

20/1/20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE
MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS**

**TRABAJO MONOGRAFICO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ANGELICA MARIA DEL CARMEN SOSA CORDOVA**

MEXICO. D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

Introducción	1
CAPITULO I. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA NUTRICION DE BACTERIAS AUTOTROFAS.	
A) Bases Fisiológicas para la Clasificación Nutricional Microbiana	3
A.1) Observaciones que Sugieren un Cambio en la Definición de Autótrofo	5
A.2) Teorías acerca de la Autotrofia	7
A.3) Fuente de Energía y Electrones	9
A.4) Fuente de Carbono	10
B) Hacia una Definición más Precisa de los Grupos Nutricionales	11
B.1) Microorganismos fotosintéticos	12
B.2) Microorganismos Quimosintéticos	18
CAPITULO II. FISILOGIA Y BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS	
A) Descripción General de los Grupos Principales de Microorganismos Quimiolitotoauto y Heterótrofos	26
A.1.a) Bacterias del Hidrógeno	26
A.2.a) Bacterias del Azufre	48
A.3.a) Bacterias del Nitrógeno	67
B) Vías de Utilización de los Diferentes Compuestos de Carbono	74
B.1) Compuestos Superiores de un Atomo de Carbono	74
B.2) Compuestos de un Atomo de Carbono	75
CAPITULO III. BIOQUIMICA DE LA RESPIRACION EN MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS.	
A) Antecedentes Históricos	89
A.1) Componentes de la Cadena Respiratoria	93
B) Respiración Aerobia	97
B.1) Bacterias Quimioorganótrofas aerobias	98
B.2) Bacterias Quimiolitótrofas aerobias	100

C) Respiración Anaerobia o Anoxobiótica	111
C.1) Bacterias Sulfato Reductoras	111
C.2) Bacterias Nitrato Reductoras	114
C.3) Bacterias Metanogénicas	115

CAPITULO IV. APLICACIONES.

A) Las Bacterias del Nitrógeno en la Agricultura	116
A.1) Influencia de los factores ambientales	118
B) Bacterias del Azufre	121
B.1) Bacterias del Azufre en la Agricultura	121
B.2) Bacterias del Azufre en la Metalurgia	125
RESUMEN	142
INDICE DE ABREVIATURAS	144
BIBLIOGRAFIA	145
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	163

Introducción.

Los microorganismos quimiolitótrofos han sido estudiados desde 1887, año en el cual Winogradsky los reportó por primera vez. La velocidad con que se han desarrollado las investigaciones sobre esta clase de microorganismos, ha sido lenta comparada con los estudios realizados en las bacterias denominadas comunmente heterótrofas. Se puede decir que el avance en las investigaciones de los microorganismos litótrofos, en general, ha estado en función principalmente de dos condiciones. Primero, en las décadas de inicio del siglo XX no se contaba con los avances tecnológicos suficientes como para realizar los estudios del metabolismo de estos microorganismos con la profundidad requerida.

El uso del espectrofotómetro, técnicas con isótopos y las diversas modalidades de cromatografía, fueron accesibles a los laboratorios de investigación, alrededor de los años cuarenta, sesenta años después de que los quimiolitótrofos fueron reportados por Winogradsky. Segundo, al inicio de la década de los años treinta, se observó y reportó la fijación heterótrofa de CO_2 , hecho que provocó controversia, pero no se le dio gran importancia, debido quizá, a que de haberlo aceptado plenamente obligaba a los científicos a dar una explicación bioquímica y fisiológica para el comportamiento de los microorganismos que se denominaban comunmente autótrofos, punto que en ese tiempo estaba lejos de ser alcanzado. El descubrimiento de la fijación de CO_2 por bacterias heterótrofas, sin embargo, no fue totalmente estéril, sino que dio lugar a que los microbiólogos empezaran a diseñar experimentos para obtener respuestas lógicas al comportamiento que presentan los microorganismos autótrofos frente al CO_2 y compuestos orgánicos como fuente de carbono y/o energía.

Se puede considerar que los resultados más importantes son:

- 1) La descripción precisa de la ruta de fijación para el CO_2 en microorganismos fotosintéticos y quimiosintéticos (1946), con esto ya se pudo dar respuesta al papel y la importancia del CO_2 en las bacterias quimioheterótrofas.
- 2) La definición de "autótrofo" recibió modificaciones, que sin embargo hasta la fecha aún no se acaba de definir. Las observaciones que más con-

tribuyeron para este cambio son: a.- Se ha demostrado que las bacterias que utilizan principalmente CO_2 como fuente de carbono son capaces de utilizar también compuestos orgánicos como fuente del carbono y/o energía, b.- Las bacterias llamadas comunmente autótrofas (excepto las del Hidrógeno) presentan un sistema productor de energía muy particular, llamado Reversa del Transporte Electrónico en la Cadena Respiratoria, 3.- Se reportó que las bacterias que utilizan compuestos monocarbonados orgánicos (1C), presentan dos rutas de asimilación muy específicas llamadas vía de la Serina y vía de Quayle o de la Alulosa. Además presentan un metabolismo limitado o nulo frente a los compuestos orgánicos superiores a 1C, esto originó que los términos "autótrofo" y "litótrofo" no se trataran como sinónimos, sino que el primero se definió con base en la fuente de carbono utilizada y el segundo en base a la fuente de electrones utilizada para la producción de energía. Desafortunadamente, el término "facultativo" no se ha podido eliminar, porque algunos microorganismos presentan un comportamiento mixto.

El objetivo de la presente revisión bibliográfica es presentar un resumen de los estudios bioquímicos y fisiológicos hechos sobre estos microorganismos que contribuyen a aclarar su interesante comportamiento, su situación particular entre las bacterias así como sus aplicaciones que día a día va ganando importancia. De una manera indirecta se hace un análisis de la aplicación en la taxonomía de los grupos nutricionales resultantes de las modificaciones hechas a los términos autótrofo, heterótrofo y litótrofo.

CAPITULO I
ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA NUTRICION DE
BACTERIAS AUTOTROFAS

- A) Bases Fisiológicas para la Clasificación Nutricional Microbiana.
 - A.1) Observaciones que Surgieren un Cambio en la Definición de Autótrofo.
 - A.2) Teorías acerca de la autotrofia
 - A.2.a) Lesiones metabólicas
 - A.2.b) Toxicidad o autotoxicidad
 - A.3) Fuente de Energía y Electrones
 - A.4) Fuente de Carbono

- B) Hacia una Definición Precisa de los Grupos Nutricionales.
 - B.1) Microorganismos Fotosintéticos
 - B.1.a) Microorganismos fotoorganoheterótrofos
 - B.1.a.1) Utilización de glucosa y fructosa
 - B.1.a.2) Utilización de glutamato y citrato
 - B.1.a.3) Utilización de glicerol
 - B.1.a.4) Utilización del acetato
 - B.1.a.5) Utilización de alcoholes y D- y L-malato
 - B.1.b) Microorganismos fotoorganoautótrofos
 - B.1.c) Microorganismos fotolitoheterótrofos
 - B.1.d) Microorganismos fotolitoautótrofos

 - B.2) Microorganismos Quimiosintéticos
 - B.2.a) Microorganismos quimioorganoheterótrofos
 - B.2.b) Microorganismos quimioorganoautótrofos
 - B.2.b.1) Bacterias metano y metanol oxidantes
 - B.2.b.2) Bacterias que asimilan metilaminas, metanol y formato
 - B.2.c) Microorganismos quimiolitoautótrofos

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA NUTRICION DE BACTERIAS AUTOTROFAS

A) Bases Fisiológicas para la Clasificación Nutricional Microbiana.

Un aspecto de la fisiología microbiana que ha servido como parámetro para su clasificación es la nutrición.

La nutrición es una función biológica, mediante la cual, los microorganismos logran un balance entre anabolismo y catabolismo tomando del medio que los rodea los elementos que los transforman en precursores de biosíntesis, generando energía a través de esta transformación, fig. 1.

Lo que aquí llamamos "elementos" son en realidad sustancias (nutrientes) con diversas características y diversos fines en el metabolismo, de las que se hablará en el curso de este trabajo.

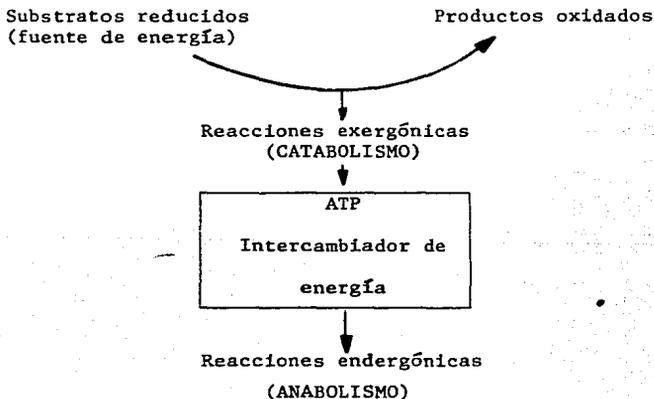


FIGURA 1. Esquema de los procesos que conocemos en conjunto como metabolismo.

Los compuestos que toman los microorganismos de su medio ambiente para el metabolismo, reciben el nombre de nutrientes. Estos compuestos son necesitados en diferente proporción, según sus características.

Aquellos que son requeridos en grandes cantidades se llaman macronutrientes, y los que se requieren en poca cantidad, pudiendo llegar a ser trazas, son llamados micronutrientes. Por otro lado, dependiendo del metabolismo asimilatorio microbiano los nutrientes se pueden dividir en dos grupos:

- a.- Nutrientes necesarios sin los cuales la célula no puede crecer.
- b.- Nutrientes útiles pero no indispensables. Estos se utilizan cuando están presentes, por lo que se les considera no esenciales.

Debido a la variedad nutricional que presentan los microorganismos, se tiene como consecuencia un comportamiento fisiológico diferente. La clasificación microbiológica basada en los requerimientos nutricionales, tiene como objetivo definir grupos, donde el comportamiento fisiológico sea lo más uniforme posible, y así poder emplear este dato en la taxonomía general.

En la actualidad se emplean tres características nutricionales de los microorganismos para poder definir los grupos, a saber:

- 1.- Fuente de energía: Puede ser luz radiante o energía de enlace químico.
- 2.- Fuente de electrones: Se refiere a la naturaleza química de los substratos oxidables, que puede ser orgánica o inorgánica.
- 3.- Fuente de carbono: Donde se considera la naturaleza del compuesto carbonado y el número de carbonos que posee el substrato utilizado para este fin.

De estas tres características, se pueden definir términos que emplearé para la denominación de los grupos nutricionales, por lo que se explican a continuación:

Según la Fuente de energía	}	Fotótrofo:	Microorganismo que utiliza la luz como fuente principal de energía, que también obtienen en cierta proporción de reacciones químicas.
		Quimiótrofo:	Microorganismo que obtiene su energía por medio de reacciones de oxidoreducción, no realizan fotosíntesis.

Según la Fuente de electrones.	}	Organótrofo: Microorganismo que utiliza sustancias orgánicas como donadores de electrones.
		Litótrofo: Microorganismo que utiliza sustancias inorgánicas como donadores de electrones.
Según la Fuente de carbono	}	Heterótrofo: Microorganismo que asimila el carbono de compuestos con más de un átomo de carbono.
		Autótrofo: Microorganismo capaz de asimilar compuestos con un átomo de carbono (1C).

A.1) Observaciones que Sugieren un Cambio en la Definición de Autótrofo.

Los términos definidos según la fuente de carbono, se ha modificado con respecto a lo que tradicionalmente se había manejado como significativo.

Es importante hacer una revisión de los hechos que han producido la definición tradicional, así como también aquellos que han provocado el cambio.

Tradicionalmente a los términos heterótrofo y autótrofo se les ha dado el siguiente significado:

Heterótrofo: Microorganismo que asimila el carbono de compuestos orgánicos que a su vez le sirven como fuente de energía.

Autótrofo: Microorganismo que asimila el carbono proveniente del CO_2 mediante el ciclo de Calvin; obtienen su energía por la oxidación de compuestos inorgánicos como el nitrato, amoníaco, azufre elemental, etc. Además, son incapaces de crecer en un medio con compuestos orgánicos.

La nueva definición de autótrofo, y por consiguiente la de heterótrofo, toma en consideración las tres características anteriormente mencionadas para denominar los grupos nutricionales microbiológicos. Esta forma de denominar a los microorganismos no ha sido aceptada oficialmente por todos los investigadores relacionados con este campo, pero las definiciones y el nombre de los grupos nutricionales cuentan con el respaldo de los reportes publicados sobre la fisiología de la nutrición bacteriana,

desde que Winogradsky observó por primera vez el fenómeno de la oxidación de compuestos inorgánicos por bacterias en 1887-1888.

Sergius Winogradsky y Martinus Willhl Beijerinck, fueron dos científicos que aportaron el descubrimiento de las bacterias inorgano-oxidantes y la fijación de nitrógeno atmosférico por los microorganismos (93).

El primer descubrimiento se llevó a cabo mediante la experimentación con las bacterias Beggiatoa (1887) y Leptothrix (1888), donde observaron la oxidación que se efectuaba a los compuestos de azufre y fierro. Como consecuencia, se empleó los términos autótrofo y quimiolitótrofo, como sinónimo para describir estas bacterias. Otra observación en la cual se enfatizó, fue el papel que tenía la materia orgánica exógena con respecto a estas bacterias, era no utilizable y tóxica.

La primera demostración convincente sobre el comportamiento de los microorganismos llamados autótrofos, provino de los experimentos realizados con las bacterias nitrificantes, realizados por Winogradsky en 1890, donde hizo una demostración inequívoca de que el ácido carbónico era asimilado por esta clase de bacterias durante la oxidación del amoníaco y del nitrato, esto le dio la pauta para describir con seis características el comportamiento fisiológico de las bacterias inorgano-oxidantes (93)

- 1.- Desarrollo en un medio solo mineral provisto de sustancias inorgánicas oxidables.
- 2.- Procesos vitales ligados estrechamente a la presencia del amoníaco, en el caso de la nitrificación.
- 3.- Oxidación del amoníaco como única fuente de energía.
- 4.- No tienen ninguna necesidad de nutrientes orgánicos, ni en calidad de precursores de biosíntesis, ni como fuente de energía.
- 5.- Incapacidad de descomponer sustancias orgánicas, cuya presencia afecta el desarrollo.
- 6.- Asimilación del ácido carbónico como única fuente de carbono, por vía quimiosintética.

Debido a esta descripción, el término quimiolitótrofo o quimioautótrofo se relacionó con algunas características específicas que se les consideró obligatorias durante el metabolismo asimilatorio para el CO_2 como fuente exclusiva de carbono, así como la capacidad de oxidar compuestos inorgánicos.

cos e inhibición del crecimiento por materia orgánica exógena. Este concepto no fue alterado por el descubrimiento de las bacterias del hidrógeno realizado por Kaser en 1906, las cuales pueden crecer, tanto en medios completamente inorgánicos, o medios con substratos orgánicos. La consecuencia fue que Winogradsky introdujo de 1923-1949, los nuevos términos "autótrofo obligado" y "autótrofo facultativo" para explicar este nuevo comportamiento. Los términos fueron aceptados, por lo que se definieron tres grupos nutricionales, para estas bacterias:

- 1.- Autótrofo obligado; Microorganismo que fija CO_2 por el ciclo de Calvin y utiliza compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía.
- 2.- Autótrofo facultativo; Microorganismo que tiene la habilidad de crecer tanto en medios orgánicos como inorgánicos.
- 3.- Mixotrófo; Microorganismos que presentan un crecimiento autótrofo y heterótrofo simultáneo.

En experimentos posteriores en vez de encontrar argumentos para fortalecer las definiciones propuestas para los grupos nutricionales manejados hasta entonces, se encontró que había características en total contraposición con lo aceptado como autotrofia.

Analizando cada característica propuesta en la definición clásica de autótrofo y las observaciones de los experimentos realizados, podemos tener una visión más clara de las circunstancias que obligan a hacer un cambio en la definición y por consiguiente en la denominación de los grupos nutricionales.

A.2) Teorías Acerca de la Autotrofia.

Al respecto podemos decir, que los estudios realizados muestran que durante el crecimiento de bacterias consideradas como autótrofas obligadas (bajo la definición tradicional), se observa un metabolismo asimilatorio real de compuestos orgánicos, (15, 22, 75, 77, 93, 121). Además se ha demostrado la presencia de enzimas capaces de metabolizar una amplia gama de compuestos orgánicos, en este tipo de bacterias. La pregunta que surge indudablemente es; ¿Por qué las bacterias llamadas autótrofas no crecen en medios heterótrofos?

Se han propuesto algunas hipótesis (82) para explicar este comportamiento, a saber:

- a) Lesiones metabólicas. Se refiere a la ausencia de ciertas enzimas claves para el crecimiento con compuestos orgánicos.
- b) Dependencia regulatoria del CO₂ en el metabolismo. Esto quiere decir, que ningún otro compuesto puede sustituir al CO₂ como fuente de carbono para la biosíntesis.
- c) Toxicidad. El crecimiento en medios orgánicos fracasa porque los substratos son tóxicos, o bien, porque a través de ellos se producen metabolitos intermediarios tóxicos.
- d) Incapacidad para obtener suficiente energía por la oxidación de compuestos orgánicos. Esta hipótesis no cuenta con la información suficiente para poderla analizar, por lo tanto se han excluido.

A continuación mencionaré los fundamentos de las tres primeras hipótesis.

A.2.a) Lesiones metabólicas. Dos lesiones en particular han sido propuestas, la primera es que los microorganismos denominados autótrofos carecen de la NADH-oxidasa, por consiguiente no pueden generar energía por la oxidación de esta molécula, pero los resultados obtenidos por Peck y Suzuki (82) han comprobado lo contrario. La segunda lesión propuesta es, la ausencia de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, lo que convierte al ciclo de Krebs en una vía puramente biosintética, perdiendo su característica de generadora de energía. Se ha pensado que esta lesión en particular ocurre en tiobacilos, bacterias nitrificantes y cianobacterias, pero no parece ser una razón lo suficientemente fuerte para que las bacterias tengan que presentar un metabolismo dependiente de CO₂ y compuestos inorgánicos reducidos, especialmente si sabemos que algunas bacterias heterótrofas pierden la capacidad funcional del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (ciclo ATC) cuando crecen anaerobicamente.

Por otro lado, si el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos incompleto y la ausencia del Ciclo del Glioxilato implicara que ciertos metabolitos no se producen excepto cuando el CO₂ es fijado, entonces teóricamente, si se le añaden al medio los suplentes del ciclo, los microorganismos podrían omitir al CO₂ como fuente de carbono, pero tampoco fue el caso. Por lo cual, la suposición de la lesión es simplemente una aproximación, siendo más realista pensar que cada le-

sión actúa en relación a un único mecanismo control o complementa algunos problemas metabólicos relacionados con la relativa invariabilidad enzimática y/o metabolitos autotóxicos, lo actual es la base para la segunda hipótesis.

A.2.b) Toxicidad o autotóxicidad. Los microorganismos llamados autótrofos, pueden oxidar glucosa y otras sustancias orgánicas y como resultado crecer. Pero estos substratos rápidamente empiezan a ser no metabolizables, por la generación de metabolitos intermediarios tóxicos, como ceto-ácidos (2-oxoglutarato, consecuencia de la lesión en el ATC) y el p-hidroxifenilpiruvato. Esto se ha reportado para algunos tiobacilos (82).

Para comprobar lo anterior, se han hecho estudios utilizando cultivos que se desarrollan en sistemas donde durante el crecimiento, el medio de cultivo está teniendo una diálisis. Los resultados obtenidos por medio de esta técnica fueron los esperados, pero la evidencia no fue concluyente, porque una sustancia inhibitoria común, no puede ser producida por toda clase de bacterias; además, se piensa que pueden ser formadas otras dos clases de metabolitos inhibitorios; 1.- Aquellos sobreproducidos a causa de los diferentes procesos regulatorios prevalencientes durante el crecimiento, por ejemplo, algunos aminoácidos (a muy bajas concentraciones son tóxicos), 2.- Aquellos acumulados por el funcionamiento de las vías a un nivel anormal, como resultado de un exceso de substrato asimilable.

A.3) Fuente de Energía y Electrones.

La fuente de energía para los quimiosintéticos depende de las reacciones de oxido-reducción que se llevan a cabo durante el metabolismo de los diferentes substratos. Esta energía es asimilable en enlaces de tipo anhídrido, formando moléculas con alto contenido energético, la más importante, debido a la frecuencia con que se utiliza, es el ATP. Los substratos que intervienen en estos procesos para los microorganismos autótrofos según la definición tradicional son de naturaleza inorgánica, pero se ha visto en la actualidad que tales compuestos no solo son inorgánicos sino que, también son capaces de utilizar compuestos orgánicos y no necesariamente son la fuente de electrones para la reducción del NAD^+ o el FAD^+ ,

que posteriormente son oxidados, si es necesario, en la cadena respiratoria para la producción de ATP o bien ser utilizados en otros procesos bio sintéticos.

Estas observaciones son apoyadas por los estudios realizados en bacterias consideradas típicamente heterótrofas bajo la definición clásica. Estos estudios fueron desarrollados por Norris y Richmond (82, 28), utilizando bacterias del género Desulfovibrio y Desulfotomaculum, de las observaciones reportadas se desprende que estas dos especies de bacterias son capaces de oxidar hidrógeno y en ciertas de Actinomicetos y algunas Pseudomonas son capaces de utilizar amoníaco y tiosulfato respectivamente. De algunas de estas oxidaciones se obtiene claramente la producción de energía, como es el caso de la oxidación del hidrógeno.

De lo anterior podemos apreciar la necesidad de considerar la fuente de energía y la fuente de electrones como necesidades fisiológicas independientes, por lo que no se pueden definir en un solo término.

A.4) Fuente de Carbono.

La fuente de carbono para los autótrofos, según la definición, es el CO_2 , siendo asimilada mediante el ciclo de Calvin. Esta característica si es comprobada en todos los estudios realizados, pero además se ha observado que existen otras vías para la misma asimilación, correspondiendo el mecanismo a la Reversa del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos encontrada en bacterias como Chlorobium, y la Vía de ácidos dicarboxílicos C_4 . De igual manera se ha demostrado por Mac Fadden (78) que el acetato es asimilado e incorporado a los componentes celulares, pero solo cuando el CO_2 está siendo utilizado como principal fuente de carbono. Por lo anterior, la descripción de un grupo nutricional no es posible mediante el empleo de términos simples, sino que es consecuencia de la combinación de estos. Esta nueva manera de formar el nombre para los grupos nutricionales implica un cambio, como lo he mencionado, en la definición de autótrofo. (82).

La definición actual de autótrofo, emplea un criterio surgido de los estudios realizados con bacterias que emplean sustratos de un átomo de carbono (1C) como fuente de carbono. Estos microorganismos presentan características similares, como las vías de asimilación para dichos compuestos. Tales vías son: 1.- De la Ribulosa Difosfato o también llamada Ciclo de Calvin. 2.- De la Ribulosa Monofosfato o de la Alulosa. 3.- Vía de la

Serina.

Los microorganismos que poseen cualquiera de estas vías tienen comportamientos similares frente a compuestos superiores de un átomo de carbono, cualidad que ha valido para emplearla como parámetro de clasificación.

Las características bioquímicas de las vías de asimilación así como de los grupos nutricionales, serán tratados en los capítulos posteriores.

B) Hacia una Definición más Precisa de los Grupos Nutricionales.

Los grupos nutricionales se forman combinando las tres características nutricionales mencionadas anteriormente como muestra la siguiente tabla. (1)

FUENTE DE ENERGIA		FUENTE DE ELECTRONES		FUENTE DE CARBONO		NOMBRE DEL GRUPO NUTRICIONAL
Luz	Químicas	Orgánica	Inorgánica	1C	+ de 1C	
Foto-		organo-			heterótrofo	Fotoorganoheterótrofo
Foto-		organo-		autótrofo		Fotoorganoaquítrofo
Foto-			lito-		heterótrofo	Fotolitoheterótrofo
Foto-			lito-	autótrofo		Fotolitoaquítrofo
	Químico-	organo-			heterótrofo	Químioorganoheterótrofo
	Químico-	organo-		autótrofo		Químioorganoaquítrofo
	Químico-		lito-		heterótrofo	Químio-lito-heterótrofo
	Químico-		lito-	autótrofo		Químio-lito-aquítrofo

Tabla 1. Grupos Nutricionales, denominados según la nueva terminología.

B.1) Microorganismos fotosintéticos.

La fotosíntesis es un proceso común a todos los microorganismos incluidos en esta categoría. El objetivo no es hacer un estudio detallado de las reacciones implicadas, sino por el contrario, hacer una revisión general aplicando los parámetros de clasificación nutricional anteriormente descritos, con la finalidad de demostrar su aplicación a dichos microorganismos.

La fotosíntesis es uno de los procesos más importantes de la Biología y es la característica común a este grupo o clase nutricional. Consiste esencialmente en la conversión de la energía luminosa en energía química, la que posteriormente se utiliza en la síntesis de constituyentes celulares o cualquier otra función biológica energético dependiente. La forma de almacenar la energía proveniente de la luz, es mediante la formación de ATP, e indirectamente en polímeros degradables como glucógeno, betapolihidroxibutirato (PHB). La síntesis de ATP en bacterias fotosintéticas es mediante una fotofosforilación cíclica, producto del funcionamiento del Sistema I. El CO_2 es asimilado durante la fase oscura de la fotosíntesis, principalmente para la síntesis de carbohidratos pero también de otras moléculas. En las plantas verdes, el CO_2 es fijado mediante el Ciclo de Calvin y en algunos casos esta vía es apoyada por la llamada "Vía de los ácidos dicarboxílicos C_4 ". Las bacterias, al igual que las plantas verdes, poseen el citado Ciclo de Calvin, pero algo muy importante es que esta vía no es exclusiva de los microorganismos fotosintéticos. Lo que se ha observado es que en algunas bacterias se encuentra una segunda vía que sirve como apoyo a la primera, y se le conoce como Ciclo Reductor del Citrato o Reversa del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. Los pasos particulares, así como enzimas que intervienen son tratados en el capítulo II sección B.

En la tabla No. 2, se resumen las características de los grupos nutricionales de microorganismos fotosintéticos.

A continuación se presentan las características de los cuatro posibles grupos nutricionales de organismos fotosintéticos.

B.1.a) Microorganismos fotoorganoheterótrofos. Este grupo nutricional está representado por miembros de las bacterias púrpureas no sulfu-

	Plantas Verdes	Algas Eucariotas	Bacterias Verdes Sulfúreas Clorobiaceas	Sulfúreas Cromatíaceas	No Sulfúreas Rhodospirillaceas	Cianofíceas
Metabolismo Energético	Fotótrofo Obligado	Fotótrofo Obligado	Fotótrofo Obligado	Fotótrofo Obligado	Fotótrofo Facultativo	Fotótrofo Obligado
Reductores Fotosintéticos	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ (algunas cepas compuestos orgánicos)	H ₂ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ (algunas cepas compuestos orgánicos)	H ₂ , compuestos orgánicos, H ₂ S a bajos niveles.	H ₂ O
Deposición de Azufre			Fuera de la célula	Por lo general en el interior de la célula excepto Ectothiorospira	El S ⁰ no suele ser donador de electrones intermedio	
Respiración	Aerobio obligado	Aerobio obligado	Anaerobio obligado excepto Chloroflexis	Anaerobio obligado	Anaerobio facultativo	Aerobio obligado
Aparato o membrana fotosintética	Cloroplastos	Cloroplastos	Vesículas no continuas con la membrana plasmática	Láminas o tubos continuos con la membrana plasmática	Láminas o tubos continuos con la membrana plasmática	
Fuente de Carbono	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂ y algunos compuestos orgánicos superiores de 1C	CO ₂
Factores de crecimiento			Vit B ₁₂ o ninguno	Vit B ₁₂ o ninguno	Usualmente complejo	
Grupo Nutricional	Fotolitoautótrofo	Fotolitoautótrofo	Fotolitoautótrofo facultativo	Fotolitoautótrofo facultativo	Fotolitoautótrofo facultativo y algunas cepas quimiorganoheterótrofas	Fotolitoautótrofo

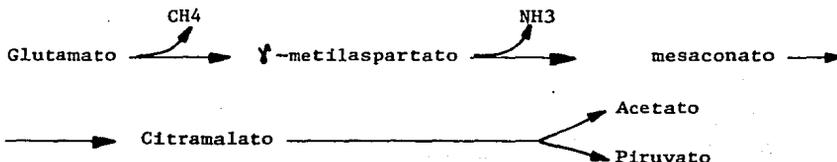
Tabla No. 2. Características de los grupos nutricionales de organismos fotosintéticos.

reas (familia Rhodospirillaceae) del género Rhodopseudomonas y del género Rhodospirillum, los cuales son capaces de crecer en una gran variedad de compuestos orgánicos de más de un átomo de carbono, entre los cuales están reportados más comunmente; ácidos grasos, aminoácidos, alcoholes, intermediarios del Ciclo de Krebs, carbohidratos, acetato y piruvato. Hay cierta predominancia del género Rhodopseudomonas para presentar este comportamiento. El metabolismo de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas ha sido estudiado por más de 40 años, así como también la cuestión de la autotrofia y fototrofia obligada. Que esto parece ser no tiene una relación simple, ya que se han encontrado bacterias que captan la luz mediante sus pigmentos y metabolizan compuestos orgánicos como primera fuente de carbono y/o de electrones. En la actualidad generalmente se admite que el mecanismo de asimilación de compuestos orgánicos por estas bacterias es similar a aquellos encontrados en los organismos heterótrofos típicos no fotosintéticos, especialmente si el Ciclo de Krebs esta completo. La familia Rhodospirillaceae, en general, tiene como característica ser fototrofa facultativa, por lo cual mientras crece en presencia de luz tiene una respiración anaerobia y metabolismo fotosintético; pero cuando está en la oscuridad tiene una respiración aerobia y metabolismo quimiosintético. A continuación haré una breve revisión de los substratos orgánicos utilizados por estas bacterias.

B.1.a.1) Utilización de glucosa y fructosa. (17). El crecimiento de Rhodopseudomonas sphaeroides en glucosa como fuente de carbono, fue reportado por vanNiel en 1944. Posteriormente se observó que este crecimiento era pobre (Szymona y Doudoroff, 1960), por lo que se prefirió probar otras sustancias tales como fructosa y manosa. Como resultado se obtuvo la producción del ácido 2-ceto 3-desoxiglucónico y además se encontró que la Vía de Embden-Meyerhof-Parnas (E.M.P.) es constitutiva. Posteriormente se trabajó con mutantes de esta especie, las cuales metabolizaron la glucosa por la Vía Entner-Doudoroff (E.D.), Rhodopseudomonas capsulata, generalmente no metaboliza la glucosa por la vía E.D., pero metaboliza la fructosa por la vía E.M.P. que es inducida por este carbohidrato. (17)

B.1.a.2) Utilización de glutamato y citrato. Rhodospirillum rubrum puede tener crecimiento tanto anaerobio en presencia de luz, como aerobio en la oscuridad, usando L o D-glutamato. Los estudios se han hecho

con este sustrato marcado e inhibidores metabólicos. (17) Los resultados han sugerido que Rs. rubrum utiliza el glutamato empleando el ciclo de Krebs. También hay una evidencia enzimática en los extractos libres de células de estos cultivos, de la presencia de una coenzima dependiente de la glutamato mutasa (17), que sugiere que el glutamato pueda ser asimilado a través de los siguientes pasos:



esta ruta es conocida en otro tipo de bacterias, como los clostridios.

B.1.a.3) Utilización de glicerol. El glicerol sirve como fuente de carbono para Rp. palustris y Rp. sphaeroides, pero no favorece el desarrollo aeróbico o fotosintético de Rp. capsulata y Rp. gelatinosa. Rhodospseudomonas sphaeroides degrada glicerol formando inicialmente glicerol-3fosfato el que es subsecuentemente convertido a dihidroxi acetona fosfato. Estas reacciones son catalizadas por una glicerocinasa soluble. Cuando estos organismos crecen en un medio que contiene tanto glicerol como malato, se consume primero el malato y en este lapso, las enzimas del metabolismo del glicerol están reprimidas. Una vez consumido el primer sustrato en una acción simultánea se elimina la represión de las enzimas para el glicerol y se reprimen las del malato.

B.1.a.4) Utilización del acetato. Desde 1951 se conoce la capacidad de Rs. rubrum para incorporar el carbono proveniente del acetato, por los trabajos de Cutenilli (17). Stainer por su parte desarrolló un trabajo (1959) donde muestra muy claramente que el carbono del acetato es asimilado directamente al polímero PHB. En presencia de CO₂, el carbono del acetato es encontrado en polisacáridos. Otra característica importante de Rs. rubrum es que no posee un ciclo activo para el Glioxilato, ya que está ausente la enzima isocitrato liasa esencial para dicho funcionamiento.

B.1.a.5) Utilización de alcoholes y D- y L-malato (17). Las bacterias púrpuras no sulfúreas generalmente se encuentran en habitats donde son acumulados los productos de fermentación de otros organismos. Rs. rubrum ha mostrado poseer la enzima alcohol deshidrogenasa que es inducible y facilita la utilización de algunos alcoholes producto de la fermentación. El crecimiento de esta bacteria en un medio de etanol incrementa la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en un 20% sobre el nivel encontrado cuando crece con malato.

B.1.b) Microorganismos fotoorganoautótrofos. En este grupo nutricional los organismos representativos son capaces de utilizar compuestos orgánicos y CO_2 para su crecimiento. Ahora se sabe que la principal función de los substratos orgánicos en las bacterias fotosintéticas es la de servir como verdaderas fuentes de carbono asimilable y no como lo sugiere Gaffron (17) que son exclusivamente fuente de electrones o poder reductor para el CO_2 . Con esto se supone que algunos substratos con cierto grado de oxidación pueden servir como fuente de carbono, por ejemplo azúcares y aminoácidos. Por otro lado, hay compuestos orgánicos (relativamente pocos) que solo donan electrones, como el isopropanol. Las especies incluidas en este grupo nutricional son de la Familia Clorobiaceae el género Cloroflexus, familia Cromatiaceae con las especies Thiocaspa roseopersicina y Chromatium vinosum y de la Familia Rhodospirillaceae, solo aquellas especies que son cultivadas bajo condiciones especiales, lo cual no ha permitido definir a ciencia cierta si se trata de una mutación o es una característica propia de la especie. En las figuras 2 y 3 se encuentran resumidas las características anteriormente mencionadas para la utilización de los diferentes compuestos orgánicos referidos.

B.1.c) Microorganismos fotolitoheterótrofos. Grupo nutricional representado en gran parte por las bacterias púrpuras del azufre pertenecientes al género Cromatiaceae. Tienen una gran tendencia hacia la utilización de compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones y presentan la capacidad de asimilar compuestos de más de un átomo de carbono. Las especies de la Familia Clorobiaceae

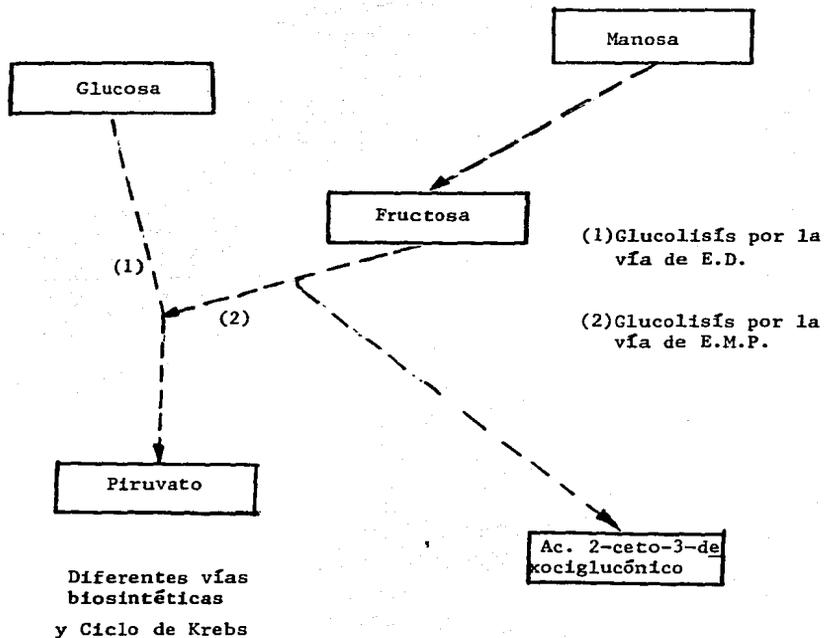


Figura No.2 Esquema para la utilización de compuestos orgánicos mayores de un átomo de carbono (1C), por microorganismos fotosintéticos pertenecientes a la Familia Rhodospirillaceae género Rhodospseudomonas y Rhodospirillum.

asimilan compuestos orgánicos sólo cuando está presente el CO_2 , lo que sugiere una dependencia metabólica de este compuesto.

Con respecto a lo estudiado sobre la Familia Rhodospirillaceae, se ha encontrado que algunas especies pueden oxidar compuestos reducidos de azufre como H_2S , pero sin acumulación de S^0 , porque se presenta una oxidación hasta sulfatos. Esta característica se ha observado en muy pocas especies, y sólo se ha conseguido en condiciones de cultivo muy estrictas y con eliminación de los productos de desecho de los microorganismos. Debido a la anterior dificultad para su cultivo en presencia de compuestos de azufre a las especies de la Familia Rhodospirillaceae se les ha considerado como Bacterias púrpura no sulfúreas.

B.1.d) Microorganismos fotolitoautótrofos. Las plantas verdes y algas cianofíceas representan a este grupo de organismos. Tienen un comportamiento dependiente del CO_2 como fuente de carbono y del H_2O como donador de electrones.

B.2) Microorganismo Quimiosintéticos.

Los microorganismos quimiosintéticos como mencioné anteriormente, obtienen su energía de reacciones de oxidoreducción. También en este caso el ATP es la principal forma accesible de energía y se sintetiza mediante una fosforilación a nivel de sustrato u oxidativa, (este tema será objeto de estudio en el capítulo tres).

El resumen de las características nutricionales en los microorganismos quimiosintéticos están dadas en la tabla No. 3

GRUPO NUTRICIONAL	FUENTE DE ELECTRONES	FUENTE DE CARBONO	RESPIRACION	TIPO DE BACTERIAS QUE SE ENCUENTRAN INCLUIDAS
Quimioorganoheterótrofo	Carbohidratos, aminoácidos, gran variedad de compuestos orgánicos.	Gran variedad de compuestos orgánicos y algunas veces el CO ₂ .	Aerobia, Anaerobia y Fermentativa.	+ 90% de las bacterias conocidas.
Quimioorganoautótrofo	Metano, metanol, metilamina, formato, ocasionalmente glucosa y fructosa.	CO ₂ , metano, metanol, metilamina, formato.	Aerobia	a) Metano-oxidantes. b) Metil-, formato oxidantes.
Quimiolitoheterótrofo o Quimiolitoautótrofo facultativo.	Hidrógeno, compuestos reducidos de azufre = (H ₂ S, S ²⁻ , SO ₃ , S ₂ O ₃)	Principalmente CO ₂ y ocasionalmente glucosa y fructosa.		a) Bacterias del Hidrógeno. b) Bacterias del Azufre.
Quimiolitoautótrofo	Compuestos orgánicos de nitrógeno (NH ₃ , NO ₂)	CO ₂	Aerobia	Bacterias del Nitrógeno.

Tabla No. 3. Características nutricionales de los microorganismos Quimio-sintéticos. A continuación se describen las características nutricionales de los dos primeros grupos, los Quimiolitotrófos (auto y heterótrofos) serán tratados en el siguiente capítulo.

B.2.a) Microorganismos quimioorganoheterótrofos. Este grupo está integrado por la mayoría de las bacterias conocidas. Tienen la capacidad de asimilar una enorme cantidad de substratos para su crecimiento. Debido a esta capacidad presentan un comportamiento bioquímico de asimilación igualmente extenso. Revisar las características bioquímicas y fisiológicas de este grupo es tema fuera del objetivo de esta revisión bibliográfica, lo que se puede decir es que los estudios realizados en estas bacterias han tenido como resultado la creación de los pilares de la bioquímica microbiana por ejemplo, la descripción de rutas metabólicas tan importantes como las de Entner-Doudoroff, Embden Meyerhof Parnas, el Ciclo de Krebs, y muchas otras.

Los microorganismos quimioorganoheterótrofos de los géneros Desulfovibrio y Desulfotomaculan utilizan hidrógeno como fuente de electrones, como ya se dijo, pero tienen preferencia por los compuestos

orgánicos superiores a un átomo de carbono para la obtención de energía y carbono, además no poseen ningún mecanismo de asimilación para CO_2 por lo que a estos organismos los podríamos denominar Quimioorganoheterótrofos facultativos con respecto a la fuente de electrones.

