

Metabolismo I (Fotosíntesis, quimiolitótrofos, metabolismo aerobio/anaerobio)



1. Cuáles de las siguientes sustancias pueden servir como fuente de energía para los sistemas biológicos: CO_2 , H_2 , O_2 , Fe^{3+} , NH_4 , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , H_2S , S^0 , CH_4 , glucosa, Fe^{2+} . Cuáles de ellos pueden servir como aceptores de electrones? Cuáles pueden servir tanto como dadores como aceptores de electrones?

2. Analice los procesos de oxidación y reducción de compuestos de azufre, indicando : reacción química involucrada, algún género bacteriano que lleve a cabo el proceso indicado, y la clasificación nutricional del organismo en cuestión (dónde obtiene cada uno la energía, el carbono y el poder reductor).

3. Cuatro microorganismos aislados de un arroyo son anaerobios facultativos. Los cuatro son capaces de crecer usando malato o glucosa como fuentes de carbono y energía en condiciones aeróbicas, pero presentan distintos requerimientos para poder prosperar en condiciones anaeróbicas. Para conocer esos requerimientos, se cultivaron en un medio con sales minerales, con distintos agregados y en las condiciones indicadas en la tabla, en ausencia de oxígeno, y se determinó en cuál/es de esas condiciones cada uno fue capaz de desarrollarse y crecer.

		1	2	3	4	5	6
Condiciones	Malato o glucosa	+	+	-	+	-	-
	CO_2	+	-	+	+	+	+
	SH_2	-	-	+	-	+	-
	NO_3^-	-	+	+	-	-	-
	Luz	+	-	-	-	+	+
Crecimiento	Microorganismo A	SI	-	-	-	-	-
	Microorganismo B	-	SI	SI	-	-	-
	Microorganismo C	-	-	-	-	SI	-
	Microorganismo D	-	-	-	-	-	SI

a) Indique, para cada microorganismo, cuál es la fuente de carbono, electrones y energía en la/s condición/es en la/s que se observa crecimiento.

- 1- Microorganismo A. Explique brevemente por qué puede crecer en la condición 1 y no en las condiciones 4, 5, o 6.
- 2- Microorganismo B. Por qué crece en condición 2 y no en 1?
- 3- Microorganismo C. De qué tipo de bacteria podría tratarse?
- 4- Microorganismo D.

b) En cuál/es de los microorganismos aislados espera encontrar las siguientes rutas/eventos bioquímicos?

- 1- Ciclo de Calvin
- 2- Fotólisis del agua
- 3- Flujo reverso de electrones

4. Un microorganismo es capaz de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica y anoxigénica. Se midió la tasa de fijación de C en presencia o ausencia de DCMU (herbicida que inactiva específicamente el fotosistema II, PSII), y en presencia de distintas concentraciones de SH_2 (Fig.1)

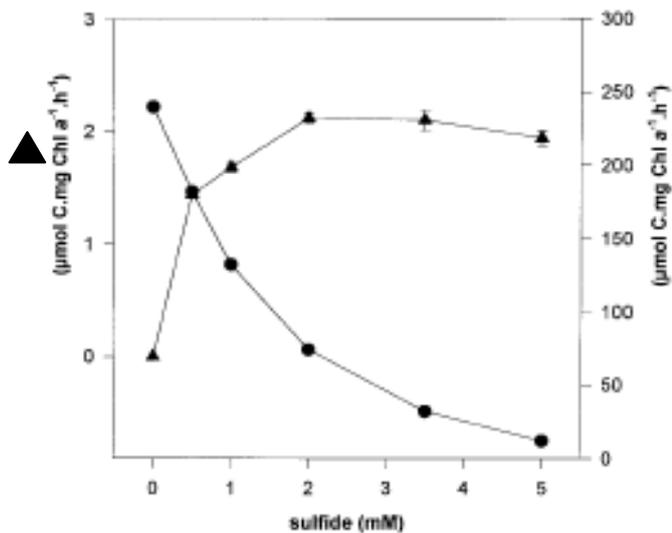


Fig.1. Fotosíntesis oxigénica y anoxygenica en *Prochlorothrix hollandica*.

Tasa de fijación de carbono bajo óptima iluminación, en presencia (triángulos) o ausencia (círculos) de 10 μM DCMU, y con distintas concentraciones de SH_2 en el ambiente.

Interprete los resultados obtenidos teniendo en cuenta que el SH_2 , además de potencial dador de electrones, también es conocido por interferir con el proceso de fotólisis del agua. Compare la tasa de fijación de carbono obtenida en condiciones oxigénicas y anoxygenicas.

