Esto es lo que ocurre en las bacterias del ácido propiónico y constituye un indicio del origen filogenético del CAT.

12.4 SISTEMAS ENZIMÁTICOS DEL CAT

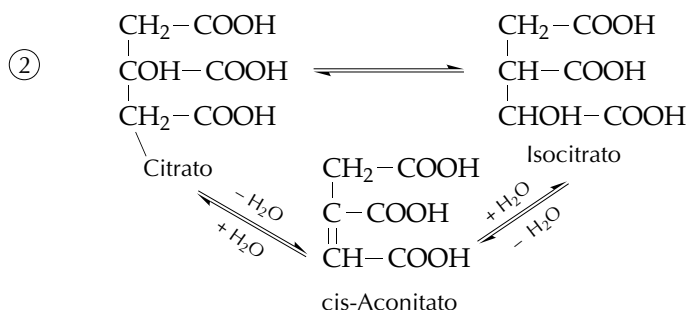
En el CAT existen siete sistemas enzimáticos. En la figura 12.1 se representa una visión de conjunto de las reacciones del ciclo. Todos los sistemas enzimáticos son reversibles excepto la oxidación del α -cetoglutarato, la cual requiere TPP, ácido lipoico, CoA, FAD y NAD^+ . Una excepción la constituye *Chlorobium thiosulfatophilum*, donde se ha encontrado una reacción de carboxilación del succinil-CoA dependiente de la ferredoxina, unida a una 2-oxoglutarato sintasa.

El oxalacetato es el compuesto clave del CAT porque es el aceptor de acetil-CoA. Esta reacción está catalizada por la citrato sintasa.



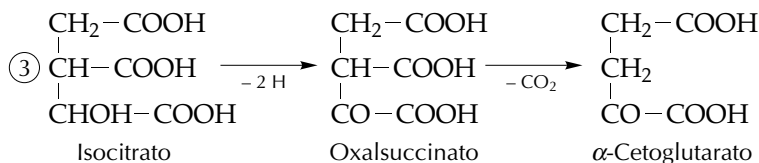
Este sistema es inhibido por el α -cetoglutarato, por el $\text{NADH} + \text{H}^+$, ATP y el succinil-CoA.

La segunda etapa está constituida por unas reacciones de hidratación catalizadas por la enzima aconitato hidratasa.



Se forma una mezcla en equilibrio de ácido cítrico, cis-aconítico e isocítrico. Se conocen varias aconitasas. Se requiere Fe^{2+} .

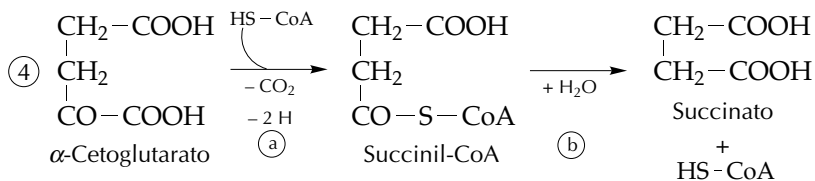
El tercer sistema es el de la isocitrato deshidrogenasa (ICDHasa):



No se ha demostrado la existencia de una oxalsuccínico descarboxilasa por lo que el mismo enzima debe catalizar las dos reacciones.

Se conocen varias ICDHasas. El ATP y el GTP pueden inhibir este sistema. Algunos microorganismos poseen una ICDHasa dependiente de NADP^+ ; en otros es dependiente de NAD^+ , pudiéndose hallar ambos tipos en la misma bacteria. Se requiere la presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Esta reacción constituye un punto clave del CAT, puesto que por el isocitrato hay un *bypass* al ciclo del ácido glioxílico y por el α -cetoglutarato a una reacción de drenaje. En esta reacción se libera el primer CO_2 de los dos que dará la mineralización del acetato activo.

La cuarta reacción está constituida por el sistema de la α -cetoglutarato deshidrogenasa:



El sistema de la α -cetoglutarato deshidrogenasa comprende un complejo de enzimas que llevan a cabo una descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato semejante a la del piruvato.

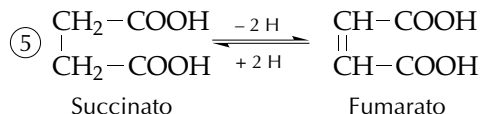
En esta reacción se produce la segunda molécula de CO_2 . Participan el NAD^+ , Mg^{2+} , el ácido lipoico y el TPP en (a) y el ADP y P_i en (b). Se origina ATP. El FAD interviene para la regeneración del lipoico:



Dihidrolipoildeshidrogenasa

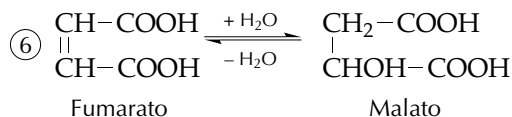
El sistema de la α -cetoglutarato deshidrogenasa juega un importante papel regulador en las bacterias anaerobias facultativas. Es extraordinariamente sensible a la deficiencia de oxígeno y está sujeto a represión por la glucosa. En condiciones anaerobias, el CAT deja de existir como vía metabólica cíclica y la formación de α -cetoglutarato tiene un sentido puramente biosintético; el succinato para las necesidades biosintéticas se forma a partir del oxalacetato por lo que se denomina un brazo reductor del CAT.

La quinta etapa es la deshidrogenación del succinato, catalizada por la succinato deshidrogenasa.

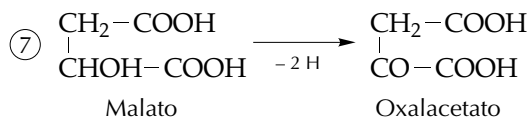


La succinato deshidrogenasa toma los dos e^- y queda en estado reducido. Su reoxidación requiere FAD. También se requiere Fe^{2+} . Es el único enzima del CAT que se encuentra en la fracción particulada. La succinato deshidrogenasa es inhibida por el oxalacetato.

La sexta reacción es la formación de malato por la fumarato hidratasa:



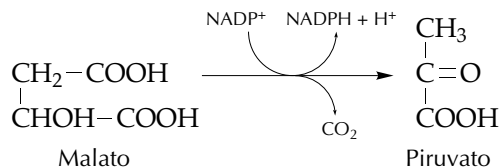
La reacción final del CAT es la deshidrogenación del malato a oxalacetato, catalizada por la malato deshidrogenasa que requiere NAD^+ :



En *E. coli*, la malato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ es soluble, pero en *Azotobacter agilis* y *Micrococcus luteus* hay, además, un sistema particulado. La primera puede estar ausente en *Serratia*

marcescens, *Pseudomonas fluorescens* y *P. ovalis*, que tienen el sistema particulado ligado directamente al O₂. Este sistema también puede hallarse en *Lactobacillus*.

En *E. coli* se encuentra una malato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ constitutiva y, además, otra dependiente de NADP⁺ inducible. Esta última cataliza la reacción:



Malato deshidrogenasa (descarboxilante (NADP⁺))

Este enzima es inhibido por el oxalacetato y el acetil-CoA. También es inhibido por el AMP cíclico. Al parecer tiene una función biosintética en relación con la formación de ácidos grasos. En *Micrococcus sp.* es la única deshidrogenasa del malato presente y juega un importante papel en la carboxilación del ácido pirúvico a malato.

En *Chromatium* no hay ninguno de los dos sistemas antes señalados de deshidrogenación del málico. Sin embargo, el malato se convierte en oxalacetato por una descarboxilación a piruvato seguida de una recarboxilación del piruvato a oxalacetato.

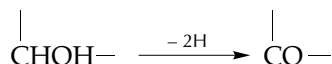
12.5 ESTEQUIOMETRÍA DEL CICLO

La reacción neta del ciclo del ácido cítrico es:

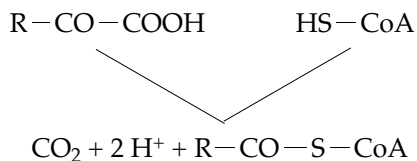


Comprende dos descarboxilaciones sucesivas en los sistemas de la isocitrato deshidrogenasa (3) y α-cetoglutarato deshidrogenasa (4) (fig. 12.2).

Comprende cuatro deshidrogenaciones. Las de los sistemas 3 y 7 son del tipo:



La de la cuarta reacción es una descarboxilación oxidativa con coenzima A:



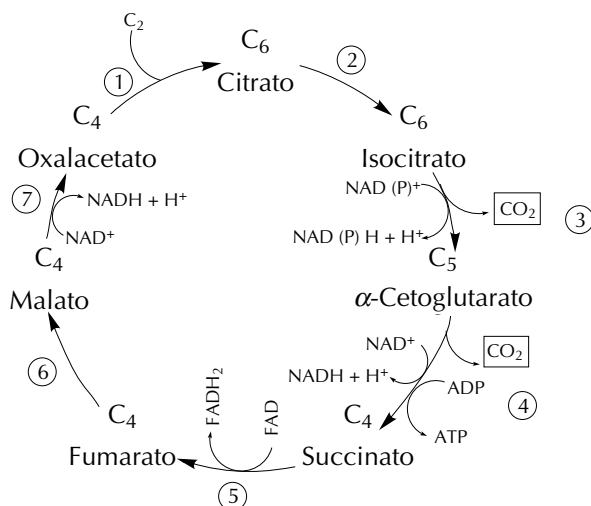
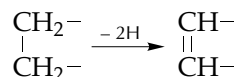


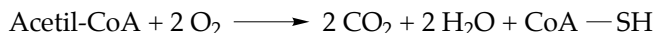
Figura 12.2 Reacciones de descarboxilación y de oxidorreducción del CAT. Los números encerrados dentro de un círculo hacen referencia a los sistemas enzimáticos que se explican en el texto.

En la reacción quinta:



La reacción cuatro es análoga a la descarboxilación del piruvato y la 6 y 7 análogas, respectivamente, a la de la crotonasa y β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de la β -oxidación de los ácidos grasos.

El CAT tiene un sentido anfibólico. Como sistema suministrador de energía está unido al O_2 a través de las cadenas respiratorias:



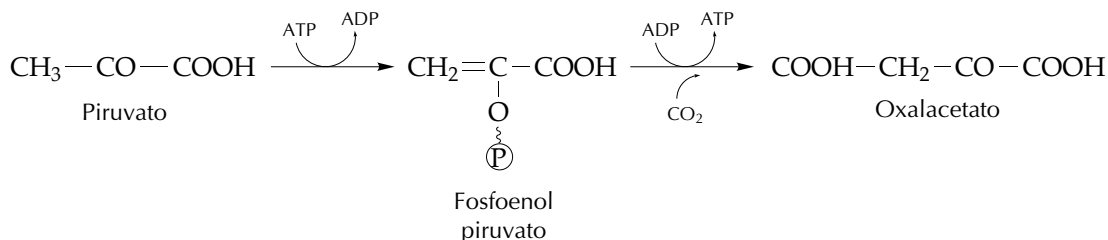
12.6 REACCIONES ANAPLERÓTICAS

En la oxidación del piruvato se libera una molécula de CO_2 y por lo tanto sólo dos átomos de C ingresarán en el CAT. El drenaje de α -cetoglutarato, succinato y oxalacetato con fines biosintéticos produce una disipación importante de intermediarios que puede agotar el ciclo. Hay dos sistemas para impedir que esto ocurra:

- Las reacciones anapleróticas, que generan compuestos C_4 por fijación de CO_2 . Estas reacciones tienen lugar principalmente cuando se utilizan azúcares como sustratos (ver Lámina 6).
- El relleno de compuestos C_4 a partir del metabolismo de compuestos C_2 por la vía del glioxilato (ver Lámina 6).

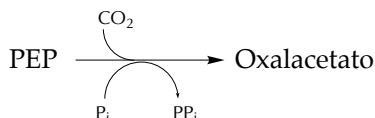
En bacterias se han caracterizado cinco enzimas para las reacciones anapleróticas:

1. La llamada reacción de Wood-Werkman, en la cual el ácido pirúvico es fosforilado a fosfoenol pirúvico con ATP y la piruvato fosfotransferasa. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) forma oxalacetato, requiriéndose ADP para formar ATP.

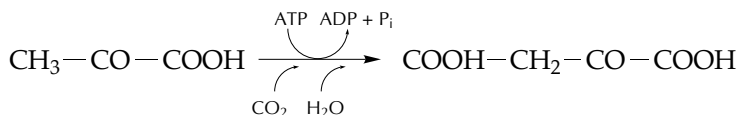


El ácido fosfoenolpirúvico es el verdadero aceptor de CO_2 y el ADP o el IDP funcionan como aceptores de fosfato.

2. Hay una reacción muy parecida a la anterior catalizada por una fosfoenol piruvato carboxilasa que requiere bicarbonato y fosfato inorgánico, el cual es convertido en pirofosfato:

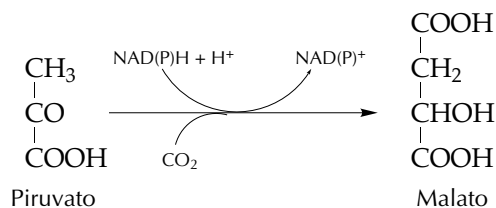


3. Una piruvato carboxilasa dependiente de la biotina que produce oxalacetato desde el piruvato con ATP:



Hay un enzima diferente en los mamíferos que lleva a cabo esta reacción con acetil-CoA y no es dependiente de la biotina.

4. La reacción de los enzimas málicos (malato deshidrogenasa descarboxilante (NAD^+/NADH)) que catalizan la carboxilación reductora del piruvato a malato, utilizando bien $\text{NADPH} + \text{H}^+$ o bien $\text{NADH} + \text{H}^+$:



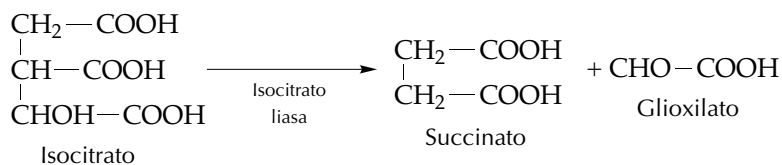
No hay duda de que no todos estos enzimas se hallan presentes a la vez en el mismo microorganismo.

12.7 CICLO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO

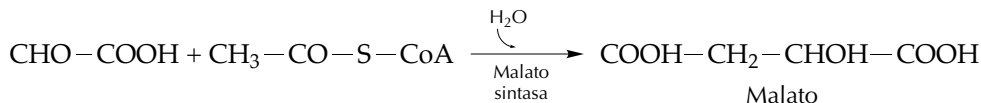
Es la fuente más importante de oxalacetato cuando la bacteria se alimenta exclusivamente de fracciones de dos átomos de carbono. Esta vía implica dos enzimas: la isocitrato liasa y la malato sintasa.

Comprende una condensación de acetil-CoA con ácido glioxílico que da ácido málico con intervención del enzima malato sintasa. El malato es subsiguientemente oxidado a oxalacetato.

La isocitrato liasa cataliza el desdoblamiento del isocitrato en succinato y glioxilato:

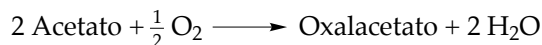


El glioxilato condensa entonces con acetil-CoA para formar malato:



El malato es subsiguientemente oxidado a oxalacetato (fig. 12.3).

La combinación de estas dos reacciones constituye un *bypass* de las reacciones de descarboxilación del CAT y un proceso cíclico a través del cual se metabolizan dos grupos acetilo a oxalacetato:



El ciclo del glioxilato regula el drenaje del CAT y adicionalmente proporciona una fuente de ácido pirúvico para la gluconeogénesis como consecuencia de la oxidación de ácidos C₄ (ver Lámina 6).

Los enzimas del ciclo se sintetizan durante el crecimiento sobre acetato o sus precursores metabólicos inmediatos. La mineralización tiene lugar cuando el isocitrato sigue el ciclo del CAT y no es el sustrato de la isocitrato liasa.

El funcionamiento del ciclo del ácido glioxílico se halla sujeto a un control muy estricto, tanto a nivel de actividad como a nivel de síntesis de sus enzimas. Los trabajos ya clásicos de Kornberg han demostrado que el control fino de la actividad se localiza en la isocitrato liasa, siendo ésta inhibida totalmente por bajos niveles de PEP. La síntesis de este enzima se reprime a nivel de transcripción pudiendo ser el correpresor el PEP, el piruvato o uno de sus derivados metabólicos.

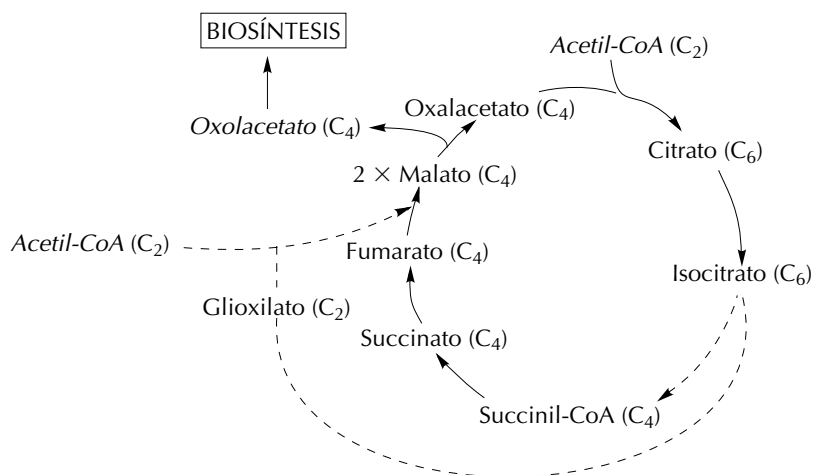


Figura 12.3 Ciclo del ácido glioxílico. Obsérvese cómo se generan moléculas C₄ a partir de acetil-CoA (ver en el texto los detalles de las reacciones). La condensación de oxalacetato con acetil-CoA sigue algunas reacciones del ciclo de Krebs. La isocitrato liasa desdobla el isocitrato, produciendo succinil-CoA, que se transforma en oxalacetato siguiendo las reacciones del CAT. Por su parte, el glioxilato condensa con una segunda molécula de acetil-CoA, generando malato. El resultado del proceso es la transformación neta de dos moléculas de acetil-CoA en una de oxalacetato, que queda disponible para finalidades biosintéticas. En trazo continuo se representan las reacciones del CAT, y en trazo discontinuo las del ciclo del glioxilato.

BIBLIOGRAFÍA

- KORNBERG, H. L. The role and control of the glioxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 99, 1-11, 1966.
- LOWENSTEIN, J. M. Citric acid cycle. Marcel Dekker, Inc. New York, 1969.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

P_{ARTE} D

OXIDANTES INORGÁNICOS

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

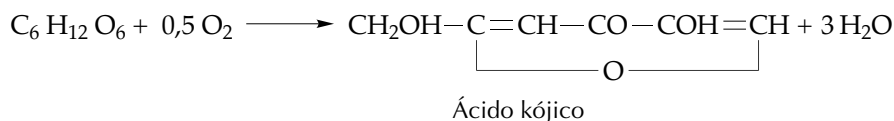
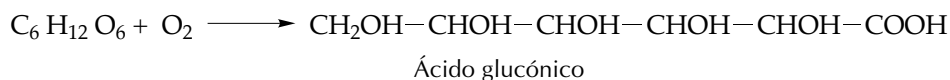
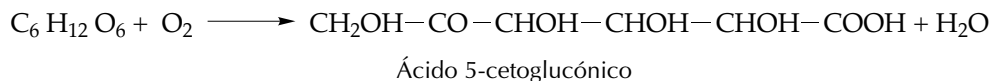
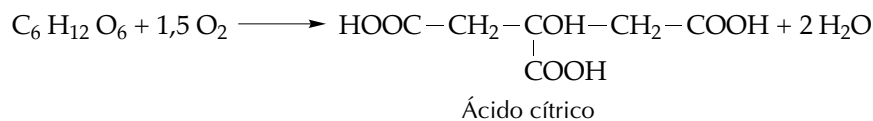
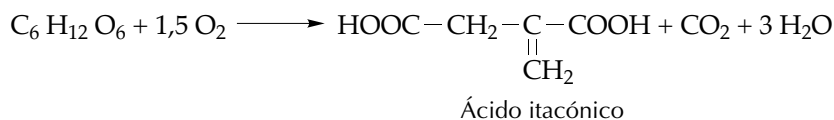
13.1	RESPIRACIÓN AEROBIA	176
13.2	ASIMILACIÓN DE O ₂	177
13.3	OXIDASAS Y PEROXIDASAS	178
13.4	SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CITOCROMO <i>c</i> PEROXIDASA	179
13.5	LAS FLAVOPROTEÍNAS AUTOOXIDABLES	179
13.6	BALANCE ENERGÉTICO DE LAS REACCIONES OXIDATIVAS	180
13.7	LA CADENA RESPIRATORIA	181
13.8	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	188
	BIBLIOGRAFÍA	189

13.1 RESPIRACIÓN AEROBIA

El concepto de respiración aerobia se deriva del clásico proceso respiratorio de Lavoisier, según el cual los organismos vivos consumen oxígeno de un modo análogo a la combustión de la materia orgánica. De hecho, muchos microorganismos llevan a cabo dicho proceso en el cual el oxígeno molecular se convierte en agua en tanto que algún sustrato orgánico desaparece del medio y todo su carbono se recupera como CO_2 . El desarrollo de muchos microorganismos en cultivo puro en un medio con glucosa se realiza de acuerdo con la estequiometría:



Todo el hidrógeno de la glucosa ha pasado al oxígeno para formar agua. Sin embargo, ya ha sido referido que las bacterias del ácido acético pueden reducir el O_2 a H_2O sin formar CO_2 (capítulo 5). En muchos hongos microscópicos se lleva a cabo una degradación parcial de la glucosa análoga a la oxidación del etanol, con la acumulación de productos orgánicos característicos que están parcialmente oxidados y son diferentes del acetato. Algunos ejemplos ilustrativos pueden ser los siguientes:



Por lo tanto, es consistente considerar que la reducción del oxígeno en la respiración puede llevar tanto a la mineralización como a la degradación parcial de los sustratos orgánicos.

El oxígeno también puede reducirse biológicamente con reductores inorgánicos como H₂, compuestos reducidos de nitrógeno o con compuestos reducidos de azufre o hierro. Esto tiene lugar en el desarrollo de bacterias que pueden crecer en medios minerales utilizando CO₂ como única fuente de carbono (capítulos 20, 21 y 22).

De hecho, el mismo proceso respiratorio puede considerarse independiente del O₂, porque existen microorganismos que pueden utilizar en su lugar NO₃⁻, SO₄²⁻ o CO₂. De ahí que se distinga una respiración aerobia de otra anaerobia.

En todo caso, la respiración está ligada a un proceso generador de energía para el crecimiento. No obstante, la reducción biológica del O₂ no siempre va unida a la producción de ATP.

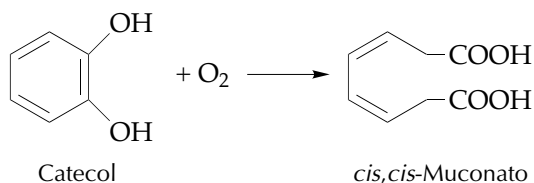
La fosforilación que se lleva a cabo con la reducción de oxígeno y el sistema de transposición de protones y la reacción ATPásica es una característica obligada de algunas bacterias estrictamente aerobias como *Azotobacter*, *Caulobacter* y muchas *Pseudomonas*. Sin embargo, ya hemos visto que este mismo sistema puede funcionar anaerobianamente en la reducción del CO₂ a ácido acético o a metano, y también tiene lugar en la reducción de NO₃⁻ y de SO₄²⁻.

13.2 ASIMILACIÓN DE O₂

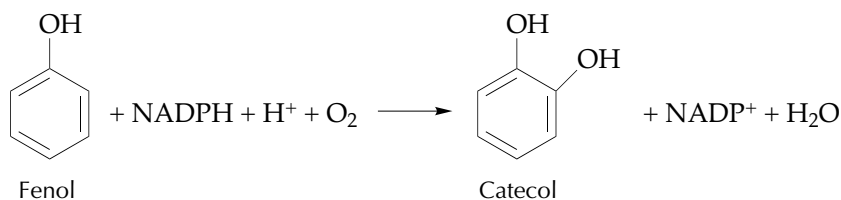
La asimilación directa del oxígeno molecular se lleva a cabo a través de las oxigenasas. Hay dos tipos de oxigenasas:

1. $A + O_2 \longrightarrow AO_2$ (dioxigenasas)
2. $AH + 2 H^+ + O_2 \longrightarrow AOH + H_2O$ (monooxigenasas)

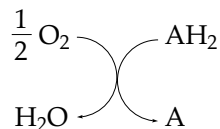
Un ejemplo característico del primer tipo lo constituye la oxidación del catecol a ácido *cis,cis*-mucónico por la pirocatecasa:



Un ejemplo de monooxigenasa es el de la fenol 2-monooxigenasa que convierte el fenol en catecol:



Las monooxigenasas se llaman también oxidasas de función mixta, porque sólo la mitad de la molécula de oxígeno se incorpora a un compuesto orgánico mientras la otra mitad forma agua. En cambio, la reacción oxidásica.

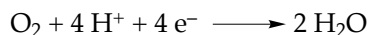


supone la reducción completa del O_2 a H_2O .

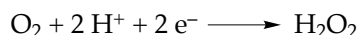
Las oxigenasas son muy importantes para la utilización de determinados sustratos orgánicos, especialmente compuestos aromáticos, así como en algunas vías biosintéticas, pero no juegan ningún papel en el sistema productor de energía.

13.3 OXIDASAS Y PEROXIDASAS

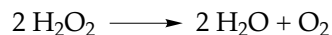
La citocromo oxidasa cataliza la reacción irreversible:



Sin embargo, algunas citocromo oxidasas transfieren sólo un par de átomos de hidrógeno al oxígeno molecular, formando peróxido de hidrógeno:



El H_2O_2 es muy tóxico para las bacterias si no se destruye rápidamente. Esto puede llevarse a cabo por la catalasa:



La catalasa es un enzima hemínico que se encuentra en la mayoría de los microorganismos aerobios. Ya se ha descrito (capítulo 6) que en las bacterias del ácido láctico no hay enzimas hemínicos, pero algunos miembros del grupo tienen pseudocatalasas, enzimas no hemínicas que catalizan la misma reacción. La prueba de la catalasa es inespecífica y se basa en el desprendimiento de oxígeno gaseoso. La prueba de la bencidina es específica del grupo hemo y puede ser utilizada complementariamente para diferenciar los falsos catalasa positivos.

El peróxido de hidrógeno puede ser igualmente destruido por las peroxidasas, enzimas que catalizan la reacción:



En este caso no se desprende oxígeno gaseoso. En realidad, la catalasa es un tipo particular de peroxidasa en la que el H_2O_2 puede

actuar de oxidante y de reductor. En otras peroxidadas el reductor suele ser $\text{NADH} + \text{H}^+$, $\text{NADPH} + \text{H}^+$, glutatión o citocromo *c*.

Además del propio peróxido de hidrógeno, la catalasa puede realizar una reacción peroxidásica con otros dadores de hidrógeno, como el etanol, el metanol, el formaldehído, el formiato y el nitrito. La reacción catalásica o peroxidásica tiene una primera etapa en común en la que se forma un complejo enzima- H_2O_2 . En un exceso de H_2O_2 tiene lugar la primera reacción con formación de O_2 . Para concentraciones débiles de H_2O_2 se lleva a cabo la reacción peroxidásica con la participación de un tipo u otro de reductores.

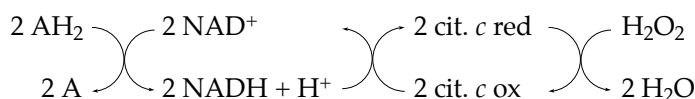
13.4 SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CITOCROMO *c* PEROXIDASA

La molécula de oxígeno no es tóxica por sí misma, pero puede dar lugar a productos parcialmente reducidos altamente reactivos y tóxicos. La reducción con un solo electrón da lugar a la formación del radical superóxido O_2^- , y la reducción con dos electrones al peróxido de hidrógeno. Con la citocromo-oxidasa se toman cuatro electrones formándose directamente agua, sin pasar por intermediarios menos reducidos.

Los iones superóxido son transformados en H_2O_2 por el enzima superóxido dismutasa, descubierto por McLeod y Friedovich en 1969.

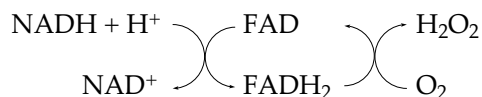


Lenhoff y Kaplan descubrieron una citocromo *c* peroxidasa en *Pseudomonas fluorescens* que cataliza la reoxidación del citocromo *c* con agua oxigenada. En esta bacteria no hay citocromo *a* ni citocromo oxidasa, por lo que el verdadero aceptor final de electrones de la cadena respiratoria es el agua oxigenada:



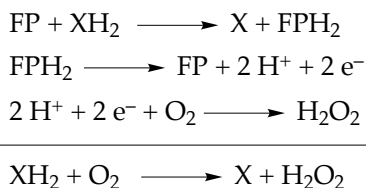
13.5 LAS FLAVOPROTEÍNAS AUTOOXIDABLES

En el grupo *fluorescens* de las especies del género *Pseudomonas* puede requerirse un suministro de H_2O_2 para el normal funcionamiento de la cadena respiratoria. Esto se consigue normalmente con la intervención de flavoproteínas autooxidables:

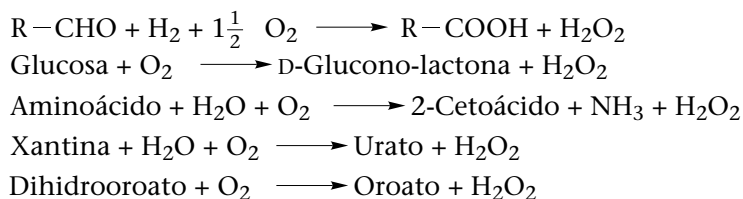


En estos casos el carácter aerobio del organismo puede estar ligado al sistema productor de H_2O_2 , necesario para el funcionamiento de la cadena respiratoria y la generación de ATP para el crecimiento.

Además del FAD y FMN existen otras flavoproteínas que reducen parcialmente el oxígeno molecular:



Entre las flavoproteínas más conocidas susceptibles de actuar como generadores de H_2O_2 figuran la aldehído oxidasa, la glucosa oxidasa, las L- y D-aminoácido oxidasas, la xantina oxidasa y la dihidroorotato oxidasa:



Es muy probable que el peróxido de hidrógeno no se forme directamente en estas reacciones sino que sea el radical superóxido, el cual subsiguientemente forme H_2O_2 por efecto de la superóxido dismutasa.

13.6 BALANCE ENERGÉTICO DE LAS REACCIONES OXIDATIVAS

Cuando se sacan un par de protones y un par de electrones de un sustrato orgánico se libera energía libre cuyo valor $\Delta G'_0$ es aproximadamente equivalente a la energía de la combustión de una molécula de hidrógeno gaseoso.

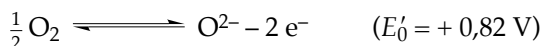
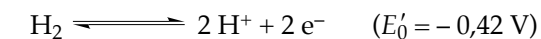
La tendencia de una sustancia a dar o aceptar e^- puede ser descrita cuantitativamente por su potencial de óxido-reducción, el cual consiste en el voltaje necesario para sacar un electrón de dicho compuesto en la forma reducida. Este potencial de óxido-reducción se expresa con relación a un potencial tipo que es el del electrodo de hidrógeno:



al cual se asigna un valor de 0,00 voltios (V). El valor de V depende de la concentración, del pH y de la temperatura. A pH = 7,25°C y concentración 1,0 molar, el potencial tipo es -0,42 V. El símbolo E'_0 designa el potencial de óxido-reducción en voltios medido en estas condiciones y se designa como potencial OR específico.

Si tenemos los valores de E'_0 de la reacción que libera electrones y el de la que los acepta, el cambio de energía libre resultante del acoplamiento de ambas reacciones puede ser calculado por la fórmula $\Delta G'_0 =$

$nF\Delta E'_0$, donde $\Delta G'_0$ es el cambio de energía libre, n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday (23 000 cal/voltios) y $\Delta E'_0$ es la diferencia algebraica entre los potenciales de óxido-reducción de las dos reacciones. Así:



Entonces, en la combustión del H_2 tendremos un cambio de energía libre:

$$\Delta G'_0 = -2 \times 23\ 000 (0,82 - (-0,42)) = -57\ 040 \text{ cal}$$

En la oxidación del malato a oxalacetato $E'_0 = -0,17 \text{ V}$ y el paso concomitante de citocromo c oxidado a reducido supone un valor de $E'_0 = 0,22 \text{ V}$. Por lo tanto,

$$\Delta G'_0 = -2 \times 23\ 000 \times (0,22 - (-0,17)) = -18\ 007 \text{ cal}$$

Teóricamente, si sustituimos la reducción del citocromo c por la del O_2 , siendo en este último caso $E'_0 = 0,82 \text{ V}$, obtendremos $\Delta G'_0 = -45\ 715 \text{ cal}$. Como con otros sustratos, cuando la oxidación del malato va unida a la reducción del oxígeno a H_2O , esta energía es utilizable en condiciones fisiológicas para el desarrollo de la célula microbiana.

13.7 LA CADENA RESPIRATORIA

Cuando se reduce el oxígeno molecular a H_2O en una única etapa, la cantidad de energía que se produce es tan grande que resultaría difícil regularla para su aprovechamiento para el desarrollo. La estrategia celular para conseguirlo pasa normalmente por el fraccionamiento en una serie de etapas de liberación de energía a través de reacciones bioquímicas sucesivas de transporte de H^+ y de e^- , desde el sustrato reductor hasta el oxígeno. Estas reacciones constituyen la denominada cadena respiratoria. El orden de los sucesivos portadores de electrones está determinado por su concentración y el potencial de óxido-reducción específico E'_0 . De este modo cada compuesto es capaz de ser reducido por el anterior y oxidado por el siguiente.

El sistema general de transporte de electrones que utiliza el O_2 como aceptor final comprende el NAD^+ ($E'_0 = -0,32 \text{ V}$), el FAD ($E'_0 = -0,26$), una quinona ($E'_0 = 0,26$), los citocromos b , c y a y la citocromo oxidasa ($E'_0 = 0,81$). No obstante, en tanto que en el sistema mitocondrial la cadena de transporte de electrones es muy uniforme en todos los eucariotas, en las bacterias presenta una gran diversidad. En ambos casos se halla asociado a membranas, en los microorganismos eucariotas asociado a las mitocondrias o a los cloroplastos, y en los procariotas a la propia membrana protoplasmática o a invaginaciones de la misma. Esto hace que muchos de los componentes de la cadena respiratoria sean insolubles en agua y difíciles de separar manteniendo su estado funcional.

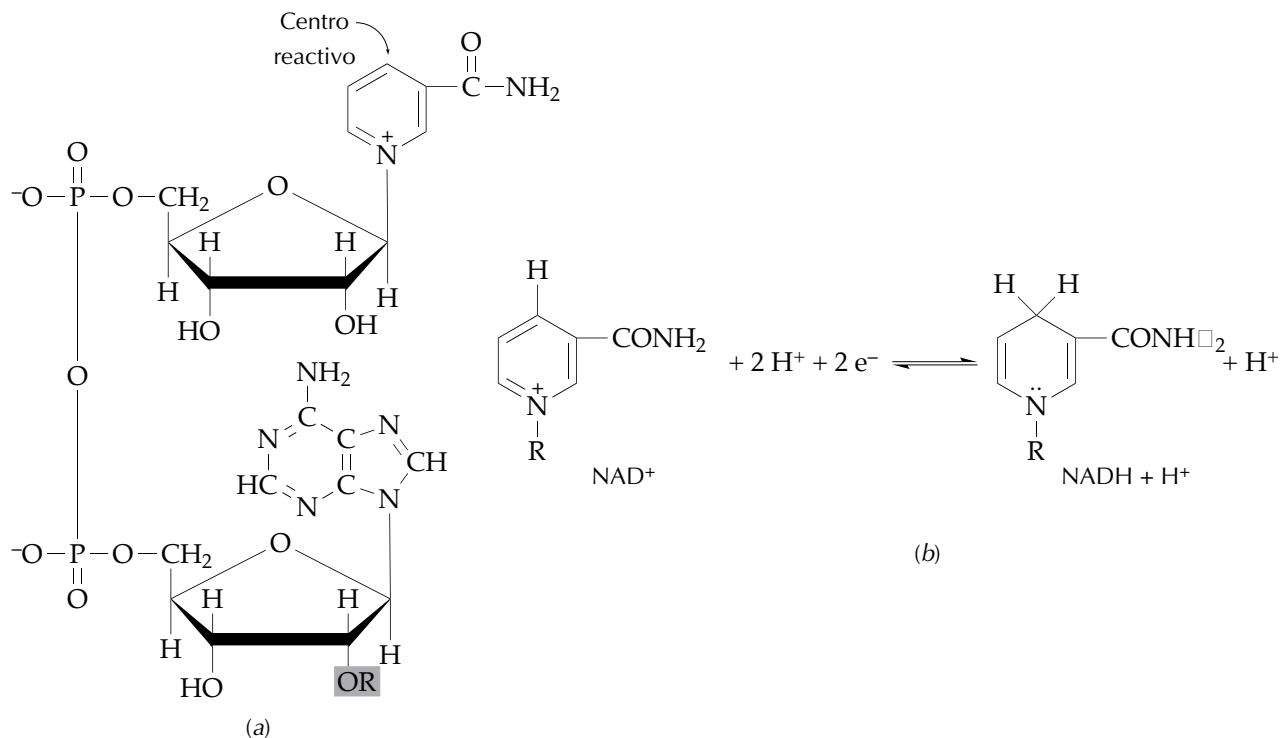
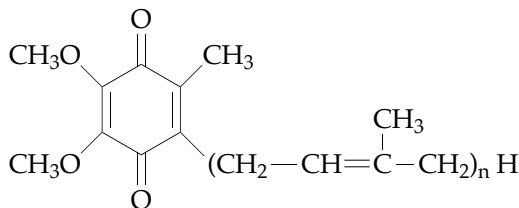


Figura 13.1 (a) Nicotinamida adenindinucleótido. En el NAD⁺, R = H; en el NADP⁺, R = PO₃²⁻. (b) Forma oxidada y reducida del centro reactivo.

El primer componente de la cadena respiratoria suele ser el nicotinamida adenindinucleótido (NAD⁺) (fig. 13.1). El flavina adenindinucleótido (FAD) es el grupo prostético de muchas flavoproteínas. Es un pigmento amarillo derivado de la riboflavina (fig. 13.2). El NADH + H⁺ y el NADPH + H⁺ pueden ser reoxidados por el enzima flavínico, pero éste generalmente no puede ser reoxidado con NAD⁺ o NADP⁺. Además de su reoxidación siguiendo la cadena respiratoria, el FAD pueden ceder directamente el hidrógeno al oxígeno molecular formando peróxido de hidrógeno.

Otro de los componentes más característicos de la cadena respiratoria está constituido por las *quinonas*. En el sistema mitocondrial tenemos la ubiquinona:



El número de unidades isoprenoides varía entre los distintos organismos de 6 a 10. La forma oxidada y reducida es:

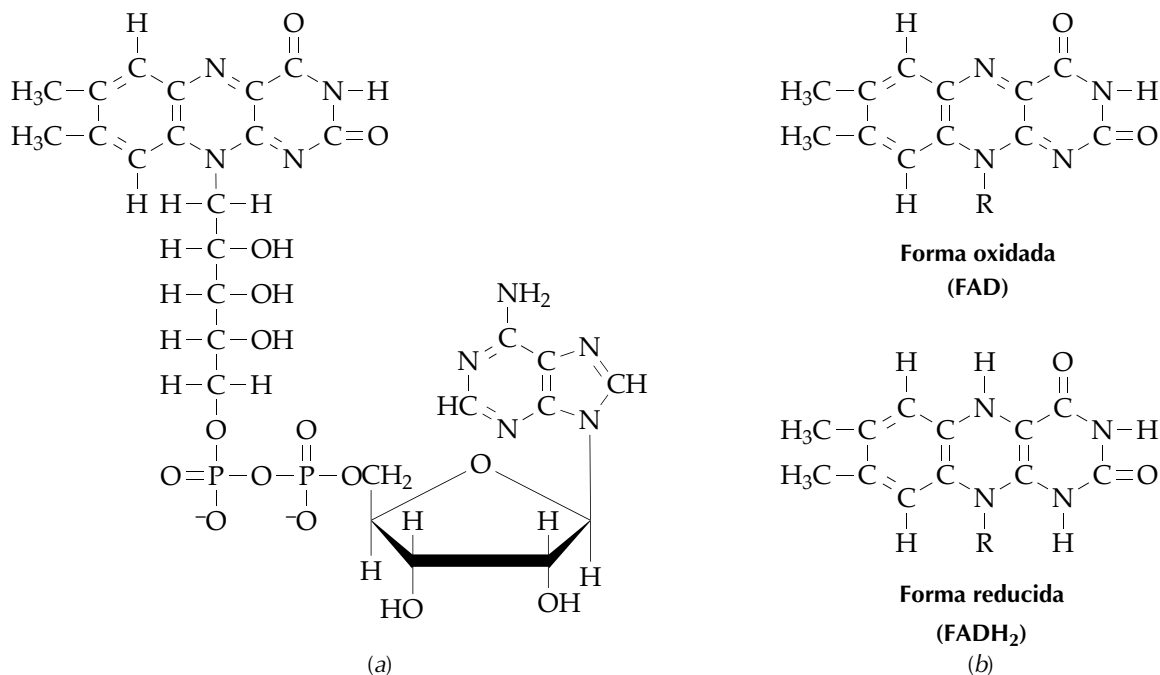
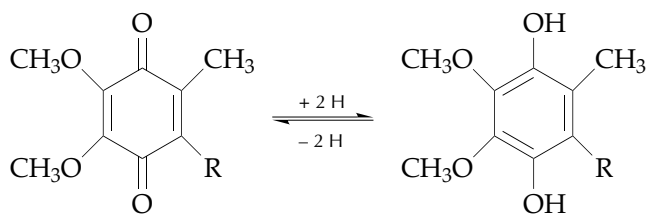


Figura 13.2 (a) Flavina adenindinucleótido (FAD). (b) Formas oxidada y reducida.



Existe una gran diversidad de quinonas en los sistemas de transporte de electrones de las bacterias. Generalmente son portadores intermediarios entre las flavoproteínas y los citocromos.

Los citocromos son proteínas hemínicas. El grupo prostético es un tetrapirrol con un átomo de Fe quelado. La transferencia de electrones por los citocromos comprende la oxidación reversible del átomo de hierro:



La estructura del grupo hemo es la siguiente:

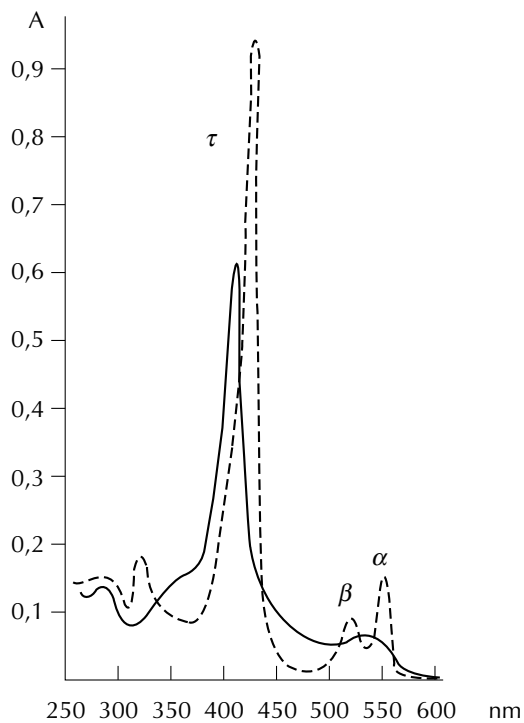
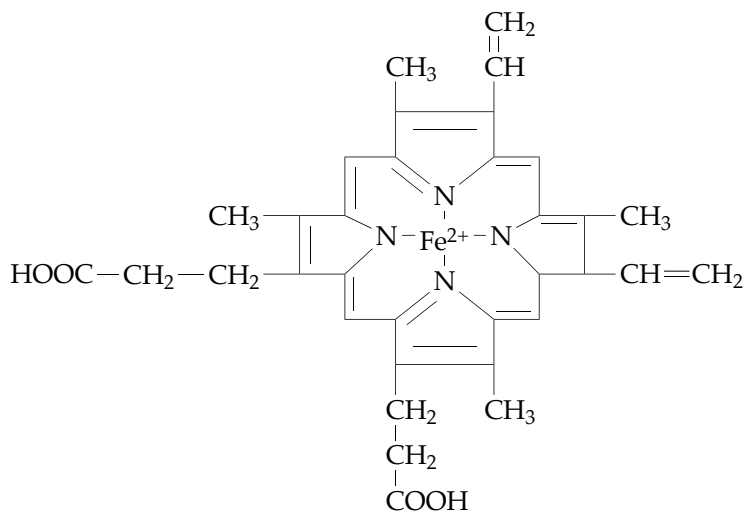


Figura 13.3 Espectros del citocromo c_{551} de *Pseudomonas aeruginosa*. Trazo continuo, forma oxidada. Trazo discontinuo, forma reducida.

TABLA 13.1 Longitud de onda (nm) de las bandas de Soret de diversos citocromos.

Citocromos de	Banda α			Banda β	Banda γ
	cit. a	cit. b	cit. c		
Mitocondrias					
Levadura	605	563	552	525	426
Músculo cardíaco	605	563	552	525	426
Bacterias					
<i>Bacillus subtilis</i>	604	564	552	523	422
<i>Micrococcus luteus</i>	605	562	552	523	422
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> *	600	562	552	523	430
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	600	-	552	520	432
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	560	552	520	428
<i>Pseudomonas putida</i>	-	560	552	530	427
<i>Gluconobacter suboxidans</i>	-	-	554	523	428
<i>Acetobacter pasteurianum</i>	588	-	554	523	428
<i>Enterobacter aerogenes</i>	628-592	560	-	530	430
<i>Escherichia coli</i>	630-593	560	-	533	433
<i>Proteus vulgaris</i>	630-595	560	-	533	430
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	622-597	558	-	530	430

* Formalmente incluido en *M. entens*.

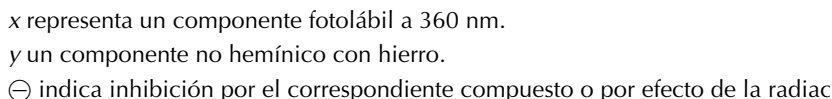
Los citocromos se reconocen por su espectro de absorción (fig. 13.3). Hay cuatro tipos distintos: *a*, *b*, *c* y *d* (a_3). En su forma reducida, se caracterizan por la banda α de absorción que es la de mayor longitud de onda. Los tres picos α , β y γ se conocen con el nombre de bandas de Soret.

En la tabla 13.1 se indican las longitudes de onda de las bandas de absorción de los citocromos obtenidos de las mitocondrias y de distintas bacterias. Los del género *Bacillus* se corresponden con los de las eucariotas, en los demás casos se presentan diferencias importantes. Además de las diferencias correspondientes a la longitud de onda para los picos del espectro de un mismo citocromo, puede asegurarse que en las enterobacterias falta el citocromo *c* terminal. Esto corresponde al resultado del test de la oxidasa. El diclorofenol indofenol o el *N,N*-dimetil parafenilendiamina son incoloros en estado reducido. Se colorean cuando se oxidan por especies oxidasa positivas que son las que contienen citocromo *c*.

Hay algunas cadenas respiratorias bastante bien conocidas, entre las cuales se describen los siguientes ejemplos:

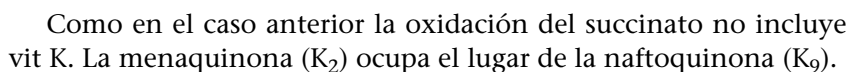
1. *Mycobacterium phlei*

Uno de los sistemas de transporte de electrones mejor estudiados es el de *Mycobacterium phlei*. El mismo puede representarse como sigue:



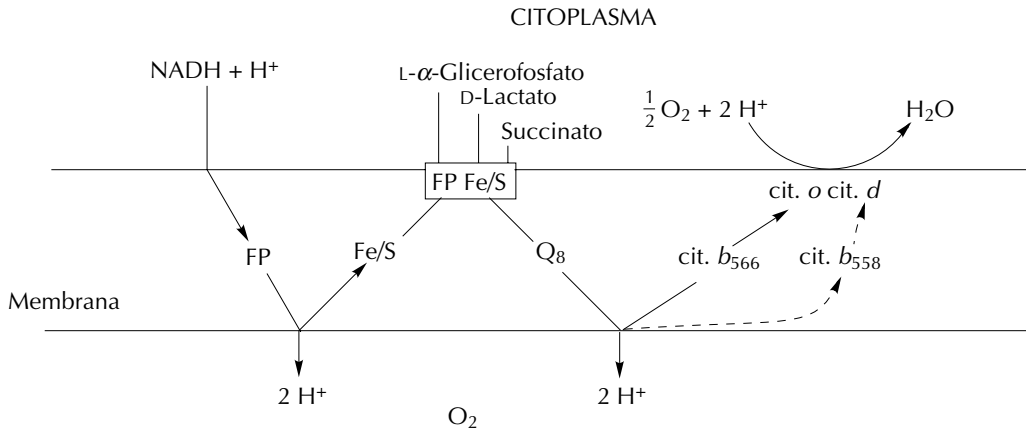
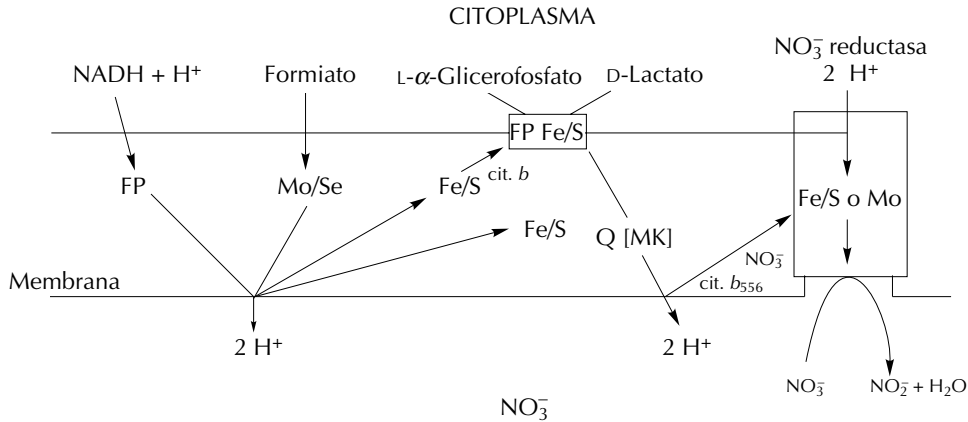
La irradiación a 360 nm inhibe la oxidación del malato y del succinato, pero sólo la primera es reversible con adición de vit K₁. La oxidación del succinato comprende un compuesto metálico que se inhibe con cianuro. En el esquema se incluyen los enzimas flavínicos (FP) inhibidos por la atebрина y el punto de acción de otros inhibidores. La NOQNO es la *N*-óxido-2-*n*-nonilhidroxiquinoleína.

El sistema de transporte de electrones en el género *Bacillus* sería:



3. Enterobacteriáceas (ver capítulo 9)

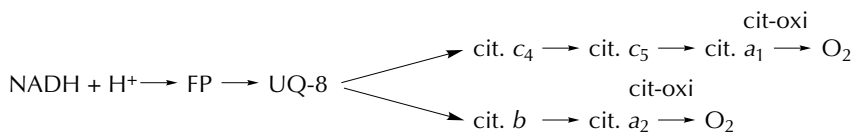
No tienen citocromo *c* terminal. En condiciones aerobias utilizan preferentemente ubiquinonas y en anaerobias menaquinonas. Con nitrato utilizan ubiquinona-8, cit. *b* y nitrato reductasa. A continuación se representan las cadenas respiratorias con nitrato y oxígeno como aceptores terminales de electrones respectivamente (ver también capítulo 14).



4. Azotobacter

Contiene ubiquinona-8 y citocromos *a*₁, *a*₂ y citocromo oxidasa. En el *bypass* sobre UQ-8, también citocromo *c*₄, citocromo *c*₅ y citocromo *a*₁.

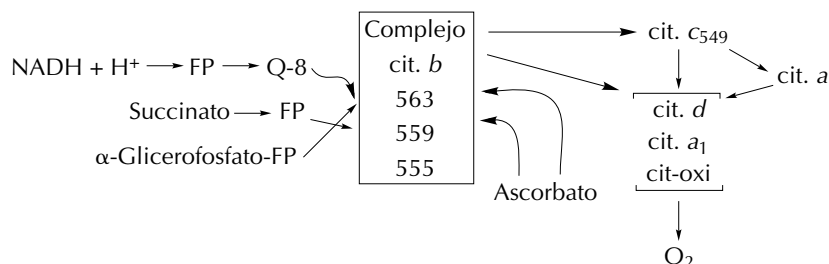
El sistema de transporte de electrones en *Azotobacter* es:



Los estudios de inhibición con KCN que afecta principalmente al cit. a_1 , han revelado la existencia de la rama lateral.

5. Bacterias halófilas

En el esquema siguiente se representa el sistema de transporte de electrones en *Halobacterium*:



13.8 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La generación de ATP puede tener lugar bien por fosforilación a nivel de sustrato, a través de un número relativamente reducido de reacciones que ya han sido descritas en los capítulos referentes a la formación de productos finales del catabolismo, o bien por fosforilación oxidativa. Este último sistema es realmente el de tipo más generalizado y es también el que está ligado a la cadena respiratoria. El transporte de dos protones y dos electrones desde el NAD hasta el O₂ va unido a la formación de tres moléculas de ATP a partir de ADP, correspondiendo a la reducción de $\frac{1}{2}$ O₂ a H₂O. Teóricamente, en la respiración aerobia la relación P/O es de 3, aparte de la posible generación concomitante de ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

La fosforilación oxidativa sólo ocurre cuando el transporte de electrones tiene lugar en una estructura inalterada de membrana. La oxidación de portadores de electrones va acompañada de la transposición de protones hacia el exterior con la creación de un gradiente de concentración que determina la nueva entrada de protones a través de puntos específicos, con la proteína ATPasa dando lugar a la reacción:



La teoría quimiosmótica puede considerarse ampliamente comprobada en la respiración aerobia y en sistemas anaerobios ligados a citocromos o sin ellos. La actividad ATPásica está circunscrita a puntos específicos de la membrana y, como consecuencia de la actividad metabólica, resulta efectivamente un gradiente de pH entre fuera y dentro de la célula.

La relación entre las concentraciones de ADP y ATP es crítica para la velocidad de respiración. De hecho, en el efecto Pasteur el factor limitante de la penetración de glucosa es la disponibilidad de ADP.

En bacterias, los valores de la relación P/O encontrados en preparados libres de células enteras es siempre inferior a 3 y, con frecuencia, un poco mayor que 1. Es evidente que en las células enteras dichos valores pueden ser superiores. No obstante, es posible que en las bacterias tenga lugar una respiración aerobia con una relación P/O inferior a la que se consigue en los microorganismo eucariotas gracias al sistema mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- MANDESTAM, J., McQUILLEN, K. y DAWES, I. (editores). Biochemistry of Bacterial Growth. 3ª ed. New York. John Wiley. 1982.
- INGLEDEW, W. J. y POOLE, R. K. The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. Microbiological Reviews, 48, pp. 222–271, 1984.

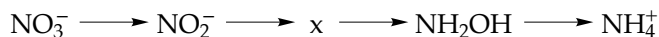
Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

14.1	DESNITRIFICACIÓN Y RESPIRACIÓN DEL NITRATO	192
14.2	BACTERIAS DESNITRIFICANTES	193
14.3	FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA DESNITRIFICACIÓN	194
14.4	LA RESPIRACIÓN DEL NITRATO EN LAS BACTERIAS FACULTATIVAS	195
14.4.1	Catabolismo de la glucosa	196
14.4.2	Respiración del nitrato y fermentación	197
14.4.3	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)	197
14.4.4	Respiración anaerobia	198
14.4.5	Mutantes clorato resistentes	198
14.4.6	Metabolismo del nitrito	198
	BIBLIOGRAFÍA	199

14.1 DESNITRIFICACIÓN Y RESPIRACIÓN DEL NITRATO

La reducción del nitrato fue descubierta por Gayon y Dupetit en 1886, pero el papel del nitrato en la producción de energía no empezó a ser comprendido hasta principios del siglo XX.

En las plantas y algunas bacterias hay una reducción asimiladora del nitrato, el cual pasa a nitrito que luego se reduce a amoníaco, pasando por hidroxilamina:



El amoníaco es incorporado al material celular. El sistema enzimático implicado en el proceso asimilador del nitrato incluye flavina, molibdeno, NAD y NADP reducidos como dadores de hidrógeno y electrones. A pesar de que algunas bacterias utilizan nitrato como fuente de nitrógeno, en la mayoría de los casos el nitrógeno se asimila partiendo de amoníaco.

La desnitrificación se refiere a una reducción desasimiladora de los óxidos de nitrógeno iónicos (nitrato: NO_3^- y nitrito: NO_2^-) que llevan a cabo algunas bacterias aerobias obligadas en ausencia de oxígeno. En condiciones anaerobias no hay crecimiento en ausencia de NO_3^- o de NO_2^- . Los productos de reducción son óxidos de nitrógeno gaseosos (óxido nítrico: NO y óxido nitroso N_2O), los cuales pueden ser reducidos a N_2 . En la mayor parte de las bacterias desnitrificantes, el nitrógeno molecular es el producto final más importante (ver Lámina 7):



En 1925, Quastel demostró que el nitrato puede sustituir al oxígeno en algunas bacterias fermentativas, las cuales entonces pueden utilizar para el crecimiento sustratos no fermentables como el lactato. En estos casos puede ocurrir otra reducción desasimiladora del nitrato parecida a la reducción asimiladora y que lleva a la excreción de NH_4^+ . También puede tener lugar la acumulación de nitritos. Se ha pensado que se trata de una respiración incidental del NO_3^- que permitiría la eliminación de hidrógeno y una mayor disponibilidad de NAD^+ . Sin embargo, hay evidencia de un mayor rendimiento energético. La respiración del NO_3^- por bacterias fermentativas es característica de las enterobacteriáceas y también de algunos miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. En algunos de estos casos se han llegado a detectar pequeñas cantidades de N_2O , a partir de NO_3^- y de hidroxilamina.

Hay dos grandes grupos de bacterias que pueden utilizar el nitrato como oxidante inorgánico: las aerobias obligadas desnitrificantes (en ausencia de NO_3^- son aerobias estrictas) y las fermentativas reductoras de nitratos. Las primeras requieren NH_3 para el crecimiento y las segundas no. Además, deben considerarse dos casos en los que el NO_3^- sustituye al oxígeno permitiendo el desarrollo autotrófico por el ciclo de Calvin. Por un parte se encuentra *Paracoccus denitrificans* que puede oxidar H_2 :

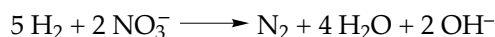


TABLA 14.1 Factores de enriquecimiento para diferentes bacterias reductoras de NO_3^- en un medio mínimo en condiciones anaerobias.

Factor de enriquecimiento	Bacteria
Con NH_3 - Trazas de peptona y etanol o propionato - Glucosa - Tartrato, succinato o malato - Ácidos orgánicos, etanol y extracto de carne con alta concentración de NO_3^- (5-12%) - Trazas de extracto de levadura y atmósfera de H_2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Sin NH_3 - Lactato y piruvato	<i>Paracoccus denitrificans</i> Enterobacterias

Por otra, *Thiobacillus denitrificans*, que oxida azufre y tiosulfato con NO_3^- en sustitución del O_2 :



Estos dos casos se incluyen dentro de las bacterias desnitrificantes.

Para el aislamiento de bacterias que utilizan el NO_3^- como oxidante pueden utilizarse medios de enriquecimiento apropiados para cada uno de los distintos tipos, dada la gran diversidad taxonómica de las especies que presentan esta propiedad. Suele utilizarse un medio mínimo con NO_3^- en condiciones anaerobias (tabla 14.1).

14.2 BACTERIAS DESNITRIFICANTES

En este tipo de bacterias existe una diversidad taxonómica sorprendente, sobre todo después de los estudios llevados a cabo en los últimos años. Muchas especies son quimioorganotrofas, pero algunas utilizan compuestos C_1 y otras, como ya ha sido consignado, crecen autotróficamente con H_2 o compuestos reducidos de azufre. También hay un grupo fotosintético. La mayoría puede reducir NO_3^- a N_2 , pero algunas no tienen NO_3^- reductasa y son dependientes de NO_2^- , otras no tienen N_2O^- reductasa y producen, por tanto, N_2O como producto final. Finalmente, se han encontrado cepas con N_2O reductasa pero que no pueden producir N_2O de NO_3^- .

Existen especies de *Achromobacter* (algunas de las cuales actualmente se incluyen en el género *Alcaligenes*) que oxidan metano con NO_3^- y otras que son dependientes del NO_2^- . También se han descrito otras que sólo poseen N_2O reductasa.

Alcaligenes incluye muchas especies desnitrificantes. *A. eutrophus* oxida H_2 con NO_3^- y crece autotróficamente, como *Hydrogenomonas eutrophus*. Existen especies dependientes de NO_2^- y fijadoras de N_2 (*Azospirillum brasilense*).

Dentro del género *Bacillus*, aparte de *B. licheniformis*, hay otras especies desnitrificantes, quizás las más abundantes, y tipos que no pueden reducir NO_2^- , así como otros que pueden crecer anaerobiamente con NO .

También se encuentran desnitrificantes en los géneros *Chromobacterium*, *Flavobacterium* y *Corynebacterium*. En este último caso con especies que producen N_2O como producto terminal. Algunas especies de *Hyphomicrobium* son desnitrificantes, comprendiendo los únicos casos conocidos que pueden utilizar el metanol como reductor. Se ha descrito también la desnitrificación en *Halobacterium*.

En *Moraxella* el nitrato puede oxidar benzoato, produciendo N_2 . También se ha descrito la reducción de NO_3^- en especies de *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium* y *Bacteroides*.

Las especies desnitrificantes de *Pseudomonas* se encuentran entre las más estudiadas y junto a las de *Alcaligenes* son probablemente las de más importancia en los medios naturales. Las hay con N_2O como producto terminal.

Finalmente, hay que considerar a *Rhodopseudomonas sphaeroides*, que se encuentra entre los fototrofos no pertenecientes al grupo de las bacterias del azufre, y a *Thiobacillus denitrificans*, quimiolitotrofo ya citado. Recientemente se ha descrito actividad desnitrificante en *Vibrio succinogenes* y en varias especies de *Xanthomonas*.

14.3 FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA DE LA DESNITRIFICACIÓN

Las reductasas de los óxidos de nitrógeno se hallan reprimidas durante el crecimiento aerobio. En condiciones anaerobias, la fase de desrepresión en presencia de NO_3^- es de unas 3 horas. En la figura 14.1 se muestra el modelo de transporte de electrones basado princi-

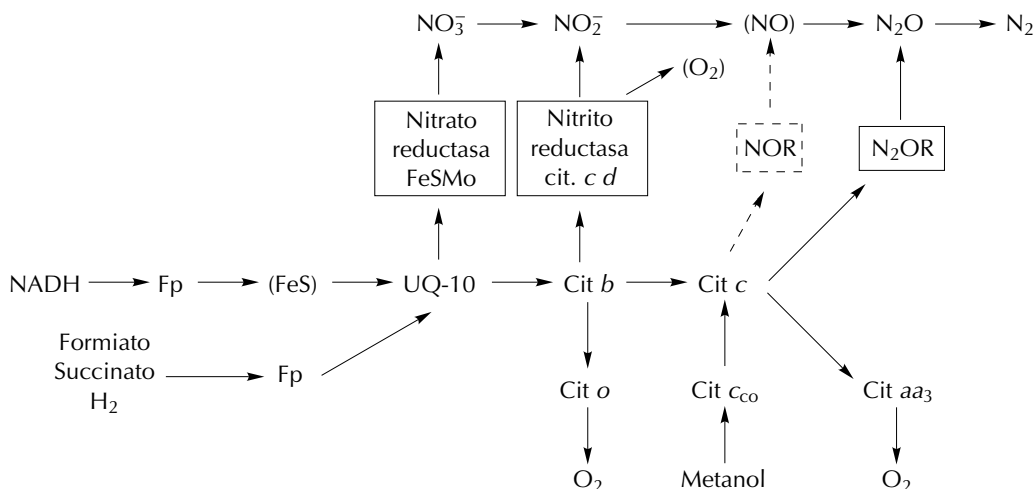


Figura 14.1 Modelo de las probables cadenas de transporte de electrones de *Paracoccus denitrificans*. Abreviaturas: NOR, reductasa del óxido nítrico; N_2OR , reductasa del óxido nitroso; Fp, enzima flavínico; FeS, centro de hierro y azufre; UQ-10, ubiquinona-10; Cit, citocromo; Mo, molibdeno.

palmente en *Paracoccus denitrificans*, que puede tomarse como esquema general de la reducción del NO_3^- en las bacterias desnitrificantes. El punto más discutido y probablemente variado de un caso a otro es el que afecta al NO .

Paracoccus denitrificans puede reducir NO_3^- tanto con H_2 como con compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono utilizadas son semejantes a las de *Desulfotomaculum* (lactato, piruvato y formiato), pero también puede utilizar el glicolato como precursor de ácidos C_4 dicarboxílicos, sin pasar por intermediarios con coenzima A (fig. 14.2).

14.4 LA RESPIRACIÓN DEL NITRATO EN LAS BACTERIAS FACULTATIVAS

La respiración del nitrato desempeña un papel importante en el metabolismo de las bacterias entéricas y es un punto clave para la regulación de la gran variedad de sistemas disponibles de producción de energía (capítulos 9 y 13).

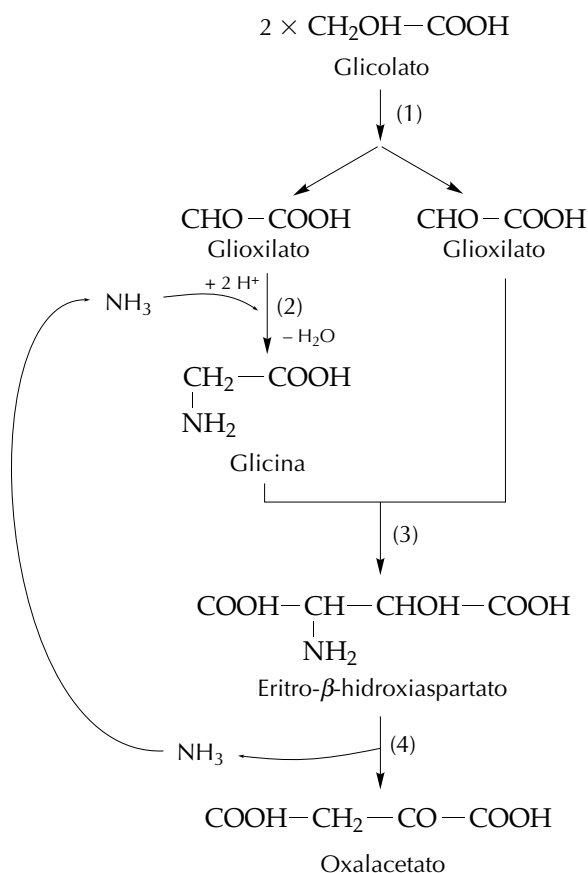


Figura 14.2 Metabolismo del glicolato por *Paracoccus denitrificans*. (1) Glioxilato reductasa dependiente de NAD. (2) Glicinoamino transferasa. (3) Eritro-2-hidroxiaspartato aldolasa. (4) Eritro-3-hidroxiaspartato deshidratasa.

Las cadenas respiratorias de las bacterias entéricas pueden utilizar una gran variedad de sustratos (fig. 14.1 y apartado 13.7). Cada una de las distintas deshidrogenasas unidas a la membrana (NADH + H⁺, lactato, succinato, formiato o L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasas) pueden dar electrones a un “pool” común de quinona (ubiquinona-8 en condiciones aerobias y menaquinona-8 en condiciones anaerobias). La quinona da a su vez electrones a las reductasas terminales y a los complejos citocromo *o* y citocromo *d*. Hay una gran número de posibilidades para una simple cadena constituida por deshidrogenasa-quinona-reductasa (capítulo 9).

Los complejos citocromo *o* y citocromo *d* tienen un mecanismo similar para la transposición protónica. La ubiquinol oxidasa libera en el periplasma 2 H⁺ + 2 e⁻ en tanto que la inserción de la oxidasa del oxígeno molecular consume 2 H⁺ + 2 e⁻ en el citoplasma.

Durante el crecimiento aerobio, el NADH + H⁺ puede ser reoxidado por la cadena respiratoria, pero en condiciones anaerobias el NAD⁺ se regenera de otro modo y tienen lugar cambios metabólicos importantes.

14.4.1 Catabolismo de la glucosa

En condiciones aerobias se utiliza preponderantemente la vía oxidativa de la hexosa monofosfato, mientras que anaerobiamente domina la vía de Embden-Meyerhof. Sin embargo, al disminuir el suministro de oxígeno, se incrementa la concentración de los enzimas de ambas vías. Este incremento es más importante sobre los niveles de fosfofructoquinasa, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato quinasa.