B.2.b) Microorganismos quimioorganoautótrofos. Este grupo de bacterias está representado por aquellas que utilizan compuestos orgánicos de un átomo de carbono como fuente de electrones y carbono. Esta clase de bacterias las podemos dividir en dos subgrupos:

Bacterias
Quimioorganoautótrofas

Bacterias Metano-y Metanol-oxidantes

Bacterias Metilamina-y formato-oxidantes

B.2.b.1) Bacterias metano y metanol oxidantes (45, 88, 92). En realidad este grupo es muy reducido y ha sido poco estudiado. Las especies que han recibido mayor atención son: Pseudomonas methanica (conocida anteriormente como Bacillus methanicus), fue descrita en 1966; Pseudomonas mathanitrificans; Methanomonas mathanooxidans, descrita en 1964; Methylcoccus capsulata, descrita en 1966. Desde este año (1966), se han obtenido cerca de 100 especies de microorganismos metanooxidantes, los cuales se encuentran agrupados en los géneros que muestra la tabla No. 4

ORGANISMO	MORFOLOGIA	GRAM	MEMBRANAS INTERNAS	VIAS DE ASIMILACION
Methylosinus	Bacilo vibroide	(-)	II	Serina
Methylocystis	Vibrioide	(-)	II	Serina
Methanomonas	Bacilo corto	(-)	II	Serina
Methylomonas	Bacilo corto	(-)	I	Alulosa
Methylobacter	Bacilo corto	(-)	I	Alulosa
Methylococcus	Coco	(-)	I	Alulosa
Pseudomonas	Bacilo corto	(-)	I, II	Serina y Alulosa

Tabla No. 4. Características morfológicas de los géneros incluidos en el grupo de bacterias metano y metanol oxidantes.

Wittenburg, Wilkinson y colaboradores (18) han reportado que todas las bacterias metanooxidantes crecen en metanol y dimetileter, pero no en otros substratos. Las bacterias metanooxidantes más estudiadas son las siguientes:

Pseudomonas methanica. Fue inicialmente aislada por Söhngen en 1906 y nombrada por él como Bacillus methanicus, después en 1966 fue estudiada por Dworkin y Foster quienes la denominaron Pseudomonas methanica. Es un bacilo Gram negativo con flagelo polar simple, forma colonias rosa de 2-4 mm de diámetro cuando crece en placas de agar. Foster y sus colaboradores aislaron este microorganismo principalmente de agua de estanques o charcos.

Pseudomonas methanitrificans. Se hicieron varios aislamientos de bacterias metanooxidantes y fijadoras de nitrógeno, las cuales formaron colonias blancas o ligeramente amarillas. Las más comunes son bacilos Gram negativos móviles. Estos organismos no crecen en otra fuente que no sea la mencionada (no hay experimentos más detallados). Los aislamientos los realizó Davis en 1964 de fuentes naturales incluyendo muestras de suelos, las cuales se expusieron al meta

no o gas natural. El enriquecimiento fue logrado por transferencias sucesivas en medio líquido, eliminando simultáneamente la fuente de nitrógeno e incubándolos con agitación en atmósfera de metano a 30 C°.

Methanomonas methanooxidans. Los primeros reportes del aislamiento de esta bacteria fueron hechos por Brown y Stocks; Masleskey en 1964 (18). El inóculo se obtuvo de fuentes naturales como suelo, lodos, aguas de minas y desechos fecales de rumiantes. El crecimiento selectivo de estos microorganismos se logró en medio líquido a temperaturas de 28-30 C°, bajo una atmósfera de metano. De estos cultivos se hicieron una serie de transferencias, donde de la última se inocularon cajas con agar mismas que se incubaron en idénticas condiciones. Después de diez días de incubación se obtuvieron microcolonias ligeramente coloridas formadas por bacterias pleomoríficas Gram-negativas móviles y asociadas generalmente en rosetas. Las colonias nunca crecieron más de 0.1 mm de diámetro, aun con incubación prolongada.

Los estudios más recientes han incluido la observación de los cultivos al microscopio para llevar a cabo una temprana detección de crecimiento.

Methylococcus capsulatus. Este organismo fue aislado de aguas negras por Foster y Davis en 1966 (18). El primer aislamiento consistió en un cultivo líquido con agitación y atmósfera de metano a una temperatura de 50-55 C. El segundo aislamiento fue en medio mineral con agar. Lo que se obtuvo fueron colonias coloridas de 1 mm de diámetro que se observaron después de 10-14 días. Estos organismos son móviles capsulados de forma cocoide Gram negativos, agrupados generalmente en diplococos, termofílicos y termotolerantes. Solo en metano metanol producen un crecimiento significativo.

Methylosinus, Methylocistis, Methylomonas, Methylobacter, Methylococcus, son grupos de organismos que han mostrado un comportamiento no obligado a la oxidación del metano, por lo que se les considera metilótrofos facultativos pudiendo utilizar compuestos de más de un átomo de carbono, pero tienen las características de que cuando utilizan compuestos 1C, solo utilizan el metanol.

El grupo de las bacterias metanooxidantes en general se agrupa y describe morfológicamente en base a: tipo de formación de espora, las vías de asimilación para IC, así como también por las estructuras internas de la membrana que son diferenciables entre sí. Las estructuras de la membrana se han agrupado en dos tipos; 1.- Sistema de un par de membranas atravesando la célula. 2.- Sistema de un par de membranas que corren por la periferia de la célula. En ambos casos se encuentran distribuidas vesículas membranales.

B.2.b.2) Bacterias que asimilan metilaminas, metanol y formato. Estos organismos son aislados con medios selectivos conteniendo los substratos mencionados, y algunas veces con compuestos de más de IC. Varios de estos organismos se han encontrado junto con las bacterias metanooxidantes, pero se ha comprobado que no excretan metanol, formaldehído o formato como lo hacen éstas.

Para las bacterias metilaminas, metanol y formato oxidantes no hay estudios detallados sobre el mecanismo empleado para la asimilación de estos compuestos. Quizá sea debido a que la mayoría de ellas son bacterias llamadas heterótrofas y tal asimilación no es de gran importancia. En la tabla No. 5 se nombran las especies con las características morfológicas y asimilatorias más importantes de este grupo.

MICROORGANISMO	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y NUTRICIONALES
<u>Bacillus PM6</u>	Bacilo aerobio Gram positivo, crecen en trimetilamina, dimetilamina y metilamina.
<u>Bacterium 4B6</u>	Bacilo Gram negativo, no esporulado, crece en monometilurea.
<u>Bacterium formicum</u>	Bacilo Gram negativo, crece en formato aerobícamente en mezclas formadas por formato y ac. dicarboxílicos de 4 carbonos.
<u>Bacterium formooxidans</u>	Bacilo Gram negativo, no esporulado ni flagelado. Crece en formato, pero no en metanol u oxalato.
<u>Hypomicrobium ssp</u>	Bacilo poco colorido al Gram. Crece en metilamina, metanol, o formato, forma hifas terminales.
<u>Nitrobacter Winogradsky</u>	Bacilo corto Gram negativo. Crece muy lentamente en formato.
<u>Protaminobacter ruber</u>	Colonias rojas, crecen en metanol, metilamina y formato.
<u>Pseudomonas AM1</u>	Bacilos móviles Gram negativos, con flagelación simple polar. Colonias poco coloridas.
<u>Pseudomonas aminovorax</u>	Colonias rosas Gram negativas móviles. Crecen en metilamina y formato.
<u>Ps PP</u>	Colonias rosas parecidas a Pseudomonas AM1
<u>Vibrio extorquens</u>	Bacilo Gram negativo curvado, con flagelación polar simple. Crece en metanol, formato y oxalato.

Tabla No. 5 Características morfológicas y nutricionales de las principales especies que utilizan metilamina, metanol y formato.

B.2.c) Microorganismos quimiolitoheterótrofos. Bajo esta denominación se encuentran agrupados los microorganismos quimiosintéticos llamados comúnmente autótrofos. Debido a que estas bacterias son el objetivo del presente trabajo, las describiré con mayor detalle en el capítulo II.

CAPITULO II
FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE
MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS

A) Descripción General de los Grupos Principales de Microorganismos Quimiolitotrofos y Heterótrofos.

A.1.a) Bacterias del Hidrógeno

A.1.a.1) Características del grupo

A.1.a.2) Asimilación de CO_2 y relación con compuestos orgánicos

A.1.a.3) Enzimas en la utilización de hexosas y glucosa

A.1.a.4) Efecto del hidrógeno en la degradación de hexosas

A.1.a.5) Síntesis y función de las hidrogenasas

A.1.a.6) Formación y función de las enzimas del Ciclo de Krebs

A.1.a.7) Utilización de los compuestos de nitrógeno

A.1.a.8) Biosíntesis de aminoácidos

A.2.a) Bacterias del azufre

A.2.a.1) Thiobacillus thioparus

A.2.a.1.1) Metabolismo heterótrofo

A.2.a.2) Thiobacillus denitrificans

A.2.a.2.1) Metabolismo heterótrofo

A.2.a.3) Thiobacillus thiooxidans

A.2.a.3.1) Metabolismo heterótrofo

A.2.a.4) Thiobacillus ferrooxidans

A.2.a.4.1) Oxidación de sulfuros metálicos

A.2.a.4.2) Metabolismo del nitrógeno en thiobacillus ferrooxidans

A.2.a.4.3) Metabolismo del fósforo de Thiobacillus ferrooxidans

A.2.a.4.4) Papel de diversos iones en el metabolismo de thiobacillus ferrooxidans

A.2.a.4.5) Metabolismo heterótrofo

A.2.a.5) Thiobacillus novellus

A.2.a.5.1) Metabolismo heterótrofo

A.2.a.6) Thiobacillus A2

A.2.a.6.1) Metabolismo heterótrofo

A.3.a) Bacterias del nitrógeno

A.3.a.1) Aspectos metabólicos

A.3.a.2) Aspectos bioquímicos del Ciclo Krebs en las bacterias de nitrógeno

B) Vías de Utilización de los Diferentes Compuestos de Carbono

B.1) Compuestos Superiores de un Atomo de Carbono

B.1.a) Carbohidratos

B.1.b) Acidos orgánicos

B.1.c) Hidrocarburos

B.2) Compuestos de un Atomo de Carbono

B.2.a.1) Asimilación heterotrófica de CO₂

B.2.a.2.1) Ciclo de Calvin

B.2.a.2.2) Ciclo reductor del citrato

B.2.a.2.3) Vía de los ácidos

B.2.b) Utilización de compuestos monocarbonados orgánicos

B.2.b.1) Vía de la serina

B.2.b.2) Ciclo de Quayle

FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS QUIMILITOTROFOS

A) Descripción General de los Grupos Principales de Microorganismos Quimilitoauto y heterótrofos.

Estos organismos ocupan fuentes de electrones inorgánicos y fuentes de carbono variables. Se ha demostrado que son capaces de asimilar compuestos orgánicos superiores a 1C, aunque su principal fuente de carbono en la gran mayoría es el CO_2 . De lo anterior se deduce que en esta clase de organismos tenemos el comportamiento facultativo con respecto a la fuente de carbono. El comportamiento quimilitoautótrofo estricto, en realidad en la actualidad ya no es tan común encontrarlo como se pensaba por que muchas de las bacterias consideradas autótrofas (bajo la definición tradicional) se les ha encontrado un mecanismo quimioorganoheterótrofo parcial, pero tienen ciertas limitaciones metabólicas que discutiré posteriormente. Los microorganismos quimilitótrofos están enlistados en la Tabla No. 6. De estas tres clases se consideran quimilitoautótrofos estrictos a las Bacterias de Nitrógeno, aunque se ha observado que algunas especies de este último grupo son capaces de asimilar compuestos orgánicos, especialmente Nitrobacter. A continuación describiré cada uno de estos grupos de bacterias tomando en cuenta su morfología, fuente de aislamiento y comportamiento bioquímico y nutricional.

A.1.a) Bacterias del hidrógeno. Las "Knallgasbacterias" ha sido el nombre con el cual se ha conocido este grupo desde que Kaser en 1906 aisló la primera especie a la que llamó Bacillus pantotrophus. El nombre de Knallgasbacteria, deriva de "knallgas" que significa mezcla de gases hidrógeno-oxígeno, atmósfera empleada para el cultivo de esta clase de bacterias. La característica distintiva para el grupo es: Crecer en atmósfera de hidrógeno-oxígeno utilizando CO_2 y/o compuestos orgánicos como fuente de carbono y/o energía. Un gran número de investigadores se ha iniciado en el intento de explicar la relación que existe entre el metabolismo litoautótrofo y el organoheterótrofo (101)

FUENTE DE ELECTRONES	GENEROS	CARACTERISTICAS NUTRICIONALES
Hidrógeno	Hydrogenomonas Pseudomonas Micrococcus	Quimilitoautótrofos facultativos con respecto a fuente de carbono y electrones. Aerobios estrictos.
Nitrógeno *	Nitrobacter Nitrospira Nitrococcus Nitrosomonas Nitrospina Nitrosococcus Nitrosolobus	Quimilitoautótrofos estrictos, aunque se ha demostrado en baja proporción la asimilación de compuestos orgánicos superiores a 1C. Aerobios estrictos.
Azufre	Thiobacillus Macromonas Thiovolium Beggiatoa Thiotrix Thiospirillopsis Thioploca Thiospira	En su gran mayoría quimilitoautótrofos facultativos con respecto a la fuente de carbono principalmente. Aerobios y anaerobios facultativos.

Tabla No. 6. Características de bacterias quimilolitótrofas.

* No a todas las especies de estos géneros se les ha demostrado el metabolismo heterótrofo, por lo cual algunas especies están consideradas como quimilitoautótrofos estrictos.

En el grupo de las bacterias del hidrógeno tenemos incluidas especies de tres géneros, que son: Hydrogenomonas, Pseudomonas y Micrococcus, como lo muestra la Tabla No. 7.

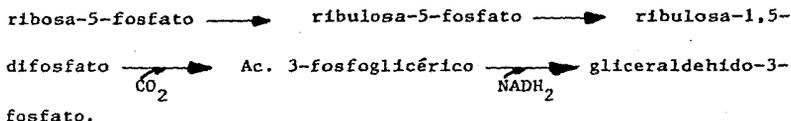
GENERO	ESPECIE	CARACTERISTICAS
Hydrogenomonas	<u>fecalia</u> <u>rublandii</u> <u>eutropha</u> <u>16</u> <u>1</u> <u>20</u>	Bacilos cortos Gram negativos, no fermentadores, poseen flagelación polar. Utilizan principalmente al hidrógeno como fuente de energía pero también utilizan compuestos de más de 1C como fructosa, gluconato, acetato, para fuente de carbono y/o energía.
Pseudomonas	<u>scacchorophila</u>	La separación de Hydrogenomonas es en base a pequeñas diferencias en el metabolismo bioquímico. Bacilos Gram negativo, poco fermentador móvil por flagelación.
Micrococcus	<u>dentrificans</u>	Cocos Gram positivos aerobios.

Tabla No. 7. Géneros incluidos en el grupo de las Bacterias del Hidrógeno.

A.1.a.1) Características generales del grupo. Morfológicamente es un grupo muy heterógeno, como lo podemos apreciar en la tabla No. 7. Con respecto a su fisiología se puede decir que la principal vía de asimilación para el CO_2 es la de Calvin. Este proceso ha sido confirmado en la mayoría de las especies. Poseen dos tipos de hidrogenasas; su capacidad respiratoria y la relación con la materia orgánica como fuente de carbono y/o energía ha sido objeto de estudio en los últimos años. (93)

A.1.a.2) Asimilación de CO_2 y relación con compuestos orgánicos (93, 101).

El CO_2 es asimilado mediante el ciclo de Calvin. Las enzimas características de esta vía son la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (RDPC) y la fosforribulocinasa (PRC). H.G. Schlegel y U. Eberhardt (101), proponen que estas enzimas son un sitio de control o regulación para la asimilación de CO_2 durante el crecimiento con compuestos orgánicos superiores a 1C y que dicha regulación esta influenciada por la cantidad y la relación que existe de la mezcla de gases hidrógeno-oxígeno durante el crecimiento celular. Los estudios realizados al respecto son los de McFadden y Tu (1965) que estudiaron la fijación de CO_2 en H.fecalis bajo las condiciones de mixotrofia. Lo que encontramos fue: la fijación de CO_2 es independiente de la cantidad de ribulosa difosfato exógena, pero depende de la cantidad de ATP y NADH_2 , presentando un comportamiento estimulatorio en la fijación. Por otro lado Mac Elroy y colaboradores en 1969 observaron que el NADH_2 no aumenta directamente la fijación de CO_2 , sino que funciona como un agente reductor para el 3-fosfoglicerato y mejor aún estimula la síntesis de la PRC, enzima importante en el ciclo de Calvin. Resumiendo, la PRC es afectada alostéricamente por el ATP y es inhibida por el AMP. Basándose en lo anterior se diseñó un experimento con la ribosa-5-fosfato y ATP como sustratos. La secuencia de reacciones.



se aumentó de 7 a 20 veces por la adición de NADH_2 1mM. El adenosin monofosfato en concentración 5 mM abolió el efecto del NADH_2 . En contraposición, ni la carboxilación de la ribulosa difosfato ni la isomerización de la ribosa-5-fosfato fueron influenciadas. Estos investigadores siguiendo el lineamiento de sus experimentos realizaron estudios sobre la síntesis de la RDPC y PRC, variando la concentración de hidrógeno y oxígeno en la atmósfera, los resultados reportados son: La síntesis de ambas enzimas son relativamente independientes de la concentración de los gases H_2 y O_2 en la atmósfera, así como también del CO_2 , esto ha originado que se les considere enzimas constitutivas. También se demostró que no son necesarias las condiciones de litoautotrofia para realizar la síntesis de las enzimas RDPC y PRC. A pesar de esto los autores no creen correcto descartar algún otro factor diferente al H_2 , O_2 y CO_2 como inductor, porque se observó que la cantidad de ambas enzimas está influenciada por el tipo de sustrato orgánico utilizado y en el caso de H. fecalis por la presión de O_2 . Diversos autores utilizando medios de cultivo adicionados de fructosa han determinado la actividad de la RDPC en H. fecalis e H. eutropha. De estos últimos estudios es de considerarse la observación de que ambas especies si crecen con fructosa y tienen una actividad de RDPC ligeramente menor a la obtenida en condiciones de litoautotrofia (no se demostró para PRC) (101). Para H. fecalis esto también se cumple para cuando crece con glucosa, otros sustratos que causaron el mismo efecto en estas especies de *Hydrogenomonas* fueron el glutamato y alanina (con 36 y 27% de actividad respectivamente comparadas con el crecimiento litoautótrofico); en contraste con esta observación el acetato y piruvato reprimieron completamente la síntesis de la enzima RDPC. McFadden (1968) estudió las condiciones que permiten la gran actividad de la enzima RDPC en H. eutropha e H. fecalis durante el crecimiento con fructosa. Las condiciones requeridas son: a) los cultivos no deben tener aereación violenta. b) deben contener cloruro férrico. c) las células deben ser transferidas al cultivo heterótrofo durante la fase inicial logarítmica. Siguiendo estos puntos se puede mantener la alta actividad de la enzima RDPC durante seis subcultivos. El requerimiento del ion férrico fue descubierto en el mismo experimento porque se observó que cierto tipo de citocromo "c" y la

enzima mencionada son sintetizados en cantidades proporcionales durante el crecimiento, la razón para esta síntesis coordinada es aún desconocida, pero Lascale (101) propuso una hipótesis -no hay estudios detallados que la respalden- donde sugiere una relación directa de la cadena respiratoria con la producción de RDPC. Hasta la fecha de esta revisión bibliográfica no se encontró ningún reporte que explique claramente el comportamiento de las síntesis RDPC durante el crecimiento organoheterótrofo y la influencia de los substratos orgánicos usados en cada caso, solo Schlegel y Eberhardt (101) presentan en su reporte la siguiente hipótesis. "La fructosa, glucosa y ribosa inducen la síntesis de RDPC porque son fácilmente convertidas en ribulosa 1-5-difosfato, con lo que la vía de Calvin debe contribuir considerablemente a la síntesis de material celular durante el crecimiento con estos carbohidratos".

Stukus y DeCicco (116) realizaron estudios en condiciones de mixotrofia. Cuando se adiciona un substrato orgánico junto con uno inorgánico (CO_2) producen un metabolismo autótrofo-heterótrofo (mixótrofo) simultáneo durante la fase inicial de crecimiento. Como evidencia tenemos el alto rendimiento en biomasa; un cambio rápido opera cuando el substrato orgánico se agota (ya que se utiliza con mayor rapidez que el CO_2). Para este experimento se usaron substratos orgánicos tales como acetato, piruvato y glutamato. En la primera fase predominaron las enzimas características del metabolismo heterótrofo, el período duró aproximadamente 5-8 hrs. A partir de este punto, las enzimas propias del metabolismo autótrofo empezaron a sintetizarse con mayor rapidez, lo que hace suponer un mecanismo de represión por parte de los substratos orgánicos para las enzimas del ciclo de Calvin, principalmente para la RDPC. Las curvas de crecimiento obtenidas para H. eutropha, bajo condiciones heterótrofas y mixotróficas, utilizando glutamato se ilustran en las figuras 4a y 4b (101). Los mismos autores obtuvieron curvas similares para piruvato y acetato.

Las observaciones realizadas en estos experimentos fueron: 1.- Durante el crecimiento heterótrofo con acetato y piruvato, la RDPC es tá presente pero con muy baja actividad. 2.- Bajo condiciones mixotróficas presenta el mismo comportamiento hasta que el substrato se agota, pero el nivel es mayor durante la fase autotrófica que cuando

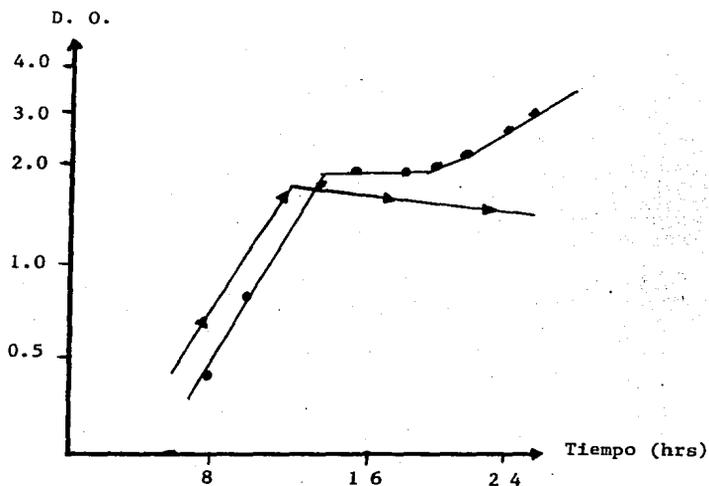


Figura No. 4 Crecimiento *Hydrogenomonas eutropha* en medio mineral conteniendo 0.2% de L-glutamato incubación con atmósfera de 70% H₂ y 30% CO₂ (●) y atmósfera aire (▲). El eje de las ordenadas está en escala logarítmica. (102)

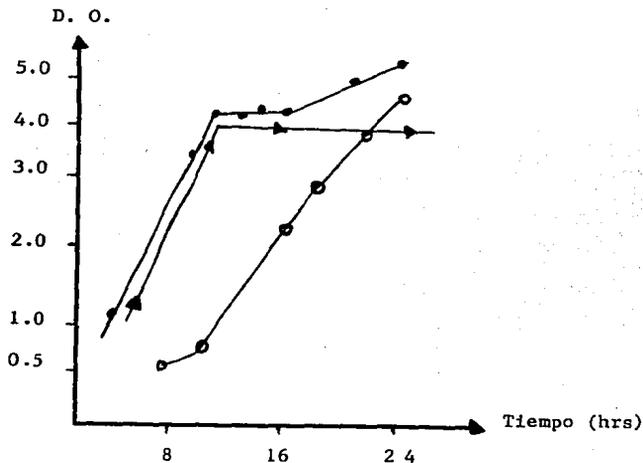


Figura No. 4 Crecimiento de *Hydrogenomonas eutropha* bajo condiciones litótrofas (●), organótrofas (▲), y mixótrofas (○). Para el crecimiento (▲) y (○) se adicionó 0.3% piruvato al medio mineral. Incubación para (▲) fue con aire y para (○), (●) con atmósfera 70% H₂, 20% O₂ y 10% CO₂. (102)

crece en un cultivo litoautótrofo simple. 3.- La adición de acetato y piruvato a un cultivo en condiciones autotróficas tienen poco efecto en la actividad de la RDPC, lo cual evidencia que estos subtratos no inhiben directamente la acción de la enzima.

A.1.a.3) Enzimas en la utilización de hexosas y gluconato (101). La especie H. 16 no es capaz de usar glucosa, manosa, ribosa o xilosa para su crecimiento solo utiliza la fructosa. La gran mayoría de las especies incluidas en el grupo de las bacterias oxidadoras de hidrógeno solo utilizan este carbohidrato, y en muy raras ocasiones la glucosa, como es el caso de H. eutropha. La fructosa es degradada por la vía de E.D.; los cultivos de H. 16 con fructosa contienen gran cantidad de enzimas como fosfoglucosa isomerasa, glucosa-6fosfato deshidrogenasa y las enzimas propias de la vía E.D., (6-fosfogluconato deshidrogenasa y 2-ceto-3 desoxi-6 fosfogluconato deshidrogenasa). Esto ha sido el resultado de trabajos realizados con mutantes de H. eutropha e H. 16 por Schlegel y Eberhart (101). Los mutantes son producto de una selección natural o de tratamientos con radiaciones ultravioleta y nitritos, las conclusiones de tales experimentos se pueden resumir en: a) los carbohidratos inducen las enzimas necesarias para su utilización, b) las células que crecen quimiolitótróficamente no pueden utilizarlos, c) la inducción de enzimas es específica, d) otros substratos orgánicos a los antes mencionados no producen efecto inductor en la síntesis de enzimas, y e) no hay inducción de enzimas específicas en presencia de clorafenicol para la glucosa o fructosa.

Durante el crecimiento autotrófico la actividad de las enzimas de la vía E.D. es muy bajo, por lo tanto es difícil de ser detectado. Se piensa que la diferencia para asimilar glucosa se deba a permeasas específicas en la membrana, responsables del transporte de glucosa y fructosa en las células de Hydrogenomonas 16⁺ e Hydrogenomonas g⁺ que son dos mutantes con transporte positivo para estos carbohidratos.

El gluconato es utilizado también como sustrato de asimilación, permitiendo la formación de productos de reserva como el polihidroxibutirato (PHB) que es sintetizado más rápidamente con gluconato que con fructosa. El gluconato se metaboliza por la vía de E.D.

Los resultados que sirven de base para la afirmación anterior son (101): a) se encontró una actividad elevada de las enzimas específicas de la vía E.D. en extractos crudos de células cultivadas en un medio con gluconato, esta actividad es comparable con la presentada en los cultivos con fructosa, b) los mutantes que pierden enzimas como 2ceto-3desoxi-6fosfogluconato aldolasa no crecen con fructosa o gluconato, c) 6fosfogluconato deshidrogenasa esta presente, tanto en las células que crecieron con fructosa o gluconato. De los resultados (b) y (c), se deduce que el gluconato no se puede degradar por la vía de las pentosas fosfato. La fosfoglucona isomerasa y gluconosa-6fosfato deshidrogenasa no son inducidas durante el crecimiento con gluconato, su actividad específica es ligeramente superior a las presentadas en condiciones quimiolitótroficas. En este aspecto, H. 16 difiere marcadamente de H. fecalis porque durante el crecimiento con gluconato, las enzimas hexocinasa, fosfoglucona isomerasa, y gluconosa 6-fosfato deshidrogenasa (NAD- y NADP- dependientes), son inducidas por la adición de la gluconocinasa y enzimas de la vía E.D. Contrariamente a H. 16, H. fecalis es capaz de usar glucosa y además de las enzimas de E.D. contiene una enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente del NAD, la cual es inducida durante el crecimiento con hexosas o gluconato (101).

El acetato ha mostrado ser un buen sustrato, para las Hidrogenomonas, aunque H. eutropha la máxima cantidad que tolera es 0.5% p/v, arriba de esta concentración ocurre la inhibición. La activación de este sustrato es mediante la acetil-CoA cinasa. Cuando los cultivos crecen quimiolitótróficamente con o sin compuestos orgánicos y luego son transferidos a un medio que contenga acetato las enzimas que ayudan a degradar este sustrato son sintetizadas rápidamente por inducción. Tales enzimas son: Acetil-CoA cinasa, Isocitrato liasa, y Malato sintetasa, enzimas propias del Ciclo de Glioxilato.

A.1.a.4) Efecto del hidrógeno en la degradación de hexosas. Los estudios realizados por Schlegel y Eberhart (101); Sindy C. Rittenbeg (92) con las bacterias del hidrógeno, abarcaron también el efecto de este gas en la síntesis y/o función de las enzimas responsables de la degradación de hexosas, en este caso las pertenecientes a la vía de E.D. Fig. 5

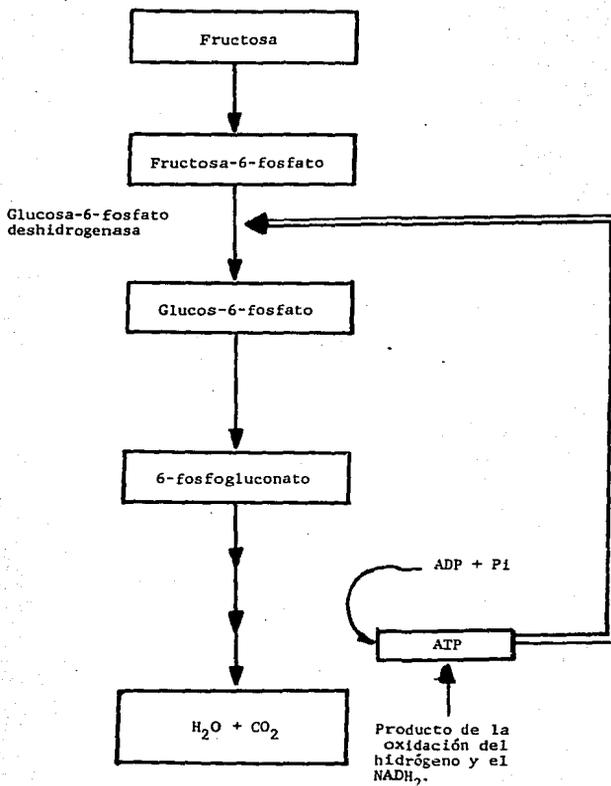


Figura No. 5 Regulación de la degradación de la fructosa (metabolizada por la vía de E.D.), por una inhibición alostérica por el ATP a nivel de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos fueron concluyentes: el hidrógeno tiene un efecto inhibitorio de la función de las enzimas y represor en sus sin tesis. El efecto del hidrógeno en la utilización de compuestos orgánicos fue observado primeramente en la síntesis del PHB porque estas bacterias incorporan más lentamente hidroxibutirato y acetato al polímero cuando crecen en una atmósfera de H_2/O_2 (80/20%) que cuando están en presencia de oxígeno solo. La inhibición es más pronunciada cuando la fructosa está presente. Las enzimas incluidas en la degradación de fructosa son rápidamente sintetizadas cuando un cultivo litoautótrofo se pasa a un medio nutriente adicionado de fructosa. Como consecuencia de esta última observación los mismos autores diseñaron otro experimento para comprobarla: variando la atmósfera y manteniendo constante la fructosa en el medio.

En el primer experimento se proporcionó knallgas y en el segundo atmósfera de oxígeno solo. Se observó que la fructosa solo era utilizada cuando el cultivo se encontraba en ausencia de hidrógeno.

Todas las especies estudiadas hasta ahora han presentado este comportamiento, entre ellas se encuentran H. eutropha, H. runlandii, H. fecalis. De lo anterior se puede postular que este comportamiento es general para las Hydrogenomonas. Por lo que respecta a M. den trificans, mostró ser su crecimiento en fructosa independiente de las condiciones de la atmósfera.

En los mismos estudios (93, 1010) se reportó que cuando las Hydrogenomonas eran transferidas de un cultivo organoheterótrofo a un litoautótrofo con fructosa adicionada, las enzimas que estaban presentes provenientes del cultivo heterotrófico presentaban una inhibición en su acción, pero se detectó crecimiento. Otros compuestos orgánicos se probaron en las mismas condiciones que la fructosa, entre ellos contamos al lactato, succinato y piruvato. Lo observado fue: la iniciación del crecimiento es independiente del tipo de atmósfera empleada. Sin embargo este crecimiento es inhibido si el acetato, glutamato o fructosa están presentes en el medio. Usando la especie H. 16⁺ (glucosa positiva) se encontró que la adición del CO_2 , peptona o lactato a una suspensión de estas células, que crecieron previamente en condiciones litótroficas con fructosa incluso en el medio original, no se liberó del efecto represor del hidrógeno con respecto a la formación de las enzimas de la vía de E.D. aun

que la especie de Hydrogenomonas tratada anteriormente mostró crecimiento a expensas de los substratos adicionados, además se mostró que el lactato, acetato, glutamato y piruvato no inhiben la síntesis de las enzimas de la vía E.D.

Los mutantes de Hydrogenomonas 16 las cuales han perdido la enzima hidrogenasa no crece quimiolitotróficamente, por lo tanto no responden a los cambios de atmósfera. Mencioné anteriormente que el acetato actúa en estas especies como un "substrato represor". Esto es, cuando un cultivo de H. 16 es transferido a un medio que contenga acetato y se cultiva en una atmósfera de knallgas, el crecimiento el crecimiento se inhibe. Usando la mutante Hydrogenomonas 16, se mostró que bajo estas condiciones las enzimas representativas del Ciclo de Glixilato se mantienen constantes por 24 hrs. y se incrementan inmediatamente cuando la atmósfera de knallgas es sustituida por oxígeno. El efecto del hidrógeno es similar al de la glucosa y ha sido interpretado como una represión catabólica. Muchas investigaciones tienen como objetivo dilucidar el mecanismo por el cual se causa la represión catabólica. Se ha postulado (Magasanik, 1961) que la capacidad de represión de un operón es independiente de la concentración de uno o algunos metabolitos formados durante la degradación de los substratos utilizados, como lo son el ATP y NADH_2 u otro metabolito. La localización y análisis de las causas del "efecto hidrógeno" han sido objeto de arduos trabajos que aún no llegan a explicar el mecanismo. Lo que se ha reportado al respecto es: Se ha encontrado que el efecto de la represión en las enzimas de la vía E.D., no solo es a nivel de síntesis, sino que también afecta a las que ya están sintetizadas. Esta inhibición se refleja de una manera drástica en la síntesis de PHB.

El gluconato no es afectado por la presencia del hidrógeno, pero este substrato es metabolizado por la misma vía que la fructosa; entonces se piensa que la inhibición sea a nivel de la enzima gluconosa-6fosfato deshidrogenasa. La deducción para este comportamiento lo proponen los autores Schlegel y Eberhardt en su reporte de 1972 (101). "La inhibición de la degradación de la fructosa depende solamente del hidrógeno, ya que éste, por el producto de su oxidación (NADH_2) hace que la relación ATP- NADH_2 sea elevada, condición suficiente para la degradación sea suspendida" fig. 6.

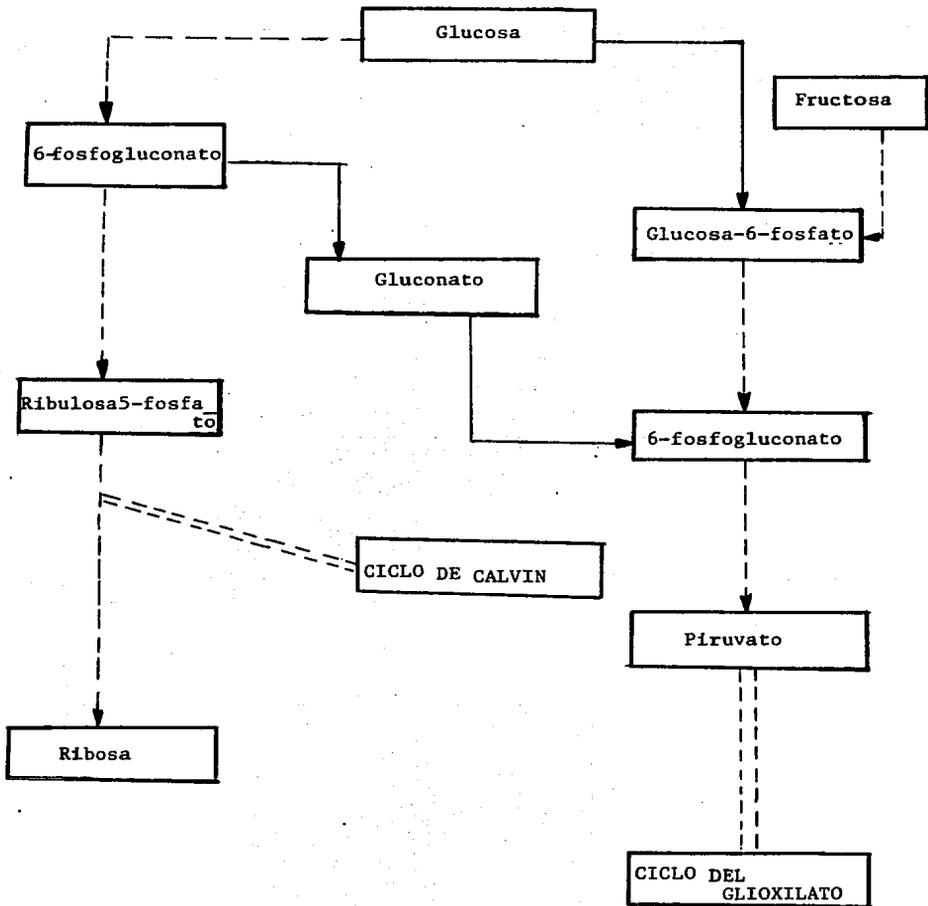


Figura No.6 Mecanismo de asimilación para la glucosa, fructosa y gluconato, presentado por la mayoría de las Hydrogenomonas.

A.1.a.5) Síntesis y función de las hidrogenasa (101). El mantener los cultivos de bacterias del hidrógeno en condiciones heterotróficas da como resultado en algunas ocasiones, la pérdida de la capacidad de oxidar hidrógeno, según lo reportado por Syndey C. (93). Sin embargo, ciertas especies que crecen heterotróficamente durante muchos cultivos retienen su capacidad quimiolitótrofa. Este autor supone que la pérdida irreversible de las hidrogenasas sea producto de una selección natural de mutantes la cual es independiente de las condiciones heterótroficas.