5. Un investigador aisló un microorganismo mesófilo de los sedimentos de la laguna de Mar Chiquita y lo denominó WS1. Determinó que la temperatura óptima de crecimiento era entre 18 y 20°C a pH de 6,5. A su vez, observó que WS1 era capaz de oxidar al hierro de Fe^{+2} a Fe^{+3} . Debido a la importancia de este último hecho en la remoción de metales en ambientes naturales, decidió estudiar las condiciones necesarias para entender como se lleva a cabo este proceso. Se realizaron ensayos para analizar la oxidación del hierro en diferentes condiciones de oxígeno y luz (Fig 1) y su relación con el consumo de CO_2 en condiciones anaeróbicas (Fig 2):

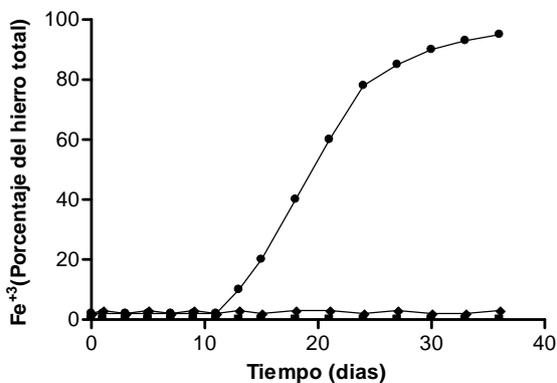


Fig 1 Oxidación del Fe^{+2}

Se realizaron cultivos de WS1 en presencia de Fe^{+2} y en distintas condiciones de luz y O_2 , y se analizó la aparición de Fe^{+3} en el tiempo. El medio contenía sales, HCO_3^- a pH 6,5 y se incubó a 18°C.

- con luz en ausencia de oxígeno
- ▼ sin luz en ausencia de oxígeno
- ▲ con luz y oxígeno
- sin luz y oxígeno

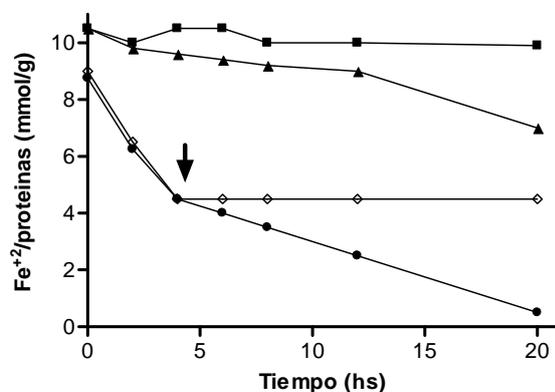


Fig 2 Relación entre la oxidación de Fe^{+2} , luz y consumo de CO_2 .

Se realizaron cultivos en anaerobiosis en diferentes condiciones de luz y CO_2 . Se extrajeron muestras para determinar la concentración de proteínas totales de WS1 y la concentración Fe^{+2} en el medio.

- cel con CO_2 en oscuridad; ▲ cel sin CO_2 con luz;
- ◇ cel con CO_2 cambiadas de luz a oscuridad (flecha);
- cel con CO_2 con luz.

Nota: potencial redox para: $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = +0,82$; centro de reacción de la bacterioclorofila red/ox = $+0,45$; $\text{NAD}^+/\text{NADH} = -0,32$. Para el par $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2} = +0,77$ (pH 2) y 0,2 (pH 6) debido a la

diferencia en solubilidad de los pares a diferentes pHs y su interacción con carbonatos, iones hidroxilo, etc.

Preguntas:

a) Interprete los resultados de la Fig 1.

b) Interprete los resultados de la Fig 2.

c) La función del Fe^{+2} es: (**justifique cada respuesta**)

- reducir NAD^+
- proveer electrones al centro de reacción
- ser aceptor de electrones en la respiración anaeróbica

d) Indique qué tipo de metabolismo posee WS1 considerando las fuentes de energía, electrones y carbono.

6. El microorganismo *Thiobacillus ferrooxidans* puede crecer utilizando la energía proveniente de la oxidación de Fe^{2+} (usando O_2 como aceptor). La cadena de electrones involucrada contiene al menos las siguientes proteínas: Fe^{2+} /citocromo c oxidorreductasa, citocromo c y citocromo c oxidasa. Se midió en esferoplastos de este organismo el consumo de O_2 en distintas condiciones, y se encontró que el consumo de O_2

- se inducía por el agregado de ferrocitocromo c (como dador de electrones soluble)
- era estimulado por el agregado de protonóforos como CCCP o DNP.
- se inhibía completamente por KCN (con la formación de un complejo inactivo cianuro-citocromo oxidasa)
- era insensible al agregado de inhibidores de complejos tipo NDH (NADH deshidrogenasa o complejo I) y bc1 (ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa o complejo III)

En un sistema de esferoplastos similar se monitoreó la oxidación del ferrocitocromo c agregado, utilizando como medida la disminución que ocurre en la absorbancia a 550 nm de este citocromo a medida que se oxida:

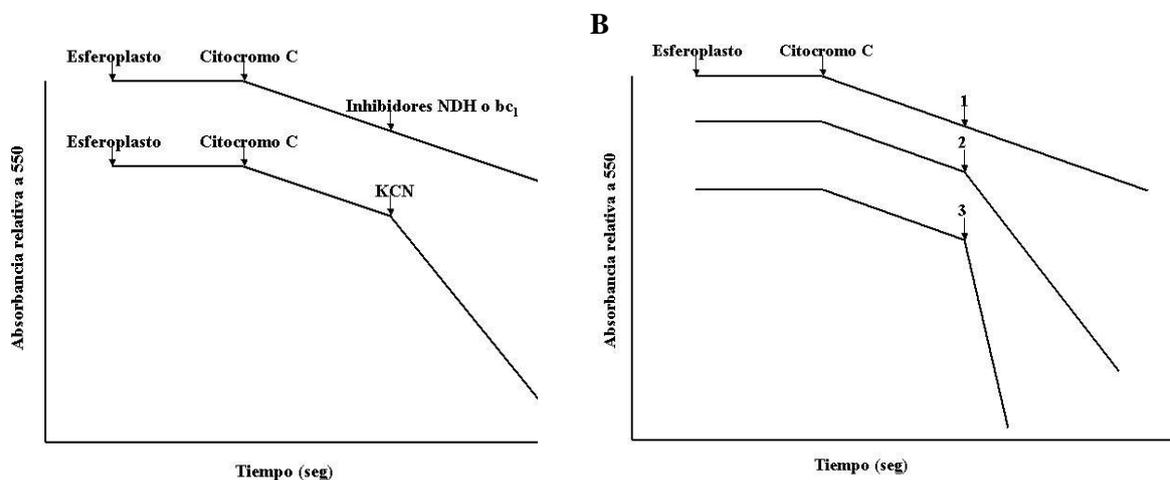


Fig. 1: Oxidación de ferrocitocromo c exógeno por esferoplastos de *T. ferrooxidans*. En todos los casos se midió la oxidación del ferrocitocromo c como la disminución en la absorbancia relativa a 550 nm.

- A. Efecto de inhibidores de complejos NDH, complejos bc1 o citocromo oxidasa sobre la velocidad de oxidación del ferrocitocromo.
- B. Efecto de ATP, protonóforos, inhibidores NDH/bc1 o inhibidores ATPasa sobre el aumento en la oxidación de citocromo c inducido por KCN. 1-KCN + protonóforos, o KCN + inhibidor de complejos NDH, ó KCN + inhibidor complejos bc1 o KCN + inhibidor ATPasa. 2- KCN. 3- KCN + ATP

Preguntas:

- a) A qué se debe el aumento en el consumo de O_2 por el tratamiento con protonóforos?
- b) Cómo interpreta la inhibición del consumo de O_2 por KCN?

- c) Cómo puede explicarse el aumento en la oxidación de ferrocitocromo inducido por KCN?
- d) Cómo interpreta que dicho aumento sea estimulado por ATP e inhibido por protonóforos, o inhibidores de la ATP sintasa/ATPasa?
- e) Cuál puede ser el destino de los electrones provenientes del ferrocitocromo en estas condiciones?
- f) Arme un esquema del sistema completo, con todos los transportadores y/o enzimas involucrados.
- g) En células vivas de *T. ferrooxidans*, la relación ATP/ADP se mantiene baja mientras las células están en crecimiento activo. Cuando no hay carbono disponible para síntesis de componentes celulares, el ATP se acumula y por lo tanto la relación ATP/ADP aumenta considerablemente. En mitocondrias de mamíferos y también en ciertos microorganismos, la citocromo c oxidasa es inhibida cuando la relación ATP/ADP es alta. Para qué podría servir la presencia de un mecanismo similar de regulación en *T. ferrooxidans*?

NOTA: recuerde que los complejos NDH y bc_1 son componentes de la cadena respiratoria que va típicamente de NADH a O_2 .

7. *Acidithiobacillus ferrooxidans* es un microorganismo quimiolitotrófico aeróbico que obtiene energía para el crecimiento a partir de la respiración oxidativa y la oxidación de compuestos ferrosos y sulfúreos. Se conoce poco sobre el rol de la respiración anaeróbica que involucra la reducción de Fe^{3+} o S^0 en el crecimiento de las típicas bacterias quimiolitotróficas. Para investigar sobre este tema se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 1. La cepa JCM 7811 de *A. ferrooxidans* se creció quimiolitotróficamente en respiración anaeróbica de Fe^{3+} como aceptor de electrones y H_2 como dador de electrones (Fig. 1 A). También se midió la concentración total de Fe y Fe^{2+} en presencia o ausencia de bacterias (Fig. 1 B).

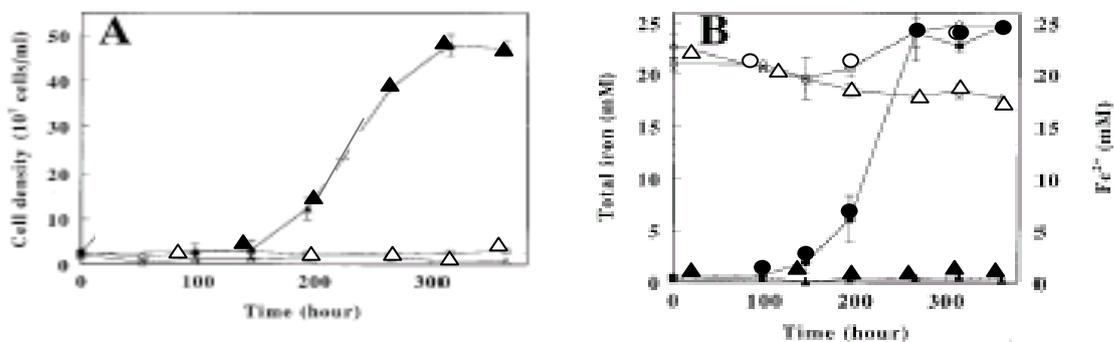


Fig. 1: Crecimiento quimiolitotrófico de *A. ferrooxidans* en respiración anaeróbica con H_2 como dador de electrones y Fe^{3+} como aceptor