La anaerobiosis disminuye la formación de piruvato deshidrogenasa, que produce NADH. La función de este enzima es reemplazada por la piruvato formiato liasa (que no depende del NAD⁺), la cual produce acetil-CoA y formiato. El formiato es, a su vez, convertido en CO₂ e H₂ por la formiato-hidrógeno liasa. Este complejo enzimático está constituido por formiato deshidrogenasa, un transportador no identificado, e hidrogenasa (fig. 14.3). La formiato-hidrógeno liasa es el factor responsable del fuerte desprendimiento de gas.

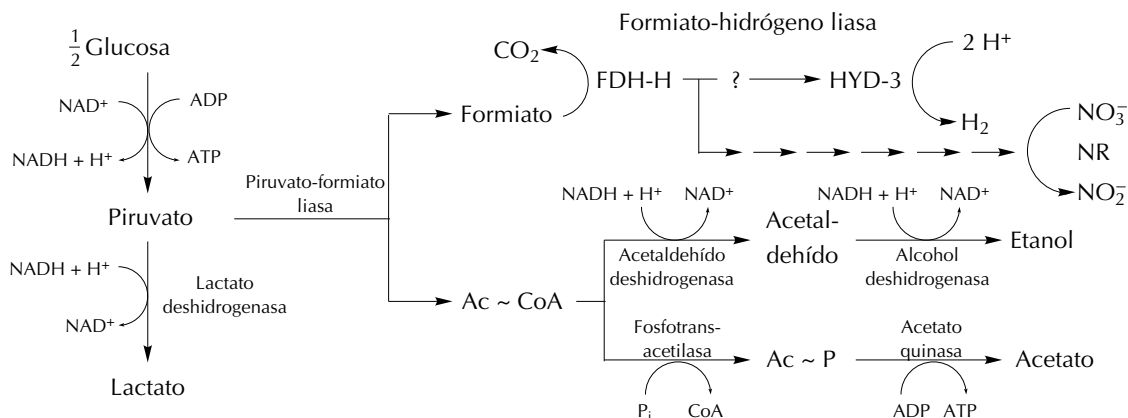


Figura 14.3 Catabolismo de la glucosa por las bacterias fermentativas que respiran nitrato. FDH-H, formiato deshidrogenasa-H; HYD-3, hidrogenasa isoenzima 3; CoA, coenzima A.; NR, nitrato reductasa.

En presencia de nitrato, el formiato es oxidado por una formiato deshidrogenasa diferente, siendo transferidos entonces los electrones al nitrato y no formándose hidrógeno. La cadena de transporte que se establece desde el formiato al nitrato permite generar ATP por fosforilación oxidativa. Así, una bacteria entérica que fermenta la glucosa en presencia de nitrato obtiene ATP tanto por fosforilación a nivel de sustrato (metabolismo fermentativo) como por fosforilación oxidativa (respiración anaerobia).

14.4.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)

Las bacterias entéricas tienen un CAT funcional en condiciones aerobias. Anaerobiamente se reducen los niveles de citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (fig. 14.4), pero se genera el α -cetoglutarato necesario para la biosíntesis.

Tal como ya ha sido comentado previamente (capítulo 12), la 2-oxoglutarato deshidrogenasa es drásticamente reprimida en anaerobiosis, impidiéndose la formación de succinato. Este último, necesario para la biosíntesis, se forma por reducción del oxalacetato (fig. 14.4), el cual, a su vez, se genera por carboxilación del piruvato. La fumarato reductasa, uno de los enzimas implicados en la generación de succinato a partir de oxalacetato, es un enzima respiratorio que genera fuerza protomotriz. De este modo, las bacterias entéricas pueden crecer anaerobiamente con un sustrato no fermentable siempre y cuando esté presente el fumarato como aceptor de electrones exógeno. Hay también que mencionar que en condiciones anaerobias el CAT no genera NADH.

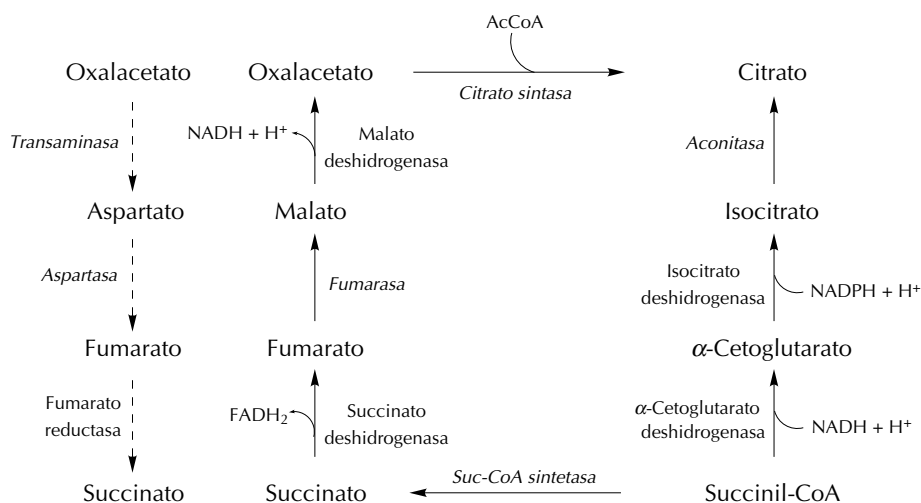


Figura 14.4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y brazo reductor (reacciones indicadas con una flecha de trazo discontinuo) que posibilita la síntesis en condiciones anaerobias de succinato a partir del oxalacetato.

En contraste con el efecto de la fermentación, la respiración del nitrato no afecta al CAT. No obstante, la aconitasa y la fumarasa son inhibidas por efecto del nitrito. La alcohol deshidrogenasa y la formiato-hidrógeno liasa se hallan a un nivel muy bajo pero se excreta acetato.

14.4.4 Respiración anaerobia

Una gran variedad de sustratos pueden utilizarse como dadores de electrones tanto para la respiración aerobia como anaerobia, incluyendo lactato, glicerol-3-fosfato, NADH y formiato. Las deshidrogenasas unidas a la membrana que actúan en cada caso son las mismas en condiciones aerobias y anaerobias, con la excepción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que presenta dos enzimas genéticamente distintos.

Como aceptores de electrones en condiciones anaerobias pueden actuar, además del nitrato, el nitrito, el fumarato, el *N*-óxido de trimetilamina (TMAO), el dimetil sulfóxido, el óxido-1-tetrahidrotiofeno y el tetratiónato. En general, la actividad de las correspondientes reductasas disminuye por efecto represor del nitrato.

14.4.5 Mutantes clorato resistentes

La selección de clones resistentes al clorato ha sido muy utilizada para obtener mutantes denominados *chl* que carecen de actividad nitrato reductasa. El clorato es un sustrato de la nitrato reductasa, y tanto el clorito como el cloro formados tienen efecto letal. Las mutaciones *chl* espontáneas se presentan con frecuencias elevadas.

Piéchaud y De Groot seleccionaron mutantes *chl* de varias bacterias entéricas y demostraron que muchos de ellos no sólo no tienen nitrato reductasa, sino que también han perdido otros enzimas anaerobios tales como la formiato deshidrogenasa y la formiato-hidrógeno liasa. Azoulay fue capaz de reconstruir la actividad nitrato reductasa mezclando extractos libres de células de diferentes mutantes *chl*. La actividad reconstruida corresponde a una nueva fracción microparticulada. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que la nitrato reductasa forma parte de un complejo enzimático ubicado en una estructura proteica de varios componentes insertada en la membrana protoplasmática.

14.4.6 Metabolismo del nitrito

El nitrito procedente de la reducción del nitrato puede acumularse o ser reducido a su vez. En las enterobacterias no hay nitrito reductasa desnitrificante que forme óxidos de nitrógeno o N_2 . Una ligera producción de óxido nítrico que se ha detectado en algunos casos se debe a la propia nitrato reductasa. En cambio, el nitrito puede reducirse a amoníaco a través de la transferencia de seis electrones. En las enterobacterias esto puede tener tres significados: asimilación de

nitrógeno, eliminación de hidrógeno para reoxidar NADH, o generación de potencial de membrana en condiciones anaerobias.

En presencia de nitrito no se produce etanol y se incrementa el acetato. Se excretan grandes cantidades de amoníaco, incluso cuando el nitrito es la única fuente de nitrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

KNOWLES, R. Denitrification. *Microbiological Review*. 46. pp. 43–70. 1982.

STEWART, U. Nitrate Respiration in Relation to Facultative Metabolism in Enterobacteria. *Microbiological Review*, 52. pp. 190–232. 1988.

BARET, E. L. y KWAN, H. S. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, pp. 131–149, 1985.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

15.1	REDUCTORES DE SULFATO Y BACTERIAS SULFURÓGENAS	202
15.2	REDUCCIÓN DEL SULFATO CON LACTATO	204
15.3	HIDROGENASAS Y TRANSPORTADORES DE ELECTRONES	205
15.4	REDUCCIÓN DEL SO_4^{2-} CON H_2	205
15.5	METABOLISMO DEL CARBONO EN LOS SULFATO REDUCTORES	208
15.6	BISULFITO REDUCTASAS	210
	BIBLIOGRAFÍA	211

15.1 REDUCTORES DE SULFATO Y BACTERIAS SULFURÓGENAS

Los reductores de sulfato fueron descubiertos por Beijerinck a principios de siglo. Hasta 1970 se consideraron constituidos por un pequeño grupo de bacterias estrictamente anaerobias con una actividad metabólica limitada a la capacidad de oxidar unos pocos ácidos orgánicos de bajo peso molecular hasta acetato, o bien hidrógeno molecular; en ambos casos, con la concomitante reducción de sulfato a sulfuro. Los reductores de sulfato fueron clasificados en dos géneros: *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* y a lo largo de los años sesenta se asumía que el mecanismo bioquímico y la generación de energía ligados a la respiración del SO_4^{2-} eran idénticos en los dos géneros. No obstante, el género *Desulfovibrio* se caracterizaba por poseer citocromos del tipo *c* y por producir una intensa fluorescencia roja en medio alcalino y bajo iluminación con rayos ultravioleta (365 nm), debido a la presencia del pigmento verde desulfoviridina, el cual presenta actividad bisulfito reductasa. El género *Desulfotomaculum* carece de citocromos del tipo *c* y de desulfoviridina y, además, tiene la capacidad de formar endosporas. Se distinguían varias especies de ambos géneros (tabla 15.1), todas ellas capaces de crecer anaerobiamente con lactato y sulfato.

TABLA 15.1 Características distintivas de las especies clásicas de *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*.

Especie	Forma	Flagelación	Citocromo	Desulfoviridina	Crecimiento con				Termófilos
					Piruvato sin sulfato	Malato más sulfato	Colina sin sulfato	Formiato más sulfato	
<i>Desulfovibrio</i>									
Grupo I (G + C 60-62%)									
<i>D. vulgaris</i>	Vibrio	Polar monotrica	c_3	+	+	-	+		-
<i>D. africans</i>	Vibrio	Polar lofotrica	c_3	+	-	+	-		-
<i>D. gigas</i>	Vibrio	Polar lofotrica	c_3	+	-	-	-		-
Grupo II (G + C 54-56%)									
<i>D. desulfuricans</i>	Vibrio	Polar monotrica	c_3	+	+	+	+		-
Grupo III (G + C 46-47%)									
<i>D. salexigens</i>	Vibrio	Polar monotrica	c_3	+	-	+	-		-
<i>Desulfotomaculum</i> (G + C 42-46%)									
<i>D. nigrificans</i>	Bacilo	Peritrica	<i>b</i>	-	+			-	+
<i>D. orientis</i>	B. curvado grueso	Peritrica	<i>b</i>	-	-			-	-
<i>D. ruminis</i>	Bacilo	Peritrica	<i>b</i>	-	+			+	-

Posteriormente se han llegado a describir seis nuevos géneros de bacterias reductoras de sulfatos: *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus* y *Thermodesulfobacterium*, los cuales presentan una importante diversidad bioquímica, nutricional y morfológica. Consecuentemente, el concepto de reductores de sulfato como relativo a un pequeño grupo de bacterias con limitadas capacidades metabólicas ha sido profundamente transformado. Los miembros de los dos antiguos géneros junto con los correspondientes a los nuevos, conservan las características comunes de utilizar el sulfato como aceptor final de electrones y de un desarrollo estrictamente anaerobio. También se han descubierto unas pocas especies como *Desulfuromonas acetoxidans* que no pueden usar sulfato, pero que son capaces de reducir el azufre a sulfuro. Como la producción de sulfuro es un carácter absolutamente común, se ha llegado a sugerir que deberíamos considerarlos conjuntamente con los antiguos reductores de SO_4^{2-} como un nuevo grupo fisiológico de bacterias sulfurógenas, cuyo conocimiento continúa ampliándose en la actualidad y que configura un importante y variado grupo fisiológico de microorganismos comparable al de las bacterias metanogénicas o al de las bacterias fototróficas.

Desde hace tiempo se sabe que algunas especies de *Desulfovibrio* pueden crecer con piruvato o con colina en ausencia de sulfato (tabla 15.1). El crecimiento fermentativo puede considerarse como una alternativa opcional de algunos reductores de sulfatos, así como el uso del nitrato y del fumarato como aceptores finales de electrones alternativos al sulfato, de acuerdo con las propiedades de las especies descritas más recientemente (tabla 15.2).

TABLA 15.2 Nuevas especies identificadas de bacterias reductoras de sulfato.

Especie	Tinción Gram	Morfología	Nutrición	Aceptor de electrones
<i>Desulfovibrio sapovorans</i>	–	Bacilo curvado	Ácidos grasos (C_{18}) \longrightarrow Acetato Propionato	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	–	Forma de limón	Propionato \longrightarrow Acetato	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$ $\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^-$
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	–	Bacilo esporógeno	Acetato \longrightarrow CO_2	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	–	Bacilo	Acetato \longrightarrow CO_2	$\text{S}^0 \longrightarrow \text{S}^{2-}$
<i>Desulfobacter postgatei</i>	–	Bacilar a elíptica	Acetato \longrightarrow CO_2	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$
<i>Desulfosarcina varibilis</i>	–	Irregular en paquetes	Orgánico \longrightarrow CO_2 $\text{CO}_2 \longrightarrow$ Célula	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$
<i>Desulfonema magnum</i>	+	Filamentos (7 μm diám.)	Orgánico \longrightarrow CO_2	$\text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-}$

15.2 REDUCCIÓN DEL SULFATO CON LACTATO

El lactato y el piruvato pueden ser dadores de electrones para la reducción del sulfato (ver Lámina 8). El lactato es oxidado a piruvato por la lactato deshidrogenasa y los electrones producidos son utilizados para producir hidrógeno molecular. El piruvato es convertido en CO_2 , H_2 y acetil fosfato por un proceso análogo al utilizado por los clostridios (fig. 15.1). Se requiere siempre una hidrogenasa citoplasmática. El hidrógeno producido difunde rápidamente a través de la membrana protoplasmática, siendo recapturado gracias a otra hidrogenasa periplasmática y su cofactor, el citocromo c_3 . Los electrones producidos entran en el citoplasma y los protones crean un gradiente protónico a través del cual puede producirse ATP por la ATP-asa. En el citoplasma los electrones producidos son utilizados para la reducción del APS a sulfuro por la APS reductasa y la bisulfito reductasa.

Odom y Peck pusieron de manifiesto que en esferoplastos de *D. gigas* que han perdido la hidrogenasa periplasmática y el citocromo c_3 no se oxida el lactato con sulfato. Añadiendo hidrogenasa purificada del mismo microorganismo y citocromo c_3 se restaura parcialmente la actividad (40%).

Verjan demostró que *D. desulfuricans*, creciendo en el quimiostato, puede simultáneamente fermentar un exceso de piruvato produciendo H_2 en tanto que el SO_4^{2-} a concentración limitante sigue siendo reducido. Añadiendo más SO_4^{2-} deja de producirse H_2 . Tsuji y Yagui han mostrado que en el cultivo discontinuo de *D. vulgaris*, en las primeras etapas de crecimiento, se libera H_2 y no se forma sulfuro. Este último sólo aparece después de que se inicia una recaptación de H_2 . No obstante, una elevada concentración exterior de H_2 puede inhibir completamente la oxidación del lactato y el piruvato.

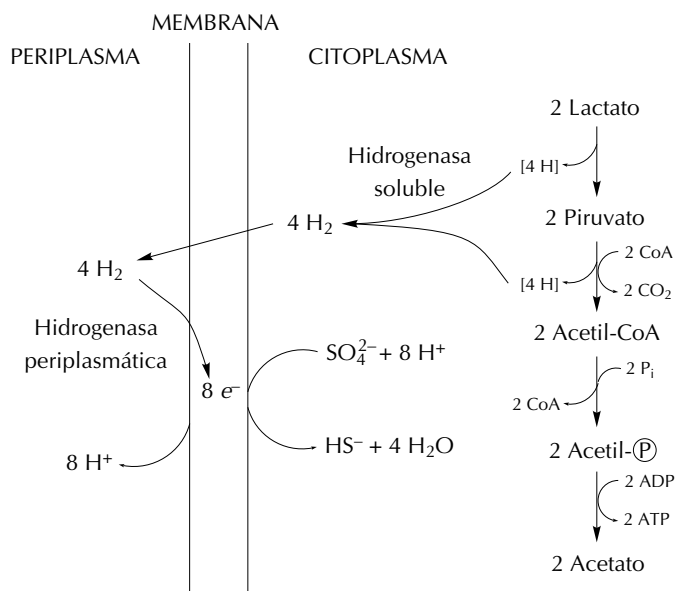


Figura 15.1 Ciclo del hidrógeno en las bacterias reductoras del azufre.

El metabolismo del hidrógeno ha jugado un papel esencial en nuestro conocimiento de los reductores de sulfato. En las bacterias que oxidan acetato hay una hidrogenasa soluble que genera H_2 de la oxidación del lactato o del piruvato. Este hidrógeno difunde hacia el exterior. Hay además una deshidrogenasa periplasmática, la cual con sulfato disponible permite la transferencia de electrones al citoplasma para su reducción y además genera un gradiente protónico (fig. 15.1). Este último permite la generación de ATP por la reacción ATPásica de forma semejante a las bacterias acetógenas (capítulo 8) y metanógenas (capítulo 11). En ausencia de sustrato orgánico reductor la hidrogenasa periplasmática puede generar ATP y reducir SO_4^{2-} . La energía disponible puede utilizarse para la asimilación de CO_2 por la vía de Wood (capítulo 8) o para la formación de acetil-CoA a partir de acetato por la reacción de la acetil-CoA sintetasa.



En los microorganismos que acumulan acetato, el acetil-CoA se forma a partir del piruvato y puede asimilarse acetato del succinil-CoA por una transferasa (fig. 15.2, pág. 209).

Se han caracterizado dos hidrogenasas periplasmáticas en diferentes especies de *Desulfovibrio*: una proteína no hemínica con Ni y Fe (Ni Fe hidrogenasa), y otras con Fe (Fe hidrogenasa). Las dos hidrogenasas difieren además por su actividad específica, por la estructura de sus subunidades, por su sensibilidad a inhibidores y por su antigenicidad. La deshidrogenasa periplasmática puede diferir entre cepas de una misma especie, como ocurre en *D. vulgaris*.

En cuanto a los citocromos, existe también una importante heterogeneidad interespecífica en los reductores de sulfato (tabla 15.3). Es curioso que entre distintos citocromos *c* de miembros del género *Desulfovibrio* existen más diferencias que entre el citocromo *c* del hombre y el de la paloma. Esto sugiere que esta proteína ha evolucionado profundamente en los microorganismos anaerobios como consecuencia de las diversas condiciones en las que se puede desarrollar un transporte de electrones acoplado a la producción de energía.

Se ha demostrado la presencia de diferentes ferredoxinas (tabla 15.3), las cuales están asociadas al sistema fosforoclástico. Pueden ser sustituidas por flavodoxina o rubredoxina.

15.4 REDUCCIÓN DEL SO_4^{2-} CON H_2

Células enteras de *D. desulfuricans* reducen rápidamente el SO_4^{2-} en presencia de H_2 (ver también Lámina 8).

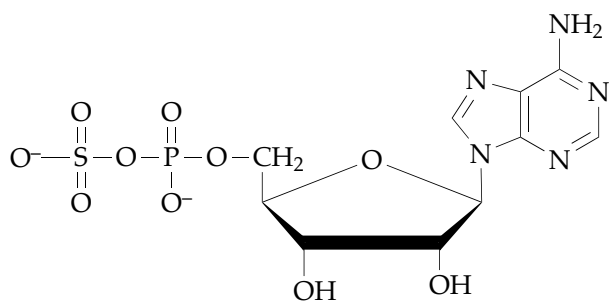


TABLA 15.3 Distribución de hidrogenasas y proteínas de transporte de electrones en diferentes especies de *Desulfovibrio*.

Organismo	Hidrogenasa*		Citocromos			Proteínas de transporte de electrones				
						Ferredoxina			Fl	Rb
	(Fe)	(NiFe)	c ₅₅₃ o monohemo	c ₃ (13 000)	c ₃ (26 000)	[Fe ₄ S ₄]	2 [Fe ₄ S ₄]	[Fe ₃ S ₄]		
<i>D. vulgaris</i> (Hildenborough)	+	–	+	+	+	1	NE	NE	+	+
<i>D. gigas</i>	–	+	–	+	+	+	–	–	+	+
<i>D. desulfuricans</i> (Norway 4)	–	+	+	+	+	1	1	1	–	+
<i>D. desulfuricans</i> (ATCC 27774)	–	+	–	+	+	NE	NE	NE	+	+
<i>D. africanus</i>	NE	NE	NE	+	+	2	1	NE	–	+

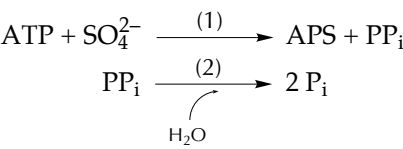
* +, presente; –, ausente; Fl, flavodoxina; Rb, rubredoxina; NE, no estudiado.

El SO_4^{2-} debe ser activado pasando a adenosina-5'-fosfosulfato (APS):



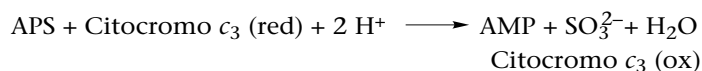
Adenosina-5'-fosfosulfato

La formación de APS requiere ATP. La reacción se lleva a cabo con la sulfato adenilil-transferasa (1) y la pirofosfatasa (2):

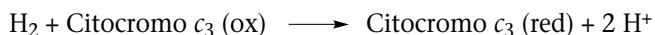


El APS se reduce con citocromo c_3 , el cual es autooxidable. La adenilil-sulfato reductasa cataliza la reacción:

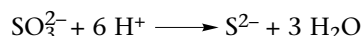
15.4 REDUCCIÓN DEL SO_4^{2-} CON H_2



El citocromo c_3 (oxi) se reduce con una hidrogenasa:

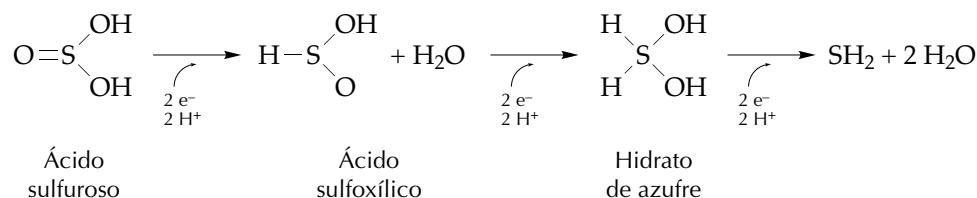


La reducción del sulfito tendría lugar con una sulfito reductasa:

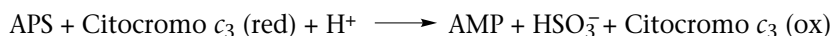


La generación de energía sólo puede llevarse a cabo en la oxidación del H_2 , la cual puede funcionar con SO_3^{2-} o con fumarato como aceptores finales de electrones. En este último caso, entre el hidrógeno y el fumarato puede mediar una 6-menaquinona.

La reducción del SO_3^{2-} con 6e^- sugiere la existencia de tres etapas sucesivas con 2e^- de transferencia en cada una. Por ello se postuló la vía del ácido sulfoxílico que no ha sido confirmada:



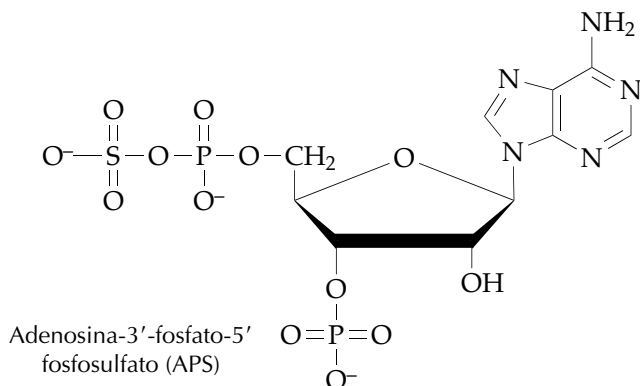
El APS también puede reducirse a bisulfito:



el cual se reduciría a sulfuro pasando a tritionato y tiosulfato mediante la bisulfato reductasa.

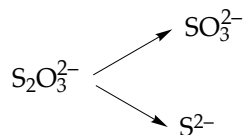
En la mayor parte de las bacterias tiene lugar una reducción asimiladora de SO_4^{2-} en la cual se forma APS que se transforma en PAPS por efecto de una adenilil sulfato transferasa.

El PAPS se reduce con una PAPS reductasa que utiliza $\text{NADPH} + \text{H}^+$:



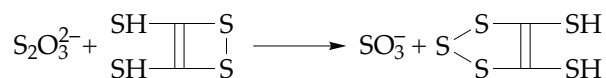
Esta reacción es un sistema enzimático complejo en el que interviene el ácido dihidrolipoico. El bisulfito se reduce luego a SH^- por un sistema análogo al señalado anteriormente.

En *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* se ha encontrado una tiosulfato reductasa que actúa en conjunción con el citocromo c_3 (red) y el H_2 y que da lugar a la reacción:



El sulfito puede ser reducido como en el caso del formado por reducción del SO_4^{2-} o puede ser reducido a $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Para esto último se requiere citocromo c_3 , ferredoxina o flavodoxina e hidrogenasa.

En *Thiobacillus denitrificans* creciendo anaerobiamente se ha encontrado una vía distinta para la reducción del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ que utiliza una tiosulfato sulfurotransferasa llamada rodonasa:



15.5 METABOLISMO DEL CARBONO EN LOS SULFATO REDUCTORES

Los reductores de sulfatos pueden utilizar un número muy limitado de fuentes de carbono. Este reducido espectro de sustratos utilizables se debe a que la oxidación con sulfato tiene un bajo rendimiento energético. El sulfato es el único aceptor final de electrones que debe ser primeramente activado reaccionando con ATP para dar adenosina fosfosulfato (APS). El APS es reducido a sulfito por transferencia de 2e^- ($E'_0 = -60\text{ mV}$) y el sulfito es reducido luego a sulfuro ($E'_0 = -116\text{ mV}$). Esto supone la transferencia de 6e^- o de tres transferencias de 2e^- , con tritronato y tiosulfato como intermediarios. Como consecuencia de estos relativamente bajos potenciales de óxido-reducción, la energía que puede obtenerse de la oxidación del sustrato es pequeña. Compárese con el O_2 ($E_0 = +820\text{ mV}$) y el NO_3^- ($E'_0 = +433\text{ mV}$).

La eliminación del acetato de los medios anaerobios se consideró durante mucho tiempo restringida a los metanógenos. Sin embargo, Pfennig y Biebl mostraron que los miembros del nuevo género *Desulfuromonas* producen sulfuro y oxidan acetato a CO_2 en presencia de azufre elemental. Por otra parte, *Desulfobacter postgatei* sólo puede utilizar acetato como sustrato orgánico para el crecimiento. En esta bacteria se han encontrado todos los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que se ha propuesto para la oxidación del acetato la vía referida en la figura 15.2.

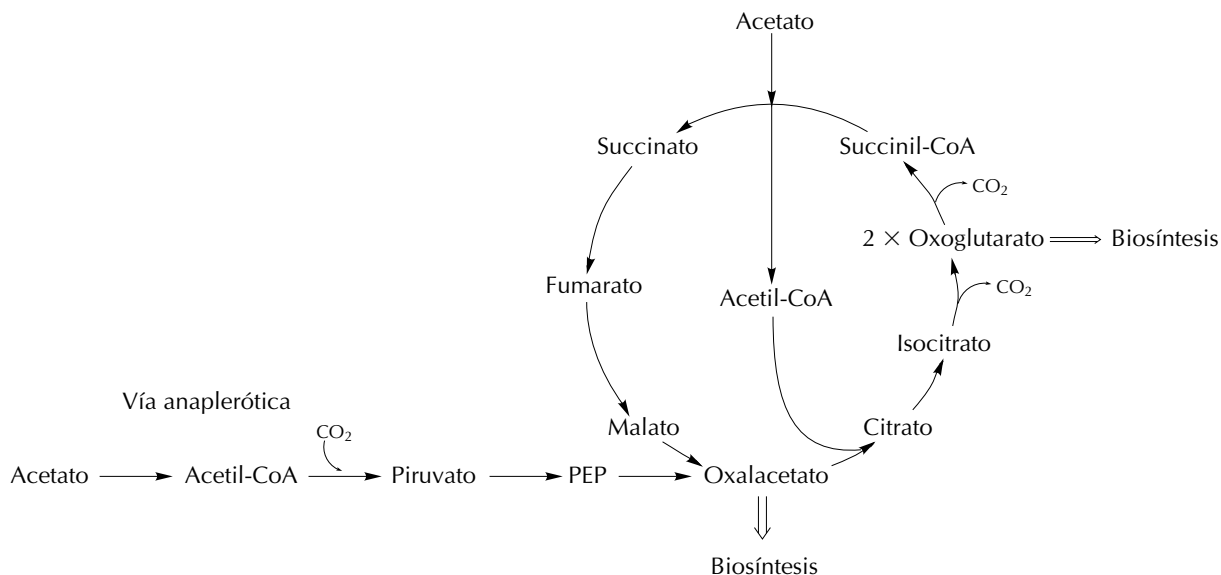


Figura 15.2 Metabolismo del acetato en *Desulfobacter postgatei*.

La fosforilación a nivel de sustrato no puede suministrar el ATP necesario para la reducción de sulfato y para el crecimiento. De este modo, se requiere el concurso de otro sistema generador de energía concomitante con la oxidación del acetato.

Actualmente se cree que la principal distinción taxonómica entre los reductores de sulfato debe situarse entre aquellos que pueden oxidar acetato y los que lo acumulan como resultado de la oxidación parcial de otros sustratos orgánicos.

Las fuentes de carbono sobre las que pueden crecer los reductores de sulfato pueden ser CO_2 , cierto número de compuestos orgánicos incluyendo el benzoato pero excluyendo azúcares e hidrocarburos y, finalmente, ácidos orgánicos desde el acetato al estearato. Sin embargo, hay un grupo que sólo puede oxidar parcialmente un número muy reducido de compuestos, como el lactato, y otro que puede oxidar una amplia variedad de fuentes de carbono, tales como ácidos grasos de peso molecular relativamente alto. En este último caso se encuentran los que acumulan acetato y los que pueden llevar a cabo su mineralización.

Aunque la glucosa no puede ser normalmente utilizada por los reductores de sulfatos, se han conseguido adaptar algunas cepas de *Desulfotomaculum nigrificans*. En estas cepas son simultáneamente funcionales las vías de Embden-Meyerhof y la de Entner-Doudoroff, lo cual es excepcional a pesar de que esta última vía se haya encontrado con carácter exclusivo en algunas bacterias anaerobias. En el caso referido, *Desulfotomaculum nigrificans* lleva a cabo un proceso

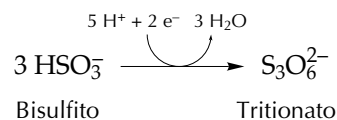
análogo a la oxidación del piruvato con SO_4^{2-} con un aporte adicional de producción interna de H_2 con electrones de baja energía.

Muchas especies, incluyendo *Desulfovibrio vulgaris* y *D. desulfuricans*, pueden oxidar H_2 con SO_4^{2-} . En estos casos, la asimilación del carbono, se reparte generalmente entre CO_2 y acetato en la proporción del 30% y del 70%, respectivamente. Sin embargo, hay especies que pueden crecer autotróficamente reduciendo CO_2 .

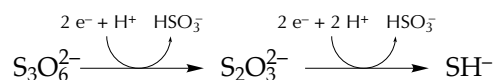
En diversas condiciones, muchos reductores de sulfato producen H_2 . Por lo tanto, al igual que ocurre con el acetato, el H_2 puede ser tanto sustrato como producto final del catabolismo.

15.6 BISULFITO REDUCTASAS

Todos los reductores de sulfatos tienen actividad bisulfito reductasa. Este enzima cataliza la reacción:



Luego, el tritionato se reduce a tiosulfato y éste a sulfuro:



Sin embargo, no está totalmente aclarada su intervención en la cantidad de SH_2 que puede formarse *in vivo*.

La bisulfito reductasa de *Desulfovibrio* se ha identificado a través del pigmento desulfoviridina, el cual se detecta por fluorescencia a la radiación ultravioleta. Sin embargo, se conocen tres especies de *Desulfovibrio* que no presentan esta característica: *D. baculatus*, *D. sapovorans* y una cepa de *D. desulfuricans*. La desulfoviridina ha sido reemplazada por la desulforrubidina, que no es fluorescente a la radiación ultravioleta y que tiene color pardo rojizo en lugar de verde. Ambos pigmentos son proteínas con hierro no hemínico en un grupo prostético denominado sirohemo, el cual está constituido por un tetrapirrol quelado con hierro con dos anillos pirrol reducidos.

La desulfoviridina ha sido detectada en *Desulfococcus multivorans* y *Desulfonema limicola*, y la desulforrubidina en *Desulfobacter postgatei*. Por lo tanto, se han reconocido dos bisulfito reductasas en algunos reductores de sulfatos, pero en contra de lo que se creyó durante muchos años, ninguna de ellas constituye una característica distintiva a nivel de género.

- ODOM, J. M. y PECK, H. D. Hydrogenase, electrontransfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Ann. Rev. Microbiol.* 38, pp. 551–92, 1984.
- HAMILTON, W. A. Sulfate-Reducing Bacteria. (En Anaerobic microbial corrosion). *Ann. Rev. Microbiol.* 39, pp. 206–215, 1985.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

P_{ARTE} E

REDUCTORES ORGÁNICOS Y COMPUESTOS C₁

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

16.1	ATAQUE PRIMARIO DE LAS FUENTES ORGÁNICAS DE PODER REDUCTOR	216
16.2	OXIDACIÓN DE ALCANOS Y ALQUENOS	216
16.3	SISTEMA DE LA ω -HIDROXILASA	218
16.4	OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	218
16.5	LA α -OXIDACIÓN	218
16.6	LA β -OXIDACIÓN	219
16.7	FORMACIÓN DE PROPIONIL-CoA	220
16.8	OXIDACIÓN A ω -HIDROXIÁCIDOS	221
	BIBLIOGRAFÍA	222

16.1 ATAQUE PRIMARIO DE LAS FUENTES ORGÁNICAS DE PODER REDUCTOR

La formación de productos finales del catabolismo (tratado en la parte C) requiere un reductor que, normalmente, es un sustrato orgánico externo. El desarrollo de la biomasa en el cultivo puro va unido a la desaparición paulatina de dicho sustrato. Ya ha sido referida la forma en que diversos sustratos orgánicos de bajo peso molecular pueden mineralizarse o dar lugar a diferentes productos orgánicos, generalmente más reducidos, junto a CO_2 .

El número de compuestos orgánicos susceptibles de oxidación por las bacterias es mucho mayor que el que ha sido considerado en los capítulos correspondientes a la formación de productos finales del catabolismo. En todos los casos tiene lugar una serie de reacciones, denominadas de ataque primario, a partir de las cuales los más diversos sustratos orgánicos se convierten en alguno de los productos que ha sido considerado como sustrato para la producción de productos finales. Cuando el oxígeno es el oxidante terminal, en casi todos los casos se produce un ataque primario que conduce a la producción de acetil-CoA.

Dejando aparte la oxidación de compuestos C_1 , pueden distinguirse tres tipos fundamentales de ataque primario: el de los compuestos alifáticos, el de los compuestos aromáticos y el de los compuestos nitrogenados. En cuanto al primer grupo, que es el objeto de este capítulo, los dos sistemas que cabe considerar fundamentalmente son el ataque primario de alcanos y alquenos y la oxidación de los ácidos grasos de elevado peso molecular.

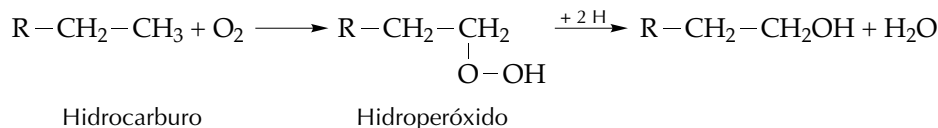
El ataque primario aerobio puede conducir a la mineralización, pero en otros casos se acumulan productos resultantes de la oxidación parcial del sustrato, tal como ya ha sido comentado anteriormente, sobre todo al tratar de las bacterias del ácido acético (capítulo 5). Puede señalarse que la predicción que Pasteur realizó después de sus estudios sobre distintas fermentaciones ("llegará un día, estoy convencido, en el que los microbios serán utilizados en ciertas operaciones industriales debido a su habilidad para atacar la materia orgánica") se ha confirmado ampliamente.

No se considerará aquí de forma especial la utilización de aquellos sustratos orgánicos que sólo pueden ser utilizados por el microbio después de una digestión exógena previa. No obstante, ésto tiene una gran importancia ecológica, pero está fuera del marco desarrollo microbiano/medio de cultivo sobre el que se ha circunscrito fundamentalmente la perspectiva de este libro.

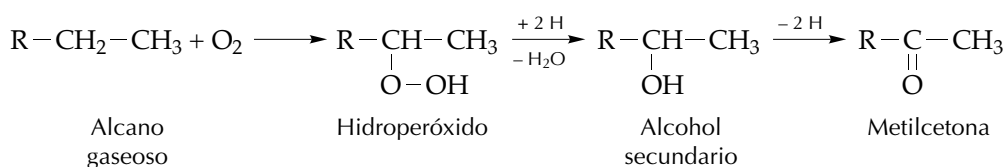
16.2 OXIDACIÓN DE ALCANOS Y ALQUENOS

La oxidación de alcanos y alquenos implica la asimilación de O_2 molecular. Esta asimilación puede ser llevada a cabo por un grupo relativamente reducido de bacterias, entre las que se encuentran miembros del género *Pseudomonas* y miembros del grupo corineforme y actinomice-tos, especialmente de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*.

El tipo más común de oxidación de los hidrocarburos parafínicos (cadena larga), es la *oxidación monoterminal* hasta ácido graso, seguida por la β -oxidación de este último. El primer producto de esta secuencia es un alcohol primario. Cuando el hidrocarburo capta el O_2 molecular se forma, probablemente, el hidroperóxido intermediario.



Los alcanos gaseosos (cadena corta), también pueden ser oxidados en un carbono subterminal para dar metilcetonas. Este tipo de oxidación se llama *oxidación subterminal*.



Este es el caso encontrado en una cepa de *Brevibacterium* que oxida el propano hasta acetona.

Pseudomonas aeruginosa crece sobre 2-metilhexano y produce una mezcla de ácidos:



Esto sugiere que el organismo debe ser capaz de atacar la cadena de hidrocarburos por los dos extremos. Un fenómeno parecido se ha descrito en la oxidación del decano y el dodecano por una cepa de *Corynebacterium*. Este tipo de oxidación se llama *oxidación biterminal*.

En último extremo, tanto en un caso como en el otro, tiene lugar inicialmente la oxidación del grupo metilo con la formación del correspondiente alcohol o cetona (oxidación subterminal).

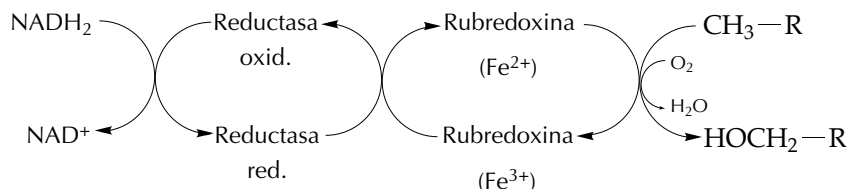
Los alcoholes primarios formados inducen la síntesis de una alcohol-deshidrogenasa independiente de NAD^+ y $NADP^+$, unida a la estructura celular. La misma bacteria dispone de deshidrogenasas constitutivas que son solubles y dependientes del $NADP^+$ (*Pseudomonas aeruginosa*).

Algunas bacterias producen ceras de palmitato cuando se desarrollan en alcanos líquidos de cadena larga. La fracción alcohol del éster corresponde al hidrocarburo del sustrato.

Hay cepas bacterianas que pueden utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono, si bien conservan la propiedad de utilizar más rápidamente otros sustratos para el crecimiento. Ciertos hidrocarburos se utilizan únicamente como cosustratos. Esto es, el organismo utiliza otro sustrato como fuente de energía y simultáneamente oxida al hidrocarburo. Este último no es oxidado completamente sino sólo en una o dos etapas. Este mecanismo se llama *co-oxidación* o *cometabolismo* de los hidrocarburos.

16.3 SISTEMA DE LA ω -HIDROXILASA

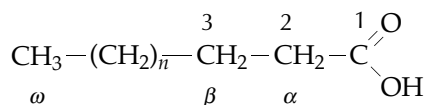
La hidroxilación del grupo metilo constituye un sistema oxidásico de función mixta o de monooxigenasa. El más conocido es el sistema de la ω -hidroxilasa de *Pseudomonas oleovorans*. Comprende 3 proteínas que han sido purificadas e identificadas como rubredoxina-NAD reductasa, rubredoxina y ω -hidroxilasa



En *Corynebacterium* el sistema ω -hidroxilasa activador del O_2 no está constituido por la rubredoxina sino por el citocromo P_{450} . En ambos casos la formación del hidroperóxido intermediario está todavía por demostrar.

16.4 OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los átomos de carbono del ácido graso se numeran a partir del carboxilo.



Los átomos de carbono 2 y 3 se indican como α y β y el carbono del metilo del extremo distal de la cadena se llama carbono ω .

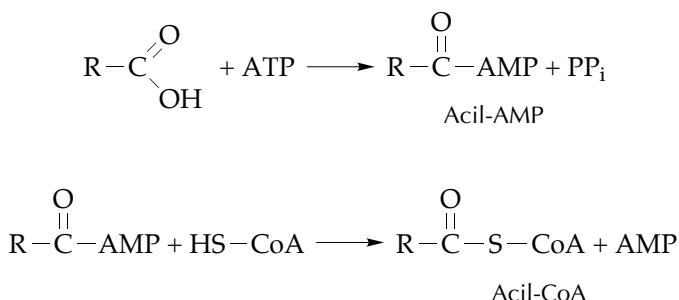
Los ácidos grasos pueden formarse a partir del ataque primario de hidrocarburos por el sistema de la ω -hidroxilasa y luego la carboxilación oxidativa en dos etapas, pasando por el aldehído. Ulteriormente, el ácido graso puede ser oxidado en el carbono α , en el β o en el ω .

16.5 LA α -OXIDACIÓN

La α -oxidación de los ácidos grasos de elevado peso molecular se lleva a cabo mediante un sistema enzimático que cataliza la hidroxilación en el carbono 2. El resultado de esta reacción oxidativa es de ordinario la descarboxilación con formación de un ácido graso de un carbono menos. La primera etapa de la formación del α -hidroxiácido es una reacción de una oxidasa de función mixta y la segunda es una descarboxilación oxidativa. Sin embargo, el mecanismo de la α -oxidación de los ácidos grasos es todavía poco conocido.

La β -oxidación es un sistema de oxidación de los ácidos grasos muy bien conocido y probablemente el que tiene lugar con mayor frecuencia. De la β -oxidación resulta la formación continuada de unidades de ácido acético (acetil CoA), a medida que la longitud del ácido graso original se reduce en dos carbonos cada vez.

La primera etapa es la activación del ácido graso por formación del correspondiente acil-CoA. Esta activación ocurre en dos reacciones.

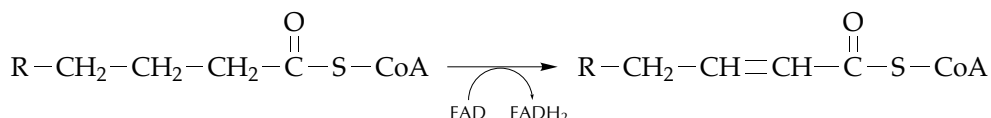


Estas dos reacciones se hacen irreversibles porque la pirofosfatasa hidroliza el pirofosfato (PP_i) a fosfato inorgánico. Se requieren iones magnesio.

La formación del tioéster del ácido graso (acil-CoA) también puede tener lugar directamente, por transferencia del coenzima A, a partir de otro acil-CoA, que puede ser el producto final de la oxidación del ácido graso inicial:

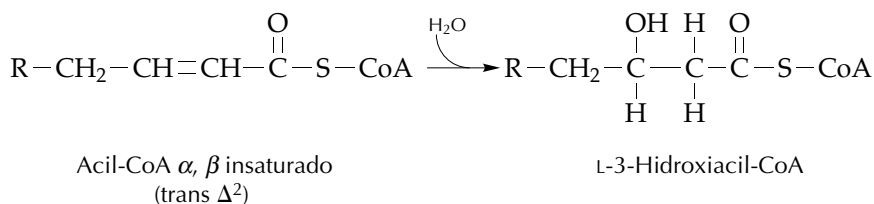


Después viene una secuencia repetitiva de cuatro reacciones. En la primera el acil-CoA es deshidrogenado entre los carbonos α y β por la acil-CoA deshidrogenasa, formándose el acil-CoA insaturado entre los carbonos 2 y 3:

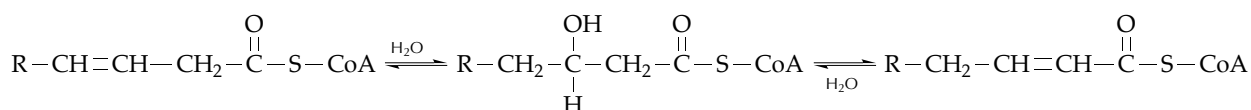


Se conocen por lo menos dos formas de este enzima, ambas metalo-proteínas. El grupo prostético es el FAD. Hay una E (Cu)-FAD que ataca los ácidos grasos de cadena corta y otra E (Fe)-FAD para los de cadena más larga.

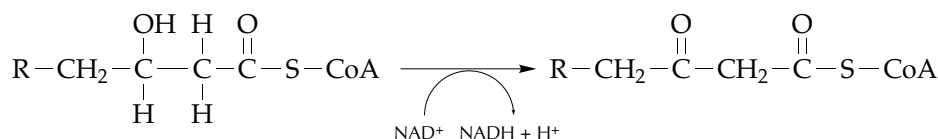
La siguiente reacción es la hidratación del doble enlace entre los carbonos 2 y 3. Se lleva a cabo por acción de la crotonasa:



No parece intervenir ningún coenzima y sólo produce los L-isómeros a partir del enlace trans- Δ^2 . Este enzima también actúa sobre el doble enlace cis- Δ^2 , pero entonces sólo produce el D-isómero. La crotonasa (acil-CoA hidratasa) proporciona asimismo un medio reversible de conversión de los ácidos β - γ insaturados (Δ^3) en α - β insaturados (Δ^2), a través del β -hidróxido común:

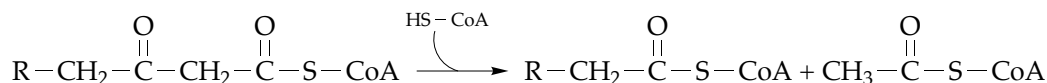


La tercera reacción es la oxidación del β -hidroxi-acil-CoA por la 3-hidroxi-acil CoA deshidrogenasa que utiliza NAD⁺:



Sólo se oxida el L-isómero.

La cuarta y última reacción de la secuencia es la reacción de la β -tiolasa. El β -cetoacil-CoA es escindido entre los carbonos 2 y 3 con la incorporación concomitante de un mol de CoA. El CoA original permanece en la molécula C₂:

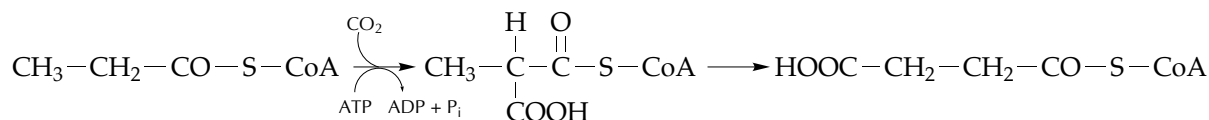


La reacción de la β -tiolasa forma un nuevo tioéster con una cadena de dos átomos de carbono menos que la original. El acil-CoA acortado puede seguir oxidándose partiendo de la reacción de la acil-CoA deshidrogenasa.

16.7 FORMACIÓN DE PROPIONIL-CoA

Los ácidos grasos que contienen un número par de átomos de carbono y que tienen la composición general C_{2n-1}H_{4n-1}COOH, pueden producir n moléculas de acetil-CoA. Los de número impar de fórmula C_{2n}H_{4n+1}COOH, proporcionarán una molécula de propionil-CoA y $n-1$ de acetil-CoA.

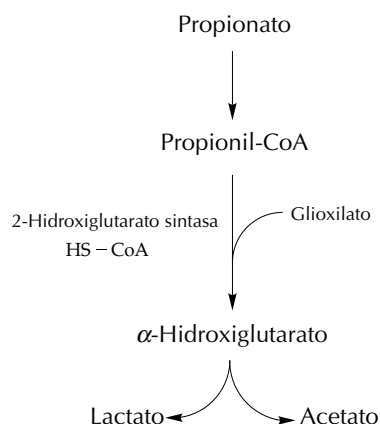
El propionil-CoA puede metabolizarse de dos maneras para su ulterior oxidación. Por una carboxilación inicial a metil malonil-CoA que luego se convertirá en succinil-CoA, el cual puede incorporarse al CAT:



O bien, tal como sucede en *E. coli*, el propionato se condensa con el glioxilato para dar α -hidroxiglutarato, que luego se desdobla en lactato y acetato.

El succinato puede ser oxidado por el CAT.

En *E. coli* el propionato se condensa con el glioxilato para dar α -hidroxiglutarato que luego se desdobla en lactato y acetato:



El destino ulterior del lactato es desconocido en este caso.

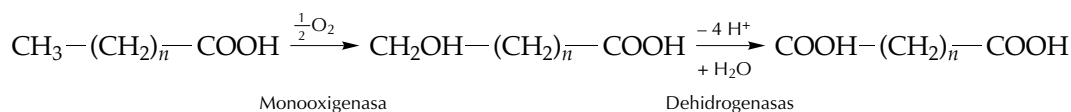
Algunas bacterias acumulan acetil fosfato, aparentemente como reserva energética. El acetil fosfato se convierte fácilmente en acetil-CoA mediante la fosfotransacetilasa:



Por otra parte, como ya ha sido comentado anteriormente, puede producir ATP y acetato.

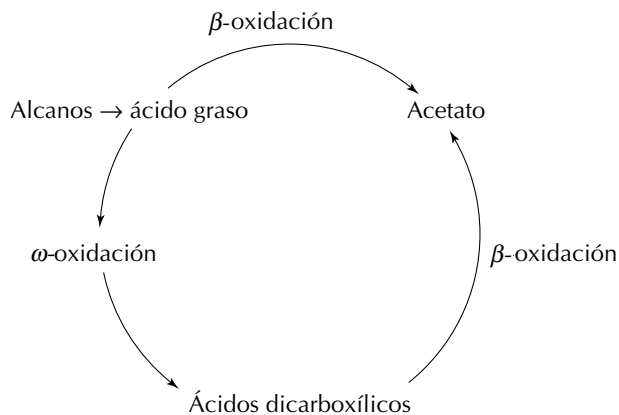
16.8 OXIDACIÓN A ω -HIDROXIÁCIDOS

Aparte la α y β oxidación, los ácidos grasos también pueden oxidarse a ω -hidroxiácidos que ulteriormente pueden pasar a ácidos dicarboxílicos:



La ω -oxidación requiere la participación de las cadenas respiratorias, posiblemente con citocromo P_{450} o tiorredoxina y NADPH-citocromo P_{450} reductasa.

En las especies de *Pseudomonas* los ácidos grasos producidos por hidrocarburos se oxidan simultáneamente por β y ω oxidación.



Cuando no tiene lugar la β -oxidación es cuando se acumulan ceras.

BIBLIOGRAFÍA

BOYD, G. S. y SMELLIE, R. M. S. (eds.). Biological Hydroxylation mechanisms. Academic Press. New York. 1972.

17.1	PROCESOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS	224
17.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN AEROBIA	224
17.3	LA ORTO-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO	224
17.4	LA META-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO	226
17.5	OXIDACIÓN DEL GENTISATO	228
17.6	OXIDACIÓN DEL D-MANDELATO Y OTROS PRECURSORES DEL CATECOL	229
17.7	OXIDACIÓN DEL <i>p</i> -HIDROXIBENZOATO Y OTROS PRECURSORES DEL ÁCIDO PROTOCATÉQUICO	231
17.8	RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VÍAS AEROBIAS DE OXIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS	232
17.9	INDUCCIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	233
17.10	DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	234
17.10.1	Obtención de metabolitos centrales a partir de intermediarios activados	236
17.10.2	Fotometabolismo anaerobio	237
17.10.3	Catabolismo por desnitrificantes	238
17.10.4	Fermentación	239
17.10.5	Degradación por reductores de sulfatos	239
17.10.6	Metabolismo en condiciones metanogénicas	239
	BIBLIOGRAFÍA	240

17.1 PROCESOS AEROBIOS Y ANAEROBIOS

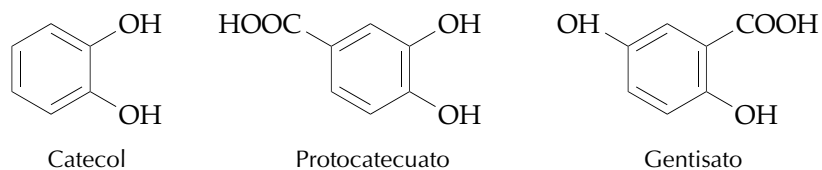
Las condiciones más apropiadas para el ataque primario de los compuestos aromáticos son fundamentalmente aerobias. Por este motivo han sido extensamente estudiadas desde hace tiempo y las vías metabólicas establecidas parecen ser los modelos válidos de la biodegradación de compuestos aromáticos, tanto naturales como xenobióticos. Por el contrario, el conocimiento de la degradación anaerobia ha permanecido largamente restringido a los pocos datos que se poseían relativos a los metanógenos y a algunas bacterias fototrofas. En los últimos diez años se han intensificado los esfuerzos destinados a comprender la biodegradación anaerobia de este tipo de compuestos orgánicos, tanto desde el punto de vista taxonómico como desde el de las vías metabólicas implicadas, habiéndose llegado a la conclusión de que su importancia en condiciones naturales debe ser realmente grande.

17.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN AEROBIA

La mayor parte de la información disponible sobre la respiración bacteriana de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio de especies del grupo *Pseudomonas*, pero, también puede ser llevada a cabo por corineformes, actinomicetos y, posiblemente, por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporógenos facultativos.

De forma general, la degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de mono- y dioxigenasas que lo transforman en un fenol dihidrico. El número de este tipo de moléculas es relativamente pequeño en comparación con la amplia variedad de sustratos susceptibles de ser degradados.

Se trata, por tanto, de vías catabólicas convergentes. Entre los intermediarios a los que convergen tales vías, hay que considerar tres como los más frecuentes: el catecol, el protocatecuato y el gentisato.



Estos compuestos son el sustrato de dioxigenasas que provocan la ruptura oxidativa del anillo aromático (Lámina 9).

17.3 LA ORTO-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO

Es la forma más general (fig. 17.1). El producto de la oxidación del protocatecuato es lactonizado por la 4-carboxi-cis,cis-muconato-cicloisomerasa (enzima lactonizante). La descarboxilación ulterior convierte la β -carboxi-muconolactona en β -ceto-adipato enol lactona mediante la 4-carboxi-muconolactona descarboxilasa. Una hidrolasa transforma este último intermediario en β -cetoadipato.

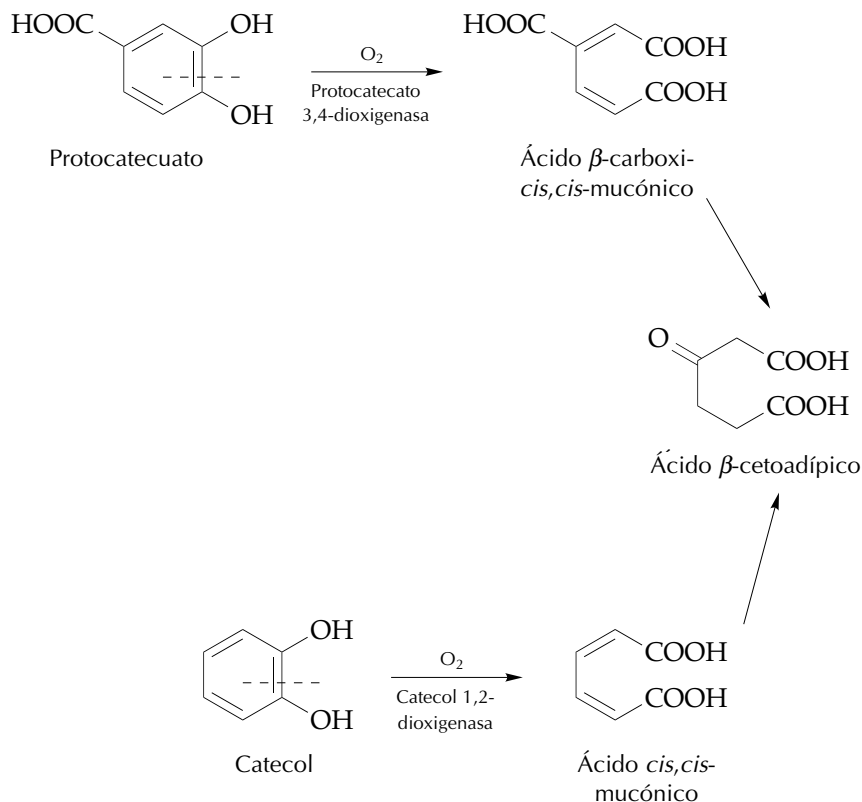
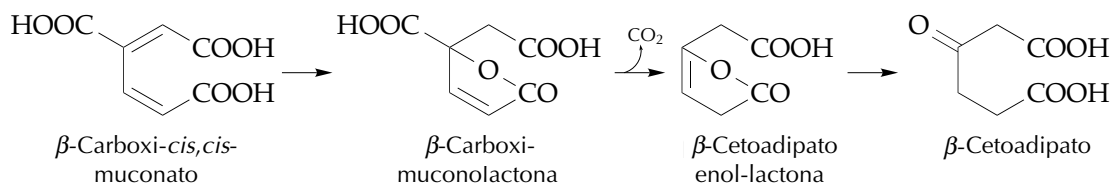
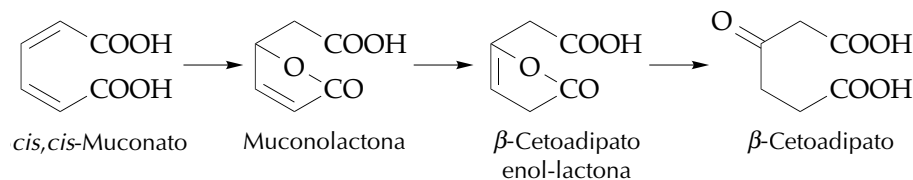


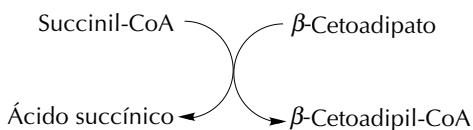
Figura 17.1 Orto-ruptura del anillo bencénico.



Por lo que respecta al *cis,cis*-muconato, un enzima lactonizante produce muconolactona que a su vez es convertida en β -cetoadipato enol lactona mediante una isomerasa:

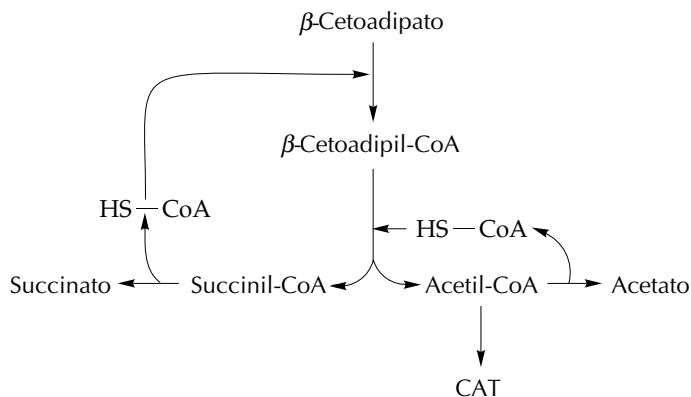


El β -cetoadipato se convierte en acetil-CoA y succinil-CoA, lo cual se lleva a cabo en dos etapas. La primera implica la formación de β -cetoadipil-CoA a partir de succinil-CoA:



El β -cetoadipil-CoA forma acetil-CoA y succinil-CoA gracias a la acetil-CoA acil transferasa y HS—CoA.

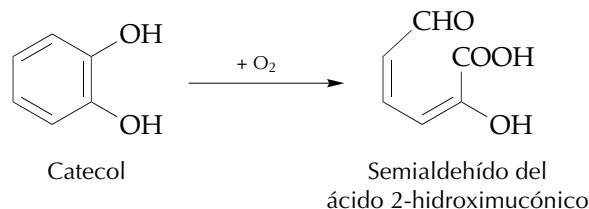
El ciclo completo puede esquematizarse de la siguiente forma:



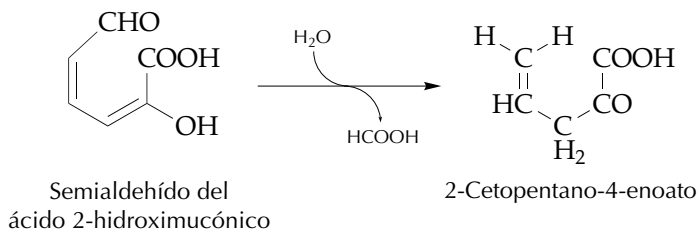
17.4 LA META-RUPTURA DEL ANILLO BENCÉNICO

Tanto el catecol como el ácido protocatéquico también son susceptibles de una meta-ruptura que puede ser predominante en catecoles sustituidos como el 3-metilcatecol. Los productos finales de esta vía son el piruvato y el acetaldehído.

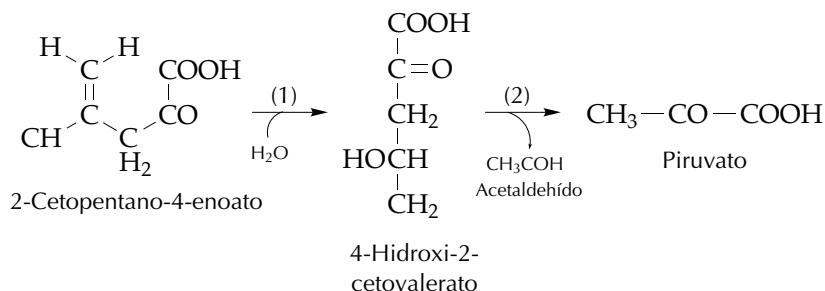
El catecol es roto por la catecol 2,3-oxigenasa, dando el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico. La ruptura del anillo bencénico no ocurre entre los dos hidroxilos, sino entre uno de éstos y el siguiente átomo de carbono.



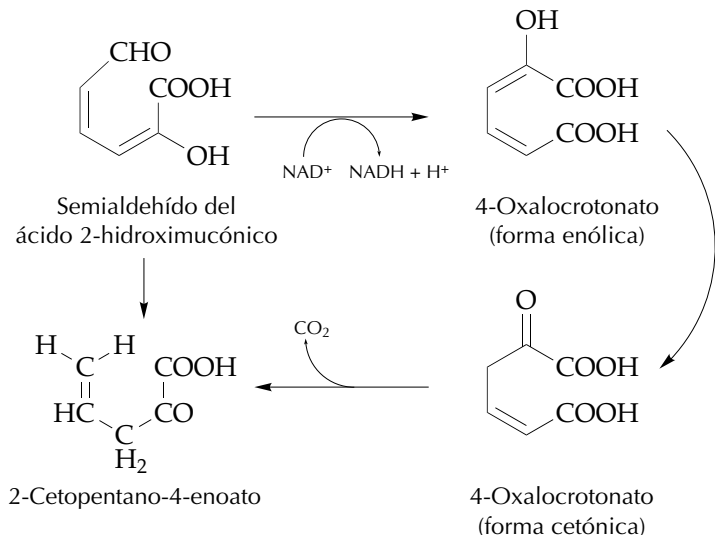
Una hidrolasa acepta una molécula de H_2O y produce formiato y 2-cetopentano-4-enoato.



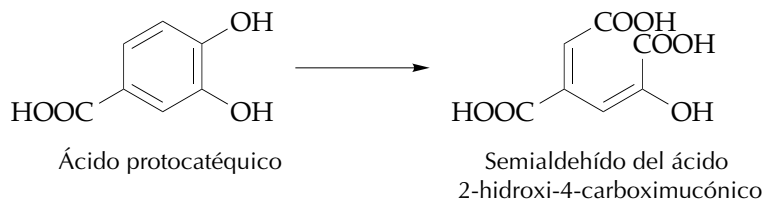
El 2-cetopentano-4-enoato se hidroliza a 4-hidroxi-2-cetovalerato con la 2-cetopentano-4-enoato hidratasa (1). Sigue la transformación a piruvato y acetaldehído por la 4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa (2):



Esta meta-fisión del anillo del catecol se encuentra en *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas arvilla*. En estas bacterias se lleva a cabo también una vía totalmente oxidativa del semialdehído del ácido 2-hidroxiimucónico, que es la única que tiene lugar en *Pseudomonas acidovorans*. En ellas el semialdehído del ácido 2-hidroxiimucónico se oxida a 4-oxalocrotonato (forma enólica) por la semialdehído del ácido 2-hidroxiimucónico deshidrogenasa que utiliza el NAD^+ . Mediante la 4-oxalocrotonato tautomerasa se forma luego la forma cetónica del 4-oxalocrotonato, la cual se descarboxila por la 4-oxalocrotonato descarboxilasa formándose el 2-cetopentano-4-enoato.

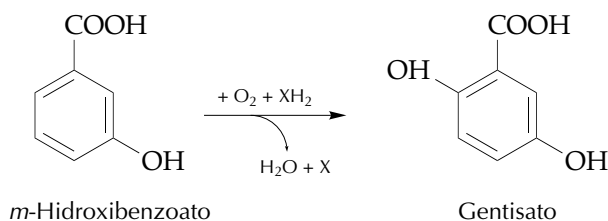


La oxidación meta del ácido protocatéquico es relativamente poco conocida. En *Pseudomonas desmolytica* y *Pseudomonas testosteroni* se forma el semialdehído del ácido 2-hidroxi-4-carboximucónico con la protocatecuato 4,5-oxigenasa. Este intermediario debe seguir una transformación similar a la del semialdehído del ácido 2-hidroxiimucónico.



17.5 OXIDACIÓN DEL GENTISATO

El gentisato es el tercer tipo de intermediario de oxidación de los hidrocarburos aromáticos. Esta vía fue descubierta en *Pseudomonas acidovorans* creciendo sobre *m*-hidroxibenzoato. La *m*-hidroxibenzoato-6-hidroxilasa lo convierte en gentisato



Este enzima es específico para la posición 6. En *Pseudomonas testosteronei* se hidroxila el ácido *p*-hidroxibenzoico en posición 4 para dar ácido protocatéquico.