La regulación de la formación de las hidrogenasas ha sido discutida por varios autores, entre los que encontramos a Schlegel, 1966; Peck, 1968; Rittenberg, 1969. De estas revisiones sin embargo solo se mencionan ciertos aspectos del mecanismo, ya que en general se le ha puesto poca atención a este punto. Las características y propiedades de las hidrogenasas las encontramos resumidas en los artículos realizados por Syndey (93), y Schlegel (101), los cuales han servido de base para esta información. La actividad de la hidrogenasa se determina generalmente por la cantidad azul de metileno reducido por células intactas de estos cultivos. Las Hydrogenomonas poseen dos clases de hidrogenasas, una ligada a la membrana y la otra en la fracción hidrosoluble de los extractos. Por el método de la reducción de azul de metileno se determina solo la actividad de la hidrogenasa ligada a la membrana. Por ejemplo: H. fecalis posee ambos tipos de enzima (hidrogenasa e hidrógeno deshidrogenasa), por lo cual su determinación debe ser por separado. En H. ruhlandii, H. 16 y Ps. saccharophilis los niveles de ambas enzimas se incrementan y decrecen adaptativamente cuando las células son transferidas de un cultivo organoheterótrofo a un litoautótrofo o vice-versa. Como consecuencia se supone que la síntesis de estas enzimas está ligada a un sistema de regulación muy sensible, el cual no ha podido ser establecido. Como consecuencia de las observaciones realizadas sobre la actividad de las hidrogenasas en cultivos heterótrofos, se han propuesto varias hipótesis; a) las hidrogenasas que son inducidas por el hidrógeno y/o CO₂, no están sujetas a la represión catabólica por substratos orgánicos; b) la formación de hidrogenasas es independiente de la presencia del hidrógeno, pero está reprimida por compuestos orgánicos; c) las hidrogenasas son inducidas

por el hidrógeno, la inducción se reprime por compuestos orgánicos. Está bien establecido en H. 16, que ambas enzimas son sintetizadas durante el crecimiento heterótrofico con ciertos substratos orgánicos, por lo que la hipótesis (b) no es correcta, además las hipótesis (a) y (c) son incorrectas por que las hidrogenasas no son totalmente dependientes de la presencia de hidrógeno. Tres razonamientos deben ser tomados en cuenta para poder tener una idea más clara de los factores que influyen la síntesis de estas enzimas: 1.- Las hidrogenasas no están sujetas a una regulación de inducción-represión y se sintetizan aunque estén presentes compuestos que puedan causar represión catabólica: 2.- Las hidrogenasas son enzimas semi-constitutivas, por ejemplo se sintetizan en mínima cantidad cuando el substrato inductor está ausente: 3.- Estas enzimas tienen controlado su mecanismo de síntesis por factores endógenos que están medianamente relacionados a la presencia de hidrógeno y compuestos orgánicos, por ejemplo la cantidad intracelular de ATP y NADH_2 . Schlegel (101) menciona que la suposición de que el hidrógeno no afecta directamente la síntesis de las hidrogenasas fue confirmada en algunos experimentos, por ejemplo los relacionados con H. eutropha la cual es mantenida en un medio con lactato y tiene como resultado la producción de las dos enzimas. Para confirmar la conclusión de que el hidrógeno no controla totalmente la síntesis de las hidrogenasas los investigadores Bovell 1957, Rittenber, 1969; Stukus y DeCicco, 1970 llevaron a cabo otros estudios con diferentes compuestos orgánicos y distintas especies de *Hydrogenomonas*, encontrando en la gran mayoría, resultados muy parecidos. Por otro lado, se reportó también que la síntesis de las hidrogenasas se ve afectada por la presencia de oxígeno produciendo un efecto inhibitorio. La pregunta obvia que surge de este comportamiento es: ¿Como se lleva a cabo la oxidación del hidrógeno?. La respuesta ha sido objeto de varios estudios entre los que tenemos a los de: Labadeff, 1910 y Ruhlan, 1924; donde reportaron la oxidación del hidrógeno en ausencia de CO_2 , Bartha, 1962, observó la disminución de la oxidación en las especies H. eutropha y H. runlandii, lo más importante es que propone una hipótesis (que mencionaré más adelante) para explicar dicho comportamiento.

A la disminución de oxidación de hidrógeno por la ausencia de CO_2

se le conocia desde 1910 como "Oxidación de Leerlauf". Eberhart en 1969, obtuvo el crecimiento de algunas de las bacterias del hidrógeno (no especifica cuales) donde dicha oxidación no esta afectada por la ausencia o presencia de CO_2 .

Como podemos observar, la relación que existe entre la oxidación del hidrógeno y la asimilación de CO_2 no es simple. Investigadores como Hippe, Schlegel y colaboradores, Pfitzner, (101) han realizado estudios partiendo de los resultados obtenidos por Bartha, con la finalidad de confirmar la hipótesis propuesta.

La hipótesis de Bartha dice: La inhibición del consumo de los gases hidrógeno-oxígeno (knallgas) es un efecto de regulación por retroalimentación causado por el nivel intracelular de ADP, asumiendo que el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa es tan estrechamente ligadas. Además, tratando de explicar el funcionamiento de esta retroalimentación expuso: "en presencia de CO_2 el ADP es constantemente regenerado por la utilización de ATP durante el crecimiento energético-dependiente (fase de adaptación y fase logarítmica principalmente) o en fase estacionaria por la síntesis de PHB, siendo así posible oxidar la máxima cantidad de hidrógeno. En ausencia de CO_2 , el ADP es regenerado por cualquier otra reacción consumidora de energía.

Ahrens en 1966, pudo demostrar cierta parte de la hipótesis porque con sus experimentos se comprobó que la fijación de CO_2 si está influenciada por el nivel intracelular de ATP (por consiguiente de ADP y NADH_2). Además observó que al eliminar el CO_2 de la atmósfera del cultivo, el nivel intracelular de ATP se incrementa en un 30% y la relación $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ sube de 0.5 a 1.4 unidades. Ahrens aclaró en su reporte que el consumo total de hidrógeno no era exclusivamente para la asimilación de CO_2 , sino que también se utiliza para la reducción de oxígeno, con producción subsecuente de energía mediante la fosforilación oxidativa, por lo cual la cantidad de hidrógeno consumido no debe ser proporcional a la cantidad de energía producida.

Hippe en 1967 propuso: "Si la hipótesis de Bartha es correcta, entonces la oxidación de Leerlauf debería ser estimulada si el transporte de electrones es desacoplado artificialmente y la cantidad de hidrógeno-oxígeno consumido debe ser disminuido drásticamente

cuando la fijación de CO_2 sea inhibida". Sin embargo, este autor en contró que el 2,4-dinitrofenol no tiene influencia en la oxidación de Leerlauf, además la carbonilcianuro-mclorafenil hidrazona estimu la el consumo de la atmósfera knallgas en 2.5 veces.

Bartha por su parte realizó el mismo experimento pero con ácido monoiodoacético, obteniendo un 96% de inhibición, porque bajo estas condiciones si se cumple con la oxidación de hidrógeno propuesta por él. En 1970 Schlegel y colaboradores trabajaron con mutantes de Hydrogenomonas 16 (101), las cuales fueron capaces de crecer qui militótróficamente consumiendo CO_2 , pero incapaces de formar PHB. Las células de estas bacterias cuando se encuentran en fase estacio naria son incapaces de asimilar CO_2 , aunque si presentan una cierta estimulación en el consumo de la mezcla de gases en presencia del CO_2 , (no todas las bacterias probadas mostraron este comportamien to). Como consecuencia de estos últimos estudios, se propuso que la relación de ATP con el consumo de hidrógeno es más directa de lo que supone Bartha.

Esta posible influencia del CO_2 o de algún producto de asimilación y la función de las enzimas hidrogenasas es desconocido aún.

En uno de los estudios más recientes, (Pfitzner, 1970) esta repor tando que la enzima del hidrógeno llamada hidrógeno deshidrogenasa (es la que está unida a la membrana) no está influenciada por la presencia de bicarbonato y es ligeramente estimulada por la presen cia de ATP y NADH_2 .

Schlegel y Eberhardt por su parte, mencionan que hay dos posibilida des de explicar la oxidación de Leerlauf: 1.- El hidrógeno es oxida do mediante el transporte de electrones y está acoplado a la fosfo rilación oxidativa. 2.- El ATP es hidrolizado por la ATP-asa o con sumido por reacciones energético-dependientes no relacionados con la síntesis de material celular. En relación a esto, la formación de polifosfatos y el mantenimiento del metabolismo son tomados en consideración dentro de estas posibilidades. La formación de poli fosfatos en Hydrogenomonas 20 (observada por Kaltwasse, 1962) no se ha demostrado en ausencia de CO_2 , (Schlegel, 1965). Otro comporta miento que se esperaría, de ser ciertas las dos suposiciones ante riores sería: Si el mantener el metabolismo consume ATP y la mezcla de gases H_2/O_2 es proporcional a la cantidad de masa celular, enton

ces la energía consumida es gastada en dichos procesos. Tal comportamiento no ha sido demostrado para H. eutropha, (Bongers, 1970). (102) Bongers determinó el consumo de hidrógeno, oxígeno y CO_2 , limitando cada uno de estos gases por separado. Con tales condiciones, demostró que durante la limitación de hidrógeno y oxígeno la cantidad consumida de estos tres gases es muy leve comparada con lo consumido en cultivo libre, pero las proporciones de consumo se guardaron en los experimentos, por otro lado trabajó con H. 16 la cual no formó polifosfatos. Con las observaciones anteriores se propone la siguiente conclusión: "Si Hydrogenomona 16, es realmente incapaz de formar polifosfatos en ausencia de CO_2 , entonces una buena porción de la cadena respiratoria puede estar ligada al oxígeno directamente por una salida auxiliar mediante la reacción de alguna flavina o citocromo de tipo b.

No se sabe aún si estas consideraciones son aplicables a las especies para las que el CO_2 no ejerce ninguna influencia. Hay que recordar que estas observaciones fueron reportadas por Eberhart en 1960 y las especies que mostraron tal comportamiento fueron Hydrogenomonas 12, H 60, H.x por lo que quizá en el presente estos resultados puedan ser modificados.

A.1.a.6) Formación y función de las enzimas del Ciclo de Krebs, (103). En los estudios realizados por Hirotsuka, y Yasuo (102), Schlegel y Eberhard, (102) bajo condiciones quimiolitótrofas, con la finalidad de describir la formación y función de las enzimas del Ciclo de Krebs, se observó que las bacterias del hidrógeno derivaron su poder reductor de la reacción de la hidrogenasa, produciendo el NADH_2 necesario para su funcionamiento, por lo que el Ciclo de Krebs sirve como una vía puramente biosintética.

En los experimentos realizados para identificar la cantidad y características de las enzimas del Ciclo de Krebs sintetizadas se utilizaron atmósferas H_2 y/o O_2 . Bajo condiciones de Knallgas las enzimas del Ciclo son inhibidas parcialmente. Se piensa que esto pueda ser consecuencia de la alta relación $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ causada por la oxidación del hidrógeno. También se reportó en algunas especies de *Hydrogenomonas* que la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, isocitrato liasa, malato sintetasa y NADH -oxidasas no están presentes cuando estas bacterias han crecido en atmósfera de H_2/O_2 . La ausencia de las enzimas es individual y no en conjunto en una sola especie.

A.1.a.7) Utilización de los compuestos de nitrógeno (90). El requerimiento de nitrógeno en *Hydrogenomonas eutropha* e *H. fecalis* fue estudiado por Sindy (93). Este requerimiento puede ser suministrado por compuestos de amonio, nitrato, urea, aminoácidos y derivados de purina. Algunas de las enzimas incluidas en el metabolismo del nitrógeno están sujetas a una regulación de tipo represión-desrepresión. *H. 16* después de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno contiene una enzima nitrato reductasa ligada a la membrana (Pfitzner, 1969). El paso reductivo de nitrato a amonio parece ser un factor que limita el crecimiento, porque los cultivos autótrofos y heterótrofos crecen más rápido algunas veces con amonio que con nitrato. En *Micrococcus denitrificans* la reducción asimilatoria, porque la enzima que actúa en la asimilación es reprimida por el amonio según Chang y Morris (102).

H. eutropha e *H. 16* contienen diferentes enzimas glutamato deshidrogenasa, una dependiente del NAD^+ y otra del NADP (102). Para ambas especies se comprobó que la enzima dependiente del NAD^+ está operan

do en la degradación del glutamato y la dependiente de NADP está explicada en la biosíntesis. La relación de los niveles de las glutamato deshidrogenasas fueron dependientes de las condiciones de cultivo, además presentan una síntesis no coordinada, aunque sus niveles de actividad no son tan diferentes. En H. eutropha la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente fue poco menos que independiente de la fuente de nitrógeno utilizada, por ejemplo, cuando se usó cloruro de amonio, L-glutamato o L-aspartato las variaciones estuvieron entre 5.2 y 7.4 nmolNADP/min/mg de proteína. La actividad de la otra enzima glutamato deshidrogenasa fue baja (cerca de 0.2 nmolNAD/min/mg. de proteína) usando cloruro de amonio como substrato, pero alcanzó un máximo (0.9 nmolNAD/min/mg proteína) cuando se utilizó glutamato. En H. 16 la relación de las dos enzimas se mantuvo constante bajo todas las condiciones de crecimiento utilizadas.

La utilización de urea en H. 16 depende de la ureasa. Esta fue la observación que se realizó en 1966 (102). Durante el crecimiento celular en presencia de amonio, como fuente de nitrógeno la actividad específica de la ureasa fue de 5-7 units./g de proteína. Esto, a su vez se puede comparar con lo obtenido cuando se utiliza urea; aquí la producción de ureasa fue mayor (40-60 Units./g prot.). Tales resultados nos indican que la ureasa está sujeta a un mecanismo de control muy efectivo, que se puede interpretar como un mecanismo inductor. En los experimentos realizados para comprobar tal suposición, se obtuvo un resultado inesperado con respecto a la síntesis de ureasa: "La ureasa no se forma cuando el amonio y la urea están presentes simultáneamente en el medio". Esto sugirió un mecanismo de control de represión efectuado por el amonio en la síntesis de ureasa, también por desrepresión endogena causada por la ausencia de nitrógeno. Para la aparente "inducción de la ureasa iniciada por la urea, son requeridas ciertas condiciones que hacen inclinarse por una desrepresión endogena para tal síntesis".

En H. 16 se probó su crecimiento y síntesis de ureasa usando un medio que contenía fructosa y urea como fuentes de nitrógeno. Lo reportado por este experimento es: Existe una oscilación entre la actividad de la ureasa y la concentración de amonio. Cuando las bacterias con poca actividad en ureasa, porque se desarrollaron en

un medio con amonio, son inoculadas a un medio con fructosa-urea, la actividad específica de la ureasa se incrementó considerablemente. Este incremento se vio seguido de un aumento en la concentración de amonio (proveniente de la hidrólisis de urea). Este amonio se utilizó posteriormente para la síntesis de aminoácidos. Antes de que el amonio alcanzara el nivel óptimo para poder ser utilizado en las síntesis de aminoácidos, la actividad y formación de ureasa descendió en el medio, después de la utilización de los iones amonio, la actividad y síntesis de ureasa se vierón incrementados nuevamente. Este ciclo de represión-desrepresión ocurre tres veces. Tal mecanismo se ha probado para Hydrogenomonas 16 pero no es específico porque se ha encontrado en otra especies como Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aureginosa y Bacillus megaterium. Con respecto a la síntesis de ureasa, las hidrogenomonas se pueden diferenciar de las otras especies donde la enzima es constitutiva. En la figura 7 se representa la regulación de algunas enzimas presentes en la degradación de derivados de purinas y que estan relacionados con la acción de la ureasa.

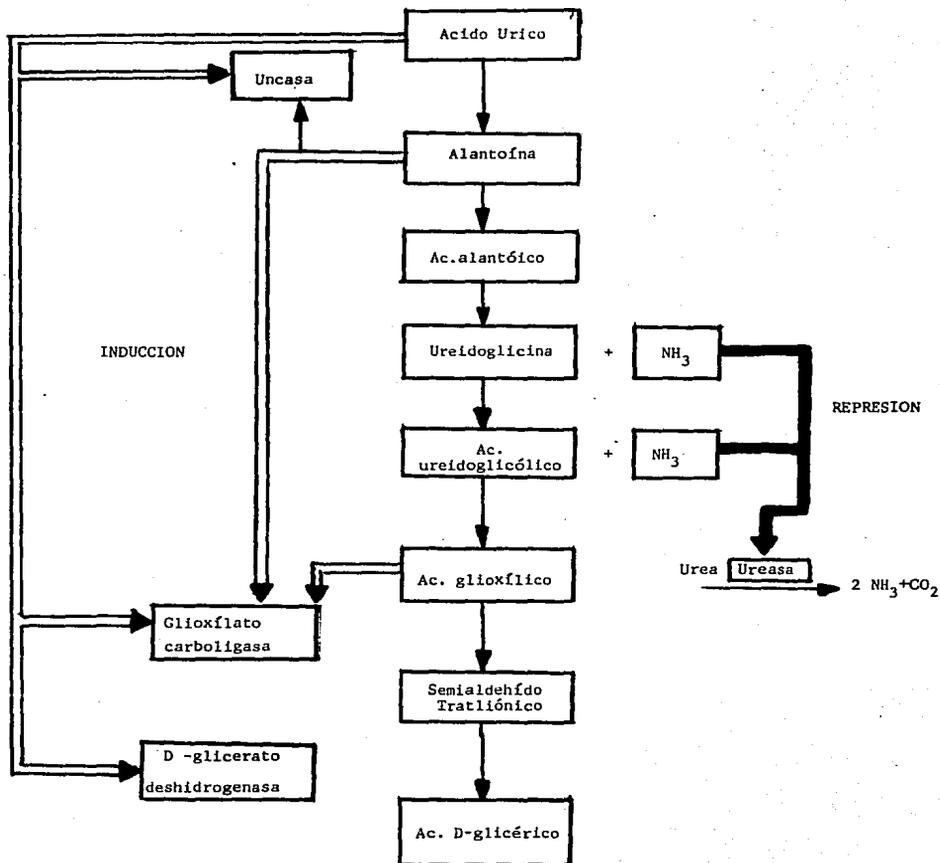


Figura No. 7 Regulación de la formación de la ureasa por la presencia de enzimas relacionadas a la degradación de derivados de purina, en hydrogenomonas 16.

A.1.a.8) Biosíntesis de aminoácidos. (102) El mecanismo general de la síntesis de aminoácidos en esta clase de bacterias corresponde al presentado en las bacterias quimioorganoheterótrofas. Aunque no hay estudios reportados actualmente enfocados a este tema en particular. Con el fin de que el metabolismo general de las bacterias del Hidrógeno sea más clara, todas las características mencionadas anteriormente se encuentran resumidas en la tabla No. 8.

<p>Crecimiento Quimiolitoautótrofo</p>	<p>Utiliza al hidrógeno mediante una reducción directa del NAD. Fija por el Ciclo de Calvin al CO₂; el Ciclo de Krebs durante este metabolismo tienen un papel biosintético; en la mayoría de las especies, el Ciclo del Glioxilato está activo.</p>
<p>Crecimiento Mixotrófo</p>	<p>Existe preferencia por utilizar los compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, siempre y cuando el hidrógeno no esté presente. Los compuestos utilizados son: Fructosa, glucosa, gluconato asimilados principalmente por la vía de Etner-Doudorof. El rendimiento en biomasa es alto comparado con las otras condiciones.</p>
<p>Crecimiento Quimioorganoheterótrofo.</p>	<p>Utiliza los substratos orgánicos fructosa, glucosa, gluconato mediante la vía Etner-Doudorof. El Ciclo de Krebs en algunas especies se encontró completo pero por lo general con baja actividad. El Ciclo del Glioxilato es de mayor actividad que el de Krebs.</p>

Tabla No. 8. Características del género *Hydrogenomonas* en diferentes condiciones.

A.2.a) Bacterias del azufre. La capacidad para desarrollarse autotróficamente utilizando compuestos reducidos y azufre, es una característica de un pequeño pero muy diverso grupo de microorganismos llamados bacterias oxidadoras de azufre o bacterias del azufre.

En esta clase de bacterias se encuentra incluida una especie con un comportamiento muy particular llamada Thiobacillus ferrooxidans, la cual es capaz de oxidar compuestos de azufre y fierro.

En la siguiente tabla No. 9, se mencionan los géneros y/o especies de este grupo con sus características morfológicas principales.

GENERO	ESPECIE	C A R A C T E R I S T I C A S
Thiobacillus	thioparus thiooxidans denitrificans ferrooxidans novellus intermedius neapolitanus acidophilus	Bacilos Gram negativo móviles por flagelación polar, excepto <u>T. neapolitanus</u> , <u>T. novellus</u> . Aerobios estrictos, excepto <u>T. denitrificans</u> (66).
Nacromonas	mobilis	Bacilos grandes con flagelación polar, depositan azufre internamente. No han sido cultivadas en forma pura.
Thiovulum	majus	Forma ovoide, depositan azufre internamente. Microaerófilos.
Beggiatoa	sp.	Microorganismos deslizantes. Metabolismo organótrofo predominante.
Thiotrix	sp.	Filamentosos, deslizantes, se adhieren por medio de una porción fijadora, forman rosetas, depositan azufre en el interior.
Thiospirillopsis	sp.	Filamentos, helicoidales, deslizantes.
Thioploca	sp.	Semejante a Beggiatoa, pero sus filamentos están unidos en ases envueltos por una vaina común (67).
Thiospira	winogradsky binpuctata	Espirales, con flagelos polares en penachos, depositan azufre internamente. No aislados en cultivos puros.
Fhlobacterium *	bovista	Bacilo inmóvil, Gram negativo.
Sulfolobus	acidocaldarius	Esferas lobadas, inmóviles, Gram negativas.
Thiodendron *	mucosum	Bacilos inmóviles, depositan azufre internamente.

Tabla No. 9. Características de las Bacterias del Azufre.

* Según Berges en la 8a. edición, son la misma especie.

De todo este grupo, el más importante y al que se le ha dado mayor atención es el género Thiobacillus, por lo cual ésta revisión se ha enfocado a dicho género tratando sus características morfológicas y metabólicas.

El género esta representado por bacilos pequeños Gram negativos con flagelación polar (excepto T. novellus y T. neapolitanus), móviles y capaces de obtener su energía por la oxidación de azufre elemental, sulfuros y tiosulfatos. La mayoría de las especies de Thiobacillus se desarrollan fácilmente en medios que contengan compuestos orgánicos con más de un átomo de carbono

En general se ha comprobado que estos organismos asimilan CO_2 por la vía de Calvin, jugando el Ciclo de Krebs un papel principalmente biosintético. Los tiobacilos están distribuidos en el suelo y en el agua. Tienen una gran importancia en el ciclo del azufre. Las particularidades de cada especie se consideraron por separado. Debido al comportamiento fisiológico que presentan los tiobacilos, en la bibliografía consultada se propone un puente de transición entre las especies que presentan un comportamiento litoautótrofo y organotrófo. En el siguiente esquema se presenta la secuencia propuesta:

I.- Litoautotrófos "estrictos"

A. Oxidan compuesto de azufre

1. Aerobios estrictos

a. pH óptimos de crecimiento (6.0-8.0)

Thiobacillus thioparus

Thiobacillus neapolitanus

aa. pH óptimo ácido (1.0-3.5)

Thiobacillus thiooxidans

2. Anaerobios facultativos, usan nitrato en ausencia de oxígeno.

B. Oxidan compuestos ferrosos o de azufre

Thiobacillus ferrooxidans

II.- Litoautótrofos facultativos.

A. Oxidan compuestos de azufre y se inhibe esta oxidación por substratos orgánicos.

Thiobacillus novellus

Thiobacillus thiooxidans

B. Oxidan simultáneamente tiosulfatos y substratos orgánicos.

Thiobacillus intermedius

III.- Organotrófos, pero que requieren la presencia de compuestos inorgánicos de azufre para un óptimo crecimiento.

Thiobacillus parometabolis

A.2.a.1) Thiobacillus thioparus. (140). Se aisló inicialmente en 1902 por Nathansohn, pero su estudio, descripción y nomenclatura fue realizada por Beijerinck en 1904. Es una bacteria aerobia estricta pero puede sobrevivir en anaerobiosis por un corto lapso de tiempo crece rápidamente en un medio mineral conteniendo tiocianato, tiosulfato y sulfuros; depositan azufre elemental cuando se encuentra en cultivo sólido, esto le proporciona a las colonias un aspecto blanquecino-amarillento.

Algunas especies, particularmente las aisladas de aguas dulces producen una capa mucóide, en la cual se encuentran embebidas pareciendo inmóviles. Las obtenidas de aguas marinas son generalmente móviles y se desarrollan más rápidamente que las especies anteriores. Sus condiciones de crecimiento son: pH neutro (6.9-7.3) y temperaturas de 28 a 30°C. En los estudios realizados por Hutchinson con este nombre, se encuentran incluidas las bacterias llamadas T. thiocyanoxidans.

A.2.a.1.1) Metabolismo heterótrofo. T. thioparus se considera un quimio-litoautótrofo obligado, pero se ha comprobado que puede asimilar carbono de compuestos como el piruvato, acetato, succinato, glutamato, aspartato y leucina, (todos ellos a una concentración aproximada de 2mM, en el medio de cultivo) y carbohidratos tales como glucosa y fructosa C₁₄. Los estudios llevados a cabo con material radioactivo (carbono catorce) mostraron que la distribución isotópica en las células cultivadas con acetato y piruvato se encontraban en la fracción lipídica y proteica; por otro lado, en las que se cultivan con glutamato el isotópo se recuperó casi en un 100% de la fracción proteica. La incorporación del isotópo de carbono procedente del acetato, sugiere que estas bacterias perdieron una o más enzimas requeridas para convertir el acetato en oxalocetato, mediante

el alfa-ceto glutarato y se confirmó ya que el C¹⁴ queda incluido en la familia de los aminoácidos del ácido glutámico. Las enzimas identificadas en los extractos libres de células relacionadas con el Ciclo de Krebs son: Deshidrogenasa isocítrica, deshidrogenasa succínica y málica. Estas enzimas mostraron una clara diferencia en sus actividades cuando provenían de bacterias como H.eutropha, la que presenta un metabolismo más amplio con substratos orgánicos que los tiobacilos y bacterias nitrificantes (22). La diferencia básica, radica a nivel de especificidad; la pérdida de la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa es la causa principal del funcionamiento del Ciclo de Krebs, en sentido únicamente biosintético.

Otra enzima importante que no fue posible identificar en los extractos crudos de T.thioparus, es la NADH oxidasa, la cual explica en términos bioquímicos las observaciones en el comportamiento de la respiración de las células intactas de estos organismos; los tiobacilos no consumen una cantidad considerable de oxígeno en presencia de substratos orgánicos, aunque bajo estas condiciones oxidan rápidamente compuestos de azufre. Todo lo anterior lo podemos resumir en:

- Ausencia de la NADH₂ oxidasa
- Ausencia de la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa
- Bajo niveles de deshidrogenasas málica y succínica
- Funcionamiento del Ciclo de Calvin

A.2.a.2) Thiobacillus denitrificans. (47,107,140). Está estrechamente relacionado con T.thioparus, difiriendo solo en la habilidad de usar nitrato como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, por lo que funciona como un desnitrificador. T.denitrificans, es una bacteria aerobia facultativa; en condiciones anaerobias utiliza al NO₃ y oxida compuestos reducidos de azufre como trisulfato, tiocianato y azufre elemental. La capacidad de crecer en medios anaerobios se pierde rápidamente cuando se encuentra en condiciones aerobias. Bajo tales condiciones llega a ser indistinguible de T.thioparus. Un buen desarrollo de esta bacteria se obtiene en un medio sólido conteniendo tiosulfato y nitrato. Una gran cantidad de azufre elemental se deposita entre las colonias. En condiciones de anaerobiosis el crecimiento es más lento.

A.2.a.2.1) Metabolismo heterótrofo. Realmente pocos estudios se han realizado sobre el metabolismo heterótrofo de esta bacteria. Los reportes que se han hecho proponen un metabolismo muy parecido al de T.thioparus pero con menor afinidad por los compuestos orgánicos que éste, ya que T.denitrificans es más sensible a estos compuestos. Lo que si se puede asegurar, es que su metabolismo básico de nutrición es mediante la fijación de CO_2 por la vía de Calvin obteniendo su energía por la oxidación de compuestos reducidos de azufre. No posee la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa.

A.2.a.3) Thiobacillus thiooxidans (140). En 1914 se reportó la presencia de una bacteria que oxidaba azufre y fijaba CO_2 en agua de mar, y cuando estaba en cultivo se podía determinar un pH marcadamente ácido. Siete años después, Waksman y Joffe aislaron del suelo un organismo con las mismas características al de Lockett que se había reportado en 1914 y lo llamaron T.thiooxidans.

Su morfología es la típica de los tiobacilos; bacilos pequeños Gram negativos y móviles. En contraste con T.thioparus y T.denitrificans, T.thiooxidans crece mejor a pH menores de cinco unidades, y llega a producir pH negativos. T.thiooxidans, oxida con mayor rapidez el azufre elemental que las dos especies anteriores. Fija CO_2 por la vía de Calvin y por la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

A.2.a.3.1) Metabolismo heterótrofo (15). Esta bacteria tiene la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos como la fructosa, piruvato, acetato, succinato, malato, glutamato, aspartato y leucina. Estos resultados son producto de un estudio realizado por Butler en 1966, en otras especies del mismo género donde enfatiza la utilización del ácido aspártico como principal producto de la fijación de CO_2 y propone que éste juegue un papel muy importante en el metabolismo de estos organismos.

Debido a la interesante información reportada en su trabajo es conveniente detallar de cierta manera los experimentos y las conclusiones a que llegó. El estudio en general se realizó con la técnica de isótopos radioactivos a bajas concentraciones, (10^{-5} , 10^{-6} M). Los resultados y conclusiones más importantes obtenidas son:

- 1.- Se confirmó la permeabilidad e integración al metabolismo de los compuestos orgánicos anteriormente mencionados.
- 2.- La glucosa mostró tendencia a seguir la ruta dirigida a la biosíntesis de lípidos y posiblemente fue utilizada como fuente de energía, mientras que los aminoácidos se encuentran esencialmente en las proteínas.
- 3.- El ácido succínico es en algunos casos tóxico para estas especies.
- 4.- El metabolismo de los compuestos orgánicos probados produjo CO_2 lo cual le llevó a preguntarse si mediante estos compuestos se podría sustituir el CO_2 exógeno. Para obtener la respuesta se diseñaron otros experimentos donde la fuente de carbono y energía se combinaron como se explica:
 - a.- Cultivo con azufre elemental y aspartato.
 - b.- Cultivo con azufre elemental, aspartato y CO_2

Lo que se obtuvo de estos ensayos fue que en presencia de azufre elemental y CO_2 , el ácido aspártico se integró casi totalmente a las proteínas y una pequeña cantidad se convirtió en CO_2 . Por otro lado si el CO_2 estaba ausente y el azufre presente junto con el ácido aspártico, éste último era convertido a CO_2 en vez de asimilarlo en las proteínas. De ésta última observación se esperó que el CO_2 proveniente del ácido aspártico substituyera al exógeno, pero no fue el caso y en un período de cuatro semanas no se obtuvo desarrollo.

Esto hizo suponer dos cosas: 1o. Mediante un mecanismo de retroalimentación el ácido aspártico inhibe la fijación de CO_2 , (no se pudo comprobar, quedando por lo tanto como hipótesis), y 2o. El metabolismo del ácido aspártico además de producir CO_2 , produce ciertas sustancias (no identificadas) que inhiben el crecimiento.

Se realizaron otra serie de experimentos para esclarecer el papel del ácido aspártico. Tales trabajos consistían en hacer crecer a estas bacterias en medios de cultivo donde previamente se habían desarrollado otras bacterias (del mismo género) con ácido aspártico. En este caso se obtuvo un desarrollo muy lento del cultivo joven inoculado en

el medio "usado" comparado con el presentado por aquellos cultivos que se inocularon en medios también "usados" e incubados pero sin ácido aspártico, porque éste se les adicionó en el momento en que se inoculaba el cultivo joven, (este medio filtrado antes de ser inoculado por segunda vez).

El autor de este reporte no da una conclusión definitiva, solamente deja estos datos para desarrollar nuevos experimentos, donde se pueda demostrar el papel del ácido aspártico en el metabolismo de T.thiooxidans. Por lo que respecta al papel desempeñado por el Ciclo de Krebs, se observó que es el mismo presentado en los casos anteriores. Los compuestos orgánicos, como en el caso de T.thioparus y T.denitrificans, no mostraron un incremento considerable en el rendimiento sino que, en algunos casos, éste disminuyó.

- A.2.a.4) Thiobacillus ferroxidans. Esta bacteria está considerada en el grupo de las bacterias hierro-oxidantes. Bajo este nombre se encuentran agrupadas las bacterias que pueden utilizar al Fe^{2+} como donador de electrones. Durante mucho tiempo se consideró a T.ferrooxidans y Ferrobacillus ferrooxidans como dos especies diferentes que mostraban algunas similitudes al oxidar compuestos de azufre, tales como tiosulfato, azufre elemental y fierro. Con la finalidad de determinar si eran especies diferentes las mencionadas anteriormente, se realizaron estudios bioquímicos y morfológicos donde se observó que presentaban gran similitud (91), por lo cual se propuso dejar bajo el nombre de T. ferrooxidans a las dos especies, designación con la que se encuentran reportados en el Manual de Bergey's 8o. edición. Tal designación no es utilizada en todos los reportes revisados para este trabajo (45), sin embargo la información se ha resumido bajo este nombre. T.ferrooxidans es un microorganismo aislado de aguas ácidas (129, 144, 12, 32, 42, 45, 47) encontradas cerca de zonas mineras. Es un bacilo Gram negativo móvil; fue descrito por Colmer en 1950. Puede usar tiosulfato como donador de electrones. Morfológicamente es idéntico a T. thioparus y T.thiooxidans pero a diferencia de estos, T.ferrooxidans puede crecer y oxidar azufre elemental a pH ácidos, además de usar iones ferrosos en vez de tiosulfato como donador de electrones. En subcultivos repetidos con iones Fe^{2+} , esta bacteria pierde la capacidad de oxidar tiosulfato, pero cuando se utiliza tiosulfato solo, no

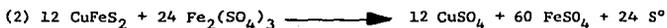
pierde la capacidad de oxidar los iones ferrosos. Se han hecho experimentos para demostrar que estos elementos no pueden ser oxidados simultáneamente. Razzel (90) observó una marcada inhibición de los iones ferrosos por la presencia del tiosulfato, pero a muy bajas concentraciones se verificó la oxidación de ambos compuestos a una velocidad muy lenta. Existen otras sustancias que inhiben también la oxidación de Fe^{2+} , como lo son las sales haloideas, nitratos, fluoruro y azidas. El tiosulfato como mencionamos anteriormente ejerce una inhibición en el metabolismo del Fe^{2+} , pero T. ferrooxidans necesita en gran cantidad iones sulfato para su metabolismo (62). Esto nos hace pensar en un mecanismo específico para este compuesto. Se han propuesto varias hipótesis, pero ninguna ha sido comprobada hasta la fecha; estas hipótesis son:

- a.- El sulfato sirve como un cofactor para el sistema Hierro-oxidasa.
- b.- El sulfato es un substrato requerido para la síntesis de compuestos de azufre, donde es necesaria la transferencia de energía del sistema hierro-oxidasa.

T. ferrooxidans, tiene una gran importancia económica y ecológica, por su capacidad de oxidar sulfuros. Su metabolismo a este respecto ha sido objeto de estudios muy variados y detallados que se exponen a continuación

A.2.a.4.1) Oxidación de sulfuros metálicos.

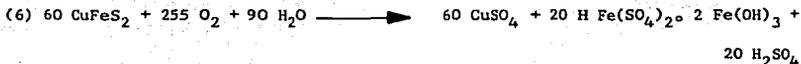
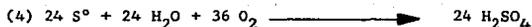
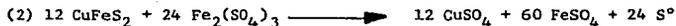
- a) Cobre.- La oxidación de los minerales de cobre Calcopirita, Covelita y Calcocita en la naturaleza puede ser llevada a cabo por un ataque directo de las bacterias y/o por iones férricos que funcionan como oxidantes. Para los minerales que contienen hierro, ambos mecanismos ocurren simultáneamente y son difíciles de separar, esta última característica correspondería a la Calcopirita, donde la secuencia de reacciones propuesta para su oxidación en presencia de bacterias es:



Es dudoso si el ataque inicial al mineral por las bacterias es mediante la disolución del mineral, ya que existe la evidencia de la baja solubilidad de éste. La reacción (1) la lleva a cabo T. ferro-oxidans, pero también puede ser que se efectúe mediante iones férricos inicialmente en el medio o provenientes de otras oxidaciones bacterianas como:

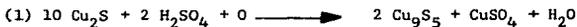


Los iones ferrosos y el azufre mineral elemental que se producen en las reacciones (1) y (2) pueden ser oxidados subsecuentemente por las bacterias presentes, mediante las reacciones (3) y (4) siguientes.

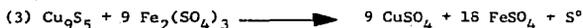


Durante la fase inicial de oxidación (reacciones 1-3), el sulfato es consumido y por lo tanto, el pH tiende a elevarse causando la precipitación del sulfato férrico y sales de sulfato básicas, tales como la anterita ($\text{Cu}_3(\text{OH})_4\text{SO}_4$). El sulfato férrico es hidrolizado mediante una reacción lenta (5) produciendo minerales secundarios de hierro, en este caso la jarosita, que precipita en la superficie del mineral original obstruyendo la acción bacteriana.

Las reacciones propuestas para la extracción de Calcocita son:



La Calcocita es oxidada a sulfato de cobre produciendo como intermedio a la Digenita (Cu_9S_5) y Covelita (CuS). Debido a que el sulfato es consumido por el ion cuprico y no hay ninguna reacción en donde se regenere, el pH tiende a elevarse con la consecuente precipitación de antlerita y ahí no es controlada esta subida puede llegar a inhibir la oxidación bacteriana. Se observo que la oxidación de Calcocita, Digenita y Covelita son independientes de la presencia de iones férricos, pero su participación aumenta el rendimiento de la extracción, acorde con las siguientes reacciones:

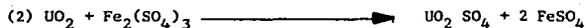


Generalmente la solubilización completa no se lleva a cabo, debido a la precipitación de la Jarosita. Los sulfuros de cobre se presentan naturalmente en la mayoría de los casos en presencia del fierro, como es el caso de los minerales pirita y pirotila.

El selenuro de cobre otro mineral de importancia económica, es oxidado por T. ferrooxidans como se muestra en la siguiente reacción:



b) Uranio.- El mecanismo de extracción por T. ferrooxidans para el uranio se puede presentar como sigue:



En la lixiviación del uranio, el ion férrico sirve como un agente oxidante y es regenerado por las bacterias por medio de la reacción (2) o por acción química (3). La forma trivalente del uranio es insoluble en las soluciones lixivadoras, mientras que la forma hexavalente es ya soluble. Los procesos microbiológicos para la extracción del uranio están influenciados por condiciones ambientales.

- c) Fierro.— Debido a la información disponible (55, 70, 105, 106, 145), puedo mencionar cual es la relación que existe entre la flora microbiana presente en los habitats de lixivación, con los tiobacilos directamente relacionados con estos procesos.

En los sitios de lixivación se han encontrado bacterias muy variadas como lo son bacilos quimioorganotrófos que no son precisamente del grupo de bacterias del fierro, pero su metabolismo está relacionado con éste, ya que pueden precipitar y eliminar al fierro en solución. Esto es, el hidróxido de fierro III es aparentemente un producto de desecho, que junto con las sales de este metal son utilizados para satisfacer las necesidades de ión fierro. Por ejemplo Bacillus bruntzi, asimilia $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ para sintetizar un pigmento que contiene aproximadamente 6.0% de fierro. (145).

Esto hace descender la concentración de fierro en el medio, que de una manera no controlada podría afectar la lixivación de los minerales. Es menos conocida la acción del género Siderocapsa empezando por su dudosa clasificación en la familia Caulobacteraceae. Su metabolismo es quimioorganotrofo. Se ha observado que su población es considerable cuantitativamente, en ambientes marinos.

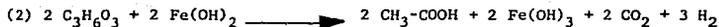
Sphaerotilus es un género encontrado en medios con bajas concentraciones de materia orgánica, oxígeno, fierro y manganeso oxidable. Se ha reportado que estos microorganismos producen problemas cuando se desarrollan en altas proporciones, en los ríos y corrientes donde son vaciadas las aguas de las minas de uranio. La principal reacción que producen es:



Gallionella, está presente en el agua y es difícil de distinguir del género Sphirophyllum. La célula de Gallionella es asimétrica y debido al hidróxido férrico que secreta al medio forma una colonia larga y delgada. La especie más encontrada de este género es G. ferruginea, que ha sido aislada de minas como la de Metigen, en Suiza, donde realiza la misma reacción que Sphaerotilus. Gallionella induce la corrosión durante las operaciones de recuperación de petróleo.

La célula Leptothrix tiene forma tubular y es transparente, la cual

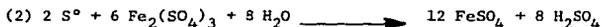
es cubierta por una copiosa cantidad de hidróxido férrico. Al igual que otras de las especies mencionadas, su metabolismo no es bien conocido y se le ha considerado como un quimilitótrofo facultativo. La oxidación del hierro por estas bacterias se supone que es como sigue:



En este caso se supone el hierro funciona como fuente de energía y aceptor de oxígeno.

Clonothrix, con su morfología filamentosa, se adhiere firmemente a diversas partículas. Su mecanismo de acción no es conocido, ni ha sido objeto de estudio.

Ahora bien, el mineral de hierro con mayor importancia económica es la pirita, la cual está sujeta a una oxidación por parte de T. ferrooxidans y T. thiooxidans. El mecanismo propuesto es:



El producto de esta oxidación, el sulfato ferroso, es de gran importancia, porque mediante la reacción:



llevada a cabo por método químico y microbiológico, suministra a los ambientes de minas un potente oxidante que facilita la extracción de algunos minerales sulfúreos principalmente, de los cuales ya he mencionado algunos. Representando con "R" al metal, la siguiente reacción puede generalizar el comportamiento hasta ahora mencionado de los iones férricos para la extracción de los minerales.



d) Manganeso.- El manganeso posee propiedades semejantes al

fierro, por lo cual se le encuentra asociado con este elemento en la naturaleza. Los óxidos, hidróxidos, silicatos y carbonatos son los compuestos minerales más comunes para este elemento. La forma bivalente es la de mayor movilidad en la naturaleza. Donde las condiciones ambientales actúan a favor de la reducción, el manganeso se extrae del suelo y depósitos minerales; tales condiciones son favorecidas por la presencia de gran cantidad de materia orgánica y suelos saturados de agua, porque se induce la descomposición del material orgánico y se producen las condiciones reductoras favorables para la extracción. (122, 145, 21).