A. crecimiento bacteriano: (▲) + H_2 ; (△) - H_2 . B. Concentración de Fe total (○) + bacterias; (△) - bacterias; concentración de Fe^{2+} (●) + bacterias; (▲) - bacterias.

Experimento 2. Se investigó la capacidad de *A. ferrooxidans* de crecer anaeróbicamente usando H_2 como dador de electrones y S^0 como aceptor

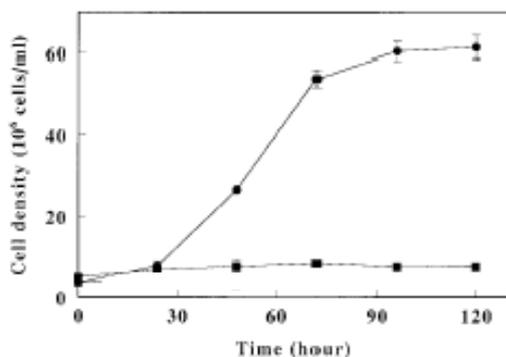


Fig. 2. Crecimiento quimiolitotrófico de *A. ferrooxidans* en respiración anaeróbica de S^0 e H_2 como dador de electrones.

● $H_2 + S^0$ ■ $H_2 - S^0$

Experimento 3. Finalmente se creció esta bacteria anaeróbicamente en presencia de S^0 como dador de electrones y Fe^{3+} como aceptor (Tabla I)

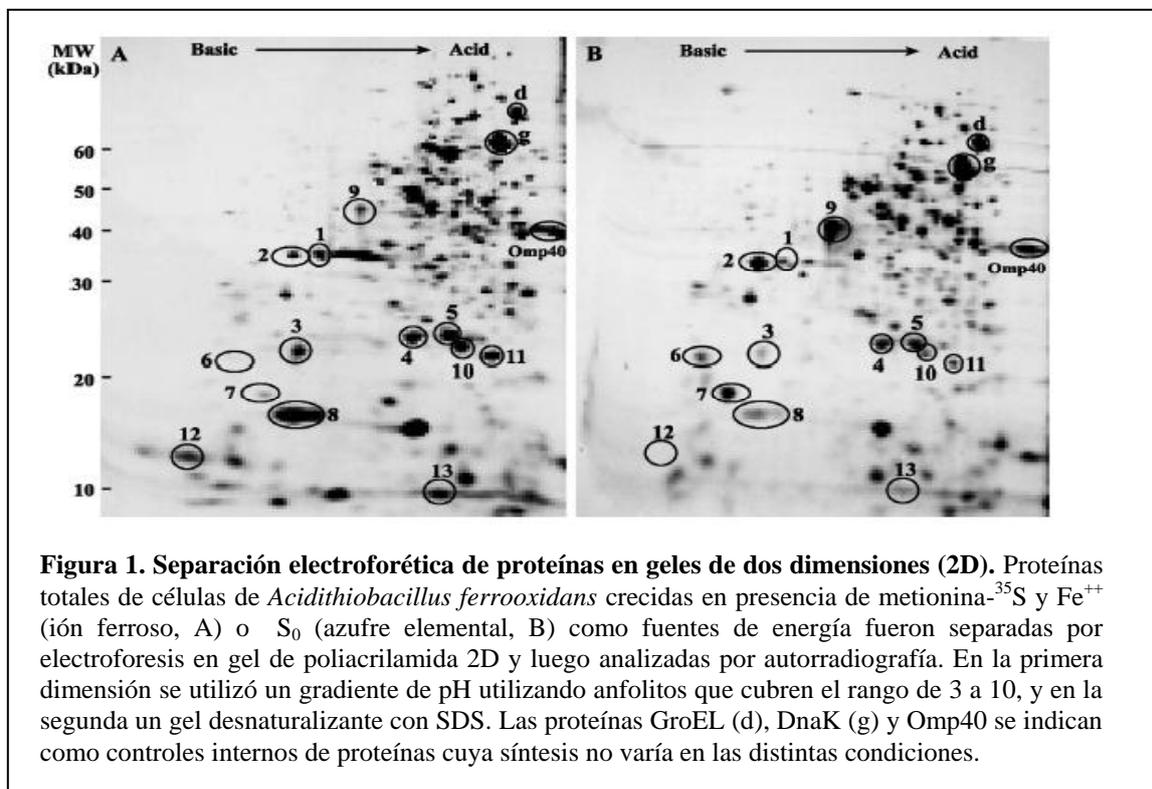
Tabla I. Crecimiento anaeróbico de *A. ferrooxidans* en base a la reducción de Fe^{3+}

Medio	Densidad celular (cél./ml)		Concentración de Fe			
	Inicial	Final	Inicial		Final	
			Total	Fe^{2+}	Total	Fe^{2+}
$S^0 + Fe^{3+}$	-	-	24	1.2	23	0.37
S^0	800	60	-	-	-	-
$S^0 + Fe^{3+}$	840	10500	24	0.59	24	23

Preguntas:

a. En base a los datos previos y a los resultados mostrados en este trabajo, qué tipos de respiración puede llevar a cabo *A ferrooxidans*? Indique dador y aceptor de electrones para cada caso.