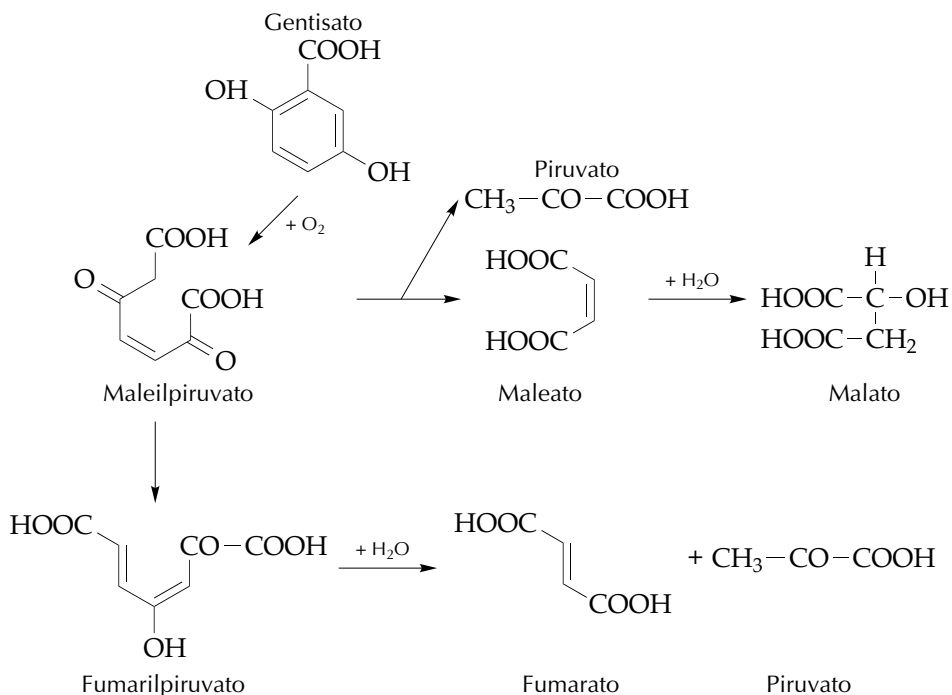


Figura 17.2 Hidrólisis del maleilpiruvato y del fumarilpiruvato.

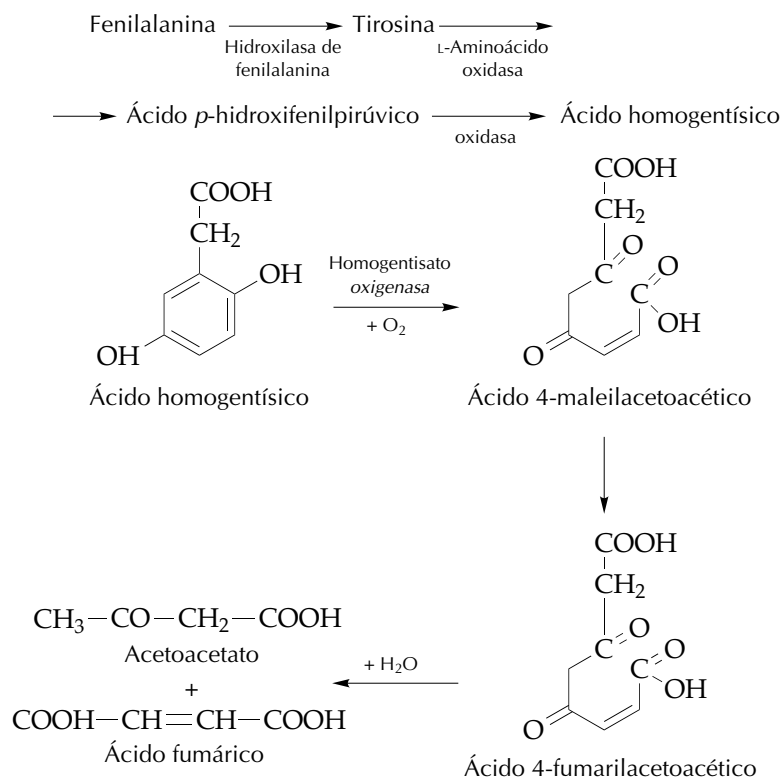


Figura 17.3 Oxidación de la fenilalanina.

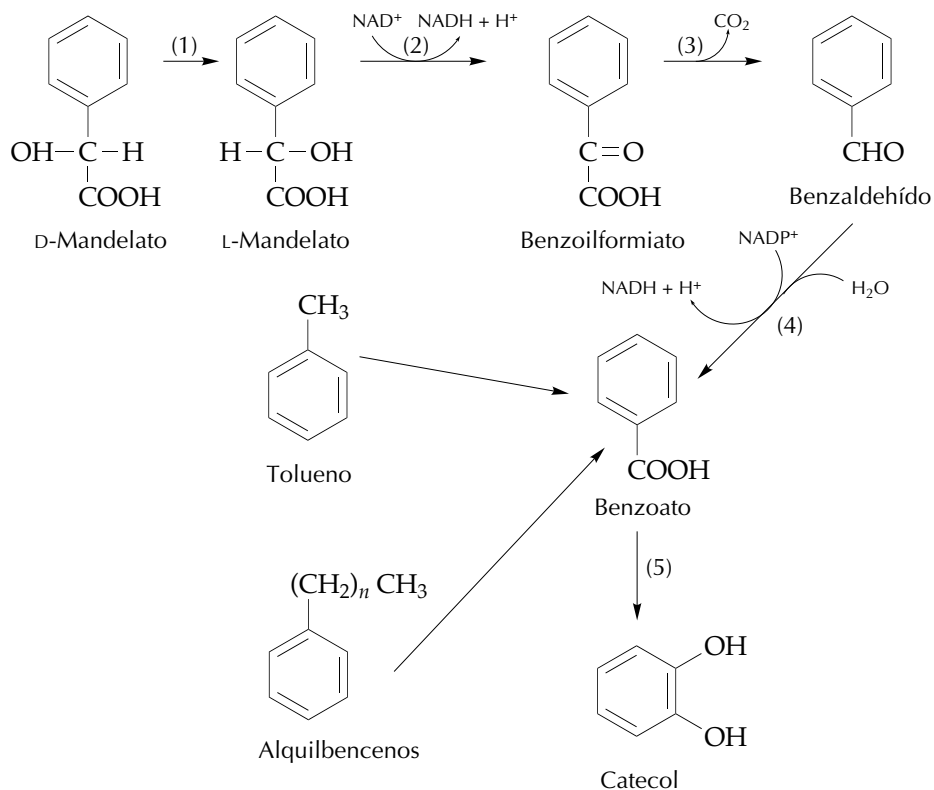
El gentisato es oxidado por la gentisato 1,2-dioxigenasa a maleilpiruvato. La siguiente isomerización a fumarilpiruvato requiere una concentración elevada de glutatión reducido. En *Pseudomonas acidovorans* el maleilpiruvato es fundamentalmente hidrolizado a piruvato y maleato que subsecuentemente se transforma en malato. En otras especies de *Pseudomonas* que forman fumarilpiruvato éste se hidroliza a fumarato y piruvato (fig. 17.2).

Una vía parecida es utilizada para la oxidación de la fenilalanina en la que se forma ácido homogentísico, el cual se abre de la misma forma a ácido maleilacetoacético (fig. 17.3).

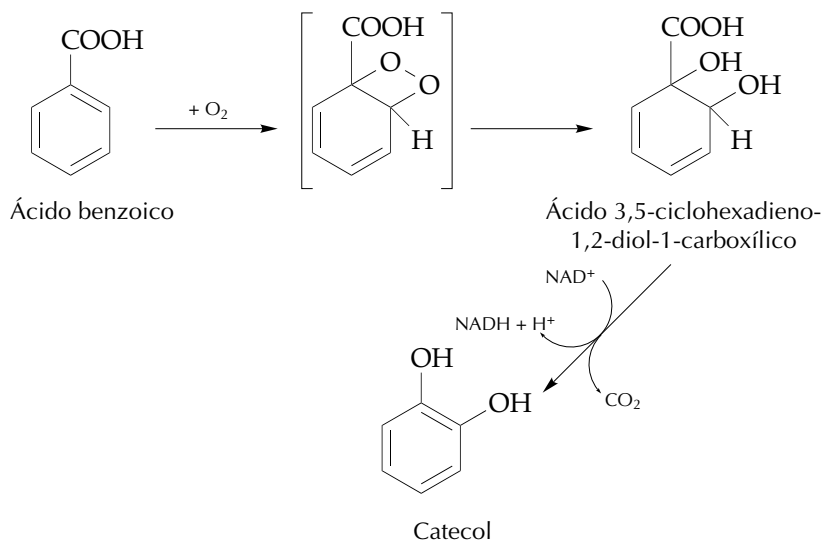
17.6 OXIDACIÓN DEL D-MANDELATO Y OTROS PRECURSORES DEL CATECOL

El D-mandelato es primero isomerizado a L-mandelato por una racemasa (1). Luego es oxidado a benzoilformiato por la L-mandelato deshidrogenasa que utiliza NAD^+ (2). La tercera etapa es una descarboxilación a benzaldehído por la benzoilformiato descarboxilasa (3). La cuarta etapa es una oxidación ligada al $NADP^+$ catalizada por la benzaldehído deshidrogenasa que forma benzoato (4). El benzoato se transforma en catecol por la benzoato 1,2 dioxigenasa (5).

El benzoato es también el intermediario de la oxidación del tolueno y de alquilbencenos.

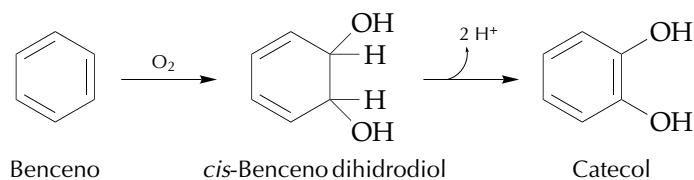


La reacción (5) de la benzoato 1,2 dioxigenasa sigue el mecanismo de dioxidación:

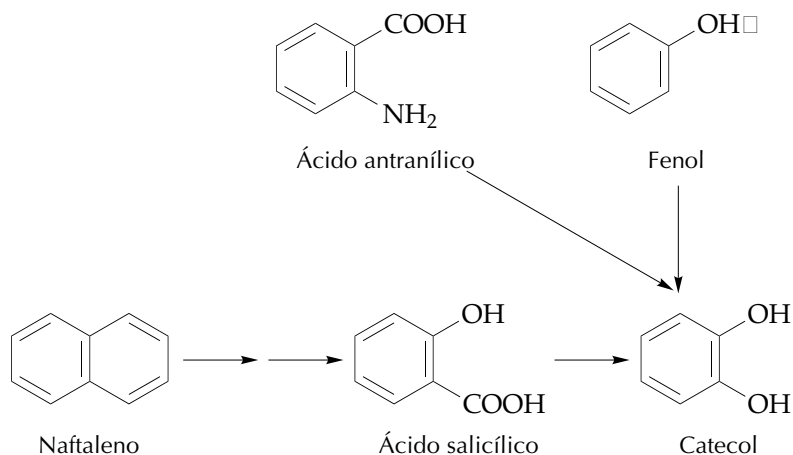


Este enzima es análogo al del que se requiere para la oxidación del benceno a catecol, en un proceso que no requiere de descarboxilación:

17.7 OXIDACIÓN DEL *p*-HIDROXIBENZOATO Y OTROS



Estas reacciones han sido estudiadas principalmente en extractos de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*. En miembros de este último género se ha podido estudiar la oxidación del fenol, del ácido antranílico y del naftaleno a catecol:



17.7 OXIDACIÓN DEL *p*-HIDROXIBENZOATO Y OTROS PRECURSORES DEL ÁCIDO PROTOCATÉQUICO

El *p*-hidroxibenzoato y otros compuestos aromáticos dan β -cetoadipato después de la orto-ruptura, pasando por el intermediario ácido protocatéquico en lugar de catecol (fig. 17.4). La primera reacción es una mono-oxigenación con la 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa dependiente de FAD (1). Se forma 3,4 dihidroxibenzoato, el cual es oxidado por la 3,4-dioxigenasa del ácido protocatéquico dando β -carboxi-*cis,cis*-muconato (2). El mecanismo de esta reacción es análogo al del catecol. Se realiza en *Pseudomonas putida* y de forma parecida en *Acinetobacter calcoaceticus*.

El 2,4-xilenol también se oxida a ácido protocatéquico, como el quinato, el siquimato y el vanilato. El toluato se oxida a *p*-hidroxibenzoato (fig. 17.4).

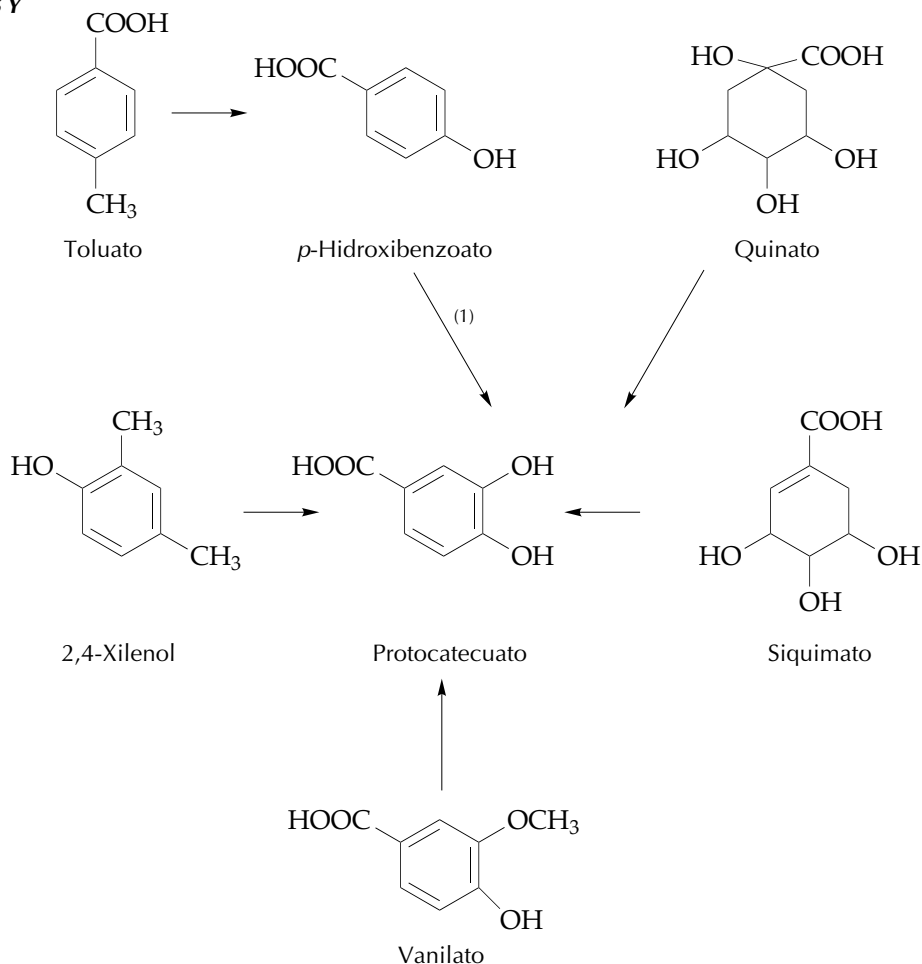
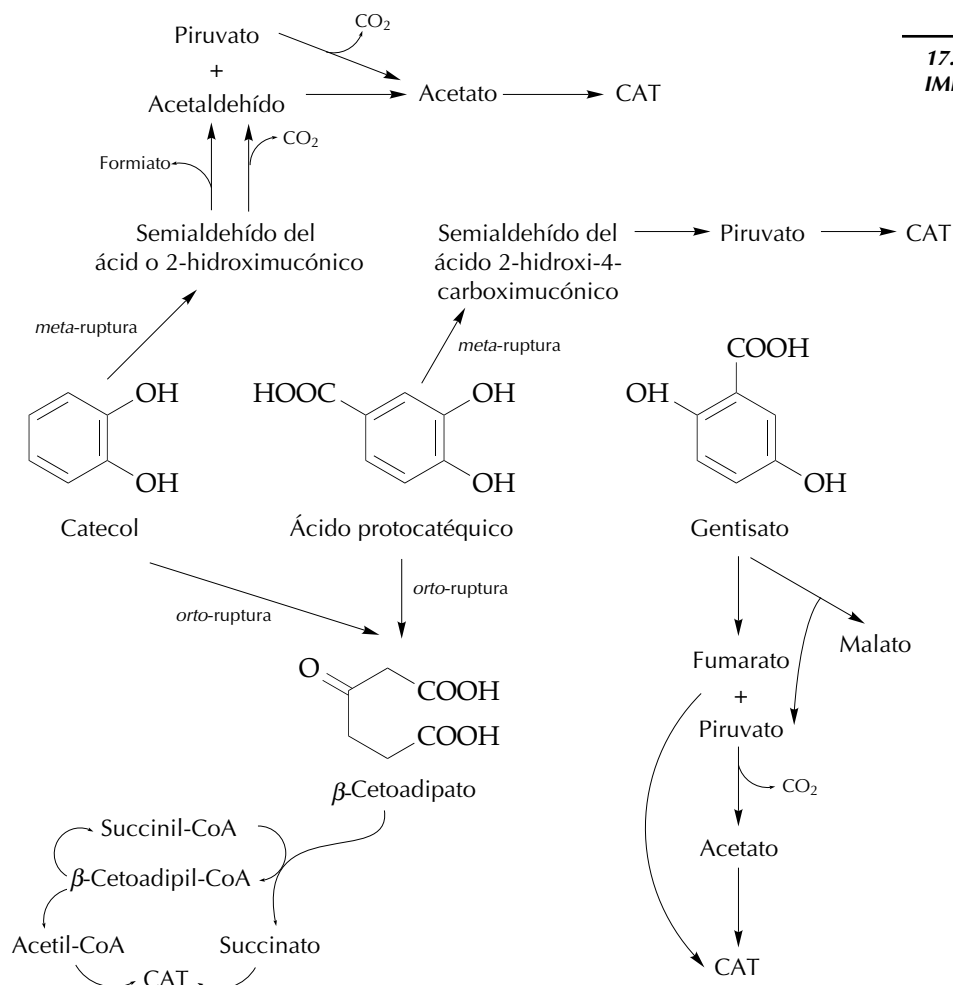


Figura 17.4 Oxidación del *p*-hidroxibenzoato y otros precursores del ácido protocatéutico.

17.8 RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS VÍAS AEROBIAS DE OXIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS

Los diversos hidrocarburos aromáticos pueden oxidarse aerobias hasta acetato y otros ácidos que se oxidan en el CAT. El semialdehído del ácido 2-hidrox-4-carboximucónico da productos finales que también deben entrar en el mismo sistema de oxidación terminal.



17.9 INDUCCIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

Los enzimas de las vías metabólicas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos suelen ser inducibles y, corrientemente de codificación plasmídica. Teniendo en cuenta que en muchos casos las vías catabólicas son ramificadas, con intermediarios comunes a la degradación de moléculas diferentes, la inducción de la síntesis de enzimas específicos se realiza de ordinario de forma secuencial, en función de la presencia de un determinado sustrato o intermediario de la vía. Además, microorganismos diferentes presentan modelos de regulación diferentes. Así, para la degradación de protocatecuato siguiendo la vía del 3-oxoadipato en *P. putida*, el protocatecuato induce el primer enzima, su oxigenasa. El resto de los enzimas es inducido por el 3-oxoadipato (fig. 17.5). En cambio, en *Acinetobacter* el protocatecuato induce la totalidad de los enzimas. En la misma vía, la degradación del catecol presenta una estrategia diferente: mientras

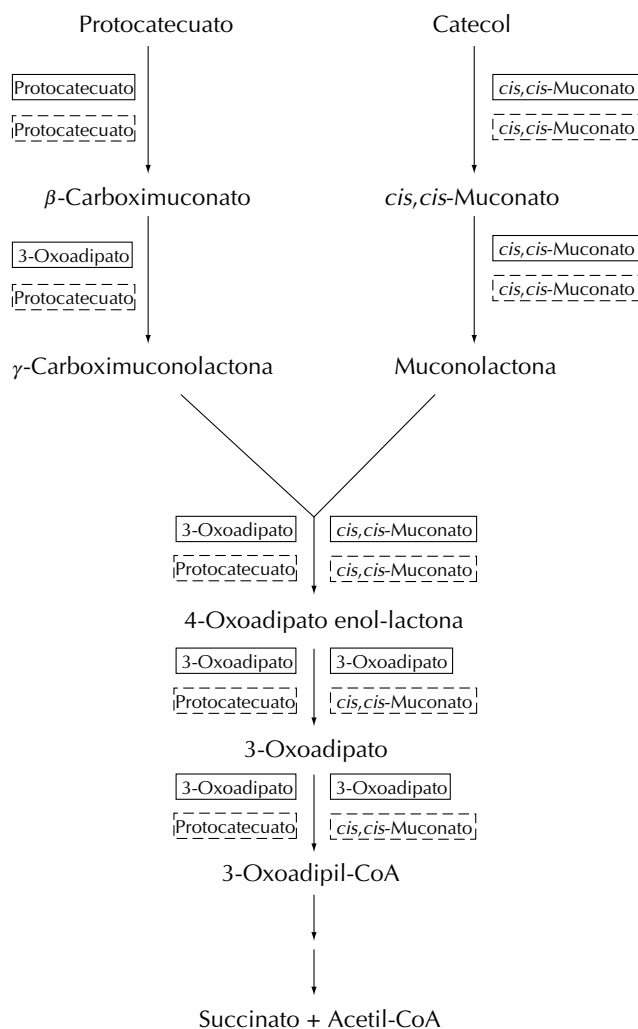


Figura 17.5 Esquema de la inducción de los enzimas de la vía del 3-oxoadipato en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. A la izquierda se indican los inductores cuando el sustrato es el protocatecuato (en rectángulo continuo, en *Pseudomonas*; en discontinuo, en *Acinetobacter*) y a la derecha los inductores cuando el sustrato es el catecol.

que en *P. putida* es el *cis,cis*-muconato el inductor de la oxigenasa del catecol y de los dos enzimas siguientes, siendo el 3-oxoadipato el inductor de los restantes, en *Acinetobacter* es el *cis,cis*-muconato el único responsable de la inducción de todos los enzimas (fig. 17.5).

17.10 DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

A diferencia de la degradación aerobia, en ambientes anaerobios la degradación de compuestos aromáticos implica la reducción de los dobles enlaces del núcleo aromático (Lámina 10).

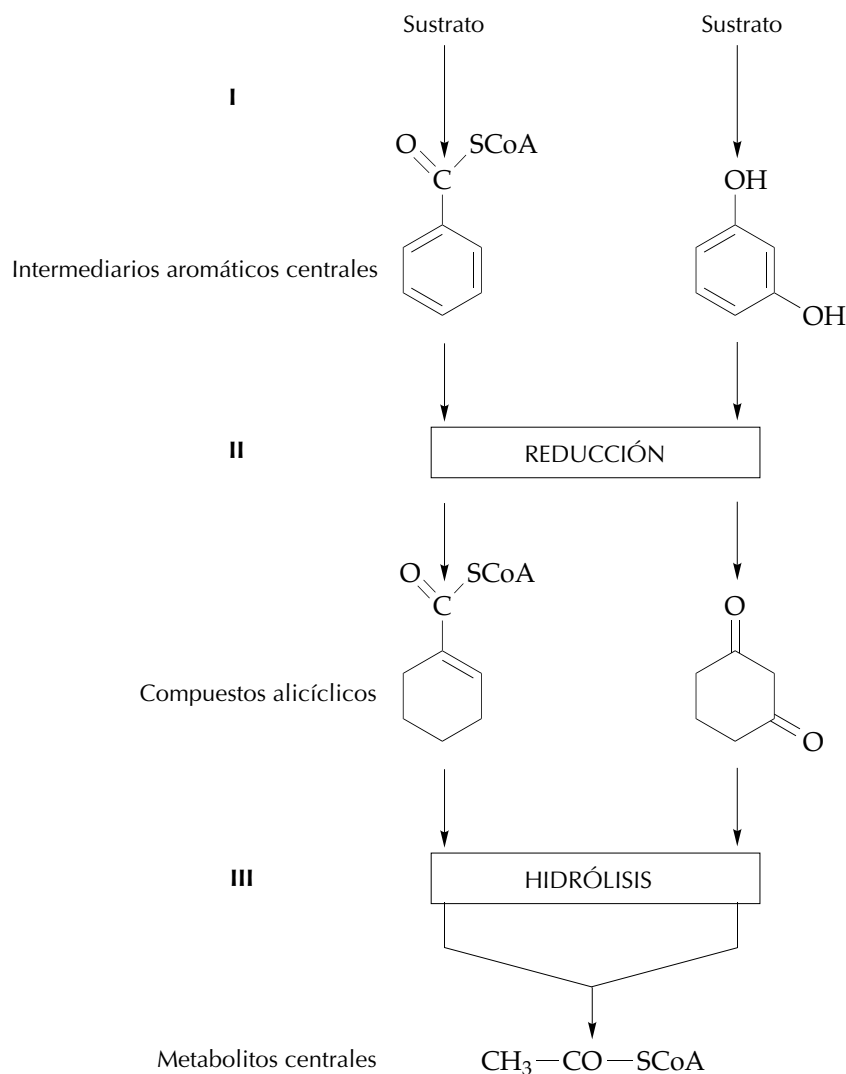


Figura 17.6 Etapas de la degradación anaerobia de compuestos aromáticos.

La degradación anaerobia tiene lugar en tres etapas (fig. 17.6). En la primera de ellas, el sustrato ha de ser activado. Esta activación implica carboxilaciones, hidroxilaciones anaerobias o formación de tioésteres del correspondiente ácido aromático con el acetil-CoA. La segunda etapa implica el ataque enzimático mediante reductasas de los intermediarios activados. Los compuestos alicíclicos resultantes son ulteriormente hidrolizados. Finalmente, los compuestos no cíclicos son convertidos en metabolitos centrales mediante vías metabólicas convencionales, y probablemente generan acetil-CoA y CO_2 .

Anaerobiamente, los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a CO_2 por cultivos puros de bacterias que realicen respiración anaero-

bia (p. ej. del nitrato o del sulfato) o por bacterias fototróficas. En cambio, las bacterias metanógenas degradan los compuestos aromáticos en cultivos mixtos.

17.10.1 Obtención de metabolitos centrales a partir de intermediarios activados

Los intermediarios aromáticos activados que se encuentran en los procesos anaerobios son en la mayoría de los casos el benzoil-CoA, el resorcinol y el floroglucinol. En la figura 17.7 se representa la transformación de algunos compuestos aromáticos en tales intermediarios.

Por lo que respecta a la reducción del anillo aromático, en el caso del benzoil-CoA se ha podido demostrar recientemente *in vitro* a partir de una especie desnitrificante de *Pseudomonas*. La reacción, además del benzoil-CoA requiere agentes reductores fuertes tales como el Ti (III), Na₂SO₄ o NaBH₄. Los intermediarios en la degradación del benzoil-coA se representan en la figura 17.8. El último compuesto alicíc-

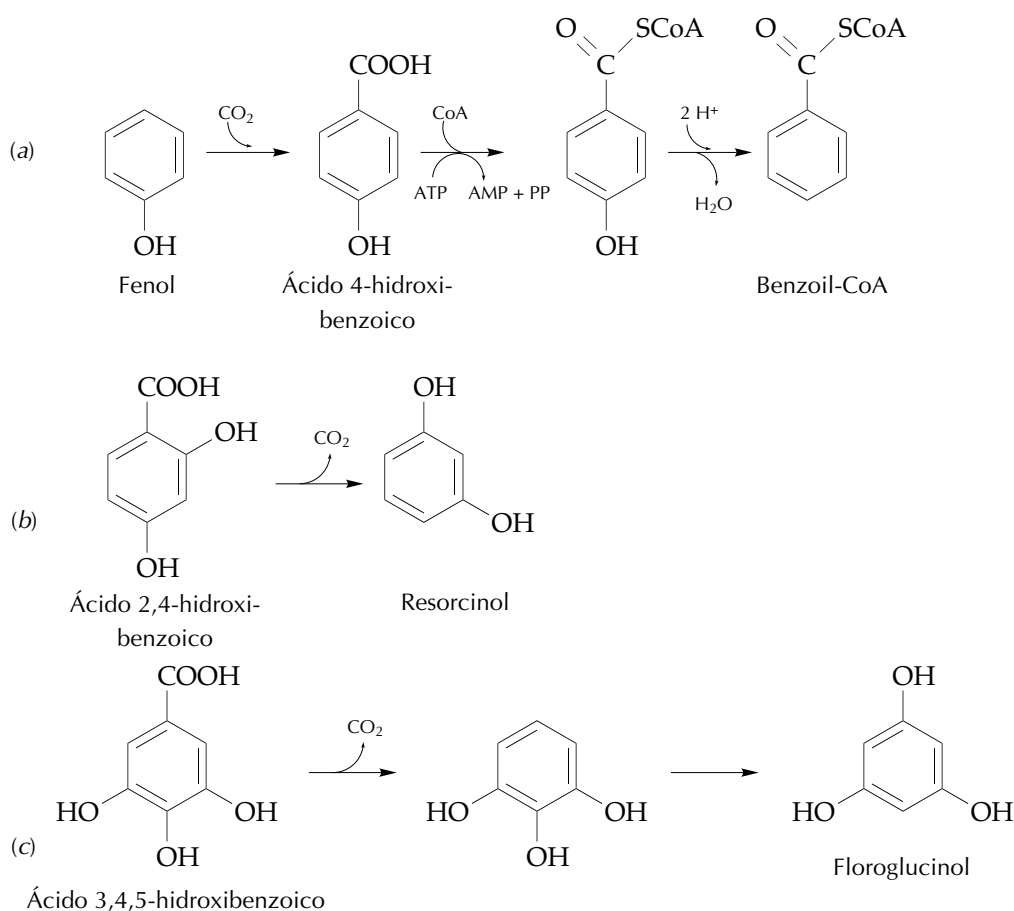


Figura 17.7 Transformaciones de algunos compuestos aromáticos en benzoil-CoA (a), resorcinol (b) y floroglucinol (c).

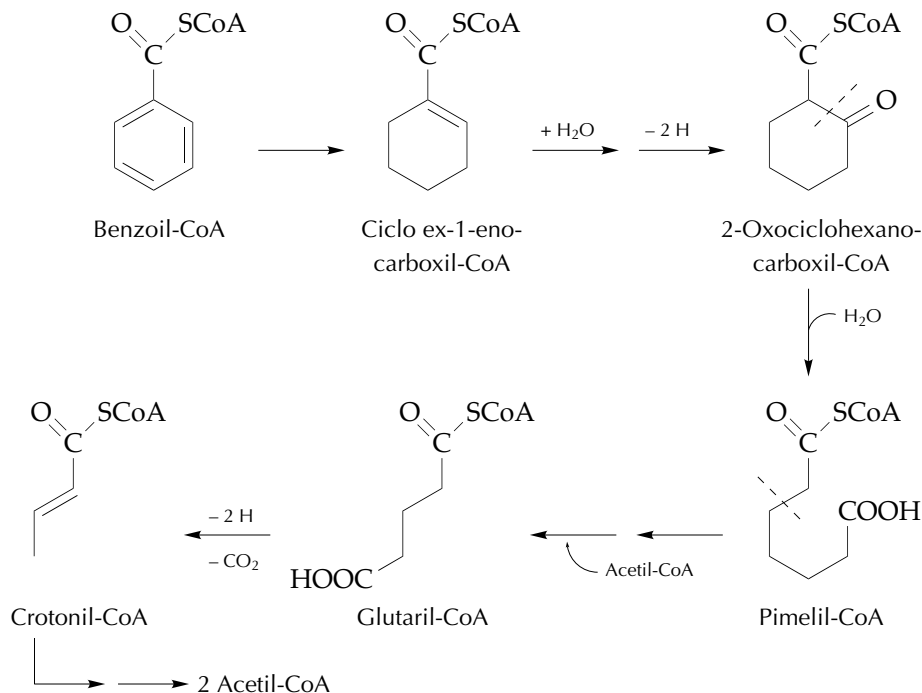


Figura 17.8 Degradación anaerobia del benzoil-CoA.

clico parece ser el 2-oxociclohexano-1-carboxil-CoA. Probablemente, el mismo es hidrolizado a pimelil-CoA, el cual puede ser degradado mediante β -oxidación a glutaril-CoA.

El floroglucinol resulta de la degradación de algunas moléculas con estructura de trihidroxibenceno. Puede ser fácilmente reducido mediante reductores débiles. El producto final es el acetil-CoA (fig. 17.9a).

El resorcinol resulta de la degradación de ácidos dihidroxibenzoicos y es reducido a 1,3-dioxociclohexano por un *Clostridium* fermentador (fig. 17.9b).

17.10.2 Fotometabolismo anaerobio

Las bacterias rojas no sulfúreas (*Rhodospirillaceae*) utilizan compuestos orgánicos como fuente principal de poder reductor y carbono para el crecimiento. Algunas especies también pueden crecer aerobiamente en la oscuridad a través del metabolismo oxidativo de sustratos orgánicos.

Rhodopseudomonas palustris puede utilizar el benzoato como única fuente de carbono y poder reductor en condiciones anaerobias. El benzoato puede ser utilizado también aerobiamente, pero otros benzenoides sólo pueden ser degradados de una sola manera, bien sea por respiración o por fotometabolismo anaerobio. Los compuestos de la vía reductora de Dutton y Evans han sido identificados como inter-

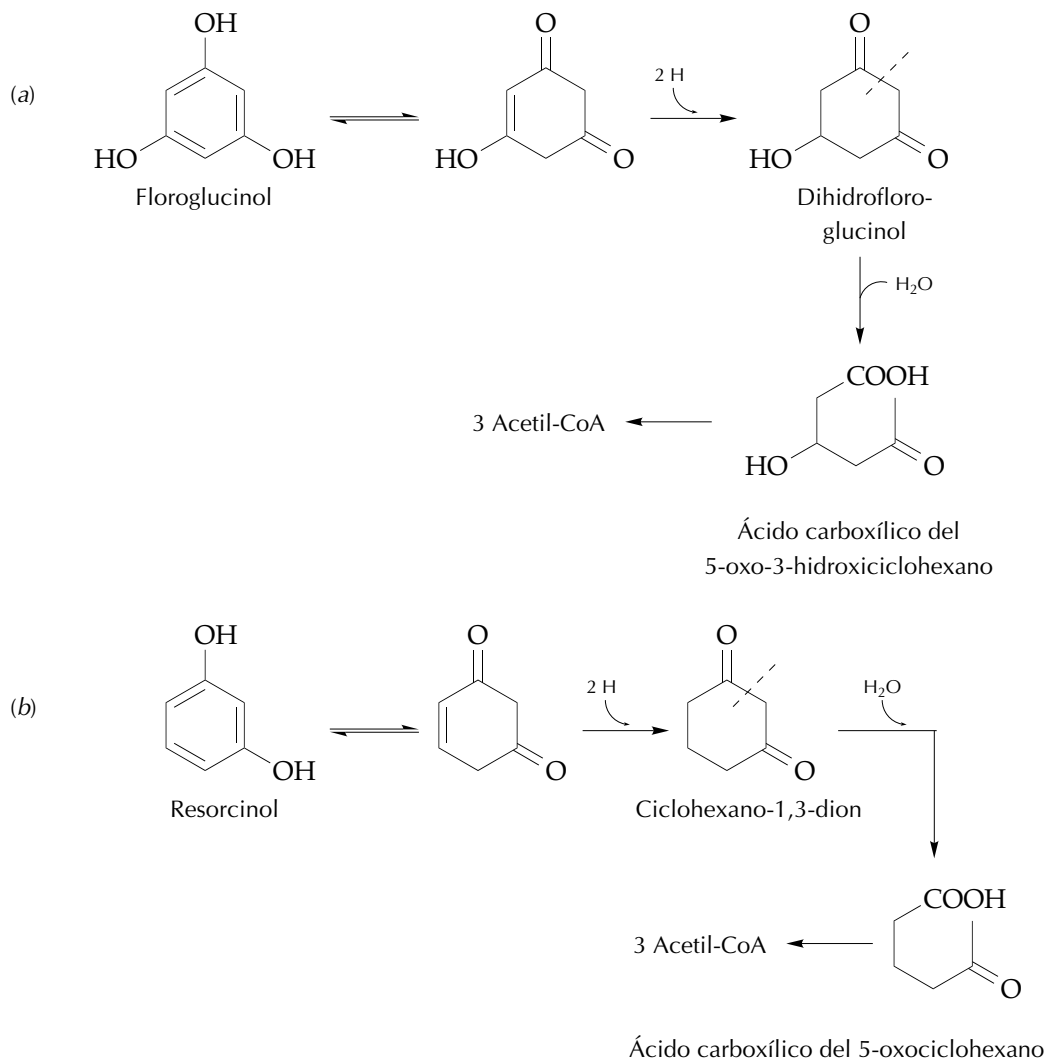


Figura 17.9 Degradación del floroglucinol (a) y del resorcinol (b).

mediarios de la degradación anaerobia del benzoato por *R. palustris*. Los enzimas utilizados son inducidos por el sustrato y la reducción inicial se lleva a cabo por una reductasa acoplada a un componente de bajo potencial redox del sistema de transporte de electrones inducido por la luz, probablemente ferredoxina.

17.10.3 Catabolismo por desnitrificantes

Algunas bacterias desnitrificantes pueden crecer en condiciones anaerobias con nitrato y utilizando un bencenoide como único sustrato. Así, Taylor demostró que la cepa PN-1 de *Pseudomonas* puede crecer sobre varios compuestos aromáticos, tanto aerobia como anaerobias, respirando nitrato.

Recientemente se han descubierto bacterias anaerobias capaces de degradar compuestos aromáticos, unas en cultivo puro y otras en consorcio. En el primer caso tenemos especies del nuevo género *Pelobacter* que fermentan ácido gálico, pirogalol, 2,4,6-trihidroxibenzoato o floroglucinol. Estos organismos no fermentan azúcares ni compuestos aromáticos como el protocatecuato o el benzoato. Los productos finales de fermentación de los compuestos aromáticos citados son acetato (3 mol) y CO_2 (1 mol por mol de sustrato). En especies de *Pelobacter* y *Coprococcus* la etapa inicial de la fermentación del floroglucinol parece ser una reducción a dihidrofloroglucinol dependiente del $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Cultivos mixtos de *Pelobacter acidigallici* y de *Acetobacterium woodii* convierten cuantitativamente el ácido sirínico en CO_2 y acetato, lo cual no pueden hacer ninguno de ellos en cultivo puro. Cualquiera de ellos cocultivado con *Methanosarcina barkeri* metaboliza completamente algunos sustratos aromáticos a CO_2 y CH_4 .

Syntrophococcus sucromutans utiliza hidratos de carbono como fuente de poder reductor y como aceptores finales de electrones al formiato y los grupos metoxilo de metoxibencenoides. En cocultivo con *Methanobrevibacter smithi*, esta última bacteria actúa como sistema aceptor de electrones. Finalmente, *Eubacterium oxidoreducens*, aislada del rumen, degrada galato, pirogalol y floroglucinol hasta acetato, pero requiere hidrógeno o formiato como fuente de poder reductor.

17.10.5 Degradación por reductores de sulfatos

Widdel aisló un nuevo reductor de sulfatos (*Desulfonema magnum*) de sedimentos marinos capaz de mineralizar ácidos grasos y benzoato a CO_2 en presencia de compuestos reducibles de azufre. Estos sustratos se oxidan a expensas del sulfato, el cual es reducido estequiométricamente a SH_2 .

17.10.6 Metabolismo en condiciones metanogénicas

Ya ha sido referido que las bacterias metanógenas en cultivo puro sólo pueden utilizar sustratos muy sencillos y preferentemente CO_2 e H_2 (capítulo 11). Sin embargo, la asociación sintrófica con microorganismos fermentadores puede permitir la biodegradación anaerobia de una gran diversidad de sustratos orgánicos.

Desde hace tiempo se conoce la transformación del benzoato y otros compuestos aromáticos a CH_4 y CO_2 . En todo caso esta transformación es el resultado del consorcio de un metanógeno y un fermentador. Los intermediarios comprobados son el butirato, el propionato, el acetato, CO_2 e H_2 . Actualmente se cree que existe un proceso reductor que llevaría al sustrato hasta ciclohexanona o ciclohexano carboxilato, los cuales permitirían la fisión del anillo bencénico (Fig. 17.10).

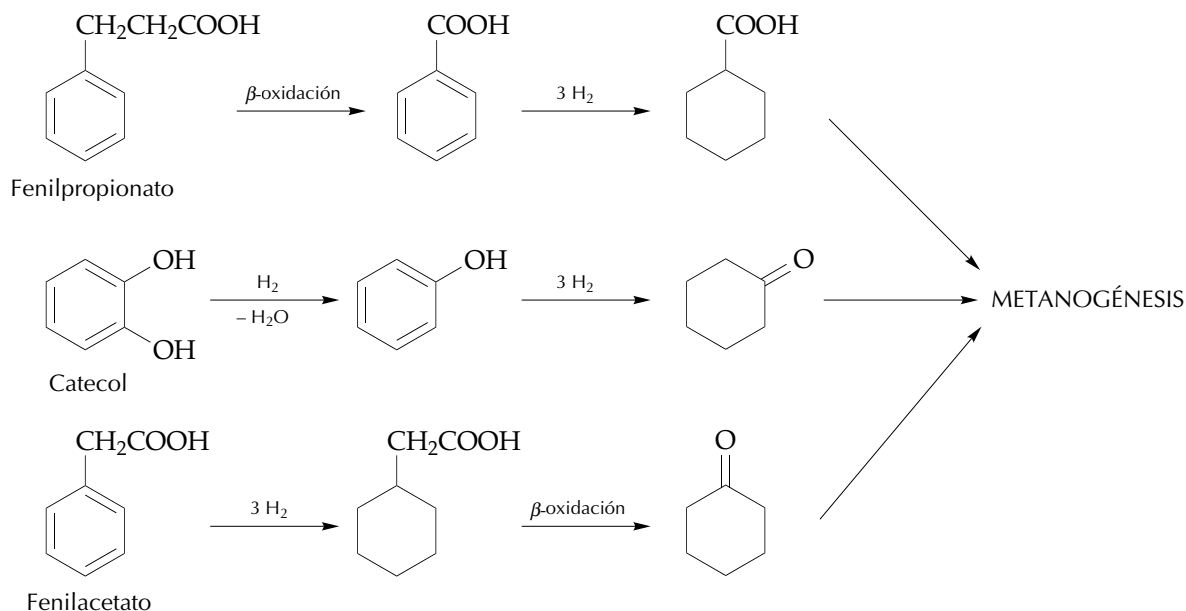


Figura 17.10 Proceso reductor propuesto por Balba y Evans previo a la fisión del anillo bencénico en condiciones metanogénicas.

BIBLIOGRAFÍA

- DAGLEY, S. Biochemistry of aromatic hidrocarbons in *Pseudomonas* (In the *Biology of Pseudomonas*. Volum X. The Bacteria. J. R. SOCATCH ed.). Academic Press. 1986.
- BERRY, D. F., FRANCIS, A. J. y BOLLAG, J. M. Microbial Metabolism of Homocyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds under Anaerobic Conditions. *Microbiological Reviews*. 51, pp. 43–95, 1987.
- EVANS, W. C. y FUCHS, G. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 289–317, 1988.
- RATLEDGE, C. (ed.). Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers. 1994.
- SPAIN, J. C. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 523–555, 1995.

COMPUESTOS NITROGENADOS

18.1	DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS	242
18.2	DEGRADACIÓN OXIDATIVA DE LOS AMINOÁCIDOS	242
18.2.1	Aminoácido oxidasas	242
18.2.2	Deshidrogenasas	243
18.2.3	Aspartasa	243
18.3	OXIDACIÓN DE LA HISTIDINA	243
18.4	OXIDACIÓN DE LA HIDROXIPROLINA	244
18.5	OXIDACIÓN DEL TRIPTÓFANO	245
18.6	OXIDACIÓN DE LA TREONINA	248
18.7	OXIDACIÓN DE PURINAS Y PIRIMIDINAS	249
18.8	OXIDACIÓN DE LA VITAMINA B ₆	251

18.1 DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

En los hábitats naturales, la proteólisis es un proceso importante que produce aminoácidos utilizables como fuente de energía o como subunidades para la biosíntesis.

Muchos géneros de distintos grupos de bacterias son capaces de producir enzimas proteolíticas, generalmente exoenzimas, que difunden al medio exterior. Ésta es la causa de que frecuentemente se encuentren altas concentraciones de aminoácidos en los medios en que se desarrollan bacterias.

Las proteasas naturales son más activas frente a las proteínas desnaturalizadas que frente a las nativas. Muchas proteasas bacterianas han sido cristalizadas. En el medio extracelular también se encuentran peptidasas que hidrolizan los fragmentos oligopeptídicos resultantes de la acción de las proteasas. También se ha purificado una serie de peptidasas bacterianas.

Es característica la actividad proteolítica de los bacilos grampositivos esporógenos, de algunos estreptococos y micrococos y de los miembros del género *Proteus*.

De *Bacillus subtilis* se ha obtenido cristalizada una proteasa alcalina llamada subtilisina que ha sido bien caracterizada. De la misma especie se ha aislado otra proteasa que actúa a pH neutro y que contiene zinc. La subtilisina ataca indistintamente los enlaces peptídicos internos y terminales y, por lo tanto, libera a la vez aminoácidos y péptidos. Al parecer, la clasificación de varias proteasas bacterianas en endopeptidasas y exopeptidasas no resulta adecuada.

Las peptidasas pueden localizarse tanto intracelular como extracelularmente. En *Lactobacillus casei* y *E. coli* se encuentran peptidasas intracelulares que aparentemente hidrolizan pequeños péptidos tomados del medio exterior.

El transporte activo de péptidos y aminoácidos al interior de la célula bacteriana ha sido conclusivamente demostrado y tiene parecidos con el transporte de azúcares. Hay un grado notable de especificidad.

18.2 DEGRADACIÓN OXIDATIVA DE LOS AMINOÁCIDOS

Muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas, como las pseudomonas y las enterobacterias, son capaces de oxidar proteínas y aminoácidos en condiciones aerobias y de utilizarlos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

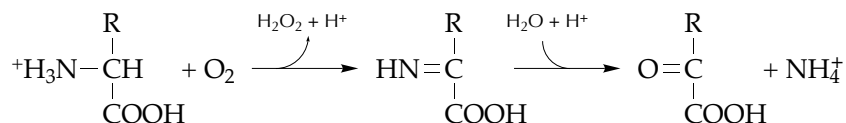
La oxidación de los aminoácidos, así como la de otras sustancias nitrogenadas, suele producir la liberación de todo el nitrógeno en forma de amoníaco. Se conocen varios tipos de desaminación según el aminoácido y la especie bacteriana. En la respiración anaerobia con NO_3^- o SO_4^{2-} tienen lugar procesos semejantes y en algunos casos hay reacciones fermentativas comunes (capítulo 10).

18.2.1 Aminoácido oxidasas

Son flavoproteínas con un potencial redox de $-0,004$ V que están implicadas en la primera etapa de oxidación de muchos aminoácidos, espe-

cialmente D-aminoácidos. En los L-aminoácidos generalmente hay una reacción de transaminación antes de la reacción de liberación de NH_3 .

Las L- y D-aminoácidos oxidasas catalizan la reacción



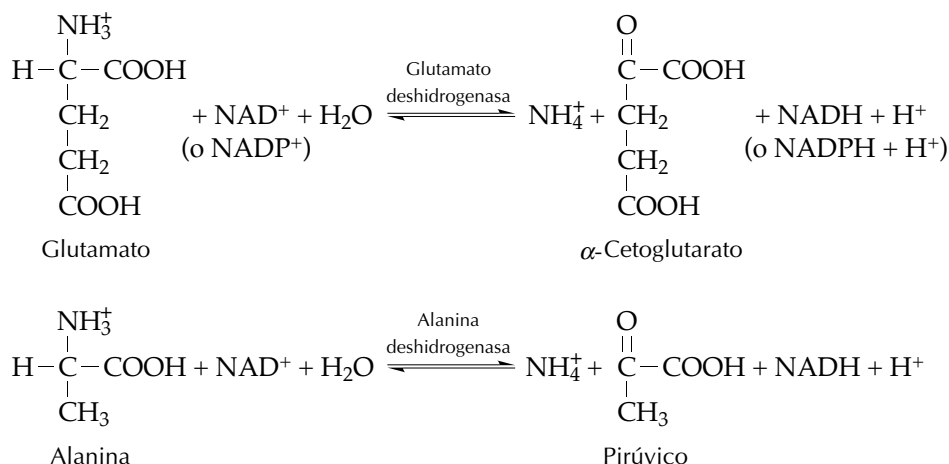
El iminoácido se hidroliza espontáneamente.

Existen α -D-aminoácido oxidasas que actúan sobre varios aminoácidos y otras como la glicina oxidasa que son específicas.

La síntesis de α -D-aminoácido oxidasas se suprime tan pronto como un segundo sustrato energético como glucosa o succinato se halla al alcance de la bacteria.

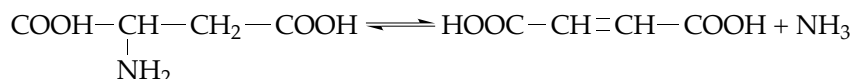
18.2.2 Deshidrogenasas

La glutamato deshidrogenasa y la alanina deshidrogenasa son dos enzimas ligados al NAD^+ o al NADP^+ que convierten al respectivo sustrato en ácido α -cetoglutarico y piruvico y liberan NH_3 . El oxígeno no es esencial.



18.2.3 Aspartasa

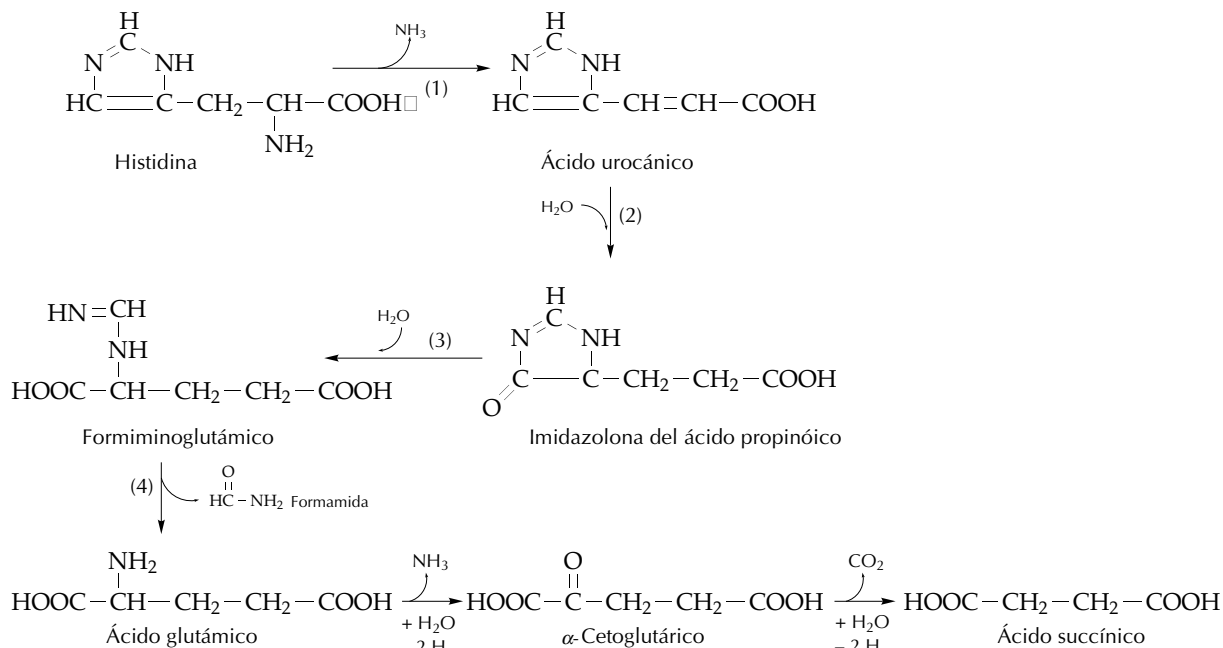
Cataliza la desaminación del ácido aspártico a ácido fumárico y NH_3 .



18.3 OXIDACIÓN DE LA HISTIDINA

La utilización de la histidina está muy extendida dentro de los microorganismos, y existen muy pocas diferencias entre la utilización aerobia y la anaerobia.

La histidina es primero desaminada hasta ácido urocánico por la histidina-amoníaco-lias (1). La urocanasa (urocanato hidratasa), que presenta fotoactivación, convierte el ácido urocánico en la imidazolona del ácido propiónico (2). La ruptura del anillo tiene lugar vía imidazolona propionasa, formándose formiminoglutámico (3). Una segunda hidrolasa escinde la molécula en ácido glutámico y formamida (formimino glutamasa) (4). Como ya ha sido referido anteriormente, el ácido glutámico puede ser desaminado a α -cetoglutárico y éste descarboxilado a succínico dentro del CAT.

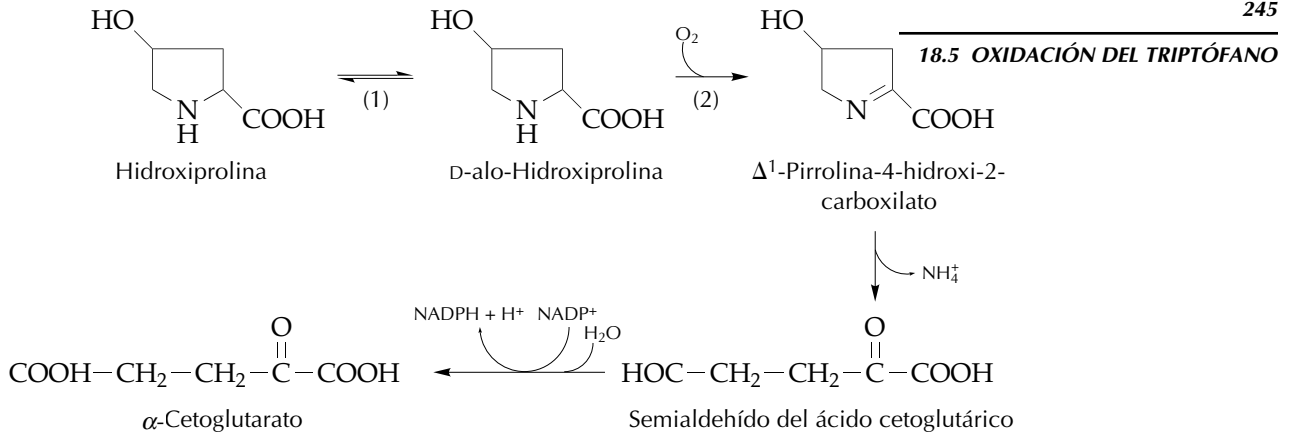


La formamida genera ácido fórmico y NH_3 .

En las pseudomonas el ácido urocánico es el inductor y el ácido succínico es un inhibidor de retroacción. En las enterobacterias también es el ácido urocánico el principal inductor, pero la histidina amoníaco-lias se produce en cantidades muy dependientes de factores ambientales y existe un sistema de control catabólico regulado por la glutamina sintetasa. En *Bacillus subtilis* el inductor fisiológico es la histidina.

18.4 OXIDACIÓN DE LA HIDROXIPROLINA

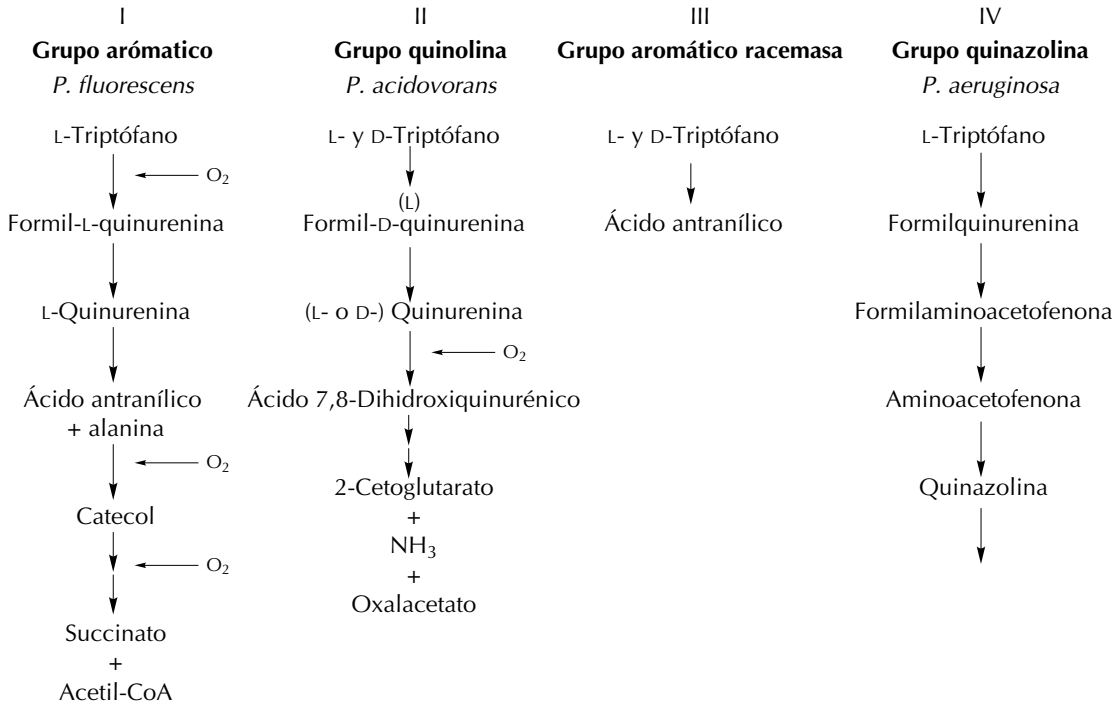
La hidroxiprolina puede ser oxidada por *Pseudomonas putida*, *P. convexa* y *P. fluorescens* formando α -cetoglutarat. La primera reacción es catalizada por una 2-epimerasa que convierte la hidroxiprolina en D-aló-hidroxiprolina (1). El siguiente paso es una oxigenación que lleva a la formación del Δ^1 -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato (2). Este compuesto se desamina y forma α -cetoglutarat.



Los dos epímeros son inductores coordinados de todo el sistema, el cual es insensible a la represión catabólica.

18.5 OXIDACIÓN DEL TRIPTÓFANO

Se distinguen varios grupos de pseudomonas según la vía degradativa del triptófano utilizada:

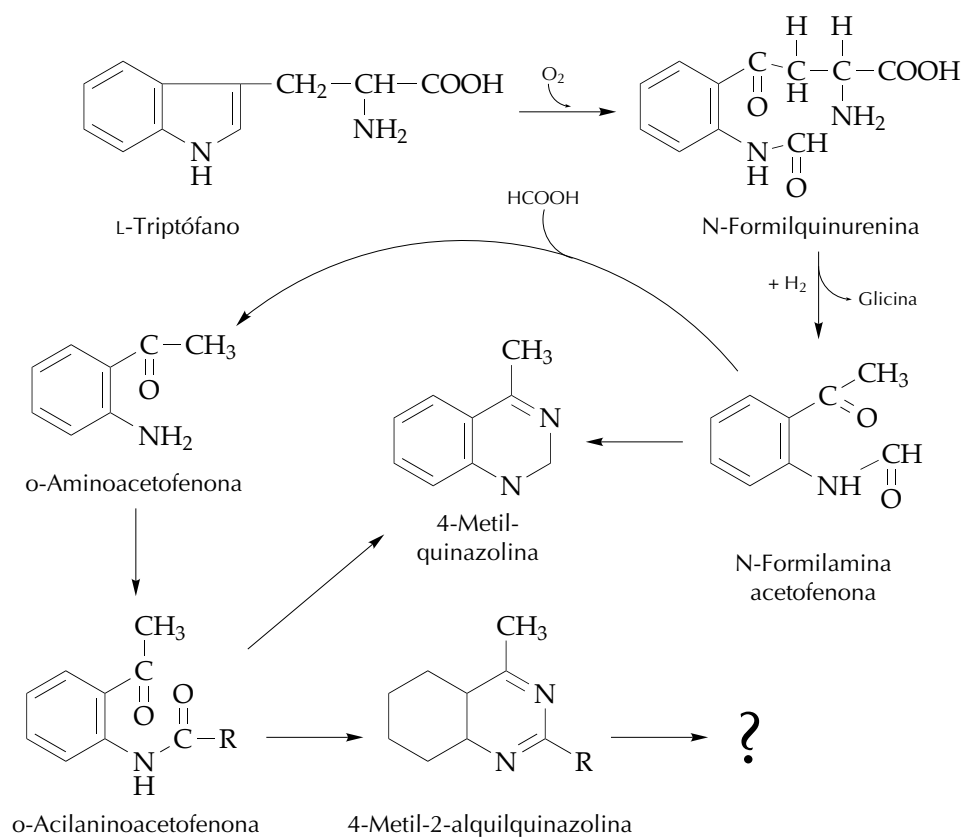


El primer grupo metaboliza el triptófano a catecol vía ácido antranílico. Es representativo *P. fluorescens*.



El tercer grupo llamado “aromático racemasa”, degrada el D y L-triptófano vía ácido antranílico, como el primer grupo, pero tiene la triptófano racemasa que le hace capaz de atacar los dos isómeros.

Un cuarto grupo está caracterizado por *P. aeruginosa*. Los metabolitos de esta vía se conocen, pero hasta el momento no se han descrito las enzimas. Es posible que la 4-metilquinazolina sea ulteriormente hidroxilada para permitir el ataque dioxigenásico. Se han identificado los intermediarios señalados a continuación pero no se han aislado las enzimas ni se conocen los productos finales.



Estas vías son características de la oxidación del triptófano por los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium* y son completamente distintas de las correspondientes al metabolismo del triptófano en los tejidos de los mamíferos. En *Streptomyces* y *Bacillus cereus* el D-triptófano se metaboliza por la vía del ácido antranílico y juega un importante papel durante la esporulación.

En las pseudomonas que tienen varias posibilidades de oxidar el triptófano hay una regulación mono coordinada.

Pueden distinguirse varios tipos:

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{---CHOH---CH---COOH} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3\text{---COH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{---COOH} \\ \searrow \text{CH}_2\text{---COOH} \\ \text{NH}_2 \end{array} \\ \text{NH}_2 \end{array}$$

Treonina

Glicina

Serina hidroximetiltransferasa

Acetato

Treonina $\xrightarrow[\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+]{}$ $\text{CH}_3\text{--CO--CH(NH}_2\text{)--COOH}$ $\begin{cases} \nearrow \text{Acetil-CoA} \\ \searrow \text{Glicina} \end{cases}$
 α -Amino- β -cetobutirato
 L-Treonina desidrogenasa

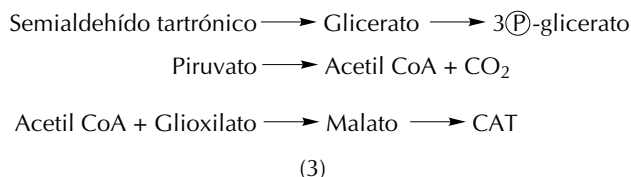
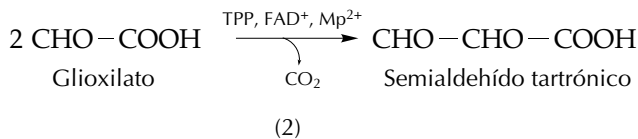
$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array} & \begin{array}{c} \text{NAD}^+ \quad \text{NADH} + \text{H}^+ \\ \text{H}_2\text{O} \quad \text{NH}_3 \end{array} & \text{CHO—COOH} \\
 \text{Glicina} & & \text{Glioxilato}
 \end{array}
 \quad (1)$$


Figura 18.1 Degradación de la glicina por *P. oxalaticus*. (1) Glicina aminotransferasa; (2) glioxilato carboligasa; (3) malato sintasa. Nótese que cada dos moléculas de glioxilato que se transforman en acetil-CoA permiten la entrada de una tercera al CAT.

$$\text{C}_1\text{-THF} + \text{Glicina} \xrightarrow{\text{THF}} \text{Serina} \longrightarrow \text{Piruvato}$$
$$\text{CH}_3-\text{CO}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \xrightarrow[\text{CO}_2]{(1)} \text{CH}_3-\text{CO}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2} \xrightarrow{(2)} \text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_3$$

Aminoacetona

Metilglioxal

\swarrow
 \searrow

CAT ← Piruvato ← Lactaldehído

18.7 OXIDACIÓN DE PURINAS Y PIRIMIDINAS

Diagrama de la vía de degradación del ácido úrico en humanos:

O=C1NC(=O)NC(=O)N1 + O_2 → NC(=O)NC(=O)NC(=O)N + CO_2

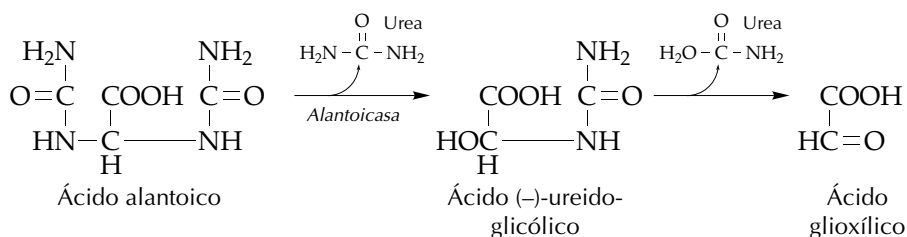
Ácido úrico → Alantoína

Alantoína + H_2O → NC(=O)C(N)C(=O)N

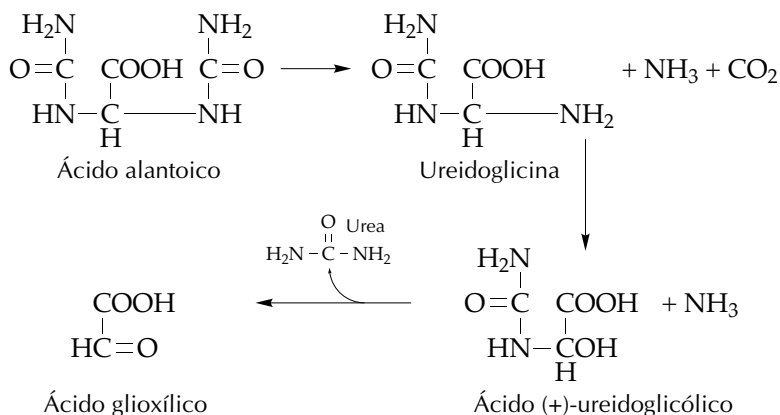
Ácido alantóico

El grupo *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* convierte el ácido alantoico en ácido (-)-ureidoglicólico y urea en una sola

etapa con la alantoicasa. Una segunda molécula de urea es liberada por la acción de la (-)-ureidoglicolato liasa, dando además glioxilato

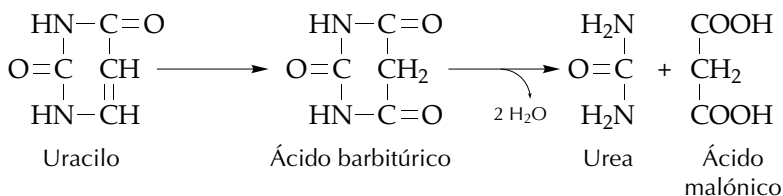


Pseudomonas acidovorans no tiene alantoicasa pero posee una alantoato-amidohidrolasa que transforma el ácido alantoico en ácido (+)-ureido-glicólico, NH₃ y CO₂. Se ha postulado que en esta conversión la ureidoglicina es un intermediario. El ácido (+)-ureidoglicólico es metabolizado a ácido glioxílico y urea por la (+)-ureidoglicolato liasa. Es la misma vía utilizada por *Streptococcus alantoicus* para la degradación de la (±) alantoína.



En *E. coli* y *Arthrobacter alantoicus* se utiliza una tercera vía en la cual el ácido alantoico es transformado a (-)-ureidoglicolato con la liberación de dos moles de NH₃ y un mol de CO₂ por la acción de la alantoatoamidohidrolasa. El ácido (-)-ureidoglicólico se transforma en ácido glioxílico y urea como en los casos anteriores.

El uracilo se transforma en ácido barbitúrico por una reacción monooxigenásica. La barbiturasa hidroliza el barbitúrico a urea y ácido malónico. La degradación del uracilo ha sido estudiada en *Mycobacterium*



El ácido malónico se convierte en acetato más CO₂. También en *Mycobacterium* se ha comprobado que la timina se oxida a ácido 5-metilbarbitúrico.

18.8 OXIDACIÓN DE LA VITAMINA B₆

Se conocen dos vías según sea la piridoxina o la piridoxamina la única fuente de carbono utilizada (fig. 18.1). Se han estudiado en miembros del género *Pseudomonas*.

La piridoxina se oxida mediante una piridoxina-5-deshidrogenasa dependiente de FAD que utiliza 2,6 dicloroindofenol como aceptor de electrones. Se forma isopiridoxal. Se ha encontrado otro enzima distinto que también es dependiente de FAD, la piridoxina-4-oxidasas, que cataliza la conversión de piridoxina a piridoxal. El isopiridoxal es deshidrogenado a 5-piridoxilactona que rápidamente se transforma en ácido 5-piridóxico. A este nivel se abre el anillo con la 5-piridoxato dioxigenasa formándose α -hidroximetil- α' -(N-acetilaminometilen)-succínico. Ulteriormente se forma acetato, CO₂, NH₃ y 2-hidroximetil-semialdehído succínico.

La segunda vía comprende una primera reacción en la que la piridoxamina produce piridoxal, convirtiendo al mismo tiempo piruvato en alanina. Es una reacción de transaminación. Sigue la formación de la 4-piridoxilactona por una piridoxal deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, la cual se hidroliza a ácido 4-piridóxico. A diferencia del ácido 5-piridóxico el ácido 4-piridóxico no puede ser atacado por una oxigenasa. El grupo alcoholico es oxidado en dos etapas a carboxilo formándose el ácido 2-metil-3-hidroxipiridina-4,5-dicarboxílico. La descarboxilación de este último produce el ácido 2-metil-3-hidroxipiridina-5-carboxílico. Éste puede ser atacado por una dioxigenasa que rompe el anillo dando el ácido α -(N-acetilaminometilen)-succínico. Esta reacción requiere NADH + H⁺. La hidrólisis subsecuente produce acetato, CO₂, NH₃ y semialdehído succínico.