El manganeso se encuentra en los nódulos marinos, que es otra fuente de este mineral.

La acción microbiana sobre los minerales de manganeso se ha enfocado a las bacterias pertenecientes al género Thiobacillus. Estos microorganismos oxidan al azufre que a su vez es capaz de reducir al manganeso de MnO_2 , a un compuesto soluble como lo es el sulfato de manganeso II.

La reacción se puede representar como:



e) Zinc.- La lixiviación de zinc, al igual que los otros minerales es llevado a cabo por las bacterias T. ferrooxidans y T. thiooxidans. La reacción de extracción es:



Básicamente el proceso de lixiviación consta de: 1.- Oxidación química y biológica de la pirita, para producir sulfato ferroso. 2.- Oxidación biológica del sulfato ferroso. 3.- Oxidación del sulfuro de zinc a sulfato de zinc, con la producción del sulfato ferroso. El sulfato de zinc puede ser recuperado y el sulfato ferroso puede ser reciclado al sitio de extracción.

A.2.a.4.2) Metabolismo del Nitrógeno en Thiobacillus ferrooxidans. El nitrógeno es asimilado en forma de ión amonio y es un nutriente limitante en la oxidación del fierro, por lo que se ha sugerido que la

diferencia de nitrógeno (amonio) pueda ser una condición ambiental que influya negativamente en el proceso de lixiviación bacteriana. Recientes estudios (136) muestran que algunas especies de T. ferrooxidans son capaces de reducir el N_2 e incorporarlo a su material celular, esto quiere decir que es capaz de fijar nitrógeno, aunque sea en mínima cantidad.

Otros compuestos inorgánicos del nitrógeno que podrían ser asimilados son el nitrito y nitrato pero en los experimentos se ha observado que solo una especie de esta bacteria es capaz de utilizar los iones nitrato pero a muy baja proporción. Se piensa que esto es consecuencia de que la asimilación de nitratos es un gasto excesivo de energía para la célula que podría ser utilizada para otros fines como lo son la fijación de CO_2 .

A.2.a.4.3) Metabolismo del fósforo de Thiobacillus ferrooxidans. El fósforo es asimilado en forma de fosfatos y parece ser necesario, no solo para el metabolismo energético de T. ferrooxidans, sino también para los primeros pasos de la oxidación de los iones ferrosos, que se llevan a cabo fuera de la pared celular. A esta aseveración se llegó mediante los experimentos realizados por Tuovinen (136) en 1971, donde no se le adicionó fósforo al medio de cultivo y se observó que después de trece subcultivos, la oxidación del Fe^{2+} había desaparecido cerca del 20% durante la fase logarítmica.

A.2.a.4.4) Papel de diversos iones en el metabolismo de Thiobacillus ferrooxidans.

- a) Magnesio.- El magnesio mostró ser un ión esencial para la fijación de CO_2 (136) y para la oxidación de Fe^{2+} . La cantidad que se requiere es muy poca (cerca de $2mM/l$), esto puede explicar algunos datos reportados, como lo son los de Andersen y Remsen (136) acerca del no requerimiento de magnesio durante la lixiviación microbiológica, ya que la naturaleza normalmente contiene más magnesio que el limitante. Por otro lado, estas bacterias pueden obtener el magnesio de los sulfuros formados, debido a que se disuelven rápidamente en medios ácidos.

- b) Cloruros.— En diversos estudios (91, 136) se ha comprobado que ión cloruro es altamente inhibitorio para la oxidación de los iones ferrosos, solamente en muy pocas especies se pudo lograr una relativa tolerancia, pero sin llegar a la adaptación total.
- c) Potasio y Calcio.— El potasio y calcio no tienen ningún efecto demostrable sobre la oxidación de los iones ferrosos, cuando el nitrato y amonio se compararon como fuente de nitrógeno. Esto muestra que las necesidades de potasio y calcio son pocas, por lo que estos cationes son suministrados en circunstancias normales por los residuos en los reactivos y en la naturaleza por el agua del suelo o depósitos minerales.

A.2.a.4.5) Metabolismo heterótrofo. Las enzimas del ciclo de Calvin y de la vía de la Hexosa monofosfato han sido demostradas en extractos libres de células de cultivo de T. ferrooxidans. Fig. 8.

Los experimentos realizados por Nord y Gay (36), fueron enfocados a la posible relación de los productos de fijación de la vía de Calvin y la Hexosa monofosfato. Es interesante revisar con mayor detalle estos experimentos junto con sus resultados y conclusiones. Inicialmente el cultivo de T. ferrooxidans se mantuvo en medio mineral adicionado de sulfato ferroso pH= 3.5 y temperatura de 28-30°C.

- a) Los extractos se prepararon mediante ultrasonido.
- b) A dichos extractos se les hizo la prueba de fijación de CO₂, la cual resultó ser rápida. Esta fase se realizó en un medio adicionado de ribulosa difosfato (RuDP), como resultado se reportó que si la RuDP era sustituida por ribulosa-5-fosfato (R5P) y ATP, el CO₂ fijado era el mismo, esto es la RuDP y R5P fueron esencial y cuantitativamente convertidas en productos marcados. Por otro lado se probó que la fijación de CO₂ descendía marcadamente cuando se utilizaba glucosa-6-fosfato (G6P) o fructosa-6-fosfato (F6P), igualmente se comprobó el aumento de fijación de

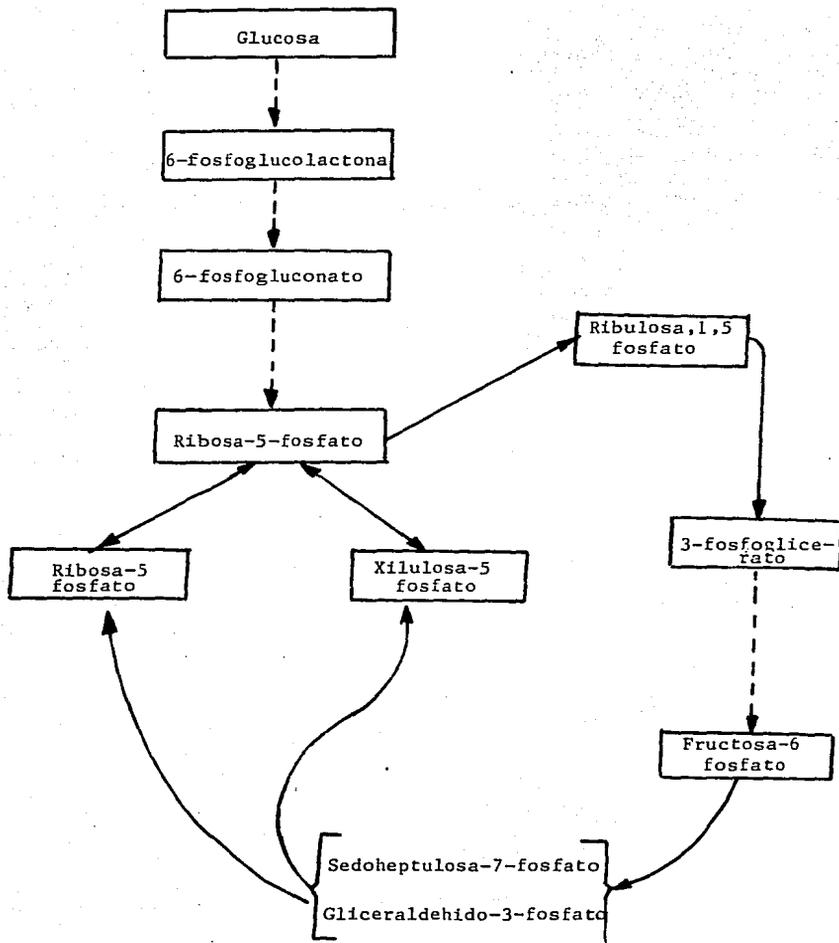


Figura No. 8 Relación propuesta para la vía de la Hexosa Mono-fosfato y el Ciclo de Calvin durante la fijación de CO_2 en Thiobacillum ferrooxidans. (136)

CO₂ por la adición de F6P y ac. 3-fosfoglicérico, cuando estos substratos actuaban solos.

El producto principal de fijación de CO₂, cuando se usó R5P y fructosa 1,6, difosfato (FDP) fue el 3-fosfoglicerato (3PGA) realizandose también la identificación de la enzima responsable, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. En estas condiciones, se identificó una pequeña cantidad de fosfoenol piruvato.

- c) Observaciones realizadas.- La habilidad de utilizar R5P como sustrato ATP dependiente para la fijación de CO₂ con la consecuente formación de 3PGA, es una muestra de la presencia de las enzimas pentosa fosfato isomerasa, fosforibulocinasa y carboximutasa.
- d) Nord y Jay nos marcan como conclusiones lo siguiente:
- 1.- Las enzimas demostradas sugieren que el Ciclo de Calvin es una vía operativa de estos organismos.
 - 2.- La acumulación de 3PGA es, probablemente, el resultado de una baja actividad enzimática de la triosa fosfato deshidrogenasa.
 - 3.- En presencia de ATP, la R5P es convertida en RuDP sin la producción de NADH₂.

Todo lo expuesto anteriormente, nos lleva a pensar que estas bacterias poseen un sistema de fijación para el CO₂ mediante la vía de Calvin que es apoyada por la vía de la Hexosa monofosfato para la regeneración de intermediarios importantes.

Otros estudios, como lo son de Sugio y Tano (108) muestran que hay especies de T. ferrooxidans denominadas AP-19 y AP-44, que difieren de las especies de las otras en el mecanismo para metabolizar glucosa y además por la presencia de la NADH₂ oxidasa. Esto es, las especies AP-19 y AP-44 que se desarrollan en un medio de glucosa al 0.1% y al 31 C° y son capaces de oxidar iones ferrosos después de 40 h de incubación. La especie AP-19 no fue capaz de metabolizar la D-glucosa. Para verificar si esto se debe a la ausencia del sistema enzimático responsable, se trabajó

con extractos libres de células y como resultado se obtuvo la asimilación en ambas especies, lo que hizo suponer que AP-19 no posee el sistema de transporte para la D-glucosa. Las especies comunes de T. ferrooxidans, no muestran ninguna actividad bajo estas condiciones.

Por lo que respecta a la enzima NADH_2 oxidasa, esta fue identificada en AP-44 y muy poco en AP-19 (en los cultivos de T. ferrooxidans no se detectó ninguna actividad para esta enzima).

Se piensa que estas diferencias, puedan ser producto de mutaciones causadas por el cultivo continuo en ciertos medios o bien, porque se trata de especies diferentes a T. ferrooxidans que se aislaron en la mezcla de bacterias fierro-oxidantes obligadas y facultativas que se parecen morfológicamente a T. ferrooxidans.

En suma, el metabolismo heterótrofo de esta bacteria incluyendo el Ciclo de Krebs es similar a los anteriores tiobacilos.

A.2.a.5) Thiobacillus novellus. (46, 64, 86, 140). Es una de las bacterias llamadas comunemente autótrofa facultativa; por haberse demostrado un metabolismo heterótrofo. Oxida tiosulfato en poca proporción con la producción de una pequeña cantidad de ácido, no tolera pH ácidos y su valor óptimo es de 6.8-7.2. La poca oxidación de tiosulfato, quizá esté influenciada por la última característica mencionada. En medio mineral muestra una morfología muy parecida a T. thiparus.

A.2.a.5.1) Metabolismo heterótrofo. Esta bacteria desarrolla muy fácilmente en medios orgánicos sin un período previo de adaptación. Tal característica denota una diferencia muy clara entre las especies anteriores. Se han realizado experimentos bajo condiciones de mixotrofia y con nutrientes limitantes, esto es con el fin de poder comprender la relación que existe entre estos dos tipos de metabolismos cuando están funcionando simultáneamente. Los reportes publicados sobre este microorganismo están ubicados cronológicamente entre 1979-1983 y son los realizados por: Huntchinson, Leefeldt, Pérez y Vishniac. (46, 64, 86, 140).

El punto a determinar con estos experimentos es el de la contribución real del CO_2 a la formación de biomasa en condiciones de litoautotrofia, mixotrofia y organoheterotrofia. Los resultados obtenidos son:

- a) Medio litoautótrofo. El 100% del carbono para la biosíntesis celular provino del NaHCO_3 que tenía adicionado el medio.
- b) Medio mixotrófo. El medio contiene NaHCO_3 , tiosulfato y extracto de levadura; aquí el resultado fue que 90% del carbono para la biosíntesis proviene del CO_2 y el restante, del extracto de levadura.
- c) Medio organoheterótrofo. Este medio tiene glucosa como fuente de carbono y energía, el resultado obtenido es: 13% del carbono celular proviene del CO_2 atmosférico y el resto del substrato orgánico.

De lo anterior se puede concluir que la contribución del CO_2 a la biosíntesis bajo condiciones de mixotrofia, depende de la concentración de tiosulfato en una proporción directa con la glucosa. Esto es, si la relación tiosulfato/glucosa es de cinco, el porcentaje de carbono proveniente del CO_2 es del 17%, pero si esta relación decrece, entonces el porcentaje de CO_2 puede llegar hasta 8-10%.

Es claro entonces que tanto bajo condiciones de mixotrofia con nutrientes limitantes, como con baja concentración de glucosa con respecto al tiosulfato, el CO_2 contribuye significativamente a la biosíntesis celular y en tales circunstancias, la energía es adquirida tanto del tiosulfato como de la glucosa (64) donde a la vez la glucosa sirve como fuente de carbono. Lo anterior hace suponer que la enzima ribulosa difosfato carboxilasa tiene mitigados los efectos de la represión causada por los substratos orgánicos cuando estos están por debajo de sus niveles críticos. Esta característica no la poseen todos los tiobacilos, porque en la mayoría la inhibición se lleva a cabo aun en niveles más bajos que los presentados por T. novellus. Con lo que respecta al Ciclo de Krebs, este se muestra completo y

actúa según el medio en que se desarrolle el microorganismo, es to es como vía energética o como vía biosintética.

A.2.a.6) Thiobacillus A2. (110, 144). Esta bacteria tiene la morfología característica de los tiobacilos; bacilo corto Gram negativo, móvil. Es un aerobio estricto, oxida el tiosulfato para la obtención de energía. Fue descrito recientemente (1979-1983) y aún no se comprueba si en realidad se trata de una nueva especie o es una variante de las ya descritas.

A.2.a.6.1) Metabolismo heterótrofo. Al igual que las bacterias de este grupo tiene la capacidad de desarrollarse en presencia de compuestos orgánicos principalmente carbohidratos haciendo uso de las vías E.M.P, E.D. y P.P. (Pentosa fosfato). Los carbohidratos usados más comunmente son: glucosa, maltosa y fructosa; aunque también han mostrado que crecen con algunos di sacáridos y trisacáridos.

Thiobacillus A2 presenta un comportamiento poco usual en este grupo de microorganismos, que es el funcionamiento de las tres vías para la asimilación de glucosa. La operación de cada vía depende del tipo de substrato usado. Por ejemplo: la vía EMP es tá ausente en la mayoría de las bacterias que crecen con glucosa (en muy pocas especies se pudo comprobar su actividad, como fue el caso de las especies Thiobacillus GF1). Por otro lado, cuando el medio contiene glucosa y tiosulfato o succinato, las vías funcionales son E.D. y P.P. La ausencia de la vía EMP se debe a la falta de la enzima fosfofrutocinasa, (la cual es clave para este funcionamiento), la pérdida de esta enzima hace que los microorganismos se parezcan más a las pseudomonas. En solo una especie se ha podido demostrar la operación simultánea de las tres vías, en Thiobacillus GF1.

También en Thiobacillus A2 se han realizado estudios para determinar el comportamiento bajo condiciones de autotrofia, mixotrofia y heterotrofia (141). Como en el caso de T. novellus, lo más importante es entender el metabolismo bajo condiciones de mixotrofia. En un cultivo que tiene al tiosulfato como subtrato limitante y CO_2 en exceso, la ribulosa difosfato carboxi

lasa muestra su mayor actividad, ésta a su vez declinó marcadamente cuando fue reemplazado el medio por uno que contenía tio sulfato glucosa- NaHCO_3 . Después de un crecimiento prolongado en el medio con glucosa la actividad de la ribulosa difosfato carboxilasa descendió hasta una marcada inactividad. La fosfoenpiruvato carboxilasa estuvo ausente en los medios autótrofos y mixotrófos y ligeramente detectada en los heterótrofos.

Como resultado de estos experimentos se puede resumir los siguientes:

- a) En el medio heterótrofo se obtuvo un rendimiento de biomasa de 109.0 gr. peso seco/ gr. subst. consumida.

Quando se compararon las condiciones de autotrofia, heterotrofia y mixiotrofia, los resultados se reportaron en (gr peso seco/l).

- b) Medio autótrofo.- (tiosulfato) 0.256
 c) Medio mixótrofo.- (tiosulfato/glucosa) 0.560
 d) Medio heterótrofo.- (glucosa) 0.294

Estos resultados nos muestran que cuando se mezclan las fuentes de electrones los rendimientos aumentan, porque se combinan los mecanismos de metabolismo litoautótrofo y organótrofo.

En la Fig. 9 se muestra el resumen del metabolismo de bacterias pertenecientes al género Thiobacillus.

- A.3.a.) Bacterias del Nitrógeno. Las bacterias nitrificantes, son consideradas microorganismos quimiolitótrofos obligados, pero los experimentos hechos por W. Wallece y D. Nicholas (143), demostraron que existe una asimilación real de compuestos orgánicos, aunque en cantidad muy pequeña. A este respecto, se piensa que no existe un microorganismo quimiolitotrófico obligado, esto es, que no sea capaz de usar compuestos orgánicos de más de un átomo de carbono, como fuente de energía y alternativamente de carbono. Se propone en el trabajo citado, que en aquellos casos donde aun no se han detectado la asimilación de compuestos orgánicos, se deba a un error en la manipulación de los culti-

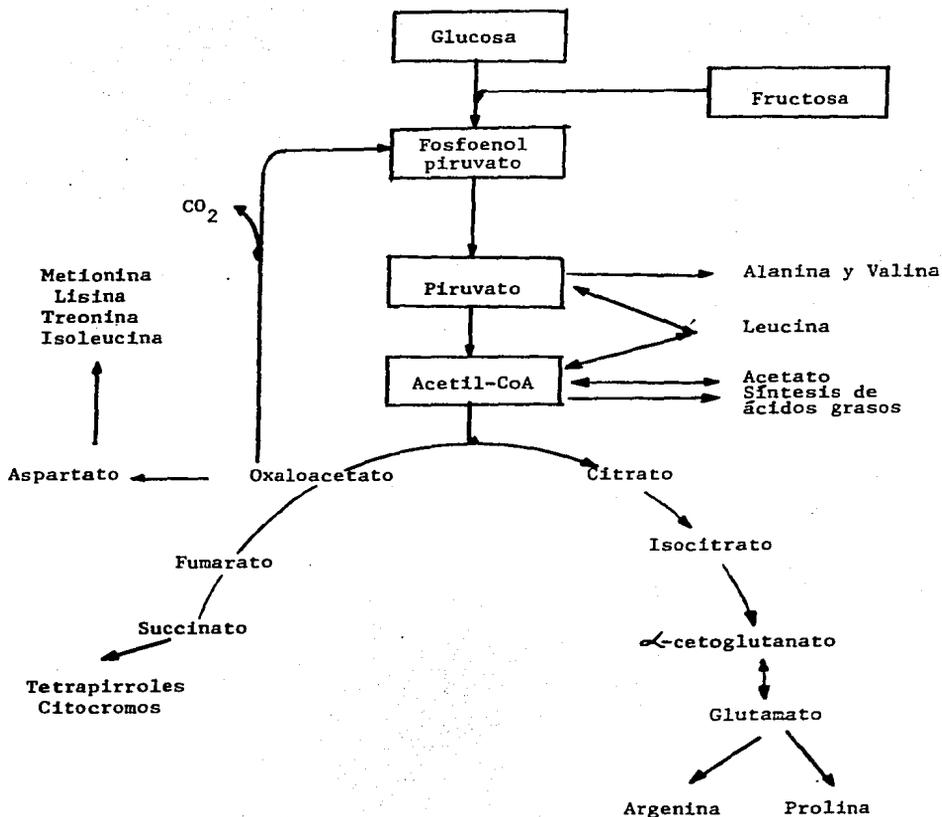


Figura No. 9 Representación esquemática del flujo de carbono en las bacterias del género *Thiobacillus* de los compuestos orgánicos como glucosa, fructosa, piruvato, acetato, succinato, glutamato y CO_2 , cuando este último no se asimila por la vía de Calvin. Se indica la integración de éste flujo con el metabolismo de aminoácidos y formación de tetrapirroles.

vos y/o sus condiciones de crecimiento o en su defecto que sea tan reducida la variedad de compuestos orgánicos asimilables, que todavía no se acierte a probar con ellos.

Por lo anterior, a este grupo de bacterias, se les considera el más representativo del metabolismo quimioolitótrofo. La clasificación está hecha en base a su morfología y pasos particulares para la oxidación de los compuestos inorgánicos del nitrógeno. No se conoce ninguna especie de este grupo que pueda oxidar por sí solo el amoniaco a nitrato, por lo cual la nitrificación del amoniaco en la naturaleza, resulta de la acción secuencial de dos clases de microorganismos que son; los que oxidan amoniaco a nitrito llamados "Nitrosificantes" y los que oxidan el nitrito a nitrato, llamados "Nitrificantes". Podría parecer mal empleado el término nitrificante para designar a ambos subgrupos, pero es de uso común en el campo de la microbiología designarlos así.

Por otro lado se ha encontrado, que algunas bacterias heterótrofas y hongos pueden oxidar el amoniaco a nitrato por sí solos, pero en su actividad es tan baja que no es significativa en la Naturaleza.

En la tabla No. 10 encontramos los géneros incluidos en el grupo de las Bacterias de Nitrógeno.

Las bacterias que oxidan amoniaco a nitrito pueden llamarse en general, "bacterias nitrificantes" y sus nombres genéricos llevan el prefijo -Nitro-; por otro lado, las que oxidan nitrato a nitrato (son las que realmente llevan a cabo la nitrificación porque son las que producen el nitrato), sus nombres genéricos tienen el prefijo -Nitro-.

GENERO	ESPECIE	CARACTERISTICAS
Nitrobacter	winogradsky	Bacilos cortos Gram negativos. Poseen una capa de citomembranas, móvil.
Nitrospina	gracilis	Bacilo largo, recto y delgado, Gram negativo, inmóviles. Se cultiva en agua de mar. Anaerobio estricto.
Nitrosomonas	europaeae	Bacilo corto, movilidad variada, Gram negativo. Poseen citomembranas que forman vesículas en la periférica del citoplasma. Su hábitat es marino y es un aerobio estricto.
Nitrospira	briensis	Bacilo con espirales, Gram negativo, móviles e inmóviles. Aerobio estricto.
Nitrosococcus	nitrosus	Cocos, Gram negativos, presentados en pares y tetradas. Aerobio estricto.
Nitrococcus	mobilis	Bacilo corto o esferas ovoides, Gram negativo, móvil.
Nitrosolobus	multiformis	Células pleomórficas, Gram Negativas, móviles, presentan invaginaciones que forman grandes compartimientos.

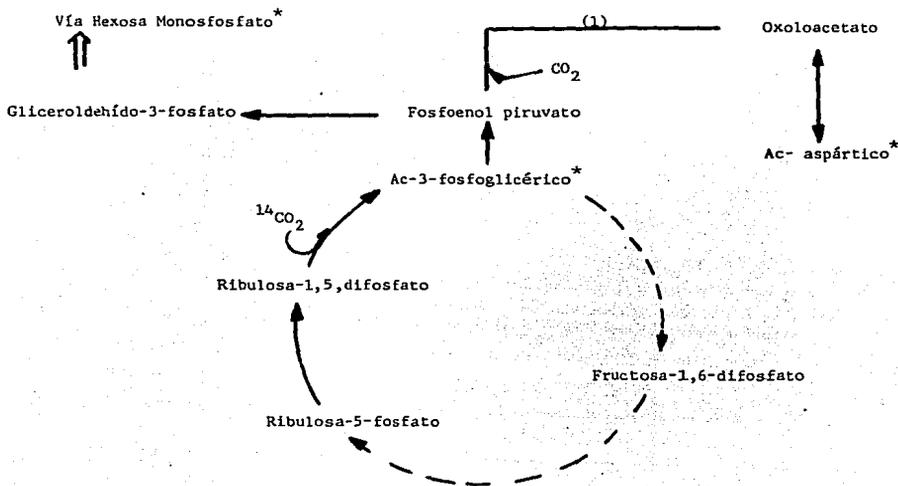
Tabla No. 10 Especies incluidas en el grupo de las Bacterias del Nitrógeno.

Los aspectos importantes sobre la morfología y estructura de las bacterias del nitrógeno, son realizados por Wallace y Nicholas (142) con el microscopio electrónico, donde se ha observado que la mayoría de estas bacterias poseen elaborados sistemas internos de membranas que sustentan la maquinaria de transporte de electrones. Esta estructura membranal no es característica del grupo de las bacterias nitrificantes, porque se ha encontrado que el triplete estructural membranal es similar a otras bacterias Gram negativas. En Nitrobacter la parte interna de la membrana es extremadamente densa y se tiñe fuertemente con acetato de uranio; en Nitrosomonas, el arreglo circunferencial de las membranas es similar al de las bacterias fotosintéticas y algas azules. La membrana de Nitrosocystis (especie de afinidad incierta), está localizada hacia el centro y su arreglo se parece al de los cloroplastos de las algas superiores, pero Nitrosocystis no posee capacidad fotosintética.

A.3.a.1) Aspectos metabólicos. Ha sido demostrado (143), que Nitrobacter agilis no puede crecer con tiosulfato, sulfito, hiposulfito, iones fierro, manganeso, arseniato, oxalato, succinato, acetato, malonato, gliceraldehido, formaldehido y urea. Por otro lado, se demostró también, que la nitrificación y la proporción de tal proceso es dependiente de la presencia de bicarbonato; cuando el bicarbonato se encuentra en el medio la nitrificación no es estimulada por la presencia de los compuestos orgánicos listados anteriormente.

En trabajo de Wallece y Nicholas (144), demuestra que algunos compuestos orgánicos tienen efectos inhibitor o estimulantes al crecimiento en Nitrobacter. Por ejemplo, se demostró (142) que el acetato aumentaba el tiempo de generación de 20 h. a 90 h. usando un medio mineral suplementado con este compuesto con una concentración de 5 mM y 0.05% p/v de caseína hidrolizada. Después se llevó a cabo otro experimento, eliminando el nitrito del medio observaron que Nitrobacter puede usar el acetato como fuente de carbono y energía. La absorción máxima de acetato marcado ($I-C^{14}$) por una suspensión de células de Nitrobacter fue llevada a cabo en poco menos de 30 min., y la distribución de los carbonos marcados en las células fue similar a cuando se utilizó acetato en el carbono dos.

Los resultados mostraron que la mayoría del carbono marcado se encontraba en las proteínas y fracción ácida soluble de las células. En el PHB, se encontró cerca del 5% del carbono marcado total, además este polímero mostró ser un importante constituyente para las funciones celulares relacionadas con la reserva de energía (fig. 11). Por otro lado, con lo que respecta a la vía de asimilación y fuente de carbono, se demostró que Nitrobacter y Nitrosomonas, ocupan principalmente el Ciclo de Calvin para fijar CO_2 . Esto se concluyó, en base a que se ha logrado identificar las enzimas involucradas en dicho Ciclo mediante el uso de carbono marcado, que fue localizado principalmente en el fosfogliceradehido, azúcar monofosfato y ácido aspártico, (fig. 10). Se supone que la acumulación del carbono marcado en el ácido aspártico tiene relación con la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.



(1) Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Figura No. 10 Mecanismo para la acumulación de Ac. aspártico, apoyando la observación de la localización (*) del carbono marcado en los compuestos 3-fosfoglicerato, intermediarios de la vía Hexosa Monosfosfato y en el Ac. aspártico.

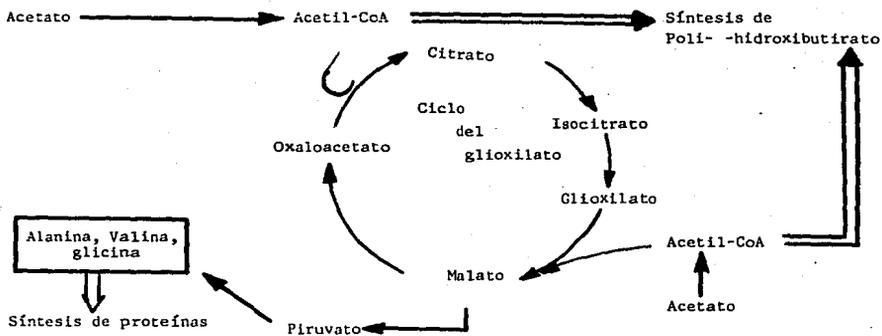


Figura No. 11. Esquema del flujo de carbono, que presentan la mayoría de las Bacterias del Nitrógeno cuando utilizan el acetato como fuente de carbono.

En Nitrosomonas se estimó que la fijación del C^{14} por la carboxidis-
mutasa fue del 70% y el 30% por la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

A.3.a.2) Aspectos bioquímicos del Ciclo Krebs en las bacterias del nitró-
geno. Se ha encontrado que en los microorganismos que tienen funcio-
nando el mecanismo de asimilación de carbono por Ciclo de Calvin, el
nivel de enzimas del Ciclo de Krebs, es muy bajo en comparación con
el nivel presentado en la asimilación de compuestos orgánicos. Debi-
do a esto, se ha propuesto, que el papel principal para el Ciclo
Krebs es anabólico por la falta de la enzima alfa-cetoglutarato des-
hidrogenasa y la baja actividad de las enzimas involucradas.

B) Vías de Utilización de Los Diferentes Compuestos de Carbono.

B.1) Compuestos Superiores de un Atomo de Carbono.

Los compuestos carbonados pueden servir como fuente de carbono y/o energía para los microorganismos, esto depende de las características enzimáticas que posee cada género o especie de bacteria.

En esta sección se revisarán las principales vías por las que son asimilados los compuestos de carbono, pero es importante hacer notar, que se hará énfasis en aquellas vías involucradas en la asimilación de com - puestos con un átomo de carbono, y sólo se mencionarán las que se refieren a compuestos superiores.

B.1.a) Carbohidratos. Estos compuestos se utilizan generalmente como fuente de carbono, hidrógeno, oxígeno y energía. En la actualidad se conocen varios sistemas metabólicos para llevar a cabo su oxidación, entre ellos: las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Hexosa monofosfato y Etner-Duoforoff (ED). Estas vías se encuentran principalmente en las bacterias organoheterótrofas. Entre los carbohidratos más comúnmente utilizados están: glucosa, fructosa, ribosa, galactosa, lactosa, etc., pero esto no quiere decir que sean los únicos.

La glucosa entra directamente a las vías de asimilación; los demás carbohidratos requieren de reacciones previas. El metabolismo de carbohidratos es muy variado y no forma un conjunto único, sino que se relaciona a través de productos intermedios comunes con otras reacciones o vías biosintéticas.

B.1.b) Ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos que provienen del Ciclo de Krebs como el citrato, malato y succinato se encuentran en la naturaleza en plantas y microorganismos, por lo que no es sorprendente que muchos microorganismos sean capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía.

B.1.c) Hidrocarburos. Hay una gran variedad de microorganismos que pueden asimilar estos compuestos. Anteriormente, no se les había dado mucha importancia, pero en la actualidad están recibiendo gran atención por lo que son objeto de diversos estudios.

B.2) Compuestos de un Atomo de Carbono.

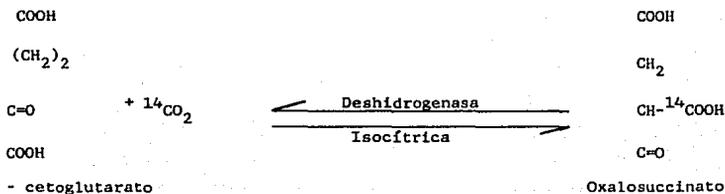
Estos pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, como es el caso del CO_2 .

B.2.a) Asimilación de CO_2 . Antiguamente se consideraba la asimilación del CO_2 exclusiva de los microorganismos quimilitótrofos, pero en la actualidad se ha encontrado que se lleva a cabo en los microorganismos quimioorganoheterótrofos, aunque el papel que desempeñan en cada clase es diferente.

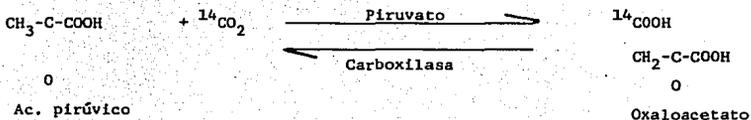
B.2.a.1) Asimilación heterotrófica de CO_2 . La asimilación del CO_2 en las bacterias heterótrofas fue propuesta inicialmente por Wood y Werkman en 1935. Esto surgió de la observación realizada durante la fermentación de glicerol por bacterias del género Propionibacterium. Ellos notaron una disminución del CO_2 contenido inicialmente en el medio en forma de carbonato, y un aumento en los productos de fermentación del glicerol. A pesar de contar con bases experimentales firmes, ésta proposición no fue aceptada y se siguió manejando la asimilación de CO_2 , como característica de bacterias quimilitótrofas (73).

Posteriormente, con el empleo de la técnica de isótopos radioactivos (C_{14}) en Bioquímica, se comprobó que la mayoría de los microorganismos asimilan cierta cantidad de CO_2 mediante las reacciones llamadas anapleróticas, que tienen la función de ayudar a la producción de intermediarios importantes del Ciclo Krebs. Dichas reacciones se pueden resumir en:

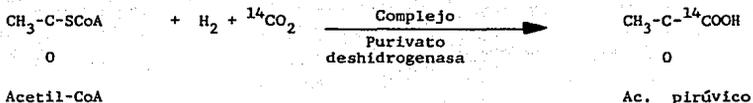
1.- Formación de ácidos tricarbóxicos



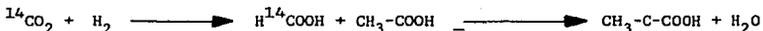
2.- Formación de ácidos dicarboxílicos mediante una (Beta) - oxidación.



3.- Formación de piruvato por (Beta) - carboxilación.

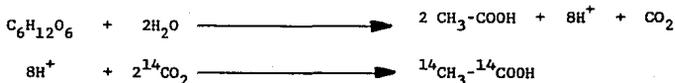


4.- Reacción hidroclástica o fosforoclastica, características de E. coli y Aerobacter aerogenes.



En el reporte de Quayle (89), se menciona que dos investigadores (Baker y Kamen), se encontraron que Clostridium thermoaceticum, es capaz de sintetizar acetato siguiendo el tipo de fermentación que a continuación se detalla:

5.-



B.2.a.2.) Asimilación autotrófica de CO₂. Como se mencionó en la sección de microorganismos fotosintéticos, la asimilación del CO₂ es mediante el Ciclo de Calvin, Ciclo reductor del Citrato y ácidos dicarboxílicos-C₄. De estas tres vías la más común es el Ciclo de Calvin, por lo que llegó a ser considerada como única para cumplir con esta función en los microorganismos autótrofos.

B.2.a.2.1) Ciclo de Calvin. El principal sistema de fijación para el CO₂ en microorganismos autótrofos fue esclarecido durante los estudios que realizaron Melvin Calvin y sus colaboradores, en la Uni-

versidad de California, Berkley, por lo que en reconocimiento a su labor, se le dió el nombre de Ciclo Calvin.

Calvin y colaboradores estudiaron el mecanismo de fijación del CO_2 utilizando dos algas unicelulares: Chlorella pyrenoidesa y Scenedesmus obliquus, como organismos de experimentación. Los métodos experimentados fueron: añadir CO_2 marcado, en forma de bicarbonato a una suspensión de algas iluminadas. Después de unos segundos o minutos, según el experimento, lisaron los organismos mediante una rápida inmersión en etanol. A continuación prepararon extractos de las algas en donde se determinaron los intermediarios del ciclo, merced a una combinación de cromatografía en papel y autorradiografía. Cuando se conocieron las principales etapas del sistema, se diseñó el esquema general de la fig. 12. Demostraron la capacidad de los extractos líquidos de células de llevar a cabo todo el ciclo al purificar más tarde de la enzima responsable de cada una de las reacciones involucradas.

El Ciclo Calvin difiere fundamentalmente de otros mecanismos de fijación para el CO_2 , en que puede tener como resultado la síntesis completa de hexosas a partir de CO_2 . Dos de las enzimas implicadas en este ciclo son únicas, en el sentido de que no se han encontrado en otros sistemas; se trata de la fosforribulocinasa, que fosforila la ribulosa-5-fosfato con ATP, para dar la ribulosa-1,5, difosfato, y la ribulosa difosfato carboxilasa, que cataliza la reacción entre la ribulosa-5-difosfato y el CO_2 , para dar dos moléculas de 3-fosfo glicerato. Las enzimas restantes del Ciclo Calvin se encuentran en muchos microorganismos, si no en todos ellos, donde se catalizan las reacciones del sistema Hexosa monofosfato.

Aunque en este ciclo se produce una molécula de hexosa a partir de seis moléculas de CO_2 , es importante hacer constar que, varios de los intermediarios del ciclo pueden ser segregados de él y ser utilizados en la síntesis de constituyentes celulares. Los puntos principales de desviación son: 3-fosfogliceraldehído (que puede conducir a la síntesis de piruvato por el sistema EMP), la eritrosa-4-fosfato (conducente a la síntesis de aminoácidos aromáticos), la ribosa-5-fosfato (utilizada en la síntesis de nucleótidos) y la hexosa monofostato, fig. 12. Las cantidades que se encuentran en el

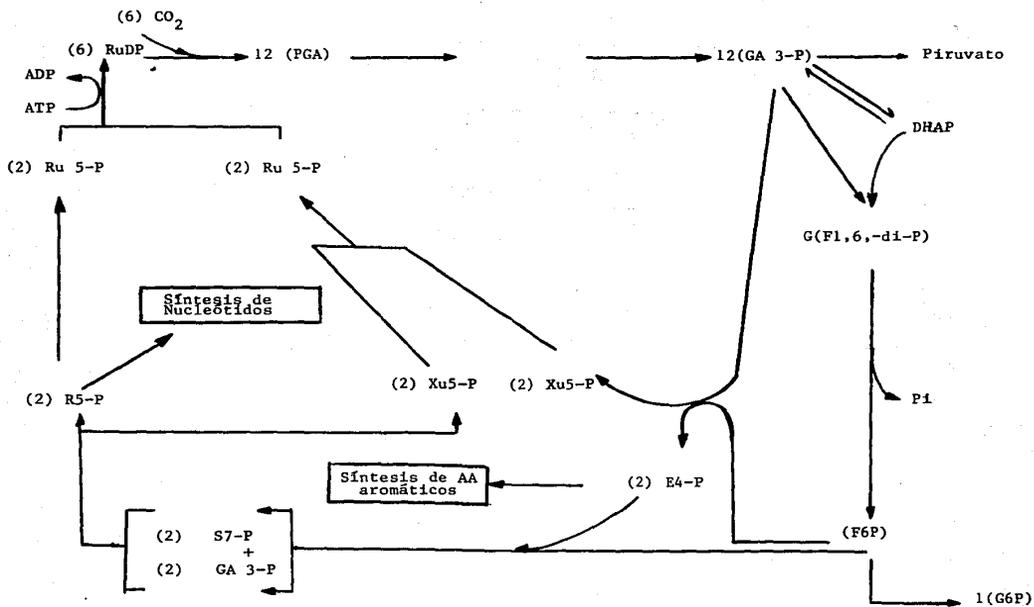


Figura No. 12 Mecanismos de fijación de CO₂ en autótrofos o Ciclo Calvin (76). Abreviaciones de los intermediarios: AFG, Acido fosfoglicérico GA3-P, Gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, Dihidroxiacetona fosfato; F6P, Fructosa-6-fosfato; G6P, Glucosa-6-fosfato; E4P, Eritrosa-6-fosfato; Xu5P, Xilulosa-5-fosfato; S7P, Sedoheptilosa-7-fosfato; R5P, Ribosa-5-fosfato; RuDP, Ribulosa 1,5, difosfato.

ciclo no deben sobrepasar las cantidades necesarias para mantener la secuencia del mismo.