8. Un grupo de la Universidad de Chile estudia los microorganismos que prosperan en el agua de las minas y que por su capacidad de disolver minerales que se encuentran en las rocas en pequeñas cantidades resultan de interés biotecnológico para aumentar la eficiencia de recuperación de ciertos minerales (procesos de *bioleaching*). Uno de tales microorganismos, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, es capaz de extraer la energía necesaria para su crecimiento de la oxidación de diversos compuestos. Para estudiar las proteínas involucradas en la obtención de energía y su regulación, se crecieron células en medios definidos en presencia de un precursor radiactivo y se analizaron las proteínas sintetizadas por electroforesis en gel en dos dimensiones (Fig.1)



a. Analice el resultado de las autorradiografías. Puede observar diferencias en el patrón de síntesis de proteínas dependiente del compuesto utilizado como fuente de energía?

- b.** Cómo imagina que sería el resultado si las células se crecieran en las dos condiciones en ausencia del precursor radiactivo, y sólo se agregara éste una hora antes de procesar las muestras?
- c.**Cuál imagina que puede ser la función de las proteínas que se expresan diferencialmente?

9- Una mezcla hipotética de dos microorganismos no identificados se inoculó en un soporte inerte, con buena aireación, que contenía además sales inorgánicas (nitratos, sulfatos, sulfuros, sales ferrosas y férricas....) y la humedad apropiada, y se incubó a 25°C y en oscuridad durante dos semanas en dos condiciones diferentes:

- A: al aire
- B: al aire, con el agregado de un hidrocarburo aromático

A tiempo cero y al cabo de las dos semanas, se tomó una muestra, se extrajo DNA total, y se amplificó el DNA correspondiente al gen del RNA 16S con primers diseñados para su análisis en geles desnaturalizantes en gradiente (DGGE por la sigla en inglés). Los resultados obtenidos fueron:

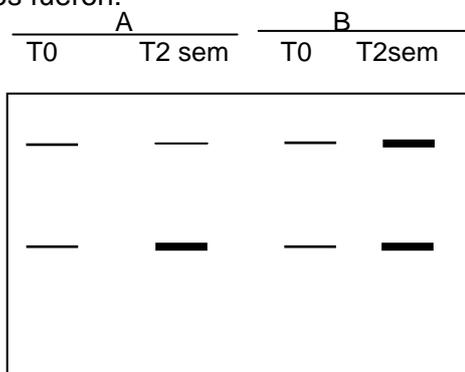


Figura 1

Además, a lo largo de todo el experimento se midió el contenido de sulfuros, sulfatos, nitratos, iones férricos y ferrosos, y del hidrocarburo. Se muestran los resultados en la Figura 2:

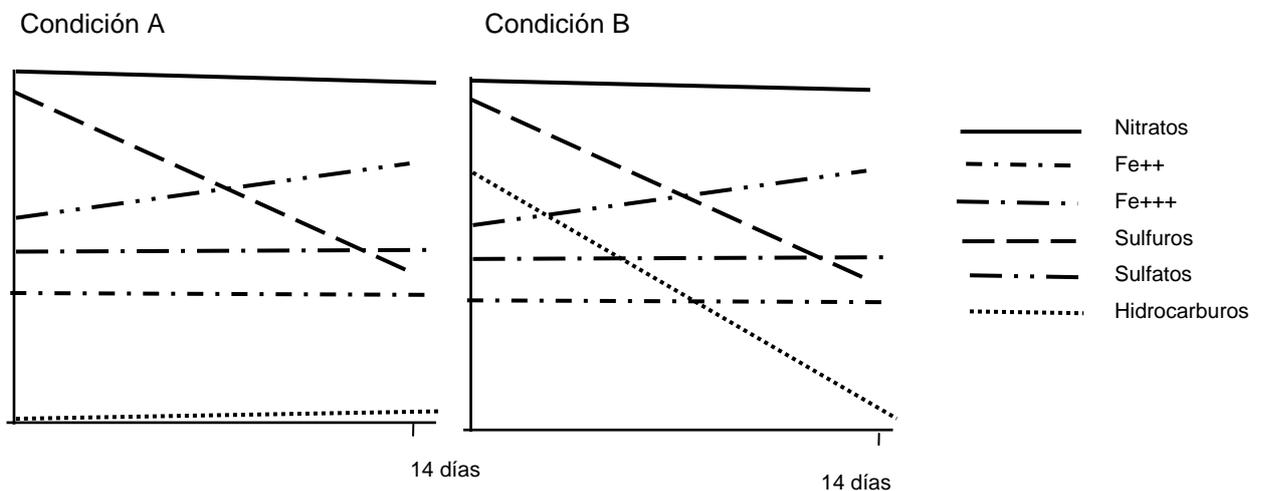
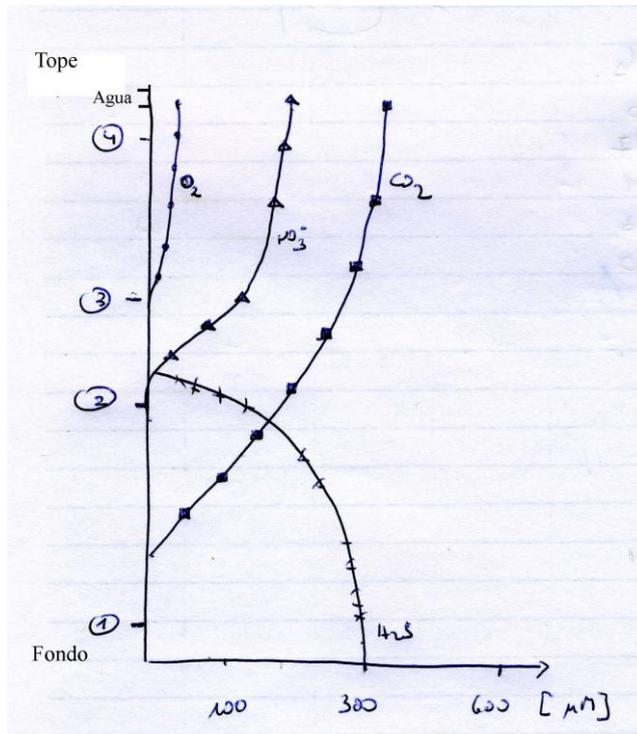


Figura 2

- a.** Interprete el resultado de la Fig. 1
- b.** Defina nutricionalmente a los dos microorganismos presentes en la mezcla teniendo en cuenta todos los resultados, e indique para cada caso la fuente de energía, la fuente de electrones y la fuente de carbono que utiliza cada uno.

10- Se desea analizar la composición de una población microbiana presente en una muestra de suelo fangoso, para ello se realizó una columna de Winogradsky. Se tomo la muestra de suelo y se le agregó nitrato, fosfato, carbonato, sulfato y celulosa. La mezcla homogéneamente mezclada

fue colocada en un recipiente adecuado y se expuso a la luz manteniendo la temperatura constante a 25°C. Al cabo de 60 días de incubación se analizó la concentración de diferentes compuestos a los largo de la columna (Fig 1).

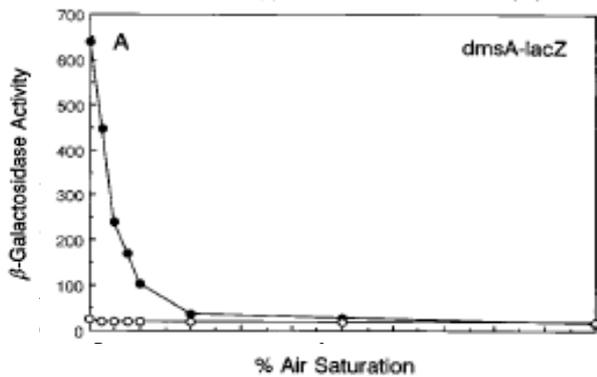
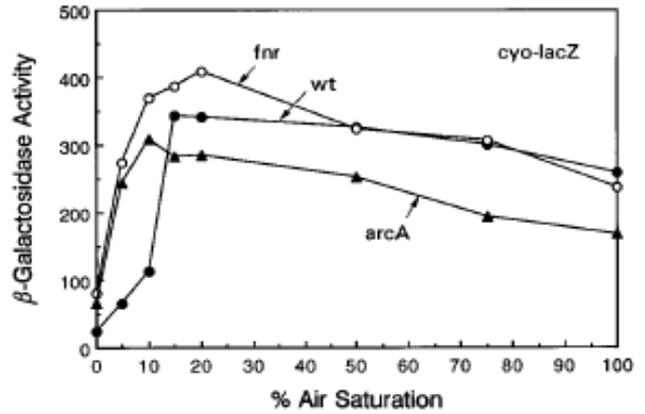
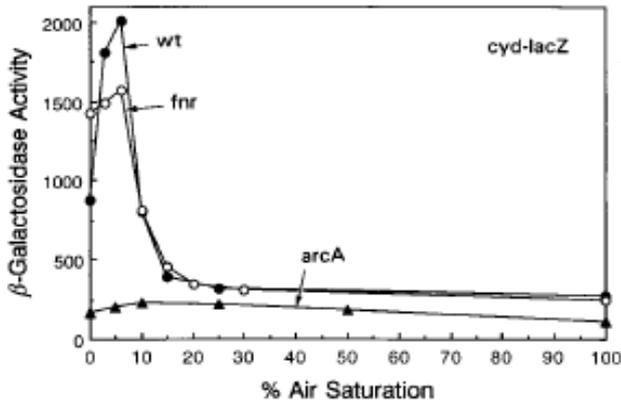