Una y otra vía pueden ser utilizadas por distintas especies de *Pseudomonas*. Ambas se esquematizan en el mapa metabólico de la figura 18.1 (página siguiente).

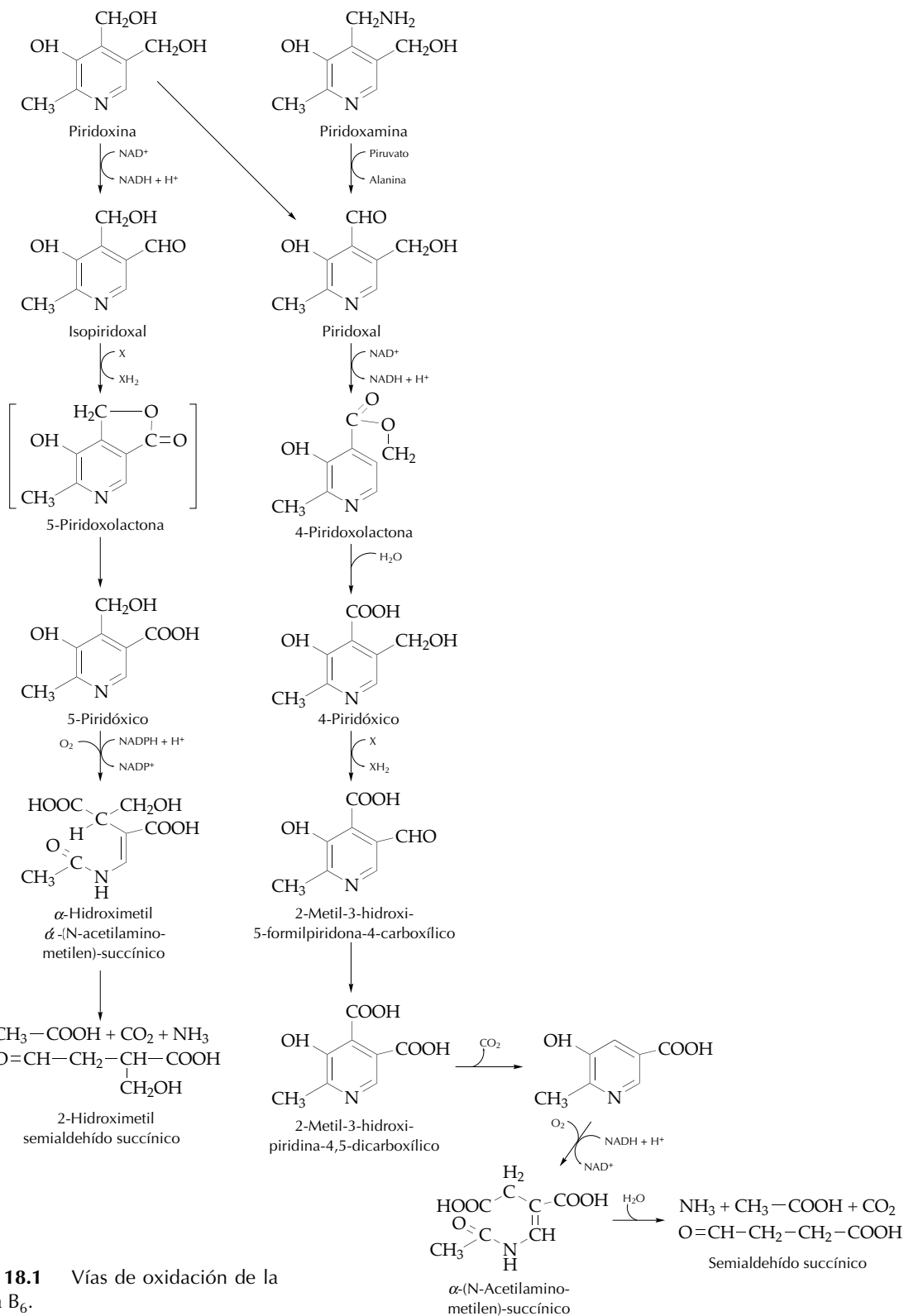


Figura 18.1 Vías de oxidación de la vitamina B₆.

COMPUESTOS C_1 COMO SUSTRATOS

19.1	CRECIMIENTO SOBRE COMPUESTOS DE UN SOLO ÁTOMO DE CARBONO	254
19.2	CICLO REDUCTOR DE LAS PENTOSAS	254
19.3	UTILIZACIÓN DEL FORMIATO POR EL CICLO DE CALVIN	257
19.4	CICLO REDUCTOR DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO	258
19.5	FIJACIÓN DE CO_2 EN <i>CHROMATIUM</i>	259
19.6	BACTERIAS METILOTROFAS	260
19.7	OXIDACIÓN DEL METANO	263
19.8	VÍAS DE LA RIBULOSA-5-P Y DE LA SERINA	265
19.9	CRECIMIENTO SOBRE METILAMINA	267
	BIBLIOGRAFÍA	268

19.1 CRECIMIENTO SOBRE COMPUESTOS DE UN SOLO ÁTOMO DE CARBONO

Los organismos que pueden desarrollarse utilizando como fuente de carbono un sustrato constituido por moléculas que contienen un solo átomo de carbono (C₁), se caracterizan por su capacidad de transformar dicho sustrato en compuestos de tres átomos de carbono (C₃) (Lámina 11). La maquinaria biosintética con la cual estos organismos transforman los compuestos C₃ en todas las demás subunidades necesarias para la síntesis de los componentes celulares no es diferente de la de otros microorganismos.

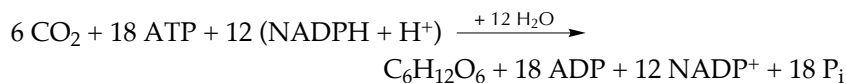
La asimilación de CO₂ mediante el ciclo de la ribulosa difosfato, que ya hemos citado repetidamente, fue la primera síntesis absoluta de compuestos C₃ a partir de compuestos C₁ que se analizó y, por ello, constituye la base del concepto de desarrollo autotrófico. El ciclo de la ribulosa difosfato es una vía metabólica común en muchos organismos que pueden desarrollarse indefinidamente utilizando CO₂ como única fuente de carbono, pero es menos frecuente en aquellos otros que utilizan compuestos C₁ más reducidos. En este caso, podemos distinguir organismos que conservan cierto grado de reducción del compuesto de carbono de otros que primeramente lo oxidan hasta CO₂ para luego reducirlo a (CH₂O)_n.

La utilización de CO₂ como única fuente de carbono está ampliamente distribuida y constituye la característica del desarrollo autotrófico de algas, cianobacterias y muchas bacterias fototrofas y quimiolitotrofas.

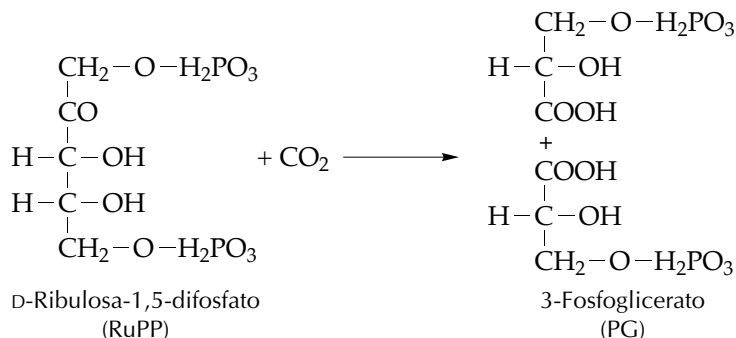
También hay que mencionar a los organismos que utilizan CO₂ formado a partir de compuestos más reducidos, como el propio metano. Asimismo, ha sido referido que las bacterias acetógenas (cap. 8) y las metanogénicas (cap. 11) pueden crecer a partir de CO₂, pero no a través de intermediarios C₃, sino del acetyl-CoA. Este tipo de autotrofismo no será considerado en este capítulo.

19.2 CICLO REDUCTOR DE LAS PENTOSAS

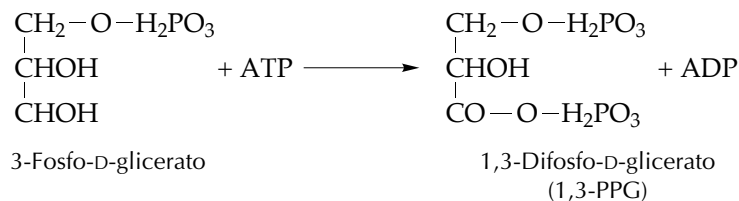
La reducción del CO₂ tiene lugar en una secuencia cíclica conocida con el nombre de ciclo de Calvin, cuyo balance es:



La incorporación del CO₂ se lleva a cabo en la reacción de la ribulosa difosfato carboxilasa:



La reacción siguiente requiere energía que proviene del ATP y está catalizada por la fosfoglicerato quinasa.

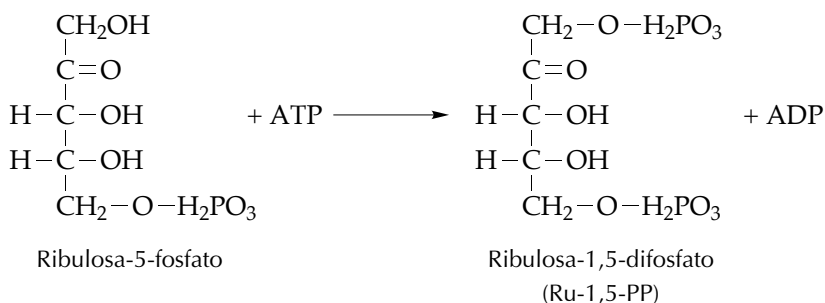


Esta reacción tiene lugar en la vía de Embden-Meyerhof pero en sentido inverso, al igual que la siguiente, en la que el 1,3-difosfo-D-glicerato se reduce a 3-fosfogliceraldehído mediante la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ . Sin embargo, en la vía de Embden-Meyerhof la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa no utiliza NADP^+ sino NAD^+ .

Estas reacciones son dos fases esenciales de la asimilación del CO_2 : la fijación por el sistema de la ribulosa difosfato carboxilasa y la reducción del 1,3-difosfo-D-glicerato.

El resto de las reacciones del ciclo de Calvin son comunes al ciclo de la hexosa monofosfato con una característica adicional que es la formación del aceptor de CO_2 , esto es, la regeneración de la Ribulosa-1,5-difosfato (Ru-1,5-PP).

La ribulosa-5-fosfato forma Ru-1,5-PP con ATP por la reacción de la fosforribulosa quinasa:



El ciclo completo se esquematiza en las figuras 19.1 y 19.2. Las reacciones características de este ciclo son la fijación de CO_2 y la regeneración de ribulosa-1,5-difosfato. Por lo tanto, si consideramos que el ciclo de Calvin es común a muchos organismos autótrofos, su identificación estará vinculada a la presencia de fosforribulosa quinasa y de ribulosa-1,5 difosfato carboxilasa. Naturalmente estas dos reacciones no están directamente relacionadas ni con la fuente de ATP ni con la fuente de poder reductor, ambas necesarias para que el ciclo sea funcional. El ATP y el poder reductor pueden provenir de distintos tipos de mecanismos.

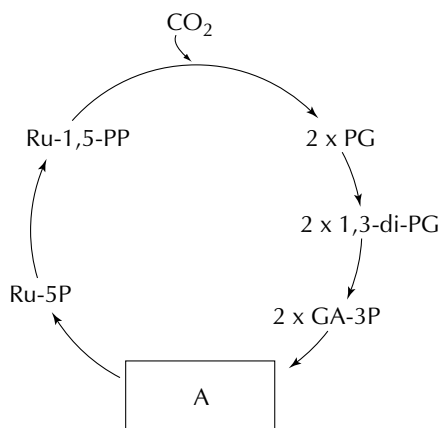


Figura 19.1 Reacciones del ciclo de Calvin. Las reacciones resumidas en A corresponden a las transformaciones características de la vía de las pentosas.

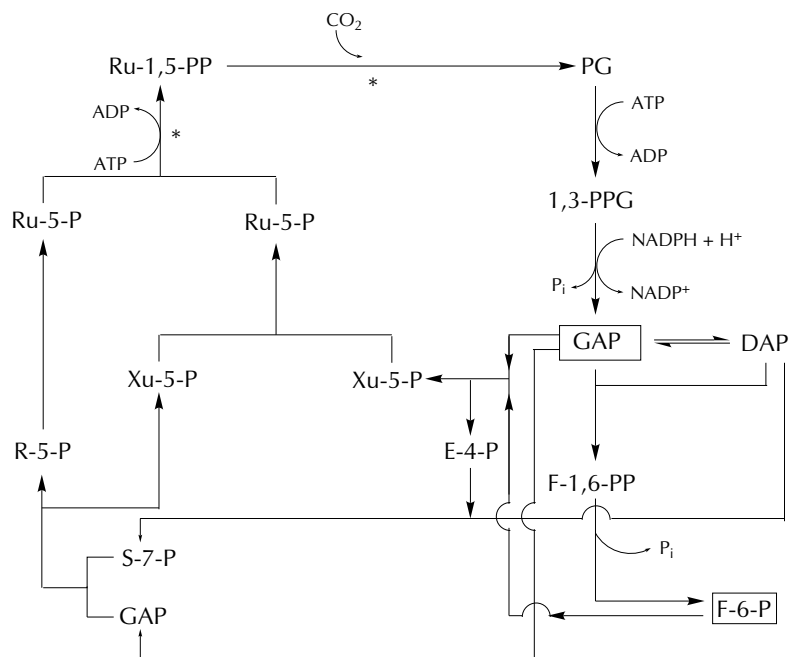


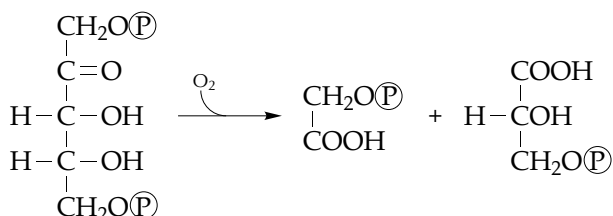
Figura 19.2 Ciclo de Calvin. Las reacciones características —fijación de CO_2 y regeneración de ribulosa-1,5-difosfato— se indican con un asterisco (*).

El control de la actividad enzimática en el ciclo de Calvin está determinado primariamente por el $NADPH + H^+$. En la fotosíntesis anoxigénica se utiliza el NAD^+ reducido en lugar del $NADP^+$, que es quizás la diferencia esencial del ciclo reductor de la hexosa monofosfato con respecto al que actúa en la fotosíntesis oxigénica. El $NADH + H^+$ actúa como efector positivo de la fosforribulosa quinasa en *P. facilis* y en otros quimiolitotrofos. Este enzima es inhibido por el AMP y

por el PEP. En *P. facilis* la acumulación de PEP impide totalmente la formación de ribulosa-1,5-difosfato.

La ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa aislada de distintas bacterias fototrofas o quimiolitotrofas difiere en su composición. Este enzima se descompone en subunidades grandes, de alrededor de 54000 daltons, y subunidades pequeñas, de alrededor de 13000 daltons. Algunos organismos contienen una carboxilasa constituida por ocho subunidades grandes y ocho subunidades pequeñas como *Alcaligenes eutrophus* y *P. facilis*. En *Thiobacillus intermedius* sólo está constituida por ocho unidades grandes. En *Rhodospirillum rubrum* se ha encontrado, sorprendentemente, que sólo contiene dos subunidades grandes. En todo caso, es evidente que la actividad catalítica depende de la subunidad de mayor peso molecular, la cual constituye el elemento constante. La función de las subunidades de menor peso molecular aún no ha sido determinada.

La ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa sólo tiene el sentido funcional asignado en un sistema en el que se hallen presentes Mg^{2+} , ribulosa-1,5-difosfato y CO_2 . En ausencia de este último y en condiciones aerobias, el mismo enzima cataliza la ruptura de la ribulosa-1,5-difosfato según la reacción:



El fosfoglicolato es convertido en glicolato por una fosfatasa, el cual es excretado por muchas bacterias quimiolitotróficas y fototróficas.

La ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa es inhibida activamente por el fosfogluconato. Este compuesto es un intermediario del ciclo de la hexosa monofosfato que utilizan los quimiolitotrofos facultativos cuando éstos se encuentran en presencia de un azúcar fermentable, con lo cual se inhibe el ciclo de Calvin.

19.3 UTILIZACIÓN DEL FORMIATO POR EL CICLO DE CALVIN

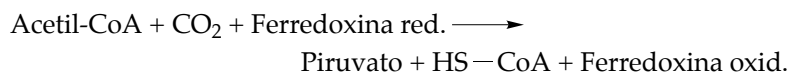
Cuando *P. oxalaticus* crece sobre formiato utiliza el ciclo de Calvin. Este organismo contiene una deshidrogenasa fórmica particulada que es responsable de la oxidación del formiato a CO_2 . El crecimiento de *Bacterium formoxidans* sobre formiato puede considerarse similar al de *P. oxalaticus*.

Rhodopseudomonas palustris es capaz de crecer sobre formiato, anaerobiamente y en presencia de luz. Se ha podido demostrar que antes de la asimilación del carbono del sustrato éste pasa por el estado de CO_2 . Mediante experimentos en los que se suministra $^{14}CO_2$ a intervalos de tiempo sucesivamente más cortos se ha encontrado un modelo de fijación característico del ciclo de la ribulosa difosfato. Por otra parte, los extractos libres de células obtenidos de estos organis-

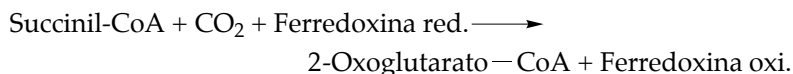
mos, cuando crecen fotosintéticamente sobre formiato, contienen los dos enzimas clave del ciclo de Calvin. En otros casos no es seguro que la asimilación fototrófica del formiato esté ligada, por lo menos exclusivamente, al ciclo de Calvin. El hecho de que el carbono marcado se acumule principalmente en el glutamato y otros aminoácidos, como ocurre en alguna cepa del mismo *Rhodospseudomonas palustris*, sugiere la intervención exclusiva o dominante del ciclo de Arnon. En otros casos pueden formarse reservas orgánicas que posteriormente podrán ser utilizadas como fuente del poder reductor necesario para asimilar el CO₂, como posiblemente ocurre en *Rhodospseudomonas palustris*. Independientemente, una parte del sustrato da lugar al CO₂ que alimenta a la reacción de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa.

19.4 CICLO REDUCTOR DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

Evans, Buchanan y Arnon propusieron un nuevo ciclo metabólico mediante el cual se obtiene una ganancia neta de carbono a partir de CO₂. En dicho ciclo existen dos reacciones fundamentales: por una parte la catalizada por la piruvato sintasa.



y por otra, la de la 2-oxoglutarato sintasa



Estas reacciones hacen reversible el ciclo del ácido tricarboxílico, dando lugar a la síntesis de una molécula de oxalacetato a partir de cuatro moléculas de dióxido de carbono. El acetil-CoA, que actúa como aceptor primario de CO₂, se regenera a partir de acetato, ATP y HS-CoA. El ciclo se esquematiza en la figura 19.3.

Este ciclo se conoce también con el nombre de ciclo de Arnon. Suministrando ¹⁴CO₂ a intervalos sucesivamente más cortos, el primer producto marcado que aparece es el glutamato (75% del carbono ligado después de 30 segundos). Este ciclo es operativo en algunas bacterias fototrofas y en algunas bacterias anaerobias.

Todos los enzimas del ciclo de Arnon se han identificado en extractos de *Chlorobium thiosulfatophilum* o de *Rhodospirillum rubrum*. Aunque la velocidad de fijación del CO₂ es proporcional a la concentración media de los mismos, algunos de ellos se encuentran a concentraciones muy bajas que probablemente no representan la actividad que tiene lugar en la célula entera, sobre todo en organismos que presentan algunas deficiencias en el ciclo reductor de la pentosa fosfato y que deben utilizar el ciclo de Arnon como base fundamental para el desarrollo autotrófico.

Chlorobium thiosulfatophilum contiene todos los enzimas del ciclo reductor de la pentosa fosfato, pero un 75% del ¹⁴CO₂ fijado en las primeras muestras se encuentra en el glutamato. La importancia relativa de las dos vías de fijación no está totalmente aclarada, pero es

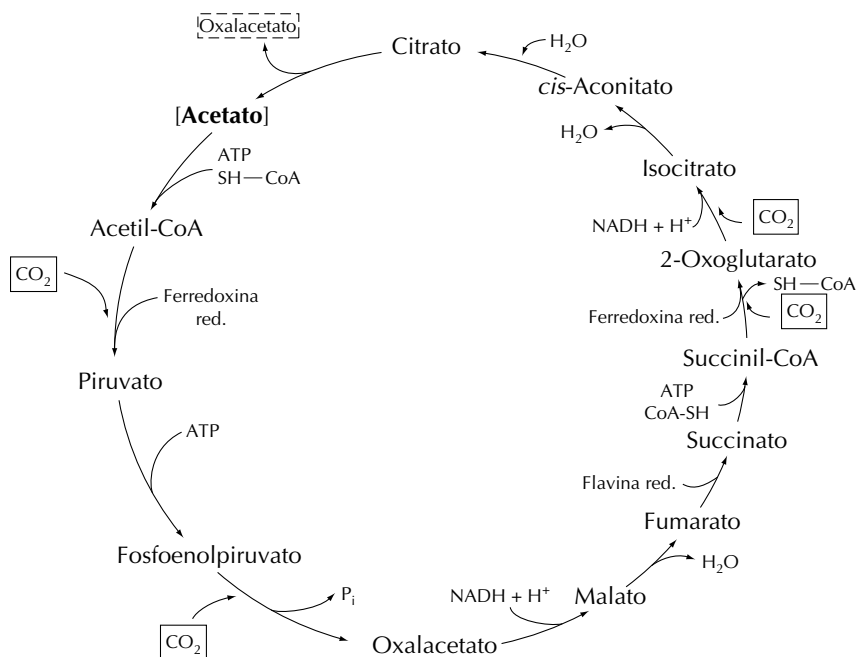


Figura 19.3 Ciclo de Arnon. Los productos que entran en el ciclo están enmarcados en trazo continuo. El proceso se iniciaría a partir de una molécula de acetato (en negrilla).

indudable que el ciclo de Arnon tiene una importancia sustancial en *Chlorobium thiosulfatophilum* creciendo a la luz en presencia de tiosulfato. En todo caso no hay que olvidar que, al igual que el ciclo reductor de las pentosas, el ciclo de Arnon requiere una fuente de poder reductor y de ATP para que prosiga la asimilación de CO₂ como soporte del desarrollo autotrófico.

Se han obtenido extractos de *Rhodospirillum rubrum*, creciendo en presencia de luz con CO₂, succinato e hidrógeno como reductor, que contienen todos los enzimas del ciclo de Arnon. Estos extractos también poseen los enzimas del ciclo de la ribulosa fosfato, por lo que se plantea el mismo problema antes referido de cuál de los dos ciclos soporta realmente el metabolismo autotrófico. En todo caso hay que tener en cuenta que *R. rubrum* puede utilizar también sustratos orgánicos, cuya presencia modifica sustancialmente el total de la actividad metabólica.

19.5 FIJACIÓN DE CO₂ EN CHROMATIUM

La autorradiografía de los productos de reacción en *Chromatium* indica que los primeros productos formados tras la fijación del CO₂ son el fosfoglicerato y el ácido aspártico. La alta proporción de aspartato señala la existencia de una etapa de carboxilación independiente de la que tiene lugar en la formación de ácido fosfoglicérico. Al parecer *Chromatium* utiliza una doble fijación de CO₂ en la que el ciclo del ácido glioxílico juega un papel muy importante. Este proceso se esquematiza en la figura 19.4.

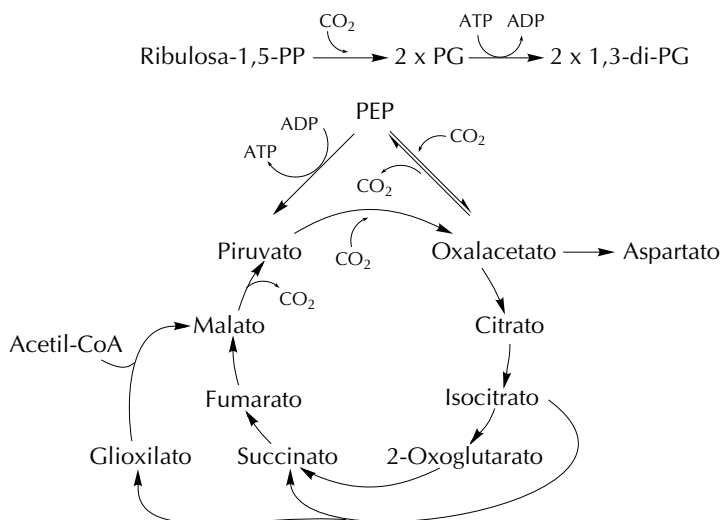
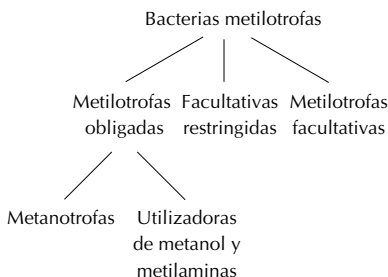


Figura 19.4 Fijación del CO₂ en *Chromatium*, PG, ácido 3-fosfoglicérico; 1,3-diPG, ácido 1,3-difosfoglicérico; PEP, fosfoenolpiruvato.

19.6 BACTERIAS METILOTROFAS



Básicamente las bacterias metilotrofas se subdividen en dos grandes grupos: las metilotrofas obligadas, que utilizan exclusivamente compuestos C₁, y las facultativas, las cuales, además de compuestos C₁, pueden utilizar sustratos formados por cadenas multicarbonadas. Las metilotrofas obligadas se subdividen a su vez en dos grupos: las que utilizan metanol y aminas metiladas pero no metano y las que sólo utilizan metano (metanotrofas) (Lámina 5). Se distingue también un grupo intermedio entre las metilotrofas obligadas y las facultativas caracterizado por utilizar, además de compuestos C₁, un número muy limitado de compuestos muticarbonados.

Dentro de las metanotrofas encontramos el grupo I, constituido por bacilos que en los cortes al microscopio electrónico muestran paquetes o discos vesiculares y utilizan la vía de la ribulosa fosfato para la asimilación de los compuestos C₁, tienen un ciclo de los ácidos tricarboxílicos incompleto y ácidos grasos predominantes de 16 carbonos. Por otro lado, el grupo II presenta membranas periféricas debajo de la membrana celular en las secciones finas al microscopio electrónico, tienen un CAT funcional y dos ácidos grasos constitutivos dominantes de más de 18 carbonos. El grupo I incluye los géneros *Methylomonas* y *Methylobacter* y el grupo II los géneros *Methylosinus* y *Methylocistis*. Existe además un tercer grupo de metanotrofas (tipo X) que es capaz de crecimiento autótrofo sobre CO₂ y que se incluye en el género *Methylococcus* (tabla 19.1). Todos estos géneros son relativamente homogéneos desde el punto de vista genético. No obstante existe aún cierta confusión y la posibilidad de que algunos de ellos se desdoblen en nuevos géneros.

TABLA 19.1 Principales grupos de bacterias metanotrofas. ^a			
Características	Tipo I	Tipo X	Tipo II
Morfología	Bastones rectos o cocobacilos	Cocos	Bastones rectos, curvados o piri-formes
Disposición de las membranas			
Discos vesiculares o empaquetados	+	+	–
Membranas periféricas emparejadas	–	–	+
Motilidad	V	–	V
Estado de anabiosis	Quiste de tipo <i>Azotobacter</i>	Quiste de tipo <i>Azotobacter</i>	Quiste de lípidos o situados en un extremo de la célula
Formación de rosetas	–	–	+ (la mayor parte de las cepas)
Principal ruta de asimilación del carbono	Ribulosa fosfato	Ribulosa fosfato	Serina
Fijación de CO ₂ autotrófica	–	+	–
Ciclo ATC completo	–	–	+
Nitrogenasa	–	+	+
Isocitrato deshidrogenasa ^a			
específica de NAD ⁺ y NAD(P) ⁺	+	–	–
específica de NAD ⁺	–	+	–
específica de NAD(P) ⁺	–	–	+
Glucosa-6⑦-deshidrogenasa	+ (específica de NADP ⁺)	+ (específica de NADP ⁺)	– ^c
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	+ (específica de NADP ⁺)	+ (específica de NADP ⁺)	–
Ácido graso predominante (longitud de la cadena)	16 carbonos	16 carbonos	18 carbonos
Crecimiento a 45 °C	V ^b	+	–
% Mol de G + C del DNA	50-54	62,5	61,7-63,1

^a No todas la cepas clasificadas en los grupos I y II han demostrado tener todas las características bioquímicas descritas en este esquema.

^b V = variable.

^c Durante el crecimiento en metano.

TABLA 19.2 Algunas características diferenciales de bacterias consumidoras obligadas de metanol y metilamina.

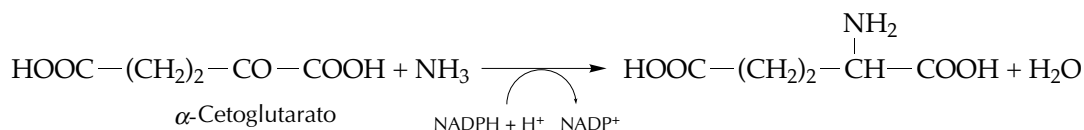
Organismo	Fosfolípidos				G + C (% mol)	Utilización de glucosa	Utilización de fructosa	Requerimientos de Na ⁺ y Mg ²⁺	Auxotrofia para B ₁₂	Ácidos grasos C ₁₇ ramificados	6 PGA deshidrogenasa (NADP)	Asimilación de amoníaco
	DPG	PG	PE	GL								
METHYLOPHILUS <i>M. methylotrophus</i> <i>M. glucoseoxidans</i>	–	+	+	A + B	50-53	+	V	–	–	+	+	Ciclo del glutamato
METHYLOBACILLUS <i>M. glucogenes</i> <i>M. ructoseoxidans</i>	+	+	+	A	50-56	–	V	–	–	–	+	Glutamato deshidrogenasa
METHYLOVORUS <i>M. glucosostrophus</i>	+	+	+	C	56-57	+	–	–	–	–	–	Ciclo del glutamato
METHYLOPHAGA <i>M. marina</i> <i>M. thalassica</i>					43-49		+	+	+			

DPG = difosfatidilglicerol; PG = fosfatidilglicerol; PE = fosfatidiletanolamina; GL = glicolípido; V = resultado variable.

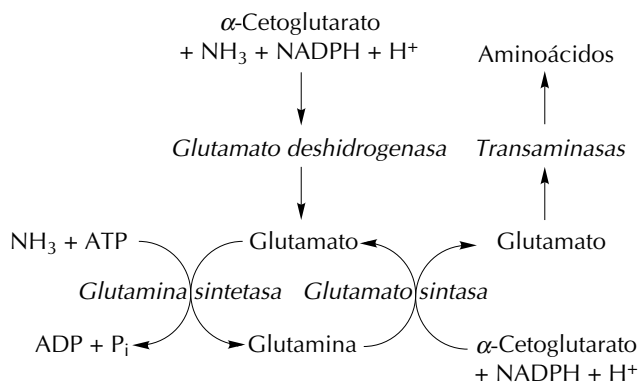
Las metilotrofas obligadas que no utilizan metano crecen sobre metanol y metilamina. Muchas de ellas están estrechamente relacionadas con microorganismos facultativos de espectro muy restringido (tabla 19.2).

Las metilotrofas facultativas son muy variadas y cosmopolitas. No forman una entidad taxonómica identificable, excepto en muy pocos casos (ej.: *Methylobacterium*). Hay grupos sin ninguna relación aparente, en cambio otros tienen en común algunas propiedades fisiológicas y características morfológicas y quizás cierta afinidad filogenética. Hay facultativas que son extremófilas como *Acidomonas methanolica*. De las características que más llaman la atención del inmenso grupo de metilotrofas facultativas pueden destacarse las siguientes: la relación con fijadores de nitrógeno (*Xantobacter* y algunas rizobiáceas), el crecimiento autotrófico (*Paracoccus*, *Nitrobacter*, *Rhodospseudomonas* y *Thiobacillus*) y la presencia de bacterioclorofila (*Methylobacterium*).

Algunas metilotrofas (tabla 19.2) se distinguen por su diferente sistema de asimilación del amoníaco. Unas utilizan la glutamato deshidrogenasa:



En cambio, otras utilizan el ciclo del glutamato:



19.7 OXIDACIÓN DEL METANO

El género *Methylomonas* sólo puede crecer con CH_4 , éter dimetílico y metanol.

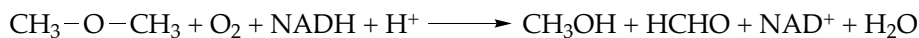
La vía metabólica para la completa oxidación del metano y el metanol puede esquematizarse de la siguiente forma:



Mediante experimentos con $^{18}\text{O}_2$ se ha demostrado que el átomo de oxígeno del metanol deriva del O_2 y no del H_2O y, por lo tanto, la etapa inicial debe ser una oxigenación.

Desde que se sabe que el éter metílico es un sustrato común de las bacterias que oxidan el metano, se cree que puede ser el producto resultante de la oxigenación inicial.

El éter dimetílico puede dar simultáneamente metanol y formaldehído según la reacción:



Esta reacción es análoga al ataque oxigenásico del éter dietílico que llevan a cabo algunas bacterias grampositivas:

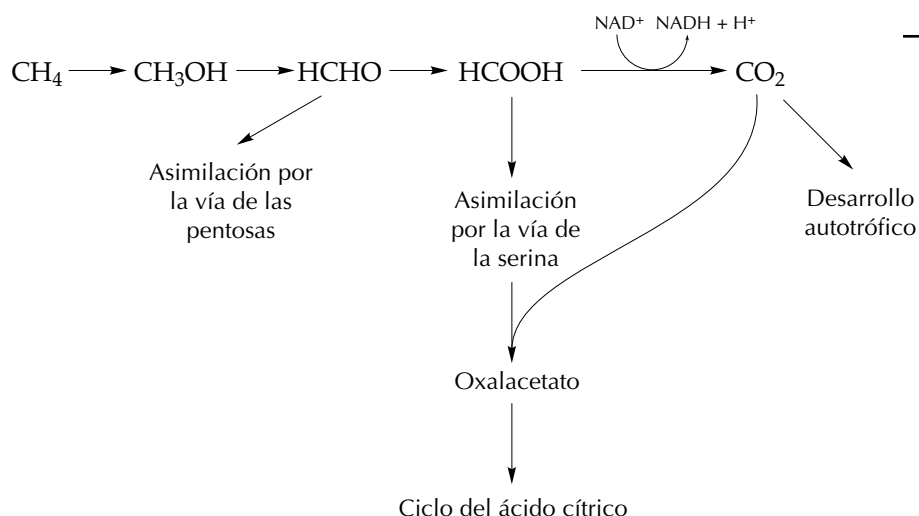


En los microorganismos que pueden utilizar metanol como sustrato, la oxidación de éste a formaldehído tiene por lo menos tres alternativas. Las levaduras metilotróficas emplean una alcohol oxidasa con FAD, la cual oxida el metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno, utilizando oxígeno como aceptor de electrones. En las bacterias gramnegativas la oxidación del metanol implica una quinoproteína metanol deshidrogenasa que contiene pirroloquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético, la cual se reoxida con un tipo especial de citocromo *c* para transferir el equivalente reductor a la cadena de transporte de electrones. La actividad metanol deshidrogenásica *in vivo* está muy influida por factores adicionales, tales como el denominado factor X de *Hyphomicrobium*, de bajo peso molecular, y la denominada proteína modificadora, detectada en varios metilotrofos gramnegativos. En contraste con la enzimología y genética bien conocidas de las levaduras metilotróficas y de las bacterias gramnegativas metilotróficas, se conoce muy poco de la oxidación primaria del metanol en los metilotrofos grampositivos. Los estudios sobre *Bacillus methanolicus* termotolerante, *Amycolatopsis methanolica* y *Mycobacterium gastri* han mostrado que estos organismos, que carecen de espacio periplasmático, no poseen PQQ-metanol deshidrogenasa. Hay alguna evidencia que utilizan una nueva metanol deshidrogenasa dependiente de NADPH + H⁺.

El formaldehído se oxida a ácido fórmico por una metanol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ o por una formaldehído deshidrogenasa también dependiente de NAD⁺.

La descarboxilación del formiato va unida al NAD⁺ y por otra parte el formiato es el intermediario mediante el cual se asimila el C₁ por la vía de la serina. En algunos metilotrofos la asimilación del carbono tiene como punto de partida el aldehído fórmico y continúa a través de la alulosa por el ciclo de la ribulosa-5-P (ver apartado 19.8)

Los organismos que asimilan formaldehído por la vía de la pentosa-fosfato no tienen α-cetoglutarato deshidrogenasa, lo cual implica que carecen del sistema necesario para la oxidación del acetato. Probablemente ésta es la causa de que sean metilotrofos obligados.

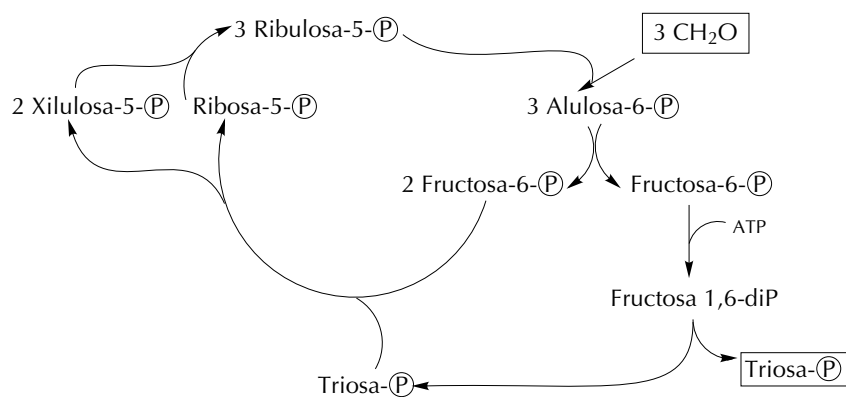


Existen metilotrofos obligados que tienen la vía de la serina y α -cetoglutarato deshidrogenasa. Ya ha sido comentado que entre uno y otro tipo de metilotrofos obligados hay diferencias estructurales importantes con relación a los cuerpos membranosos. Los correspondientes a los que no tienen ciclo del ácido tricarboxílico funcional, que son los llamados del tipo I, contienen un sistema enzimático muy parecido al de muchos quimioautotrofos estrictos en los que tampoco el CAT es funcional como sistema de oxidación terminal.

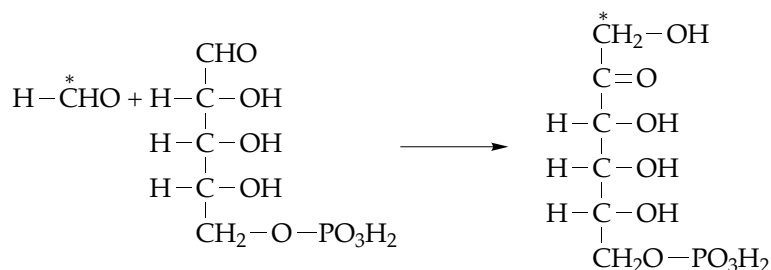
19.8 VÍAS DE LA RIBULOSA-5-P Y DE LA SERINA

La vía de la ribulosa fosfato es en muchos aspectos parecida al ciclo de Calvin para la asimilación de CO_2 . Mediante dicha vía se asimila formaldehído actuando de aceptor la ribulosa-5-fosfato y formándose alulosa-6-fosfato. Esta vía fue descubierta en *P. methanica*.

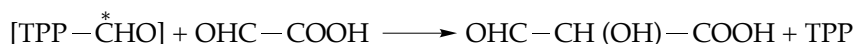
En el esquema metabólico siguiente se representa la asimilación del formaldehído en los metilotrofos del tipo I, así como en los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter* y en *Methylococcus*:



La reacción de condensación:



comprende TPP como coenzima y es parecida a la formación del semialdehído ácido tartrónico con formaldehído-TPP y glioxilato en presencia de carboligasa:



Existen otras reacciones semejantes de condensación aldólica entre formaldehído y moléculas que contengan un grupo metileno adyacente a un grupo carbonilo, y no solamente en las bacterias sino también en el músculo. De hecho, este tipo de reacción explica los resultados obtenidos en *P. methanica* y *Methylococcus capsulatus* de conformidad con el esquema anterior. El sistema enzimático que cataliza la condensación de formaldehído con pentosa fosfato ha sido denominado hexosa fosfato sintetasa.

En los metilotrofos que tienen el sistema membranoso de tipo II, como *Methylosinus* y *Methylocistis*, opera otro sistema fijador de C₁, como el metanol, pero que puede tener lugar entre niveles de oxidación que varían desde el metano hasta el formiato.

La vía cíclica denominada de la serina es la que se lleva a cabo en los casos anteriormente referidos y convierte unidades de un carbono en serina, como se expresa en el esquema adjunto, de forma acoplada al ciclo del ácido glioxílico (fig. 19.5).

Los metilotrofos obligados que utilizan la vía de las pentosas fosfato para la asimilación del formaldehído no tienen α -cetoglutarato deshidrogenasa. No pueden crecer a expensas del formiato porque no lo reducen a formaldehído. La α -cetoglutarato deshidrogenasa está presente en los metilotrofos obligados que asimilan formaldehído a través de la vía de la serina.

Se ha especulado con la posibilidad de que los organismos que asimilan formaldehído hayan evolucionado a partir de las bacterias nitrificantes, puesto que sólo se necesita un pequeño cambio para adaptar el ciclo de Calvin al ciclo de la ribulosa fosfato que consiste simplemente en la reacción de condensación del formaldehído con la ribulosa-5-fosfato. La semejanza del sistema membranoso de ambos tipos de bacterias sugiere esta conexión.

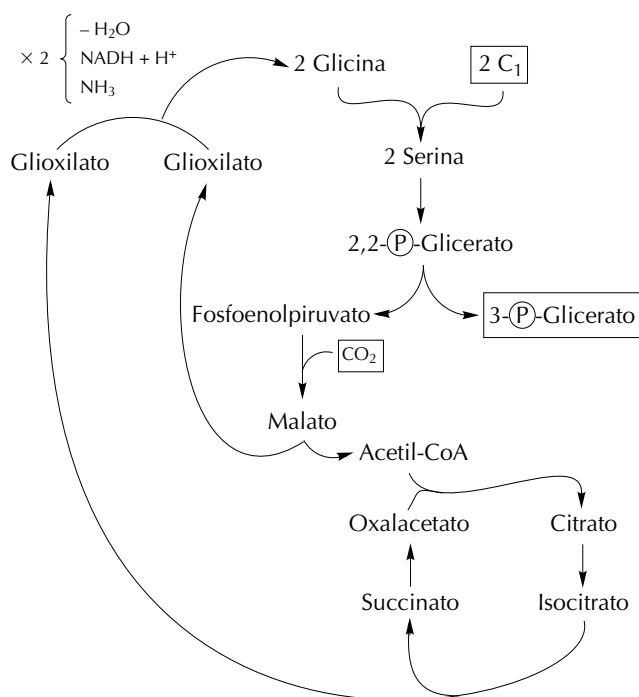
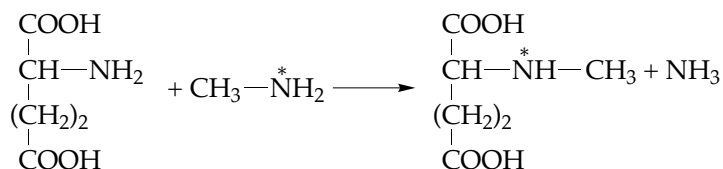


Figura 19.5 Vía de la serina.

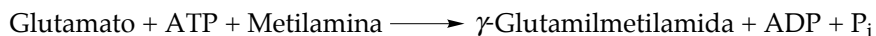
19.9 CRECIMIENTO SOBRE METILAMINA

Algunas cepas de *Pseudomonas* catalizan la reacción



Los experimentos con átomos marcados demuestran que la metilamina se incorpora al N-metilglutamato por una reacción directa de desplazamiento del grupo amino.

También se ha descubierto una reacción semejante a la de la glutamina sintetasa que produce γ -glutamilmetilamida:



Finalmente, también en extractos de una cepa de *Pseudomonas*, se ha conseguido llevar a cabo la reacción:



No se conocen los mecanismos mediante los cuales los referidos organismos pueden incorporar la metilamina a los demás constituyentes celulares, pero pueden estar relacionados con la vía de la serina.

BIBLIOGRAFÍA

- QUAYLE, J. R. The metabolism of one-carbon compounds by Microorganisms. *Adv. in Microbial Physiology and Metabolism*. Academic Press. London and New York. 1972.
- McFADDEN, B. Autotrophic CO₂ Assimilation and the Evolution of Ribulose Diphosphate Carboxylase. *Bacteriol. Rev.* vol. 37. 1973.
- HIGGINS, I. J., BEST, D. J., HAMMOND, R. C. y SCOTT, D. Methane-Oxidizing Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45, pp. 556–590. 1981.
- BEDARD, CH. y KNOWLES, R. Physiology, Biochemistry, and Specific Inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53, pp. 68–84. 1989.
- MORRELL, J. C. y KELLY, D. P. (eds.). *Microbial Growth on C₁ Compounds*. Intercept Ltd. Andover U. K. 1993.

P*_{ARTE} *F

REDUCTORES INORGÁNICOS

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

COMPUESTOS REDUCIDOS DE NITRÓGENO

20.1	QUIMIOLITOTROFISMO	272
20.2	LAS BACTERIAS NITRIFICANTES	273
20.3	EL GRUPO NITROSO	274
20.4	EL GRUPO NITRO	276
20.5	OBTENCIÓN DEL PODER REDUCTOR POR LAS BACTERIAS QUIMIOLITOTROFAS	278
20.6	EFFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES	278
	BIBLIOGRAFÍA	280

20.1 QUIMIOLITOTROFISMO

Se puede definir el quimiolitotrofismo como el sistema metabólico que genera energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos. Esta definición no afecta ni al tipo de sustrato utilizado como fuente de carbono ni al hecho de que alternativa, simultánea o secuencialmente se obtenga energía a partir de compuestos orgánicos. En cualquier caso, podemos decir que una bacteria es quimiolitotrofa cuando ésta es capaz, en un momento dado, de obtener toda la energía necesaria para el crecimiento a partir de la oxidación de compuestos minerales.

El concepto de quimiolitotrofo (no el término) se debe a Winogradsky. Paradójicamente, este autor dedujo el concepto de una interpretación errónea de la oxidación de compuestos minerales que, como reacción química predominante, realizan algunas bacterias. En 1887 Winogradsky estudió la oxidación del sulfuro de hierro por miembros del género *Beggiatoa* y, en 1888, la oxidación de compuestos ferrosos por *Leptothrix*. Basándose en estos estudios llegó la conclusión de que el significado fisiológico de dichas oxidaciones debía de ser el mismo que el de la respiración de moléculas orgánicas. Sin embargo, sus observaciones eran cualitativas y no del todo estrictas, hasta el punto de que hoy día se sabe que, en ambos ejemplos, la oxidación del compuesto mineral no proporciona energía al microorganismo.

Las bacterias quimiolitotrofas se han agrupado en función del tipo de compuesto mineral que oxidan para obtener energía. Se consideran las bacterias del nitrógeno, del hierro, del azufre y del hidrógeno. Se trata de grupos fisiológicos caracterizados por una actividad química que implica la oxidación bien del elemento en cuestión (caso del hidrógeno o del azufre), bien de un derivado del mismo no totalmente oxidado (caso del nitrógeno, el hierro y también del azufre).

Fue precisamente en 1890 cuando Winogradsky, estudiando las bacterias del nitrógeno, las cuales utilizando una terminología más precisa han de ser denominadas nitrificantes, estableció el significado fisiológico de la oxidación de compuestos inorgánicos. Dicho autor estableció seis características que permitían definir el carácter quimiolitotrófico de un microorganismo:

1. Capacidad de desarrollo en un medio totalmente mineral, en el cual se encuentra la sustancia inorgánica oxidable.
2. El desarrollo ha de estar directamente asociado a la presencia de dicha sustancia inorgánica que, en el caso de las bacterias nitrificantes, es el amoníaco.
3. La oxidación de la mencionada sustancia mineral ha de ser la fuente de energía.
4. No se requiere materia orgánica, ni como fuente de carbono ni como fuente de energía.
5. La materia orgánica no es degradable por los quimiolitotrofos, y su presencia en el medio dificulta el desarrollo de los mismos.
6. El CO_2 es la única fuente de carbono utilizada por el quimiolitotrofo.

Si bien Winogradsky descubrió una nueva fisiología, los conceptos derivados de sus estudios la relacionaron estrictamente con el carácter obligado de la utilización de CO_2 , con la oxidación de un compuesto inorgánico y con el efecto perjudicial de la materia orgánica. Durante muchos años el concepto de bacteria quimiolitotrofa se entendió en este sentido. Ni siquiera el descubrimiento por parte de Kaseerer en 1906 de las bacterias del hidrógeno (las cuales pueden crecer tanto en un medio completamente inorgánico en atmósfera de H_2 , CO_2 y O_2 como en medios orgánicos) hizo alterar el criterio primitivo, que fue reiterado por Winogradsky (1923-1949), creando las categorías de los quimiolitotrofos obligados y los facultativos (microorganismos con dos tipos de metabolismo energético diferente y opuesto). No obstante, desde hace ya bastante tiempo se han establecido con más precisión las características que definen el quimiolitotrofismo. De hecho, las ideas de Winogradsky están en contradicción con el principio de la bioquímica unitaria y, por lo tanto, representan una interpretación difícil de sostener a lo largo del tiempo.

Los conceptos de Winogradsky chocan con una dificultad inherente al hecho de haber asociado aspectos metabólicos que en realidad son independientes, como lo son el sistema de obtención de energía y el sustrato utilizable como fuente de carbono. De hecho, se ha podido comprobar que existen tipos de bacterias que representan todas las combinaciones posibles entre las distintas formas de obtener energía y carbono. Asimismo, se han encontrado hechos que se oponen al concepto inicial, como la necesidad de algunas vitaminas que tienen ciertas bacterias del hidrógeno cuando crecen en medio mineral.

Considerando el metabolismo oxidativo, las bacterias quimiolitotróficas incluyen microorganismos que comparten la característica de carecer de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional. Teniendo en cuenta que, además de precursores para la biosíntesis, este ciclo genera ATP y poder reductor, en la oxidación de compuestos inorgánicos el poder reductor deberá generarse bien por transferencia directa de electrones al NAD^+ a partir del sustrato inorgánico, bien mediante el transporte inverso de una cadena de electrones a expensas del ATP generado en el proceso respiratorio.

20.2 LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

La degradación de la materia orgánica nitrogenada acaba generando amonio. El mismo es utilizado como sustrato por un grupo de microorganismos que, independientemente de que la degradación sea aerobia o anaerobia, lo oxidan a nitrato, completando así el ciclo del nitrógeno en la biosfera (Lámina 7). Si bien podría pensarse que el paso $\text{NH}_4^+ \longrightarrow \text{NO}_3^-$ es llevado a cabo por un mismo tipo de microorganismos, esto no es así. La conversión neta de amonio en nitrato requiere de la actividad metabólica de dos tipos de microorganismos. El primero de ellos, cuyos representantes se agrupan en lo que se conoce como grupo nitroso, cataliza la transformación del amonio en nitrito. Este compuesto es a su vez el sustrato de microorganismos incluidos en el segundo grupo, denominado nitro, que transforman el nitrito en nitrato.

Las bacterias nitrificantes son siempre gramnegativas y estrictamente aerobias. Se incluyen dentro de la familia Nitrobacteriáceas. Entre los representantes de este grupo se encuentran microorganismos que se acercan mucho al concepto estricto de Winogradsky de los quimiolitotrofos, especialmente si se considera el hecho de que, al menos en principio, solamente se desarrollan en medios minerales y no utilizan materia orgánica aunque ésta se añada al medio. No obstante, esta última aseveración ha de ser matizada adecuadamente, ya que parece que compuestos orgánicos tales como el acetato sí que pueden ser incorporados al material celular por algunos representantes de este grupo.

Clásicamente se ha considerado que la nitrificación es un proceso que aporta fertilidad al suelo y, en consecuencia, que la flora nitrificante es un factor clave en el proceso de fertilización. No obstante, es importante resaltar que algunos aspectos de la nitrificación pueden no ser tan beneficiosos como parecen. Así, el amonio es retenido mejor por los suelos que el nitrato, el cual es muy susceptible a la lixiviación. Por otra parte, un exceso de actividad nitrificante puede contribuir a la destrucción de construcciones tanto de cemento como de piedra caliza, al convertir en ácido nítrico el amonio atmosférico o el proveniente de excrementos de animales.

20.3 EL GRUPO NITROSO

El grupo nitroso incluye microorganismos que utilizan amoniaco como sustrato y realizan la primera etapa del proceso de nitrificación, es decir, forman nitrito. Los géneros y especies de bacterias pertenecientes a este grupo se reseñan en la tabla 20.1. Dentro del grupo, *Nitrosomonas europaea* es la especie mejor caracterizada. No obstante, especies del género *Nitrosolobus* parecen ser las principales responsables de la nitrificación en los suelos agrícolas.

TABLA 20.1 Géneros representativos de bacterias nitrificantes.			
	Morfología	Motilidad	Hábitat
Grupo nitroso			
<i>Nitrosomonas</i>	Bacilos	±	Suelo, aguas dulces, saladas o residuales
<i>Nitrospira</i>	Espirales	+	Suelo
<i>Nitrosococcus</i>	Cocos	±	Suelo
<i>Nitrosolobus</i>	Pleomórficos	+	Suelo
Grupo nitro			
<i>Nitrobacter</i>	Bacilos cortos	±	Suelo, aguas dulces, aguas saladas
<i>Nitrospina</i>	Bacilos largos y finos	–	Aguas saladas
<i>Nitrococcus</i>	Cocos grandes	+	Aguas saladas
<i>Nitrospira</i>	Células helicoidales a vibrioides	–	Aguas saladas

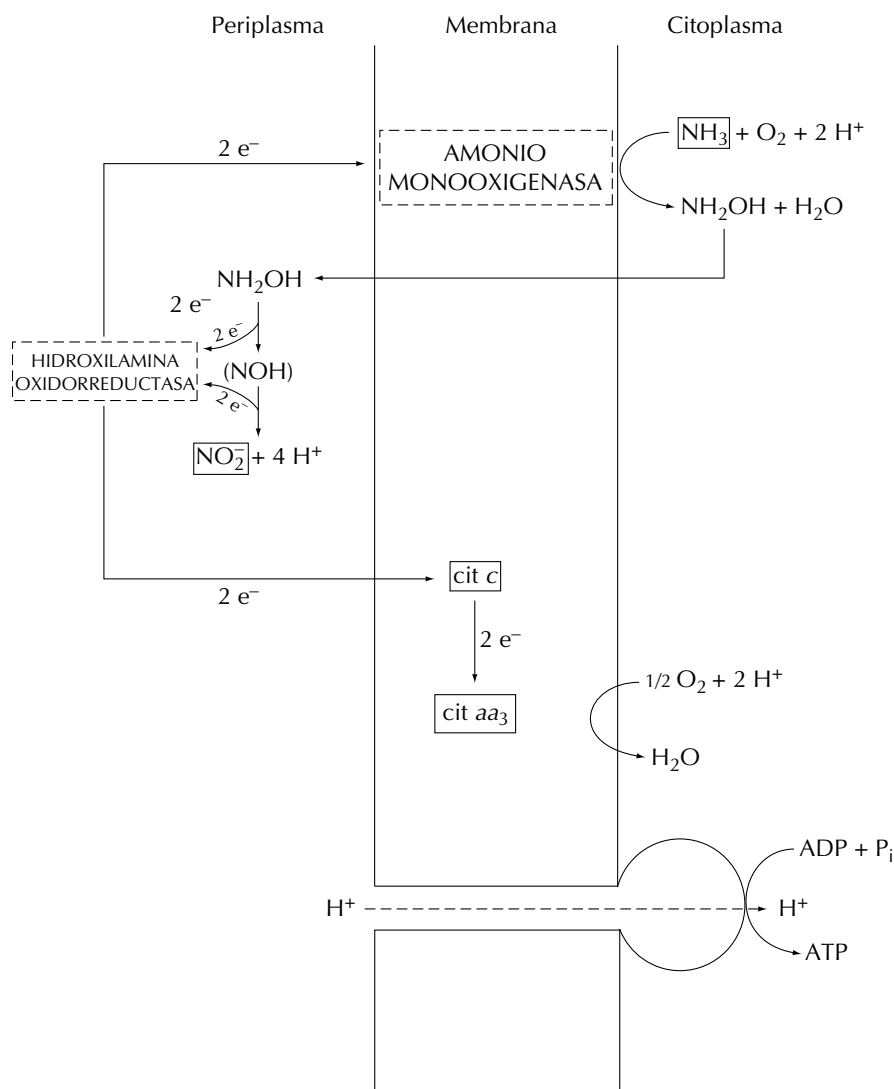


Figura 20.1 Oxidación del amoníaco a nitrito por las bacterias del grupo nitroso.

La oxidación del amoníaco a nitrito tiene lugar en varias etapas (fig. 20.1). En la primera de ellas se genera hidroxilamina mediante la acción de una monooxigenasa; no se produce energía en este proceso. Posteriormente, la hidroxilamina es oxidada a nitrito, formándose ATP en esta etapa debido a la transferencia de electrones a través de una cadena de citocromos y posterior proceso de fosforilación oxidativa (fig. 20.1). En esta reacción participa un complejo enzimático asociado a membrana y otro sistema enzimático que oxida un intermediario hipotético, el nitroxilo (NOH), a nitrito.

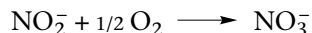
En cuanto a la obtención de energía, hay que considerar que se genera un flujo de electrones vía una cadena de transporte de electro-

nes, lo que a su vez crea un potencial de membrana y un gradiente de protones que se utilizan para generar ATP. De hecho, en la primera etapa del proceso de transformación del amoníaco en nitrito, es decir, la formación de hidroxilamina, se han de aportar dos electrones al sistema. Estos electrones son aportados por el proceso de oxidación de la hidroxilamina, que genera cuatro electrones. Es decir, de cada 4 electrones generados en la oxidación de amoníaco a nitrito, sólo dos entran en la cadena respiratoria (fig. 20.1).

El flujo de electrones que se genera en la cadena respiratoria sólo sirve para producir ATP, ya que los potenciales de óxido-reducción de las parejas $\text{NH}_4^+/\text{NH}_2\text{OH}$ (+899 mV) y $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH}$ (+66 mV) son demasiado positivos como para reducir el NAD^+ . Por ello, la generación de poder reductor implica el funcionamiento de una cadena de transporte inverso de electrones a partir del ATP derivado de la cadena respiratoria. Pero, en función del potencial redox del par $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH}$, los electrones entran a nivel del citocromo *c*, con lo que solamente puede utilizarse un punto de fosforilación en la cadena respiratoria establecida. Teniendo en cuenta el bajo rendimiento de ATP del proceso respiratorio, la necesidad de invertir ATP para obtener poder reductor y la gran cantidad de poder reductor que estas bacterias necesitan para poder fijar el CO_2 por el ciclo de Calvin, el rendimiento en biomasa de estos microorganismos y de otros quimiolitotrofos es muy bajo. La síntesis de un gramo de células (peso seco) implica el consumo de cantidades de sustrato muy superiores a las que consume cualquier otro microorganismo de distinto tipo fisiológico y, como consecuencia de ello, la tasa de duplicación es muy baja.

20.4 EL GRUPO NITRO

Este grupo incluye las bacterias que oxidan el nitrito hasta nitrato. Usualmente se encuentran asociadas a las bacterias del grupo nitroso en sus hábitats naturales. El género más característico es *Nitrobacter*, siendo *N. winogradskyi* probablemente la especie más estudiada. A diferencia de la oxidación de amoníaco a nitrito, la de éste último a nitrato tiene lugar en un solo paso:



La reacción es catalizada por una nitrito oxidasa, una molibdoпротеína localizada en la parte interna de la membrana. Los electrones son transportados al oxígeno mediante una cadena que incluye a los citocromos *a*₁, *c* y *aa*₃. Se ha podido demostrar que el nitrito no es oxidado directamente por el oxígeno sino por el H_2O , que se utiliza como dador de H_2 para la reducción concomitante del NAD^+ . Debido al alto potencial redox del par $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($E'_0 = +0,42$ V), la cadena de transporte de electrones que se establece es muy corta (fig. 20.2). Aun cuando la energía liberada en la oxidación de nitrito a nitrato ($\Delta G^\circ = -76$ kJ) posibilitaría la síntesis de dos moléculas de ATP, parece que solamente se sintetiza una. El proceso de generación de ATP no está completamente aclarado. Nuevamente, la generación de poder reductor no puede tener lugar directamente de la oxidación del nitrito, por lo que tiene que estable-

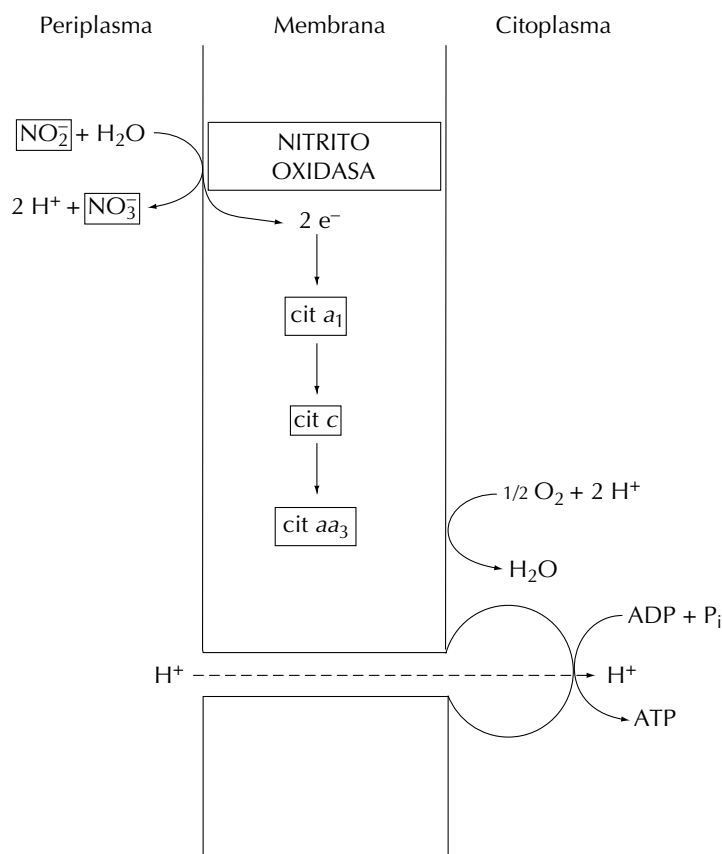


Figura 20.2 Oxidación del nitrito a nitrato por las bacterias del grupo nitro.

cerse una cadena de transporte inverso de electrones para esta finalidad. Teniendo en cuenta el bajo rendimiento energético de su oxidación, es necesario oxidar hasta cinco moléculas de nitrito para conseguir reducir una de NAD^+ . Por ello, el tiempo de duplicación de los representantes del género *Nitrobacter* es de unas 18 horas.

En los miembros del grupo nitro el quimiolitotrofismo no tiene un carácter tan estrictamente obligado como en el grupo nitroso. *Nitrobacter agilis*, además de crecer aerobiamente a expensas del nitrito, también es capaz de crecer, en cierta medida, mixotróficamente e incluso heterotróficamente.

Nitrobacter reduce nitratos anaerobiamente, interviniendo en esta reducción el citocromo c y un componente del citocromo a_1 . El nitrito producido puede ser utilizado como sustrato de la cadena respiratoria. Un exceso de nitrito no inhibe la ulterior reducción de más nitrato. El oxígeno tampoco la inhibe, lo cual contrasta con otros sistemas de nitrato reductasas. En cambio, un exceso de nitrato en el medio inhibe el consumo de oxígeno. *N. agilis* también contiene nitrito reductasa e hidroxilamina reductasa, las cuales se utilizan, junto a la nitrato reductasa, para asimilar el nitrato. Los dos primeros enzimas son solamente activos en condiciones anaerobias.

20.5 OBTENCIÓN DEL PODER REDUCTOR POR LAS BACTERIAS QUIMIOLITOTROFAS

Los ejemplos anteriormente mencionados de las bacterias nitrificantes son extrapolables a la mayoría de los microorganismos quimiolitotrofos: el potencial redox del sustrato que oxidan (tabla 20.2) es demasiado electropositivo como para poder ser utilizado directamente en la reducción del NAD^+ . Por ello, se requiere una estrategia alternativa, que en todos los casos consiste en el funcionamiento a expensas de ATP de una cadena de transporte inverso de electrones. Considerando que el metabolismo quimiolitotrófico implica en muchos casos una cadena de transporte de electrones que genera solamente uno o dos moles de ATP por mol de sustrato oxidado, y que necesita importantes cantidades de NADH para la fijación del CO_2 , no resultan sorprendentes ni las grandes cantidades de sustrato oxidable que consumen muchas bacterias quimiolitotrofas, ni las bajas tasas del tiempo de generación anteriormente referidas.

Una excepción a lo anteriormente mencionado la constituyen las bacterias del hidrógeno (ver capítulo 22). El potencial de reducción de la reacción $\text{H}_2 \longrightarrow 2 \text{H}^+ + 2 e^-$ es suficientemente electronegativo como para poder reducir al NAD^+ directamente y, de hecho, uno de los tipos de hidrogenasa conocidos puede catalizar esa reacción. De la tabla 20.2 se desprende que las bacterias que oxidan el CO, o carboxidobacterias, también están en condiciones de reducir al NAD^+ directamente. No obstante, la monóxido de carbono oxidasa, una molibdo proteína asociada a la membrana, parece que transfiere electrones a otros componentes de la cadena, y no directamente al NAD^+ , situación equivalente a la representada por la hidrogenasa particulada (ver capítulo 22).

20.6 EFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

El concepto clásico de Winogradsky anteriormente expuesto sobre la incapacidad de utilizar materia orgánica y el efecto tóxico de la misma se derivó del estudio de las bacterias nitrificantes. En los últimos años este concepto ha sufrido variaciones importantes.

TABLA 20.2 Potenciales de reducción de las reacciones dadoras de electrones en el metabolismo quimiolitotrófico.

	E'_0 (V)
$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	-0,54
$\text{H}_2 \longrightarrow 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	-0,41
$\text{NAD(P)H} \longrightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+ + 2 e^-$	-0,32
$\text{H}_2\text{S} \longrightarrow \text{S}^0 + 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	-0,27
$\text{S}^0 + 3 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_3^{2-} + 6 \text{H}^+ + 4 e^-$	+0,05
$\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	-0,28
$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NO}_2^- + 5 \text{H}^+ + 4 e^-$	+0,07
$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	+0,42
$\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + e^-$	+0,77
$\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 e^-$	+0,82

Winogradsky y Omeliansky descubrieron (1899) que las concentraciones de glucosa, peptona y asparagina comprendidas entre 0,02 y 0,05% retrasan el crecimiento de las bacterias nitrificantes y que las concentraciones comprendidas entre el 0,2 y el 0,5% lo inhiben completamente. A partir de estos hallazgos se pasó a la idea de que la toxicidad de la materia orgánica era un fenómeno absolutamente general para los organismos que oxidan sustratos inorgánicos (inorganooxidantes).

Se pensó que los compuestos orgánicos no eran capaces de atravesar las envolturas celulares y que quedaban adheridos a la membrana celular impidiendo la penetración del sustrato energético mineral. Esta hipótesis, sugerida por Dugan y Lundgren en 1965, no tiene un apoyo importante y está en contradicción con los mecanismos específicos de permeabilidad descubiertos tanto para iones como para distintos tipos de sustancias orgánicas. Por otra parte, las experiencias con sustancias orgánicas marcadas con isótopos radiactivos han demostrado que pueden realmente incorporarse al protoplasma en cantidades considerables.