Reacciones enzimáticas del Ciclo de Calvin. El primer paso en la reducción del CO_2 , es la reacción catalizada por la enzima carboxidismutasa (ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa), que comprende la interacción del CO_2 con la ribulosa-1,5, difosfato, que como ya se dijo, conduce a la síntesis de dos moléculas de Ac.3-fosfoglicérico (APG), una de las células tiene el átomo de carbono proveniente del CO_2 . El APG constituye el primer intermediario estable del proceso reductor del CO_2 , el átomo de carbono CO_2 está en el mismo nivel de oxidación en el APG; las dos etapas siguientes comprenden la reducción del APG al nivel de oxidación de los glucósidos. En esta fase se requiere tanto de ATP como de NADH_2 ; el primero interviene en la reacción que activa al grupo carboxilo y el segundo en la reducción misma. El átomo de carbono proveniente del CO_2 , ahora se encuentra al nivel de reducción deseado. Posteriormente, la ribulosa 1,5-difosfato utilizada se genera. Las restantes reacciones del ciclo se dedican a llevar a cabo dicha regeneración.

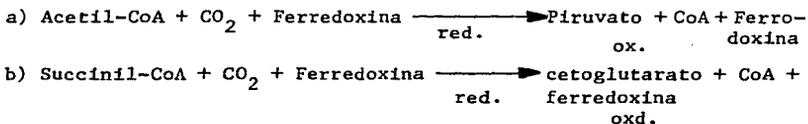
Regulación del Ciclo de Calvin en las Bacterias. El control de la actividad enzimática se lleva a cabo por:

- 1.- AMP. En 1965 Johnson y Peck (78), descubrieron la inhibición de la fijación del CO_2 en la ribosa,1,5,-difosfato por el AMP usando extractos de T. thioparus. Propusieron entonces, que tal forma tenía un mecanismo dependiente de ATP. La inhibición de la fijación fue subsecuentemente observada en extractos libres de células, procedentes de H. fecalis y T. novellus. En contraste con la observación anterior, descubrió que la enzima purificada ribulosa,1,5-difosfato carboxilasa era parcialmente inhibida por el ATP a una concentración de 3.5. mM. Esto hizo suponer que la regulación de ésta enzima en el Ciclo Calvin, responde a una regulación muy sensible.
- 2.- NADH. El NADH (78), es el agente reductor utilizado por esta clase de bacterias para la fijación de CO_2 . MacFadden y Tu en 1965 y 1967, respectivamente, realizaron experimentos con la finalidad de comprobar la inhibición de las enzimas responsables de la reduc

ción del CO_2 por el AMP. Esto fue probado para la RuPD carboxilas, pero no así para la fosfaribulosa-cinasa (PRC). Mac Eroy, en 1969, aportó un importante hallazgo relacionado con esta discrepancia que fue: "El NADH, es un efector alostérico positivo de la fosforibulosa-cinasa. Esto, ciertamente contribuye a la aceleración del flujo de carbono en el ciclo, aunque tiende a bajar la concentración del reductor.

3.- Otros metabolitos. Se ha encontrado que no sólo los compuestos mencionados anteriormente tienen efecto sobre las actividades enzimáticas del Ciclo Calvin, sino que de una manera relativa, se ha encontrado que son afectadas, dichas actividades, por metabolitos como fosfoenol piruvato y fosfogluconato (intermediarios importantes en el metabolismo heterotrófico de las bacterias del hidrógeno y azufre), cuando sobrepasan la cantidad de 3.5 mM (78).

B.2.a.2.2) Ciclo reductor del citrato. Este ciclo también se conoce como Reserva del ATC, ciclo reductor de los ácidos tricarbóxicos o Sistema de Acetil-CoA. Entre las bacterias litotróficas fotosintéticas, se encontró (95) que el acetato era el primer compuesto con mayor rendimiento, después de la fijación de CO_2 . Tales bacterias fueron Chlorobium limicola y otras del mismo género. Investigaciones posteriores condujeron al descubrimiento de las enzimas responsables de este funcionamiento invertido.



Estos descubrimientos llevaron posteriormente a la formulación de un nuevo ciclo para la fijación de CO_2 , que se denominó principalmente de la Acetil-CoA. Este ciclo tiene invertidas algunas reacciones del Ciclo de Krebs y da como resultado la síntesis de una molécula de oxalacetato a partir de cuatro moléculas de CO_2 y la regeneración del primer aceptor del CO_2 : la Acetil-CoA. Tal sistema es encontrado como una vía auxiliar a la descrita por Calvin, ya que no existen o no se han encontrado microorganismos que se demuestren a

a esta vía como única para la asimilación del CO_2 , fig. 13.

B.2.a.2.3.) Vía de los ácidos dicarboxílicos- C_4 . En este caso el CO_2 es fijado por las enzimas fosfoenol carboxilasa y piruvato carboxilasa con lo cual se tiene la síntesis del oxaloacetato, el malato es sintetizado por la enzima málica fijando el CO_2 . La ruta es la regeneración del 3-fosfoglicerato, para posteriormente seguir al Ciclo de Calvin. Los ácidos dicarboxílicos- C_4 son regenerados por el funcionamiento del Ciclo de Glioxilato o bien por el Ciclo de Krebs, cuando éste se encuentra presente. Fig. 14.

B.2.b.) Utilización de compuestos monocarbonados orgánicos. Muchas especies de bacterias son capaces de crecer en compuesto de un átomo de carbono diferentes al CO_2 . Estos compuestos son usados generalmente como fuente de carbono y energía, pero, se ha pensado que se podría acoplar la energía de oxidación de estos substratos a la reducción de CO_2 . Al respecto no hay nada realizado y sólo queda como un comentario del reporte realizado por Zhao y Hanson (147).

Es ahora claro que existen dos mecanismos distintos por los cuales se pueden asimilar el carbono de compuestos orgánicos monocarbonados. Las dos vías son: 1.- Vía Serina y 2.- Vía de la Alulosa, las cuales son encontradas en todos los microorganismos que crecen con substratos como: metano, metano, formaldehído, metilamina o ac. fórmico. La vía de la Alusosa, hasta la fecha, ha sido descrita sólo en bacterias del metano obligadas, independientemente de si han estado creciendo o no en metano o metanol.

Parece ser que la vía de la Serina, que ocurre en todos los microorganismos que utilizan compuestos orgánicos monocarbonados, incluyendo a las bacterias metano-oxidante, por ejemplo M. methanooxidans y en aquéllos que crecen con formato, excepto P. oxalaticus.

El número de especies que hasta ahora han sido estudiadas es muy limitado, y lo poco que se ha realizado se debe a Quayle y colaboradores (88,89), quien determinó: (a) la cinética inicial en la incorporación del carbono radioactivo a los compuestos estables no volátiles alcohol soluble, (b) la distribución de isótopos de carbono en los metabolitos aislados, y (c) ciertas actividades enzimá-

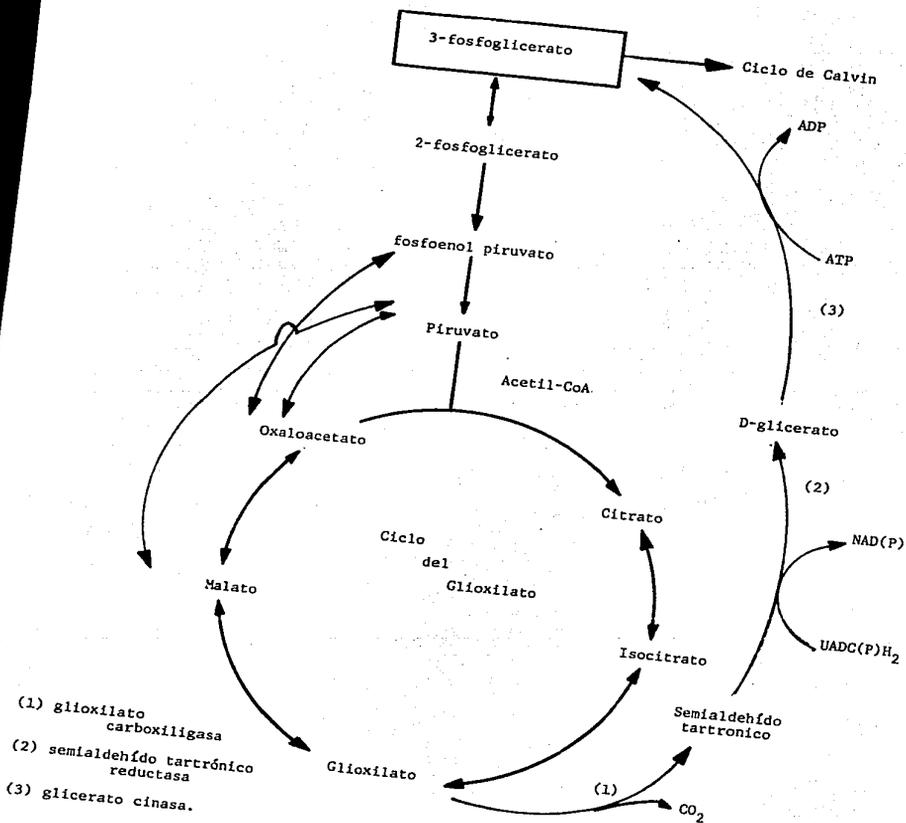


FIGURA No. 14 Vía de los Acidos C -dicarboxílicos. El CO₂ es fijado por las enzimas (4) Piruvato carboxilasa, (5) Fosfoeneol piruvato carboxilasa y (5) por la enzima Mállica, con lo cual se produce oxaloacetato y malato.

ticas clave, predichas en base a los experimentos con isótopos.

B.2.b.1) Vía de la Serina. Los compuestos orgánicos monocarbonados, tales como el metanol, formaldehído, formato y metilaminas, son rápidamente incorporados en la serina y melato durante el crecimiento de Pseudomonas-AM1, Pseudomonas MS, Pseudomonas PRL-W5, Hyphomicrobium vulgare, M. methanooxidans y diplococos. En la actualidad hay una cantidad considerable de evidencias que indican que la hidroximetilación de la glicina, para conservarla en serina, es un mecanismo importante para la asimilación de estos compuestos. La vía de la Serina, Fig. 15, se encuentra en este tipo de microorganismos así como la Vía de Calvin entre los fijadores de CO_2 .

La distribución del carbono marcado, administrado en los substratos monocarbonados, en los metabolitos intermediarios sugieren dos reacciones asimilatorias iniciales: una es la hidroximetilación de la glicina para producir serina y la carboxilación de un fragmento de tres carbonos, provenientes de la serina. Los resultado de los estudios enzimáticos indican que hay dos posibles secuencias de reacciones para la síntesis de constituyentes celulares. Ellos sólo difieren en la manera por la cual el aceptor para los fragmentos reducidos de 1C , dá origen a la glicina.

En la parte (a) del esquema se muestra la síntesis "de novo" de la glicina a partir de 1C y CO_2 . En la parte (b) la glicina es regenerada, como una secuencia de reacciones cíclicas en las cuales se tiene la escisión de una molécula de cuatro átomos de carbono, produciendo dos de 2C , que son utilizadas para la síntesis de constituyentes celulares y glicina. Aún con los estudios realizados y la identificación del precursor de la glicina, el mecanismo de síntesis no es conocido a ciencia cierta.

En la figura 16 se muestran cuales son las enzimas catalizadoras de la vía de la Serina y su relación con otras reacciones biosintéticas. Ahí se indican los pasos incluidos en la formación de la serina y el oxaloacetato, partiendo del formato. Cuando un compuesto más reducido que el formato, está como substrato para el crecimiento, entonces el formaldehído formado de ellos se puede convertir di

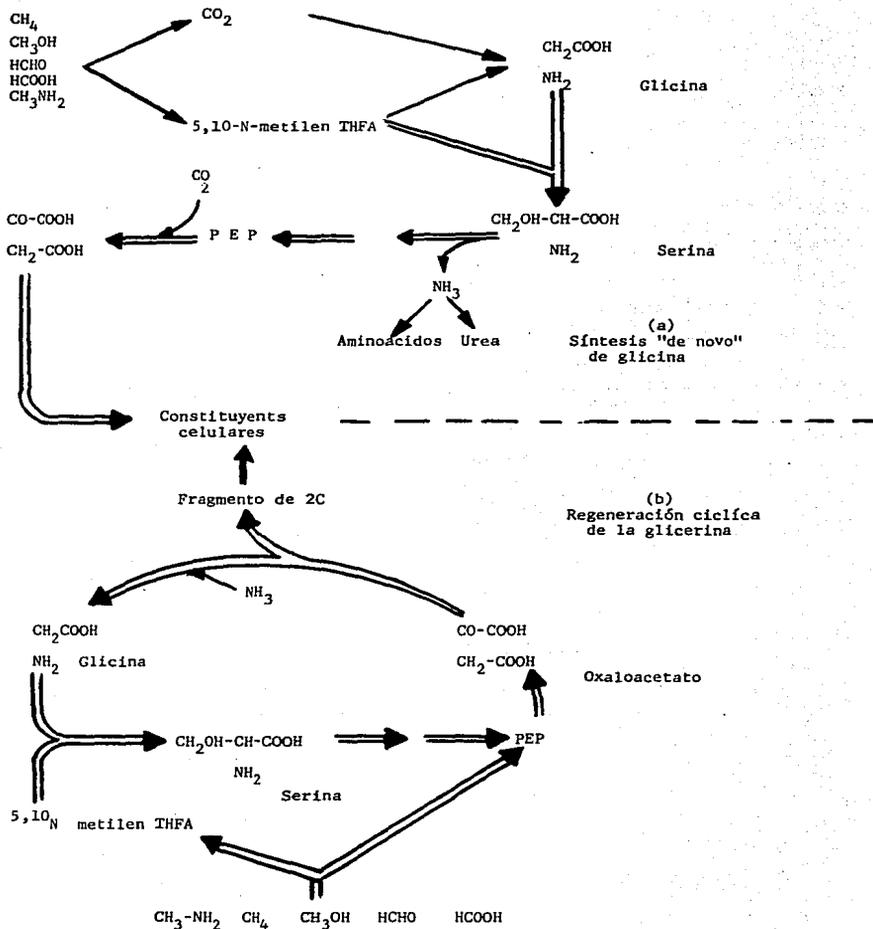


Figura No. 15 Vía Síntesis de glicina partiendo de compuestos reducidos de 1C. La glicina así sintetizada interviene en la Vía de la Serina.

rectamente en $N^{5,10}$ -metilen tetrahidrofolato, formando la parte activa que será usada en la síntesis de serina.

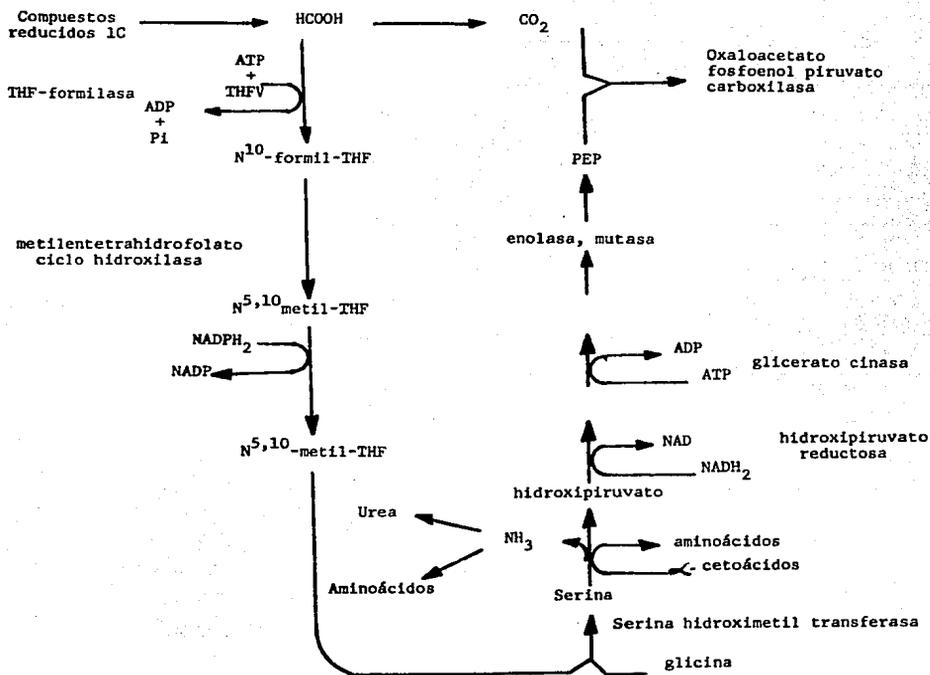


Figura 16 Pasos de la Vía de la Serina partiendo del formiato.

B.2.b.2) Ciclo de Quayle para la fijación de formaldehido. Esta vía también es conocida con el nombre de Vía de la Alulosa o Ciclo de Quayle para la fijación de formaldehido, fig. 17. Es un sistema de fijación enteramente diferente a los encontrados en otros microorganismos que fijan compuestos orgánicos reducidos monocarbonados. Aquí, en vez de que la serina y el malato sean los productos iniciales de incorporación, se encontró que algunos compuestos fosforilados estaban desempeñando tal papel. La identificación de estos compuestos mostró como intermediarios predominantes esqueletos de glucosa y frutosa.

En la vía de la Alulosa se condensa el formaldehido con la ribosa-5-fosfato (condensación acilofínica) para dar un carbohidrato de seis carbonos, la alulosa, la que posteriormente es convertida en fructosa-6-fostato. Los siguientes pasos están encaminados hacia la producción de triosas (gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato), mismas que son ocupadas para la síntesis de constituyentes celulares y regeneración de la ribosa-5-fosfato, inicialmente utilizada.

El ciclo o Vía de la Alulosa tiene cierto parecido con el Ciclo de Calvin, la principal diferencia entre ambos está en que, en la fijación del formaldehido se evita el paso reductor (conversión del fosfoglicrato en gliceraldehido) donde el carbono del CO_2 pasa a nivel de formaldehido.

Las bacterias que oxidan el metano utilizan los sistemas de la Alulosa o de la Serina, pero no ambos a la vez. El que posean uno y/u otro, no carece de interés porque se propone que esta diferencia está relacionada con circunstancias evolutivas (92).

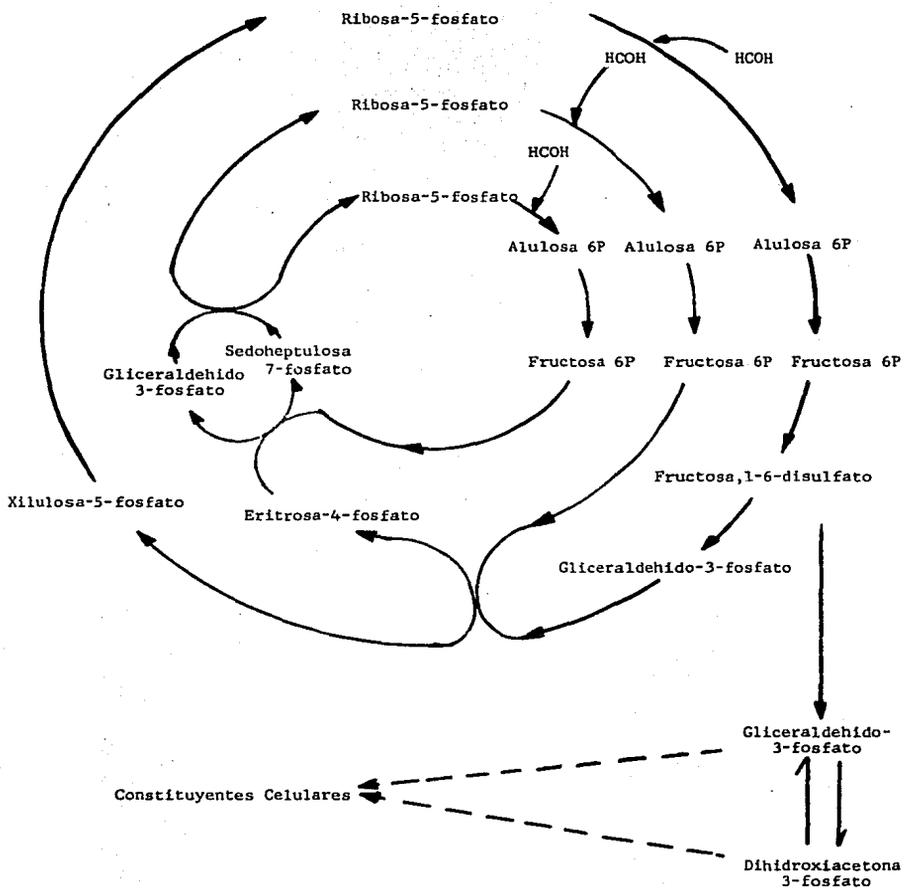


Figura 17 Esquema de la vía de la Alulosa para la fijación de formaldehído. El sistema muestra la fijación de tres moléculas de formaldehído para dar una molécula de triosa fosfato.

CAPITULO III
BIOQUIMICA DE LA RESPIRACION EN MICROORGANISMOS
QUIMIOLITOTROFOS

- A) Antecedentes Históricos.

- B) Respiración Aerobia.
 - B.1) Bacterias Quimioorganótropas Aerobias
 - B.2) Bacterias Quimiolitótropas Aerobias
 - B.2.a) Bacterias del hidrógeno
 - B.2.b) Bacterias del azufre
 - B.2.c) Bacterias del nitrógeno
 - B.1.c.1) Bacterias nitrosificantes
 - b.2.c.2) Bacterias nitrificantes

- C) Respiración Anaerobia o Anoxibiótica.
 - C.1) Bacterias Sulfato Reductoras
 - C.2) Bacterias Nitrato Reductoras
 - C.3) Bacterias Metanogénicas

BIOQUIMICA DE LA RESPIRACION EN MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS.

A) Antecedentes Históricos.

Hay dos clases de procesos productores de energía en los microorganismos quimiotrófos, a saber; la respiración, que puede ser aerobia o anaerobia y la fermentación. Tabla No. 11.

La respiración se caracteriza por ser llevada a cabo por un grupo de compuestos especializados llamados transportadores electrónicos y que en conjunto forman "La Cadena Respiratoria". Los compuestos que forman la cadena respiratoria en organismos procarlotes y eucarlotes son diferentes, lo que tienen en común son sus funciones objetivo, entre las que podemos contar: 1.- Aceptar los electrones del donador y transferirlos al aceptor; 2.- Conservar parte de la energía liberada durante la transferencia electrónica, mediante la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa), figura 18. Hay una tercera función característica particular de los microorganismos quimiolitótrofos que es la producción del poder reductor en forma de NADH. Esta última función no la encontramos en las bacterias del hidrógeno, porque ellas producen el NADH por una reacción directa con el hidrógeno, debido a los potenciales de reducción.

El poder reductor que se forme en la célula, depende del estado de oxidación del substrato que va a ser asimilado. Esto es, si el compuesto está más oxidado que el material celular, su asimilación requiere una considerable cantidad de piridín dinucleótidos reducidos, que en los microorganismos organotrófos se produce principalmente por el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos y en los quimiolitótrofos por un mecanismo llamado "Reversa del Flujo Electrónico en la Cadena Respiratoria" figura 19.

Los transportadores que participan en el flujo electrónico poseen valores graduales decrecientes de E'_0 , comprendidos entre el inicial del sistema redox del substrato reductor, cuyo valor E'_0 por lo general es negativo y el valor final es positivo.

En la Tabla No. 12 puede observarse la posición en la escala de valores E'_0 de algunos de los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria, así como los substratos inorgánicos usados como aceptores y donadores de electrones, por los diferentes microorganismos.

	Grupos de bacterias	Género/Especie	Características
Respiración	Sulfato-reductoras	Desulfovibrio desulfuricans Desulfovibrio gigas Desulfovibrio africanus Thiobacillus denitrificans Desulfotomaculum nigrificans orientis thermodesulfuricans	Quimioorganotrofas Anaeróbicas facultativas y quimiolitotrófo facultativo.
Anaerobia o Anaxobiotica	Nitrato-reductoras	Thiobacillus denitrificans Micrococcus denitrificans Pseudomonas aureoginosa	Quimiolitótrofos Aerobios facultativos Quimioorganotrófo
	Metanogénicas		Quimioorganotrófas Anaerobios estrictos
Respiración Aerobia	Bacterias del Hidrógeno	Hydrogenomonas	Quimiolitótrofo facultativo, aerobio estricto
	Bacterias del Azufre	Thiobacillus	Quimiolitótrofo facultativo, aerobios estrictos excepto Thiobacillus denitrificans.
	Bacterias del Nitrógeno	Nitrosomonas Nitrobacter	Quimiolitótrofas, aerobios estrictos.
		QUIMIOORGANOHETEROTROFAS	Aerobios facultativos

Tabla No. 11. Tipos de Respiración en los Grupos Principales de Microorganismos Quimiolitótrofos.

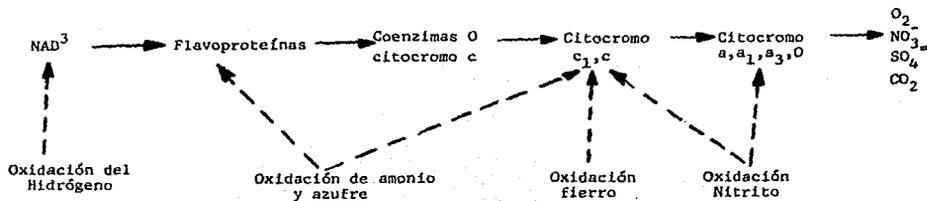


Figura 18. Puntos de entrada a la cadena respiratoria de los equivalentes reductores provenientes de la oxidación de compuestos inorgánicos- I, II, III. Indican los probables sitios de acoplamiento con la fosforilación oxidativa. (85)

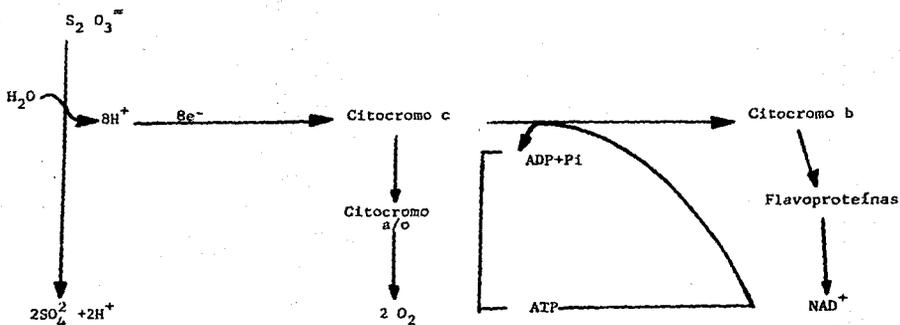


Figura 19. Esquema generalizado de la reversa del Transporte de Electrones, para los compuestos de azufre y nitrógeno. (85)

SUBSTRATO	POTENCIALES E
$H_2O / \frac{1}{2} O_2$	+ 0.80
Fe^{2+} / Fe^{3+}	+ 0.77
citocromo b (red.) / citocromo b (oxd.)	+ 0.50
NO_2^- / NO_3^-	+ 0.42
citocromo c (red.) / Citocromo c (oxd.)	+ 0.25
S^0 / S^{2-}	+ 0.14
$S_4O_6^{2-} / S_2O_3$	+ 0.09
flavoproteína (red.) / flavoproteína (oxd.)	- 0.31
$NAD(P)H_2 / NAD(P)^+$	- 0.32
-cetoglutarato deshidrogenasa	- 0.38
ferredoxina (red.) / ferredoxina (oxd.)	- 0.41
$H_2 / 2H^+$	- .042

Tabla No.12 Tabla de potenciales estandar para los diferentes substratos inorgánicos y para algunos de los componentes de la cadena respiratoria.

Uno de los aspectos que considero más relevante de la fisiología de los quimiolitótrofos es su mecanismo de producción de energía a través de la "reversa de la cadena respiratoria". Ya que este mecanismo es típico de los quimiolitótrofos, me parece conveniente revisar algunas características generales de la cadena respiratoria, así como los antecedentes que contribuyeron al entendimiento de la producción de energía en los microorganismos quimiolitótrofos.

A.1) Componentes de la cadena respiratoria. Sobre el tema puedo decir, que es uno de los de mayor controversia, sobre todo por lo que respecta a los sistemas bacterianos, debido a la gran diversidad que presentan (40). En las cadenas respiratorias hasta ahora estudiadas, se ha observado que estan constituidas por tres tipos de moléculas; los dos primeras estan formadas por enzimas que llevan unidos grupos prostéticos, capaces de sufrir oxidación, tales moléculas son la flavoproteínas y los citocromos que de estos ultimos existen diferentes tipos (a,b,c, u o). El tercer tipo de molécula esta formada por las quinonas que son transportadores no protéticos, de peso molecular relativamente pequeño.

El NAD (Nicotín Adenín Dinucleotido), es un compuesto de gran importancia en la cadena respiratoria. Esta molécula junto con el NADP, son clasificados como coenzimas para un gran número de deshidrogenasas, con la única función de actuar como agentes de transportación de átomos de hidrógeno en las reacciones de oxido-reducción. La oxidación de estos compuestos produce un rendimiento neto de 53 calorías, además su destino metabólico, principalmente el NADH, es ser reoxidados como primera etapa en la serie de reacciones de la cadena respiratoria. Aunque el NADPH, también puede ser reoxidado por el mismo proceso, su principal función es servir como donador de hidrógenos en algunas reacciones biosintéticas.

La secuencia en que estos compuestos actuan, se pueden ejemplificar como se muestra en la figura 20.

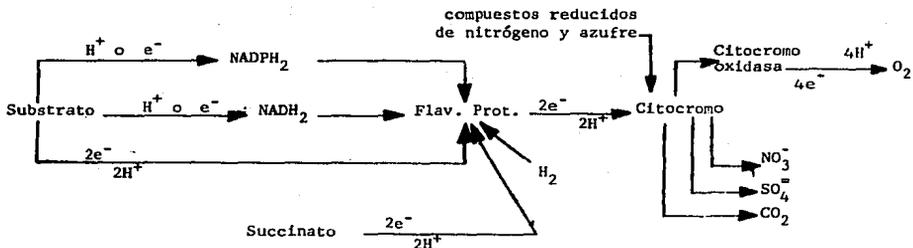


Figura No. 20 Esquema del flujo electrónico proveniente de los Nicotín Dinucleotidos, en la cadena respiratoria.

Los citocromos de tipo "a", tienen la función de pasar los electrones al oxígeno, nitrato, sulfato, bioxido de carbono según sea el caso. La clase de citocromos que se pueden encontrar en una cadena respiratoria, no siempre es la misma. Los citocromos de tipo " b y c", son los intermediarios entre las flavoproteínas y los citocromos a. De este modo llevan a cabo la oxidorreducción alternante, durante la oxidación de los substratos y tal oxidación tiene como resultado la producción de ATP. Un punto importante, que se debe hacer notar, es que no todos los citocromos aislados tienen relación con la cadena respiratoria, sino que se pueden encontrar algunos que son independientes al transporte electrónico de la cadena respiratoria.

Por otro lado, se ha visto, que no todos los citocromos estan presentes en todas las bacterias, por ejemplo: en Nitrobacter, el citocromo b, no se ha podido demostrar claramente, se cree que la cantidad es tan pequeña que queda enmascarada por la concentración del citocromo c.

En las bacterias quimiolitótrofas, las características de los componentes de la cadena respiratoria, su secuencia y acoplamiento para la producción de energía (ATP), han sido objeto de estudio en los últimos 20 años.

A continuación haré una semblanza histórica de los estudios que al respecto se han realizados.

El primer estudio, en el cual se verificó la utilización de compuestos inorgánicos como fuente de energía, fue realizado por Winogradsky en 1888-1890, utilizando a las bacterias del nitrógeno. A partir de este reporte se han hecho un gran número de estudios, con la finalidad de determinar la secuencia de los componentes. La primera teoría fue realizada por Meyerhof en 1916-1917 y la introdujo como "Teoría de la Respiración en Quimiolitótrofos". Esto fue resultado de algunos experimentos, donde se utilizó una especie de Nitrobacter. Se consideró este proceso similar a las otras respiraciones celulares, consistiendo de una serie de transportadores de electrones, operando desde el nitrito hasta el oxígeno. Esta teoría fue favorecida por los resultados y observaciones subsecuentes, que fuerón: el descubrimiento de los citocromos en las bacterias, (esto lo realizó Lessy Simpson en 1957, Aleem y Alexander en 1958 y Aleem y Nason en 1959). De aquí se concluyó que efectivamente la síntesis de ATP estaba acoplada con la oxidación de compuestos inorgánicos,

esto último fue publicado por Aleem y Nason en 1960 (2).

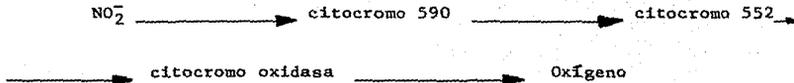
En 1962 se reportaron resultados que no coincidieron con lo supuesto por Aleem y Nason. Estos resultados fueron: "Nitrobacter winogradsky, requiere energía en forma de ATP para la oxidación de nitrito, por lo que una vía simple y directa en el transporte electrónico desde el nitrito al oxígeno, parece no ser posible". Esta publicación dio origen a algunos trabajos efectuados en 1963, donde pudieron determinar de una manera aproximada los sitios o reacciones que deberían consumir energía, como lo afirmaban los reportes de 1962. Estos autores concluyen lo siguiente: "Los substratos utilizados como fuente de energía por las bacterias llamadas autótrofas (excepto las bacterias del hidrógeno), tienen valores de potencial redox más positivos que el par $NAD^+ / NADH$ por lo que una reducción directa o espontánea, termodinámicamente no es posible. Además el nitrito requiere oxígeno para su oxidación".

De esto, Kiewson sugirió, que el consumo de oxígeno se realiza paralelamente a la oxidación de los compuestos inorgánicos, suministrando así la energía necesaria para llevar a cabo los procesos celulares. Este punto fue discutido y aclarado por Aleem y colaboradores en 1963 (2), quienes examinaron en espectroscopio los extractos libres de células de Nitrobacter el cual había crecido en condiciones aerobias. Los resultados obtenidos de aquí fueron: "La reducción de NAD^+ por los citocromos c, en presencia de un donador de electrones como el nitrito, tuvo lugar solo cuando el ATP está presente en el medio". Posteriormente, en 1964 se demostró directamente en Nitrobacter la reducción del NAD^+ adicionando nitrito y controlando la reacción con un desacoplante de la fosforilación oxidativa. Este experimento lo realizó posteriormente en Nitrosomonas europea y Thiobacillus novellus, obteniendo los mismos resultados.

En este mismo año Kiewson obtuvo una serie de resultados que marcaron un avance importante en esta clase de estudios, debido a que no se habían presentado. El encontró que Nitrobacter era capaz de reducir nitrato a nitrito; en sistemas libres de células la reducción se pudo obtener adicionando NADH al medio (no sucedió lo mismo con el NADP) como reductor. Con esta característica se demostró la participación de los citocromos que se habían descrito por Lees y Simpson en 1957, para la respiración aerobia del nitrito; también identificó una flavoproteína, que posteriormente la purificó Straat y Nason en 1965. El sistema de reducción del

nitrate, se localizó en las partículas obtenidas de las dobles membranas celulares, donde el supuso se lleva a cabo la oxidación del nitrato, esto fue corroborado con las observaciones, de que la reducción del nitrato consiste de una reversión completa o parcial de la oxidación del nitrito. Tal reducción, se reportó también, esta influenciada por iones magnesio, fosfato inorgánico y ADP, además hay una pequeña cantidad de ATP producida. Esto último fue de gran interés, por lo cual, en ese mismo año se desarrollo otro experimento usando un inhibidor de la cadena respiratoria (2,4-dinitrofenol). Como resultado se obtuvo la misma cantidad de ATP producida anteriormente, lo cual probó que esta síntesis de ATP no esta ligada a la cadena respiratoria en la respiración anaerobia. Como es de esperar, los científicos que participaron de alguna manera en el desarrollo de estos trabajos y que estuvieron de acuerdo con la conclusión de que: "La oxidación del nitrito es una reacción que consume energía, además que el NADH no puede ser reducido directamente por la oxidación de los substratos inorgánicos; y que la reducción de nitrato es una reacción generadora de ATP (solo para Nitrobacter)", hizo que les surgiera la pregunta ¿Cuál o cuales vías utilizan los microorganismos autótrofos para producir el ATP ?.

Quien hizo el trabajo más completo fue Kiewson en 1964, siguiendo la secuencia de sus investigaciones. Aquí demostró que pequeñas cantidades de NADH, en presencia de oxígeno, no permitían la oxidación del nitrito, pero si el ATP estaba en suficiente cantidad los efectos del NADH quedaban inhibidos. Esto llevó a concluir: " El NADH controla la oxidación del nitrito, pero este a su vez es controlado por la concentración de ATP en la célula". Con estos resultados Kiewson infirió la existencia de dos vías, una que permite la oxidación del NADH por el oxígeno y otra mediante una reacción acoplada a la oxidación del nitrito con consumo de ATP. Además de estas observaciones, reportó que la oxidación enzimática del NADH y la producción de ATP, se lleva a cabo por los mismos citocromos que intervienen en la oxidación aerobia del nitrito y la reducción del nitrato. Estos citocromos son los reportados por Lees y Simpson como del tipo c y con una banda de absorción de 552 y 590 nm. Ambos citocromos toman parte en los siguientes pasos:



El citocromo con banda de absorción de 590nm. es el primer sitio de interacción entre el substrato inorgánico y los acarreadores de electrones en la cadena respiratoria, según Kiesow. Además este flujo puede proceder hacia el oxígeno vía citocromo oxidasa y producir ATP o bien hacia la oxidación de un substrato endógeno o el NADH. Cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones, el sistema es sensible al KCN y CO_2 .

Con las observaciones precedentes se llegó a una nueva concepción de la generación de energía, mecanismos muy particular de las bacterias quimiolitótrofas, que como mencioné anteriormente se llama "Reversa del Transporte Electrónico en la Cadena Respiratoria". Este mecanismo consiste básicamente, en el consumo de energía para la producción de NADH a partir de NAD^+ , que es llevada a cabo por los citocromos y posteriormente la energía se produce por fosforilación oxidativa mediante la oxidación del substrato inorgánico que interacciona directamente con los citocromos en un sitio específico. Las características particulares de cada grupo de bacterias quimiolitótrofas las trataré por separado.

La revisión del mecanismo empleado en la respiración se hará usando el tipo de respiración que presentan los microorganismos (Tabla No. 11) de donde resultan dos grandes grupos, estando las bacterias objeto de esta revisión, incluidas en la respiración aerobia.

B) Respiración Aerobia.

La respiración aerobia u oxidativa, incluye un gran número de procesos, comparados con la fermentación y la respiración anaerobia. Consiste en una oxidación enzimática total de las moléculas teniendo como aceptor final de electrones al oxígeno molecular. En este aspecto hay dos grupos de bacterias que realizan este tipo de respiración, pero con mecanismos diferentes. El primer grupo, se refiere a las que utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones y fuente de

carbono (Quimioorganoheterótrofos), el segundo se refiere a las bacterias que utilizan substratos inorgánicos como fuente de electrones y como fuente de carbono utilizan principalmente el CO_2 , porque también pueden asimilar los compuestos a los compuestos orgánicos (Quimioolitoautótrofos).

B.1) Bacterias quimioorganótrofas aerobias. Un gran número de microorganismos obtienen su energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos, teniendo como receptor final de electrones al oxígeno. Esta oxidación se lleva a cabo, por un grupo de enzimas que pertenecen a diferentes vías metabólicas y que actúan en conjunto. Esto hace que los electrones liberados por las deshidrogenasas sean llevados, mediante un flujo organizado al oxígeno. Durante el trayecto del flujo, el ATP es sintetizado por una fosforilación a nivel de substrato por lo tanto en vías diferentes a la cadena respiratoria y por una fosforilación oxidativa, en este caso en la cadena respiratoria. El NADH y FADH se producen principalmente en las vías glucolíticas y el Ciclo de Krebs.

Se puede decir mas sobre esta tema, pero solo me concretare a dar un esquema generalizado para la respiración de bacterias quimioorganotrófas, Figura 21. El esquema sirve de comparación para el siguiente grupo de bacterias. Un punto importante para esto es que, realmente ninguna cadena respiratoria bacteriana ha sido detallada en su totalidad, sino que los estudios siguen teniendo apoyo en los experimentos realizados con organismos eucarioticos, debido a la dificultad y variedad que tienen los organismos procarioticos para el estudio.