Preguntas (Justifique en todos los casos):

- Como explicaría la aparición de H₂S en la columna? Y la diferencia en concentración de H₂S entre los puntos 1 y 2?
- Considerando que *Clostridium* sp. es productor de CO₂ y que fue detectado en los puntos 1 a 3, como explicaría la ausencia de CO₂ en el punto 1?
- Explique los factores que determinan la concentración de O₂ en los puntos 3 y 4.
- Como explica las diferencias en la concentración de NO₃⁻ en los puntos 2 y 3.
- Indique las categorías nutricionales de al menos 1 microorganismo en cada punto
- De donde aislaría *Sulfolobus acidophilus* (S⁰, Fe⁺² como fuente de energía, heterotrófico)

11- *E. coli* posee la capacidad de crecer en condiciones aeróbicas (2,1-21% O₂), microaeróbicas (0,1-2,1% O₂) o anaeróbicas (<0,1 % O₂). Para ello, este microorganismo sintetiza, de acuerdo a sus necesidades, una gama de proteínas como: citocromo oxidasa b (Cyo), citocromo oxidasa d (Cyd), fumarato reductasa (FrdA) y DMSO/TMSO reductasa (DmsA), entre otras. Por otro lado, se conoce que existen dos sistemas de regulación de la respiración aerobia/anaerobia compuestos por los productos de los genes *fnr* y *arcA-arcB*.

Para analizar la regulación de las proteínas involucradas en los distintos tipos de metabolismo respiratorio, se fusionó el promotor de los tres genes mencionados con el gen de β-galactosidasa, y con el plásmido obtenido se transformaron células *wt*, o células con una delección en los genes *fnr* o *arcA*.



Efecto del oxígeno sobre la expresión de *cyd* (A), *cyo* (B) y *dmsA* (C) en *E. coli*.

Se realizaron cultivos continuos y a los tiempos determinados se extrajeron muestras para determinar la actividad β-galactosidasa. El nivel de oxígeno usado para los crecimientos está expresado como porcentaje de saturación del medio, que es igual a 21%. Círculo cerrado: ¹ *wild type*; círculo abierto: mutante *fnr*, triángulo: mutante *arcA*

Preguntas

- Cuál le parece que sería el aceptor de electrones de c/u de las tres condiciones mencionadas (anaerobiosis, microaerobiosis o aerobiosis)? Cuál le parece que podría ser la diferencia entre las proteínas codificadas por los genes *cyd* y *cyo*?
- En qué condiciones se expresa c/u de los tres genes?
- Sugiera una forma de regulación que sea consistente con los resultados obtenidos para c/u de los tres genes analizados: 1) *dmsA*; 2) *cyd*; 3) *cyo*.
- Si en lugar de una cepa con una delección en *arcA* se utilizara una cepa en la cual la kinasa estuviera constitutivamente activa en todas las condiciones de oxígeno testeadas, qué resultados esperarías al analizar la expresión del gen reportero *cyo-lacZ* vs concentración de O₂? **JUSTIFIQUE.**

12- Un bacteriólogo intenta impedir el crecimiento de *Pseudomonas* respiradoras obligadas (no-fermentativas) incubando sus cultivos de enriquecimiento en ausencia de O₂. El intento falla y luego de la incubación el cultivo aparece enriquecido en especies de *Pseudomonas*. Dé una posible explicación bioquímica para esta observación.

13. *Shewanella oneidensis* es una bacteria heterótrofa, no fermentativa, que tolera concentraciones relativamente altas de arsénico (As) durante su crecimiento.

El As(V) entra a la célula por un transportador de fosfato y debe ser reducido a As(III) para poder ser exportado por una bomba específica de As (III) y así ser expulsado de la célula para evitar sus efectos tóxicos.

Por otro lado, en ciertas condiciones el crecimiento de la bacteria depende del As(V), y su remoción del medio causa la inmediata cesación del crecimiento.

En *S. oneidensis* se encontraron dos operones inducibles por As:

- operón **ars** contiene una reductasa As(V)→As(III) que acopla la oxidación de tioles a la reducción de As(V), una bomba para extrusión de As(III) por un mecanismo dependiente de ATP, y reguladores de los mismos genes ars.
- operón **arr** contiene una reductasa As(V)→As(III), y un transportador de electrones desde un citocromo tipo c a la reductasa.

Para conocer la función de los distintos operones, se midió la abundancia de transcriptos pertenecientes a uno u otro operón en distintas condiciones. El medio básico contenía sales minerales y glucosa. Como fuente de nitrógeno se utilizó amonio, y en los distintos medios se incorporaron potenciales aceptores de electrones.