En 1966, Borichevski y Umbreit sugirieron que la materia orgánica no era realmente tóxica para las bacterias nitrificantes y que posiblemente podría ser utilizada como sustrato plástico, pero no como sustrato energético. El efecto inhibitor sobre el desarrollo se debería a que es transformada en productos que resultan tóxicos al acumularse. Existe alguna prueba experimental que apoya débilmente a esta hipótesis en relación al efecto tóxico de la acumulación de piruvato en otros quimiolitotrofos obligados como *Thiobacillus thiooxidans*. No obstante, se ha demostrado que los aminoácidos y los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos pueden inhibir el crecimiento de cepas bacterianas muy diversas, a veces en concentraciones muy bajas. Así, la treonina y la valina son inhibidores de *E. coli* y la valina, leucina e isoleucina de *Bacillus anthracis*. En función de los conocimientos que se tienen actualmente sobre la regulación de la síntesis y de la actividad de los enzimas biosintéticos, este fenómeno puede interpretarse de la siguiente manera: una vía metabólica ramificada que conduce a la síntesis de diferentes aminoácidos y que presenta intermediarios comunes puede quedar bloqueada por el exceso de uno de los productos finales ya que inhibirá al primer enzima de la vía, con lo que no se sintetizará ni el producto que está en exceso ni ninguno de los otros que derivan de la misma vía. Algunas cepas evitan este problema disponiendo, por ejemplo, de isoenzimas que catalizan el primer paso de la vía, siendo cada uno de los isoenzimas sensible al exceso de cada uno de los productos finales. Las cepas que no disponen de estos mecanismos son sensibles al exceso en el medio de alguno de los aminoácidos sintetizado en una vía metabólica ramificada.

Un caso estudiado con bastante detalle es la inhibición del crecimiento de *Thiobacillus neapolitanus* por la fenilalanina. Las concentraciones superiores a 10^{-3} mM son inhibitoras, pero las concentraciones inferiores no solamente permiten el crecimiento sino que además la incorporación de la fenilalanina es proporcional a la concentración. Esto debe interpretarse como un efecto sobre un mecanismo regula-

dor, como el que tienen algunos intermediarios del CAT que reprimen el ciclo de las pentosas. Los intermediarios del CAT tienen además un efecto inhibidor debido a la acción quelante.

Recientes investigaciones han demostrado que *Nitrosolobus multiformis* puede utilizar materia orgánica como fuente de energía, lentamente y en ausencia de amoníaco. En *Nitrosococcus oceanus* se han encontrado todos los enzimas de la vía de Embden-Meyerhof y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos con excepción de la fosfofructoquinasa. La peptona estimula el crecimiento de *Nitrobacter winogradskyi*, que ha demostrado la capacidad de utilizar compuestos orgánicos. Entre estos compuestos orgánicos se encuentra el acetato, que puede ser utilizado como fuente de carbono y de energía, que no afecta a la oxidación del nitrito y que simultáneamente contribuye al 30-40% del carbono del protoplasma que se va formando. La asimilación de acetato tiene lugar incluso en ausencia de CO₂ o de bicarbonato. Cuando se agota el nitrito, el acetato, que se mineraliza muy lentamente, se acumula en forma de poli- β -hidroxibutirato. La adición de nitrito suprime la mineralización del acetato e incrementa su asimilación. En realidad *Nitrobacter agilis* puede oxidar nitrito tanto con CO₂ como con acetato como fuentes de carbono. Esto indica un control totalmente independiente del sistema suministrador de energía y del metabolismo biosintético. En ausencia de nitrito, el crecimiento de *Nitrobacter agilis* requiere hidrolizado de caseína además de acetato.

Todo lo reseñado anteriormente invalida el concepto clásico de Winogradsky e indica que los factores que influyen en los efectos de la materia orgánica sobre el metabolismo de los quimiolitotrofos sean posiblemente varios. La incapacidad de utilizarla puede estar asociada, bien a la no disponibilidad de un ciclo de Krebs funcional, bien a la incapacidad de reoxidar el NADH vía cadena respiratoria (recuérdese que muchos quimiolitotrofos tienen una estrategia específica y muy costosa desde el punto de vista energético para generar NADH, por lo que pueden tener mecanismos específicos que impidan su reoxidación). Por otra parte, el efecto tóxico de la materia orgánica cabe probablemente atribuirlo a la presencia en el citoplasma de ciertos metabolitos que o bien no se degradan o bien lo hacen muy lentamente al no existir un ciclo de Krebs funcional, lo que puede provocar alteraciones en la regulación metabólica que redundan en una inhibición del crecimiento. Estas alteraciones serían mucho más drásticas que las que tienen lugar en las bacterias heterotrofas. Por otra parte, algunos de estos efectos reguladores son idénticos a los que reprimen el metabolismo quimiolitotrofo en las bacterias facultativas.

BIBLIOGRAFÍA

- RITTENBERG, S. C. The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. *Adv. Microbiol Physiology*.3, 1977.
- STROHL, W. R. y TUOVINEN, O. H. (editores). *Microbiol Chemoautotrophy*. Ohio State University Press, 1984.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. vol. 3. Williams and Wilkins 1989.

COMPUESTOS DE HIERRO Y DE AZUFRE

- 21.1 OXIDACIÓN DEL HIERRO 282
- 21.2 OXIDACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE
AZUFRE 285
- 21.3 CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO Y
HETEROTRÓFICO 285
- 21.4 VÍAS DE OXIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS
REDUCIDOS DE AZUFRE 286
- 21.5 CADENAS RESPIRATORIAS EN LOS TIOBACILOS.
GENERACIÓN DE ATP Y DE PODER REDUCTOR 288

21.1 OXIDACIÓN DEL HIERRO

El hierro en forma reducida es abundante en las aguas de algunas fuentes y manantiales, existiendo una flora bacteriana asociada a tal tipo de ambientes. La oxidación del hierro fue primeramente observada por Winogradsky en *Leptotrix ochracea*, quien lo interpretó como un equivalente de la oxidación de sustratos orgánicos. Tanto en miembros de este género como en los de los géneros *Gallionella* o *Sphaerotilus*, el crecimiento está asociado al depósito de sales de hidróxido férrico. No obstante, el crecimiento de tales microorganismos tiene lugar en ambientes de pH neutro o alcalino, condiciones en las cuales el ion ferroso es insoluble y se oxida espontáneamente en presencia de aire, por lo que ha sido muy difícil asociar el crecimiento de estos microorganismos a la oxidación del hierro. Solamente en *Gallionella* ha podido demostrarse crecimiento autotrófico, asimilando el CO₂ por el ciclo de Calvin. Además del hierro, en estos ambientes neutros el manganeso también es oxidado por algunas bacterias. Aunque el quimiolitotrofismo basado en la oxidación del manganeso ha sido considerado durante mucho tiempo, no ha llegado a ser conclusivamente demostrado.

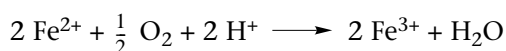
El rendimiento energético de la oxidación del hierro es muy bajo, incluso comparado con el de otras reacciones que soportan el crecimiento de otros grupos de quimiolitotrofos (tabla 21.1), por lo que han de oxidarse grandes cantidades de hierro a fin de obtener energía suficiente. Gracias a las peculiares condiciones en que crece, ha podido demostrarse de forma conclusiva que existe un microorganismo que obtiene la energía necesaria para el crecimiento a partir de la oxidación del hierro. Se trata de *Thiobacillus ferrooxidans*, conocido inicialmente como *Ferrobacillus ferrooxidans*. Este microorganismo crece en medios con un pH notablemente ácido, condiciones en las que el ion ferroso, además de soluble, no es oxidado espontáneamente a férrico en presencia de aire.

Thiobacillus ferrooxidans es también capaz de obtener energía para el crecimiento a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre, además de la oxidación del hierro.

TABLA 21.1 Rendimientos energéticos de la oxidación de diferentes compuestos inorgánicos.

Reacción	ΔG° (kJ/reacción)
$\text{HS}^- + \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$	-203
$\text{S}^0 + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+$	-589
$\text{NH}_4^+ + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{NO}_2^- + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-260
$\text{NO}_2^- + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{NO}_3^-$	-76
$\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	-237
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \frac{1}{4} \text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$	-71

El potencial redox del par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (+0,77 V) está muy próximo al del oxígeno (+0,82 V), por lo que resulta evidente que una cadena de transporte de electrones establecida entre ambos difícilmente generará ATP por fosforilación oxidativa. De hecho, el rendimiento energético de las células que oxidan Fe^{2+} se basa en el ambiente extremadamente ácido en el que viven ($\text{pH} \approx 2$). Teniendo en cuenta que el pH del citoplasma de *T. ferrooxidans* es de aproximadamente 6, la concentración de protones en el medio externo es muy superior a la del citoplasma, por lo que un simple flujo de protones hacia el citoplasma podría generar ATP vía ATPasa. No obstante, esto implicaría una acidificación del citoplasma que ha de ser neutralizada. De hecho, la oxidación del hierro es una reacción que consume protones:



Parece que la reacción $\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+$ tiene lugar en la cara interna de la membrana citoplasmática, mientras que la reacción $\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}$ tiene

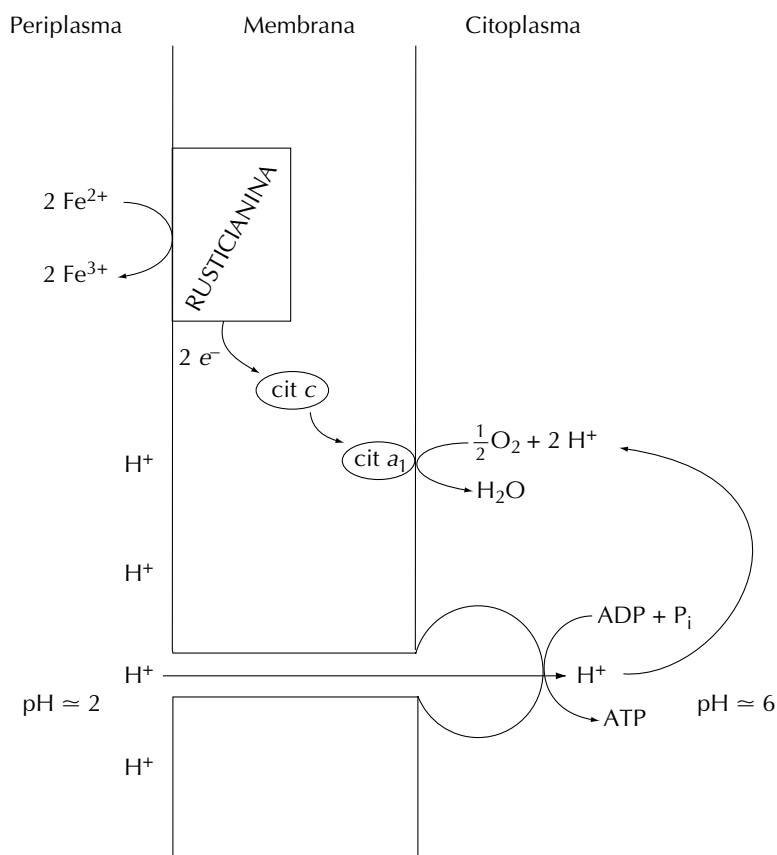


Figura 21.1 Síntesis de ATP a expensas de la oxidación del Fe^{2+} . El gradiente de protones existente por la diferencia de pH entre el citoplasma y el medio externo es utilizado por la ATPasa. A pesar de la incorporación de protones, la concentración citoplasmática de los mismos se mantiene constante al ser utilizados para oxidar el Fe^{2+} .

lugar en la cara externa de la membrana (fig. 21.1). Los electrones liberados por el ion ferroso son aceptados en el periplasma por la rusticianina, una proteína con Cu de alto potencial redox, que a su vez los transfiere al oxígeno vía un citocromo *c* de alto potencial que está asociado a la membrana y un citocromo *a*₁, desde el cual son transferidos los electrones al O₂. Los protones necesarios para formar H₂O se obtienen del citoplasma, por lo que, mientras exista ion ferroso disponible, la célula puede bombear protones del medio externo, con la consiguiente síntesis de ATP. Por lo que respecta a la formación de poder reductor, al igual que en el caso de las bacterias nitrificantes, el alto potencial del par Fe²⁺/Fe³⁺ imposibilita reducir directamente el NAD⁺, por lo que se establece una cadena de transporte inverso de electrones a expensas del ATP generado en la oxidación del hierro. Nuevamente, esto redundaría en un pobre rendimiento en biomasa, ya que tienen que oxidar grandes cantidades de hierro, que precipita, para generar pequeñas cantidades de biomasa.

T. ferrooxidans puede crecer también a expensas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y también oxidando simultáneamente compuestos de hierro y azufre. Además es capaz de crecer heterotróficamente, metabolizando simultáneamente la glucosa por las vías de Entner-Doudoroff y de la hexosa monofosfato. Al igual que en las bacterias del hidrógeno (ver capítulo 22), puede darse también un crecimiento mixotrófico, es decir, utilizando simultáneamente vías de los metabolismos quimiolitotrófico y quimioorganotrófico (fig. 21.2).

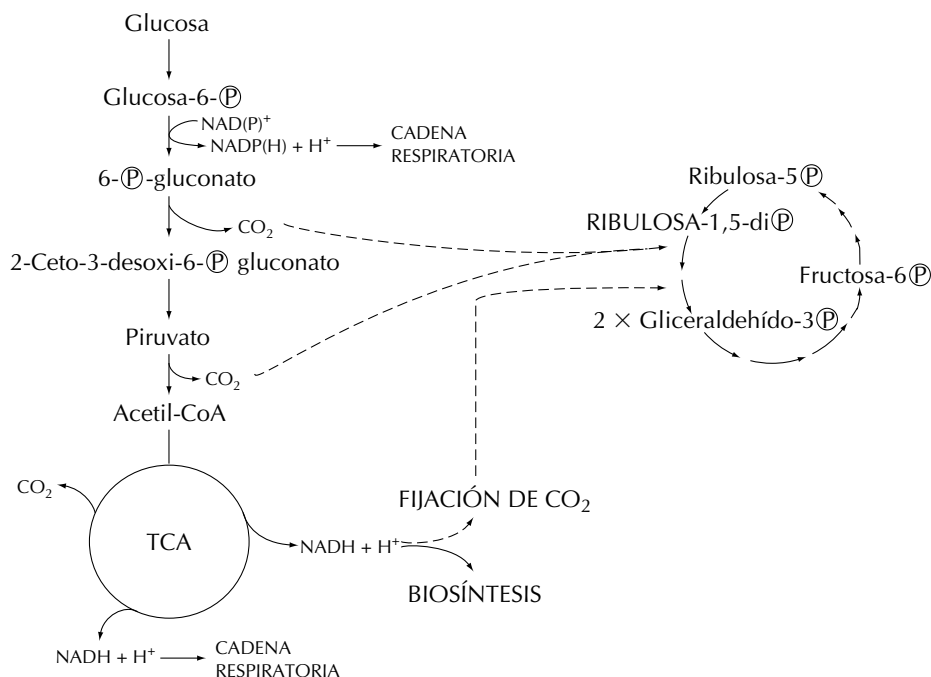
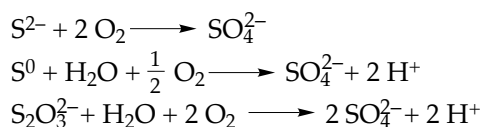


Figura 21.2 Desarrollo mixotrófico de *T. ferrooxidans* en un medio con glucosa y CO₂. En estas condiciones, la oxidación del hierro está reprimida. En trazo discontinuo se representa la fijación autotrófica del CO₂ por el ciclo de Calvin.

Existen diferentes grupos de bacterias carentes de pigmentos (recuérdese que las bacterias verdes y púrpuras pueden utilizar compuestos reducidos de azufre) capaces de crecer a expensas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre (Lámina 8). Si bien la mayoría de ellas se incluyen dentro del género *Thiobacillus*, también se ha encontrado esta propiedad en microorganismos pertenecientes a los géneros *Sulfolobus*, que incluye bacterias termófilas inmóviles y *Thiomicrospira*, un espirilo con flagelación bipolar.

Los compuestos más comúnmente oxidados son el sulfhídrico (H_2S), el azufre elemental (S^0) y el tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). En muchos casos, el producto final de la oxidación es el sulfúrico (SO_4^{2-}):



La mayoría de los tiobacilos son capaces de oxidar indistintamente diferentes compuestos reducidos de azufre, produciendo sulfato como producto final. En los medios ambientes naturales, la oxidación del azufre se combina con la reducción asimiladora y desasimiladora del sulfato. Asimismo, el crecimiento a expensas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre juega un papel esencial en ecosistemas muy especiales, como las grietas submarinas de las que fluye agua a alta temperatura (350 °C). Estas fuentes termales submarinas contienen muchos minerales en solución y también H_2S . En las zonas de contacto con agua oceánica que contiene oxígeno crecen bacterias del azufre que sirven de alimento para otros organismos superiores, tales como cangrejos y gusanos. En estas condiciones se genera un ecosistema en ausencia de energía luminosa y a expensas del metabolismo quimiolitotrófico de diferentes microorganismos.

21.3 CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO Y HETEROTRÓFICO

Si se analiza el porcentaje de bases del ADN de los tiobacilos se comprueba que existe una significativa heterogeneidad, lo que implica una notable diversidad genética. Esto también puede comprobarse si se analiza, por ejemplo, la obligatoriedad del metabolismo quimiolitotrófico en este grupo: mientras algunos de ellos son quimiolitotrofos obligados y dependientes de la fijación del CO_2 (*T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*), otros presentan crecimiento mixotrófico (*T. novellus* y *T. intermedius*), entendiéndose por mixotrofia la capacidad de utilizar conjuntamente productos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono y/o energía.

Starky, en 1934, fue el primero en comprobar que *T. novellus* crece tan bien en un medio orgánico con o sin tiosulfato como en un medio mineral con tiosulfato. Algunos compuestos orgánicos inhiben la oxidación del tiosulfato en mayor o menor grado. Así, la presencia en el medio de un 0,5% de glucosa, sacarosa o asparagina tiene efecto

inhibidor. En estas condiciones se reprime la síntesis de la ribulosa difosfato carboxilasa. En crecimiento autotrófico, *T. novellus* incrementa su crecimiento en un factor de 4 si se le añade glutamato al 0,5%. En estas condiciones se considera que la oxidación del tiosulfato se lleva a cabo simultáneamente con la asimilación del glutamato, probablemente con una baja asimilación autotrófica del CO₂.

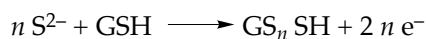
En 1963 London aisló *T. intermedius*, el cual, además de crecer en medios minerales con tiosulfato, ve incrementado su crecimiento por la adición de glucosa, glutamato o extracto de levadura. Con glucosa y tiosulfato se obtiene una fijación de CO₂ radiactivo de sólo el 10%. En estas condiciones, el nivel de ribulosa difosfato carboxilasa es del 40%. Parece que la glucosa suministraría el carbono y el tiosulfato la energía. En medios con extracto de levadura y glucosa, *T. intermedius* presenta un elevado nivel de los enzimas de la vía de Entner-Doudoroff y poca capacidad de oxidar tiosulfato.

Sin duda, un caso peculiar lo representa *T. perometabolis*, aislado por London y Rittenberg en 1967 a partir de un cultivo de enriquecimiento de *T. thioparus*. Esta bacteria es incapaz de crecer en un medio mineral con tiosulfato, y tampoco lo hace en un medio mineral con un sustrato orgánico oxidable. Sin embargo, crece en medios con un sustrato orgánico oxidable (por ejemplo, extractos de levadura y un azúcar) y tiosulfato. De hecho, esta bacteria carece de los enzimas necesarios para la asimilación del CO₂, por lo que es incapaz de crecimiento autotrófico. Por ello, requiere una fuente orgánica de carbono, cuya asimilación necesita de la oxidación del compuesto reducido de azufre.

En el grupo de bacterias del azufre con metabolismo mixotrófico se habrían de incluir probablemente bacterias filamentosas tales como *Beggiatoa* o *Thiothrix*, de amplia distribución en sedimentos marinos y de aguas dulces. Este género fue utilizado por Winogradsky para sus investigaciones que llevaron al concepto de quimiolitotrofismo. No obstante, el género *Beggiatoa* parece no ser uniforme, e incluye cepas de difícil crecimiento en cultivo puro y que, en cualquier caso, requieren materia orgánica como fuente de carbono y energía.

21.4 VÍAS DE OXIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE

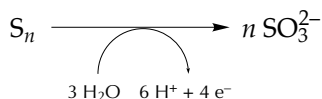
El sulfuro es en primer lugar oxidado a poliazufre-sulfuro por una sulfuro oxidasa que requiere glutatión (GSH):



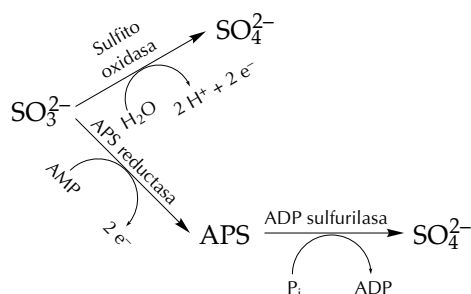
Ésta es también la forma en que el azufre elemental es directamente oxidado. El azufre es altamente insoluble, por lo que algunas bacterias que oxidan el sulfuro lo depositan en forma de gránulos intracelulares. Por esta misma razón, aquellas que crecen directamente a partir de azufre deben crecer en contacto directo con la superficie de la partícula. La oxidación de compuestos reducidos de azufre implica la liberación de protones al medio, lo cual provoca la consiguiente acidi-

ficación. Por ello, no es de extrañar que algunas de estas bacterias sean capaces de crecer a valores de pH inferiores a 1.

El azufre es oxidado a sulfito mediante la acción de una azufre oxidasa:



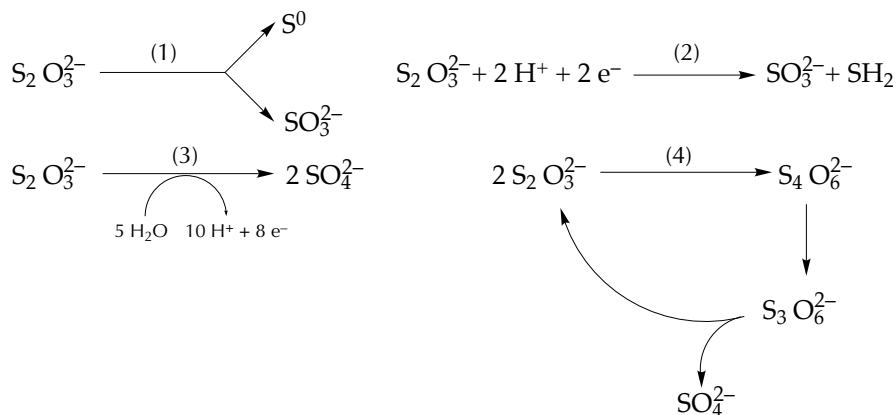
El sulfito es oxidado a sulfato mediante la participación de dos sistemas enzimáticos diferentes. Uno de ellos implica una sulfito oxidasa, molibdo proteína ligada a membrana que transfiere los electrones al citocromo *c*. Además, muchas bacterias disponen del sistema de la adenil-fosfato (APS) reductasa. Para ello, se forma en primer lugar APS, el cual es oxidado después a sulfato, transfiriéndose también los electrones a un citocromo.



Si se sigue esta última vía, puede sintetizarse ATP por un mecanismo de fosforilación a nivel de sustrato en el paso de APS a SO_4^{2-} ya que, puede sintetizarse ATP al condensar dos moléculas de ADP:



El tiosulfato entra en la vía de oxidación del azufre mediante diferentes sistemas: una rodonasa rompe la molécula, originando azufre y sulfito (1); un enzima reductor origina sulfito y sulfhídrico (2); un complejo multienzimático oxidante del tiosulfato origina dos moléculas de sulfato sin otros intermediarios (3); finalmente, la oxidación a sulfato pasa previamente por el tetrationato (4).



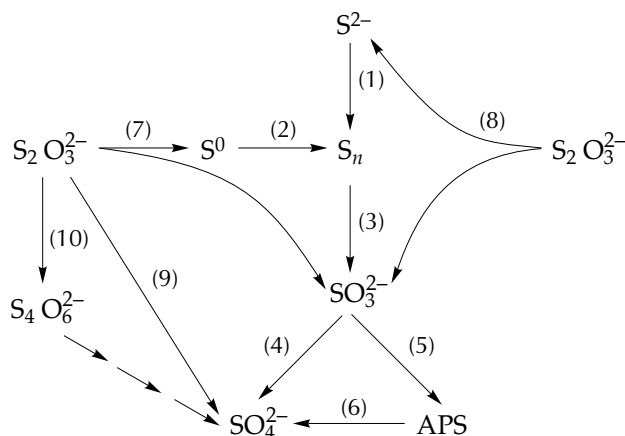


Figura 21.3 Vías de oxidación de compuestos de azufre por las bacterias oxidadoras del azufre. (1) Sulfuro oxidasa; (2) azufre-oxidasa; (3) azufre-oxidasa; (4) sulfito-oxidasa; (5) APS-reductasa; (6) ADP-sulfurilasa; (7) rodonasa; (8) enzima reductor del tiosulfato; (9) complejo oxidante del tiosulfato; (10) vía de formación del tetratiónato.

En la figura 21.3 se representan en su conjunto las diferentes vías responsables de la oxidación de compuestos reducidos de azufre, así como los sistemas enzimáticos implicados.

21.5 CADENAS RESPIRATORIAS EN LOS TIOBACILOS. GENERACIÓN DE ATP Y DE PODER REDUCTOR

Los electrones drenados de la oxidación de compuestos entran en diferentes puntos (en función del potencial de reducción del compuesto del que son drenados), y son transportados usualmente al oxígeno a través de una cadena de citocromos, generándose ATP por fosforilación oxidativa. El citocromo *c* suele ser el punto de entrada para la mayoría de los compuestos, aun cuando también pueden existir otros (fig. 21.4). *T. denitrificans* es un anaerobio facultativo que puede utilizar el nitrato como aceptor terminal de electrones y que crece mejor que *T. thiooxidans*. Esto último puede deberse al hecho de que es capaz de utilizar una flavoproteína como aceptor de electrones, lo cual le daría un punto más de fosforilación en la cadena respiratoria.

Al igual que en otros ejemplos de bacterias quimiolitotrofas mencionadas anteriormente, el potencial de reducción de los compuestos de azufre utilizados por este grupo no posibilita una reducción directa del NAD^+ , por lo que es necesario el funcionamiento de una cadena de transporte inverso de electrones a expensas de ATP.

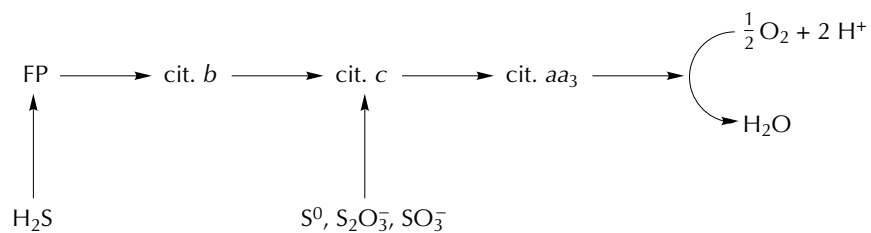


Figura 21.4 Flujo de electrones procedentes de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. FP, flavoproteína; cit. *b*, citocromo *b*; cit. *c*, citocromo *c*; cit. *aa*₃, citocromo *aa*₃. *T. denitrificans* puede utilizar NO₃⁻ como aceptor final en lugar de O₂.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

22.1	LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO Y OTROS AUTOTROFOS FACULTATIVOS	292
22.2	TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO	292
22.3	CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO	293
22.3.1	Características generales del crecimiento autotrófico de las bacterias del H ₂	293
22.3.2	El sistema de la hidrogenasa	294
22.3.3	Asimilación del CO ₂	295
22.4	ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO	296
22.5	CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO	296
22.6	OXIDACIÓN DEL MONÓXIDO DE CARBONO	297
22.7	OXIDACIÓN DEL H ₂ EN <i>PARACOCCLUS</i> <i>DENITRIFICANS</i>	297
22.8	OXIDACIÓN DEL HIDRÓGENO EN <i>DESULFOVIBRIO</i>	298
	BIBLIOGRAFÍA	299

22.1 LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO Y OTROS AUTOTROFOS FACULTATIVOS

De Saussure y Liebig fueron los primeros en poner de manifiesto la oxidación biológica del hidrógeno molecular con oxígeno. En 1892, Immendorf atribuyó por primera vez a unas bacterias la capacidad de utilizar el hidrógeno libre como sustrato del proceso respiratorio.

La reacción química entre el hidrógeno y el oxígeno es conocida con el nombre de reacción del gas detonante por su carácter explosivo. Las bacterias que oxidan hidrógeno con oxígeno llevan a cabo la misma reacción y por esto se incluyen bajo la denominación general de bacterias del gas detonante. La primera de ellas fue aislada por Kaserer en 1906 y la denominó *Bacillus pantotrophus*, cuyo nombre específico indica el gran número de sustratos orgánicos que puede utilizar como fuente de energía. Por lo tanto, esta bacteria posee la propiedad de crecer heterotróficamente como quimioorganotrofo aerobio en una gran diversidad de medios. No obstante, también es capaz de oxidar hidrógeno molecular con oxígeno y de utilizar la energía liberada para fijar el anhídrido carbónico a través del ciclo de Calvin. En estas condiciones se comporta como un quimiolitotrofo autotrofo. Posteriormente se descubrieron otras bacterias que presentan un comportamiento facultativo análogo al de *Bacillus pantotrophus*.

En 1954, Woods y Lascelles describen aún a las bacterias del hidrógeno como organismos capaces de un metabolismo dual independiente y opuesto. Como ya ha sido señalado previamente, esto era consecuencia de la influencia de las ideas de Winogradsky sobre la unidad del metabolismo de los inorganooxidantes. De hecho, este concepto había sido confirmado por las primeras observaciones de la inhibición de la oxidación del hidrógeno molecular por diversos compuestos orgánicos en *Hydrogenomonas flava* e *H. vitrea* (Niklewski, 1910), y *Bacillus pycnoticus* (Ruhland, 1924). Más tarde, Kluyver y Manten (1942), encontraron que, si bien las suspensiones de *H. flava* no podían oxidar el hidrógeno molecular cuando crecían heterotróficamente, las suspensiones que se desarrollaban autotróficamente podían oxidar H_2 y lactato. Este dato fue confirmado por Wilson (1953) y constituye el primer indicio de que las bacterias del hidrógeno son capaces de expresar simultáneamente las dos fisiologías alternativas. Posteriormente, el desarrollo mixotrófico de las bacterias del gas detonante ha sido claramente demostrado.

Además de las bacterias del hidrógeno, otras bacterias que obtienen la energía a través de la oxidación de compuestos reducidos de azufre, como *Thiobacillus novellus* y *T. intermedius*, pueden presentar un desarrollo autotrófico facultativo. Estas bacterias, que también son capaces de desarrollo mixotrófico, se han considerado al tratar de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

22.2 TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS DEL HIDRÓGENO

Orla-Jensen propuso la denominación de *Hydrogenomonas* para el género de los bacilos gramnegativos capaces de oxidar el hidrógeno molecular, incluyéndose en el mismo *Bacillus pantotrophus*. El género

Hydrogenomonas estaría definido por las mismas características que el género *Pseudomonas* pero tendría la propiedad adicional de desarrollarse autotróficamente mediante la oxidación de hidrógeno molecular en una atmósfera de gas detonante.

Actualmente, la validez del género *Hydrogenomonas* se ha desestimado. Entre las principales razones a favor de este criterio se encuentran las relaciones genéticas entre los géneros *Hydrogenomonas* y *Pseudomonas*, las diferencias entre las distintas especies que se incluían en *Hydrogenomonas*, la pérdida espontánea de la capacidad de desarrollo autotrófico después del subcultivo en medios orgánicos, el descubrimiento de otras bacterias del hidrógeno muy alejadas taxonómicamente que presentan, algunas de ellas, estirpes oxidadoras y no oxidadoras del hidrógeno en especies tan bien definidas como *Alcaligenes paradoxus* y *Nocardia opaca*, y, finalmente, el hecho de que en algunos casos la capacidad de desarrollo autotrófico se halle vehiculizada por un plásmido.

Los antiguos miembros del género *Hydrogenomonas* se distribuyen actualmente entre los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. En la tabla 22.1 se reseñan algunas de las especies de bacterias del hidrógeno descritas hasta ahora. Sin duda, su número se ampliará en el futuro.

22.3 CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO

22.3.1 Características generales del crecimiento autotrófico de las bacterias del H₂

En general, las bacterias del hidrógeno pueden considerarse organismos autotrofos facultativos. Usualmente, el crecimiento es aerobio,

TABLA 22.1 Algunas de las especies más representativas de las bacterias del hidrógeno.

Especie	Gram	Hidrogenasa ligada al NAD ⁺	Hidrogenasa particulada	Fijación de N ₂	Temperatura de crecimiento
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	—	+	+	—	m*
<i>Alcaligenes latus</i>	—	—	+	+	m
<i>Azospirillum lipofermentum</i>	—	—	+	+	m
<i>Derxia gummosa</i>	—	—	+	+	m
<i>Paracoccus denitrificans</i>	—	—	+	—	m
<i>Pseudomonas facilis</i>	—	—	+	—	m
<i>Pseudomonas flava</i>	—	—	+	—	m
<i>Pseudomonas thermophila</i>	—	n.e.	+	n.e.	t**
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	—	—	+	—	m
<i>Rhizobium japonicum</i>	—	—	+	+	m
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	—	—	+	+	m
<i>Arthrobacter</i> spp. cepa 11/X	+	—	+	—	m
<i>Bacillus schlegelii</i>	+	—	+	—	t
<i>Mycobacterium gordonae</i>	+	n.e.	+	—	m
<i>Nocardia autotrophica</i>	+	+	—	—	m
<i>Nocardia opaca</i>	+	+	—	—	m

n.e. no estudiado.

* mesofílico.

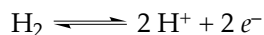
** termofílico.

quedando restringido el crecimiento anaerobio a unas pocas especies que pueden realizar una reducción desasimiladora del nitrato. Hay que destacar que las condiciones óptimas son microaerófilas, ya que las hidrogenasas son sensibles al O₂ (usualmente, un 10% de O₂ es óptimo para el crecimiento).

En condiciones autotróficas, el crecimiento de este grupo no requiere condiciones especiales. La mayoría de las especies pueden crecer en un medio compuesto por sales minerales y una atmósfera con los correspondientes gases. En estas condiciones, muchas especies requieren níquel para el crecimiento, probablemente por su papel en la formación de las hidrogenasas. Durante el crecimiento autotrófico, la proporción en que se encuentran los gases H₂, CO₂ y O₂ es crítica. La fijación del CO₂ como fuente de carbono depende del contenido de O₂ de la atmósfera. El consumo óptimo de estos gases se da, según la especie, cuando el H₂, el CO₂ y el O₂ se encuentran en la proporción 5,7:1,7:1 o bien 8:3:1.

22.3.2 El sistema de la hidrogenasa

Se han descrito dos familias de hidrogenasas, una soluble y otra particulada. Se trata en todos los casos de metaloproteínas con hierro y azufre que contienen níquel. La familia de las solubles incluye proteínas tetraméricas que presentan la capacidad de reducir el NAD⁺, mientras que la familia de las particuladas incluye enzimas diméricos, ligados a membrana, que transfieren los electrones del hidrógeno directamente a la cadena respiratoria, al nivel de la quinona. Mientras que algunas especies presentan solamente la hidrogenasa soluble, como es el caso de *Nocardia opaca* y de *Alcaligenes denitrificans*, es mucho más frecuente la presencia de una hidrogenasa ligada a membrana, siendo el ejemplo mejor caracterizado el de *Paracoccus denitrificans*. También un pequeño grupo de especies dispone de dos hidrogenasas, una soluble y otra particulada, siendo *Alcaligenes eutrophus* un ejemplo característico. Las hidrogenasas catalizan la oxidación del hidrógeno según la siguiente estequiometría:



La disponibilidad de una hidrogenasa soluble posibilita obtener directamente el NADH necesario para la reducción del CO₂. Este no es el caso de la mayoría de las bacterias del hidrógeno, que contienen exclusivamente la hidrogenasa ligada a membrana. En este caso, se requiere un transporte inverso de electrones hasta el NAD⁺.

Las bacterias del hidrógeno obtienen ATP por fosforilación oxidativa mediante una cadena respiratoria. En este grupo los componentes del sistema de transporte de electrones son esencialmente del mismo tipo que los encontrados en otras bacterias y en las mitocondrias. De hecho, la cadena respiratoria de *Paracoccus denitrificans*, muy parecida a la de *Alcaligenes eutrophus*, es muy similar a la del sistema mitocondrial (ver capítulo 13). Por otra parte, la naturaleza del crecimiento, ya sea quimiolitotrófico, o quimioorganotrófico no afecta

esencialmente a las proporciones cualitativas de los citocromos de la cadena respiratoria.

En muchas bacterias del hidrógeno, el determinante genético de este tipo de metabolismo ha podido ser asociado a plásmidos, muchos de ellos conjugativos. Así, la cepa H16 de *A. eutrophus* codifica un megaplásmido conjugativo de 450 kb, el cual, además de incorporar la información genética para la oxidación del hidrógeno, incorpora otras muchas actividades metabólicas como, por ejemplo, la fijación del CO₂.

En algunas especies, tales como *Paracoccus denitrificans* y *Alcaligenes hydrogenophilus*, la síntesis de la hidrogenasa es dependiente del H₂. En otros casos, como, por ejemplo, en *A. eutrophus*, la síntesis de sus dos hidrogenasas es reprimida en presencia de fuentes orgánicas de carbono fácilmente utilizables, como el piruvato o succinato. Asimismo, también es dependiente de la temperatura, reprimiéndose por encima de 33 °C.

22.3.3 Asimilación del CO₂

En todas las bacterias del hidrógeno aerobias el mecanismo por el que se fija el CO₂ es el ciclo de Calvin. Sólo las bacterias anaerobias tales como las metanogénicas, las acetogénicas o las Clorobiáceas pueden fijar CO₂ por carboxilaciones reductoras sin necesidad del ciclo de Calvin, ya que disponen de dadores de electrones más electronegativos que el NAD⁺ (capítulos 8, 11 y 23). Los enzimas clave del ciclo de Calvin, la ribulosa difosfato carboxilasa y la fosforribulosa quinasa se expresan siguiendo pautas parecidas a la hidrogenasa: en crecimiento heterotrófico son total o parcialmente reprimidas en función del sustrato que soporta el crecimiento. Así, en el modelo de *A. eutrophus*, uno de los más estudiados, la fructosa, el glutamato o el citrato no reprimen totalmente estos enzimas, mientras que el succinato, piruvato, lactato o acetato sí que lo hacen. Asimismo, la actividad de ambos enzimas también está precisamente regulada. La actividad de la fosforribulosa quinasa es sensible a la carga energética de las células y, en algunos casos, a la concentración intracelular de NADH, lo cual se justifica con las necesidades metabólicas cuando las células asimilan CO₂. Mientras que el AMP cíclico (cAMP) suele ser un inhibidor de la actividad del enzima, el NAD⁺ suele ser un activador. En cuanto a la ribulosa difosfato carboxilasa, su actividad es inhibida competitivamente por el O₂ y por el 6-fosfogluconato. Teniendo en cuenta que la mayoría de las bacterias del hidrógeno degradan las hexosas por la vía de Entner-Doudoroff (recuérdese que el 6-fosfogluconato es el intermediario inicial), es comprensible que un exceso de 6-fosfogluconato, indicativo de la presencia de hexosas, reprima la actividad de la ribulosa difosfato carboxilasa. Por otra parte, la inhibición por el O₂ de la actividad carboxilásica se justifica porque el enzima, al igual que en las plantas, también tiene actividad oxigenásica, generando 2-fosfoglicolato. En función de la relación CO₂/O₂, *A. eutrophus* produce y excreta glicolato. Cuando la proporción de CO₂ se reduce de un 1% a un 0,07%, la proporción de CO₂ fijado en forma de glicolato aumenta

de un 1% a un 50%. Por tanto, el CO_2 y el O_2 juegan un papel opuesto en la síntesis de glicolato. Si bien es difícil asignar un papel fisiológico a esta actividad oxigenásica en bacterias (en las plantas puede ejercer un papel protector del aparato fotosintético, proporcionando CO_2 cuando la concentración de este compuesto es muy baja y evitando la acumulación de compuestos reducidos procedentes del fotometabolismo), se cree que ambas funciones, carboxilásica y oxigenásica, probablemente sean inseparables del mismo enzima.

22.4 ASIMILACIÓN DEL NITRÓGENO

El amonio es una fuente de nitrógeno utilizable por todas las bacterias del hidrógeno estudiadas. El nitrato o el nitrito también pueden ser utilizados por algunas cepas. Por lo que respecta a las fuentes orgánicas de nitrógeno, la urea es una buena fuente de nitrógeno. La misma es hidrolizada por una ureasa inducible. Otras fuentes de nitrógeno orgánicas, tales como diferentes aminoácidos, ácido úrico, alantoína, guanina, xantina, hipoxantina, etc., también pueden ser utilizadas, por las bacterias del hidrógeno aunque no siempre.

Una situación especial la representan aquellas bacterias del hidrógeno que son capaces de fijar el nitrógeno elemental. El grupo de bacterias del hidrógeno caracterizado inicialmente por su capacidad de fijar nitrógeno molecular incluye microorganismos corineformes pigmentados de color amarillo, que se incluyen dentro del género *Xanthobacter*. Tales microorganismos pueden crecer en una atmósfera de N_2 , H_2 , O_2 y CO_2 , utilizando el nitrógeno molecular como única fuente de este elemento, siendo la fijación de N_2 relativamente sensible a la presión parcial de oxígeno (por ejemplo, mientras que la máxima tasa de crecimiento con amonio como fuente de nitrógeno se consigue a una presión parcial de O_2 de 0,15 bar, cuando se utiliza N_2 dicha presión parcial ha de ser de 0,014 bar).

Estudiando microorganismos clásicamente caracterizados por su capacidad de fijar nitrógeno molecular con la finalidad de detectar la capacidad de utilizar hidrógeno molecular y de fijar CO_2 mediante la ribulosa difosfato carboxilasa, se encontró una cepa de *Rhizobium japonicum* y otra de *Azospirillum lipoferum* que también son capaces de crecer en una atmósfera de N_2 , H_2 , O_2 y CO_2 .

22.5 CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO

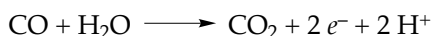
Tal como ha sido definido previamente, por mixotrofia se entiende la capacidad de utilizar conjuntamente compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono y/o energía. Por tanto, para que exista crecimiento mixotrófico basta que el microorganismo utilice de forma conjunta compuestos orgánicos e inorgánicos, ya sea como fuente de energía o como fuente de carbono. En otras palabras, cuando un microorganismo crece a expensas de, por ejemplo, un esqueleto carbonado como fuente de carbono y energía, existe mixotrofia si la adición de H_2 a la atmósfera del cultivo provoca un

aumento del rendimiento energético o si, en las mismas condiciones, la adición de CO₂ provoca su incorporación al material celular.

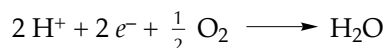
El mixotrofismo es una característica del metabolismo de las bacterias del hidrógeno. Muchos representantes de este grupo tienen esta capacidad, aumentando su tasa de crecimiento o su rendimiento cuando crecen sobre sustratos orgánicos en atmósfera de H₂, CO₂ y O₂; este es el caso, entre otros, de *Pseudomonas facilis*, *Paracoccus denitrificans* o *Alcaligenes eutrophus*. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente acerca de la represión de la hidrogenasa, las condiciones de crecimiento mixotrófico para diferentes especies incluidas en el grupo de las bacterias del hidrógeno dependerán de si el sustrato orgánico que soporta el crecimiento o la propia temperatura de crecimiento son inhibitorias o no para la hidrogenasa. Así, retomando el ejemplo de *A. eutrophus*, este microorganismo puede crecer mixotróficamente sobre fructosa, que sólo reprime parcialmente a la hidrogenasa, pero no sobre lactato o piruvato, que poseen una fuerte capacidad represora.

22.6 OXIDACIÓN DEL MONÓXIDO DE CARBONO

Un grupo de bacterias, la mayoría de las cuales se incluye en los géneros *Pseudomonas* o *Alcaligenes*, es capaz de crecer autotróficamente a expensas de monóxido de carbono, en una atmósfera de CO y O₂. Dicho crecimiento genera CO₂, pasando al carbono celular parte del CO consumido. El enzima clave es una CO oxidorreductasa, una molibdo proteína que se forma exclusivamente en presencia de CO. Las CO oxidorreductasas de todos los microorganismos estudiados son enzimas solubles que no transfieren electrones al NAD⁺ y que oxidan el CO según la estequiometría:



Posteriormente, a través de la cadena respiratoria,



Todas estas bacterias pueden considerarse como bacterias del hidrógeno, ya que también son capaces de crecer a expensas de H₂ y CO₂, incluso mejor que con CO. De hecho, las células que crecen en presencia de CO también contienen hidrogenasa.

22.7 OXIDACIÓN DEL H₂ EN *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*

Paracoccus denitrificans fue aislado por primera vez por Beijerinck y Minckman (1910) como un coco gramnegativo quimioorganotrófico. En 1954 Verhoeven y Kluyver descubrieron su capacidad de oxidar el hidrógeno molecular, tanto con oxígeno molecular como con nitrato. Kornberg, en 1968, puso de manifiesto que en el desarrollo autotrófico la fijación del CO₂ tiene lugar por el ciclo de la ribulosa fosfato.

Cuando *P. denitrificans* crece con un sustrato orgánico, la actividad hidrogenásica se reprime, pudiendo llegar a ser nula. También se reprime la Ru-1,5-PP-carboxilasa, la Ru-5-P-quinasa y la pentosa fosfato isomerasa. Si se pasa del medio mineral al medio orgánico, no sólo tiene lugar la represión enzimática referida sino que se inducen varios enzimas catabólicos.

En medio mineral, *P. denitrificans* sólo es capaz de oxidar H_2 con nitrato si se añade extracto de levadura. Ello se debe al efecto destoxificante sobre el nitrito.

El extracto de levadura tiene un efecto adicional, aumentando el crecimiento total en atmósfera de H_2 , O_2 y CO_2 . En estas condiciones el crecimiento obtenido es mayor que la suma del que se obtiene separadamente en medio mineral- CO_2 en atmósfera de H_2 , O_2 y CO_2 , y medio mineral con extracto de levadura en el aire. El extracto de levadura no modifica la actividad hidrogenásica, por lo que se cree que no interviene en el suministro energético. Sólo el 35% del carbono deriva del CO_2 , siendo el resto del extracto de levadura. Por lo tanto, *Paracoccus denitrificans* se desarrolla mixotróficamente utilizando la oxidación del hidrógeno como única fuente de energía.

Se ha podido comprobar que el extracto de levadura inhibe la eficacia del ciclo de la ribulosa fosfato. No obstante, se utiliza como fuente de carbono de forma mucho más eficaz cuando la oxidación del hidrógeno es la fuente de energía.

22.8 OXIDACIÓN DEL HIDRÓGENO EN *DESULFOVIBRIO*

Ya ha sido comentado que el sulfato puede ser reducido con hidrógeno molecular por los miembros del género *Desulfovibrio* (capítulo 15). Este hecho constituyó la base para considerar que estas bacterias son potencialmente capaces de desarrollo autotrófico. De hecho, Buttin y Adams refirieron en 1947 el cultivo puro en medio mineral, en el cual se supone que el CO_2 es la única fuente de carbono. A pesar de que estos resultados fueron confirmados por varios autores, quedaba claro que el desarrollo autotrófico era muy pobre y que no se podía mantener indefinidamente. También se comprobó que la adición de pequeñas cantidades de extracto de levadura exaltaba extraordinariamente el crecimiento.

Mechalas y Rittenberg demostraron que el crecimiento es proporcional a la cantidad de extracto de levadura, dentro de un intervalo de concentraciones que alcanzan valores suficientemente altos para considerar que los factores de crecimiento necesarios deben estar en cantidades adecuadas. Por otra parte, en presencia de extracto de levadura, la cantidad de ^{14}C fijada es la misma. Con estos datos se ha llegado a la conclusión de que no hay verdadero autotrofismo; y, por supuesto, no ha sido probada la existencia de fosforribulosa quinasa y ribulosa difosfato carboxilasa.

El isobutanol puede reemplazar al H_2 en el metabolismo de *D. desulfuricans*. El extracto de levadura, necesariamente presente, proporciona el 90% del carbono celular y el resto proviene del CO_2 . El

isobutanol es convertido cuantitativamente a ácido isobutírico, el cual actúa exclusivamente como fuente de energía y no se incorpora al material celular. La colina, el oxamato y el fumarato pueden tener el mismo efecto que el isobutanol.

En una cepa de *Desulfovibrio* capaz de crecer sobre oxamato y con extracto de levadura se ha probado la existencia de oxamato carbamiltransferasa, oxalato descarboxilasa y formato deshidrogenasa. Al parecer utiliza hidrógeno para reducir sulfato y dispone de un sistema capaz de producirlo con independencia del H₂ del medio. Este puede ser el caso de otras cepas que utilizan formiato.

No hay pruebas de la necesidad de una fuente tan compleja de carbono como el extracto de levadura, que es la utilizada en todos los experimentos referidos que condujeron al conocimiento del carácter heterotrófico de *Desulfovibrio*. También se ha demostrado que el acetato, que no puede ser utilizado en crecimiento quimioorganotrófico, puede proveer más de dos terceras partes del carbono celular cuando está junto a hidrógeno molecular y formiato; el resto del carbono proviene del CO₂.

Recientemente se han descrito nuevas especies de reductores de sulfatos (Capítulo 15). Entre ellas se encuentran algunas que pueden crecer autotróficamente (tabla 15.2).

BIBLIOGRAFÍA

- BOWIEN, B. y SCHLEGEL, H. G. Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 35; pp. 405–452. 1981.
- FRIEDICH, B. y SCHWARTZ, E. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, pp. 351–383. 1993.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

P*_{ARTE} ***G**

ENERGÍA RADIANTE

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

FOTOFOSFORILACIÓN Y FOTOMETABOLISMO

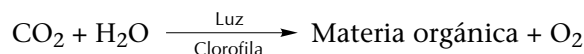
23.1	FOTOSÍNTESIS VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS BACTERIANA. PERSPECTIVA HISTÓRICA	304
23.2	FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA Y ANOXIGÉNICA EN EL MUNDO MICROBIANO	307
23.3	GRUPOS DE BACTERIAS FOTOTROFAS	307
23.4	BACTERIAS PÚRPURA	308
23.5	BACTERIAS VERDES	311
23.6	FISIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO FOTOTRÓFICO EN LAS BACTERIAS PÚRPURA Y VERDES	311
23.7	LA FOTOSÍNTESIS DE LAS CIANOBACTERIAS	313
23.8	EL FOTOMETABOLISMO DE LAS HALOBACTERIAS	317
23.9	BIOLUMINISCENCIA EN LAS BACTERIAS	318
	BIBLIOGRAFÍA	320

23.1 FOTOSÍNTESIS VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS BACTERIANA. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Nuestro conocimiento de la fotosíntesis tiene su punto de partida en tres observaciones llevadas a cabo a fines del siglo XVIII:

- a) Capacidad de las plantas verdes de purificar el aire viciado (John Priestley).
- b) Que este proceso sólo se verifica en presencia de luz (Ingenhousz).
- c) Las plantas necesitan aire fijo, o sea, anhídrido carbónico, para de-sencadenar esta actividad (Senebier).

En el siglo pasado Saussure establece la estequiometría de la fotosíntesis vegetal:



Esta estequiometría pone de manifiesto que el agua también juega un papel esencial. Von Mayer, el descubridor del principio de la conservación de la energía, fue probablemente quien primero puso particular énfasis, también durante el siglo pasado, en el hecho de que la fotosíntesis era una conversión de energía luminosa en energía química utilizable para la síntesis de la materia viva vegetal (fototrofismo). La luz es una fuente primaria de energía que también pueden utilizar las bacterias, además de la derivada de la oxidación de sustratos minerales u orgánicos.

Con anterioridad al descubrimiento de las bacterias fototrofas, los microorganismos jugaron un importante papel en la evolución de nuestro conocimiento sobre la fotosíntesis vegetal; y luego, con el descubrimiento de aquéllas, se incrementó considerablemente nuestra visión general del propio proceso fotosintético en la totalidad de los seres vivos.

Alrededor de 1880, Engelmann llevó a cabo una serie de experimentos muy ingeniosos en los cuales utilizaba bacterias aerobias móviles comunes como detectoras de oxígeno molecular. A partir de estos experimentos pudo constatar lo siguiente:

- a) Existe una conexión directa entre la producción de oxígeno y los cloroplastos. Esta conclusión está de acuerdo con la acumulación de bacterias alrededor de un filamento de *Spirogyra* siguiendo los acodos del cloroplasto laminar.
- b) La fotosíntesis sólo tiene lugar con luz correspondiente a las bandas de absorción del pigmento verde. Esto está de acuerdo con los cúmulos de bacterias observados sobre el cloroplasto laminar cuando se proyecta sobre él un microespectro solar.
- c) La luz absorbida por otros pigmentos distintos de la clorofila y presentes en algas rojas, pardas y cianofíceas también es utilizada para la fotosíntesis. Esto está de acuerdo con los cúmulos de bacterias encontrados en las regiones del espectro donde los pigmentos, rojos, pardos y verdeazulados absorben una mayor

cantidad de luz que la clorofila que se encuentra presente junto a ellos. Esta conclusión tardó más de ochenta años en ser comúnmente aceptada.

Engelmann también observó que las algas móviles experimentaban movimientos fototácticos y se acumulaban en las zonas iluminadas con radiaciones de una longitud de onda definida y de una intensidad apropiada, coincidiendo con la absorción máxima de los pigmentos que contenían. Por ello, cuando en 1883 observó que ciertas bacterias rojas también presentaban el mismo tactismo de acuerdo con las características de absorción de su pigmento, no dudó en concluir que dichas bacterias rojas eran fotosintéticas. Esta conclusión llevaba implícito el sorprendente supuesto de que el infrarrojo de 900 nm debía ser efectivo para la fotosíntesis.

Las célebres bacterias luminiscentes descubiertas por Beijerinck también han desempeñado un papel interesante en el estudio de la fotosíntesis. La emisión de luz por parte de estas bacterias es estrictamente dependiente de la disponibilidad de oxígeno y la sensibilidad de esta reacción es mucho mayor que la de la reacción táctica de las bacterias móviles aerobias. Mediante estos detectores más sensibles se comprobó, posteriormente a los experimentos de Engelmann, que las bacterias rojas no desprenden oxígeno y, por tanto, no presentan uno de los rasgos fundamentales del proceso fotosintético. Esta comprobación constituyó un elemento de discordia respecto de la idea de Engelmann de que las bacterias rojas eran fotosintéticas.

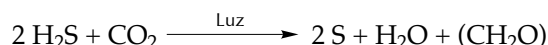
Beijerinck desarrolló los primeros medios de cultivo puro de algas microscópicas, aplicando con éxito los métodos introducidos por Koch para las bacterias. La disponibilidad de este material ha tenido una importancia vital en todos los estudios sobre la fotosíntesis llevados a cabo hasta la actualidad, empezando por los célebres trabajos de Warburg en los que a partir de 1920 se puso de manifiesto la existencia de una fase luminosa y una fase oscura y con los que descubrió la reducción fotoquímica del nitrato. Este último era una alternativa al CO_2 no prevista en la estequiometría de Saussure.

El descubrimiento de las bacterias inorganooxidantes por Winogradsky y su capacidad de desarrollo autotrófico jugaron un importante papel tanto en la comprensión de las bacterias rojas de Engelmann como en el de la propia fotosíntesis en general. Por una parte, el autotrofismo quedaba desvinculado de la propia fotosíntesis y por lo tanto estaba implícita la posibilidad de que la fijación autotrófica de CO_2 tuviera lugar por reacciones análogas en uno y otro caso. La misma reducción del CO_2 no estaría necesariamente ligada al mecanismo fotosintético. Lebedeff, en 1908, parece haber sido el primero en señalar este hecho pero, como en otras ocasiones, la época no estaba preparada para aceptarlo y se tardaron bastantes años en aplicar debidamente estas ideas.

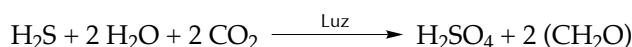
Por otra parte, las bacterias rojas de Engelmann llevaban a cabo una oxidación del sulfuro de hidrógeno y del azufre que es totalmente igual a la de las bacterias incoloras quimiosintéticas del azufre. Cuando en 1907 no pudo detectar desprendimiento de oxígeno,

Molish estuvo fuertemente tentado de considerar que las bacterias rojas no eran fotosintéticas. Sin embargo, quedaba el poderoso argumento ecológico en favor de la hipótesis de Engelmann: las bacterias rojas del azufre se desarrollan no sólo donde hay sulfuro de hidrógeno disponible sino únicamente donde hay además luz. Por ello, Buder, en 1919, llegó a afirmar que las bacterias rojas eran tanto fotosintéticas como quimiosintéticas porque dependían tanto del CO_2 y de la luz como del H_2S .

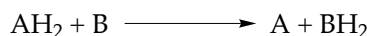
Kluyver y Van Niel pudieron establecer la estequiometría correspondiente a las bacterias rojas. Así, en los cultivos jóvenes encontraron:



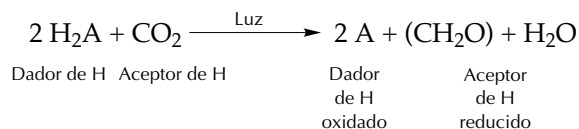
y en los cultivos viejos:



Estas ecuaciones muestran que hay un reaccionante que se oxida y otro que se reduce, al igual que en la fotosíntesis vegetal. Conjuntamente con la idea inicial de Kluyver y Donker de que la generación de energía metabólica va ligada a un proceso de transhidrogenación:

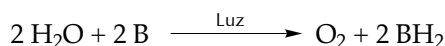


sugirieron que la esencia del mecanismo fotosintético sería la transferencia de hidrógeno, que en un caso provendría del agua y en otro del sulfuro de hidrógeno. Esta interpretación permitiría establecer una visión general de la fotosíntesis como un proceso fotoquímico de oxidorreducción del tipo:



Esta ecuación sugiere la posible existencia de otros dadores de hidrógeno distintos del H_2O y del H_2S . De hecho ha sido posible encontrar diversos ejemplos de fotosíntesis bacteriana en los cuales diferentes tipos de sustancias orgánicas e inorgánicas actúan como H_2A .

Otra consecuencia directa de la formulación anterior es que en la fotosíntesis de tipo vegetal el O_2 debe provenir del agua y no del CO_2 . Esto ha sido confirmado por varios autores marcando el CO_2 y el H_2O con isótopos de oxígeno distintos. Con anterioridad Hill había probado la producción de O_2 en preparaciones de cloroplastos aislados. Este proceso, llamado reacción de Hill, es dependiente tanto de la luz como de la presencia de aceptores artificiales de hidrógeno adecuados. Dicha reacción puede representarse por:



En sus primeros experimentos Hill utilizó oxalato férrico como sustancia reducible. Más tarde, Warburg y Lungs utilizaron quinona y obtuvieron hidroquinona y O₂ en las cantidades previstas según las cuales sólo el agua podía ser la fuente del gas formado.

23.2 FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA Y ANOXIGÉNICA EN EL MUNDO
MICROBIANO

Dentro del mundo microbiano existen dos tipos de procesos fotosintéticos bien diferenciados. Uno de ellos se asemeja a la fotosíntesis de los vegetales superiores: genera oxígeno, emplea clorofila *a*, presenta dos fotosistemas y utiliza H₂O como dador de electrones. Este proceso lo presentan las algas cianofíceas o cianobacterias. El segundo proceso no genera oxígeno, presenta diferentes tipos de bacterioclorofila, utiliza solamente un fotosistema y no emplea H₂O como dador de electrones. Este proceso es típico de las bacterias fototrofas (bacterias verdes y bacterias púrpuras) que realizan la fotosíntesis en condiciones estrictamente anaerobias (Lámina 12).

23.3 GRUPOS DE BACTERIAS FOTOTROFAS

La capacidad de obtener energía a partir de la luz se encuentra distribuida en grupos de bacterias que difieren tanto morfológica como filogenéticamente. Por ello parece razonable pensar que esta capacidad no es un punto de partida evolutivo, sino que grupos diferentes de microorganismos la han adquirido independientemente. Esto último se viene corroborando con la caracterización de nuevos grupos de bacterias fotosintéticas, incluso de algunos microorganismos aerobios que pueden clasificarse dentro del género *Pseudomonas* (recuérdese que los grupos clásicos de bacterias fotosintéticas incluyen microorganismos exclusivamente anaerobios).

Según los compuestos preferidos como dador de hidrógeno, el tipo de pigmentos y otras propiedades, las bacterias fotosintéticas pueden clasificarse en cuatro familias: Rodospiriláceas, Cromatiáceas, Cloro-

TABLA 23.1 Propiedades de las cuatro familias de bacterias fototrofas.				
Propiedades	Bacterias púrpura		Bacterias verdes	
	Rodospiriláceas (no del azufre)	Cromatiáceas (del azufre)	Clorobiáceas (del azufre)	Cloroflexáceas (no del azufre)
Tipo de bacterioclorofila	<i>a</i> o <i>b</i>	<i>a</i> o <i>b</i>	<i>c</i> , <i>d</i> o <i>e</i> , <i>a</i>	<i>c</i> , <i>d</i> o <i>e</i> , <i>a</i>
H ₂ S como dador de H	– (algunas +)	+	+	+
Acúmulo de gránulos de azufre, utilizándolo como reductor	–	+	+	–
Utilización de sustratos orgánicos como dadores de H	+	+	–	+
Crecimiento aerobio en la oscuridad	+	–	–	+

biáceas y Cloroflexáceas. En la tabla 23.1 se resumen algunas de las propiedades de las cuatro familias. Una primera característica permite agrupar a las cuatro familias de dos en dos: la utilización generalizada de compuestos reducidos de azufre o de azufre elemental como agente reductor. Esta es una propiedad de las Cromatiáceas y de las Clorobiáceas, y viene acompañada de la incapacidad de crecer aerobiamente en la oscuridad. Estas dos familias presentan un metabolismo energético completamente al margen de la presencia de materia orgánica en el medio, pueden depositar azufre en forma de gránulos citoplasmáticos como consecuencia de la utilización de sulfhídrico como dador de hidrógeno, y crecen en medios con concentraciones de este compuestos que son inhibitoras para las otras dos familias. Por el contrario, estas últimas (las Rodospiriláceas y las Cloroflexáceas) incluyen representantes que parecen tener un metabolismo más “flexible”: todos ellos pueden utilizar sustratos orgánicos como dadores de hidrógeno para la fotosíntesis, pero muchos de ellos pueden utilizar también compuestos reducidos de azufre. Además, pueden prescindir de la luz y crecer aerobiamente en la oscuridad en función de la materia orgánica presente en el medio.

Si bien los criterios mencionados anteriormente permiten agrupar las cuatro familias de bacterias fotosintéticas en dos grupos de dos, la consideración del tipo de pigmentos que presentan y de la estrategia que siguen para generar poder reductor, en función del fotosistema que poseen, permite hacer una agrupación distinta de la anterior. Así, las bacterias púrpuras incluyen a las Rodospiriláceas y las Cromatiáceas, mientras que las bacterias verdes incluyen a las Clorobiáceas y a las Cloroflexáceas. Teniendo en cuenta que en este capítulo se hace referencia a las características del metabolismo fototrófico, las familias de bacterias fotosintéticas se agrupan aquí según los tipos de pigmentos y fotosistemas que presentan, y no en función del dador de hidrógeno o de la capacidad de crecimiento quimioheterotrófico.

También hay que hacer referencia a las heliobacterias, un grupo de bacterias fotosintéticas anoxigénicas que disponen de bacterioclorofila *g* y que parecen estar filogenéticamente relacionadas con los clostridios. De hecho, dos especies del género *Heliobacterium* producen endosperas que contienen ácido dipicolínico y una elevada concentración de Ca^{++} .

23.4 BACTERIAS PÚRPURA

Las bacterias púrpura presentan bacterioclorofilas *a* o *b* (fig. 23.1). Además de absorber luz en la banda correspondiente a la bacterioclorofila (800-890 nm y 1020-1040 nm), también absorben en una segunda región entre 400 y 500 nm debido a la presencia de los carotenoides responsables del color rojo, púrpura o marrón de las bacterias fototrofas. Estos pigmentos protegen a las bacterias del efecto tóxico de la fotooxidación y, además, transfieren la energía absorbida a la bacterioclorofila. Invaginaciones de la membrana proporcionan espacio para la localización del aparato fotosintético, que incluye los elementos reseñados en la figura 23.2. Un elemento esencial del apa-

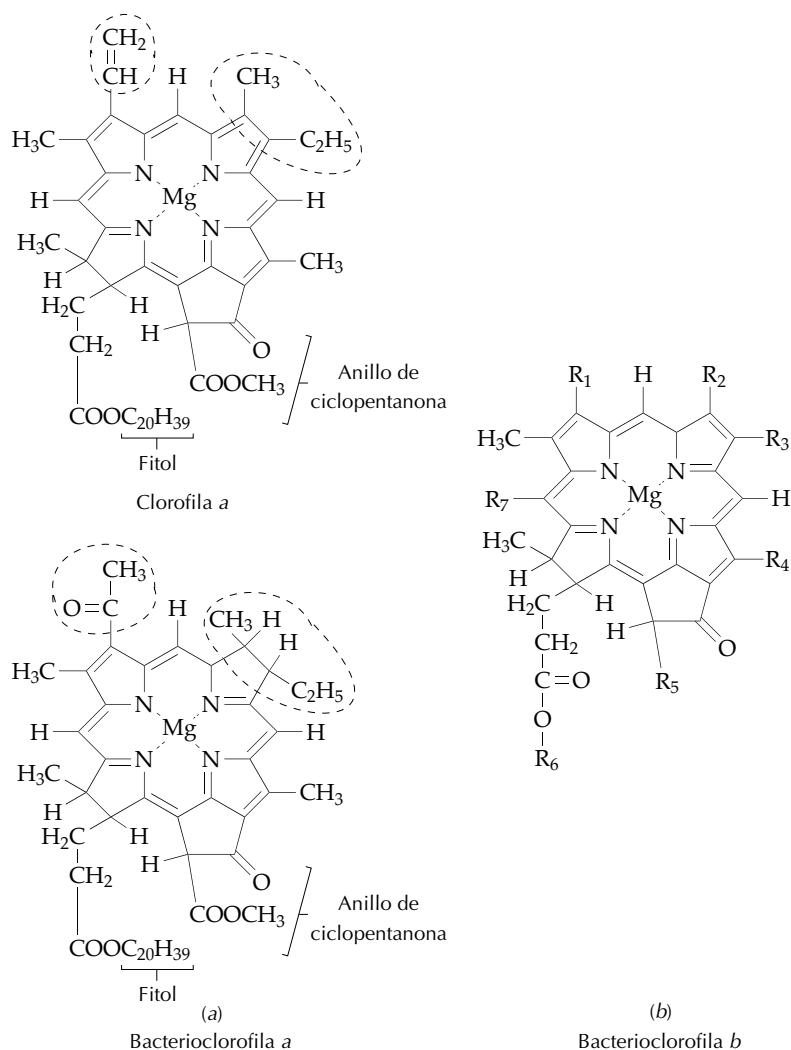


Figura 23.1 (a) Esquema comparativo entre la estructura de la clorofila *a* y la bacterioclorofila *a*. Los círculos en trazo discontinuo representan las regiones diferentes. (b) Estructura básica de las bacterioclorofilas. El tipo de grupo en las posiciones R_1 a R_7 diferencia a los distintos tipos de bacterioclorofilas. La bacterioclorofila *b* difiere básicamente de la *a* en R_3 ($=CH-CH_3$).

rato fotosintético es el centro de captación de la luz (CL), que incluye más del 90% de la bacterioclorofila, juntamente con carotenoides y muchas proteínas. Estos centros transfieren la energía luminosa a los centros de reacción. Cada centro de reacción puede estar asociado a muchos CL (entre 20 y 40). El centro de reacción, denominado P870, es un complejo que incluye 4 moléculas de bacterioclorofila (dos de ellas activas fotoquímicamente), 2 moléculas de bacteriofeofitina (bacterioclorofila libre de magnesio) y una proteína con tres subunidades diferentes. Este centro de reacción se encuentra asociado a un complejo de hierro-ubiquinona. Estos dos complejos, integrados en la

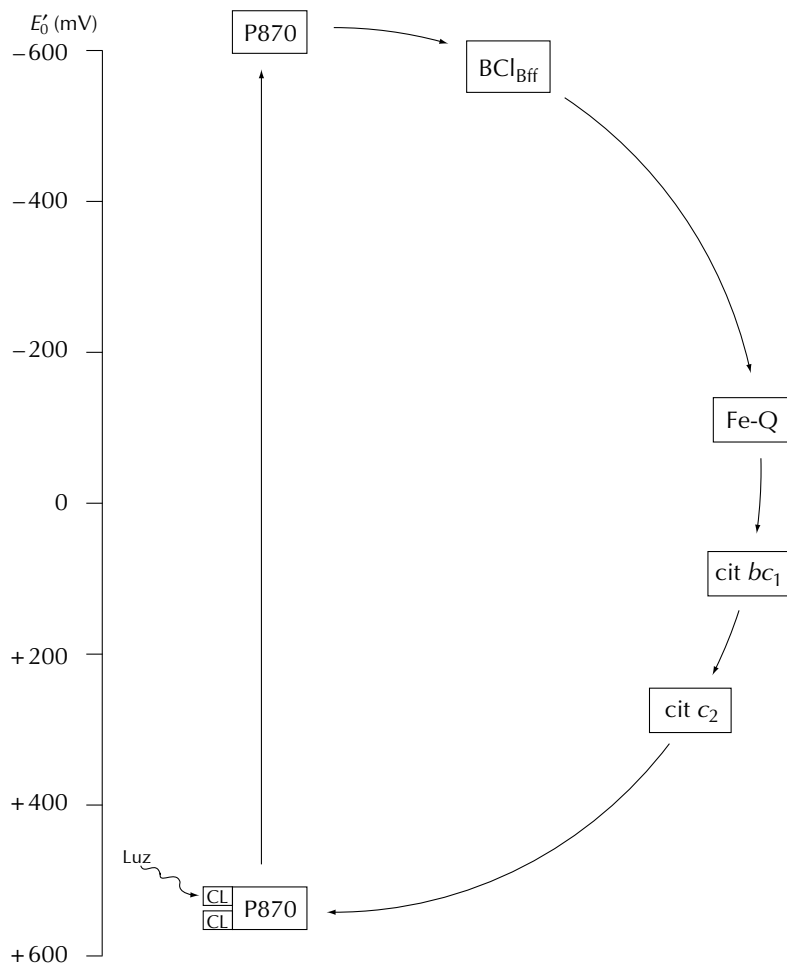


Figura 23.2 Flujo de electrones en el aparato fotosintético de las bacterias púrpuras. CL, centro de captación de la luz; P870, centro de reacción; BCl, bacterioclorofila; Bff, bacteriofeofitina; Fe-Q, complejo de hierro-ubiquinona; cit, citocromo.

membrana, se encuentran asociados a otro complejo, también anclado en la membrana, denominado citocromo *bc*₁. Al aparato fotosintético pertenecen también la ubiquinona y el citocromo *c*₂, moléculas que se mueven libremente en la membrana.