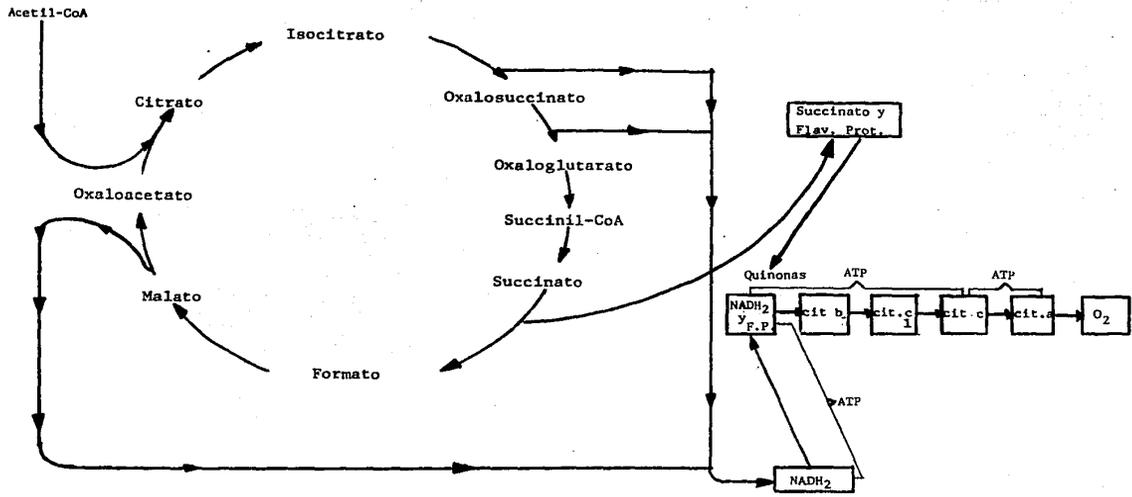


Figura No.21. Esquema general de la respiración aerobia en bacterias quimiorganótrofas.

B.2) Bacterias quimiolitótrofas aerobias. Este grupo de bacterias esta constituido por las bacterias del Azufre, Nitrógeno e Hidrógeno.

B.2.a) Bacterias del Hidrógeno. Este grupo se caracteriza por ser aerobio estricto y presentar un metabolismo mixótrofo, por lo cual sus donadores de electrones pueden ser tanto substratos orgánicos y como inorgánicos utiliza al hidrógeno. Debido a que el par H_2/ H^+ tiene un potencial más alto que el par $NADH_2/ NAD^+$, la reducción del dinucleotido se lleva a cabo espontáneamente, sin hacer uso de la reversa del transporte electrónico. La producción de ATP es mediante la fosforilación oxidativa. Los estudios realizados (117) en Hydrogenomonas 16 revelan que la actividad de las hidrogenasas pueden ser separadas en una fracción soluble y otra ligada a la membrana. La primera enzima cataliza la reducción del NAD^+ con hidrógeno molecular y no requiere de cofactores; es la enzima afectada por la presencia de ATP o NADH, no reacciona con el O_2 , $NADP^+$, o azul de metileno. La inhibición de la hidrogenasa soluble por su producto de reacción (NADH), es característica del efecto alostérico y puede ser responsable de un control para el transporte de electrones.

La hidrogenasa ligada a la membrana reduce el azul de metileno y ocupa al oxígeno como un aceptor fisiológico de electrones. La hidrogenasa soluble podría ser suficiente para proveer a la célula del NADH y ATP necesario para la reducción del CO_2 , por lo que Eberhardt sugiere que la segunda enzima hidrogenasa sea el primer miembro de la cadena de transporte electrónico, el cual está acoplado con la fosforilación oxidativa, produciendo el ATP complementario para las funciones restantes.

Se cree que la fosforilación oxidativa, originada por la oxidación del hidrógeno, esta limitada a la secuencia entre el hidrógeno y el citocromo b. Por otro lado, se supone que el NAD^+ no esta incluido como intermediario para la producción de ATP (124), sino que ocurre en el sitio descrito anteriormente, esto no ha sido debidamente demostrado por lo que, se propone en el mismo artículo, esto sea producto de las condiciones de experimentación.

El metabolismo energético de estas bacterias no ha sido objeto de estudio profundos, pero se tiene un esquema para el posible flujo electrónico, y se presenta en la figura 22.

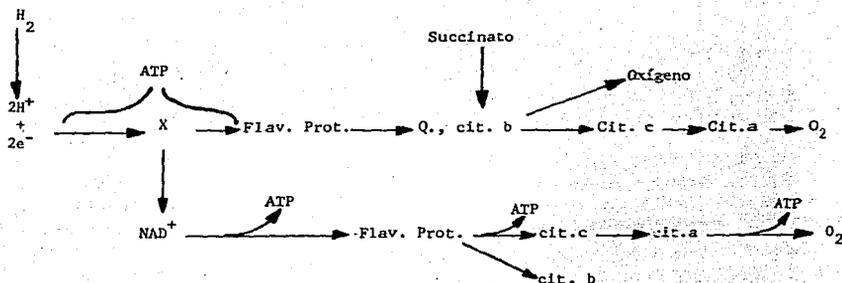


Figura No.22 Flujo electrónico seguido por las Bacterias del Hidrógeno para la obtención de energía. (124).

B.2.b) Bacterias del Azufre. Las bacterias incluidas en este grupo son aerobias estrictas, excepto Thiobacillus denitrificans, que es un aerobio facultativo. Para el estudio de la oxidación de compuestos de azufre y su relación con la cadena respiratoria, es conveniente tratar el tema revisando las especies por separado o en grupo, cuando esto sea posible.

Thiobacillus ferrooxidans. Esta bacteria deriva su energía de la siguiente reacción:



Aunque también puede utilizar otros compuestos, principalmente de azufre, como se describirá posteriormente. La generación de NADH es energéticamente dependiente, porque es a través de la reversa del transporte de electrones en la cadena respiratoria, esto es va en dirección del citocromo c al NAD⁺. Los citocromos encontrados en

estas bacterias son de tipo c y b, así como también ubiquinonas. La función de estos componentes en la cadena respiratoria, junto con la oxidación del ión ferroso ha sido propuesto por Aleem (124), donde también menciona la necesidad de estas bacterias por el ión sulfato, figura 23.

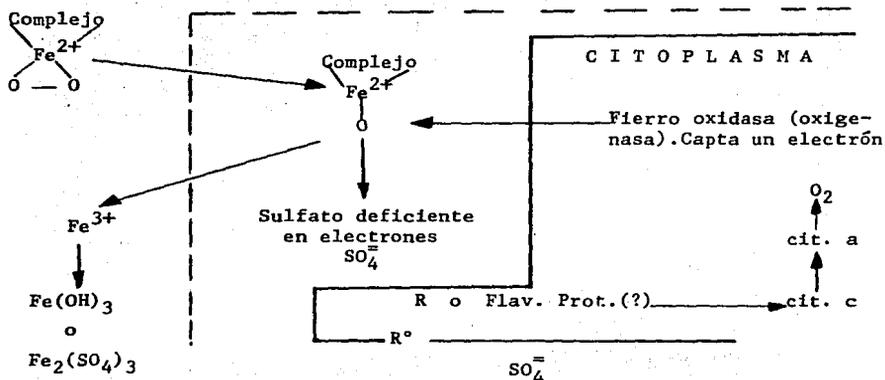


Figura No.23 Mecanismo de oxidación para el ion ferroso, mediante el complejo propuesto por Aleem (124).

El par Fe^{2+}/Fe^{3+} tiene un potencial igual a +0.77 V, lo que hace probable una reducción directa del citocromo c por el ión ferroso. Se ha propuesto que este ión puede ser complejado, como por ejemplo, con el oxalato para formar el oxalato de hierro III. El potencial de este complejo es aproximadamente cero a pH=4 -7. Esto hace posible la reducción enzimática del citocromo c por el ión ferroso, generando así energía. Tal suposición solo se ha comprobado "in vitro". La entrada del ión ferroso a la célula según Aleem (124), debe ser toda la molécula o bien solo ser atacado a nivel de membrana en un sitio específico donde se acoplen la oxidación del hierro con el mecanismo de reducción del CO_2 .

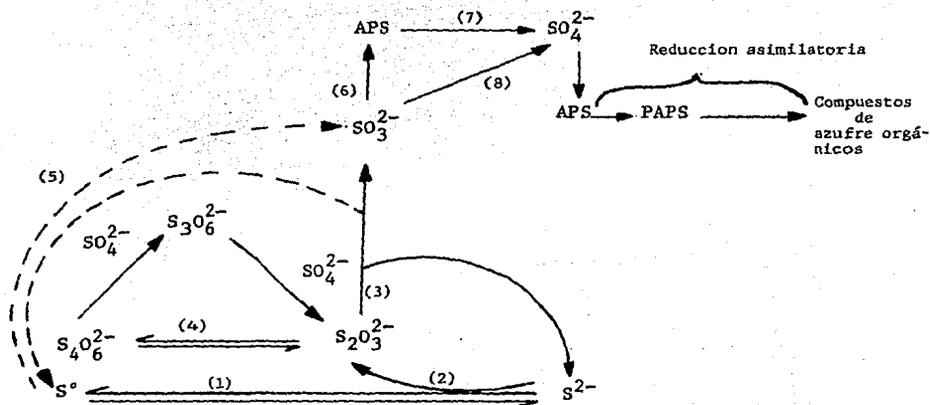
La oxidación del Fe^{2+} produce energía, por lo que se forma un complejo, teniendo unidos al hierro 2 átomos de oxígeno. Aquí el hierro sólo está oxigenado, no oxidado, tal complejo puede ser formado en solución o en la superficie, donde va a reaccionar con la hierro oxidasa y oxigenasa. El electrón captado de esta reacción es transportado en la célula por el ión sulfato o por flavoproteínas (que aún no se determina cual es). Ya en el interior de la célula, el electrón es cedido a la ubiquinona, citocromo c, citocromo a y finalmente al oxígeno. Se presume que la producción de energía debida a este flujo electrónico, esta acoplada en el paso del citocromo c, por una fosforilación oxidativa, como se ha señalado en Nitrosomonas y Nitrobacter.

La producción de poder reductor, como mencioné anteriormente, es mediante el flujo inverso de electrones en la cadena respiratoria, y el esquema a seguir es como lo presenta Nitrosomonas, el cual esta respaldado por los hallazgos reportados en la referencia (124).

Thiobacillus ferrooxidans esta clasificado como un quimiolitótrofo facultativo, esto implica que bajo condiciones organoheterótrofas, puede derivar su energía y poder reductor haciendo uso de las vías EMP y Ciclo de Krebs. Esta clase de metabolismo es de gran importancia para la cadena respiratoria, ya que el NADH al ser sintetizado por estas vías puede entrar directamente a la cadena respiratoria, teniendo un mayor rendimiento energético, así como también se puede utilizar para la reducción de CO_2 (teóricamente).

Los siguientes miembros del grupo de las Bacterias del Azufre, tienen como características común, utilizar compuestos de azufre reducidos para la obtención de energía. Estos compuestos abarcan desde el sulfuro hasta el sulfito. El mecanismo de oxidación para estos substratos se muestra en la figura 24 (124).

Debido a que estas bacterias no utilizan el mismo mecanismo de oxidación, se pueden distinguir tres grupos.



(1) No enzimática pero requiere GSH, (2) Sulfato oxidasa, (3) Tiosulfato reductasa, (4) Tetrasulfonasa, requiere GSH, (5) Sulfurodioxigenasa, (6) Adenil sulfato reductasa, (7) Adenil sulfatasa, (8) Sulfito oxidasa.

Figura No. 24 Mecanismo de oxidación para los compuestos de azufre, que son utilizados por los tiobacilos.

- a) Los que oxidan tiosulfato a sulfato, como Thiobacillus concretivorus, Thiobacillus thiooxidans, Thiobacillus neapolitanus, donde este último es el único capaz de oxidar también el tetratiónato. Las reacciones que se llevan a cabo son:



- b) Los que oxidan tiosulfato a sulfato, producen azufre elemental, el cual a su vez es oxidado a sulfato, como:

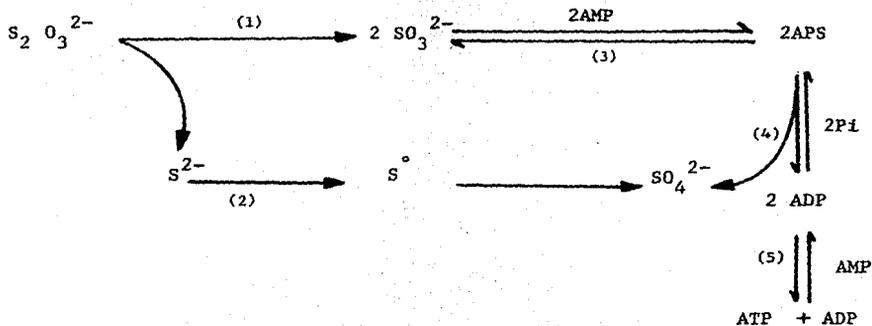


- c) Los que oxidan tiosulfato directamente a sulfato, no se ha podido detectar algún intermediario, esto lo realiza T. novellus.



De lo anterior, se desprende que el tiosulfato ocupa un papel importante en el metabolismo de este grupo de bacterias. El azufre elemental que se produce en las reacciones anteriores no se almacena sino que es oxidado y secretado al medio. Por otro lado de la figura 24 apreciamos que existen básicamente dos vías para oxidar el tiosulfato las cuales trataré a continuación.

- 1.- Vía por la cual el tiosulfato es reducido a sulfuro y oxidado a sulfito, este último a su vez es oxidado a sulfato. En Thiobacillus neapolitanus se ha observado, que el sulfito es oxidado a sulfato por una sulfito-oxidasa, la cual exhibe una interacción alostérica con el AMP. Figura No. 25
- 2.- Vía para la oxidación de tiosulfato produciendo tetratiónato. el cual no puede funcionar como sustrato para la formación de ATP, solo tiene esta función cuando el glutatión esta presente, esto implica una reducción no enzimática al tiosulfato. Figura No. 26



(1) Tiosulfato reductasa, (2) Sulfuro oxidasa, (3) Adenil sulfato reductasa, (4) ADP: Sulfato adenil transferasa, (5) ATP: AMP fosfotransferasa o adenilato cinasa.

Figura No. 25. Mecanismo por el cual el tiosulfato es reducido a sulfuro y oxidado a sulfato, llegando a la formación de sulfato (124).

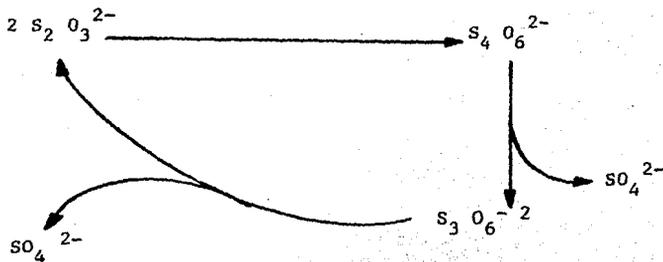


Figura 26. Mecanismo para la oxidación de tiosulfato a tetrationato (124).

De la oxidación de compuestos de azufre se obtiene energía y de manera indirecta se produce el NADH_2 y el NADPH_2 . El mecanismo observado en los tiobacilos para la producción de energía y NADH_2 se puede ejemplificar como muestra la figura No. 27

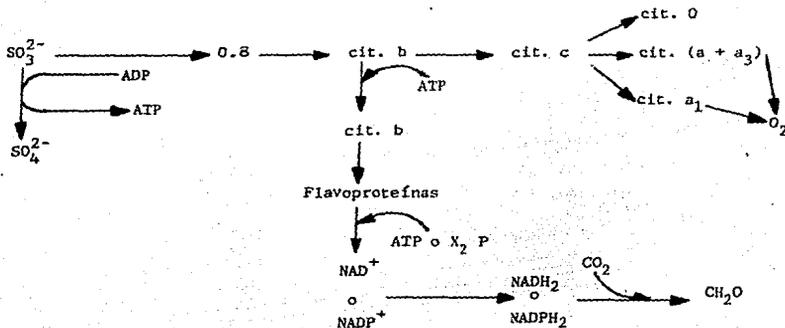


Figura No. 27 Esquema para el flujo electrónico y producción de NADH_2 en los tiobacilos. (124)

Un caso especial es presentado por Thiobacillus denitrificans, porque como mencioné anteriormente, es capaz de usar nitrato como aceptor final de electrones en lugar de oxígeno, esto se muestra en la figura No. 28

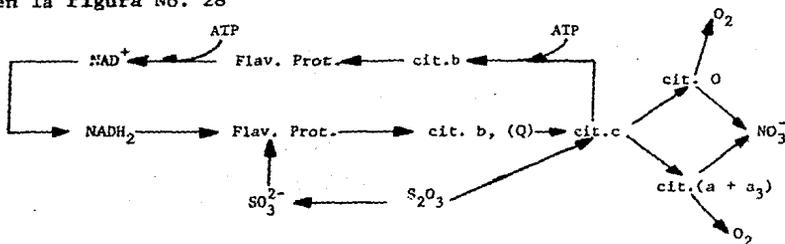


Figura No. 28 Flujo electrónico para Thiobacillus denitrificans. (124).

B.2.c) Bacterias del Nitrógeno. Este grupo de bacterias, como mencioné en el capítulo II, al revisar sus características generales, tiene dos categorías según el paso de la nitrificación que realizan, esto es, hay bacterias nitrosificantes y bacterias nitrificantes.

B.2.c.1) Bacterias nitrosificantes. Las bacterias incluidas en esta categoría oxidan amonio a nitrito y son aerobias facultativas, la reacción que llevan a cabo se representan a continuación:



Esta reacción incluye una transferencia neta de seis electrones, causando una oxidación al nitrógeno de -3 a +3. El mecanismo propuesto por Aleem para tal oxidación (124), se muestra en la figura 29.

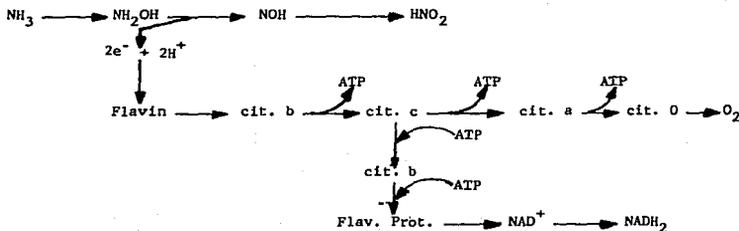


Figura No. 29 Mecanismo para la oxidación del amonio a nitrito, propuesto por Aleem(124)

La oxidación del amonio como se propone, consiste en: 1.- La formación de la hidroxilamina, interviniendo aquí el citocromo P460, que se encuentra en la fracción soluble de los extractos. 2.- La hidroxilamina es oxidada por la enzima hidroxilamina reductasa, produciendo un intermediario llamado nitroxil (NOH), que aún no ha si-

do identificado como resultado de esta reacción, tenemos la producción de dos electrones, que van a entrar posteriormente a la cadena respiratoria como lo muestra la Fig. 27. Debido a que estas bacterias no producen el NADH_2 , directamente por su alto potencial redox, es necesario llevar a cabo la reversa del transporte de electrones. Esto consiste en el consumo de ATP para efectuar el flujo electrónico contrario al decremento del potencial redox de los transportadores con el objeto de reducir el NAD^+ para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula.

B.2.c.2) Bacterias nitrificantes. Todas las especies incluidas aquí oxidan el nítrito a nitrato. Entre los microorganismos más usados para los estudios está Nitrobacter agilis, el cual se ha caracterizado como mixotrofo y aerobio facultativo. El mecanismo de oxidación para el nítrito es propuesto también por Aleem (124) como se muestra en la Fig. 28. En el se contempla la desventaja de que el par $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, tenga un potencial más positivo que el citocromo c y el NADH_2 .

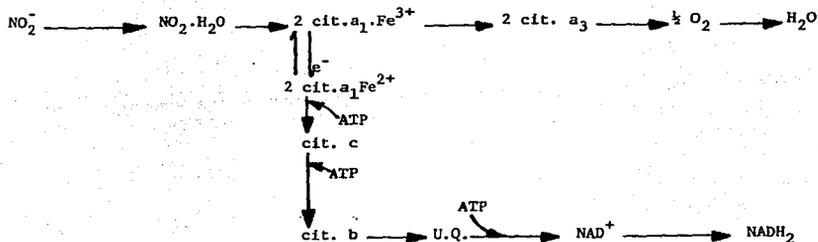


Figura No. 30 Esquema propuesto por Aleem para la oxidación del nítrito a nitrato (124).

Este mecanismo consta de: 1.- Una hidratación del ión nitrito, lo que baja el potencial y hace más factible su oxidación por el citocromo a_1 . 2.- El oxígeno se obtiene del agua (y no del oxígeno molecular como se pensaba anteriormente), liberandose dos protones por la hidrólisis de esta molécula. A nivel de este paso se presenta la reversa del flujo electrónico hacia el citocromo c, para producir el NADH necesario para la reducción de CO_2 . Aleem en 1968, demostró que la generación de ATP es independiente de la participación de las flavoproteínas o piridín dinucleótidos. Esto es, las bacterias quimioolitótrofas pueden generar ATP en tres sitios de la cadena respiratoria, partiendo del punto en que el substrato inorgánico dona los electrones, pero también puede generar ATP por la oxidación de $NADH_2$. Por otro lado, O'Kelly en 1970 reportó (57) la reducción del citocromo c por la enzima nitrito-citocromo reductasa, que correspondería al paso número cuatro de esta reacción general. La última reacción mencionada es independiente del consumo de energía.

Se piensa que para esta reacción un importante control, esta ligado a la alta concentración de ATP y a la baja cantidad de nitrito. Esto es, se ha observado que bajo condiciones parecidas a las mencionadas hay una aparente estimulación a la reducción de citocromo c, utilizando ATP. Con lo que respecta a los tipos de citocromos que intervienen en la cadena respiratoria, existen los del tipo c y tres tipos de a (a587 nm., a-583 nm., a-605 nm.) que utilizan como aceptor de electrones al nitrato y oxígeno como se muestra en la Fig. 31.

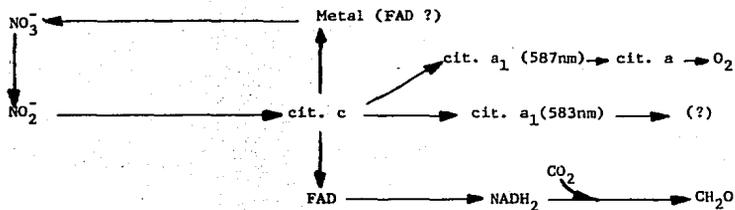


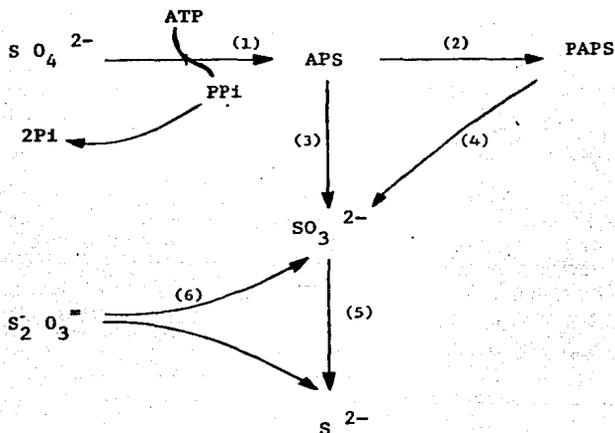
Figura No.31. Tipo de citocromos que intervienen en la oxidación del nitrito.

El aceptor de electrones proveniente del citocromo a-583 nm., no se ha podido determinar, así como tampoco su función. Bajo condiciones anaerobias o aerobias el nitrato sirve como aceptor de electrones, lo que hace necesaria la presencia de una nitrato reductasa no afectada por el oxígeno, esta última característica difiere del comportamiento que encontramos en las otras nitrato reductasas. Se ha encontrado que en Nitrobacter, parte de la enzima nitrato reductasa mencionada, posee también la nitrito e hidroxilamina reductasa en condiciones de anaerobiosis. La conversión de nitrato a amonio, no hace desnitrificantes a estos organismos, porque no se ha encontrado que liberen N_2 ; esto hace suponer una reducción asimilatoria. El mismo sistema parece existir en Nitrosomonas. Como estas enzimas son activas solamente bajo condiciones anaerobias, la relación que existe entre la sensibilidad al oxígeno y la presencia de las reductasas podría ser la regulación intracelular de los compuestos de nitrito.

C.1) Respiración Anaerobia o Anoxobiotica.

Este proceso es referido como aquel donde los microorganismos utilizan compuestos inorgánicos diferentes al oxígeno molecular, como aceptor final de electrones que provienen de la oxidación de los substratos utilizados. Este flujo de electrones se hace a través de la cadena respiratoria. Existen básicamente tres grupos de bacterias que utilizan este proceso, (tabla No. 11.) Cabe mencionar que no todas las bacterias con respiración anaerobia son de exigencia estricta, sino que encontramos un comportamiento facultativo.

- C.1) Bacterias sulfato reductoras. Este grupo utiliza el sulfato como aceptor final de electrones; en realidad es un grupo variado en cuanto a sus requerimientos nutricionales y condiciones de anaerobiosis, existen desde las de comportamiento facultativo hasta las de requerimientos estrictos de anaerobiosis como son el caso de Desulfovibrio y Desulfotomaculum. La reducción del sulfato se lleva a cabo básicamente en cuatro pasos como lo muestra la Fig. 32



(1) Sulfato adenil transferasa, (2) Adenil Sulfato cinasa, (3) Adenil Sulfato reductasa, (4) PAPS reductasa, (5) Sulfito reductasa, (6) Tiosulfato reductasa.

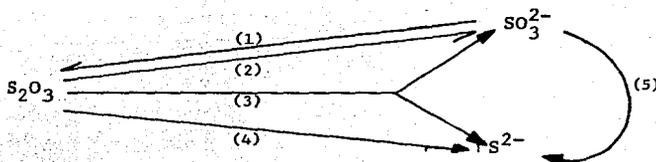
Figura No. 32 Reducción de sulfato mediante la acción de las bacterias sulfato reductoras (124)

Primer paso. Consiste en la activación del ión sulfato, mediante la liberación de pirofosfato que provoca el consumo de ATP. La energía liberada es utilizada para unir al sulfato a un compuesto orgánico (Adenosín-5'-fosfato), con lo que se forma el Adenosín-5'-fosfosulfato (APS), la enzima involucrada en esta reacción es la sulfato-adeniltransferasa.

Segundo paso. Se lleva a cabo la oxidación del hidrógeno molecular (en el caso de Desulfovibrio y Desulfotomaculum) o del sustrato empleado para este fin, mediante la reducción del citocromo c_3 , que tiene bajo potencial de oxidación. La enzima involucrada es la adenil-sulfato reductasa.

Tercer paso. Es la reducción de sulfito a sulfuro, lo cual ocurre también en presencia del citocromo c_3 oxidado.

Cuarto paso. La reducción del tiosulfato se puede realizar de dos maneras, como lo muestra la figura 33. Por ejemplo: Desulfovibrio desulfuricans, Desulfovibrio vulgaris, Desulfotomaculum nigrificans, producen la enzima tiosulfato reductasa que, en conjunto con el citocromo c_3 , llevan a cabo dicha reducción, teniendo como resultado la producción de sulfuro y sulfito; este último, a su vez, puede ser reducido como mencionamos anteriormente o ser reciclado a la formación de tiosulfato por un sistema enzímico que consta de citocromo c_3 , ferredoxina o flavodoxina e hidrogenasas. Esta última característica hace que el tiosulfato sea un intermediario en la reducción del sulfito y también sea un mecanismo de control para el nivel intracelular del mismo.



(1) Formación tiosulfato, (2) Tiosulfato sulfotransferasa, (3) tiosulfato reductasa, (4) Sistema tiosulfato reductor, (5) Sulfito reductasa.

Figura No. 33 Mecanismos por los cuales se puede reducir el tiosulfato, (124).

Practicamente todas las especies de Desulfovibrio y Desulfotomaculum son anaerobios estrictos, utilizan en buena proporción al hidrógeno como donador de electrones. Si el sustrato donador de electrones fuera un compuesto orgánico exclusivamente para la reducción del sulfato sería, figura 34 :

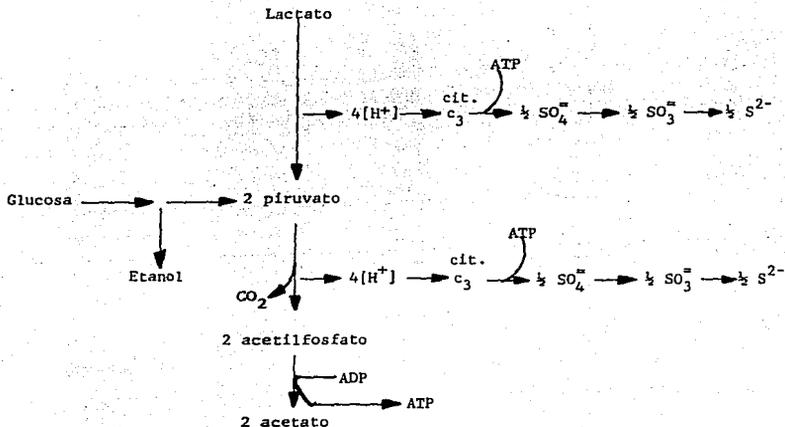


Figura No. 34 Mecanismo de reducción para el sulfato cuando se utilizan como sustratos orgánicos (124).

C.2) Bacterias nitrato reductoras. Bajo esta clasificación se encuentran incluidas las bacterias que utilizan al nitrato como aceptor final de electrones. En este caso el donador de electrones es un compuesto orgánico y en muy raras ocasiones el hidrógeno, para algunas cepas de Hydrogenomonas, pero sólo son estudios "in vitro".

C.3.) Bacterias Metanogénicas.

El CO_2 es usado también por las bacterias como aceptor final de electrones produciendo metano. Al igual que los grupos anteriores, no es un grupo muy estudiado y además se conocen muy pocas especies. Todos los miembros dependen de los compuestos orgánicos para fuente de carbono y energía. Las bacterias metanogénicas tienen un metabolismo muy especializado para la obtención de energía y carbono, su cadena respiratoria no se conoce, lo único que se sabe es que:

Con algunos sustratos como el etanol, butirato e hidrógeno forman metano por la reducción del CO_2 , (si el CO_2 proviene de la atmósfera).

Se obtiene metano por la reducción del CO_2 si este se forma durante la oxidación del propionato.

Se obtiene también el metano por la vía de metiltransferasa, usando metilcobalamina o $\text{N}^5\text{-N}^{10}$ -metilentetrahidrofolato como cofactor, pero sin CO_2 , por ejemplo con acetato y metanol.

APLICACIONES

A) Bacterias del Nitrógeno en la Agricultura

B) Bacterias del Azufre

B.1) En la Agricultura

B.2) En la Metalurgia

B.2.a) Extracción de Cobre

B.2.b) Extracción de Uranio

B.2.c) Extracción de Fierro

B.2.d) Extracción de Manganeseo

B.2.e) Extracción de Zinc

APLICACIONES.

La aplicación de las bacterias quimiolitótrofas se centra en las pertenecientes de los grupos de las Bacterias del Nitrógeno y Azufre. Los campos donde se tiene la principal aplicación son en la Agricultura y en la extracción metalúrgica.

A) Bacterias del Nitrógeno en la Agricultura.

La disponibilidad biológica del nitrógeno, fósforo y potasio es de considerable importancia económica, porque son los principales nutrientes vegetales que derivan del suelo. De los tres elementos, el nitrógeno es el más susceptible a las transformaciones microbianas. Este elemento es la unidad estructural de moléculas tan importantes como las proteínas. El suministro crítico de nitrógeno durante la producción de cultivos, provoca una producción deficiente en cuanto a calidad y cantidad de las cosechas así como -- también en la fertilidad de los suelos. Es importante hacer notar que el nitrógeno es uno de los pocos nutrientes del suelo que se pierde por volatilización así como también por lixiviación, por lo que requiere un control constante.

Las transformaciones que sufre el nitrógeno involucran compuestos orgánicos e inorgánicos, estos cambios ocurren simultáneamente pero a menudo los pasos individuales efectúan objetivos contrarios. Las reacciones pueden verse en términos de un ciclo, en el cual el elemento es manejado a discreción por la microflora. Dicho ciclo lo podemos resumir en los siguientes pasos: Una pequeña parte del nitrógeno gaseoso proveniente de la atmósfera es convertido a compuestos orgánicos por algunos microorganismos de vida libre o bien por asociación planta-microorganismo (simbiosis).

El nitrógeno presente en las plantas en forma de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos es usado por los animales. En el cuerpo animal el nitrógeno es convertido en otros compuestos simples y complejos. Cuando los animales y plantas son sujetos a la degradación microbiana, el nitrógeno orgánico se libera en forma de amonio, que a su vez es utilizado por las plantas o es oxidado por la microflora

a nitrito y subsecuentemente a nitrato. El nitrito puede perderse por lixiviación o servir como nutriente vegetal o ser reducido alternativamente a amonio o N_2 que es liberado a la atmósfera completando así el ciclo como lo muestra la Figura 35.

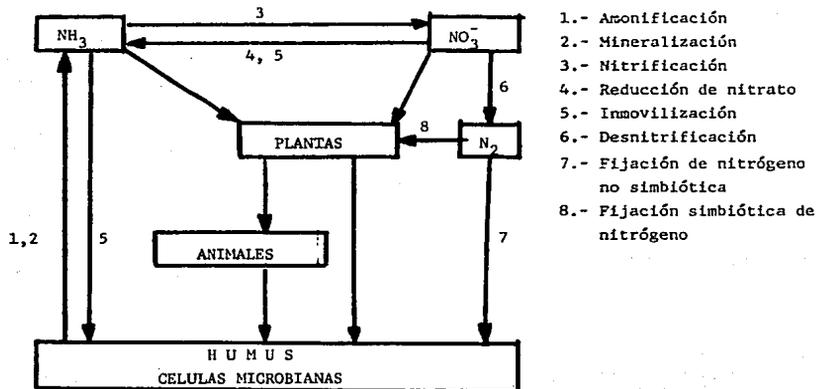


Figura No.35. Ciclo del Nitrógeno en la Naturaleza.

Las bacterias quimiolitótrofas participan en el proceso de nitrificación. La importancia de los microorganismos nitrificantes se basa en gran parte en su capacidad para producir el nitrato, que es la principal fuente de nitrógeno asimilable para las plantas superiores. Este mecanismo no solo funciona en el suelo, sino que también en ambientes marinos y durante el procesamineto de aguas negras donde el nitrato es el producto final en la restitución del nitrógeno orgánico.

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, se distinguen dos pasos separados durante el proceso de nitrificación que son: 1.- La nitrosación y 2.- La nitrificación propiamente dicha. La primera -- reacción ocurre durante la transformación del amonio a nitrito y la segunda durante la transformación de nitrito a nitrato. En el suelo

se han aislado cinco géneros de bacterias relacionadas con este proceso que son:

A.- Oxidan amonio a nitrito:

- 1.- Nitrosomonas, 2.- Nitrosococcus, 3.- Nitrospira, 4.- Nitrosolobus.

B.- Oxida nitrito a nitrato:

- 5.- Nitrobacter.

De los cinco géneros solo Nitrosomonas y Nitrobacter se encuentran con mayor frecuencia y sin duda son los principales microorganismos nitrificantes. Las especies más comunes son Nitrobacter -- winoogradsky y Nitrosomonas europeas, en los suelos forestales se han encontrado algunas especies del género Nitrospira (14,73).

Los géneros Nitrosococcus y Nitrosolobus son poco frecuentes. Muchos microbiólogos han estudiado la frecuencia con que se presentan los microorganismos oxidadores de nitrógeno y han encontrado que -- varía de cero a un millón de microorganismos por gramo de suelo. La mayor cantidad se encuentra en suelos con pH superiores a 6.0 unidades aunque en habitats con pH marcadamente alcalinos o neutros -- tienen poblaciones muy pequeñas. En la mayoría de los casos existe una relación directa entre las poblaciones de los géneros Nitrobacter y Nitrosomonas, esto es evidente porque de no ser así el nitrito producido podría llegar a niveles fitotóxicos. Las poblaciones de ambos géneros pueden aumentarse usando sales de amonio. En climas templados los microorganismos nitrificantes son numerosos durante la primavera y bastante escasos durante el verano seco y caliente así como también durante el invierno; las sequías o nevadas disminuyen la población nitrificante pero nunca se elimina totalmente a estas bacterias.

A.1) Influencia de los Factores Ambientales (29). Los factores físicos y químicos afectan la tasa de oxidación del amonio y por ende del nitrito. Este hecho se demuestra fácilmente por la variación en la velocidad de nitrificación en suelos estériles que han sido inoculados. Entre los factores ambientales que más influyen en el proceso de nitrificación están:

El oxígeno es un requerimiento obligatorio para todas las especies relacionadas, siendo por lo tanto necesario una aireación adecuada. Cuando el suministro de oxígeno es inadecuado para los microorganismos, disminuye considerablemente la oxidación del amonio, cesando la reacción total en ausencia de oxígeno. Debido a este comportamiento la estructura del suelo también afecta la acumulación de nitrato -- por ejemplo en suelos muy compactos la aireación disminuye. Por otro lado la nitrificación se lleva a cabo también en suelos inundados, -- como lo son los usados para el cultivo del arroz, aquí el oxígeno de la atmósfera se difunde en la fase acuosa manteniendo oxigenada los milímetros superiores del suelo, por abajo de esta zona no se lleva a cabo la nitrificación.

A.1.b) Humedad.

La humedad afecta el régimen de aireación del suelo. Por un lado el anegamiento limita la difusión de oxígeno y suprime la nitrificación; por otro lado en condiciones áridas, la proliferación bacteriana no se retarda por el suministro gaseoso sino por la insuficiencia de agua. por lo tanto la irrigación aumenta tanto la población nitrificante así como la biosíntesis del nitrato. El nivel óptimo -- de humedad varía considerablemente en los diferentes suelos, pero el nitrato aparece generalmente más rápido a 1/2 o 2/3 de la capacidad de retención de humedad en el suelo empleado.

A.1.c) pH.

La acidez es la principal influencia ecológica, porque algunas investigaciones(73), han demostrado que existe correlación entre la producción de nitrato y el pH. En ambientes ácidos la nitrificación se lleva a cabo lentamente, aun en presencia de un suministro adecuado de substratos, porque las especies responsables están ausentes cuando la acidez es alta. Típicamente la tasa de oxidación del amonio desciende por debajo de un pH igual a 5.0 unidades y empieza a ser significativo arriba de 6 unidades, ocasionalmente el nitrato puede presentarse en campos con pH=4.0 y algunas veces mayor. La diferencia microbiológica para actuar en diferentes condiciones de pH se atribuye a la adaptabilidad de las cepas responsables o bien a diferencias químicas de los habitats. La acidez no afecta solamente

a la transformación del sustrato, sino que también a la población microbiana; los suelos neutros o alcalinos tienen las mayores poblaciones con un comportamiento típico para esta clase de microorganismos. Los valores de pH óptimos para las cepas dependen en parte de la localidad de donde proceden.

A.1.d) Temperatura

La nitrificación se afecta también por la temperatura y las investigaciones han comprobado el hecho de que por debajo de 5°C y por encima de 40 °C, la cantidad de oxidación es muy baja. Existe la evidencia de una lenta formación de nitrato casi por debajo de la temperatura de congelación, hecho de importancia para las pérdidas de nitrógeno en tierras con climas muy fríos donde la lixiviación o -- desnitrificación puede ocurrir durante el otoño o invierno; esta pérdida puede originar la falta de respuesta en los fertilizantes aplicados generalmente durante el otoño, esto se evita a menos que el elemento sea retenido de alguna manera en el suelo. El incremento de la temperatura a partir de los extremos más bajos produce una oxidación rápida hasta alcanzar el intervalo óptimo de temperatura. Este rango varía debido quizá a las diferencias fisiológicas de cada cepa bacteriana dominante, pero el óptimo oscila generalmente entre 30-35 °C.

La nitrificación puede tener efectos indeseables cuando no se controla el proceso, esto ocurre aunque las plantas asimilan fácilmente el nitrato. Este ión es también susceptible a la lixiviación como el amonio, por lo que el nutriente puede pasar a través del suelo y quedar fuera de la zona radicular. Esto origina una pérdida muy importante para el cultivo y además puede ser responsable de la contaminación de aguas superficiales cercanas, siendo altamente peligroso para el consumo humano o animal, también puede causar el crecimiento de plantas acuáticas. El nitrógeno en forma de nitrato es susceptible a la reducción y por lo tanto a la formación de productos gaseosos no disponibles para las plantas. Por estas razones, se debe indicar que necesita gran atención las investigaciones para encontrar -- agentes químicos que puedan ser mezclados o aplicados junto con los fertilizantes de amonio o urea para producir un descenso en la velocidad de nitrificación. El compuesto a escoger no debe ser fitotóxico ni contaminante al medio ambiente.