O ₂	Otros aceptores de electrones	As(V)	Abundancia transcriptos arr	Abundancia transcriptos ars	
+	-	-	0.12	0.15	
		+	0.14	1.12	
-	Fumarato	-	0.91	0.44	
		+	4.27	3.23	
	Nitrato	-	0.53	0.35	
		+	0.61	2.37	
	-	-	-	No hubo crecimiento	
			+	11.6	12.7

- Cómo explica los resultados obtenidos en anaerobiosis y en ausencia de aceptores de electrones adicionales?
- Se ha propuesto que la función primordial de uno de los operones está relacionada únicamente con la detoxificación de ese ion tan nocivo. Según su interpretación de los resultados de la tabla, cuál de los dos operones cumpliría este rol? Justifique.
- Podría indicar una preferencia en el uso de aceptores de electrones para este microorganismo?
- El rendimiento celular de este microorganismo (masa de células producida/mol de glucosa consumido) fue mayor en condiciones de aerobiosis que en condiciones de anaerobiosis con nitrato como aceptor de electrones. Cómo explica este resultado?

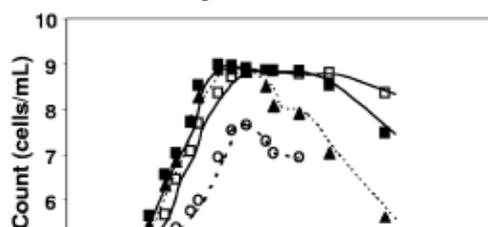
ANEXO

1- Una muestra de tierra destinada a armar una columna de Winogradsky se divide en dos porciones: a una porción no se le hace ningún tratamiento y a la otra se la trata de un modo por el cual se eliminan selectivamente las bacterias reductoras de sulfato. Luego se arman las columnas y se dejan desarrollar. Cuál/es le parece que será/n la/s principal/es diferencia/s entre ambas columnas? No utilice más de cinco renglones en su respuesta.

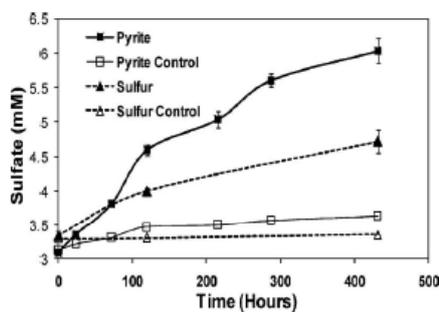
2- Se está estudiando la población de microorganismos presentes en una fuente termal del Parque Yellowstone (EEUU). Se realizó un cultivo de enriquecimiento utilizando como medio de cultivo agua de la fuente termal filtrada con el agregado de 2% (p/v) de residuos de mina enriquecidos en piritita (FeS₂), y como inóculo una porción de biofilm extraída de los costados de la fuente. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos con agitación, incluyendo un espacio de gas cuya composición era de 25 % O₂, 50 % CO₂ y 25 % aire, y se incubaron a 65 °C en oscuridad.

Luego de varios pasajes y dilución de los cultivos, se aisló un microorganismo puro y se realizaron ensayos para caracterizar su metabolismo.

- Curvas de crecimiento utilizando condiciones similares a las que se utilizaron durante el aislamiento, pero reemplazando los residuos de mina por piritita pura, Fe²⁺ adsorbido en una superficie de ferrihidrita, o azufre elemental. En algunos casos se agregó un muy pequeño porcentaje de extracto de levadura (YE) como fuente de vitaminas. Los resultados se muestran en la figura 1



- b- Producción de sulfato en cultivos con pirita o azufre elemental. El medio de cultivo contenía un nivel inicial de sulfato de 3 mM, y se realizaron controles sin inocular (Fig.2)



Preguntas (contestar brevemente, no usar

más de cinco renglones para cada una):

a. Puede definir nutricionalmente a este microorganismo? Justifique.

b. Conteste V o F y justifique:

- Cuando este microorganismo crece con pirita en el medio de cultivo, la única fuente de energía para el crecimiento proviene de la oxidación de Fe^{++} a Fe^{+++}
- Para la producción del poder reductor (NADPH) necesario para procesos de biosíntesis, este microorganismo requiere gastar energía en el flujo reverso de electrones tanto cuando crece en Fe^{++} como cuando crece en azufre elemental.
- Para obtener el mismo resultado en términos de rendimiento energético, este microorganismo necesita oxidar un mayor número de moles de Fe^{++} que de azufre elemental.

Nota: se recuerdan los potenciales de reducción de algunos pares:

$2\text{H}^+/\text{H}_2$: -0.42 V, NAD^+/NADH : -0.32 V, $\text{S}_0/\text{H}_2\text{S}$: -0.28, $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$: -0.22V, $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$: +0.76V, $1/2 \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$: +0.8V

c. Ud prepara 2 frascos conteniendo, como agregados al agua filtrada, Fe^{2+} solo, S elemental solo, S elemental y Fe^{2+} o S elemental y Fe^{3+} , y los incuba en las mismas condiciones que anteriormente pero excluyendo al oxígeno de la fase gaseosa. En los tres primeros frascos no observa ningún crecimiento, pero en el último sí. Puede encontrar una explicación para ese hecho? Qué mediría en el medio de cultivo en cada caso para probar que su hipótesis es cierta?