En presencia de luz, cada cuántum absorbido provoca que un electrón se transloque del par de bacterioclorofilas activas del centro de reacción a la bacteriofeofitina, vía una bacterioclorofila secundaria ($E'_0 = -600$ mV), pasando posteriormente al complejo ubiquinona-hierro ($E'_0 = -180$ mV). De aquí, el flujo de electrones sigue vía complejo citocromo *bc*₁ y citocromo *c*₂ ($E'_0 = +300$ mV), el cual vuelve a reducir otra vez al complejo P870.

Este transporte de electrones cíclico genera un gradiente de pH en la membrana, estimándose que por cada electrón que circula son expulsados al exterior dos protones que son utilizados para generar

ATP mediante la ATP-asa. Del análisis del fotosistema de las bacterias púrpura se deduce que no existe ninguna posible desviación del flujo de electrones entre la bacteriofeofitina ($E'_0 = -600$ mV) y el complejo ubiquinona-hierro ($E'_0 = -180$ mV). Ello implica que el flujo de electrones no puede desviarse hacia el NAD^+ ($E'_0 = -320$ mV), por lo que la reducción del mismo se realiza utilizando el SH_2 (Cromatiáceas) o sustratos orgánicos (Rodospiriláceas). Si el potencial redox del dador de hidrógeno lo permite, el mismo se oxida en una reacción dependiente de NAD^+ . Para los demás sustratos (incluido el H_2), el NAD^+ se reduce a través de una cadena de transporte inverso de electrones, a expensas del ATP generado en el proceso fotosintético.

23.5 BACTERIAS VERDES

Las bacterias verdes presentan un aparato fotosintético diferente del de las bacterias púrpura. En primer lugar, el mismo no se encuentra localizado en invaginaciones de la membrana, sino en vesículas, denominadas clorosomas, localizadas debajo de la membrana citoplasmática. Los clorosomas contienen bacterioclorofila *c*, *d* o *e* (absorción entre 700 y 755 nm) y, adicionalmente, muchos de los carotenoides y proteínas. En este sistema, las vesículas pigmentadas absorben la luz y transfieren la energía al centro de reacción, denominado P840, que está localizado en la membrana citoplasmática. La proporción entre la bacterioclorofila de las vesículas y la bacterioclorofila de los centros de reacción es de 1 a 1000, mucho más alta que en el caso de las bacterias púrpura; por tanto, los clorosomas son captadores muy eficientes de luz, incluso en condiciones de iluminación muy débil.

En este sistema, el flujo de electrones (fig. 23.3) implica la transferencia de un electrón desde el centro de reacción a una proteína de hierro y azufre ($E'_0 = -540$ mV). A diferencia de las bacterias púrpura, el siguiente intermediario, una ferredoxina, puede desviar el electrón hacia el NAD^+ . En este caso la reducción del citocromo c_{555} , que es el que a su vez vuelve a reducir al centro de reacción, se consigue mediante un dador externo de electrones como, por ejemplo, el SH_2 . En las bacterias verdes, al igual que sucede en la fotosíntesis oxigénica, la reducción del NAD^+ es consecuencia directa del proceso fotosintético. La excepción es *Chloroflexus*, cuyo aceptor primario de electrones presenta un potencial redox que impide reducir directamente el NAD^+ .

23.6 FISIOLÓGIA DEL CRECIMIENTO FOTOTRÓFICO EN LAS BACTERIAS PÚRPURA Y VERDES

En general, la utilización de la luz por las bacterias fototrofas tiene como consecuencia la generación de ATP, y no la de poder reductor (excepto en el caso de las bacterias verdes del azufre). Por ello, la necesidad de una fuente de poder reductor puede existir o no dependiendo de la fuente de carbono. Si ésta es CO_2 , la fuente de poder reductor puede ser un compuesto reducido de azufre o H_2 . Si el micro-

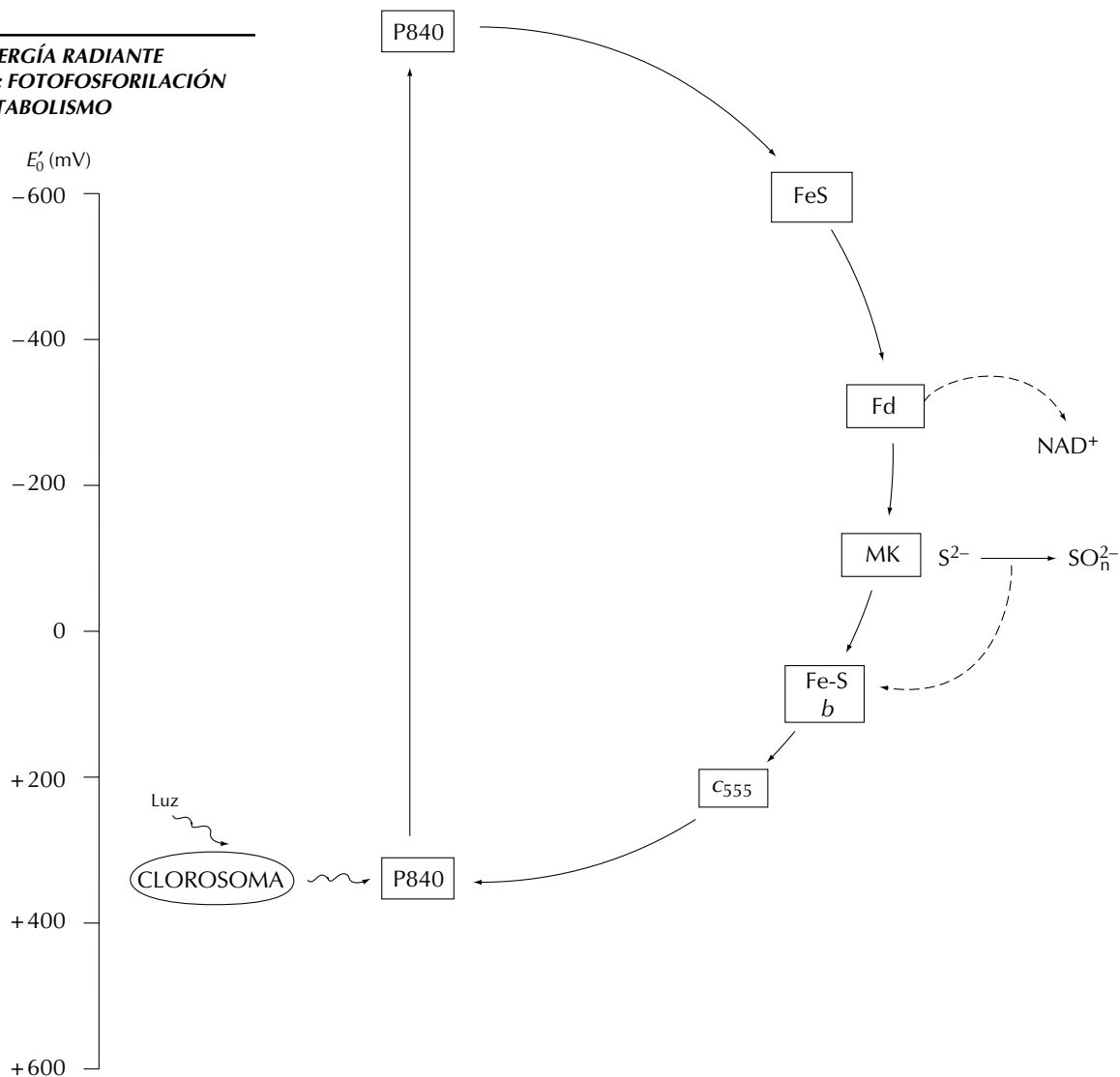
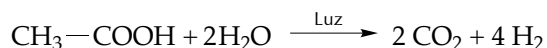


Figura 23.3 Flujo de electrones en el aparato fotosintético de las bacterias verdes. P840, centro de reacción; FeS, proteína de hierro y azufre; Fd, ferredoxina; MK, menaquinona; *b*, citocromo *b*; *c*₅₅₅, citocromo *c*₅₅₅.

organismo crece en presencia de CO₂ y materia orgánica, la situación puede ser compleja ya que esta última puede utilizarse para reducir el CO₂ y también puede ser utilizada directamente como fuente de carbono, con lo que no es necesario reducir a aquél. El estado de oxidorreducción del sustrato orgánico utilizado determinará si ha de asimilarse CO₂ o no. El uso de sustratos orgánicos con un estado de oxidorreducción similar al del material celular (glucosa, acetato, etc.) no requiere la fijación adicional de CO₂. En cambio, la utilización de sustratos más reducidos que el material celular (por ejemplo, butirato), implica disponer de un mecanismo para drenar el exceso de

poder reductor, por lo que se reduce CO_2 . En presencia exclusiva de CO_2 , el H_2 puede ser utilizado por muchas bacterias fototrofas como única fuente de poder reductor.

En ausencia de amonio, muchas bacterias fototrofas pueden producir H_2 cuando crecen fotosintéticamente. El origen del hidrógeno parece ser la inducción de la nitrogenasa, que se produce a bajas concentraciones de amonio. Una vez inducida la nitrogenasa, el hidrógeno se produce en ausencia de nitrógeno molecular. Así, cultivos de *Rhodospirillum rubrum* producen hidrógeno cuando crecen con ácidos orgánicos y aminoácidos:



Los ácidos orgánicos son oxidados vía CAT, y el poder reductor generado es utilizado para generar H_2 mediante la acción de la nitrogenasa.

Por lo que respecta a la fijación del CO_2 , el ciclo de Calvin es empleado por la mayoría de las bacterias púrpura, pero no por *Chloroflexus* o por las bacterias verdes del azufre. *Chlorobium* utiliza para la fijación del CO_2 un ciclo que implica hacer reversibles las reacciones del CAT, y es denominado ciclo reverso del CAT (fig. 23.4) (capítulo 19). Dos enzimas ligados a ferredoxina posibilitan una carboxilación reductora del CO_2 a 2-oxoglutarato (partiendo del succinil-CoA) y a piruvato (partiendo del acetil-CoA). Además, otra reacción característica es la catalizada por la citrato liasa, un enzima dependiente de ATP que hidroliza el citrato dando oxalacetato y acetil-CoA. El resto de las reacciones del ciclo corresponden a los mismos enzimas, pero trabajan en sentido inverso al oxidativo.

En *Chloroflexus* la asimilación del CO_2 no implica la utilización del ciclo de Calvin o del CAT reverso, sino de una vía única, la vía del hidroxipropionato (fig. 23.5), que implica una doble carboxilación de acetil-CoA para generar metilmalonil-CoA, que se desdobla en dos moléculas de acetil-CoA, una de las cuales se utiliza para biosíntesis.

Por lo que respecta a la utilización de fuentes de carbono distintas del CO_2 , el acetato es un buen sustrato. Estimula el crecimiento de las Clorobiáceas, y permite el crecimiento de las Rodospiriláceas tanto anaerobiamente en presencia de luz como aerobiamente en la oscuridad. El propionato y el piruvato son también otras fuentes de carbono susceptibles de ser utilizadas por bacterias fototrofas. Los azúcares no suelen ser sustratos utilizables, aunque hay excepciones: *Rhodospirillum rubrum* puede crecer con fructosa y *Rhodopseudomonas sphaeroides* puede utilizar la fructosa y la glucosa. Sin duda, la amplia diversidad filogenética de las bacterias fototrofas posibilita encontrar en ellas una variedad de estrategias metabólicas.

23.7 LA FOTOSÍNTESIS DE LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo grande y heterogéneo de microorganismos fototrofos. Clásicamente, los miembros de este grupo se han conocido con el nombre de algas verdeazuladas aunque, aten-

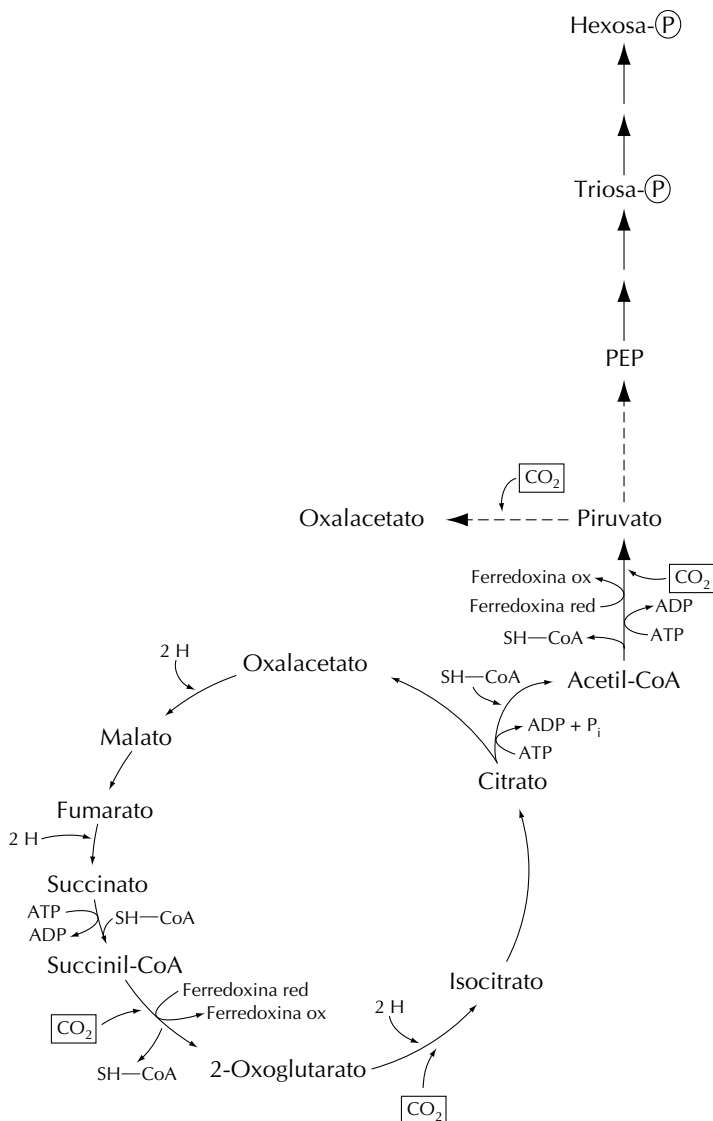


Figura 23.4 Fijación de CO_2 por el ciclo CAT reverso. Se indican las reacciones que requieren ferredoxina como fuente de poder reductor, las que requieren poder reductor sin participación de la ferredoxina (2H), y las que implican consumo de ATP. Nótese que, a partir de una molécula de oxalacetato, tres carboxilaciones pueden generar una de piruvato, la cual, siguiendo diferentes rutas (reacciones de trazo discontinuo), puede volver a entrar en el ciclo vía oxalacetato, o generar material celular.

diendo a su naturaleza procariota, el término correcto que se debe emplear para denominarlos es el de cianobacterias. A pesar de tener un metabolismo fototrofo, difieren de las bacterias verdes, púrpuras y, de hecho, del resto de procariotas fototrofos en aspectos esenciales, fundamentalmente por el hecho de que desarrollan una fotosíntesis oxigénica. Presentan solamente un tipo de clorofila, la clorofila *a*, al igual

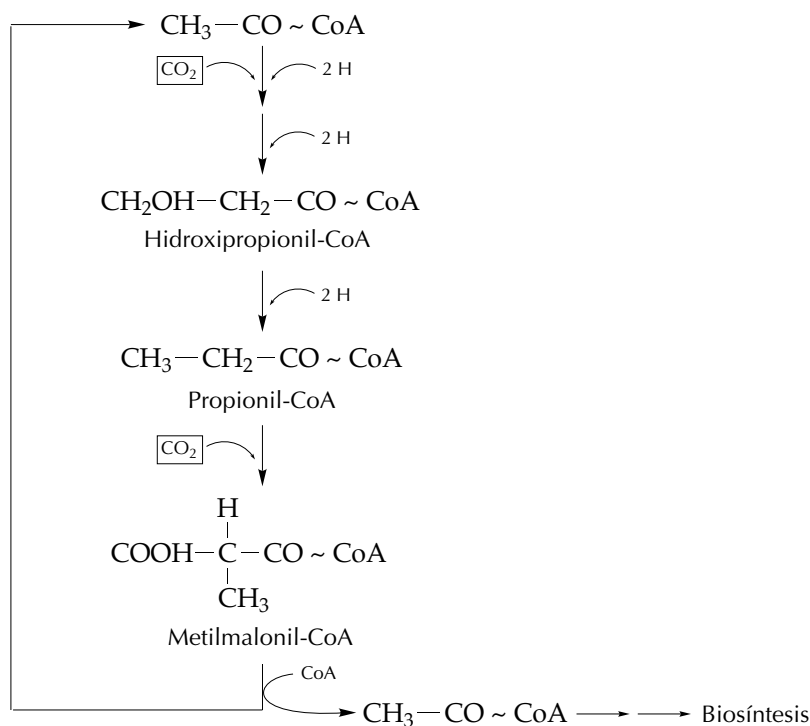


Figura 23.5 Ruta del hidroxipropionato para la fijación del CO_2 . Una molécula de acetil-CoA es carboxilada, generando en dos etapas metilmalonil-CoA.

que las plantas superiores y la mayoría de las algas (fig. 23.1). Además todas ellas presentan un tipo de pigmentos característicos, las ficobilinas, que juegan un papel accesorio en la fotosíntesis. Las ficocianinas, un tipo de ficobilinas, son azules, y presentan un pico máximo de absorción de la luz a 625-630 nm. Juntamente con la clorofila *a* son responsables del color de este grupo de microorganismos.

Las cianobacterias presentan dos fotosistemas (PSI y PSII). El fotosistema PSI sería el equivalente al de las bacterias verdes, y cubre un intervalo de potencial redox equivalente, desde +400 mV hasta -600 mV. El fotosistema PSII posibilita bombear electrones desde sistemas tan positivos como +850 mV hasta aproximadamente 0 mV, lo que permite utilizar el agua como dador de hidrógeno. El aparato fotosintético se encuentra localizado en sistemas membranosos intracitoplasmáticos denominados tilacoides, los cuales están cubiertos por ficobilisomas, o centros de captación de la luz del fotosistema II.

El proceso fotosintético de las cianobacterias se representa en la figura 23.6. La energía lumínica es captada y transferida al centro de reacción I, lo que provoca que un electrón salte, siendo capturado por una proteína con hierro y azufre que presenta un E'_0 de -600 mV. El electrón, a través de un flujo cíclico, es transferido al centro de reacción I vía ferredoxina, plastoquinona, un complejo citocromo *bf* y una proteína con Fe y S y plastocianina. La transferencia de electrones

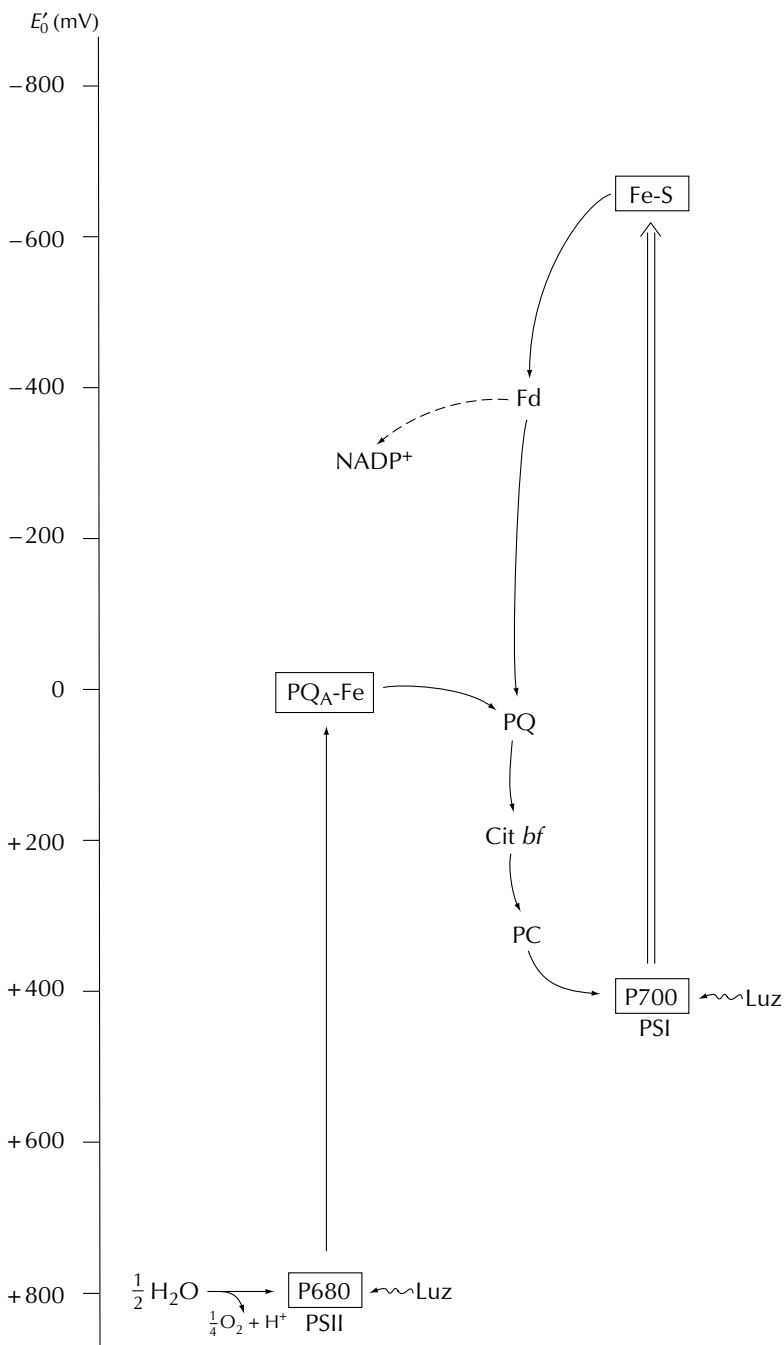


Figura 23.6 Sistema fotosintético de las cianobacterias. P680, centro de reacción II; P700, centro de reacción I; $\text{PQ}_\text{A}\text{-Fe}$, complejo plastoquinona-hierro; PQ, plastoquinona; cit *bf*, citocromo *bf*; PC, plastocianina; Fd, ferredoxina; Fe-S, proteína azufre y hierro.

de la quinona al complejo citocromo *bf* está asociada a la translocación de protones a través de la membrana. Este flujo cíclico de elec-

trones puede interrumpirse para producir poder reductor en forma de NADPH, al cual se le transfieren los electrones de la ferredoxina. Si se da esta situación, el aporte externo de electrones se realiza mediante el fotosistema II. La transferencia de electrones al NAD^+ genera un "pool" de plastoquinona oxidada. Teniendo en cuenta que la plastoquinona se encuentra en la membrana en concentraciones mucho más elevadas que el resto de los componentes, el sistema puede soportar un cierto flujo de electrones al NAD^+ sin aporte externo pero, finalmente, el "pool" de plastoquinona necesita ser reducido. El centro de reacción II se encarga de bombear electrones del agua a un complejo plastoquinona-hierro, el cual finalmente lo transfiere a la plastoquinona. El potencial redox tan positivo del centro de reacción P680 ($E'_0 = +850 \text{ mV}$) posibilita oxidar agua a oxígeno, proceso catalizado por una manganoproteína.

Por lo que respecta a la fisiología de este grupo, la misma es notablemente sencilla. Como fuente de nitrógeno utilizan nitrato o amonio. No obstante, es importante resaltar que muchas cianobacterias fijan nitrógeno elemental. Aun cuando muchas especies son fototrofas obligadas, incapaces de crecer en la oscuridad a expensas de materia orgánica, algunas pueden asimilar compuestos orgánicos sencillos, tales como la glucosa o el acetato. No obstante, ello sólo tiene lugar en presencia de luz. Parece que las cianobacterias son incapaces de producir ATP mediante la oxidación de compuestos orgánicos pero, si el ATP es obtenido mediante fotofosforilación, algunos compuestos orgánicos pueden ser utilizados como fuente de carbono.

Es también importante mencionar que algunas cianobacterias pueden llevar también a cabo una fotosíntesis anoxigénica. En estas circunstancias funciona solamente el fotosistema I, y el SH_2 funciona como dador de electrones.

23.8 EL FOTOMETABOLISMO DE LAS HALOBACTERIAS

Las halobacterias son arqueobacterias adaptadas a vivir en ambientes de alta concentración salina. No se desarrollan a concentraciones de NaCl inferiores a 2,5 M, siendo óptima para su crecimiento una concentración de 5 M de NaCl . Se trata siempre de organismos organotrofos, siendo la mayoría de las especies aerobios obligados. Utilizan aminoácidos y ácidos orgánicos como fuente de energía, y requieren diferentes factores de crecimiento (fundamentalmente vitaminas) para un desarrollo óptimo. Algunas especies de *Halobacterium* utilizan hidratos de carbono, pero este hecho es poco frecuente. También en este género se han encontrado especies capaces de crecer anaerobiamente, bien fermentando azúcares, bien respirando. En este último caso utilizan nitrato, azufre elemental o tiosulfato como aceptor terminal de electrones.

El crecimiento en ambientes hipersalinos condiciona la fisiología de estos microorganismos, los cuales, para mantener una presión osmótica intracelular superior a la del medio externo (situación común en el mundo bacteriano), bombean K^+ al interior de la célula (la concentración intracelular de este ion suele ser de 3 M). El Na^+

también es requerido para el mantenimiento de la estructura de su pared celular.

La membrana de las halobacterias presenta ciertas particularidades, como la presencia de carotenoides que protegen a la célula de la agresión fotoquímica. Estos carotenoides, denominados bacteriorrubrinas, de color anaranjado a rojizo, confieren a la célula un color rojo. Adicionalmente, la pigmentación se ve potenciada por una molécula púrpura cuya síntesis se induce cuando la presión parcial de oxígeno se reduce: se trata de la bacteriorrodopsina, denominada de esta forma por su similitud estructural con el pigmento visual del ojo, la rodopsina. Al igual que ésta, la bacteriorrodopsina consiste en una proteína unida a retinal a través de un residuo lisina. El retinal es una molécula tipo carotenoide que puede absorber luz y catalizar la transferencia de protones a través de la membrana citoplasmática.

Al disminuir la presión parcial de oxígeno, el color de las células de *Halobacterium* pasa de anaranjado-rojizo a un color rojo intenso, debido a la síntesis de bacteriorrodopsina. Si se aísla la membrana citoplasmática de células que han crecido en ambientes con baja concentración de O_2 , la membrana púrpura se encuentra cubriendo regiones de la membrana citoplasmática, lo cual sugiere que la bacteriorrodopsina es acumulada en la membrana preexistente mientras que se va reduciendo la concentración de O_2 .

La capacidad de la bacteriorrodopsina de captar la luz es utilizada por las células para llevar a cabo un proceso único, que posibilita la síntesis de ATP a expensas de la luz en ausencia de clorofilas. En presencia de luz (la bacteriorrodopsina presenta un máximo de absorción a 570 nm), el cromóforo retinal, que normalmente se encuentra en conformación *trans*, pasa a conformación *cis* (fig. 23.7), lo que lleva a la transferencia de protones al exterior de la célula. La forma *cis* tiene tendencia a estabilizarse en la oscuridad, captando protones del citoplasma. Este ciclo crea un gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática, el cual puede ser utilizado para la síntesis de ATP.

La energía generada por esta reacción no permite soportar el crecimiento máximo de *Halobacterium* en ausencia de una fuente orgánica de energía, pero puede mantener un crecimiento lento en condiciones anaerobias desfavorables para la obtención de energía a expensas de materia orgánica y también posibilita mantener la viabilidad de las células en condiciones anaerobias y en ausencia de fuentes alternativas de energía. Adicionalmente, el gradiente de protones creado también sirve para bombear Na^+ fuera de la célula al funcionar un sistema de antiporte Na^+/H^+ , y para facilitar la entrada de nutrientes, incluido el K^+ necesario para el equilibrio osmótico.

23.9 BIOLUMINISCENCIA EN LAS BACTERIAS

La relación entre radiación luminosa y metabolismo microbiano no solamente está restringida a la utilización de la energía radiante por parte de los microorganismos sino que, también, existen actividades metabólicas microbianas que conllevan la producción de luz.

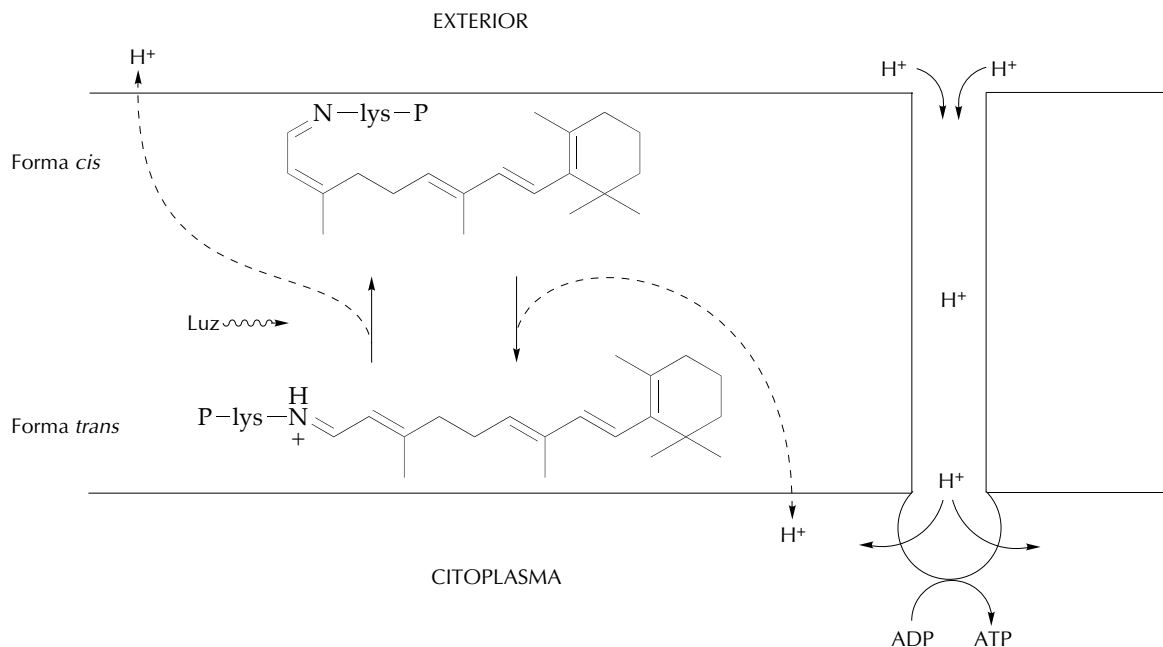
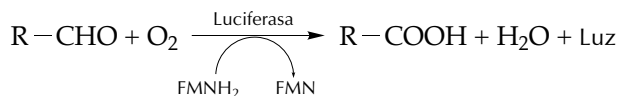


Figura 23.7 Bombeo de protones dependiente de la luz en las halobacterias. La excitación producida por la luz provoca que el retinal en estado *trans* pase a la forma *cis*, lo que a su vez provoca la expulsión de un protón hacia el exterior. La forma *cis* vuelve a la *trans* en un proceso no fotodependiente y que incorpora un protón del citoplasma. El gradiente protónico puede utilizarse para sintetizar ATP mediante la ATP-asa. P, proteína a la que está unida el retinal a través del residuo lisina (lys).

La bioluminiscencia en el mundo procariota es más frecuente de lo que normalmente se cree. Las bacterias bioluminiscentes se encuentran en ambientes tanto acuáticos como terrestres, pudiéndose aislar fácilmente como saprofitos que crecen sobre peces muertos o sobre carne. A pesar de que diversos grupos bacterianos tienen esta propiedad, clásicamente ha sido asociada a dos géneros, *Vibrio* y *Photobacterium*.

Los procesos metabólicos que conducen a la producción de luz por los microorganismos son actualmente bien conocidos. La catálisis del proceso depende de un enzima, la luciferasa, que cataliza una reacción en la cual un aldehído de cadena larga es oxidado. Esta reacción emite luz:



Se trata de una reacción que requiere oxígeno, flavin mononucleótido reducido y el correspondiente aldehído, que suele ser el tetradecanal, aun cuando *in vitro* el sistema funcione con moléculas más cortas, de 12 ó 9 átomos de C. La luciferasa es un enzima compuesto de dos subunidades, α y β . Los genes que codifican dichas subunidades (*luxA* y *luxB*) se encuentran localizados en el mismo operón, que

también incluye los genes *luxC*, *luxD* y *luxE*, que codifican una reductasa de ácidos grasos. El clonaje de este bloque de genes ha abierto enormes posibilidades de aplicaciones prácticas a la emisión de luz por las bacterias, ya que es posible convertir en bioluminiscentes a muchos microorganismos que de forma natural no lo son. Para ello, solamente es necesario introducir un plásmido recombinante que contenga los genes anteriormente mencionados. Si bien la mayoría de las bacterias carecen de la luciferasa y de la reductasa de ácidos grasos, sí que pueden proporcionar FMNH₂ y, en la práctica, el aldehído puede ser suministrado por el medio.

La posibilidad de convertir en bioluminiscentes a bacterias que de forma natural no lo son ofrece innumerables posibilidades de aplicaciones prácticas, entre las que se puede incluir el estudio de la expresión de genes diferentes (fusionando con el operón *lux* al gen de interés), la detección de la presencia en determinadas muestras de un microorganismo concreto (utilizando bacteriófagos específicos portadores de los genes *lux* que, una vez introducidos en la bacteria si la misma se encuentra presente, provocarán la aparición de luminiscencia en la muestra), o la detección de la viabilidad bacteriana, ya que la producción de luz es dependiente del estado energético de la bacteria. De hecho, la detección de la presencia de microorganismos por la producción de luz tiene sin duda proyección en muchos campos de la microbiología aplicada, por ejemplo, cuando se requiera comprobar el efecto de algún producto o condición ambiental sobre una microflora específica, la cual habrá sido previamente convertida en bioluminiscente.

BIBLIOGRAFÍA

CARR, N. G. y WHITTON, B. A. (editores). The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scient. Public. Oxford/London/Edinburgh 1982.

P_{ARTE} H

METABOLISMO SECUNDARIO

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

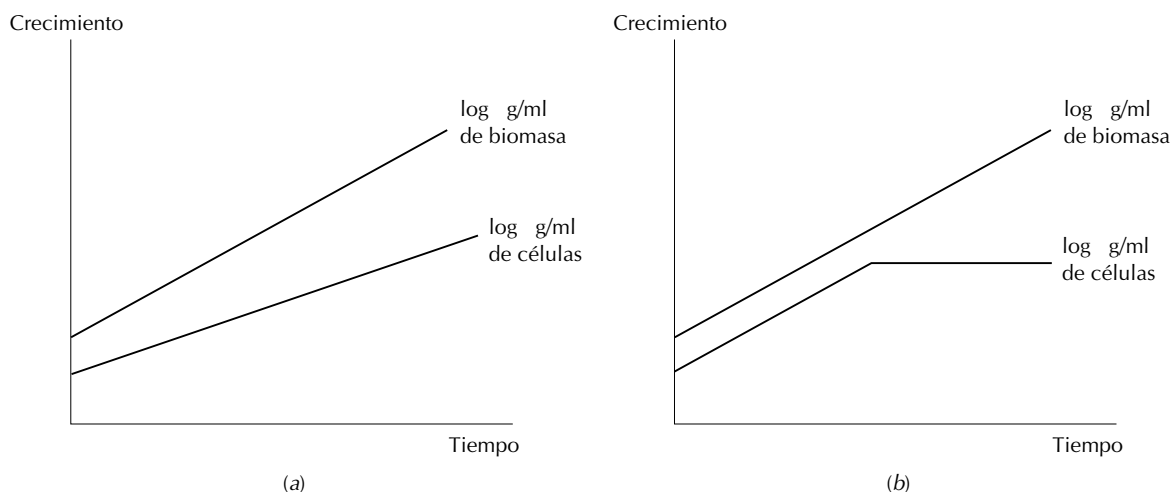
METABOLITOS SECUNDARIOS: COMPOSICIÓN, PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD

24.1	DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO SECUNDARIO	324
24.2	TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	326
24.2.1	Composición química	326
24.2.2	Actividad	329
24.3	FUNCIONES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	331
24.4	REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO	333
24.4.1	Cinética de formación de los metabolitos secundarios	333
24.4.2	Inducción y represión de la síntesis de metabolitos secundarios	335
24.4.3	Genética del metabolismo secundario. Superproducción de metabolitos secundarios	337
24.5	MACROMOLÉCULAS ESPECÍFICAS COMO METABOLITOS SECUNDARIOS	338
	BIBLIOGRAFÍA	338

24.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL METABOLISMO SECUNDARIO

La actividad metabólica microbiana no tiene siempre como consecuencia la proliferación celular. Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano a lo largo de toda la curva de crecimiento (ver capítulo 2), se diferencian aquellos procesos metabólicos asociados al crecimiento celular (metabolismo primario) de aquellos que tienen lugar en la fase estacionaria, una vez que ha cesado el crecimiento de la biomasa (metabolismo secundario). Como resultado del metabolismo secundario se producen diferentes tipos de compuestos que reciben, todos ellos, la denominación de metabolitos secundarios.

En el crecimiento no balanceado, el aumento del número de células puede tener lugar en una o dos fases. En el primer caso, tenemos unas curvas de aumento de la biomasa y del incremento del número de bacterias como se representa en (a) y, en el segundo, como en (b).



Esto permite distinguir dos fases de crecimiento: la trofofase (proliferación celular) y la idiofase (no proliferación celular). El diagrama (a) puede corresponder a una trofofase superpuesta a la idiofase. Cuando son sucesivas, como en (b), la actividad metabólica no participa directamente en el desarrollo celular. El acúmulo de reservas suele tener lugar de conformidad con el diagrama (a), pero pueden ser reutilizadas después del agotamiento del sustrato exterior. En cambio, (b) puede representar formación de polisacáridos extracelulares que se arrastran con las células, pero que pueden luego separarse por lavado. Otros casos como el del diagrama (b), o intermedios entre (a) y (b), pueden corresponder a diferenciación celular o producción de pigmentos.

Es evidente que el metabolismo secundario debe estar relacionado con el primario. La distinción entre trofofase e idiofase tiene precisamente como objeto resaltar esta conexión.

Es importante destacar que el concepto de metabolito secundario tiene un sentido amplio y no se restringe al mundo microbiano. De hecho, este término fue introducido inicialmente por fisiólogos vege-

tales y aplicado posteriormente al mundo microbiano por J. D. Bu'Lock en 1961. Sus trabajos se relacionan con las clásicas investigaciones de Raistrick (1931) sobre la producción de sustancias químicas poco usuales por hongos.

Los metabolitos secundarios se definen por las siguientes características: a) productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida; b) se forman una vez que el crecimiento se ha detenido; c) suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados; d) no se encuentran aparentemente relacionados con los productos de las vías biosintéticas del tipo II y III (capítulo 1).

En la década de los años cuarenta, las investigaciones sobre el metabolismo secundario se centraron particularmente sobre la producción de sustancias tóxicas para microorganismos patógenos (antibióticos). En la década de los sesenta, en la producción de sustancias con especiales efectos sobre animales y vegetales (toxinas y promotores del crecimiento).

Considerando específicamente el mundo microbiano, los metabolitos secundarios presentan una enorme variedad de estructuras químicas. Muchos de ellos suelen ser específicos de algunos grupos microbianos, y el hecho de que algunos tipos de moléculas sean características de determinadas cepas no es insólito. Adicionalmente, los metabolitos secundarios sólo son producidos en condiciones fisiológicas muy específicas. Todos estos factores han llevado a la conclusión de que estos productos no tienen una función metabólica esencial.

La variedad y complejidad de los procesos metabólicos que tienen lugar una vez que se entra en una fase de no proliferación celular plantean sin duda muchas preguntas de difícil respuesta. Una de ellas, por ejemplo, hace referencia a los procesos de diferenciación celular que llevan a cabo muchos microorganismos una vez que se encuentran en condiciones de no proliferación celular como el desarrollo de formas de anabiosis, uno de cuyos ejemplos es el de las esporas bacterianas. En el caso de los bacilos esporulados, la síntesis de ácido dipicolínico es concomitante a la formación de la espora pero parece obvio que este compuesto no entraría en la categoría de los metabolitos secundarios.

Antes del descubrimiento de los antibióticos, el tipo de metabolitos secundarios que despertaba más interés era el de aquellas moléculas que se producían en cantidades importantes en condiciones de cultivo notablemente sencillas, y que eran fácilmente aislables. No es de extrañar que muchos de tales productos se hacían aparentes por su color o aspecto cristalino. Sin duda, el descubrimiento de la penicilina como compuesto dotado de bioactividad y útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas provocó un cambio en el enfoque que los investigadores daban al estudio de los metabolitos secundarios, lo que ha sido la base del conocimiento que hoy día se dispone acerca de la amplísima variedad de moléculas estudiadas.

Otro aspecto importante de los metabolitos secundarios es el de si presentan una función específica o, por el contrario, su síntesis se encuentra asociada a distintos procesos celulares. Aunque esto es todavía una cuestión abierta, la consideración de sus propiedades, tal

como se comenta más adelante, apoya la hipótesis de que la puesta en marcha de las vías que conducen a la biosíntesis de este tipo de productos está relacionada con diferentes procesos celulares.

Un examen detallado de todos los aspectos del metabolismo secundario de los microorganismos se escapa del marco de este libro. En realidad este capítulo tiene carácter complementario del objeto principal constituido por las transformaciones químicas del sistema microbio-medio durante el crecimiento balanceado en cultivo puro. Por esto se centra particularmente en los metabolitos secundarios propiamente dichos que son los constituidos por moléculas especiales con un peso molecular relativamente bajo.

24.2 TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

24.2.1 Composición química

Raistrick (1931) fue el primero en señalar la naturaliza química extraordinariamente específica de algunos productos poco usuales de la actividad química de los hongos. Además, señaló también el hecho de que algunas veces son producidos por determinadas cepas de una especie, y otras por una sola especie o por muy pocas especies dentro de un género.

El conjunto de los metabolitos secundarios es químicamente muy diverso y en muchos casos comprende tipos de productos que no se hallan en el metabolismo primario.

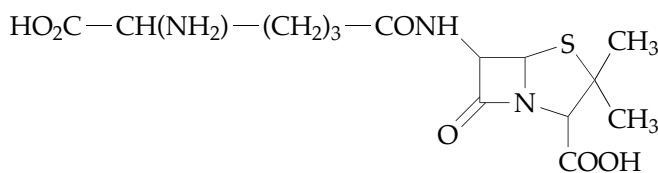
Los metabolitos secundarios pueden distribuirse en las siguientes clases de compuestos orgánicos:

Ácidos tetrónicos	Naftoquinonas
Alcaloides de la ergolina	Nucleósidos
Aminoazúcares	Perilenos
Antocianinas	Piperacinas
Antraquinonas	Pirazinas
Aziridinas	Piridinas
Benzoquinonas	Pironas
Cumarinas	Pirroles
Derivados del indol	Pirrolícinas
Diazinas	Pirrolinas
Epóxidos	Poliacetilenos
Fenazinas	Polienos
Fenoxaquinonas	Quinolinas
Flavonoides	Quinolinoles
Glucósidos	Quinonas
Glutaramidas	Salicilatos
Hidroxilaminas	Terpenoides
Italdehídos	Tetraciclinas
Lactonas	Triacinas
Macrólidos	Tropolonas
Naftalenos	

En los metabolitos secundarios constituidos total o parcialmente por péptidos se encuentran tanto L- como D- aminoácidos y derivados que no se hallan presentes en las proteínas naturales. Hay uniones

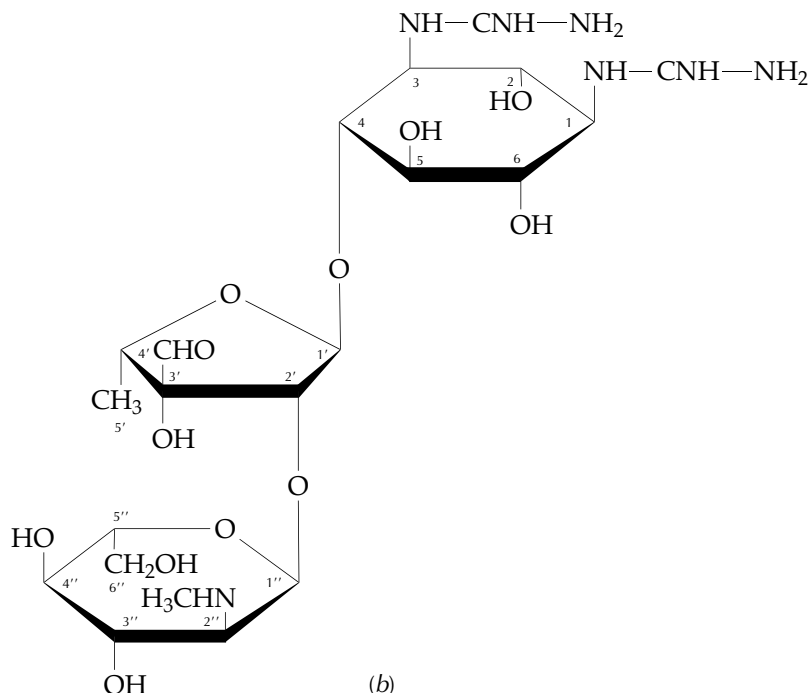
químicas poco usuales: formas cíclicas del pentapéptido de las malforminas, o del dodecadepsipéptido de la valinomicina; los largos anillos lactónicos de los macrólidos y polienos; los sistemas de unión de los anillos de las giberelinas y el triple enlace de los poliacetilenos.

De la gran diversidad estructural de los metabolitos secundarios dan idea las estructuras de la penicilina, la estreptomycin (fig. 24.1), la avermectina o la eritromicina (fig. 24.2). Estos dos últimos compuestos pertenecen al grupo de los policétidos. Se trata de moléculas sintetizadas a partir de ácidos grasos sencillos por una vía que superficialmente se asemeja a la de los ácidos grasos de cadena larga, pero los productos resultantes presentan una complejidad estructural muy superior al sencillo esqueleto carbonado de los ácidos grasos de cadena larga. Sin duda, la comparación de las estructuras de la aver-



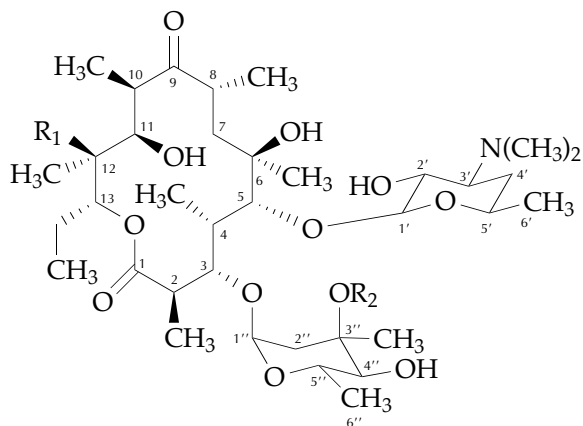
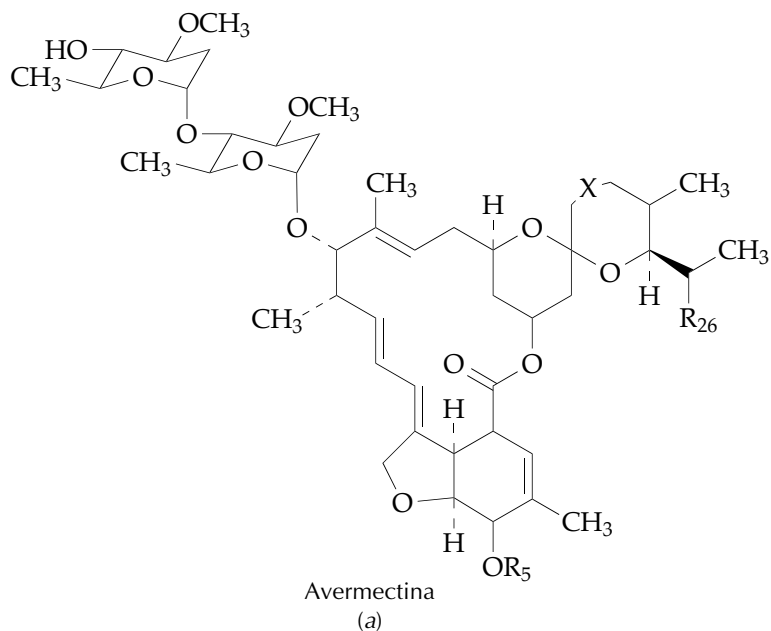
Penicilina N

(a)



(b)

Figura 24.1 Estructuras de la penicilina N, una β -lactona (a) y de la estreptomycin, un aminociclitol (b).



		R ₁	R ₂
Eritromicina	A	OH	CH ₃
	B	H	CH ₃
	C	OH	H
	D	H	H

Figura 24.2 Estructuras de la avermectina, un compuesto con actividad antinematodos y antiartrópodos (a) y de la estreptomicina, un antibiótico (b).

mectina, producida por *Streptomyces avermitilis*, y de la eritromicina, producida por el actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea* (fig. 24.2) evidencia una cierta semejanza estructural, aunque existen notables diferencias responsables, sin duda, del diferente tipo de bioactividad

que presentan estos compuestos: antibiótica en el caso de la eritromicina y antihelmíntica e insecticida en el caso de la avermectina. No obstante, en función de esta cierta similitud estructural, no resulta extraño el hecho de que, tal como se ha puesto de manifiesto recientemente, la organización del bloque de genes responsables de la biosíntesis de ambos tipos de compuestos sea muy similar.

24.2.2 Actividad

Teniendo en cuenta la enorme variedad de productos que existen, a continuación se indican exclusivamente los grupos más característicos y no se contemplan moléculas tales como las de las cápsulas, exotoxinas y, en general, exoenzimas que podrían ser considerados como metabolitos secundarios.

Antibióticos

La producción de moléculas con propiedades antibióticas es característica de muchos de los microorganismos que habitan en el suelo. Teniendo en cuenta que en esta flora predominan los hongos microscópicos y los actinomicetos, no es de extrañar que una buena parte de los antibióticos de uso clínico tenga su origen en el metabolismo secundario de estos grupos de microorganismos. Dentro de los hongos, son los hongos imperfectos los que producen la mayoría de los antibióticos de origen fúngico. En el mundo bacteriano, los actinomicetos destacan como productores de antibióticos y, entre ellos, especialmente los estreptomicetos. El grupo de los actinomicetos produce antibióticos de estructura química muy diversa. Por el contrario, las moléculas con actividad antibiótica producidas por bacterias unicelulares suelen ser péptidos o péptidos modificados. No obstante, las bacterias unicelulares también pueden biosintetizar otros tipos de compuestos, tales como aminoglicósidos, prodigininas o betalactamas.

La actividad antibiótica de los metabolitos secundarios se fundamenta en su capacidad de inhibir procesos metabólicos primarios esenciales. En muchos casos la bioactividad del antibiótico está asociada a una acción como antimetabolito, esto es, en función de su semejanza funcional con un metabolito, se unen al blanco (enzima, orgánulo celular, etc.) e interfieren con un proceso vital. Parece claro que la actividad de las moléculas que tengan este comportamiento depende de su estructura y de los grupos funcionales que contenga. En cualquier caso, no puede generalizarse el concepto de que todos los metabolitos secundarios que sean moléculas modificadas derivadas de intermediarios primarios han de tener actividad antibiótica.

Metabolitos con actividad en animales

Algunos de los antibióticos producidos por microorganismos tienen también efectos tóxicos en animales, aun cuando los procesos en que interfieren tales moléculas no suelen ser los mismos que en las bacterias. Así, la anfomicina, que en bacterias interfiere en el transporte de la mureína a través de membrana, bloquea la glicosilación en células eucariotas. En algunos casos es posible utilizar las propiedades de algunos tipos de antibióticos para el tratamiento de enfermedades no infeccio-

sas. Un ejemplo de ello lo constituyen las antraciclinas y bleomicinas, antibióticos que además de inhibir el crecimiento de bacterias han sido utilizados como compuestos anticancerígenos, ya que también son tóxicos para células de alta capacidad de proliferación.

A los metabolitos secundarios también se les han atribuido otras actividades farmacológicas o inmunológicas. Las zearaleonas, producidas por especies del hongo *Fusarium*, son utilizadas como agentes anabolizantes para el ganado. Las ciclosporinas, producidas por especies de *Beauveria*, son inmunosupresores de uso habitual.

Muchos metabolitos secundarios también han encontrado utilidad en función de su actividad insecticida o nematocida. Un ejemplo ya mencionado anteriormente lo constituyen las avermectinas de *Streptomyces avermitilis*.

Metabolitos con actividad en plantas

Dentro del grupo de metabolitos secundarios con actividad en plantas se encuentran productos que o bien inhiben el crecimiento del vegetal o bien lo activan. Algunos herbicidas tienen su origen en metabolitos secundarios microbianos, como algunas herbicidas producidas por especies de estreptomicetos.

Inhibidores de enzimas

La búsqueda de compuestos con capacidad inhibidora de la actividad enzimática ha permitido obtener actividades inhibidoras de muchos enzimas. Entre ellos hay que mencionar los inhibidores de proteasas, activos contra diferentes tipos de enzimas (pepsina, papaína, tripsina, quimiotripsina, etc.). También han sido aislados compuestos inhibidores de glucosidasas (el antibiótico nojirimicina), fosfodiesterasas (el reticulol) y quinasas (la sangivamicina).

Autorreguladores

Un importante grupo de metabolitos secundarios tienen la propiedad de regular de forma más o menos específica ciertos procesos metabólicos microbianos. Entre ellos, cabe citar la esporulación en los estreptomicetos (factor A, producido por un 15% de las cepas de estreptomicetos analizadas), cambios morfológicos en las hifas vegetativas de los estreptomicetos (factor C) y los inductores de la emisión de luz en *Vibrio fischeri*.

Queladores de hierro

Moléculas de pequeño tamaño con estructuras basadas en el 2,3-hidroxilbenzoato o hidroxiamato que quelan hierro son excretadas por diferentes microorganismos del suelo. La formación de sideróforos también juega un papel importante en las interacciones microbianas que tienen lugar en la rizosfera.

Tensioactivos

Los microorganismos producen diferentes tipos de moléculas con propiedades tensioactivas. Un ejemplo lo constituye la surfactina, lipopéptido producido por *Bacillus subtilis* cuando crece en medios con hidratos de carbono. Por otra parte, *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otros muchos microorganismos, produce un agente tensioactivo que le ayuda a asimilar los nutrientes cuando crece con hidrocarburos.

La mayoría de las esporas de actinomicetos y hongos contienen pigmentos que, al absorber la energía luminosa, protegen al material genético de las reacciones químicas inducidas por la luz. La presencia de pigmentos también es frecuente en células vegetativas, donde pueden funcionar protegiéndolas bien de la radiación o de radicales tóxicos producidos en reacciones aeróbicas. En este contexto, es interesante resaltar que algunas espiroquetas solamente producen pigmentos cuando crecen aeróbicamente.

24.3 FUNCIONES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Indudablemente, la investigación acerca de los metabolitos secundarios está fundamentalmente enfocada hacia su aprovechamiento, y no hacia el papel que realmente desempeñan dentro del metabolismo microbiano. No obstante, en función de la información colateral disponible, puede realizarse una estima acerca del papel que desempeñan este tipo de moléculas en las células microbianas. Para ello, hay que considerar previamente algunos aspectos que caracterizan a los metabolitos secundarios.

En primer lugar, hay que indicar que su biosíntesis se deriva de intermediarios o monómeros del metabolismo primario. Esto implica la existencia de enzimas específicos que posibilitan que una de tales moléculas, siguiendo una ruta determinada, se transforme en el metabolito secundario en cuestión. Sin duda, la información genética necesaria acabaría perdiéndose a no ser que su disponibilidad representara algún beneficio para la célula.

Por lo que respecta al tipo de reacciones, cuando se comparan las vías biosintéticas del metabolismo primario con las del secundario se observa que estas últimas, si bien utilizan mecanismos de reacción similares a los de las primeras, tienen también características propias. No tienden a la economía energética ni a la simplicidad de las vías del metabolismo primario. Como ya ha sido comentado, los metabolitos secundarios presentan una gran diversidad estructural, consecuencia de la diversificación y ramificación de sus vías biosintéticas. Este hecho, juntamente con el de la regulación específica de tales vías, justifica que la célula “utilice” este metabolismo en su propio beneficio. Considerando la regulación en sí misma, hay que mencionar que la formación de metabolitos secundarios está sometida a un control general que responde a factores ambientales.

Otra característica importante es que el metabolismo secundario tiene una prioridad menor que la del propio crecimiento. Creciendo en medio rico, los microorganismos no producen metabolitos secundarios o, si lo hacen, su producción es muy reducida. La información genética necesaria para producir metabolitos secundarios solamente se expresa al máximo nivel cuando el crecimiento se halla restringido. La naturaleza de la limitación del crecimiento también afecta al nivel de expresión. Finalmente cabe mencionar que, además de un sistema de regulación fisiológico en función de parámetros ambientales, existen también

mecanismos específicos que regulan la producción de un metabolito secundario. Por ejemplo, la producción de cefalosporina en *Cephalosporium acremonium* se ve incrementada si se añade metionina al medio.

Otros factores que apoyan la hipótesis de que los metabolitos secundarios tienen una función útil para la célula son los siguientes:

1. La mayoría de los metabolitos secundarios son excretados al medio externo. Este hecho puede estar relacionado tanto con la eliminación de material tóxico de la célula como con la existencia de una función propia de estas moléculas, o con ambos a la vez.
2. La tolerancia que presentan los microorganismos productores a los efectos tóxicos de estos compuestos (es evidente que los microorganismos productores de antibióticos son resistentes a los mismos).
3. El hecho de que los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentren agrupados juntamente con genes reguladores, sugiere claramente que se trata de un sistema altamente evolucionado que debe de representar un beneficio importante para el microorganismos productor.

Algunos de los papeles que pueden desempeñar los metabolitos secundarios en la célula microbiana pueden estar integrados en procesos globales de la célula, mientras que otros pueden desempeñar funciones específicas.

Una de las funciones de tipo global o general sería la de drenar los metabolitos primarios que se acumulan en condiciones de desequilibrio metabólico. Esta posibilidad ya fue considerada por Woodruff en 1966. La acumulación de metabolitos que puede tener lugar como consecuencia de una descoordinación en la regulación de las vías metabólicas podría resolverse mediante la transformación de los intermediarios en metabolitos secundarios, en lugar de excretarlos directamente al medio. En este contexto, una visión diferente sería la de considerar que, en realidad, lo importante para la célula no es la eliminación del intermediario, sino la activación de una serie de vías metabólicas que permitirían a las vías primarias seguir manteniendo un nivel de actividad (suministrando energía y precursores) que posibilitaría el restablecimiento del crecimiento normal cuando se diesen las condiciones adecuadas.

Por lo que respecta a funciones específicas de los metabolitos secundarios, cabe reseñar las siguientes como más posibles:

1. **Precusores de componentes estructurales.** Al parecer, la estreptomycin es un constituyente de la mureína de *Streptomyces gryseus*. Algunas estructuras de las cubiertas celulares fúngicas contienen productos protectores formados por polimerización oxidativa de productos tales como el 1,8-dihidroxinaftaleno, proceso equivalente a la lignificación. Este hecho sugiere que todos estos casos podrían ser manifestaciones del metabolismo secundario que se han integrado al metabolismo normal de algunos organismos.
2. **Captadores de minerales.** En este caso, la producción de compuestos que quelan hierro por parte de microorganismos que

no tienen necesidad de este compuesto podría estar relacionada con la eliminación del hierro disponible para otros microorganismos que sí lo necesitan, lo que daría ventaja competitiva al productor de este tipo de moléculas.

3. **Señales de diferenciación.** Se ha propuesto que los metabolitos secundarios modulan el metabolismo celular. En este contexto, es muy evidente que las condiciones fisiológicas que desencadenan la esporulación y la acumulación de reservas metabólicas son muy parecidas a las que desencadenan el metabolismo secundario.
4. **Elementos que contribuyen a la virulencia.** Mientras las toxinas bacterianas son macromoléculas y no se consideran propiamente metabolitos secundarios, algunos patógenos de plantas producen antimetabolitos tóxicos. De forma general, los microorganismos que invaden plantas excretan una amplia variedad de moléculas de pequeño a medio tamaño que resultan tóxicas para el vegetal.

24.4 REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO

24.4.1 Cinética de formación de los metabolitos secundarios

En la cinética de formación de los metabolitos secundarios cabe distinguir tres aspectos fundamentales: 1) momento en el que se inicia la producción; 2) tipo de producción y duración de la misma y 3) cese de la producción.

En el cultivo discontinuo, o por cargas, la síntesis del metabolismo secundario se inicia después de cesar la multiplicación celular y durante un periodo de tiempo en el que las células permanecen viables. En organismos unicelulares, algas, levaduras y bacterias, la formación de metabolitos secundarios se inicia en la última porción de la fase exponencial del crecimiento, lo cual se atribuye a la existencia de células que no se dividen junto a otras que todavía están en fase activa de crecimiento balanceado. En organismos filamentosos, hongos y actinomicetos se encuentra una pequeña cantidad de metabolitos secundarios cuando todavía se incrementa el contenido de proteínas y ácido nucleicos. También aquí se atribuye a células de los filamentosos que ya no están en crecimiento activo.

En los cultivos continuos, los metabolitos secundarios no aparecen en el recipiente llamado generador celular, en el cual tiene lugar un crecimiento balanceado. Se han descrito muchos procesos industriales en los que las células se pasan del generador celular a un reactor tubular en el cual tiene lugar la síntesis del metabolito secundario sin multiplicación.

En el generador celular se puede disminuir la velocidad de dilución hasta que la actividad del cultivo cambie al metabolismo secundario. En un cultivo continuo de *Penicillium urticae*, por ejemplo, puede mantenerse un crecimiento balanceado a una alta dilución. Si el flujo disminuye se inicia la producción de ácido 6-metilsalicílico. Si se suspende totalmente la adición de medio fresco, este metabolito se transforma en una serie de otros compuestos que son los típicos metabolitos secundarios de la especie.

Lo que ocurre en los medios naturales es difícil de predecir, pero probablemente es una situación intermedia entre los casos referidos del cultivo continuo y discontinuo. Hay que tener en cuenta que los metabolitos secundarios pueden ser destruidos por otros organismos que se desarrollen simultáneamente.

Es comúnmente aceptado que la formación de verdaderos metabolitos secundarios nunca tiene lugar ni al principio ni a la mitad de la fase logarítmica de crecimiento; sin embargo, en ciertos microorganismos de interés industrial tiene lugar cierta producción de metabolito secundario en estas etapas. Esto es consecuencia de que en este tipo de organismos los mecanismos de regulación se hallan alterados. Ello sugiere que en el organismo salvaje la síntesis del metabolito secundario está reprimida.

Por lo que respecta a la cinética de producción de un metabolito secundario, una vez que se inicia su síntesis la producción es una función lineal con respecto al tiempo. En la figura 24.3 se representa la cinética de producción de edeína, un compuesto producido por una cepa de *Bacillus brevis*. La duración de la etapa de producción varía en función de la naturaleza del metabolito secundario, del organismo y del medio. Generalmente el periodo de producción del metabolismo secundario oscila entre una mitad y el doble del tiempo de la fase de crecimiento exponencial. Usualmente, los procesos de síntesis de corta duración corresponden a sistemas bacterianos, mientras que los de larga duración corresponden tanto a sistemas bacterianos como a microorganismos eucariotas. A título de ejemplo, la producción de edeína reseñada en la figura 24.3 dura 5 horas, después de 8 de crecimiento, mientras que la síntesis de enterotoxina estafilocócica se lleva a cabo durante un periodo de 13 horas que sucede a otro de 5 horas de crecimiento.

En actinomicetos y mohos, la relación entre el periodo de crecimiento vegetativo y el del metabolismo secundario para la producción de la actinomicina, eritromicina, metomicina, estreptomycin, alcaloides de la ergolina y ácido kójico son respectivamente 1:2, 1:2,4, 1:1,5, 1:2, 1:1,25 y 1:2.

La duración del metabolismo secundario es mucho más corta que la de la viabilidad del cultivo.

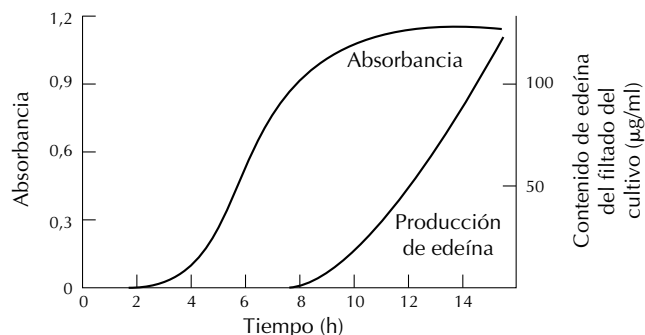


Figura 24.3 Crecimiento y producción de edeína por células de *Bacillus brevis*.

La terminación súbita de la producción del metabolito secundario se ha atribuido a las siguientes causas:

1. Aparición de un proceso de diferenciación celular, que genera células no productoras del metabolito.
2. Inhibición feedback por el propio metabolito secundario sobre la sintasa clave.
3. Represión de la síntesis de un enzima clave por el propio metabolito junto a la progresiva desnaturalización del enzima presente.
4. Agotamiento de un precursor del metabolito secundario.

No existen datos experimentales que apoyen claramente alguno de estos mecanismos y en general se considera que el punto 4 es el más probable. Dentro de los puntos 2 y 3 puede incluirse el cambio del medio producido por la propia acumulación del metabolito. Entre estos cambios tiene especial significación la acción quelante sobre metales esenciales para la célula.

La producción total de metabolito en cepas seleccionadas para su utilización industrial puede estar comprendida entre un 5 y 20% del peso seco del cultivo. El conjunto de metabolitos secundarios formados en cepas no seleccionadas puede ser de este orden. En todo caso, la producción de metabolitos secundarios esta muy influida por las condiciones del medio.

En general, los metabolitos secundarios se excretan al medio, pero una parte puede quedar retenida en la célula, usualmente asociada a las envueltas celulares. En los organismos que forman esporas pueden encontrarse metabolitos secundarios totalmente localizados en las cubiertas de las mismas.

En la producción de metabolitos secundarios de interés industrial hay que tener en cuenta la alteración que el metabolito secundario puede sufrir en el medio de cultivo. En el sistema de producción de metomicina, más del 90% del material producido puede perderse si permanece en fermentadores no aireados en presencia del micelio. La penicilina es inactivada cuando el ascenso del pH en los cultivos viejos alcanza valores de alrededor de 7,5. La aflatoxina también se destruye en el medio después de varios días.

24.4.2 Inducción y represión de la síntesis de metabolitos secundarios

Tal como ha sido comentado con anterioridad, los metabolitos secundarios no se producen a altas tasas de crecimiento del microorganismo. Durante la fase exponencial de crecimiento muchas sintetetasas de metabolitos secundarios son reprimidas por nutrientes fácilmente utilizables tales como fuentes de carbono, de nitrógeno o de fósforo.