Muchas sustancias químicas han sido patentadas para este propósito y entre ellas tenemos: Azidas, piridina, pirimidias cloradas, tiourea, cianoguanidina, dicianodiamida, nitrobenceno, etc.

Al suprimir la nitrificación, disminuye la cantidad de nitrógeno inorgánico perdido por lixiviación y desnitrificación; así se dispone de más nitrógeno a partir del fertilizante, aumentando la asimilación vegetal y consecuentemente la producción del cultivo se aumenta aplicando proporciones menores de fertilizantes.

B) Bacterias del Azufre.

Las bacterias del azufre tienen dos campos de aplicación muy importantes que son: La Agricultura y la extracción metalúrgica. Las condiciones e importancia de este tipo de bacterias es objeto de estudio ya que en la mayoría de los casos en que se usan no tienen bases científicas sino más bien es empírica. El conocimiento más profundo sobre el tema brindaría al hombre un criterio más firme para obtener los mayores beneficios de estas bacterias.

B.1) Bacterias del Azufre en la Agricultura. El azufre es un nutriente esencial para los integrantes del reino animal y vegetal. Empero, a pesar de su abundancia en la corteza terrestre, el azufre se encuentra en el suelo en cantidades subóptimas o en forma no aprovechables, de manera que no es raro observar respuestas a los fertilizantes que contienen azufre. La principal reserva de este elemento en el suelo está en la fracción orgánica y sólo puede existir el acceso a esta fuente mediante la descomposición microbiológica. Existe un parecido con la descomposición y transformaciones que presenta el nitrógeno.

El azufre, en sus variadas formas orgánicas e inorgánicas, se metaboliza fácilmente en el suelo. El hecho de que predomine una u otra forma de transformación, depende en gran parte de las circunstancias del medio ambiente que afectan la composición y abundancia de la microflora. Las reacciones implicadas en las transformaciones de este elemento se pueden representar en un ciclo, como lo muestra la Figura 36.

Los sulfuros, azufre elemental y tiosulfatos pueden ser oxidados en el suelo por métodos biológicos y no biológicos. La oxidación no biológica es lenta y requiere de un medio ambiente muy ácido. El ácido sulfuroso y las sales de sulfito son agentes reductores que reaccionan más fa-

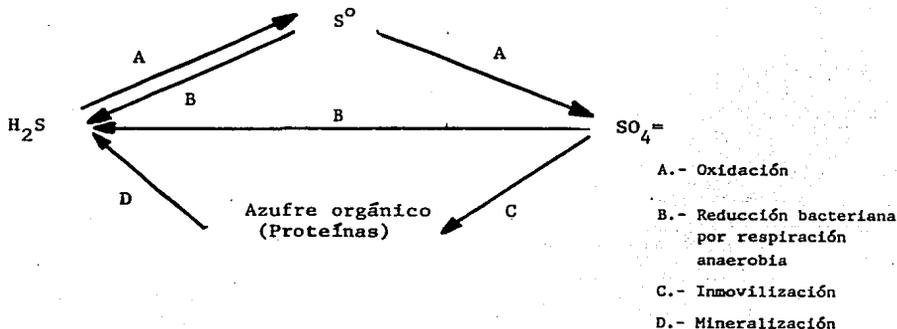


Figura No. 36. Ciclo del Azufre en la Naturaleza.

cilmente que los sulfuros. Las condiciones favorables para la oxidación - no biológica de compuestos de azufre, se presentan raras veces en el suelo de forma natural, en cambio las que favorecen la oxidación microbológica son más frecuentes.

El número de microorganismos que metabolizan el azufre, varía considerablemente de un suelo a otro, así como con la adición de fertilizantes azufrados (azufre elemental, polisulfuros, tiosulfatos).

La actividad de la microflora está influenciada por factores ambientales del suelo, tales como el contenido de humedad, temperatura, pH, -- textura y cantidad de nutrientes disponibles. Básicamente las condiciones son las mismas que para las bacterias del Nitrógeno, excepto para el valor de pH óptimo, porque en este caso se tiende a valores ácidos.

El ciclo del azufre es uno de los más importantes en el aspecto -- biológico, para la agricultura por la aportación de nutrientes y su efecto en el suelo. Los procesos de inmovilización y mineralización se -- llevan a cabo mediante la utilización de este elemento en la forma que sea propia para el microorganismo. Los compuestos de azufre provienen principalmente de desechos orgánicos, que mediante la acción microbológica liberan el azufre en su forma mineral. Consecuentemente el tipo de residuos vegetales y animales tiene una marcada influencia en la re-

lación de azufre disponible, ya que el contenido de dicho elemento varía, además el contenido de fósforo, carbono y nitrógeno en el suelo afecta la disponibilidad del azufre.

Es importante mencionar que el proceso de inmovilización puede llevarse a cabo también por métodos químicos, utilizando coloides orgánicos que absorben a los compuestos azufrados o bien usando la precipitación de sulfatos con iones calcio y bario.

Durante el proceso de inmovilización, el sulfuro de hidrógeno formado en el suelo es convertido a azufre elemental principalmente por las bacterias, aquí la oxidación no biológica es mínima. Entre los microorganismos que toman parte en este proceso están los tiobacilos tales como; Thiobacillus thioparus, Thiobacillus denitrificans (oxidan el sulfuro a azufre elemental) y Thiobacillus thiooxidans (oxida azufre elemental a ácido sulfúrico). Estas bacterias aparte de bajar el pH de los suelos, ayudan a renovar los compuestos inorgánicos del suelo, ya que los sulfatos y azufre elemental formado son tomados favorablemente por las plantas para incorporarlos a su metabolismo.

Brock y Fliermans (13), aislaron miembros de un nuevo género de bacterias acidófilas oxidantes de azufre llamadas Sulfolobus, del cual se conoce la especie Sulfolobus acidocaldarius. Las condiciones ambientales que influyen en la distribución de los tiobacilos y Sulfolobus, según estos autores, son la temperatura y pH de los suelos. Con lo que respecta a la temperatura se observó que el género Thiobacillus se encuentra a temperaturas de 30-35 °C mientras que Sulfolobus esta entre 50-85 °C, registrandose las poblaciones más abundantes del primer género a 25 °C y del segundo a 70 °C. Solamente a 55 °C estan presentes ambos géneros, aunque ninguno es activo. En relación a pH, Thiobacillus se encontró en un rango de 0.9-4.5 unidades, manifestando mayor actividad a 2.5 unidades. El pH al cual Sulfolobus crece y oxida azufre elemental es de 2.5-3.0 unidades alcanzando valores de 5.9 unidades.

En suelos alcalinos a los cuales se les ha aplicado tratamientos químicos para su restauración e incorporación a la agricultura, se han hecho estudios sobre la determinación y tipo de bacterias que estan presentes (37). Los tratamientos han sido a base de yeso, ácido sulfúrico diluido, sulfato ferroso, y azufre elemental. El aislamiento de bacterias del ciclo del Azufre fue muy reducido y predominaron dos especies del

género *Thiobacillus* las que corresponden a T. thiooxidans y T. novellus.

El clima es otro de los factores ambientales que influyen en la oxidación del azufre en el suelo. Se realizaron estudios (110) utilizando 360 muestras provenientes de Australia, los resultados muestran que tal oxidación se llevó a cabo en un 50% de los suelos subtemplados, disminuyendo conforme el clima fue cambiando a árido y caliente, así en la estación húmeda se produce la mayor incidencia y por lo tanto altos niveles de oxidación mientras que en meses de sequía es mínima. T. thiooxidans se encontró en un 13% en suelos templados, la resistencia de este microorganismo fue relacionada con la humedad, mostrando que en la estación de sequía, disminuía considerablemente.

Es importante aclarar que las especies de tiobacilos no son las únicas, pero si las principales, que oxidan el azufre ya que esta actividad se encuentra en microorganismos quimioganheterótrofos, por ejemplo Bacillus licheniformis y especies de los géneros mencionados en la Tabla No.9

El azufre en forma de sulfato se pierde muy poco por acción de la respiración anaerobia y lixiviación, debido a que forma compuestos poco solubles.

La utilización de Thiobacillus en suelos alcalinos, ha sido con el propósito de recuperar grandes áreas de suelos áridos y semiáridos para la agricultura. La adición de azufre y adaptación de drenajes apropiados han sido los mejores métodos para esta recuperación. Sin embargo el tiempo requerido para la transformación es muy largo debido a que los suelos alcalinos tienen una población autóctona muy baja y por consiguiente la población oxidadora de azufre es mucho más escasa.

Los estudios enfocados a determinar el número de bacterias oxidadoras de azufre en tales suelos, ha tenido por objeto aislar cepas favorables y usarlas en el enriquecimiento de los suelos deficientes de bacterias después de haber aplicado azufre como fertilizante. Las especies aisladas para este fin deben cumplir con las siguientes características:

- _ Capacidad para multiplicarse en suelos alcalinos
- _ Temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 °C, que es la temperatura en las regiones áridas
- _ Tolerar grandes concentraciones de iones sodio

La cepa que ha cumplido más frecuentemente con estas características es Thiobacillus novellus, pero no se excluye a las demás especies del género.

Se ha observado que la aplicación de microorganismos del género Thiobacillus ayuda a restaurar los suelos alcalinos, pero un aspecto, quizá el decisivo para llevar a cabo cualquier método nuevo, es el económico y hasta la fecha no hay ningún reporte que exponga las ventajas y desventajas del método así como su costo.

B.2) Bacterias del Azufre en la Extracción Metalúrgica. El proceso más empleado para la recuperación de metales es el hidrometalúrgico, que consiste en la disolución de los metales contenidos en los minerales y la recuperación de estos consecuentemente. Los procesos hidrometalúrgicos en los cuales se incluye la lixiviación bacteriana están tomando un papel muy importante en la extracción metalúrgica, ya que son aplicables en minas donde la cantidad tan baja del mineral hace incosteable la extracción por los métodos fisicoquímicos convencionales.

Un ejemplo de la importancia de estos procesos en la economía de los países que lo utilizan está en Estados Unidos, que en el año de 1978 la lixiviación de cobre en minas con baja concentración en el mineral, representó el 11.5% en la producción total de ese año (10,101). La lixiviación mineral no sólo es llevada a cabo por procesos microbiológicos, sino que puede ser mediante métodos fisicoquímicos.

Para tener una idea más clara sobre la utilidad que representan los procesos hidrometalúrgicos con lixiviación bacteriana, es conveniente revisar las características más importantes de los métodos más comúnmente empleados para este fin. Los principales métodos hidrometalúrgicos en donde no se favorece la acción microbiológica son: Lixiviación en vertedero, en cículos, tanques o cisternas y la lixiviación "in situ". La lixiviación en vertederos ha sido usada para extraer cobre de compuestos de óxido, minerales sulfúreos y materiales de desecho extraídos de los hoyos de las minas. Tales materiales contienen menos del 0.4% de cobre y tienen restos no pulverizados. Los vertederos están localizados usualmente en valles que proporcionan declives naturales, útiles para la estabilidad y recuperación de la solución lixivadora. Idealmente, estos lugares deben ser seleccionados cuando se comprueba que el suelo es impermeable, pero esto es imposible, por lo que se tienen que construir bases especiales para formar el vertedero.

El tipo de material que llega al vertedero incluye rocas grandes que pueden pesar toneladas, y rocas o piedras finas con medidas de hasta 70 cm. de diámetro. Algunos de los vertederos del Oeste de los Estados Unidos, fueron construidos con una elevación de 15 m. y una altura aproximada de 3,600 m. El mayor vertedero contiene 4 billones de toneladas de material para lixiviar y esta localizado en el Cañon de Brigham, Utah. La solución lixiviadora es introducida por un sistema de asperción o inundación, esta solución lixiviadora se absorbe y fluye a través de los vertederos que estan al final del declive, Figura 37. La solución que se recobra después de lixiviar se llama "licor", de ahí se obtiene el cobre mediante la precipitación de fierro metálico por electroforésis o con solventes. El "licor" o solución resultante que queda de la recuperación es retornado al vertedero (reciclación). Esta extracción tiene duración de años.

La lixiviación en cúmulos es usada principalmente para extraer cobre y uranio de óxidos metálicos en partículas de cualquier tamaño, con un contenido de cierta manera más alto que las destinadas a la lixiviación en vertederos. El material colocado en la superficie previamente preparada. El volumen de material que se puede trabajar en cúmulos puede variar de 100,000 a 500,000 toneladas. Los minerales de estos metales son generalmente solubles en ácido sulfúrico, aquí el proceso se realiza en días.

La lixiviación subterránea o "in situ", como proceso aplicable es muy limitado, porque solo se pueden utilizar como materiales para la extracción los óxidos y sulfuros de cobre y uranio, además los conocimientos actuales de la hidrología subterránea y fracturación de rocas cristalinas es muy deficiente, por lo que es difícil predecir y controlar la vía que sigue la solución lixiviadora y si a esto lo sumamos la dificultad de trabajar grandes volúmenes de ácido, tal proceso no representa gran beneficio. Además la pérdida de solución lixiviadora por este método tiene la capacidad potencial de contaminar aguas subterráneas cercanas y en algunos casos las superficiales también.

Los factores que no son controlados en estos procesos son la cantidad de oxígeno interno y la temperatura, porque estan sujetos principalmente a la temporada.

Los procesos hidrometalúrgicos que incluyen la lixiviación bacteriana

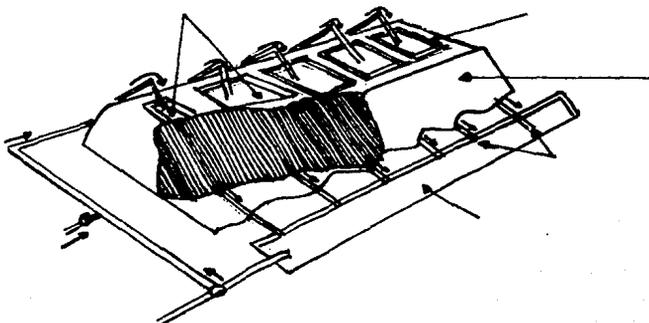


Figura 37. (a)

- A. Introducción del líquido
- B. Estanque para el líquido lixivador
- C. Zanja para el líquido lixivador
- D. Vertedero para el mineral con bajo contenido en el metal
- E. Tubería colectora, que pasa por abajo del vertedero
- F. Estanque colector del líquido lixivador para la extracción
- G. Recuperación

Figura 37. (b)

- I. Introducción del líquido
- II. Estanque colector del líquido lixivador
- III. Vertedero para el mineral
- IV. Estanque del líquido lixivador
- V. Reciclaje del líquido lixivador
- VI. Recuperación

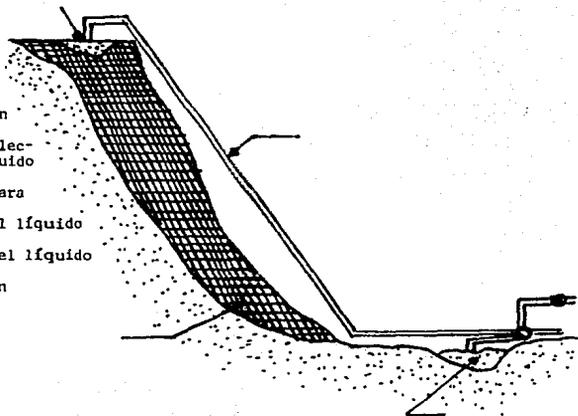


Figura No. 37. Esquema de los sistemas de lixiviación por vertederos (a) y en cúmulos (b). (101).

han sido objeto de estudio, ya que se pretende establecer los mecanismos de acción de dichas bacterias y sobre todo las condiciones más apropiadas y desfavorables para su acción.

Las bacterias involucradas en la extracción metalúrgica son principalmente Thiobacillus ferrooxidans y Thiobacillus thiooxidans, siendo más importante la primera especie. Es de considerar que los estudios realizados reportan la presencia de bacterias quimiorganoheterótrofas que también intervienen en la extracción, pero su contribución es mínima comparadas con las bacterias quimiolitótrofas.

La manera en que expondré esta información será revisando primero la extracción de minerales con importancia para el hombre y posteriormente haré la revisión de los factores que afectan y favorecen la lixiviación bacteriana.

B.2.a.) Extracción de cobre (4,10,11,62,97, 140).

La calcopirita es el mineral de cobre más extendido sobre la tierra lo que la hace ser la principal fuente de cobre en el mundo.

Los minerales de cobre que se pueden encontrar en minas se mencionan en la Tabla No.13

COMPOSICION QUIMICA	MINERAL	SECCION OXIDADA BIOQUIMICAMENTE	OXIDACION POR Fe ³⁺
Cu ₂ S	Calcocita	S ²⁻	+
CuFeS ₂	Calcopirita	S ²⁻ , Fe ²⁺	-
CuS	Covelita	S ²⁻	+
Cu ₃ (CO ₃)(OH) ₂	Azurita	—	+
Cu ₂ O	Cuprita	—	+
Cu ₃ AsS ₄	Enargita	As ²⁻ , S ²⁺	-
Cu ₄ (OH) ₆ SO ₄	Brochantita	—	-
Cu ₃ (OH) ₄ SO ₄	Antlerita	—	-
Cu ₂ Cl(OH) ₂	Atacamita	—	-
Cu ₂ CO ₃ (OH) ₂	Malanchita	—	+
Cu ₅ FeS ₄	Bornita	Fe ²⁺ , S ²⁻	+
Cu ₉ S ₅	Digenita	S ²⁻	+
CuSiO ₃ ·2 H ₂ O	Criosocola	—	-

Tabla No.13 Principales minerales de cobre, se hace referencia a la acción microbiológica que presentan.

La calcocita, covelita energita bornita y digenita contienen el ión sulfuro, por lo que estos minerales son lixiviados mediante la oxidación de dicho ión a ácido sulfúrico mediante métodos microbiológicos. Calcopirita y bornita también contienen el ión ferroso, el cual produce el ión férrico acelerando así la oxidación del mineral. El arsénico presente en la energita es atacado también por las bacterias, aunque no con la misma facilidad. Los otros minerales de cobre listados son más difíciles de lixiviar por las bacterias debido quizá a que son tóxicos a los sistemas biológicos. La criosocola es difícil de extraer, probablemente porque es un silicato más que por ser tóxico.

En la planta industrial extractora de cobre se realizó un estudio sobre la microflora presente (10), y se encontró que las especies Thiobacillus ferrooxidans, Thiobacillus thiooxidans, Thiobacillus thioparus y Thiobacillus denitrificans así como bacterias coloridas del azufre, Gallionella y Leptothrix estaban presentes a parte de una pequeña cantidad de bacterias quimioheterótrofas como Desulfovibrio, Bacillus, Enterobacter, Pseudomonas y hongos y levaduras. Los microorganismos quimioheterótrofos se encontraron en lugares alejados a las zonas de los vertederos, su importancia radica en la acción competitiva que realizan con los tiobacilos por el consumo de oxígeno y algunos nutrientes necesarios para el metabolismo. En algunos casos, como los protozoarios la acción es más directa, por ejemplo Amoeba usa a los tiobacilos como nutrientes y Caulobacter produce compuestos orgánicos inhibidores para estas bacterias.

La actividad de los tiobacilos se puede ejemplificar con los siguientes datos: Con Thiobacillus ferrooxidans se recupera el cobre del mineral calcopirita en un 85% en 24 días, de la covelita el 50% en 76 días, de la calcocita el 90% en 30 días y de la bornita el 100% en 30 días. Thiobacillus thiooxidans no actúa directamente en los minerales, sólo que ayuda a estabilizar el pH en un valor ácido, porque este oxida el azufre elemental a ácido sulfúrico. La adición de sulfato ferroso no es necesaria para la extracción pero si favorece el control de pH y poder reductor en los minerales con bajo contenido de Fe^{2+} .

De estos mismos estudios se observa que la población quimioheterótrofa y quimiheterótrofa tiende a disminuir conforme avanza la extracción del mineral, esto se interpreta como una falta de resistencia a condiciones severas.

B.2.a.1) Condiciones de lixiviación para los principales minerales de cobre.

La interacción de las bacterias quimiolitótrofas con los compuestos minerales, han desarrollado gran interés desde los años cincuentas, sin embargo hasta la fecha de esta revisión bibliográfica, ninguna reacción ha sido estudiada lo suficiente como para poder describir el mecanismo de acción bioquímico, esto se debe a que las reacciones además de ser complicadas interaccionan con reacciones puramente químicas. Los mecanismos propiamente dichos, se han revisado en el capítulo dos, aquí solo mencionare las características y condiciones empleadas para llevar a cabo la lixiviación bacteriana de los diferentes minerales de cobre.

B.2.a.1.a) Oxidación de Calcocita y Covelita. (27,62,98). El medio utilizado para la lixiviación de estos minerales es reportado por Silverman y Lundren (106). Su composición química es:

Sulfato de amonio	3.0 g
Cloruro de potasio	0.1 g
Fosfato dibásico de potasio	0.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.5 g
Nitrato de calcio	0.1 g
Agua destilada	700 ml
Acido sulfúrico 10N	1.0 ml
Sulfato ferroso heptahidratado 14.74% (p/v)	300 ml

La cepa utilizada en la lixiviación se aisló de las aguas ácidas de minas localizadas en Yanahara, Japón. El mayor rendimiento de la extracción en diferentes ensayos fué de: 35% en 33 días llegando a obtener en algunos casos el 100% en 26 días. Las condiciones óptimas para la extracción se -- pueden resumir en; pH= 1.7 a 2.3 unidades, temperatura de 35°C \pm 1, concentración de iones férricos de 0.004-0.01 M.

En tanque de agitación se redujo el tiempo requerido para la extracción y se aumento el rendimiento en un 50-60% en 4-6 días.

En el artículo (97), se reporta un esquema para la extracción de cobre partiendo de calcopirita y covelita, como se muestra en la Figura 38 Este proceso tiene un alto rendimiento en cobre disuelto durante la primera etapa. Los residuos de la primera y segunda lixiviación son reci--

lo que implica una economía en el proceso. Después de la lixiviación se sigue con la recuperación mediante procesos de cementación, extracción con solventes y/o electroquímicos. La solución lixivadora resultante de este último paso es ajustado en su concentración de nutrientes, pH y residuos, pudiendo así ser reciclado. A pesar de que el esquema nos muestra un proceso total, algunos pasos no están todavía probados a nivel de planta piloto o industrial.

B.2.b) Extracción de uranio (10,22,31,62,132,145). En la corteza terrestre se estima que el uranio existe en una concentración aproximada de -- 0.004%. Los mayores depósitos están localizados en Shinkolobwe Doachinsthal Checoslovaquia. Los minerales de uranio están concentrados en pegmatitas, -- vetas hidrotermales (son los principales depósitos en cuanto a cantidad) y piedras arenosas. Todos los yacimientos varían en edad de 50 a 2,000 millones de años. El mineral más conocido de este metal es la uranita -- (UO_2) en segundo lugar está la pitchblenda que es de color café o negro, con alta densidad y es además una forma cristalina de la uranita.

La Tabla No. 14 contiene los principales minerales de uranio encontrados en la naturaleza, dándonos además la información de la relación que guardan dichos minerales con la acción bacteriana

Los minerales uranita, pitchblenda, branerita, davidita, cofinita están depositados generalmente en rocas fundidas o soluciones calientes que -- pasan dentro de la corteza terrestre. La carnotita es depositada en áreas aledañas a zonas de lixiviación por la acción de aguas ácidas o alcalinas.

En Estados Unidos el uranio se encuentra en la zona de Utah y Colorado. El uranio se considera un mineral de importancia secundaria para su extracción.

Al igual que en otros casos se encontró que la variedad de la microflora influye en la depositación de uranio por la producción de ácidos orgánicos u otras sustancias oxidadoras. En su extracción, el uranio tiene acoplada a la extracción microbiológica la lixiviación "in situ", sobre todo en las minas de Elliot, Ontario.

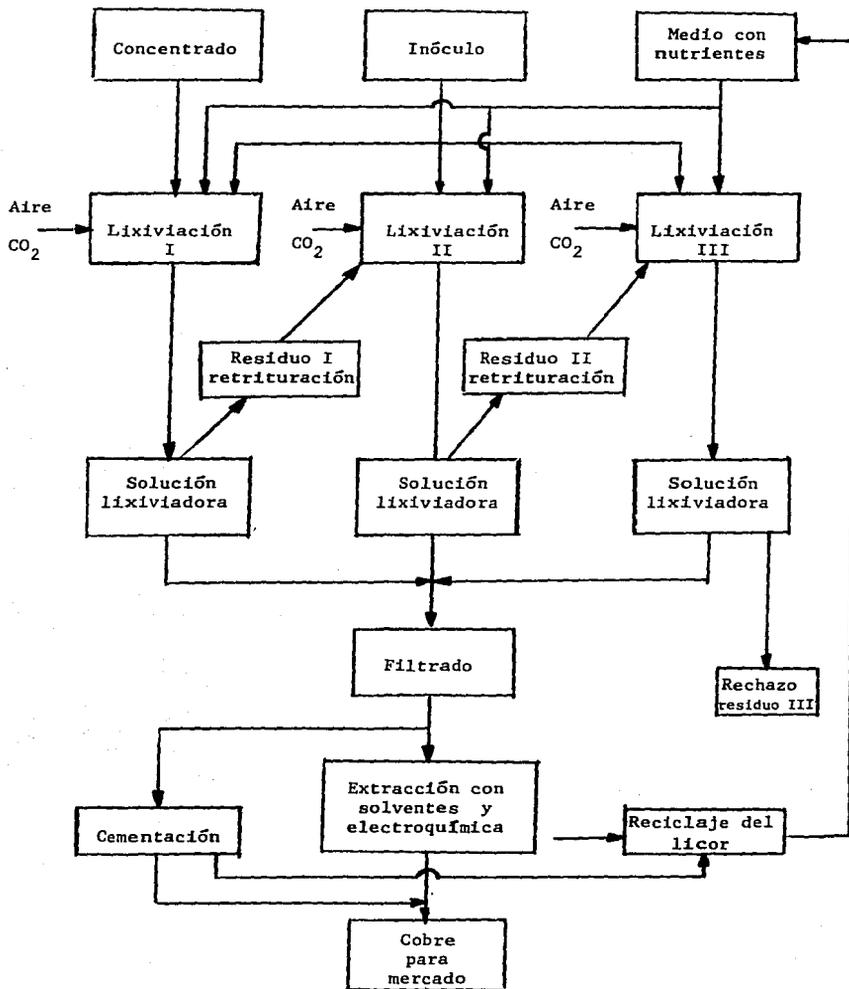


Figura No. 38 Flujo del proceso de extracción de cobre partiendo de calcopirita y cobalita propuesto por Hiromichi y Sakaguchi (97).

COMPOSICION QUIMICA	MINERAL	SENSIBILIDAD A LA ACCION MICROBIANA
UO ₂	Uranita	+
UO ₃ .n H ₂ O	Gumita	+
2 UO ₃ .n H ₂ O	Baquerelita	+
(U, Ca, Fe, Th, Y) ₃ Ti ₅ O ₁₆	Branerita	+
(Fe, Ce, U)(Ti, Fe, V, Cr) ₃ (O,OH) ₇	Davidita	+
U(SiO ₄) _{1-x} (OH) _{4x}	Cofnita	-
Ca.2UO ₃ .2SiO ₂ .6 H ₂ O	Uranofana	+,-
MgO.2UO ₃ .2SiO ₂ .6H ₂ O	Esclodoguesquita	+,-
CaO.2UO ₃ .P ₂ O ₅ .8H ₂ O	Autunita	+
CuO.2UO ₃ .P ₂ O ₅ .8H ₂ O	Torbernita	+
NH ₄ (UO ₂)(PO ₄). 3H ₂ O	Uranfita	+
CuO.2UO ₃ .AsO ₅ . 8H ₂ O	Zeunerita	+
K ₂ O.2UO ₃ .V ₂ O ₅ . 3H ₂ O	Carnotita	+,-
CaO. 2UO ₃ .V ₂ O ₅ . 8H ₂ O	Tiyumunita	+,-
2 UO ₃ .SO ₃ . n H ₂ O	Zippelita	+
6 UO ₃ .SO ₃ . n H ₂ O	Uranopilita	+
CuO. 2UO ₃ . 2SO ₃ . 7H ₂ O	Johannita	+
3CaO. Na ₂ O. UO ₃ .CO ₂ .SO ₃ F. 10 H ₂ O	Escroequingerita	+

Tabla No.14 Principales minerales de uranio y la relación que guardan con la acción microbiológica.(101).

Las especies encontradas como principales agentes casuales de la lixiviación microbiana son Thiobacillus ferrooxidans y Thiobacillus -- thiooxidans, el ácido formado por estas bacterias sirven para la oxidación del azufre presentes en la piritita, ya que es un mineral asociado en la mayoría de los casos a los de uranio y de muchos otros metales.

Los procesos microbiológicos para la extracción del uranio, estan influenciados por las condiciones ambientales tales como temperatura, pH, cantidad de nutrientes, tamaño físico de las partículas del material, pero la condición que más efecto tiene es el suministro de oxígeno. Las

condiciones óptimas para el cultivo continuo en la extracción de uranio son reportados por Noboru Tomizuka (135) y son pH= 2.3-2.7 unidades, temperatura de 29-34 °C, suministro de oxígeno de 5.0×10^{-7} / ml.min.atmo. El medio de cultivo empleado es:

Sulfato férrico	50.0 g
Fosfato de potasio monobásico	0.5 g
Sulfato de manganeso II heptahidratado	0.5 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Sulfato de amonio	3.0 g
Cloruro de calcio	0.11g
Agua destilada	1000 ml.

Se esteriliza a 100°C durante 60 min.

El proceso de inmovilización de los minerales de uranio es importante debido a que el uranio se extrae principalmente por lixiviación "in situ". La descripción del proceso es: El uranio que esta presente en la uranita es oxidado por los iones férrico a UO_2^{2+} , el cual es soluble en agua. Las bacterias ferrooxidantes mantienen un suministro continuo de iones férricos lo que aumenta la movilización del uranio. Existen otros oxidantes que ayudan a mantener al hierro en su estado más oxidado, como ejemplo tenemos a el peróxido de hidrógeno, dióxido de manganeso; este último es especialmente activo en metales alcalinos haciéndolos más solubles. El uranio hexavalente es redepositado cuando estan en condiciones altamente reductoras, tales condiciones son producidas por las bacterias sulfato reductoras. Los compuestos orgánicos o humus inmovilizan al uranio formando quelatos.

B.2.c.) Extracción de fierro(51,68,101,100, 145). El fierro tiene las propiedades físicas de ser maleable y fundir a 1535 °C, su abundancia ha contribuido al desarrollo de la era espacial. El contenido de fierro en la litósfera es aproximadamente 5%. Los meteoritos aportan cerca del 40% del total. El cobalto y níquel son constituyentes comunes en los depósitos de fierro. Las rocas magmáticas contienen los metales Mg, Fe, Mn en una relación de 8:1:0.002, lo que demuestra ser una fuente de fierro.

La extracción de fierro en el Lago Superior, Pensilvania (E.U), ha sido uno de los depósitos más bastos para este país. En el océano es muy bajo el contenido de este metal (aprox. 1 p.p.m.), se supone que la baja concentración esté asociada con la baja solubilidad de este metal a un pH=8 la cantidad de este metal aumenta conforme aumenta la profundidad. Los minerales de fierro en el océano se depositan en zonas concéntricas, esto puede ser consecuencia de las variaciones de corriente durante las estaciones (145).

Los principales minerales de fierro estan contenidos en la Tabla No.15. La microflora relacionada con la extracción de fierro se reporta como (101,145): T. ferrooxidans, T. thiooxidans, algunas especies del género Bacillus, Desulfovibrio, Pseudomonas, Clostridium, Siderocarpa (en habitats marinos), Spherotilus, Beggiatoa, Leuconostoc, Flavobacterium, Galionella y Crenotrix.

El principal mineral de fierro es la pirita que aparte de ser factor importante en otras extracciones metalúrgicas por el suministro de iones férricos, es de gran utilidad en la desulfuración de minas carboneras. El carbón es considerado como una fuente alternativa de energía cuando el petróleo sea escaso, debido a los problemas que enfrenta el mundo actualmente en su producción, precios y principalmente por ser un recurso natural no-renovable.

La producción de carbón se ha incrementado paulativamente, en un espacio de tiempo relativamente corto. Sin embargo uno de los principales problemas para la utilización del carbón es su alto contenido de azufre, que durante la combustión es desprendido en forma de SO_2 . Este gas es altamente tóxico para la vida animal y vegetal, por lo que es necesario utilizar procesos de desulfuración para el carbono.

Los métodos reportados (52,80) para eliminar los compuestos de azufre del carbón son: Desulfuración por precombustión, que opera a altas temperaturas y tiene un gasto de energía muy alto; Método de flotación, donde resulta una pérdida considerable del material por la completa eliminación de partículas de carbón con pirita; y por último los métodos microbiológicos de desulfuración (MCD), que requieren un bajo costo de operación y capital, son más eficientes que los anteriores y lo más importante, pueden eliminar los compuestos inorgánicos de azufre con la mínima pérdida de carbón (80).

El azufre contenido en el carbón varía de 0.5-60% en promedio y consiste de compuestos orgánicos e inorgánicos (principalmente pirita).

COMPOSICION QUIMICA	MINERAL
FeS_2	Pirita
FeCl	Lawrencita
FeAl_2O_4	Hercynita
$\text{Ca}_4\text{Al}_2 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_{10}$	Brownmillerita
FeTiO_3	Ilmenita
Fe_2TiO_3	Pseudobroquita
FeCO_3	Siderita
$\text{FeH}(\text{SO}_4) \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Romboclasa
$\text{Na}_3\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Ferrinatrilita
$\text{KFe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{SO}_4)_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Voltaita
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Esomolnoquita
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Melanterita
$\text{FeSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Siderotil
$(\text{H}_2\text{O})\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2\text{OH}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Carposiderita
$\text{Fe}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Butlerita
$\text{Fe}(\text{SO}_4)(\text{OH}) \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Amarantita
$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Limnita (hematita)

Tabla No. 15 . Minerales del hierro con importancia económica para el hombre (145).

Los compuestos orgánicos son muy variados, pero los grupos funcionales presentes son: tiol, sulfuro, disulfuro, tiofenos. La eliminación de los compuestos orgánicos azufrados es más difícil que los inorgánicos, tal proceso se está llevando a cabo en muy baja cantidad por bacterias que han presentado esta habilidad como Sulfolobus acidocaldarius, que es una de las bacterias con resultados más prometedores. Los compuestos inorgánicos de azufre son eliminados principalmente por la acción conjunta de T. ferrooxidans y T. thiooxidans. Es importante que estas bacterias actúen al mismo tiempo, porque en estudios realizados (52,80) se ha observado que así se obtiene el mayor rendimiento.

La desulfuración de carbón se lleva a cabo a nivel industrial generalmente como lo muestra la Figura 39

B.2.d.) Extracción de manganeso(112,115,123,145). La corteza terrestre contiene aproximadamente 0.1% de manganeso en forma de $MnAl_2O_4$. Las plantas y animales utilizan este elemento en diversos procesos bioquímicos. Una de las fuentes más grandes de este elemento es la mina de Nsatu en Costa de Oro, Africa. Desde que esta mina fue abierta en 1914 ha producido 5-7 millones de toneladas de manganeso. La extracción se lleva a cabo por métodos de -- fundición. Otras fuentes importantes de manganeso son: En Rusia se extrae de Chiatri, distrito de Caucasia de donde se obtiene principalmente el mineral pirolusita (MnO_2); en suelos marinos encontramos la rodocrosita -- ($MnCO_3$). No todos los depósitos marinos se han formado por precipitación(145), sino que también ha contribuido la actividad volcánica submarina.

Los minerales más importantes de manganeso son listados en la Tabla No. 16.

El manganeso posee propiedades similares al hierro, por lo que se encuentran asociados con este elemento en la naturaleza. Los óxidos, hidróxidos, silicatos y carbonatos son las formas minerales más comunes de este metal. La forma bivalente es la de mayor movilidad en la naturaleza. Donde las condiciones ambientales actúan a favor de la reducción del manganeso, por lo que es lixiviado del suelo y depósitos minerales. Tales condiciones son frecuentes en los lugares donde la materia orgánica está en alta cantidad y además el suelo esté saturado de agua, esto provoca que la materia se descomponga, iniciándose así las condiciones reductoras favorables para la extracción. El manganeso se encuentra en el fondo marino en

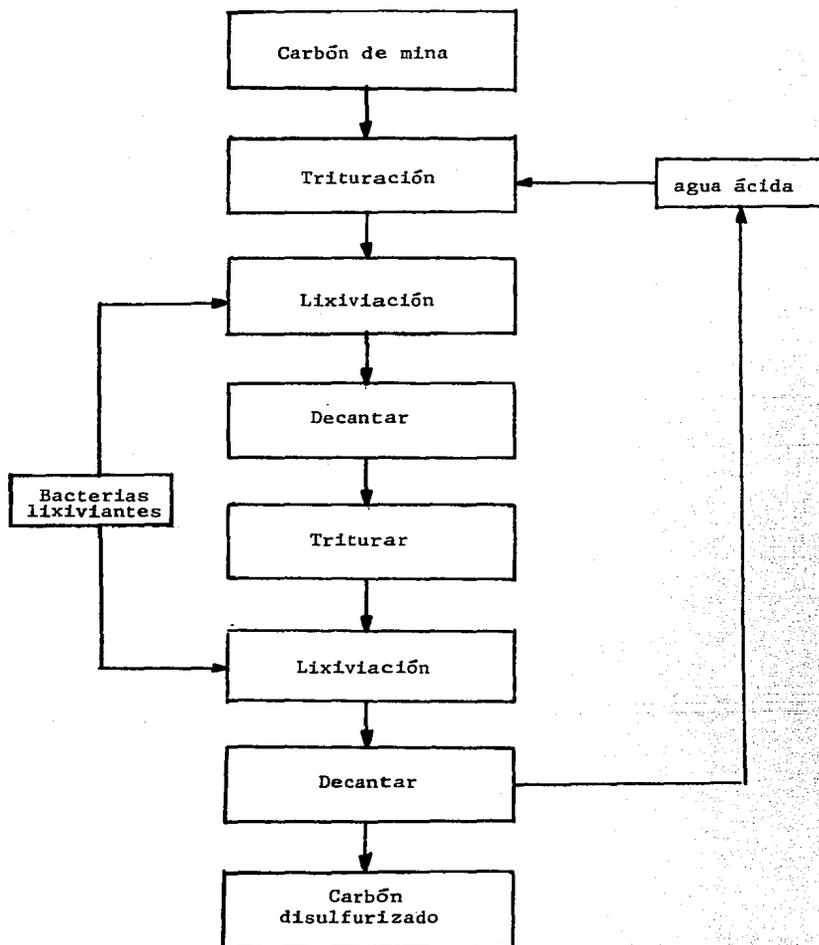


Figura No. 39 Método de desulfurización del carbono a nivel industrial por método microbiológico.