Un ejemplo claro de represión por catabolito ejercida por la glucosa es el del enzima fenoxazinona sintetasa, que cataliza la síntesis del núcleo de la actinomicina. La síntesis de este enzima se incrementa según desaparece la glucosa del medio. También la presencia de glucosa reprime la producción de bacitracina.

También se conocen ejemplos de represión por las fuentes de fosfato y de nitrógeno. Así, una elevada concentración de fosfato en el

medio reprime la síntesis de muchos enzimas implicados en la biosíntesis de diferentes antibióticos, y la producción de cefamicina por *Gibberella fujiluori* es reprimida por el amoniaco.

En algunos ejemplos parece que el propio producto final de la síntesis secundaria inhibe la formación del metabolito secundario. Tal es el caso del cloranfenicol y del 6-metasalicilato. Por otra parte, cuando el metabolito secundario procede de un precursor que es intermediario común con la biosíntesis de un metabolito primario, este último inhibe la formación del metabolito secundario. El caso mejor estudiado es la inhibición de la síntesis de penicilina por la lisina en *Penicillium chrysogenum* (fig. 24.4).

Teniendo en cuenta que muchos otros metabolitos secundarios se producen por una ramificación de vías biosintéticas primarias, el inicio de la síntesis del metabolito secundario podría producirse como

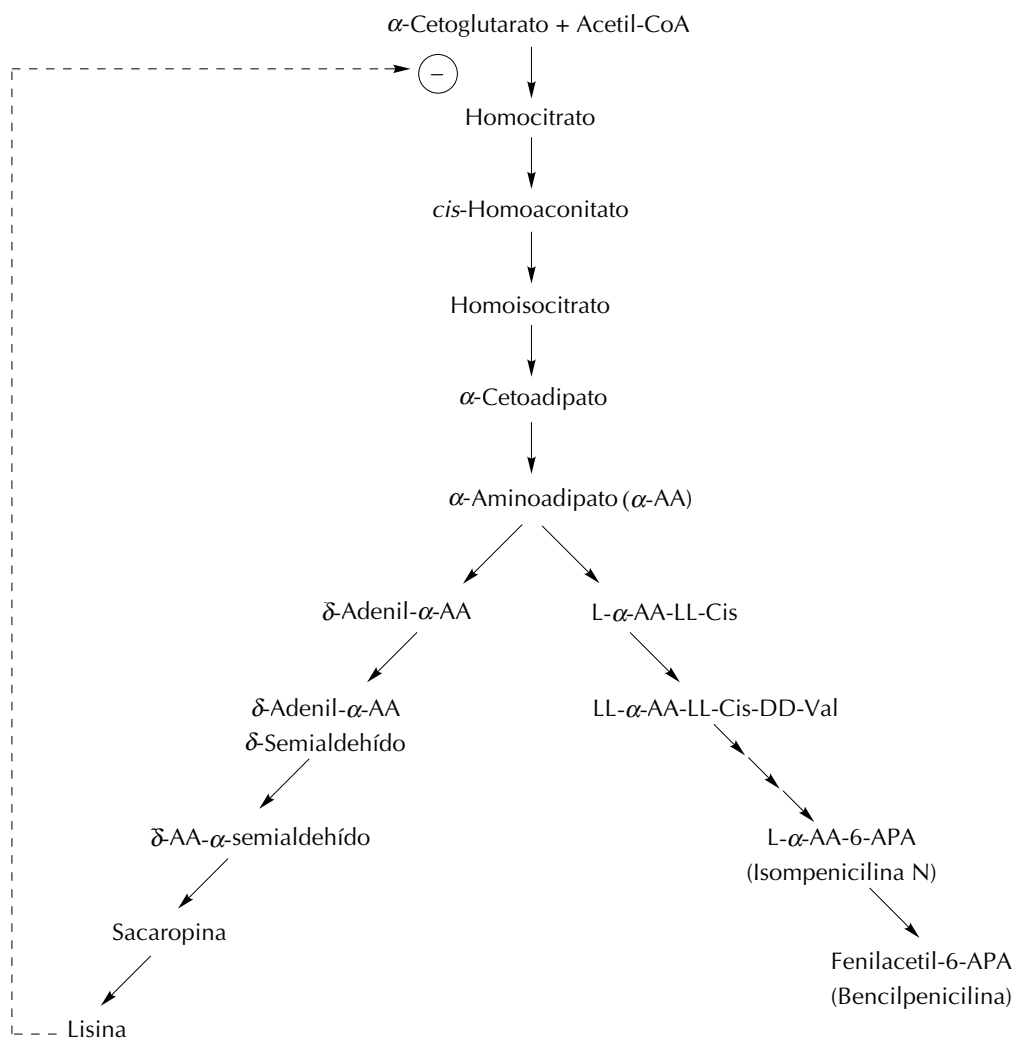


Figura 24.4 Vía de síntesis de la lisina y de la bencilpenicilina en *Penicillium chrysogenum*.

consecuencia del cese de la represión “feedback” que tiene lugar al no sintetizarse más el metabolito primario.

El metabolismo secundario y la diferenciación celular están mucho más influidos por la presencia de determinados iones metálicos que el crecimiento vegetativo. Así, manganeso, hierro y zinc son respectivamente metales clave para el metabolismo secundario de bacterias del género *Bacillus*, actinomicetos y hongos. Hay que mencionar que, en algunos casos, el metal induce la producción del metabolito (por ejemplo, el manganeso induce la producción de bacilina en *Bacillus subtilis* o el hierro la de estreptomicina por *Streptomyces antibioticus*) mientras que, en otros, la reduce (por ejemplo, el zinc inhibe la producción de griseofulvina por *Penicillium griseofulvum*). Un mismo metal puede tener actividad inductora frente a un metabolito e inhibidora frente a otro.

También hay que considerar la existencia de moléculas que ejercen un control sobre la producción de ciertos metabolitos secundarios. Por ejemplo, el factor A (2-isocaprioloil-3-R-hidroximetil-p-butirolactona) es un regulador pleiotrópico que ejerce un control positivo sobre la biosíntesis de estreptomicina en algunas especies de estreptomicetos. Tal como se comentó anteriormente, la metionina añadida inicialmente al medio incrementa la formación de cefalosporina en *Cephalosporium acremonium*. También el triptófano induce la producción de alcaloides de la ergolina por *Claviceps*.

24.4.3 Genética del metabolismo secundario. Superproducción de metabolitos secundarios

Una característica bastante extendida entre las bacterias es que los genes que codifican los enzimas de vías metabólicas secundarias se encuentran normalmente agrupados. Es también destacable que los genes responsables de la producción de un antibiótico suelen localizarse junto a los que codifican los mecanismos de resistencia al mismo. Si bien en organismos eucariotas los genes que codifican los enzimas de una vía metabólica secundaria pueden hallarse en diferentes cromosomas, existen ejemplos en los que algunos de los genes implicados en un proceso metabólico secundario han sido localizados en un mismo grupo de ligamiento en un cromosoma determinado. Este es el caso de dos genes implicados en la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*. Sin duda, este agrupamiento de genes claramente apunta a una regulación coordinada de los mismos.

Por lo que respecta a la modificación de la producción de metabolitos secundarios, se han obtenido mutantes altamente productores, bien a partir de mutaciones espontáneas, bien a partir de tratamientos mutagénicos. A título de ejemplo, el rendimiento en la producción de penicilina pasó de 5 mg/l en 1941 a 1000 mg/l en 1946 debido a los avances en la técnica del cultivo sumergido. Desde 1946 hasta 1970, el rendimiento siguió aumentando hasta 10000 mg/l en función de la selección de mutantes superproductores. La selección de mutantes también se ha utilizado eficazmente para obtener cepas que produzcan un solo metabolito secundario a partir de cepas salvajes que producen una mezcla de productos relacionados. Así, se obtu-

vieron cepas de *Penicillium patulum* que producen sólo griseofulvina, mientras que la cepa original produce una mezcla de este antibiótico juntamente con diclorogriseofulvina.

Cabe también destacar que la aplicación de las técnicas de ingeniería genética está siendo y será de gran ayuda para la optimización de la producción industrial de metabolitos secundarios. La identificación de los bloques de genes implicados en las vías biosintéticas secundarias, el estudio de su regulación y el clonaje de los mismos están posibilitando modificar no sólo el rendimiento, sino que además, mediante la combinación de genes de diferentes vías, permitan crear nuevas rutas que lleven a la producción de nuevos tipos de moléculas.

24.5 MACROMOLÉCULAS ESPECÍFICAS COMO METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios propiamente dichos son moléculas específicas o conjuntos específicos de moléculas muy parecidas (microheterogeneidad molecular), cuyo peso molecular no sobrepasa los 1500 daltons o, en muy pocos casos, los 2000 daltons. Sin embargo, ya ha sido señalado que los polisacáridos extracelulares, los pigmentos y las toxinas tienen muchas características comunes con los metabolitos secundarios. En los polisacáridos y las toxinas tenemos pesos moleculares que van de 10000 a 100000 daltons, o todavía mayores en algunos casos. No suelen presentar D-aminoácidos ni enlaces químicos extraños. En los polisacáridos hay microheterogeneidad molecular, pero en las toxinas no.

Entre otras sustancias de alto peso molecular que pueden ser incluidas dentro del concepto de metabolito secundario se encuentra el mismo γ -poli-D-glutamato capsular de *Bacillus anthracis* y *B. subtilis*, la estreptolisina S de los estreptococos del grupo A, la neurotoxina de *Shigella dysenteriae*, el factor de permeabilidad vascular de *Vibrio cholerae* y algunas bacteriocinas.

La producción de enzimas extracelulares está incluida en el metabolismo primario. Sin embargo, algunos exoenzimas degradativos sólo se producen una vez terminada la trofofase. De hecho, hay también enzimas endocelulares, como la catalasa en *Pseudomonas fluorescens*, que se forman especialmente al final de la fase logarítmica del crecimiento, y otros fenómenos, como la competencia para la transformación en *Bacillus subtilis* y en *Haemophilus influenzae*, que requiere el cese del crecimiento balanceado.

BIBLIOGRAFÍA

- BALTZ, R. H., HEGEMAN, G. D. y SKATRUD, eds. Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1993.
- DREW, S. W. y DEMAINE, A. L. Effect of Primary Metabolites on Secondary Metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 343–56, 1977.
- MARTIN, J. G. y LIRAS, P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* 43, 173–206 (1989).
- VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 395–427. 1990.

***A**PÉNDICE*

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

A

GRUPOS FISIOLÓGICOS Y DIVERSIDAD BACTERIANA

- A.1 EL TIPO CULTURAL COMO PIEZA BÁSICA DEL TRABAJO
BIOQUÍMICO 342**
- A.2 LA IDEALIZACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS Y LA
UNIDAD DE LA ACTIVIDAD QUÍMICA DEL CULTIVO
PURO 343**
- A.3 GRUPOS FISIOLÓGICOS Y TAXONOMÍA 344**

A.1 EL TIPO CULTURAL COMO PIEZA BÁSICA DEL TRABAJO BIOQUÍMICO

Los cultivos puros de los microorganismos que han servido para describir las actividades químicas que se refieren en los diferentes capítulos de este libro se derivan originariamente de un aislamiento primario. Este aislamiento se realizó en su momento a partir de una muestra de una planta o de un animal, de cieno, suelo, agua marina o de cualquier otro tipo de hábitat natural. En muchas ocasiones, tales aislamientos han sido mantenidos durante años por propagación vegetativa en cultivo puro.

Hay dos tipos de muestras naturales de las que pueden obtenerse aislamientos primarios. Un tipo corresponde a las derivadas de animales, plantas o de hábitats naturales donde predominan condiciones muy específicas, como ocurre en ciertas lagunas ricas en H_2S , en lagos salados o en fuentes termales. En estos casos, puede detectarse directamente al microscopio en la propia muestra un microorganismo exclusivo o claramente dominante que coincide aparentemente con el aislado en el cultivo puro primario. Las cepas procedentes de repetidos aislamientos primarios del mismo medio resultan ser, en su mayor parte, coincidentes. Al parecer, todas ellas se han obtenido a partir de poblaciones homogéneas de la misma especie microbiana (cultivo axénico).

El segundo tipo de muestras naturales, que es el más frecuente, es el que genera aislamientos de especies muy diferentes. Las aguas naturales y residuales, el cieno, el sedimento marino o cualquier muestra de suelo pueden constituir ejemplos característicos de este tipo de muestras, de las cuales parece que pueda aislarse casi cualquier tipo de microorganismo. Esto se debe a que muchos microorganismos son prácticamente ubicuos, aunque a veces se encuentren en una proporción mínima o incluso en estado durmiente o de anabiosis. Debido al cambio continuo de condiciones que suelen experimentar estos medios, en el transcurso del tiempo pueden producirse sucesiones de poblaciones diferentes, más o menos dominantes, o explosiones aleatorias de alguna de ellas. Precisamente en esto se funda el principio del cultivo de enriquecimiento, iniciado a principios de siglo por Winogradsky y desarrollado sobre todo por Beijerinck. El aislamiento primario de muchos microorganismos se ha llevado a cabo después de un cultivo de enriquecimiento determinado, y eventualmente, con la ayuda adicional de inhibidores selectivos. Por lo tanto, resulta evidente que la cepa obtenida puede ser escasamente representativa de la flora microbiana del medio de origen en el momento que se llevó a cabo el aislamiento.

El material con el que finalmente se trabaja corresponde a cultivos puros obtenidos a partir de uno o varios aislamientos diferentes. Un grupo fisiológico está formado por cepas que provienen del mismo medio de enriquecimiento y pueden pertenecer a especies muy distintas. Existen microorganismos que presentan una fisiología múltiple, con lo que pueden aislarse a partir de diferentes medios de enriquecimiento. En cualquier caso, el material de trabajo en el laboratorio es una población derivada de un aislamiento determinado, y que se desarrolla en unas condiciones definidas en un medio concreto. Este

desarrollo determina unas características propias de cada tipo cultural, las cuales pueden ser distintas para una misma cepa según sea el medio y las condiciones de cultivo. Al cambiar unas u otras, puede modificarse el tipo cultural y, en todo caso, solo se desarrolla una fracción, seleccionada al azar, de la población utilizada como inóculo.

Es obvio que, en continuidad con lo anteriormente señalado, se pueden establecer ciertas relaciones entre los diferentes tipos culturales obtenidos. Las más importantes son las que llevan a describir correctamente una cepa determinada, bien sea de fisiología restringida o múltiple. Un salto mucho mayor es el que conduce a distribuir las diferentes cepas en categorías taxonómicas análogas a las utilizadas para la sistemática vegetal y animal. Hay muchas cepas que de forma evidente pueden agruparse por su semejanza. Sin embargo, las razones que permiten considerar la traslación referida en toda su extensión son bastante convencionales y pueden llegar a ser abusivas, tanto por defecto como por exceso, pero realmente no se ha encontrado nada mejor para intentar comprender la diversidad bacteriana en su conjunto, ni para ordenar de forma más o menos convincente las distintas cepas formadas por el conjunto de cultivos puros que se mantienen y desarrollan. Cada uno de ellos comprende un biocatalizador definido con el que pueden oxidarse y reducirse unos componentes del medio de cultivo y, como consecuencia, acumularse en el mismo nuevas moléculas. Es evidente que para definir con rigor el tipo cultural para luego poder agrupar y ordenar en categorías taxonómicas, además de las actividades químicas, es forzoso tener en cuenta otras manifestaciones fenotípicas y genotípicas.

A.2 LA IDEALIZACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS Y LA UNIDAD DE LA ACTIVIDAD QUÍMICA DEL CULTIVO PURO

El análisis de intermediarios, la identificación de enzimas y coenzimas y la posibilidad de establecer con ello vías metabólicas concretas no puede hacernos perder de vista el tipo cultural de partida. Después podrán establecerse hipótesis generales útiles incluso cuando son elaboradas sobre datos tomados de diferentes tipos culturales, pero nunca hay que olvidar el riesgo de caer en una idealización que no corresponda efectivamente al comportamiento de ningún tipo real de cultivo puro.

La diferentes vías metabólicas son una abstracción de una actividad química completamente integrada. El mismo crecimiento balanceado es una condición ideal que sólo resulta aplicable al conjunto de la población, y ni siquiera en todos los casos, pero que nunca presupone que todas las células individuales tengan el mismo comportamiento. Esto sólo puede conseguirse en un cultivo sincrónico y sólo para un período de tiempo limitado. En realidad, el desarrollo balanceado corresponde a una población ideal cuya actividad sería equivalente al de la población real. Además, hay que considerar que muchas células mueren y se lisan o dejan de multiplicarse. Por otra parte, siempre se forman productos que se acumulan en el medio en pequeña proporción y que no se consideran, especialmente durante la división celular.

Ésta no es nunca un proceso tan limpio y uniforme como podríamos imaginar y, junto a otros fenómenos de lisis más o menos importantes, determina la incorporación al medio de diferentes productos, muchos de los cuales se reutilizan.

El aislamiento e identificación de los intermediarios de una vía metabólica, juntamente con la demostración *in vitro* de su transformación en el siguiente producto de la vía son condiciones imprescindibles para la justificación de la misma. Sin embargo, muchos de tales intermediarios también se forman a partir de otros precursores o pueden ser transformados en productos distintos al siguiente de la vía en cuestión.

Los productos finales de la mayoría de las vías metabólicas suelen ser a su vez sustratos de otras vías, tanto catabólicas como biosintéticas. Es evidente que las vías catabólicas no funcionan aisladamente generando siempre un mismo producto a partir de un determinado sustrato. En una célula metabólicamente activa está en marcha un sistema altamente complejo de reacciones en equilibrio. No sólo el sustrato sino los intermediarios y los mismos productos finales toman parte en estas reacciones, o incluso los mismos productos catalíticos o sus precursores pueden ser sustratos para otras reacciones. La bioquímica del microorganismo en cultivo puro es una actividad unitaria donde junto a cierto intercambio energético con el medio exterior van desapareciendo y formándose diferentes productos en el sistema biofase-medio de cultivo.

La teoría del cultivo puro que se ha desarrollado en este libro permite elaborar un modelo racional sobre las transformaciones químicas que tienen lugar en el medio mientras aumenta una masa microbiana, la cual permanece idéntica a sí misma a través de una gran actividad química más compleja que han sido dejada aparte. Este modelo es sin duda útil para permitirnos provocar determinados procesos con resultados perfectamente predecibles, los cuales permiten trazar una imagen comprensiva de muchos aspectos del mundo microbiano. Sin embargo, siempre representa una teoría ideal, eso sí, concordante con la constatación de un balance mayoritario perfectamente cuadrado entre sustratos, productos finales y biomasa.

A.3 GRUPOS FISIOLÓGICOS Y TAXONOMÍA

Orla-Jensen fue el primero en impulsar una clasificación de las bacterias basada primariamente en sus características fisiológicas. En este aspecto es memorable su trabajo "Die Hauptlinien des Natürlichen Bacterien-Systems", publicado en 1909 en el *Zentralblatt für Bacteriologie* (XXII, 305–346). Su clasificación es fiel al paradigma lineano y ha tenido mucha influencia en todos los sistemas de clasificación propuestos posteriormente. Sin embargo, muchas de sus ideas son incompatibles con los grandes progresos subsiguientes en la propia bioquímica de los microorganismos, y su misma nomenclatura se ha abandonado casi completamente. No obstante, desde Orla-Jensen está claro que la bioquímica de los cultivos puros es útil para ordenar las diferentes cepas bacterianas de forma bastante satisfactoria dentro de un sistema

de categorías taxonómicas. A pesar de ello, nunca se ha admitido una sistemática basada exclusivamente en este criterio y, en la actualidad, la teoría de la diversidad bacteriana generalmente aceptada considera el criterio bioquímico para establecer diferentes categorías en muchos casos, pero atiende también a otros aspectos, tanto fenotípicos como genotípicos. La visión más completa de la diversidad bacteriana se recoge en el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” y el “The Prokaryotes”, ambas obras citadas repetidamente en este texto.

TABLA A.1 Significación taxonómica de los grupos fisiológicos descritos en este libro.

Bergey’s Systematic	Grupo fisiológico	Capítulo, apartado y subapartado
—	1. Levaduras facultativas	4
4, VI	2. Bacterias del ácido acético	5
	3. <i>Zymomonas</i>	5.9.2
	4. <i>Bifidobacterium</i>	5.9.6
	5. Homolácticos obligados	6.3
	6. Heterolácticos y facultativos	6.3
	7. Propionibacterias	7
	8. Succinibacterias	7.14 y 8.13
	9. Acetógenos	8.5
	10. Butiribacterias	8.2
5, I	11. Bacterias del ácido fórmico	9
	11.1 Mezcla de ácidos	9.3
	11.2 2,3 Butilenglicol	9.4
	11.3 Trimetilenglicol	9.5
	12. Bacterias putrefactivas	10
25	13. Bacterias metanógenas	11
	14. Bacterias mineralizadoras	12 y 13
	15. Bacterias desnitrificantes	14.2
5, I	16. Fermentadores reductores de nitrato	14.4
7	17. Bacterias sulfurógenas	15
	18. Oxidadores de hidrocarburos	16
	19. Oxidadores de compuestos aromáticos	17
	19.1 Aerobios	17.2
	19.2 Anaerobios	17.10
	20. Oxidadores de compuestos nitrogenados	18
4, IV	21. Metilotrofos	19.6
20, A	22. Nitrificantes	20
20, D	23. Bacterias del hierro	21.1
20, B	24. Escotobacterias del azufre	21.2
(20, C)	25. Bacterias del hidrógeno	22
18	26. Bacterias fototróficas	23
	26.1 Púrpura	23.4
	26.2 Verdes	23.5
19	27. Cianobacterias	23.7
25, III (o 4, II)	28. Halobacterias	23.8
	29. Bacterias luminiscentes	23.9
	30. Productores de metabolitos secundarios	24

En esta “Bioquímica de los microorganismos” se ha hecho referencia a 30 grupos fisiológicos que se caracterizan por su actividad química (tabla A.1). De las 33 Secciones en que se divide el reino Prokaryotae en el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, sólo cuatro quedan establecidas por su tipo fisiológico: las 25, 7, 18 y 19 (tabla A.1). Tienen carácter de familia los grupos fisiológicos 2, 11, 16, 21 y 28. Respectivamente, corresponden a las Secciones y Familias 4, VI; 5, I; 5, I; 4, IV; y, 25, III (o 4, II). Los grupos fisiológicos 22, 23 y 24 tienen nivel de Grupo, comparable al de Orden o Familia, en la Sección 20 del Bergey’s Manual (20 A, 20 B y 20 D). El grupo fisiológico 25 sólo tienen carácter taxonómico distintivo a nivel de la Sección 20 C cuando la oxidación del hidrógeno es obligada. Los demás grupos fisiológicos indicados en este libro están considerados como criterio taxonómico distintivo a nivel de género, especie o cepa. Por lo tanto, la diversidad bacteriana que ha sido puesta de manifiesto a nivel del sistema medio/biomasa en este libro es sólo una parte menor de la que se reconoce en la sistemática bacteriana actual, y correspondiente a niveles taxonómicos que pueden variar desde el de cepa al de Sección. Esto es debido no sólo a que la química del cultivo puro es insuficiente para expresar la diversidad bacteriana en un sistema de categorías taxonómicas, sino a que la misma bioquímica bacteriana es todavía poco conocida.

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS Y AUTORES

A

- Aceite de Fusel 48
- Aceitunas aliñadas 74
- Aceptores finales de hidrógeno 82
- Acetaldehído 46, 100
- Acetaldehído deshidrogenasa 100
- Acetato 64
 - formación por reducción directa de CO₂ 101
- Acetator 54
- Acetil lipoato 85, 100
- N-Acetil murámico (NAM) 21
- Acetil-P quinasa 69
- Acetil-CoA, generación por condensación de acetil-CoA 85, 100, 109
- Acetil-CoA acil transferasa 226
- Acetilfosfato 66, 79, 221
- N-Acetilglucosamina (NAG) 22, 21
- Acetoacetato 108
- Acetoacetato descarboxilasa 111
- Acetoína deshidrogenasa 84
- Acetoína 62, 71, 83, 110, 128
- Acetoína sintasa 71
- Acetol 62
- Acetolactato 108
- α -Acetolactato 128
- α -Acetolactato sintasa 128
- Acetoquinasa 100, 106
- Ácido 6-metilsalicílico 333
- Ácido acético por descarboxilación 99
- Ácido alantoico 249, 250
- Ácido antranílico 231, 246
- Ácido ascórbico (vitamina C) 63
- Ácido butírico 96, 108
- Ácido caproico 108
- Ácido 2-ceto-L-gulónico 63
- Ácido Co-metilcobárico 105
- Ácido dipicolínico 26, 308, 325
- Ácido fórmico 119
- Ácido fosfórico altamente polimerizado 26
- Ácido glicólico 62
- Ácido glioxílico 164
- Ácido glucurónico 55
- Ácido glutámico 136
- Ácido homogentísico 229
- Ácido indolpropiónico 139
- Ácido kójico 334
- Ácido láctico como producto de fermentación 74
- Ácido monoiodoacético 45
- Ácido N-acetil murámico (NAM) 22
- Ácido α -OH-propiónico 74
- Ácido propiónico como producto de fermentación 90
- Ácido protocatéquico. Ver protocatecuato
- Ácido succínico 48, 49
- Ácido β -cetoadípico 225
- Ácidos grasos 20, 218
 - oxidación 218
 - oxidación a ω -hidroxiácidos 221
 - α -oxidación 218
- Ácidos lipoteicoicos (LTA) 21, 24
- Ácidos nucleicos 19
- Ácidos teicoicos (TA) 21, 23, 24, 26
- Acil-CoA deshidrogenasa 219
- Aconitato hidratasa 165
- Acroleína 131

- Actinomicetos 216, 329, 333, 334, 337
 Actinomicina 334, 335
 Actividad de la biofase 6
 Actividad química completamente integrada 343
 Actividad unitaria 344
 Adams 298
 Adenil-fosfato (APS) reductasa 287
 Adenilil sulfato transferasa 207
 Adenilil-sulfato reductasa 207
 Adenosina-5'-fosfosulfato (APS) 206
 Adenosina-3'-fosfato-5' fosfosulfato (APS) 207
 Adiciones sucesivas de etanol 58
 ADP-sulfurilasa 288
 Aerotolerancia 85
 Agar sangre, medio 75
 Agitación 16
 Agua de la biofase 17
 Agua intercelular 18
 Agua intracelular 18
 Aireación 16
 Aislamientos primarios 342
 Alanina 246
 Alanina deshidrogenasa 243
 D-Alanina 25
 Alantoato-amidohidrolasa 250
 Alantoicasa 250
 Alantoinasa 249
 Alcaloides 334
 Alcaloides de la ergolina 337
 Alcanos 216
 oxidación 216
 Alcohol deshidrogenasa 60, 100
 Alcohol deshidrogenasa NAD⁺ dependiente 60
 Alcohol oxidasa 264
 Alcohol D-amílico 49
 Alcoholes de más de cinco átomos de carbono 62
 Alcohol isoamílico 49
 Aldehído deshidrogenasa 60
 Aldehído oxidasa 180
 Aldolasa 64
 Aldolasa de la desoxirribosa-5-P 83
 Algas 333
 Algas cianofíceas 307
 Allen, S. H. G. 94
 Alquenos 216
 oxidación 216
 Alquibencenos 230
 Aminoácido oxidasa 242, 243
 D-Aminoácido 326
 D-Aminoácido oxidasa 180
 L-Aminoácido 326
 L-Aminoácido deshidrogenasa 145
 Aminoácidos aromáticos 66
 Aminoácidos fermentados por bacterias anaerobias 143
 Aminoácidos que actúan como reductores 144
 Aminoácidos y cetoácidos, fermentación conjunta 145
 Aminoglicósidos 329
 Aminopeptidasas 134
 Amoniac 276
 Amonio, utilización 273
 Amonio monooxigenasa 275
 Anderson 50
 Anfomicina 329
 Anhídrido carbónico 162
 Anillo aromático, ver anillo bencénico
 Anillo bencénico 224
 meta-ruptura 226
 orto-ruptura 231
 Aniones más abundantes 19
 Antibióticos 325, 329, 332
 Antiespumantes 16
 Antimetabolito 329
 Antraciclinas 330
 APS 206
 APS-reductasa 288
 Arabinosa 83
 Arginina 135
 Arginina-desaminasa 135
 ARN 27
 Arnon 258
 Archeobacterias 21, 153
 Archeobacterias metanógenas
 grupo I 153
 grupo II 153
 grupo III 153
 Asai, T. 54, 72
 Asimilación de O₂ 177
 Asimilación del CO₂ 295
 Asimilación del nitrógeno 296
 Asimilación fermentativa 50
 Asimilación oxidativa 50
 Aspartasa 243
 ATP 7, 17, 27, 44, 66, 69, 101, 106
 Aureomicina 52
 Avermectina 327, 328, 329, 330
 Azida sódica 52
Azotobacter, cadena de transporte de electrones 187
 Azoulay 198
 Azúcares aminados 25
 Azufre elemental 285, 308
 oxidación 285, 286
 Azufre oxidasa 287, 288
B
 Bacilina 337

Bacillus, cadena de transporte de electrones 186
 Bacilos gramnegativos facultativos 120
 Bacilos grampositivos no esporógenos 75, 76
 Bacitracina 335
 Bacteria de Wieringa 102
 Bacterias 333
 Bacterias acetógenas 98, 103, 107, 254
 reducción indirecta del CO₂ 107
 Bacterias anaerobias 258
 Bacterias anaerobias facultativas 43
 Bacterias del ácido acético 54, 55, 99
 formación de colonias 56
 metabolismo de los glúcidos 71
 metabolismo oxidativo 71
 modelos metabólicos 72
 Bacterias del ácido butírico 97
 fermentación de los hidratos de carbono 98
 Bacterias del ácido láctico 66, 71, 74, 77
 heterofermentativas 77
 homofermentativas 77
 Bacterias del ácido propiónico 112
 Bacterias del azufre 272
 Bacterias del hidrógeno 103, 272, 273, 278, 292
 crecimiento autotrófico 293
 Bacterias del hierro 17, 272
 Bacterias del nitrógeno 272
 Bacterias desnitrificantes 193
 Bacterias entéricas 77, 79
 productoras de mezcla de ácidos orgánicos 116
 productoras de productos finales neutros 116
 reducción de glicerina a trimetilenglicol 116
 Bacterias esporógenas 96
 Bacterias esporógenas anaerobias estrictas 96
 Bacterias fototrófas 257, 258, 304, 307, 311, 312, 313
 Bacterias grampositivas 26
 Bacterias heteroacetógenas 103
 Bacterias heterofermentativas del ácido láctico 99
 Bacterias luminiscentes 305
 Bacterias metanógenas 152, 254
 Bacterias metanotrofas 260, 261
 Bacterias metilotrofas 260
 Bacterias nitrificantes 273, 274, 278, 279
 Bacterias púrpura 307, 308, 310, 311
 Bacterias que utilizan la reacción de Stickland 144
 Bacterias quimiolitotróficas 257
 obtención de poder reductor 278
 Bacterias reductoras del azufre
 ciclo del hidrógeno 204
 hidrogenasas 205
 Bacterias rojas 305
 Bacterias rojas del azufre 306
 Bacterias sulfurógenas 202
 Bacterias verdes 308, 311
 Bacteriocinas 338
 Bacterioclorofila 307, 309, 310
 Bacterioclorofila *a* 308, 309
 Bacterioclorofila *b* 308, 309
 Bacterioclorofila *c* 311
 Bacterioclorofila *d* 311
 Bacterioclorofila *e* 311
 Bacterioclorofila *g* 308
 Bacteriofeofitina 309, 310, 311
 Bacteriorrodopsina 318
 Bacteriorruberinas 318
 Balance porcentual O/R 81
 Balances de fermentación 79
 Balba 240
 Baldwin, R. L. 94
 Baltz, R. H. 338
 Bandas de Soret 185
 Barbiturasa 250
 Baret, E. L. 199
 Barker VI, 50, 90
 Barker, H. A. VI, 50, 90, 102, 149
 Bedard, CH. 268
 Beijerinck 202, 297, 305, 342
 Bencidina 75
 Bencilpenicilina 336
 Benzaldehído deshidrogenasa 229
 Benzoato 230, 237
 Benzoato 1,2-dioxigenasa 229, 230
 Benzoil-CoA 236, 237
 Benzoilformiato descarboxilasa 229
 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 72, 87, 94, 280
 Berry, D. F. 240
 Berzelius 43
 Best, D. J. 268
 Betalactamas 329
 Biebl 208
 Bifidobacterium, formación de acetato y lactato 80
 Biftano 154
 Biología de *Escherichia coli* 119
 Bioluminiscencia 318
 Bioquímica comparada 11
 Bioquímica unitaria VI, 10
 Biosíntesis de las purinas 66
 Biotina 101
 Bisulfato reductasa 207
 Bisulfito reductasas 210
 Black 162
 Bleomicinas 330
 Blondeaur 74
 Boerhave 54
 Bollag, J. M. 240

Borichewski 279
 Bowien, B. 299
 Boyd, G. S. 222
 Braun, M. 102
 Brooks Low, K. 131
 Bu'Lock, J. D. 325
 Buchanan 258
 Büchner 44, 56
 Büchner, hermanos 42
 Buder, J. VI, 306
 Burge, R. F. 27
 2,3-Butanodiol 62, 116
 1,3-Butanodiol 62
 Butanodiol deshidrogenasas 129
 Butanol 96
 Butanol deshidrogenas 111
 Butirilaldehído deshidrogenasa 111
 Butiril-CoA deshidrogenasa 140
 Buttin 298
Bypass metabólico 9
 C
 Cadena de transporte inverso de electrones 276, 278
 Cadena O 22
 Cadena respiratoria 116, 181
 Cadenas respiratorias en los tiobacilos 288
 Cagniard-Latour 42
 Calvin 103, 276
 Cambio químico realizado en una sola etapa 6
 Capacidad autorreguladora 36
 Carácter cíclico 6
 Carácter fermentativo facultativo 116
 Carácter neodarwiniano 11
 Carbamato-quinasa 136
 Carbono asimétrico 74
 Carbono recuperado 81
 porcentaje 81
 4-Carboxi-cis,cis-muconato-ciclo-isomerasa 224
 4-Carboxi-muconolactona descarboxilasa 224
 Carboxidobacterias 278
 Carboxipeptidasas 134
 Carboxitransfosforilasa 93
 Cardiolipina 21
 Cardon 90
 Carne cocida de Robertson 97
 Carotenoides 25, 308, 311
 Carr, N. G. 320
 CAT. Ver ciclo de los ácidos tricarboxílicos
 Catabolismo 8
 Catabolismo de la glucosa 196
 Catalasa 178, 338
 Catecol 224–227, 230, 231, 233, 234
 Catecol 2,3-oxigenasa 226
 Caucho natural 96
 Caucho sintético 96
 Cefalosporina 332, 337
 Cefamicina 336
 Celulosa 21, 41, 55
 Celulosa sintasa 71
 Centro de captación 308
 Centro de reacción 309
 Centro de reacción I 316
 Centro de reacción II 316, 317
 Centro de reacción P680 317
 Cepa 4
 Ceras de palmitato 217
 2-Ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato 64
 2-Cetoácido deshidrogenasa 145
 β -Cetoadipato 224, 225, 226, 231, 233
 Cetogénesis 62
 2-Cetogluconato 69
 5-Cetogluconato 55, 69
 α -Cetoglutarato 69, 144
 α -Cetoglutarato deshidrogenasa 163, 165, 166, 167, 264
 2-Cetopentano-4-enoato hidratasa 227
 β -Cetotiolasa 140
 CH₃—H₄ folato 105
 Cianobacterias 307, 313, 315
 fisiología 317
 Ciclo CAT reverso 314
 Ciclo de Arnon 258, 259
 Ciclo de Calvin 192, 254–259, 265, 282, 292, 295, 313
 Ciclo de Krebs 163, 280
 Ciclo de Krebs funcional 55
 Ciclo de la hexosa monofosfato 66, 255
 Ciclo de la ribulosa difosfato. Ver ciclo de Calvin
 Ciclo de la ribulosa fosfato 297
 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos 163, 197, 258, 280
 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional 258
 Ciclo de reducción del CO₂ a CH₄ 157
 Ciclo del ácido cítrico 167
 Ciclo del ácido cítrico funcional 60
 Ciclo del ácido glioxílico 170, 171, 259
 Ciclo del glutamato 263
 Ciclo reductor de la hexosa monofosfato 256
 Ciclo reductor de la pentosa fosfato 258
 Ciclo reductor de las pentosas. Ver ciclo de Calvin
 Ciclo reductor de los ácidos tricarboxílicos. Ver ciclo de Arnon
 Ciclo reverso del CAT 313
 Ciclosporinas 330
 Cinética de la producción de acetato 56
 Cisteína 141
 Citocromo *a* 64, 185
 Citocromo *a*₁ 276, 277, 284

- Citocromo *aa*₃ 276, 289
 Citocromo *b* 64, 185, 289
 Citocromo *bc* 309
 Citocromo *bc*₁ 310
 Citocromo *bf* 315, 316
 Citocromo *c* 64, 179, 185, 276, 284, 288, 289
 Citocromo *c* peroxidasa 179
 Citocromo *c*₂ 310
 Citocromo *c*₃ (red) 208
 Citocromo *c*₅₅₁ 184
 Citocromo *c*₅₅₃ reductasa 60
 Citocromo *c*₅₅₅ 311
 Citocromo *d* 196
 Citocromo *dO*₂ 117
 Citocromo *o* 196
 Citocromo *oO*₂ 117
 Citocromo oxidasa 64, 178
 Citocromo *P*₄₅₀ 218, 222
 Citocromos 183, 205, 206, 277
 Citramalatoliasa 136
 Citrato liasa 313
 Citrato sintasa 165
 Clark, H. F. 121, 131
 Clifton 50
 Cloranfenicol 336
 Clorobiáceas 307, 308, 313
 Clorofila *a* 309, 314, 315
 Clorofilas 25
 Cloroflexáceas 307, 308
 Clorosomas 311
 Clostridios 308
 Clostridios putrefactivos 134
 Clostridios sacarolíticos 97
Clostridium kluyveri, formación de succinato 113
 CO 106
 CO deshidrogenasa 105
 CO oxidorreductasa 297
 Co-(5-metoxi-bencimidazolil)-Co-metilcobamida 105
 CO₂ como catabolito 163
 CO₂ recuperado, porcentaje 81
 CoA transacetilasa 100
 CoA transferasa 111, 140
 Cocos grampositivos facultativos 75, 76
 Coenzima F₄₂₀ 156
 Coenzima flavínico F₄₂₀ 155
 Coenzima M (SH—CoM) 155, 156
 Coenzimas 7
 Cofermentación de la lactosa 83
 Cofermentación de la treonina 83
 Col ácida ("sauerkraut") 74
 Co-metilcorrinoideas 105
 Competencia 338
 Complejo oxidante del tiosulfato 288
 Complejo piruvato-ferredoxina oxidorreductasa 101
 Complejo plastoquinona-hierro 316
 Composición elemental 18
 Compuestos aromáticos 224, 232, 233
 degradación aerobia 224
 degradación anaerobia 234
 Compuestos C₁ 254
 Compuestos reducidos de azufre 308
 Concentración efectiva de sustrato 34
 Concepto de microorganismos 6
 Condiciones metanogénicas 239
 Constante de la fase de crecimiento 31
 Consumo de acetato
 efecto de la concentración de etanol 58
 por *Pseudomonas* 57
 Consumo de etanol 57
 por *Pseudomonas* 57
 Co-oxidación 217
 Crecimiento balanceado 333, 338, 343
 Crecimiento mixotrófico 284, 296
 Crecimiento sobre metilamina 267
 Cromatiáceas 307, 308, 311
 Cromosoma 20
 Crotonasa 219
 Cubiertas celulares fúngicas 332
 Cultivo axénico 342
 Cultivo continuo 34, 333
 Cultivo de enriquecimiento 342
 Cultivo discontinuo ("*batch culture*") 30, 333
 Cultivo puro 4, 6
 Cultivo sincrónico 343
D
 Dagley, S. 240
 Dawes, I. 189
 De Groot 198
 De Ley 54, 72
 De Saussure 292
 Degradación aerobia 224
 Degradación de la xantina 148
 Delf VI
 Demain, A. L. 338
 Desaminación 242
 Desaminación de un aminoácido 134
 Desaminación por insaturación 134
 Desaminación reductora 135
 Desaminasa 140
 Desarrollo aerobio 50
 Desarrollo equilibrado 44
 Desarrollo mixotrófico de *T. ferrooxidans* 284
 Descarboxilación anaerobia del piruvato en las bacterias
 del grupo entérico 119

- Descarboxilación de aminoácidos 142
 Descarboxilación del piruvato 47
 Descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato 63
 Descarboxilación oxidativa del piruvato 99
 Deshidrogenasa del monóxido de carbono 106
 Deshidrogenasa láctica 78
 Desnitrificación 192, 194
 Desoxirribosa 83
 Desoxirribosa-5-P 83
 Desulforrubidina 210
 Desulfovibrio 298
 Desulfoviridina 202, 210
 Devereux 44
 Diacetilo 84, 128
 Diálisis 45
 3,5-Diaminohexanoato deshidrogenasa 140
 Diauxia 58
 2,5-Dicetogluconato 69
 Dickert 106
 Diclorogriseofulvina 337
 Diéteres 154
 1,3-Difosfo-D-glicerato 255
 1,3-Difosfoglicerato (Éster de Negelein) 46
 Dihidrolipoildeshidrogenasa 166
 Dihidroorotato oxidasa 180
 Dihidroxiacetona 55, 62
 Dihidroxiacetona-P 46
 DPI (2,6-dinitrofenol indofenol) 66
 Diol deshidratasa 130
 Dioxigenasas 177, 224
 Disolventes neutros 96
 Diversidad bacteriana 343, 346
 División binaria 30
 DNA 19
 DNAsa 19
 DNP (dinitrofenol) 52
 Doble sustrato 17
 Doelle, H. W. VII, VIII
 Donker 77, 306
 Drake 103, 106
 Drew, S. W. 338
 Dugan 279
 Dupetit 192
 Durham 121
 Dutton 237
 Dutton y Evans, vía reductora 237
 E
 E₁, piruvato deshidrogenasa 99
 E₂, dihidrolipoato transacetilasa 99
 E₃, dihidrolipoato deshidrogenasa 99
 Ecuación de Michaelis-Menten 33
 Edeína 334
 Efecto de la adición de etanol 59
 Efecto de la adición de fosfatos 45
 Efecto de la materia orgánica sobre las bacterias nitrificantes 278
 Efecto Pasteur 43, 44, 188
 Ehrlich 49
 Eijkman 121
 Elsdén 90
 Embden-Meyerhof, vía 45
 Embutidos curados 74
 Emergy, R. S. 94
 Endopeptidasas 134
 Energía libre (ΔG) 8
 Energía libre específica (ΔG°) 8
 Engelmann VI, 304, 305, 306
 Enlaces α -glucosídicos 25
 Enlaces β -1,4-glucosídicos 21
 Enterobacteriáceas 119, 187
 cadenas de transporte de electrones 187
 Enterobacterias 193
 Enterotoxina 334
 Envueltas celulares 10
 Enzima málico 86, 169
 Enzima reductor del tiosulfato 288
 Enzimas extracelulares, producción 338
 Ergolina 334
 Eritritol 62
 Eritromicina 327, 328, 329, 334
 Eritrulosa 62
 Escherich 121
 Especie 5
 Espiroquetas 331
 Esporas bacterianas 325
 Esporulación 333
 Estabilidad del mRNA 20
 Estado de óxido-reducción 81
 Estado estacionario 35
 para distintas concentraciones celulares 36
 Estequiometría clásica de la fermentación láctica 74
 Streptococos del grupo A 338
 Streptococos del grupo N de Lancefield 83
 Streptococos lácticos 83
 Streptolisina S 338
 Streptomicetos 329, 330, 337
 Streptomycin 327, 332, 334, 337
 Estructura altamente organizada 6
 Etanol 46, 111
 Etilenglicol 61
 E—TPP 100, 101
 Etwards, medio 75
 Evans 237, 240, 258
 Evans, W. C. 240

Exopeptidasas 134
 Extractos 44
 Extractos comerciales de levadura 45
F
 Fabricación de cordita 96
 Factor A 337
 Factor de producción 34
 Factor F₄₃₀ 156, 158
 Factores de crecimiento 16
 FAD 99
 FADH₂ 78
 Fase exponencial del crecimiento 333
 Fase logarítmica del crecimiento 338
 Fenilalanina 229, 279
 inhibición de *T. neapolitanus* 279
 oxidación 229
 Fenol 231
 oxidación 231
 Fenol 2-monooxigenasa 177
 Fenómenos de lisis 343
 Fenoxazinona sintetasa 335
 Fermentación 162, 197
 Fermentación acética del etanol 54
 Fermentación aceto-glicérica 47
 Fermentación ácido mixta 121
 Fermentación acoplada de dos aminoácidos 142
 Fermentación alcohólica 45
 Fermentación alcohólica de la levadura 46
 Fermentación 2,3-butilenglicólica 127
 Fermentación de la alantoína 149
 Fermentación de la glucosa por *Lactobacillus buchneri* 81
 Fermentación de la pirimidina 147
 Fermentación de la purina 147
 Fermentación de los azúcares 116
 Fermentación del ácido nicotínico 149
 Fermentación del ácido orótico por *Clostridium orotium* 148
 Fermentación del etanol por *Clostridium kluyveri* 108
 Fermentación del malato 85
 Fermentación endógena 51, 52
 Fermentación glicérica con sulfito 47
 Fermentación heteroláctica 78
 Fermentación homoláctica 78
 Fermentación láctica de la desoxirribosa 83
 Fermentación láctica del tartrato 86
 Fermentación maloláctica 85, 86
 Fermentación pirúvico-glicérica 48
 Fermentación propiónica de la glucosa 92
 Fermentación de la glucosa 45
 Fermentación láctica de hexosas y pentosas 77
 Fermentación láctica de la fructosa 82
 Fermento 43
 Fermento butírico 96
 Fernbach 96
 Ferredoxina 105, 205, 206, 208, 311, 316
 Ferredoxina red 105
 Ferredoxina-ox 101, 105
 Ficobilinas 314
 Ficobilisomas 315
 Ficocianinas 314
 Fijación autotrófica del CO₂ 105
 Fijación del CO₂ 313
 Fijación del nitrógeno molecular 296
 Fischer, W. 27, 101
 Fisiología múltiple 342
 Fitano 154
 Fitz 90, 96
 Flavina adenindinucleótico (FAD) 182, 183
 Flavodoxina 208
 Flavoproteínas 180
 Flavoproteínas autooxidables 179
 Floroglucinol 236, 237, 238, 239
 Fluoruro sódico 45, 52
 Formación de butanol 110
 Formación de acetato 124
 Formación de acetoína 127
 Formación de acetona 110
 Formación de ácido láctico 78
 Formación de 2,3-butanodiol (2,3-butilenglicol) 129
 Formación de butirato 109
 Formación de celulosa 71
 Formación de CO₂ 124
 Formación de diacetilo 85
 Formación de etanol 122
 Formación de glucógeno 51
 Formación de gluconato 66, 68
 Formación de H₂ 124
 Formación de hexosas fosfato 47
 Formación de macromoléculas 7
 Formación de propiónico en *Propionibacterium* 92
 Formación de propiónico en *Veillonella* 92
 Formación de succinato 125
 Formación de trimetilenglicol 130
 Formación de triosas fosfato 47
 Formación del lactato 125
 Formación del piruvato 47
 Formación directa 86
 Formiato 100, 104, 257
 Formiato deshidrogenasa 104, 117, 298
 Formiato-hidrógeno liasa 100
 Formil-L-quinurenina 246
 Formilmetanofurano 155
 N-Formilquinurenina 247
 Forrajes ensilados 74
 Fosfatidiletanolamina 21

Fosfatidilglicerol 21
 Fosfato de 7-mercaptopheptanoil treonina (HS-HTP) 156
 Fosfatos orgánicos 45
 Fosfocetolasa y acetato quinasa 140
 Fosfoenolpiruvato 46
 Fosfoenolpiruvato carboxilasa 169
 Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 169
 Fosfofructoquinasa 47
 3-Fosfoglicer aldehído 255
 2-Fosfoglicerato 46
 3-Fosfoglicerato (Éster de Nielson) 46
 Fosfoglicerato quinasa 255
 Fosfoglicolato 257
 Fosfogluconato 69, 257
 6-Fosfogluconato 64
 Fosfohexosa fosfocetolasa 69
 6-Fosfohexosa fosfocetolasa 99
 Fosfopentosa fosfocetolasa 78
 Fosforilación oxidativa 44, 188
 Fosforribulosa quinasa 255
 Fosfotrans acetilasa 100
 Fosfotriosa isomerasa 79
 Fotosíntesis 8, 304, 307, 308
 Fotosíntesis anoxigénica 307
 Fotosíntesis oxigénica 307, 314
 Fotosistema 308, 310, 315
 Fotosistema II 317
 Fotosistema PSI 315
 Fotosistema PSII 315
 Fracción ácido-soluble 18, 19
 Fracción alcohol-éter insoluble 19
 Francis, A. J. 240
 Frateur, J. 54, 72
 Friedich, B. 299
 Friedovich 179
 Fritsch 121
 Fructosa 46, 62
 Fructosa-1,6-PP (Éster de Harden-Young) 46
 Fructosa-6-P 69
 Fructosa-6-P (Éster de Neuberg) 46
 Fuchs, G. 240
 Fulmer 44
 Fumarato como aceptor final de electrones 116
 Fumarato hidratasa 166
 Fumarato reductasa 117
 Fumarilpiruvato 228
 Función anabólica 7
 Función catabólica 7
 Funciones específicas 332
G
 Gas de los pantanos 152
 Gas fijo 162
 Gas silvestre 162
 Gay-Lussac 42
 Gayon 192
 Geis, A. 87
 Generación de ATP 311
 Generación de energía en acetógenas 106
 Generador de Fings 54
 Géneros representativos 155
 Gentisato 224, 228, 229, 233
 Gentisato 1,2-dioxigenasa 229
 Giberelinas 327
 Glaser 71
 Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa 255
 Gliceraldehído-3-P 64, 66
 Gliceraldehído-3-P (Éster de Fischer) 46
 Glicerina 62, 130
 Glicerol 23
 α -Glicero-PO₄ (aerobia) deshidrogenasa 117
 α -Glicero-PO₄ (anaerobia) deshidrogenasa 117
 Glicina 83, 137
 Glicina oxidasa 243
 Glicina reductasa 107
 Glicincarboxilasa 107
 Glicolato 257
 Glicosilación 329
 Glioxilato carboligasa 249
 Glucógeno 46
 Glucógeno basal 52
 Glucólisis anaerobia 74
 Gluconato 66
 D-Glucono- δ -lactona 66
 Glucopéptido 41
 Glucoquinasa 69
 Glucosa 46
 Glucosa-6-fosfato 63
 Glucosa oxidasa 56, 180
 Glucosa-1-P (Éster de Cori) 46
 Glucosa-6-P (Éster de Robinson) 46
 β -Glucosídicos 25
 Glutamato deshidrogenasa 49, 243, 263
 Gottschalk, G. VII, VIII, 102
 Gránulos metacromático 26
 Grasa de las levaduras 52
 Griseofulvina 337
 Grupo corineforme 216
 Grupo entérico 116
 Grupo fisiológico 342
 Grupo hemo 75
 Grupo láctico 74
 Grupo nitro 273, 276
 Grupo nitroso 273, 274
 Guillermond 43

- Gunsalus, I. C. VII, 159
 Gutiérrez 90
H
 H_2O_2 85
 H_4 folato 105
 Halobacterias 317
 membrana 317
Halobacterium, cadena de transporte de electrones 188
 Hammond, R. C. 268
 Hansen 43, 54
 Harden 45
 Harrison, J. S. 52
 Hegeman, G. D. 338
 Heliobacterias 308
 Heterodisulfuro 158
 Heterofermentativas 77
 Hexosa difosfato 78
 Hexosa monofosfato 284
 Hidratos de carbono 20
 Hidrocarburos aromáticos 232
 Hidrogenasa 106, 117, 205–208, 294, 297
 Hidrogenasa citoplasmática 106
 Hidrogenasa ligada a membrana 106
 4-Hidroxi-2-cetovaleato aldolasa 227
 3-Hidroxi-acil CoA deshidrogenasa 220
p-Hidroxibenzoato 231, 232
 oxidación 231
m-Hidroxibenzoato-6-hidroxilasa 228
 4-Hidroxibenzoato-3-monooxigenasa 231
 3-Hidroxibutirato 62
 α -Hidroxioglutarato 221
 Hidroxilamina 275, 276
 Hidroxilamina oxidorreductasa 275
 Hidroxilamina reductasa 277
 ω -Hidroxilasa 218
 Hidroxiprolina 145, 244
 3-Hidroxipropionaldehído deshidrogenasa 131
 Hierro 282, 337
 oxidación 282
 quelación 332
 Higgins, I. J. 268
 Hill 306, 307
 Histidina 136, 243, 244
 oxidación 243
 Histidina amonio-liasa 244
 L-Histidina-amonio-liasa 136, 244
 Homoacetógenas 103
 Homofermentativas 77
 Homofermentativas facultativas 77
 Homofermentativas obligadas 77
 Hongos 329, 333, 337
 HS—CoA 101
 Hugh 74
I
 Idiofase 324
 Imidazolona propionasa 244
 Immendorf 292
 Indol 139
 Ingenhousz 42, 162, 304
 Ingledew, W. J. 131, 189
 Ingraham, J. L. 27, 131
 Inhibición del crecimiento 16
 Inhibición feedback 335
 Inhibidores selectivos 45
 Integración 6
 Intersección entre microbiología y bioquímica 5
 Isocitrato deshidrogenasa 163, 165, 167
 Isocitrato liasa 170, 171
 Isoenzimas 279
 Isoleucina 279
 inhibición de *B. anthracis* 279
 Isopropanol 111
 Isopropanol deshidrogenasa 111
J
 Jeremia L. J. 87
 Jones, D. T. 114
 Jörgenson 43
 Jugo de tomate, medio 75
 Juni 129
K
 Kabler, P. W. 131
 Kandler, O. 159
 Kaplan 179
 Kaseerer 273
 Kaserer 292
 Kéfir 74
 Kellermever, R. V. 94
 Kelly, D. P. 268
 Kjungdahl, L. G. 114
 Kluyver, A. J. VII, 10, 77, 292, 297, 306
 Knowles, R. 199, 268
 Koch 305
 Komasata, Izuka 54
 Kornberg, H. L. 170, 171, 297
 Kurmann, S. A 87
 Kutzing 42
 Kwan, H. S. 199
L
 Lactato 66, 83, 112
 Lactato deshidrogenasa 86, 117
 Lactato deshidrogenasa NADH dependiente 112
 Lactosa 83
 Lascelles 292
 Lavoisier 42, 162, 176

Lebedeff 305
 Leche ácida 74
 Leche agriada 74
 Leifson 74
 Lenhoff 179
 Leucina 279
 inhibición de *B. anthracis* 279
 Levadura 16, 40, 65, 333
 contribución a la bioquímica 42
 Levadura de pan 40
 Levaduras facultativas 43
 Levedev 44
 Liebig 43, 162, 292
 Lípido A 22
 Lípidos 20
 Lípidos de arqueobacterias 154
 Lipmann VI
 Lipoato transacetilasa 100
 Lipoglucanos 24, 25
 Lipopolisacárido (LPS) 21
 Liras, P. 338
 Lisina 139, 336
 Lisina 2,3-aminomutasa 140
 β -Lisina mutasa 140
 Lister 74
 Littleton 74
 Lodder 43
 London 286
 Looder, J. 52
 Lowenstein, J. M. 171
 LPS 27
 LTA 26, 27
 Lubs 121
 Luciferasa 319, 320
 Lundgren 279
 Lungs 307
 Lynen, F. VI
M
 Macrólidos 327
 Madre del vinagre 54
 Magasanik, B. 131
 Malato deshidrogenasa 166, 167
 Malato sintasa 170
 Maleilpiruvato 228
 Malforminas 326
 Mandelato 230
 D-Mandelato 229
 L-Mandelato deshidrogenasa 229
 Mandestam, J. 189
 Manganeso 282, 337
 oxidación del 282
 Manitol 62
 Manten 292
 Martin, J. G. 338
 Mayer, F. 44, 102
 McFadden, B. 268
 McLeod 179
 McQuillen, K. 189
 Mechalas 298
 Medio de levaduras 44
 Medio sintético 16
 Medios de composición química definida 16
 6-Menaquinona 207
 Menaquinona (MQ) 117
 7-Mercaptoetanolitreonina 158
 Mesaconato hidratasa 136
 Metabolismo degradativo de sustratos orgánicos 8
 Metabolismo del nitrito 198
 Metabolismo microbiano 5
 Metabolismo primario 324, 331, 336
 Metabolismo secundario 324
 Metabolitos de reserva 7
 Metabolitos secundarios 7, 324–326, 330–338
 formación 334
 funciones de tipo global 332
 Metano (CH₄) 152, 254
 Metanofurano 156
 Metanorreductosoma 159
 6-Metasalicilato 336
 5,10-Meteniltetrahidrometanopterinciclohidrolasa 155
 Metil aspartato amonio liasa 136
 Metil corrinoide 104
 Metil malonil-CoA 221
 Metil-coenzima M 156
 Metil-CoM metilreductasa 157, 158
 Metileno-H₄MPT 155
 β -Metilglutaconil-CoA 108
 Metil-H₄F-hidrolasa 107
 Metilmalonil-CoA 91
 Metilmalonil-CoA-piruvato transcarboxilasa 91
 Metilmercaptano 142
 Metilreductasa 157, 158
 Metiltransferasa 104, 106
 Metionina 141, 337
 Método de fijación de Neuberg 45
 Método de Lineweaver-Burk 33
 Método de Orleans 54
 Metomicina 334, 335
 Mickelson 131
 Micoderma 54
 Microaerófilos 75
 Microbios en cultivo puro V
 Microorganismo, concepto 6
 Microorganismos productores de ácido propiónico 91

Minckman 297
 Mitocondrias 185
 Mixotrofia 296
 Mohos 334
 Moléculas complejas en la pared celular 20
 Moléculas inorgánicas 19
 Moles de NADH 48
 Molist 305
 Mollicutes (micoplasmas) 21
 Monod, J. 32, 33, 36
 Monooxigenasas 177, 178, 224
 Monóxido de carbono, oxidación 297
 Monóxido de carbono deshidrogenasa 104
 Monóxido de carbono oxidasa 278
 Morrell, J. C. 268
 mRNA 19
cis,cis-Muconato 233
 Mureína 21, 27
 Mutantes clorato resistentes 198
 Mutantes superproductores 337
Mycobacterium phlei, cadena de transporte de electrones 185
N
 NAD deshidrogenasa 117
 NAD⁺ 66, 100
 NADH + H⁺ 78
 NADP⁺ 69
 NADPH 63, 64
 NADPH + H⁺ 66
 NADPH-citocromo *P*₄₅₀ reductasa 222
 Naftaleno 231
 oxidación 231
 Neidhardt, F. C. 27, 131
 Nelson 44
 Neuberg 47
 Neurotoxina 338
 Nicotinamida adenindinucleótido 182
 Niklewski 292
 Nitrato 273, 276, 277
 reducción asimiladora 192
 reducción desasimiladora 294
 respiración 192
 Nitrato como aceptor final de electrones 116
 Nitrato de uranilo 52
 Nitrato reductasa 117
 Nitrificación 274
 Nitrito 275, 276, 277
 Nitrito oxidasa 276, 277
 Nitrito reductasa 277
 Nitro, grupo 273
 Nitrobacteriáceas 274
 Nitrogenasa 313

Nitroxilo 275
 Nojirimicina 330
 Nöllner 90
 Núcleo 22
 Núcleo de la guanidina 127
 Número de células 30
 Número de generaciones 30
 Número de generaciones por unidad de tiempo 31
 Número total de polipéptidos 19
O
 Obtención del poder reductor por las bacterias quimiolitotrofas 278
 Odom 204
 Omeliansky 279
 Organismos eucariotas 40
 Organismos filamentosos 333
 Organismos unicelulares 333
 Origen filogenético del CAT 164
 Orla-Jensen 90, 292, 344
 Orleans 54
 Ornitina 141
 Ornitina-carbamoyl-transferasa 135
 Orto-ruptura 231
 Oxalacetato descarboxilasa 86
 Oxalato descarboxilasa 298
 4-Oxalocrotonato descarboxilasa 227
 4-Oxalocrotonato tautomerasa 227
 Oxamato carbamyltransferasa 298
 α -Oxidación 218
 β -Oxidación 219
 Oxidación a piruvato 63
 Oxidación a ω -hidroxiácidos 221
 Oxidación biterminal 217
 Oxidación de alcoholes primarios 61
 Oxidación de azúcares 63
 Oxidación de compuestos inorgánicos 8, 272
 Oxidación de compuestos reducidos de azufre 285
 Oxidación del ácido láctico 63
 Oxidación del ácido pirúvico 63
 Oxidación de polialcoholes 62
 Oxidación del amoníaco a nitrito 275
 Oxidación del etanol 60
 Oxidación del etanol en *Acetobacter* 61
 Oxidación del etanol en *Gluconobacter* 61
 Oxidación del gliceraldehído-3-P 47
 Oxidación del nitrito a nitrato 277
 Oxidación del sorbitol a sorbosa 63
 Oxidación del triptófano 245, 247
 Oxidación directa a acetato 63
 Oxidación monoterminal 217
 Oxidación subterminal 217
 Oxidasas 178

Oxigenasas 177
 Oxígeno necesario 16
 3-Oxoadipato 234
 2-Oxoglutarato sintasa 258
P
 Palmítico 20
 Palmitoleico 20
 PAPS 207
Paracoccus denitrificans, oxidación del H₂ 297
 Parentesco entre todos los seres vivos 11
 Pares, R. VIII
 Pasteur 43, 47, 49, 54, 74, 96, 216
 Pasteureláceas 119
 Patrón de fermentación 121
 Peck, H. D. 211, 204
 Penicilina 325, 327, 335, 336, 337
 Pentosa fosfocetolasa 66
 Pepinillos 74
 Peptidasas 242
 Peptidoglicano 21
 Peroxidasa 85
 Peroxidasa 178
 Persson 54
 Pfennig 208
 Pickett 50
 Piéchaud 198
 Pigmentos 25, 308, 331, 338
 Piocianina 25
 Piridoxamina 251, 252
 Piridoxina 251, 252
 Piridoxina-5-deshidrogenasa 251
 Piridoxina-4-oxidasa 251
 Pirimidinas 66
 Pirocatecasa 177
 Pirofosfatasa 219
 Pirofosfato de tiamina ((OH) TPP) 85
 Δ^1 -Pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato 244
 Piruvato 46, 64
 Piruvato carboxilasa 169
 Piruvato descarboxilasa 63
 Piruvato deshidrogenasa 99
 Piruvato fosfotransferasa 93
 Piruvato sintasa 258
 Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa 100, 105
 Piruvato-formiato liasa 100
 Plásmidos 295
 Plastocianina 315, 316
 Plastoquinona 315, 316, 317
 Poli- β -hidroxibutirato 280
 Poliacetilenos 327
 Policétidos 327
 Polienos 327
 γ -Poli-D-glutamato 338
 Polimetáfosfato 26
 Polisacáridos 338
 Polisacáridos extracelulares 20, 324, 338
 Poole, R. K. 131, 189
 Portadores de C₁ del tetrahidrofolato 104
 Prévot 90
 Priestley, John 42, 304
 Proceso anaerobio 43
 Prodiginas 329
 Prodigiosina 25
 Producción de acetato, efecto de la concentración de etanol 58
 Producción de acetato 98
 por *Acetobacter* 57
 por *Gluconobacter* 57
 Producción de acetona 111
 Producción de biomasa 16
 Producción de butanol 111
 por fermentación 96
 Producción de pigmentos 324
 Producción de succinato 112
 Producción de sustancias ópticamente activas 49
 Productos finales 6, 344
 de la fermentación de la glucosa 118
 por bacterias del ácido butírico 97
 por diferentes bacterias entéricas 122
 Promotores del crecimiento 325
 1,2-Propanodiol 62
 Propionato, acetato y CO₂
 formación 93
 Propionil-CoA 220
 Proskauer 121
 Proteasas 242
 Proteína azufre 316
 Proteína corrinoide 104
 Proteína hierro 316
 Proteínas 19
 Proteolíticos 97
 Protocatecuato 224–226, 228, 232, 233, 234
 Protocatecuato 4,5-oxigenasa 227
 Prueba de la bencidina 178
 Pseudocatalasas 75, 178
 Pseudomonas 297
 Purinas y pirimidinas, oxidación 249
Q
 Quastel 192
 Quayle, J. R. 268
 Quesos 74
 Quimiolitotrofismo 272
 Quimiolitotrofos 274, 278
 Quimiostato 34

Quinato 232
 Quinona Q₁₀ 64
 Quinonas 64, 182
 Quinoproteína metanol deshidrogenasa 264
 Quinurenato 7,8-hidroxilasa 246
 L-Quinurenina 246
 Quitina 41
R
 Racemasa 229
 Racemasas exógenas 74
 Radical superóxido O₂⁻ 179
 Raistrick 325, 326
 Rasic 87
 Ratledge, C. 240
 Reacción de Hill 306
 Reacción de la acetoína sintasa 84
 Reacción de la alcohol deshidrogenasa 56
 Reacción de la desoxirribosafosfato aldolasa 84
 Reacción de la serina hidroximetil transferasa 84
 Reacción de Stickland 142
 mecanismo 144
 Reacción de Swick 91
 Reacción de Swick-Wood 93
 Reacción de Voges-Proskauer 127
 Reacción de Wood 91
 Reacción de Wood-Werkman 93, 169
 Reacción del gas detonante 292
 Reacción fosforoclástica 110
 Reacción oxidásica 178
 Reacciones acopladas por un coenzima común 10
 Reacciones anapleróticas 164, 168
 Reacciones puramente degradativas 7
 Reaveley, D. A. 27
 Redetzki 56
 Reducción de CH₃—S—CoM 159
 Reducción de la prolina 145
 Reducción del acetaldehído 47
 Reducción del ácido pirúvico 78
 Reducción del dióxido de carbono 155
 Reducción del NAD⁺ 56
 Reductores de sulfato 202, 239
 Regulación metabólica 9, 44
 Relación CO₂/H₂ 121
 Reoxidación 48
 Reoxidación del NADH 47, 48
 Reoxidación del NADPH 63
 Represión “feedback” 336
 Reservas energéticas 20
 Resorcinol 236, 237, 238
 Respiración aerobia 176
 Respiración anaerobia 198
 Respiración con fumarato 116
 Respiración del nitrato 197
 Respiración del nitrato, bacterias facultativas 195
 Reticulol 330
 Retinal 318, 319
 Ribitol 23
 Ribosa-5-P 66
 Ribulosa-1,5-difosfato 255, 257
 Ribulosa difosfato carboxilasa 103, 254, 285, 295
 Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa 257, 258
 Ribulosa-5-fosfato 63, 255
 Ribulosa-5-P 64, 66
 Rittenberg, S. C. 280, 286, 298
 RNA 19
 RNA estable 19
 RNA total 20
 RNAsa 19
 Rodonasa 208, 287, 288
 Rodospiriláceas 307, 308, 311, 313
 Rogosa 90
 Rogosa, medio 75
 Rojo de metilo 116
 Rose, A. H. 43, 52
 Roturas del enlace 47
 Rouvière, P. E. 159
 rRNA 19
 Ruhland 292
 Ruptura fosforoclástica del piruvato 100
 Rusticianina 284
S
 Sangivamicina 330
 Saussure 42, 304, 305
 Saw 90
 Schaechter, M. 27, 131
 Schardinger 96
 Scheele 74
 Schlegel, H. G. 299
 Schwann 42
 Schwartz, E. 299
 Scott, D. 268
 Sedoheptulosa-7-P 66
 Semialdehído del ácido 2-hidroximucónico deshidrogenasa 227
 Semialdehído tartrónico 248
 Senebier 42, 162, 304
 Serina 138
 Serina deshidratasa 107, 138
 Serina hidroximetiltransferasa 138
 Serina-glioxalato aminotransferasa 249
 SH₂ 311
 Sharpe, M. Elisabeth 87
 Shelman 90
 Sideróforos 330