COMPOSICION QUIMICA	MINERAL	SENSIBILIDAD A LA ACCION MICROBIOLOGICA
MnO	Mangonosita	+
Mn(OH) ₂	Pirocroita	+
Mn ₂ O ₃ · H ₂ O	Manganita	+
Mn ₃ O ₄	Hausmanita	-
MnO ₂	Polianita o pirolusita	+
3 Mn ₂ O ₃ MnSiO ₂	Braunita	-
Mn ₂ (SiO ₄) ₂	Teproita	-
(Mn, Fe) ₂ (SiO)	Manganfayelita o knebelita	-
(Mn, Fe, Ca)(SiO ₃)	Rodonita	-
(Mn, Fe) ₂ (SiO ₃)	Piromangita	-
Mn ₃ Al ₂ (SiO ₄) ₃	Espesartita	-
BaMnMn ₈ O ₁₆ (OH) ₄	Silomelana	-
(Fe, Zn, Mn)(Fe,Mn) ₂ O ₄	Franclinita	-
MnS	Albandita	+
MnCO ₃	Rodocrosita	+
MnAl ₂ O ₄	Galaxita	-
MnFeO ₄	Jacabsita	+
LiMn(PO ₄)	Litiofilita	+

Tabla No. 16 . Principales minerales de Manganeso y su relación con la acción microbio-
logica (101).

forma de nódulos, la composición principal de estos nódulos es la pirolusita. Se ha encontrado (145), que en los depósitos marinos del mineral están localizados en el Océano Atlántico, con un contenido aproximado en manganeso del 20%. La generación de los nódulos en el suelo marino es aun desconocida, aunque la mayoría de los resultados de diversos estudios(112,115, 123), hace suponer un mecanismo bioquímico llevado a cabo por el metabolismo de los microorganismos. La acción microbiana sobre los minerales de man-

ganeso, se ha enfocado principalmente al género Thiobacillus; los cultivos de estas bacterias que han sido usados para recobrar el manganeso de las -- minas con bajo contenido en el metal, también se han reportado como posibles responsables de la formación de los nódulos (145). Las bacterias oxidadoras de azufre producen suficiente ácido sulfúrico, lo que favorece la oxidación de azufre, que a su vez reduce al manganeso del mineral pirolusita a un compuesto soluble como el $MnSO_4$. Cerca del 60-70% del mineral extraído se realiza en un período de tiempo de 9 días con una temperatura de 30°C; en la extracción se adiciona azufre, sulfato ferroso y fosfato de potasio con la finalidad de favorecer el desarrollo bacteriano y las condiciones reductoras del medio ambiente. La reacción que se lleva a cabo para la extracción se puede representar como:



Los minerales de manganeso al igual que los de fierro, son atacados por una gran variedad de microorganismos entre los que destacan: Algunas especies de Arthrobacter, Bacillus y Pseudomonas. Con estas especies se ha obtenido un rendimiento cerca del 70-80% en un lapso de 90-100 días. El manganeso es extraído con métodos químicos favoreciendo las condiciones que afectan la vida bacteriana, siendo así un método que requiere menos control en las -- condiciones de operación. Los minerales piromanganita, rodonita, jacobsita son separados con una solución de sulfato ferroso y dióxido de manganeso produciendo la reacción:



El sulfato férrico precipita, excepto bajo condiciones altamente ácidas mientras el sulfato de manganeso II, se mantiene en solución y es llevado en la fase acuosa y de ahí es recuperado.

B.2.e.) Extracción de zinc(68,71,81,106,123,133,145). En los tiempos antiguos el zinc no fue reconocido como elemento sino que se identificó como un constituyente de las aleaciones de cobre y bronce. El término cadmis se aplicó a los minerales de zinc y para los productos obtenidos en los hornos de los minerales (principalmente óxidos). Probablemente los chinos fueron los primeros en extraer al zinc como metal. La corteza terrestre con-

tiene aproximadamente 0.004% de zinc, el cual es menor que los estimados para otros metales como el zirconio, vanadio, titanio, y estroncio.

El zinc es un catión positivo en la mayoría de los casos que se combina y se encuentra en la naturaleza; se compleja fácilmente con el azufre para formar la esfalerita que contiene aproximadamente un 67% de zinc.

La esfalerita es importante por su abundancia en los depósitos y además es fuente secundaria de cadmio y en menor grado de indio, galio, y germanio; los minerales asociados generalmente son la galena, piritita, marcasita, calcopiritita, simitsonita, calcocita y dolmita. La cantidad de fierro presente en la esfalerita esta relacionada con la temperatura de formación del mineral por lo que es usada como un termómetro geológico, esto es: bajo contenido de fierro y manganeso son prueba de una formación a baja temperatura, por otro lado las altas concentraciones indican las condiciones inversas. En la Tabla No.17 se muestran los principales minerales de zinc.

Las condiciones óptimas para la lixiviación del zinc son: Temperatura de 30°C, pH=2.0-2.5 unidades, aireación moderada, utilización de un medio de cultivo como el descrito por Noboru y Tomizuka (132) para otras extracciones ya mencionadas en este capítulo.

COMPOSICION QUIMICA	M I N E R A L
ZnS	Esfalerita o wurtzita
ZnO	Zincita
ZnCO ₃	Esmitomita
Zn ₂ (SiO ₄)	Willemita
Zn ₄ (OH) ₂ (Si ₂ O ₇).H ₂ O	Hemmorfitita

Tabla No. 17. Minerales de Zinc con importancia económica para el hombre.

RESUMEN

En el presente trabajo de revisión monográfica se ha mostrado la información sobre el comportamiento bioquímico y fisiológico de bacterias quimiolitótropas. Dentro de este panorama los puntos más sobresalientes son:

- 1.- Problemática para la denominación de los grupos nutricionales, utilizando los términos autótrofo y heterótrofo con su significado tradicional. Al respecto se ha propuesto un cambio sustancial para el significado de dichos términos, así como también para la denominación de los grupos nutricionales.
- 2.- La asimilación de compuestos orgánicos por las bacterias quimiolitótropas es una acción comprobada, lo que ha provocado que los científicos relacionados con este tema de la microbiología hayan realizado estudios con la finalidad de dar respuesta a las interrogantes:
¿Cuál es el papel metabólico de los compuestos orgánicos asimilados por las bacterias quimiolitótropas?
¿Cómo funciona el transporte a nivel de membrana en esta clase de bacterias?
- 3.- La obtención de energía y poder reductor por las bacterias quimiolitótropas es un punto muy importante, que ha sido expuesto en este trabajo. Los artículos consultados nos reportan un mecanismo muy particular para este fin al cual han llamado "Reserva del Transporte Electrónico en la Cadena Respiratoria".
- 4.- La utilidad de las bacterias del nitrógeno y del azufre en la agricultura y minería, ha sido el motivo de que se realicen estudios con la finalidad de: aislar y mejorar cepas para la recuperación de suelos alcalinos y mantenimiento del grado de nitrificación en los suelos que son utilizados para el cultivo.

Con lo que respecta a la minería, los estudios se han enfocado en la determinación de los factores que afectan y favorecen la lixiviación microbiana, así como también los mecanismos bioquímicos por los cuales se lleva a cabo dicho proceso.

Los estudios realizados sobre los aspectos arriba mencionados han ido formando eslabones que en algunas ocasiones no se ha podido determinar su lugar correcto en una cadena, que aclare en definitiva la fisiología y el metabolismo de las bacterias quimiolitótrofas, lo que ha originado controversias que seguramente, pronto serán resueltas.

Lo que sí puedo decir, sin miedo a equivocarme, es que las bacterias quimiolitótrofas son un campo de investigación muy importante, de donde se puede obtener una nueva visión de la fisiología y bioquímica microbiana. Con lo que respecta a su aplicación, éstas bacterias son una herramienta muy útil en la agricultura y en la minería.

ABREVIATURAS

AMP	Monofosfato de Adenosín
APG	Acido 3-fosfoglicérico
ATP	Trifosfato de Adenosín
1C	Compuesto de un átomo de carbono
2C	Compuesto de dos átomos de carbono
EMB	Embden-Meyerhof-Parnas
ED	Entner-Doudoroff
FADH ₂	Flavin Adenil Dinucleótido
FDP	Fructosa 1,6-difosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
NADH ₂	Nicotín Adenín Dinucleótido
3PGA	3-fosfato gliceraldehido
PHB	Beta polihidroxiurato
PRC	Fosforribulocinasa
RDPC	Ribulosa difosfato carboxilasa
R5P	Ribulosa 5-fosfato
RU5P	Ribulosa 1,5-fosfato

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adair F.F.W., K. Gundersen
Chemoautotrophic sulfur bacteria in the marine environment
I) Isolation, cultivation and distribution
II) Characterization of an obligately marine facultative autotroph
Canadian Journal of Microbiology, 15, 345-359 (1969).
- 2.- Aleem M.I.H.
Generation of reducing power in chemosynthesis
III) Energy-linked reduction of piridine nucleotides in Thiobacillus novellus
Journal of Bacteriology, 91, 729-736 (1966)
- 3.- Apel W.A., P.R. Dugen, J.H. Tuttle
Adenosine 5'-Triphosphate formation in Thiobacillus ferrooxidans
vesicles by H^+ -ion gradients comparable to those of environmental
conditions
Journal of Bacteriology, 142, 295-301 (1980).
- 4.- Arpad E. Torma
The role of Thiobacillus ferrooxidans in hydrometallurgical
processes
Advances Biochemistry Engineering, 6(1), 1-29 (1976),
- 5.- Bassham J.A.
The control of photosynthetic carbon metabolism
Science, 174, 525-530 (1979).
- 6.- Beck J.V.
A ferrous ion-oxidating bacterium
Journal of Bacteriology, 79, 502-509 (1960).
- 7.- Belser L.W.
Bicarbonate uptake by nitrifiers: Effect of growth rate, pH,
substrate concentration, and metabolic inhibitors
Applied Environment Microbiology, 48(6), 1100-1104 (1984).

- 8.- Beudeker R.F.
Regulation of nitrogen assimilation by obligate chemolithotrophic
Thiobacillus neapolitanus
Journal of General Microbiology, 28(1), 39-47 January (1982).
- 9.- Bosecker K., M. Kürsten
Recovery of metallic raw materials by microbial leaching
Process Biochemistry, 34, 1-4 October (1978).
- 10.- Brierly C.
Bacterial leaching
CRC Critical Reviews in Microbiology, November (1978).
- 11.- Brierly C.
Microbial mining
Scientific American, 247, 44-53 (1982).
- 12.- Brock T.D.
Biología de los microorganismos
3a. Edición, Editorial Omega, España 1985.
- 13.- Brock T.D., J. Gustafson
Ferric iron-reduction by sulfur and iron-oxidizing bacteria
Applied and Environmental Microbiology, 32, 567- 571 (1976).
- 14.- Brown C.S., D.S. MacDonald and J.L. Meers
Physiological aspect of microbial inorganic nitrogen metabolism
Advances in Microbial Physiology, 11, 1-52 (1974).
- 15.- Butler R.G., W.W. Umbreit
Absorption and utilization of organic matter by the strict
autotroph Thiobacillus thiooxidans with special reference to
aspartic acid
Journal of Bacteriology, 91, 661-666 (1966).
- 16.- Callender I.J., J.P. Barford
Precipitation, chelation and the availability of metals as nutrients
in anaerobic digestion
I) Methodology
II) Application
Biotechnology and Bioengineering, 25, 1947-1972 (1983).

- 17.- Clayton Roderick K. and William R. Sistrom
The photosynthetic bacteria
Plenum Press, New York and London 1978.
- 18.- Colby J. Zatman
Enzimological aspects of the pathways for the trimethylamine
oxidation and C₁ assimilation in obligate methylotrophs and
restricted facultative methylotrophs
Biochemical Journal, 148, 513-520 (1975).
- 19.- Cole J.A.
Microbial gas metabolism
Advance Microbiology and Phisyology, 14(1), 1-84 (1976).
- 20.- Comer R.A.
Relation of iron-oxidizer Thiobacillus ferrooxidans to thiosul-
fate
Journal of Bacteriology, 83, 761-765 (1962).
- 21.- Conference: Bacterial Leaching
March 24 to 26, (1977)
Edited by W. Schwartz
G.B.F. (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH. Brauns-
cheweing Stöckheim)
Text of 28 reports presented to the Conference.
- 22.- Cooper R.C.
Evidence for the presence of certain tricarboxylic acid cycle in
Thiobacillus thioparus
Journal of Bacteriology, 88, 624-629 (1964).
- 23.- Cox R.B. and Quayle J.R.
The autotrophic growth of Micrococcus denitrificans on methanol
Biochemical Journal, 150, 569-571 (1975).
- 24.- Delwiche C.C., and M.S. Finstein
Carbon and energy source for the nitrifying autotroph Nitrobacter
Journal Bacteriology, 90, 151- 152 (1965).

- 25.- DiSpirito A.A., J.H. Touvinen
Oxygen uptake coupled with uranium sulfate oxidation by
Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus acidophilus
Geomicrobiology Journal, 2, 275-291 (1981).
- 26.- Doelle H.W.
Bacterial metabolism
2nd. Edition, Academic Press, Inc. (1975).
- 27.- Drabkova V.G.
Redox potential and distribution of bacteria in the surface mud
of some lakes of the Karelian isthms
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 35, 899-903 (1966).
- 28.- Dugan P.R., D.G. Lundyren
Energy supply for the chemoautotroph Ferrobacillus ferrooxidans
Journal of Bacteriology, 89, 825-834 (1965).
- 29.- Ellwood D.C., H.F. Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch, H.H. Slater
Contemporary Microbial Ecology
Academic Press, London (1980).
- 30.- Erickson L.E.
Analysis of microbial growth and product formation with nitrate
as nitrogen source
Biotechnology and Bioengineering, 22, 1929-1944 (1980).
- 31.- Fenchel T., T.H. Blackburn
Bacterial and mineral cycling
Academic Press (1979).
- 32.- Fliermans C.B., T.D. Brock
Ecology of sulfur-oxidizing bacteria in hot acid soils
Journal of Bacteriology, 111, 343-350 (1972).
- 33.- Focht D.D., A.C. Chang
Nitrification and denitrification processes related to waste
water treatment
Advance in Applied Microbiology, 19, 153-182 (1974).

- 34.- Frenkel A.W.
Multiplicity of electron transport reactions in bacterial photosynthesis
Advances in Microbial Physiology, 7, 243-282 (1970).
- 35.- Gaay R., M. Silver, A.E. Torma
Ferrous iron oxidation and uranium extraction by Thiobacillus ferrooxidans
Biotechnology and Bioengineering, 19, 727-740 (1977).
- 36.- Gale N.L., J.V. Beck
Evidence for the Calvin Cycle and Hexose Monophosphate pathways in Thiobacillus ferrooxidans
Journal of Bacteriology, 94, 1052-1059 (1967)
- 37.- Gest Howard, Anthony San Pietro
Bacterial Photosynthesis
A symposium sponsored by the Charles F. Kettering Research Lab.
The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio (1963).
- 38.- Gest Howard
Energy conversion and generation of reducing power in bacterial photosynthesis
Advances in Microbial Physiology, 7, 243-250 (1972).
- 39.- Golomzik A.I., V.I. Ivanov
Adaptation of Thiobacillus ferrooxidans to increased hydrogen ion and ion concentration
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 34, 396-399 (1965).
- 40.- Günsalus I.C., Roger, Stainer
The Bacteria, Vol. II
Academic Press, New York and London (1961).
- 41.- Harold F.M.
Conservation and transformation of energy by bacterial membrane
Bacteriological Reviews, 36, 172-230 (1970).

- 42.- Harrison A.P.
The acidophilic Thiobacillus and other acidophilic bacteria that share their habitat
Annual Review of Microbiology, 38, 265-292 (1984).
- 43.- Hempling W.P., W. Uishiniac
Yield coefficient of the Thiobacillus neapolitanus in continus culture
Journal of Bacteriology, 93, 874-878 (1967).
- 44.- Horio T., Kamen M.D.
Bacterial cytochromes.
II) Funtional aspect
Annual Review of Microbiology, 24, 399-428 (1970).
- 45.- Huntchison M., K.I. Johnstone White
Taxonomy of the genus Thiobacillus: The outcome of numeral taxonomy applied to the group as a whole
Journal of General Microbiology, 57, 397-410 (1969).
- 46.- Huntchinson M., K.I. Johnstone White
Taxonomy of the acidophilic Thiobacillus
Journal of General Microbiology, 44, 373-381 (1966).
- 47.- Hunter S.H.
Inorganic nutrition
Annual Review of Microbiology, 26, 313-346 (1972).
- 48.- Kamen M.D., Horio T.
Bacterial cytochromes
I) Structural aspects
Annual Review of Biochemistry, 39, 673-700 (1970).
- 49.- Kamalor M.R., R.Z. Kreines
Bacterial leaching of copper ores of the Kounrad deposit
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 38, 426-429 (1969).
- 50.- Karavaiko G.I., S.A. Moshnyakova
A study of chemosynthesis and rate of bacterial and chemical processes under conditions of copper-nickel ore deposits on the Kola Peninsula
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 40, 484-488 (1971).

- 51.- Kargi F.
Enhancement of microbial removal of pyritic sulfur from coal using concentrate cell-suspension of Thiobacillus ferrooxidans and external carbon supply
Biotechnology and Bioengineering, 24, 37-53 (1982).
- 52.- Kargi F. and Robison J.M.
Microbial desulfurization of coal by the thermophilic micro-organism Sulfolobus acidocaldarius
Biotechnology and Bioengineering, 24, 54-71 (1982).
- 53.- Kovalenko T.V., G.I. Karavaiko, V.P. Piskunov
Effect of the Fe³⁺ ions in the oxidation of ferrous iron by Thiobacillus ferrooxidans at various temperatures
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya).
- 54.- Karube Isao, Toshiaki Otsuka
Photochemical system for regenerating NADPH from NADP with use of immobilized chloroplast
Biotechnology and Bioengineering, 22, 2655-2665 (1980).
- 55.- Keltjens J.T.
Coenzymes of methanogenesis from hydrogen and carbon dioxide
Antonie VanLeeuwenhoek, 54(4), 383-396 (1984).
- 56.- Keller Ludwig, L.E. Murr
Acid bacterial and ferric sulfate leaching of pyritic single crystals
Biotechnology and Bioengineering, 24, 83-96 (1982).
- 57.- Kelly D.P.
Autotrophy: Concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism
Annual Review of Microbiology, 25, 177-210 (1971).
- 58.- King G.M.
Utilization of hydrogen, acetate and "noncompetitive" substrate by the methanogenic bacteria in marine sediments
Geomicrobiology, 3(4), 275-306 (1984).

- 59.- Kinsel N.A.
New sulfur oxidizing iron bacterium Ferrobacillus sulfooxidans sp.n
Journal of Bacteriology, 80, 628-632 (1960).
- 60.- Kow Y. W.
Ubiquinone in hydrogen metabolism by Azotobacter winelabdii
Journal of Microbiology, 30(1), 1421-1423 November (1984).
- 61.- Kunznetova Z.I.
Distribution of bacteria in ground water as a function of
environmental Redox condition
Microbiology (translation of Mikrobiologiya), 35, 758-761 (1966)
- 62.- Lazarott N.
Sulfate requirement for iron oxidation by Thiobacillus ferrooxidans
Journal of Bacteriology, 85, 78-93 (1963).
- 63.- Leathen W.W., N.A. Kinsel, S.A. Braley
Ferrobacillus ferrooxidans: A chemosynthetic autotrophic bacterium
Journal of Bacteriology, 72, 700-704 (1956).
- 64.- Leefeldt R.H., A. Martin
Growth and physiology of the Thiobacillus novellus under
nutrient limited mixotrophic condition
Journal of Bacteriology, 142, 645-650 (1980).
- 65.- Lewe D.J., R.N.F. Thornely
The mechanism of Klebsiella pneumoniae nitrogenase action.
Presteady-state kinetics of H₂ formation
Biochemical Journal, 224(3), 877-886 December (1984).
- 66.- Lundgren D.G., M. Silver
Ore leaching by bacteria
Annual Review of Microbiology, 34, 263-283 (1980).
- 67.- Lyalikova N.N., G.A. Sokoleva
A microbial characterization of some ore deposits in central
Kazakhstan
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 34, 279-285 (1965).

- 68.- Lyalikova N.N., Z.P. Deryugina

Microbial investigation of certain sulfide deposite of North-
ern Caucasus

Microbiology (Translation of Mikrobiologiya).

- 69.- Lyric Ronald M., Isamm Suzuki

Kinetic studie of sulfide. Cytochrome c oxidoreductase, thio-
sulfate-oxidizing enzyme and adenosine-5'-phosphate reductase
from Thiobacillus thioparus

Canadian Journal of Biochemistry, 48, 143-150 (1980).

- 70.- Lyric Ronald M. Isamm Suzuki

Enzimes involve in the metabolis of thiosulfate by Thiobacillus
thioparus

I) Survey of enzymes and properties of sulfide: cytochrome c
oxidoreductase

II) Properties of adenosine-5'-phosphosulfate reductase

III) Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed
pathways of thiosulfate oxidation

Canadian Journal of Biochemistry, 48, 334-363 (1970).

- 71.- Malakhova P.T., G.M. Chebotaren, E.U. Kovalenko, V.A. Volkov

Oxidation of sulfide minerals by Thiobacillus ferrooxidans

Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 50, 108-115 (1981).

- 72.- Manning H.L.

New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic
acidophilic bacteria from acid mine drainage

Journal of Applied Microbiology, 30, 1010-1016 (1975).

- 73.- Martidainen P.J., E.L. Nurmiaha-Lassila

Nitrosospira, an important ammonium-oxidizing bacterium in
fertilized coniferous forest soil

Canadian Journal Microbiology, 31(3), 190-197 March (1985).

- 74.- Mateos Marcos Rosa del Carmen

Estudio de la asimilación heterotrófica del anhídrido carbóni-
co por Saccharomyces

Tesis de licenciatura de la Facultad de Química, UNAM México 1979.

- 75.- Matin A., M. Schleisa, R.C. Pérez
Regulation of glucose transport and metabolism in Thiobacillus novellus
Journal of Bacteriology, 42(2), 639-644 May (1980).
- 76.- Matin A.
Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria
Annual Review Microbiology, 32, 433-468 (1980).
- 77.- Matin A., B. Wilson, E. Zychlinsky, M. Martin
Proton motive force and the physiological basis of delta pH maintenance in Thiobacillus acidophilus
Journal of Bacteriology, 150, 582-591 (1982).
- 78.- Matin A., M. Scheleiss, R.C. Pérez
Regulation of glucose transport and metabolism in Thiobacillus novellus
Journal of Bacteriology, 142, 639-644 (1980).
- 79.- McFadden B.A.
Autotrophic CO₂ assimilation and the evolution of ribulose diphosphate carboxylase
Bacteriology Review, 37, 289-319 (1973).
- 80.- MurrL.D., and A.T. Metha
Coal desulfurization by leaching involving acidophilic and thermophilic microorganism
Biotechnology and Bioengineering, 24, 743-747 (1982).
- 81.- Moshnyakova S.A., G.I. Karavaiko, E.U. Schetinina
Role of Thiobacillus ferrooxidans in leaching of Ni, Cu, Co, Fe, Al, Ca from ores of copper-nickel deposits
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 40, 959-965 (1971)
- 82.- Noguchi A., M. Takoma, T. Sekiguchi, Y. Noseh
Effects of uncouplers on the acidostability of Thiobacillus thiooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 41, 451-454 (1977).

- 83.- Norris J.R., Richmond M.H.
Bacterial nutrition
Edited by R. Whittenbury, Essay in Microbiology
John Wiley and Sons , New York 1978
- 84.- Parson W.N.
Bacterial photosynthesis
Annual Review of Microbiology, 28, 41-59 (1974).
- 85.- Peck H.D.
Energy-coupling mechanism in chemolithotrophic bacteria
Annual Review of Microbiology, 22, 489-518 (1968).
- 86.- Pérez Rachel C., Abdul Matin
Carbon dioxide assimilation by Thiobacillus novellus under
nutrient-limited mixotrophic conditions
Journal of Bacteriology, 150(1), 46-51 (1982).
- 87.- Pfenning N.
Photosynthetic bacteria
Annual Review of Microbiology, 21, 285-324 (1967).
- 88.- Pinovarova T.A., Y.M. Miller
Role of phospholipids in the fractionation of stable isotopes
of sulfur in its oxidation by Thiobacillus ferrooxidans
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya).
- 89.- Quayle J.R.
The metabolism of one carbon compounds by microorganism
Advances in Microbial Physiology, 7, 119-203 (1972).
- 90.- Quayle J.R.
Metabolism of C₁ compounds in autotrophic and heterotrophic
microorganism
Annual Review of Microbiology, 15, 119-152 (1961).
- 91.- Razzel-W.E., P.C. Trussell
Isolation and properties of an iron-oxidizing Thiobacillus
Journal of Bacteriology, 85, 595-603 (1963).

- 92.- R.P.F. Gregory
Biochemistry of photosynthesis
2nd. Edition, John Wiley and Sons LTD, London (1977).
- 93.- Ribbons D.W., J.E. Harrison, A.M. Wadzinky
Metabolism of single carbon compounds
Annual Review of Microbiology, 24, 135-158 (1970).
- 94.- Rittenberg S.C.
The role of exogenous organic matter in physiology of
chemolithotrophic bacteria
Advances in Microbial Physiology, 3, 159-196 (1969).
- 95.- Rusinova N.G., A.K. Romonova, G.N. Lutouchen Ko, N.G. Doman
Carbon dioxide fixation by thionic bacteria Thiobacillus 58 R
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 40, 669-674 (1971).
- 96.- Rose H. Anthony
Chemical microbiology
2nd. Edition, London Butterworths (1970).
- 97.- Ruby E.G., C.O. Wirsen, H.W. Jannasch
Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos
Rift hydrothermal vents
Applied and Environmental Microbiology, 42, 317-324 (1984).
- 98.- Schaeffer W.I., W.W. Umbreit
Phosphotidyl inositol as a wetting agent in sulfur oxidation
by Thiobacillus thiooxidans
Journal of Bacteriology, 85, 492-493 (1963).
- 99.- Shaeffer W.I., P.E. Holbeat, W.W. Umbreit
Attachment of Thiobacillus thiooxidans to sulfur crystals
Journal of Bacteriology, 85, 137-140 (1963).
- 100.- Sakaguchi and Marvin Silver
Microbiological leaching of a chalcocopyrite concentrate by
Thiobacillus ferrooxidans
Biotechnology and Bioengineering, 18, 1091-1101 (1976).

- 101.- Sakaguchi H., A.E. Torma, M. Silver
Microbiological oxidation of synthetic chalcocite and covellite
by Thiobacillus ferrooxidans
Applied and Environmental Microbiology, 31, 7-10 (1976).
- 102.- Schlegel H., U. Eberhardt
Regulatory phenomena in the metabolism of Knallgasbacteria
Advances in Microbiology Physiology, 7, 205-240 (1972).
- 103.- Shiba H., T. Kawasumi
The deficient carbohydrate metabolic pathways in trophic hydro-
gen-oxidizing bacterium
Agricultural and Biological Chemistry, 46(9), 2341-2345 Sep. (1982).
- 104.- Shafia F., R.F. Wilkinson
Growth of Ferrobacillus ferrooxidans on organic matter
Journal of Bacteriology, 97, 256-260 (1969).
- 105.- Silver M., P. Margalith, D.G. Lundgren
Effect of glucose on carbon dioxide assimilation and substrate by
Ferrobacillus ferrooxidans
Journal of Bacteriology, 93, 1765-1769 (1967).
- 106.- Silverman Melvin P., Henry L. Ehrlich
Microbial formation and degradation of minerals
Advances in Applied Microbiology, 6, 119-124 (1964).
- 107.- Silverman Melvin P.
Mechanism of bacterial pyrite oxidation
Journal of Bacteriology, 94, 1046-1051 (1967).
- 108.- Silverman Melvin P., M.H. Rogoff
Morphological variation in Ferrobacillus ferrooxidans related
to the rate of iron oxidation
Nature, 191, 1221-1223 (1961).
- 109.- Silverman Melvin P., D.G. Lugren
Studies on the chemoatrophic iron bacterium Ferrobacillus
ferrooxidans
II. Manometric studies
Journal of Bacteriology, 78, 326-331 (1959).

- 110.- Smith Alison L., Don P. Kelly, Ann P. Wood
Metabolism of Thiobacillus A2 grown under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions in chemostat culture
Journal of General Microbiology, 121, 127-138 (1980).
- 111.- Smith Alison L., J. London, R.Y. Stainer
Biochemical bases of obligate autotrophy in blue-green algae, and Thiobacillus
Journal of Bacteriology, 94, 972-983 (1967).
- 112.- Sokolova G.A., Z.P. Deryugina
The role of microorganism in the formation of oxidized ores in the Chiatura manganese deposits
Microbiology (Translation of Mikrobiologiya), 35, 293-298 (1966).
- 113.- Stark Awishay A., Saul A. Yankosky
Active transport of amino acid in Thiobacillus thioparus is a low affinity process
Journal of Bacteriology, 148(3), 956-965 Dec. (1981).
- 114.- Stark Awishay A., Saul A. Yankosky
Regulation of aminoacid transport in Thiobacillus thioparus
Journal of Bacteriology, 148(3), 966-972 Dec. (1981).
- 115.- Starkey L. Robert
Transformation of sulfur by microorganism
Industrial and Engineering Chemistry, 48(9), 17-20 Sept.(1956).
- 116.- Stouthamer A.H.
Biochemistry and genetics, of nitrate reductase in bacteria
Advances in Microbiology and Physiology, 14, 315-375 (1976).
- 117.- Stukas P.E., DeCicco B.T.
Autotrophic and heterotrophic metabolism of Hydrogenomonas
regulation of autotrophic growth by organic substrate
Journal of Bacteriology, 101, 339-345 (1970).
- 118.- Sugio Tsuyoshio, T. Tano, K. Imai
Two factors affecting on iron-oxidizing activities of Thiobacillus ferrooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 45, 393-407 (1981).

The purification and some properties of a factor having a stimulatory effect on iron-oxidizing activity of Thiobacillus ferrooxidans

Agricultural and Biological Chemistry, 45, 405-412 (1981).

120.- Sugio Tsuyoshio, Y. Anzai, T. Tano, K. Imai

Isolation and some properties of an obligate and facultative iron-oxidizing bacteria

Agricultural and Biological Chemistry, 45, 1141-1151 (1981).

121.- Sugio Tsuyoshio, T. Tano, K. Imai

Isolation and some properties of two kinds of cytochrome c oxidase from iron-grown Thiobacillus ferrooxidans

Agricultural and Biological Chemistry, 45, 1791-1799 (1981).

122.- Sugio Tsuyoshio, Tetsushi Kougami, Tatsuo Tano

Glutathione transport system in Thiobacillus ferrooxidans strain AP-44

Agricultural and Biological Chemistry, 46(12), 2919-2924 (1982).

123.- Summers A.O., S. Silver

Microbial transformation of metals

Annual Review of Microbiology, 32, 637-672 (1978).

124.- Twenty-seventh Symposium of the Society for General Microbiology.

Held at Imperial College London MARCH 1977

Microbial Energetics

Published for the Society for General Microbiology, Cambridge University Press, Cambridge. Edited by Haddock and Hamilton W.A 1977.

125.- Takana H., Uzman S., T.J. Dunn

Kinetics of nitrification using a fluidized sand bed reactor with attached growth

Biotechnology and Bioengineering, 23, 1638-1702 (1981).

- 126.- Tano Tatsuo, K. Imai
Physiological studies in Thiobacillus
Part. II) Metabolism of colloidal sulfur by the cell-free
enzyme system of Thiobacillus thiooxidans (pags.51-54)
Part. III) The oxidation of thiosulfate by particulate fraction
of Thiobacillus thiooxidans (pags.140-143)
Part. IV) Purification and certain properties of cytochrome c
from Thiobacillus thiooxidans (pags.279-283)
Part. V) Extraction of NADPH-cytochrome c oxidorectase from
Thiobacillus thiooxidans (pags.284-286)
Part VI) Certain properties of NADPH-cytochrome oxidorectase
of Thiobacillus thiooxidans (pags.401-404)
Agricultural and Biological Chemistry, 32, (1969).
- 127.- Tano Tatsuo, T. Sugio, K. Imai
A cytochrome c peroxidase isolated from Thiobacillus thiooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 37, 695-696 (1973).
- 128.- Tano Tatsuo, K. Ishii, T. Sugio, K. Imai
A NADPH: Glutathione oxidoreductase isolated from Thiobacillus thiooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 40, 1879-1880 (1976).
- 129.- Tano Tatsuo, K. Saka, T. Sugio, K. Imai
Purification and some properties of a ferrocycytochrome c: Hydro-
genperoxide oxidoreductase from Thiobacillus thiooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 41, 323-330 (1977).
- 130.- Taylor I.J., Anthony C.
A biochemical basis for obligate methylotrophy; properties of a
mutant of Pseudomonas AM1 lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase.
Journal of General Microbiology, 93, 259-265 (1976).
- 131.- Thauer Rudolf K., Jungerman Kurt, Deeker Karl
Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria
Bacteriology Review, 41(1), 100-180 (1977).

- 132.- Tomizuka N., M. Yagisawa, J. Someya, Y. Takahara
Continuous leaching of uranium by Thiobacillus ferrooxidans
Agricultural and Biological Chemistry, 40, 1019-1025 (1976).
- 133.- Toima A.E., C.C. Walden, R.M.R. Branion
Microbiological leaching of zinc sulfide concentrate
Biotechnology and Bioengineering, 12, 501-517 (1970).
- 134.- Trudinger P.A.
Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulphur
compounds by microorganism
Advances in Microbial Physiology, 11, 79-85 (1974).
- 135.- Tsang D.C.
Cytochrome c_{554} as a possible electron donator in the hydroxy-
lation of ammonia and CO_2 in Nitrosomonas europea
Canadian Journal Biochemistry, 60(11), 1018-1024 (1982).
- 136.- Touvinen O.H., S.I. Niemela, H.G. Gyllenberg
Effect of mineral nutrients and organic substance on the develop-
ment of Thiobacillus ferrooxidans
Biotechnology and Bioengineering, 13, 517-527 (1971).
- 137.- Touvinen O.H., F.A. Panda, H.M. Tsuchiya
Nitrogen requirement of iron-oxidizing thiobacilli for acidic
Applied and Environmental Microbiology, 37, 954-958 (1979).
- 138.- Umbreit W.W.
Symposium on autotrophy
II) The comparative physiology of autotrophic bacteria
Bacteriology Reviews, 26, 145-150 (1962).
- 139.- Umbreit W.W.
Essentials of bacterial physiology
Ed. Dowden Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania (1976).
- 140.- Vishniac W., M. Sahter
The Thiobacilli
Bacteriological Reviews, 21, 195-213 (1957).

- 141.- Vishniac W., P.A. Trudinger
Symposium on autotrophy carbon dioxide fixation and substrate
oxidation in the chemosynthetic sulfur and hydrogen bacteria
Bacterial Reviews, 26, 168-175 (1962).
- 142.- Wallace W., D.J. Nicholas
The biochemistry of nitroifying microorganism
Biological Reviews, 44, 359-391 (1969).
- 143.- Wichlacz P.L., R.F. Unz
Acidophilic, heterotrophic bacteria of acidic mine waters
Applied and Environmental Microbiology, 41, 1254-1261 (1981).
- 144.- Wood P. Ann, Don P. Kelly
Carbohydrate degradation pathways in Thiobacillus A2 grown
on various sugar
Journal of General Microbiology, 120, 333-345 (1980).
- 145.- Zajic E. James
Microbial Biogeochemistry
Academic Press, London 1969.
- 146.- Zhao S.J., R.S. Hanson
Variants of obligate methanotroph isolate 761M capable of growth
on glucose in the absence of methane
Applied Environmental Microbiology, 48(4), 807-812 October (1984).

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPITULO I.- ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA NUTRICIÓN DE BACTERIAS AUTOTROFAS.	
FIGURA 1	Esquema de los procesos que conocemos en conjunto como metabolismo 3
TABLA 1	Grupos nutricionales denominados según la nueva terminología 11
TABLA 2	Características de los grupos nutricionales de organismos fotosintéticos 13
FIGURA 2	Esquema metabólico para la utilización de compuestos orgánicos mayores que $1C$ por microorganismos fotosintéticos de la Familia <u>Rhodospirillaceae</u> género <u>Rhodospseudomonas</u> y <u>Rhodospirillum</u> 17
FIGURA 3	Reacciones implicadas en la síntesis y degradación del poli-beta-hidroxibutirato 19
TABLA 3	Características nutricionales de microorganismos quimiosintéticos 20
TABLA 4	Características morfológicas de los géneros incluidos en el grupo de bacterias metanol oxidantes 22
TABLA 5	Características morfológicas nutricionales de las principales especies que utilizan metilamina, metanol y formato 25
TABLA 6	Características de las bacterias quimiolitótrofas 27
TABLA 7	Géneros incluidos en el grupo de las Bacterias del Hidrógeno 27
FIGURA 4	Crecimiento de <u>Hydrogenomona eutropha</u> 30
FIGURA 5	Regulación de la degradación de la fructosa 34
FIGURA 6	Mecanismo de asimilación para la glucosa, fructosa y glutamato presentado en el mayoría de las <u>Hydrogenomonas</u> .. 37
FIGURA 7	Regulación de la formación de la ureasa por la presencia de enzimas relacionadas a la degradación de derivados de purina, en <u>Hydrogenomonas 16</u> 46
TABLA 8	Características del género <u>Hydrogenomonas</u> en diferentes condiciones de crecimiento 47
TABLA 9	Características morfológicas de las Bacterias del Azufre .. 48
FIGURA 8	Relación propuesta para la vía de la Hexosa Monofosfato y el Ciclo Calvin durante la fijación del CO_2 en <u>thiobacillus ferrooxidans</u> 62
FIGURA 9	Representación esquemática del flujo de carbón de los compuestos orgánicos como glucosa 68

TABLA 10	Especies incluidas en el grupo de las Bacterias del Nitrógeno	70
FIGURA 10	Mecanismo para la acumulación de Ac. aspártico	72
FIGURA 11	Esquema del flujo de carbono, que representan la mayoría de las Bacterias del Nitrógeno cuando utilizan acetato como fuente del carbono	72
CAPITULO II.- VIAS DE UTILIZACION DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS DE CARBONO		
FIGURA 12	Mecanismos de fijación del CO ₂ en autótrofos o Ciclo Calvin	78
FIGURA 13	Sistema Acetil-CoA o Reserva de los Acidos Tricarboxílicos	82
FIGURA 14	Vía de los Acidos dicarboxílicos-C ₄	83
FIGURA 15	Vía Síntesis de glicina partiendo de compuestos reducidos de 1C	85
FIGURA 16	Pasos de la vía de la Serina partiendo del formato	86
FIGURA 17	Esquema de la vía de la Alulosa para la fijación de formaldehido	88
CAPITULO III.- BIOQUIMICA DE LA RESPIRACION EN MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS.		
Tabla 11	Tipos de respiración en los principales grupos de microorganismos quimiolitótrofos	90
FIGURA 18	Puntos de entrada a la cadena respiratoria de los equivalentes reductores provenientes de la oxidación de compuestos inorgánicos	91
FIGURA 19	Esquema generalizado para la reserva del Transporte de Electrones para los compuestos de azufre y nitrógeno	91
TABLA 12	Valores E', para los diferentes substratos inorgánicos y para los componentes de cada cadena respiratoria	92
FIGURA 20	Esquema de flujo electrónico proveniente de los Nicotín Dinucleótidos en la cadena respiratoria	93
FIGURA 21	Esquema general de la respiración en bacterias quimiorganótrofas	99
FIGURA 22	Flujo electrónico para las bacterias del Hidrógeno	101

FIGURA 23	Mecanismos de oxidación para el ión ferroso, mediante el complejo propuesto por Aleem	102
FIGURA 24	Mecanismos de oxidación para los compuestos de azufre utilizados por los tiobacilos	104
FIGURA 25	Mecanismo por el cual el tiosulfato es reducido a sulfuro oxidado a sulfito llegando a la formación del sulfato	106
FIGURA 26	Mecanismo para la oxidación de tiosulfato a tetrationato ..	106
FIGURA 27	Esquema para el flujo electrónico y producción de $NADH_2$ en los tiobacilos	107
FIGURA 28	Flujo electrónico para <i>T. denitrificans</i>	107
FIGURA 29	Mecanismo para la oxidación del amonio a nitrito, propuesto por Aleem	108
FIGURA 30	Esquema propuesto por Aleem para la oxidación del nitrito a nitrato	109
FIGURA 31	Citocromos que intervienen en la oxidación del nitrito	110
FIGURA 32	Reducción del sulfato, mediante la acción de las bacterias sulfato reductoras	112
FIGURA 33	Mecanismos por los cuales se puede reducir el tiosulfito ..	113
FIGURA 34	Mecanismos de reducción para el sulfato cuando se utilizan compuestos orgánicos	114
CAPITULO IV.- LAS BACTERIAS DEL NITROGENO EN LA AGRICULTURA.		
FIGURA 35	Esquema del Ciclo del Nitrógeno en la naturaleza	117
FIGURA 36	Esquema del Ciclo Calvin del Azufre en la naturaleza	122
FIGURA 37	Esquema de los sistemas de lixiviación por vertedero (a) y en cúmulos (b)	127
TABLA 13	Los principales minerales de cobre	128
FIGURA 38	Flujo del proceso de extracción de cobre partiendo de calcopirita y covelita, propuesto por Hiromuchi y Sakaguchi	132
TABLA 14	Los principales minerales de uranio en la naturaleza	133
TABLA 15	Los principales minerales de fierro con importancia económica para el hombre	136
FIGURA 39	Método de desulfuración l,carbono a nivel industrial, utilizando métodos microbiológicos	138
TABLA 16	Los principales minerales de manganeso con importancia económica para el hombre	139
TABLA 17	Los principales minerales de zinc con importancia económica para el hombre	141