Síntesis asimétrica 49
 Síntesis de un enzima
 inhibición 9
 represión 9
 Siquimato 232
 Sirohemo 210
 Sistema de la α -cetoglutarato deshidrogenasa 49
 Sistema altamente heterogéneo 10
 Sistema de células enteras no proliferante 44
 Sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 63
 Sistema de la glucosa-6-P-deshidrogenasa 66
 Sistema de las fosfocetolasas 69, 70
 Sistema de volumen constante 34
 Sistema terminal de oxidación 163
 Sistemas de células enteras 44
 Sistemas de flujo continuo 16
 Sistemas dependientes del tetrahidrofolato 107
 Sistemas libres de células 44
 Sistemas suministradores de energía 8
 Skatrud 338
 Smiley 131
 Smith 121
 Sobolov 131
 Sokatch, J. R. 27
 Sorbitol 62
 Sorbosa 55, 62
 Spain, J. C. 240
 Stanier, Roger Y. VII
 Starky 285
 Stewart, U. 199
 Stjernholm, R. 94
 Strohl, W. R. 280
 Subtilisina 242
 Subunidades 7
 Succinato 91, 93, 112
 Succinato deshidrogenasa 117, 166
 Sulfato 285
 reducción 285
 reducción con lactato 204
 reducción con hidrógeno 205
 Sulfhídrico
 oxidación 285
 utilización 308
 Sulfito 207, 208
 oxidación 287
 reducción 207, 208
 reducción asimiladora 207
 Sulfito oxidasa 287, 288
 Sulfito reductasa 207
 Sulfuro, oxidación 286
 Sulfuro oxidasa 286, 288
 Suministro energético 7
 Superóxido dismutasa 179
 Surfactina 330
 Sustrato 6
 Sustrato orgánico 16
 Sustratos utilizables 91
 Swick, R. W. 94
 Swings, J. 72
 T
 Tampones 17
 Taner 44
 Tartrato deshidrasa 87
 Tauber, M. 87
 Taylor 129, 238
 Tempest, P. W. 36
 Tensioactivos 330
 Teoría de la diversidad bacteriana 344
 Teoría del cultivo 344
 Teoría quimiosmótica 188
 Teoría vitalista 43
 Test de la oxidasa 185
 Tetraéteres 154
 Tetrahidrofolato 136
 Tetrahidrometanopterina formiltransferasa 155
 Tetrahidrometanopterina (H₄MPT) 155, 156
 Tetrapéptido 21
 Tetrationato 287, 288
 Thauer 106
 Tiempo de generación *g* 31, 32
 Tiempo necesario para la duplicación de la población 32
 Tilacoides 315
 Tiobacilos 285
 crecimiento 285
 β -Tiolasa 220
 Tiorredoxina 222
 Tiosulfato 285
 oxidación 285, 287
 Tiosulfato reductasa 208
 Tipo cultural 342, 343
 Tipo entérico 78
 Tipos diferentes de moléculas de glucógeno 52
 Toluato 232
 Tolueno 230
 Toxinas 325, 338
 TPP 99, 105
 Transcetolasa 66
 Transferencia de grupos fosfato 47
 Transferencias de H⁺ 47
 Transformaciones de la ribulosa-5-P 67
 Transhidroximetilasa 107
 Transportadores de electrones 205
 Transporte activo 33
 Transporte de translocación de grupo 33

Treonina 83, 138, 248, 279
 inhibición de *E. coli* 279
 oxidación 248
 Treonina-deshidratasa 138
 Trifosfato de adenosina (ATP) 8
 Triosas 78
 Triptofanasa 139
 L-Triptófano 246
 Triptófano 139
 Triptófano racemasa 247
 tRNA 19
 Trofofase 324, 338
 Tsuji 204
 Tuovinen, O. H. 280
 Turbidostato 36
U
 Ubiquinol oxidasa 196
 Ubiquinona (Q) 117, 310
 Ubiquinona-hierro, complejo 310, 311
 UDP-glucosa 71
 UDP-glucosa pirofosforilasa 71
 Umbarger, H. E. 131
 Umbreit 279
 Unidad de esquema de organización 11
 Unidad de la actividad química del cultivo puro 343
 Uracilo 250
 Uratooxidasa 249
 Ureasa inducible 296
 Ureidoglicolato liasa 250
 Urocanasa 244
 Urocanato hidratasa 136
 Utilización del gluconato 69
 Utilización industrial de las bacterias del ácido butírico 96
V
cis-Vaccénico 20
 Valina 279
 inhibición de *B. anthracis* 279
 inhibición de *E. coli* 279
 Valinomicina 327
 Van der Drift, C. 149
 Van Leewenhoek, A. 42
 Van Niel, C. B. VII, 10, 50, 90, 306
 Vanilato 232
 Velocidad de crecimiento 31
 Velocidad de dilución 34
 Velocidad de multiplicación (*R*) 31
 Velocidad específica de multiplicación μ 31, 34
 Velocidad específica máxima de crecimiento 33
 Verhoeven 297
 Verjan 204
 Vía de Embden-Meyerhof 47, 64–66, 74, 77, 78, 94, 110, 119, 255, 280
 Vía de Entner-Doudoroff 64, 65, 284, 286, 295
 Vía de la hexosa monofosfato 78
 mineralización de la glucosa 68
 Vía de la pentosa 66, 78, 256
 Vía de la pentosa fosfato 78, 264
 Vía de la ribulosa fosfato 260, 265
 Vía de la serina 265, 266, 267
 Vía de las triosas 45
 Vía de los corrinoides. Ver vía de Wood
 Vía de Warburg-Dickens 50, 66, 69, 119
 Vía de Wood 103, 104, 205
 Vía del ácido glioxílico 112, 207
 Vía del acrilato 94
 Vía del glioxilato 168
 Vía del hidroxipropionato 313
 Vías biosintéticas secundarias 338
 Vía del 6-P-gluconato 65
 Vías metabólicas 6
 Vibrionáceas 119
 Vida anaerobia 43
 Vinagre 54
 Vining, L. C. 338
 Violaceína 25
 Virtanen 90
 Virulencia 333
 Vitamina B₆ 251, 255
 Vogels, G. S. 149
 Voges 121
 Voges-Proskauer 116
 Voisenet 131
 Volumen del cultivo 17
 Volutina 26
 Von Mayer 304
W
 Warburg 305, 307
 Warburg-Dicken 78
 Weizmann 96
 Werkman 131
 Whitton, B. A. 320
 Wieringa 101
 Wilson 292
 Winogradsky VI, 96, 272–274, 278–280, 282, 286, 292, 305, 342
 Wöhler 43
 Wolfe, R. S. 159
 Wood, H. G. 94, 106
 Woods, D. R. 114, 292
 Wurtz 96, 121
X
 X-5-P 78
 Xantina oxidasa 180
 2,4-Xilenol 231, 232

Xilulosa 83
Xilulosa-5-P 66
Y
Yagui 204
Yogur 74
Young 45

Z
Zearaleonas 330
Zinc 337
Zuckerpilz 42

ÍNDICE ALFABÉTICO DE MICROORGANISMOS CITADOS

A

Acetoanaerobium noterae 104
Acetobacter 55–58, 60, 63, 64, 71
Acetobacter aceti 58, 59, 71
Acetobacter aceti ssp. *xylinum* 69, 71
Acetobacter mesoxydans 71
Acetobacter paradoxum 71
Acetobacter pasteurianum 71, 185
Acetobacter peroxydans 55, 60, 71
Acetobacter rancens 71
Acetobacter xylinum 71, 102
Acetobacterium carbinolicum 104
Acetobacterium wieringae 104
Acetobacterium woodii 104, 239
Acetogenium kivui 104
Achromobacter 193
Acidomonas methanolica 263
Acinetobacter 233, 234
Acinetobacter calcoaceticus 231
Actinomyces 78
Actinomyces antibioticus 24
Actinomyces streptomicini 24
Aerococcus 75, 77
Aeromonas hydrophila 124, 127, 129
Alcaligenes 193, 194
Alcaligenes denitrificans 294
Alcaligenes eutrophus 193, 231, 257, 293–297
Alcaligenes hydrogenophilus 295
Alcaligenes latus 293
Alcaligenes paradoxus 293
Amycolatopsis methanolica 264
Anguilula aceti 54

Arthrobacter 248

Arthrobacter alantoicus 250

Arthrobacter spp. *cepa* 11/X 293

Azospirillum brasilense 193

Azospirillum lipofermentum 293

Azospirillum lipoferum 296

Azotobacter 177, 187

Azotobacter agilis 166

Azotobacter vinelandii 231

B

Bacillus 26, 77, 119, 128, 185, 186, 192, 194, 337

Bacillus amarae (B. *polymixa*) 131

Bacillus anthracis 279, 338

Bacillus brevis 334

Bacillus cereus 247

Bacillus coli 121

Bacillus licheniformis 193, 194

Bacillus macerans 96, 100, 111, 112, 119

Bacillus methanolicus 264

Bacillus pantotrophus 292

Bacillus polymyxa 119, 127, 129

Bacillus pycnoticus 292

Bacillus schlegelii 293

Bacillus subtilis 24, 127, 129, 185, 242, 249, 330, 337, 338

Bacterium formoxidans 257

Bacteroides 93, 194

Beauveria 330

Beggiatoa 272, 286

Beneckea 116

Beneckea alginolytica 127

Bifidobacterium 69, 77–79, 99, 102

Brevibacterium 217

Brucella suis 16
Butyribacterium methylophilum 104
Butyribacterium rettgeri 77, 97, 102, 112

C

Caulobacter 177
Cephalosporium acremonium 332, 337
Chlorobium 313
Chlorobium thiosulfatophilum 164, 258
Chloroflexus 311, 313
Chromatium 167, 259
Chromobacterium 194
Citrobacter freundii 130, 131
Claviceps 337
Clostridium 20, 26, 96, 97, 100, 149, 192
Clostridium acetatum 101, 104
Clostridium acetobutylicum 74, 96, 97, 110
Clostridium acidurici 100, 124, 102, 119,
Clostridium aminobutyricum 145, 146
Clostridium botulinum 97, 111, 134, 136, 141, 143
Clostridium cochlearium 143
Clostridium formicoaceticum 104, 106
Clostridium kluyveri 108, 112
Clostridium magnum 104
Clostridium oroticum 147
Clostridium pasteurianum 96, 138
Clostridium perfringens 77, 78, 97, 111, 112, 134, 143
Clostridium propionicum 90, 93, 94, 138, 143, 145
Clostridium saccharobutyricum 143
Clostridium sporogenes 134, 139, 143
Clostridium sticklandii 139, 141, 143
Clostridium tetani 134, 143
Clostridium tetanomorphum 135, 136, 143
Clostridium thermoaceticum 102–104, 106, 124
Clostridium thermoautotrophicum 104
Clostridium tyrobutyricum 97
Coprococcus 239
Corynebacterium 194, 217, 218
Cremoris 83

D

Derxia gummosa 293
Desulfobacter 203
Desulfobacter postgatei 203, 208, 209, 210
Desulfobulbus 203
Desulfobulbus propionicus 203
Desulfococcus 203
Desulfococcus multivorans 210
Desulfonema 203
Desulfonema limicola 210
Desulfonema magnum 203, 239
Desulfosarcina 203
Desulfosarcina varibilis 203
Desulfotomaculum 195, 202, 208

Desulfotomaculum acetoxidans 203
Desulfotomaculum nigrificans 209
Desulfotomaculum orientis 104
Desulfovibrio 100, 202, 203, 205, 206, 208, 210
Desulfovibrio africanus 202, 206
Desulfovibrio baarsii 104
Desulfovibrio baculatus 210
Desulfovibrio desulfuricans 202, 204, 205, 206, 210, 298
Desulfovibrio gigas 202, 204, 206
Desulfovibrio nigrificans 202
Desulfovibrio orientis 202
Desulfovibrio ruminis 202
Desulfovibrio salexigens 202
Desulfovibrio saporovorans 203, 210
Desulfovibrio vulgaris 202, 204, 205, 206, 210
Desulfuromonas 208
Desulfuromonas acetoxidans 203
Diplococcus glycinophilus 137

E

Enterobacter 117, 125, 127
Enterobacter aerogenes 118, 126, 129, 130, 131, 185
Enterobacter indologenes 118
Erwinia 116
Erwinia amylovora 122
Erwinia carotovora 118, 122, 127
Erwinia herbicola 127
Escherichia aurea 118, 122
Escherichia coli 16, 18–22, 33, 43, 99, 100, 118–120, 122,
125, 130, 143, 166, 167, 185, 221, 250, 279
Eubacterium limosum 97, 104
Eubacterium oxidoreducens 239

F

Ferrobacillus ferrooxidans. Ver *Thiobacillus ferrooxidans*
Flavobacterium 194, 247
Fusarium 330
Fusobacterium 134
Fusobacterium nucleatum 143

G

Gallionella 282
Gibberella fujiluri 336
Gluconobacter 55–58, 60–64, 71
Gluconobacter oxydans 60, 63
Gluconobacter oxydans ssp. *melanogenes* 64
Gluconobacter oxydans ssp. *suboxydans* 66, 69
Gluconobacter suboxydans 185

H

Haemophilus influenzae 338
Halobacterium 188, 194, 317, 318
Halobacterium salinarum 136
Heliobacterium 308
Hydrogenomonas 292, 293
Hydrogenomonas eutrophus 193

Hydrogenomonas flava 292
Hydrogenomonas vitrea 292
Hyphomicrobium 194
K
Klebsiella 127
Klebsiella edwarsii var *atlantae* 116
Klebsiella pneumoniae 121
Klebsiella rhinoscleromatis 121
L
Lactobacillus 75, 77, 167
Lactobacillus arabinosus 17
Lactobacillus brevis 82, 87
Lactobacillus buchneri 79
Lactobacillus casei 24
Lactobacillus plantarum 82, 83, 86, 87
Leptothrix 272
Leptothrix ochracea 282
Leuconostoc 75, 77, 78
Leuconostoc mesenteroides 86
M
Megasphaera elsdenii 90, 93, 94
Metanococcus 153
Methanobacillus omelianskii 152
Methanobacterium 153
Methanobacterium formicicum 153
Methanobacterium propionicum 153
Methanobacterium suboxidans 153
Methanobacterium thermoautotrophicum 158
Methanobrevibacter smithii 239
Methanobrevibacter 153
Methanosarcina 153
Methanosarcina barkeri 159, 239
Methanospirillum 153
Methylobacillus fructooxidans
Methylobacillus glycogenes 262
Methylobacillus glucoseoxidans 262
Methylobacter 163, 260, 265
Methylobacterium 263
Methylocistis 260, 266
Methylococcus 163, 260, 265
Methylococcus capsulatus 266
Methylomonas 163, 260, 263, 265
Methylophaga marina 262
Methylophaga thalassica 262
Methylophilus methylotrophus 262
Methylosinus 260, 266
Methylovorus glucosostrophus 262
Micoderma aceti 54
Micoderma vini 54
Microbacterium 77
Micrococcus 134, 147
Micrococcus anaerobius 137
Micrococcus luteus 166, 185
Micrococcus lysodeikticus 185
Micrococcus variabilis 137
Micrococcus sp. 167
Moraxella 194
Mycobacterium 216, 250, 251
Mycobacterium gordonae 293
Mycobacterium phlei 185
Mycoplasma 135
N
Neisseria 127, 194
Nitrobacter 263, 274, 276, 277
Nitrobacter agilis 277, 280
Nitrobacter winogradskyi 276, 280
Nitrococcus 274
Nitrosococcus 274
Nitrosococcus oceanus 280
Nitrosolobus 274
Nitrosolobus multiformis 280
Nitrosomonas 274
Nitrosomonas europaea 274
Nitrospira 274
Nitrospina 274
Nitrospira 274
Nocardia 216
Nocardia autotrophica 293
Nocardia opaca 293, 294
P
Paracoccus 194, 263
Paracoccus denitrificans 192–195, 293–297
Pediococcus 75, 77
Pelobacter 239
Pelobacter acidigallici 239
Penicillium chrysogenum 336, 337
Penicillium griseofulvum 337
Penicillium patulum 337
Penicillium urticae 333
Pentococcus activus 143
Pentococcus aerogenes 143
Pentococcus anaerobius 143
Pentococcus asaccharolyticus 143
Pentococcus glycinophilus 143
Pentococcus prevotii 143
Pentococcus variabilis 143
Peptococcus aerogenes 139, 147
Peptococcus anaerobius 137
Peptostreptococcus productus 104
Photobacterium 319
Photobacterium phosphoreum 127
Propionibacterium 78, 90, 194
Proteus 134
Proteus rettgeri 125

- Proteus vulgaris* 141, 185
Prototheca zophii 50
Pseudomonas 55–57, 60, 63, 177, 179, 194, 216, 222, 224, 231, 234, 236, 238, 247–249, 251, 267, 293, 307
Pseudomonas acidovorans 185, 227–229, 250
Pseudomonas aeruginosa 184, 185, 193, 217, 249, 330
Pseudomonas arvilla 227
Pseudomonas convexa 244
Pseudomonas desmolytica 227
Pseudomonas facilis 293, 296
Pseudomonas flava 293
Pseudomonas fluorescens 136, 166, 179, 193, 338
Pseudomonas maltophilia 185
Pseudomonas oleovorans 218
Pseudomonas oxalaticus 248
Pseudomonas putida 185, 227, 231, 244
Pseudomonas saccharophila 293
Pseudomonas stutzeri 193
Pseudomonas testosteroni 227, 228
Pseudomonas thermophila 293
R
Rhizobium japonicum 293, 296
Rhodopseudomonas 263, 313
Rhodopseudomonas palustris 237, 257, 258
Rhodopseudomonas sphaeroides 194, 313
Rhodospirillaceae 237
Rhodospirillum 313
Rhodospirillum rubrum 257, 258, 259, 313
Ruminococcus flavofaciens 93
S
Saccharomyces 42
Saccharomyces cerevisiae 17, 40, 42, 50
Saccharopolyspora erythraea 328
Salmonella 21, 23
Salmonella typhi 125
Sarcina 119
Sarcina maxima 97, 119
Serratia 127
Serratia kiliensis 118, 122, 126
Serratia marcescens 16, 118, 125, 166
Serratia plymuthica 118, 122
Shigella 125
Shigella dysenteriae 338
Sphaerotilus 282
Spirillum 224
Spirogyra 304
Sporomusa acidovorans 104
Staphylococcus aureus 19
Streptococcus 75, 77, 134
Streptococcus allantoicus 149, 250
Streptococcus faecalis 17
Streptococcus lactis 24, 74, 83
Streptomyces 247
Streptomyces antibioticus 337
Streptomyces avermitilis 328, 330
Streptomyces gryseus 332
Succinomonas amylolytica 93
Sulfolobus 285
Syntrophococcus sucromutans 239
T
Thermodesulfobacterium 203
Thiobacillus 263, 285
Thiobacillus denitrificans 193, 194, 208, 285, 288, 289
Thiobacillus ferrooxidans 282, 283, 284
Thiobacillus intermedius 257, 285, 286, 292
Thiobacillus neapolitanus 279
Thiobacillus novellus 285, 286, 292
Thiobacillus thiooxidans 279, 288, 285
Thiomicrospira 285
Thiothrix 286
V
Veillonella 90
Vibrio 319
Vibrio cholerae 338
Vibrio fischeri 330
Vibrio succinogenes 194
X
Xanthobacter autotrophicus 263, 293, 296
Xanthomonas 194
Z
Zymomonas mobilis 45, 64, 65

***ASPECTOS COMPARATIVOS
DE DIFERENTES VÍAS METABÓLICAS
Y DE DIFERENTES GRUPOS
FISIOLÓGICOS MICROBIANOS***

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

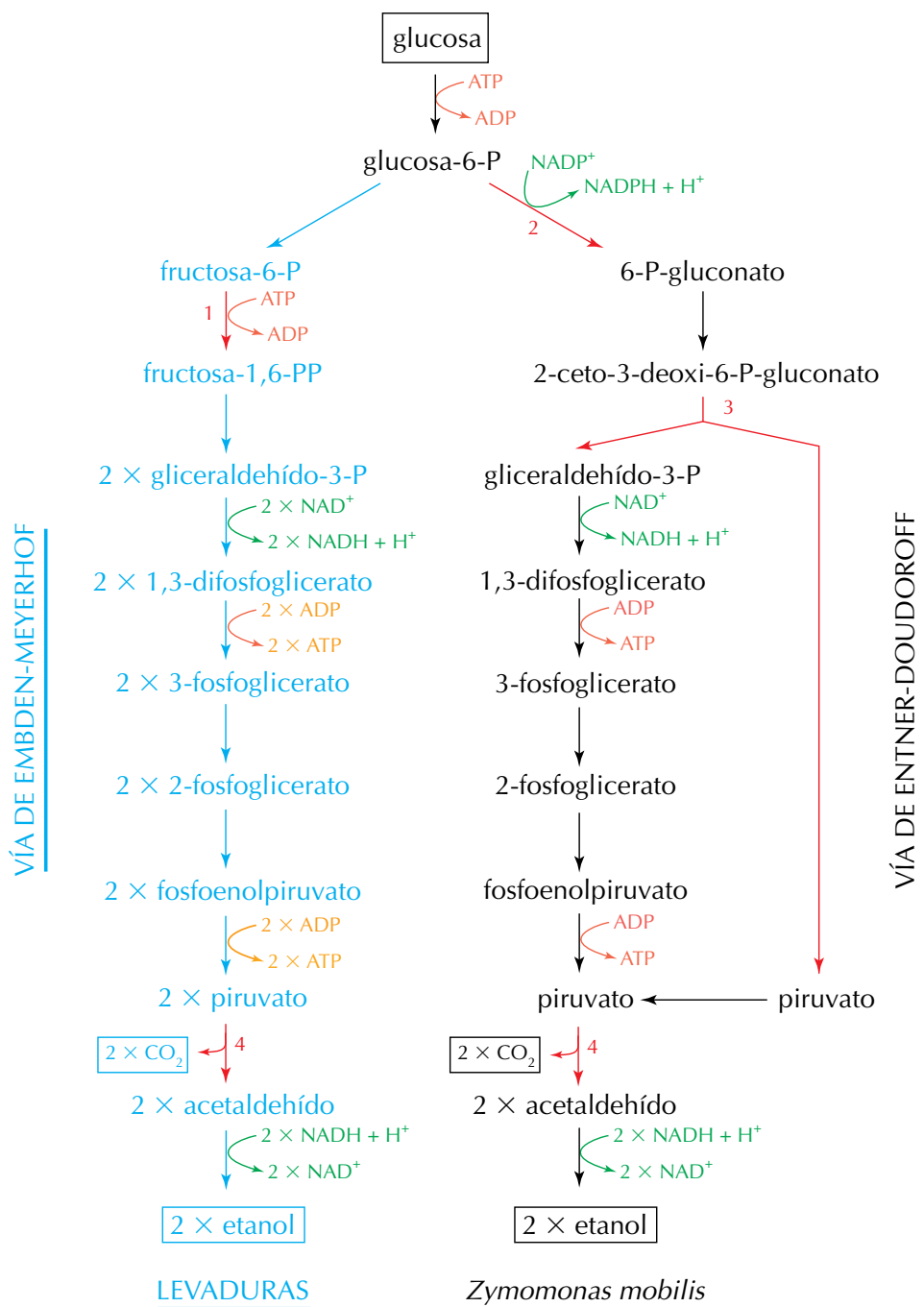


Lámina 1 Estrategias microbianas de fermentación alcohólica. A la izquierda (en azul) se representa la vía metabólica de las levaduras. A la derecha (en negro) la vía metabólica de *Z. mobilis*. En rojo se indican las reacciones catalizadas por los enzimas clave de cada una de las vías: 1, fosfofructoquinasa; 2, glucosa-6-P deshidrogenasa; 3, aldolasa; 4, piruvato descarboxilasa.

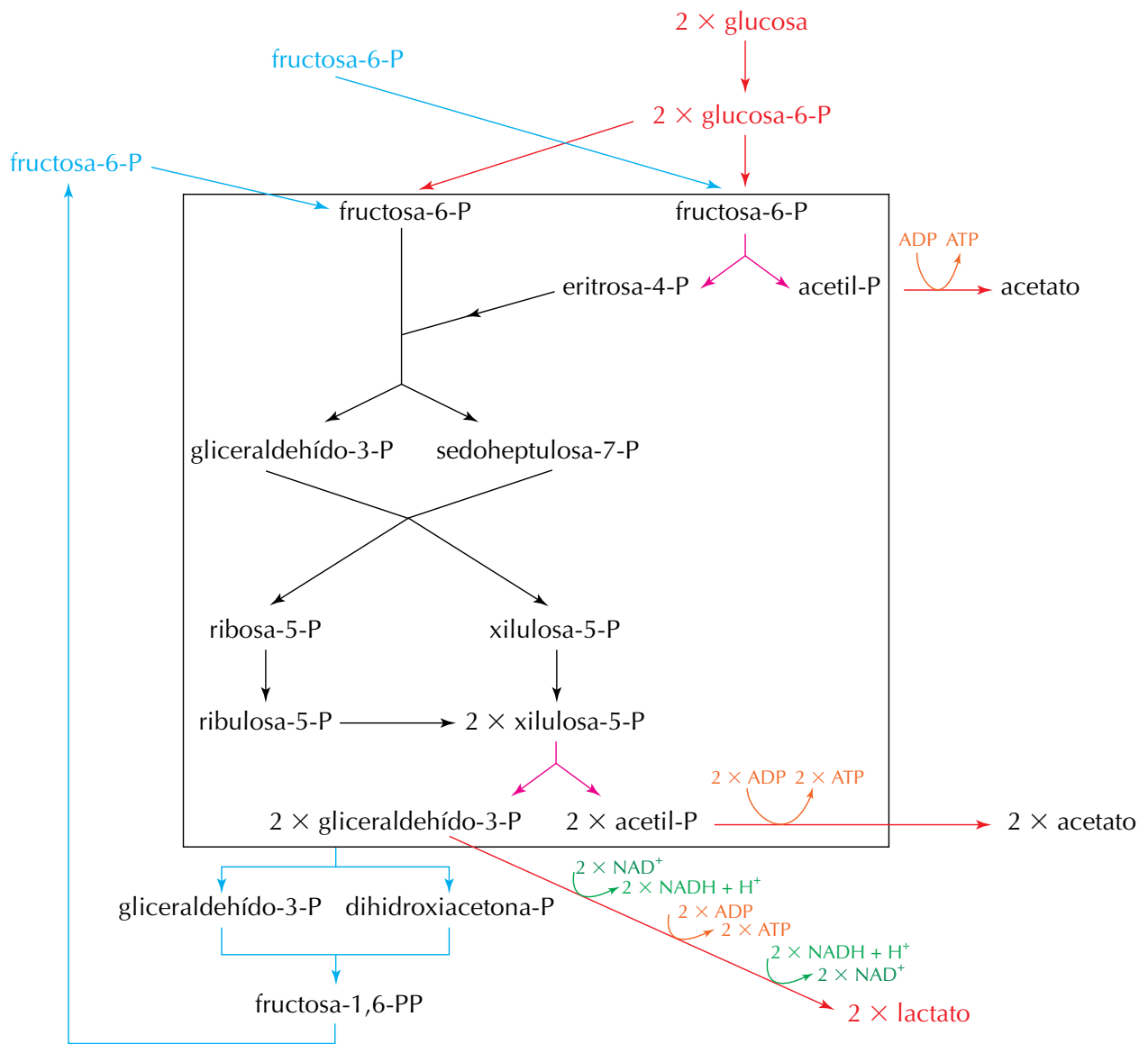


Lámina 2 Sistema de las fosfoacetolasas en *Acetobacter* y *Bifidobacterium*. En azul y rojo se indican las reacciones específicas de *Acetobacter* y *Bifidobacterium* respectivamente. El recuadro negro incluye las reacciones comunes (en púrpura las catalizadas por las fosfoacetolasas). El sistema de *Acetobacter*, aerobio, convierte una molécula de fructosa-6-P en tres de acetato. El de *Bifidobacterium*, anaerobio, convierte dos moléculas de glucosa en tres de acetato y dos de lactato.

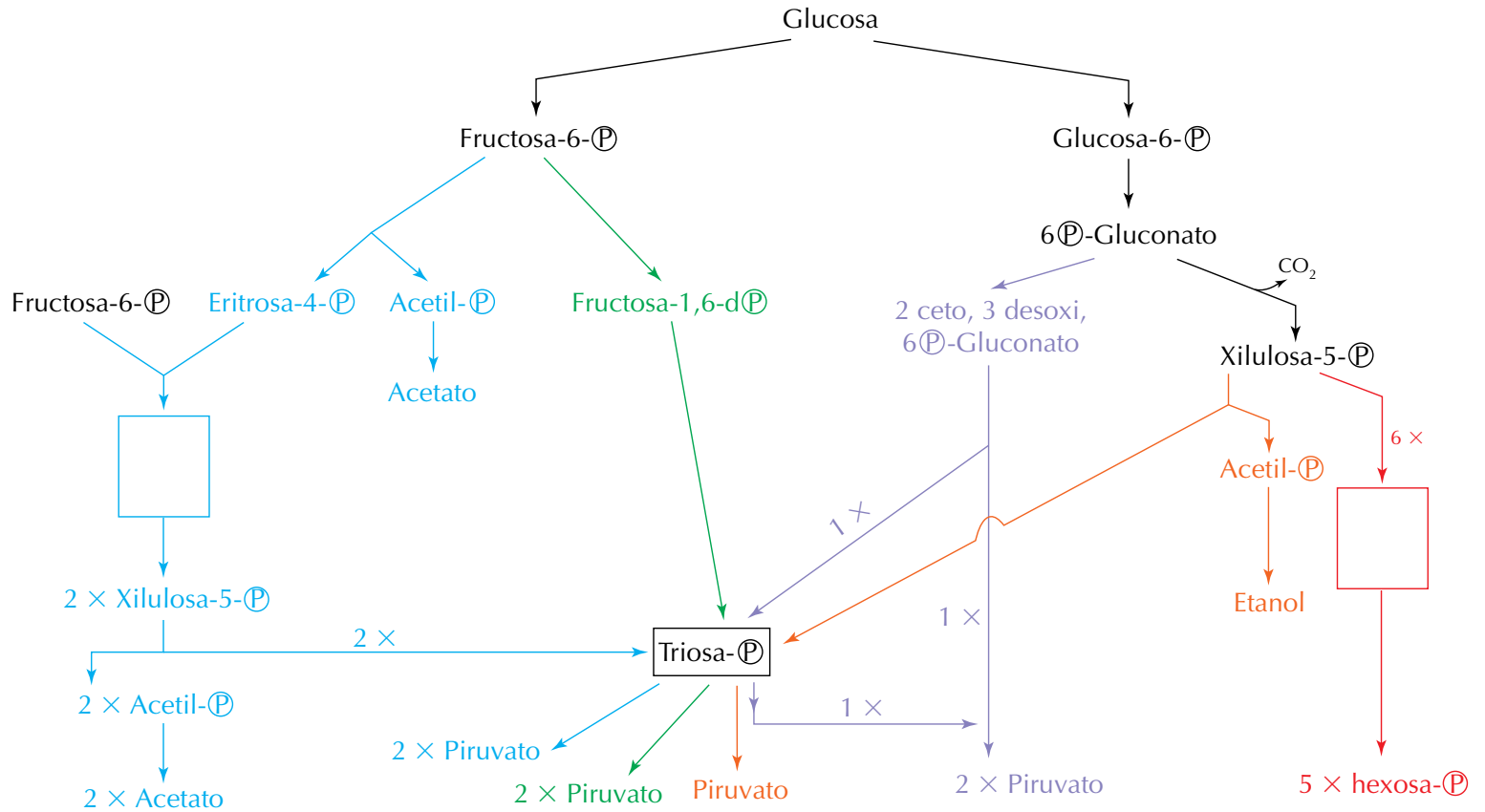


Lámina 3 Estrategias microbianas de degradación de la glucosa. En verde, la vía de Embden-Meyerhof. En violeta, vía de Entner-Doudoroff. En rojo, vía de Warburg-Dickens (también conocida como vía de la pentosa fosfato o de la hexosa monofosfato). En anaranjado, vía de la pentosa. En azul, vía de *Bifidobacterium*. Las cajas representan reacciones catalizadas por aldolasas y transcetolasas. Nótese la importancia de las triosas fosfato y del piruvato como intermediarios en la degradación. De hecho, de todas las alternativas posibles, la vía de Warburg-Dickens es la única que no implica necesariamente la formación de piruvato para la mineralización completa de una molécula de glucosa.

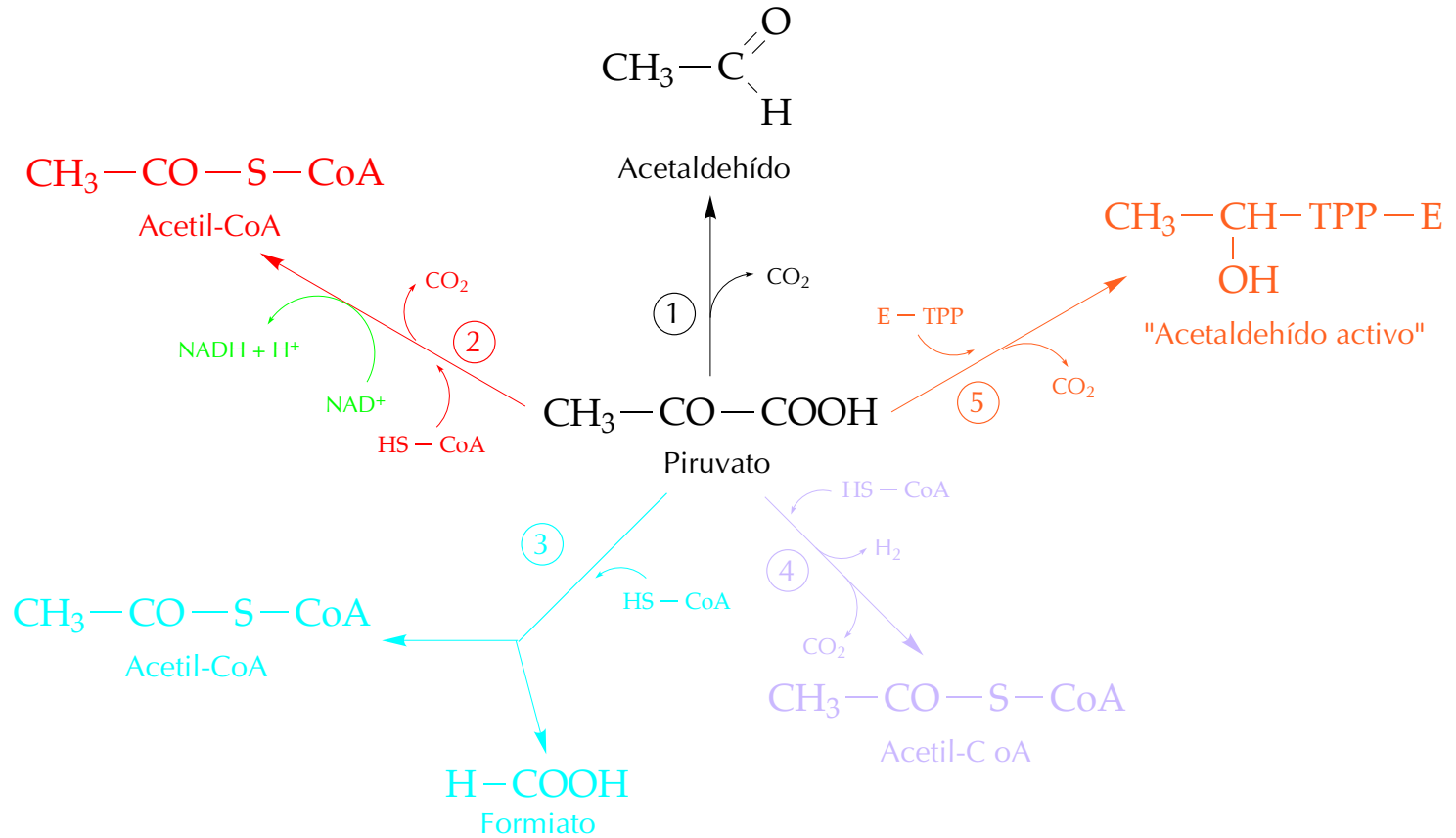


Lámina 4 Estrategias microbianas de descarboxilación del piruvato. 1, piruvato descarboxilasa. Funcional en levaduras y algunas bacterias, como *Zymomonas mobilis* cuando fermentan la glucosa. 2, piruvato deshidrogenasa. Característico del desarrollo aerobio de, entre otras, las bacterias entéricas. 3, piruvato-formiato-liasa. Lo sintetizan las bacterias entéricas en condiciones anaerobias. 4, piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa. Característico de los clostridios. 5, parte del complejo de la α -acetolactato sintasa de algunas bacterias entéricas (el α -acetolactato se genera por condensación del acetaldehído activo con piruvato). Un sistema equivalente es utilizado por las bacterias lácticas para producir diacetilo (en este caso, el acetaldehído activo condensa con acetil-CoA).

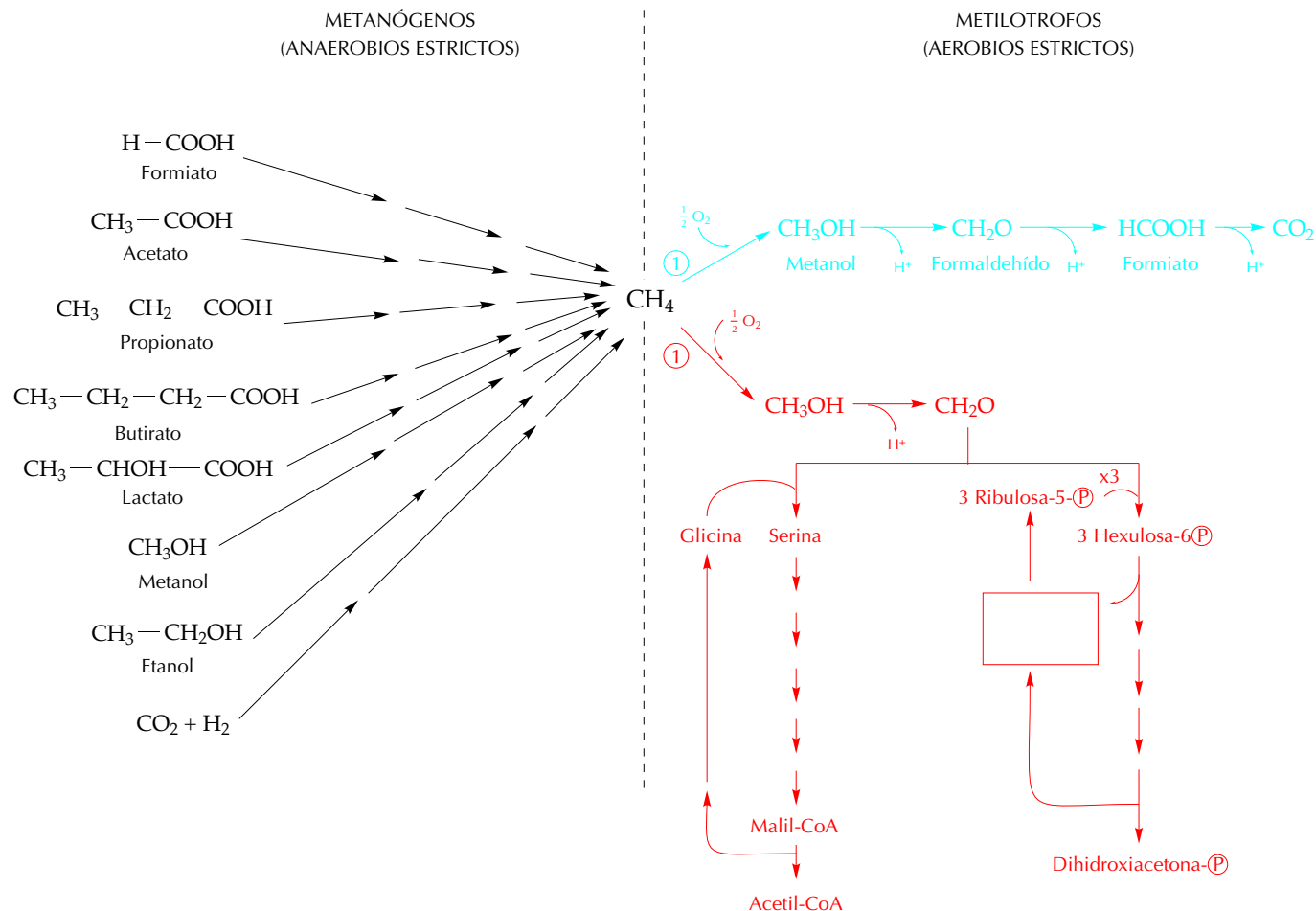


Lámina 5 Metabolismo microbiano del metano. *Izquierda:* Este compuesto puede ser producto del metabolismo de diversos microorganismos (metanógenos), todos ellos anaerobios estrictos e incluidos dentro de las arqueobacterias. El sustrato sobre el que crecen puede variar desde el $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ hasta, entre otras moléculas, ácidos orgánicos y alcoholes de cadena corta. *Derecha:* Asimismo, el metano puede ser el sustrato del crecimiento de diferentes grupos de microorganismos (metilotrofos obligados), todos ellos aerobios estrictos. La oxidación a CO_2 (en azul) está acoplada a la producción de energía, mientras que la formación de esqueletos carbonados tiene lugar asimilando el formaldehído (en rojo), bien por la vía de la serina (izquierda) o bien por el ciclo de la ribulosa monofosfato (derecha). La caja en esta vía representa reacciones catalizadas por aldolasas y transcetolasas. Las levaduras también pueden fijar formaldehído por el ciclo de la xilulosa monofosfato (no representado en la figura). La reacción 1 es clave para el crecimiento con metano, y está catalizada por la metano monooxigenasa.

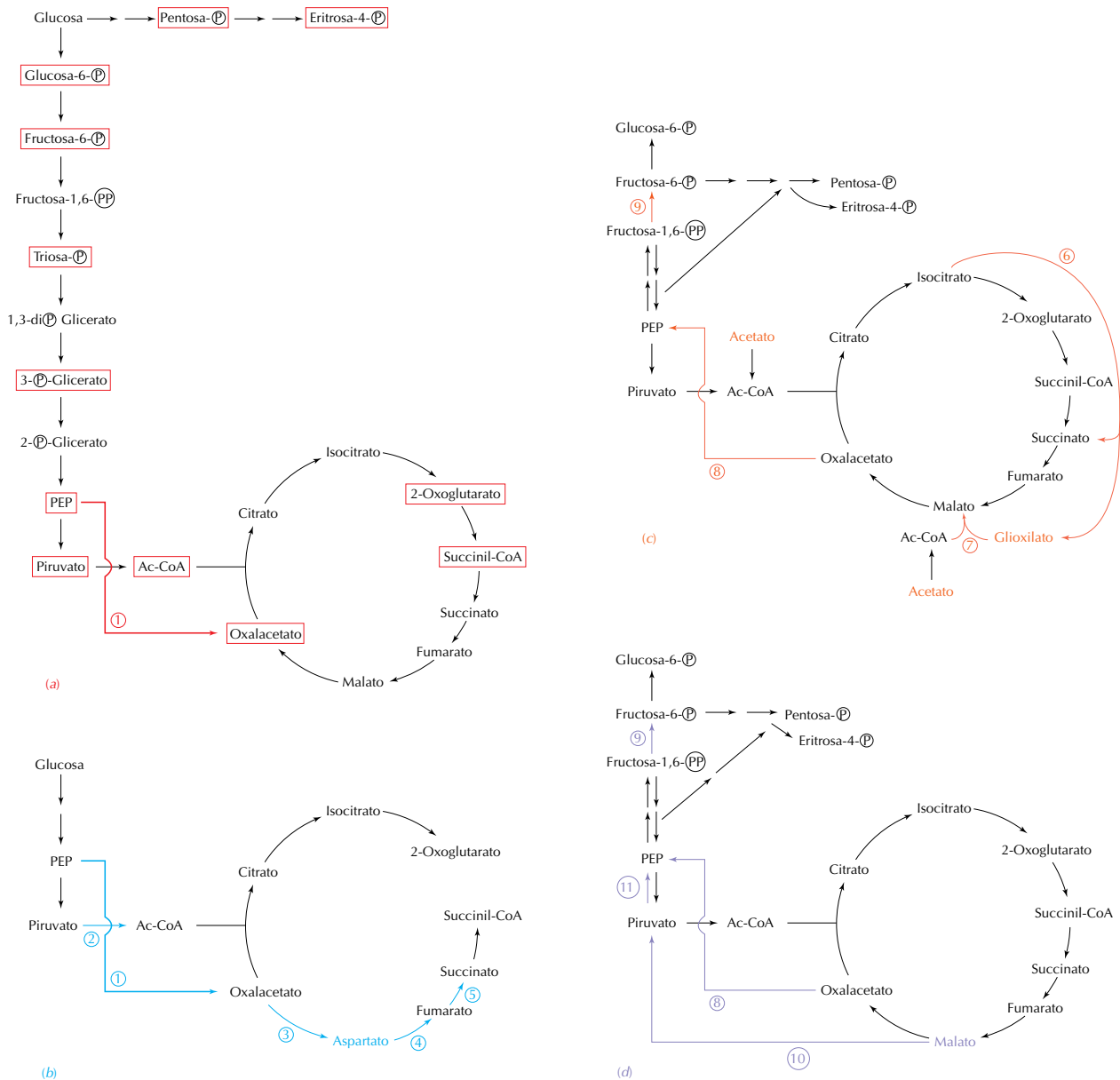


Lámina 6 Reacciones anapleróticas y ciclo del ácido glioxílico en *E. coli*. (a) Los 12 metabolitos precursores (enmarcados en rojo) necesarios para el proceso de biosíntesis. Estos precursores se obtienen a partir del catabolismo aerobio de la glucosa y, a fin de no colapsar el CAT a medida que se drenan, la PEP carboxilasa (1) aporta oxalacetato al ciclo. (b) En condiciones anaerobias el CAT se interrumpe, y puede sintetizarse directamente succinil-CoA. Esta síntesis se consigue mediante una serie de reacciones que implican una transaminasa (3), una aspartasa (4) y una fumarato reductasa (5) que hacen reversible el CAT a partir del oxalacetato. La descarboxilación del priuvato implica a la piruvato formiato liasa (2). (c) Crecimiento a partir de acetato. En este caso funciona el ciclo del ácido glioxílico. El CAT se nutre de acetil-CoA, el cual, además de incorporarse a nivel de la citrato sintasa, también lo hace después que la citrato liasa (6) genere glioxilato, que se condensa con acetil-CoA mediante la malato sintasa (7) para generar malato. El exceso de oxalacetato que así se genera se transforma en PEP, el cual, mediante la actividad de los enzimas de la vía de EMB, se convierte en fructosa-1,6-PP, que es convertida en fructosa-6-P mediante la fructosa-1,6-bisfosfatasa (9). (d) Crecimiento a partir de malato. En este caso, un enzima málico (10) genera piruvato, que es fuente de acetil-CoA que nutre el CAT. El PEP se obtiene a partir de la PEP carboxiquinasa y también a partir del piruvato por la PEP sintasa (11). El resto de los precursores se obtiene a partir del PEP de la misma manera que en (c).

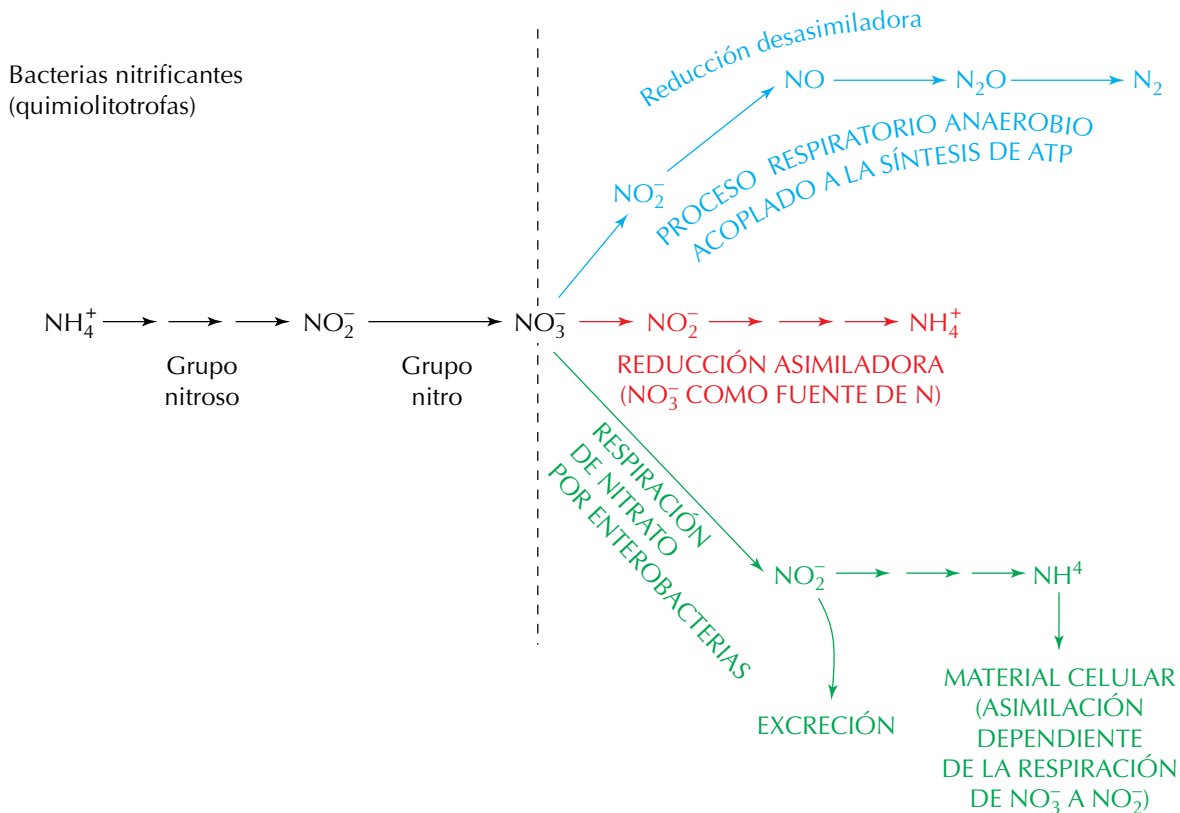


Lámina 7 El nitrato en el metabolismo bacteriano. *Izquierda:* El nitrato puede ser el producto final del metabolismo de algunas bacterias. Se trata de bacterias quimiolitotrofas que oxidan el nitrito a nitrato (grupo nitro). El nitrito proviene de la oxidación del amonio, realizado por bacterias pertenecientes al grupo nitroso. *Derecha:* El nitrato puede también ser utilizado como sustrato para el crecimiento microbiano; lo utilizan bacterias pertenecientes a géneros y especies muy diferentes, y también con objetivos diferentes. Por una parte, en condiciones anaerobias algunas bacterias lo utilizan como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria. La reducción del NO_3^- puede acabar generando N_2 . Se trata de una reducción desasimiladora. Por otra parte, algunas bacterias pueden utilizar el NO_3^- como fuente de nitrógeno, reduciéndolo previamente a amonio. En este caso, se trata de una reducción asimiladora. La respiración del NO_3^- que realizan las bacterias entéricas merece una mención especial. Cuando crecen anaerobiamente fermentando azúcares, el nitrato puede aceptar electrones provenientes del formiato, con lo que al metabolismo fermentador se le solapa una respiración anaerobia. El nitrito puede ser excretado al medio, o bien reducido a amonio, el cual puede ser asimilado. No obstante, es importante resaltar que dicha asimilación depende de una actividad respiratoria, y solamente tiene lugar en condiciones anaerobias y no de falta de otras fuentes de N.

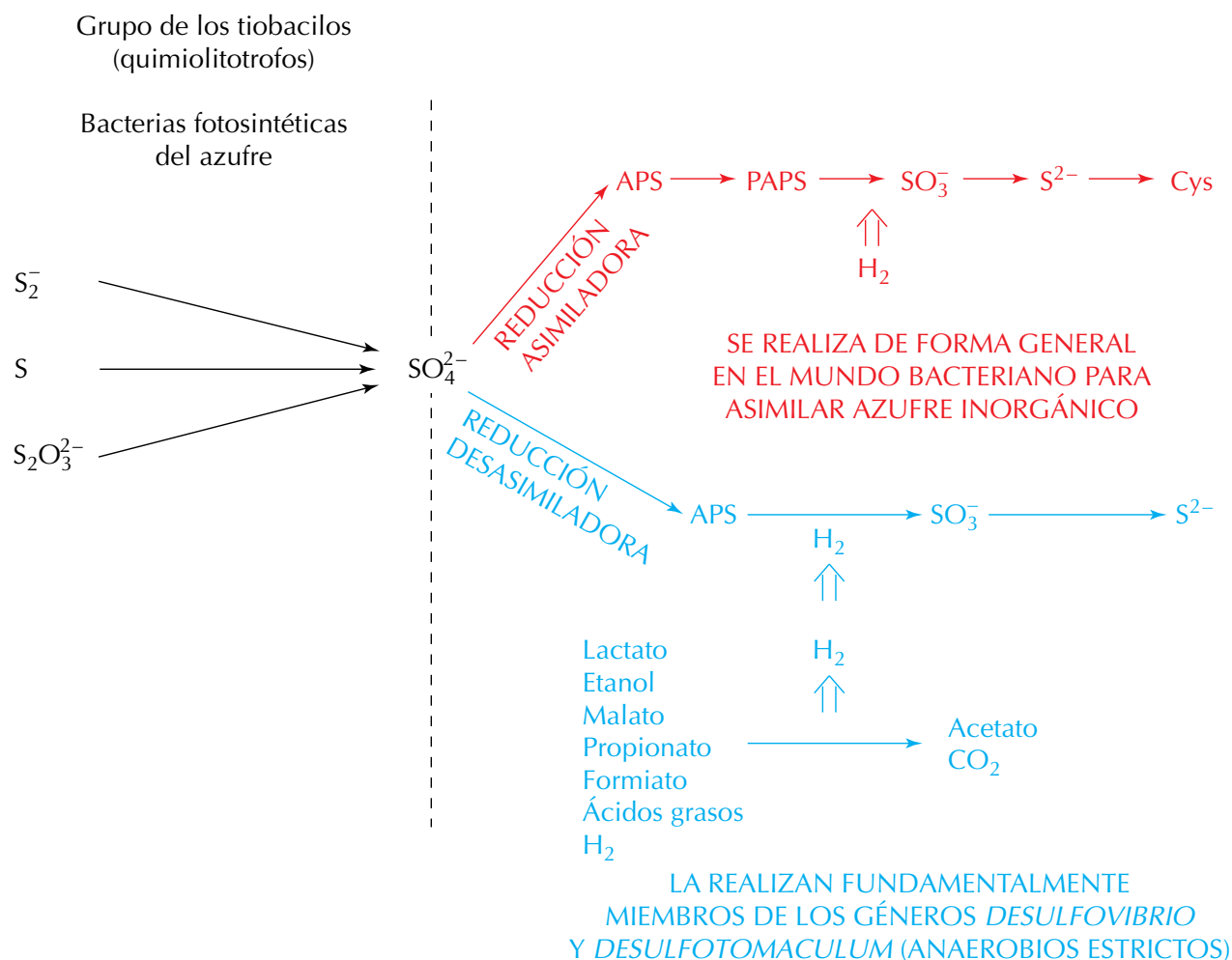


Lámina 8 El sulfato en el metabolismo bacteriano. *Izquierda:* El sulfato puede ser producto final del metabolismo de algunos microorganismos. Entre ellos se encuentran las bacterias del azufre. Se trata de quimiolitotrofos que obtienen la energía de la oxidación de compuestos total o parcialmente reducidos de azufre. Asimismo, algunas bacterias fotosintéticas producen sulfato como consecuencia de la utilización de sulfuro o azufre elemental como fuente de poder reductor. *Derecha:* El sulfato es utilizado de forma general como fuente inorgánica de azufre en el mundo bacteriano. Asimismo, algunos grupos de anaerobios estrictos (la mayoría pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*) lo utilizan como aceptor terminal de electrones en una cadena respiratoria (respiración del sulfato). Los electrones que entran en dicha cadena provienen bien del hidrógeno o de ácidos orgánicos de cadena corta (formiato, lactato, malato, propionato), etanol o ácidos grasos. Tales moléculas orgánicas son parcialmente oxidadas por algunas especies a acetato, mientras que otras las oxidan completamente a CO_2 .

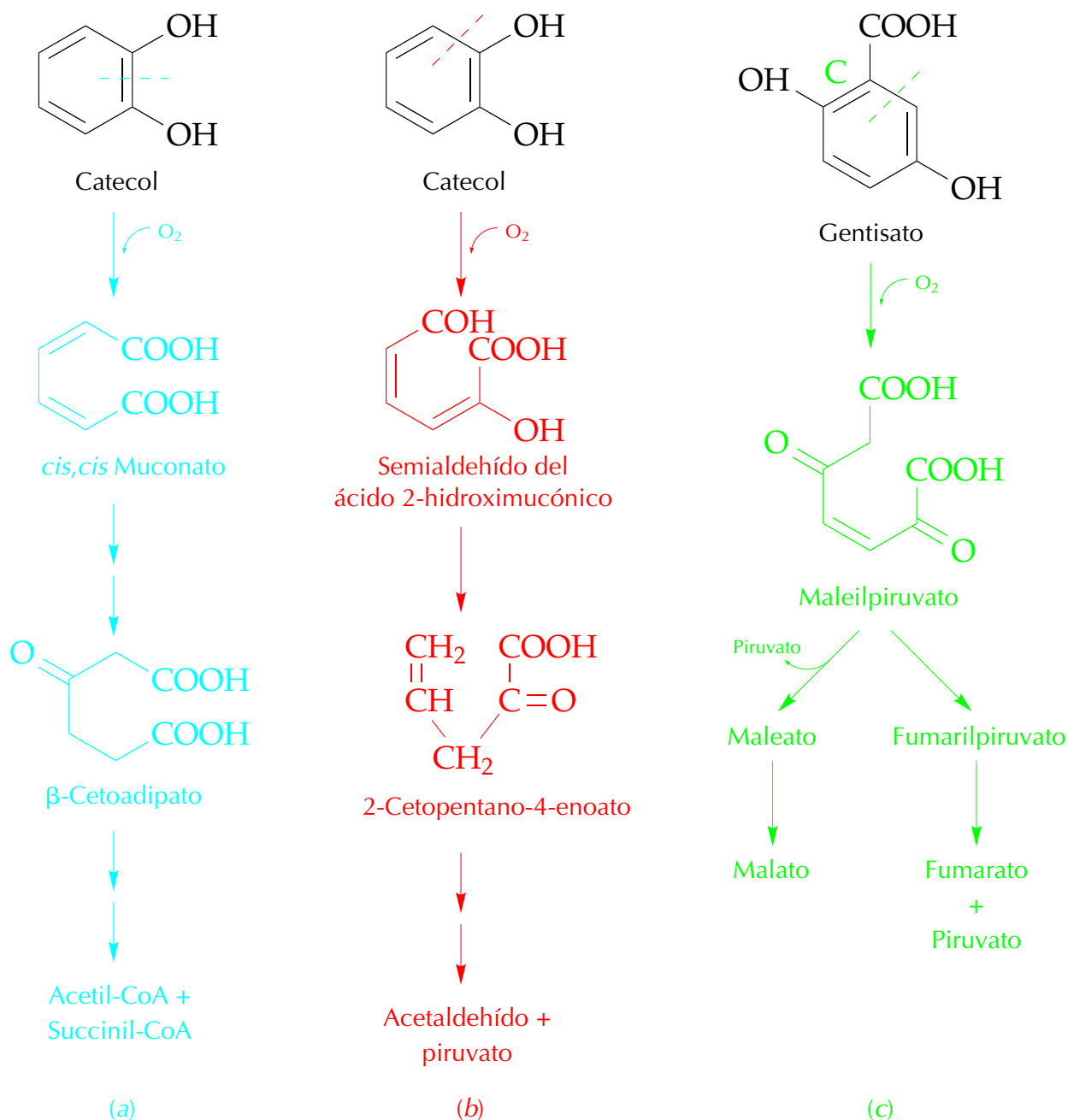


Lámina 9 Estrategias microbianas de degradación aerobia del anillo aromático. (a) Orto-ruptura. (b) Meta-ruptura. (c) Vía de degradación del gentisato. Nótese que en todos los casos se produce un ataque oxigenásico al anillo aromático. Asimismo, con independencia de la estrategia utilizada, los productos resultantes de la degradación del anillo aromático son metabolitos de las vías metabólicas centrales.

	<i>DEGRADACIÓN AEROBIA</i>	<i>DEGRADACIÓN ANAEROBIA</i>
Intermediarios característicos en la degradación	<i>Catecol</i> <i>Protocatecato</i> <i>Gentisato</i>	Benzoil-CoA Resorcinol Floroglucinol
Reacciones que transforman el sustrato en uno de tales intermediarios	<i>Oxidación</i>	Carboxilación Hidroxilación anaerobia Formación de tioésteres con CoA
Propiedades de los intermediarios característicos	<i>Fáciles de oxidar</i> <i>(rompiéndose</i> <i>concomitante-</i> <i>mente el anillo)</i>	Fáciles de reducir (hidratar)
Ataque del anillo aromático	O ₂	2 ó 4 [H] (+H ₂ O)
Rotura del anillo	<i>Ataque oxigená-</i> <i>sico directamente</i> <i>sobre el núcleo</i> <i>aromático</i>	Hidrólisis del derivado 3-ceto del correspondiente anillo alicíclico que se forma después del ataque reductor al anillo aromático

Lámina 10 Comparación de las estrategias microbianas aerobias y anaerobias de degradación del anillo aromático. De forma general, los sustratos aromáticos que soportan el crecimiento son transformados en algunos de los metabolitos centrales reseñados, que son los sustratos de los enzimas que catalizan la rotura del anillo. Una vez roto el anillo, el fraccionamiento de la molécula lineal genera metabolitos que se incorporan a las vías metabólicas centrales.

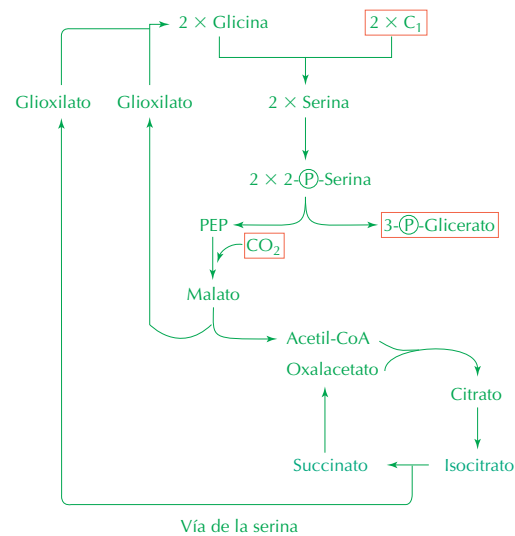
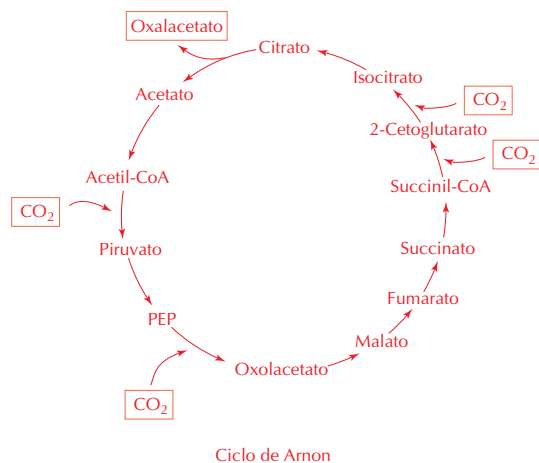
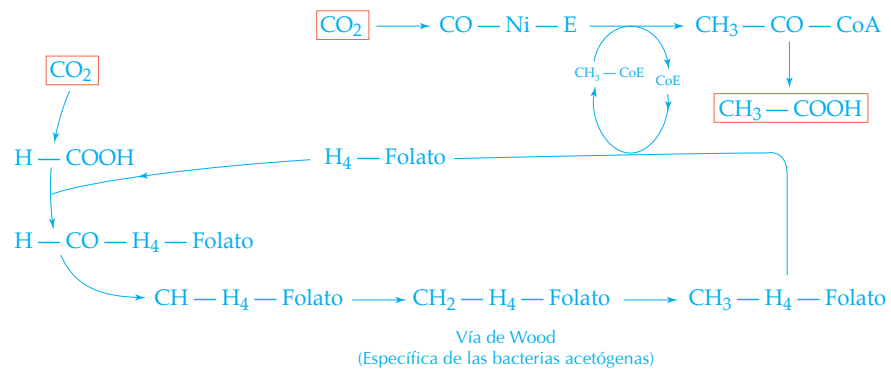
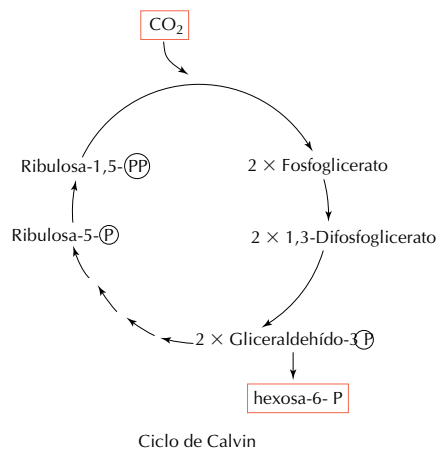


Lámina 11 Principales vías microbianas de fijación del CO_2 . Tanto las moléculas de CO_2 que entran como los productos que se obtienen se encuentran enmarcados. A fin de simplificar los esquemas, no se indican las fuentes de poder reductor. Además de las vías reseñadas, la vía de la ribulosa-P es utilizada por algunos metilótrofos para fijar formaldehído.

	Bacterias púrpura		Bacterias verdes	
PROPIEDADES	Rodospiriláceas	Cromatiáceas	Clorobiáceas	Cloroflexáceas
Bacterioclorofila	<i>a o b</i>	<i>a o b</i>	<i>c, d o e, a</i>	<i>c, d o e, a</i>
H ₂ S como dador de H	No (la mayoría)	Sí	Sí	Sí
Acúmulo de granos de azufre	No	Sí	Sí	No
Crecimiento aerobio en la oscuridad	Sí	No	Sí	No

Bacterias fotosintéticas del azufre

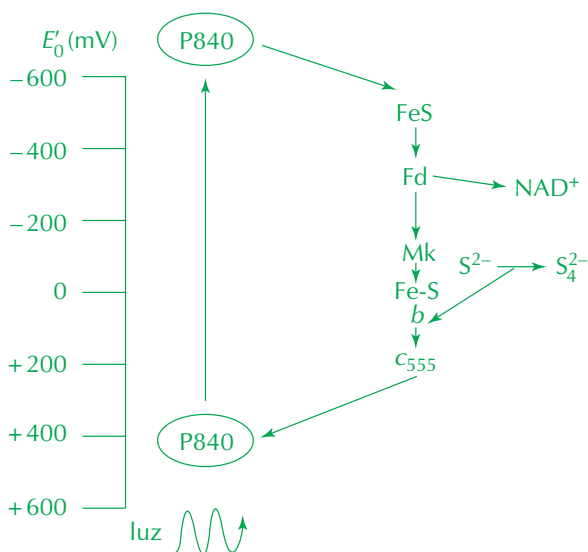
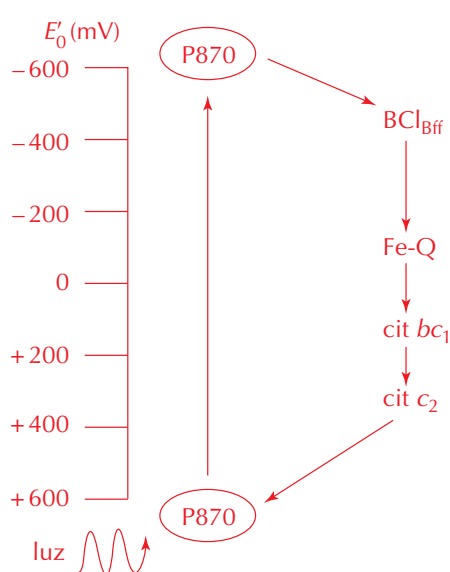


Lámina 12 Características generales de las bacterias fototróficas. En rojo y verde se reseñan respectivamente algunas de las características de las bacterias púrpura y verdes. Nótese que el flujo de electrones que se genera en el aparato fotosintético de las bacterias púrpura (a la izquierda) no posibilita la reducción directa del NAD^+ , ya que el aceptor primario de electrones (Fe-Q) tiene un potencial más positivo que el par NAD^+/NADH . Ello no sucede así en el sistema de las bacterias verdes (izquierda).

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Balance de una fermentación de la glucosa por <i>Lactobacillus buchneri</i> .							
	A	B	C	D	E		F
Glucosa utilizada	112,2	100	600	0	-	-	-
Productos formados:							
Ác. láctico	89,2	80	240	0	-	-	-
Ác. acético	19,7	17,56	35,12	0	-	-	17,56
Etanol	78,9	70,38	140,76	-2	-	140,76	70,38
CO ₂	95,1	84,82	84,82	+2	169,4	-	-
Glicerol	43,5	38,80	116,40	-1	-	38,80	-
			Σ 617,10		Σ 169,4	Σ 179,56	Σ 87,94
$\% \text{ C recuperado } \frac{617,10}{600} \times 100 = 102,7$							
$\text{Balance O/R (\%)} \frac{169,4}{179,56} \times 100 = 94,47$							
$\% \text{ de CO}_2 \text{ recuperado } \frac{84,82}{87,94} \times 100 = 96,5$							



EDITORIAL REVERTÉ, S. A.

Barcelona - Bogotá - Buenos Aires - Caracas - México

BIOQUÍMICA DE LOS MICROORGANISMOS

RAMON PARÉS
ANTONIO JUÁREZ