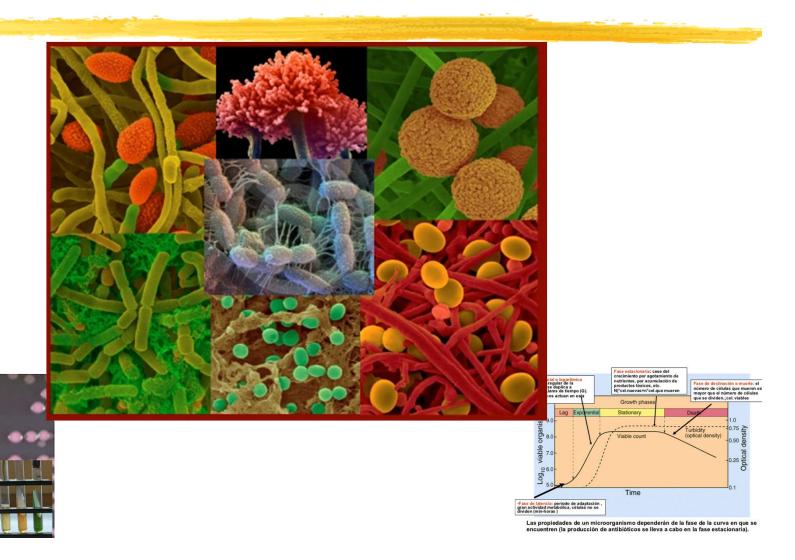
METABOLISMO Y CRECIMIENTO BACTERIANO



Metabolismo Bacteriano

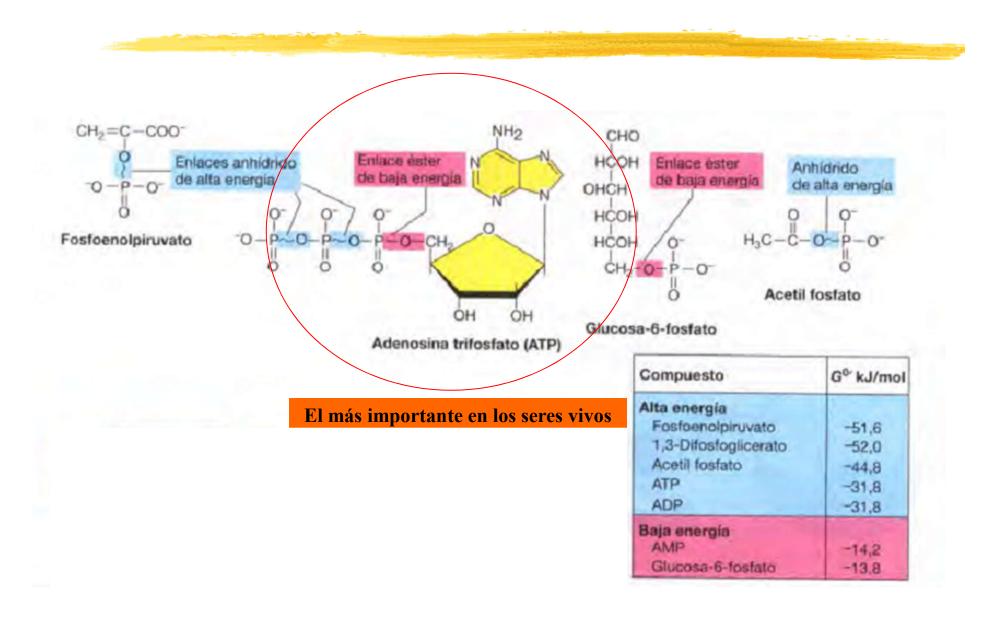
Metabolismo: conjunto de todas las reacciones bioquímicas que ocurren en una célula, tanto las catabólicas como las anabólicas.

- Catabolismo: reacciones de degradación de compuestos orgánicos o inorgánicos para obtener energía.
- Anabolismo: reacciones de síntesis de macromoléculas a partir de precursores con gasto de energía.

LAS 2 PARTES DEL METABOLISMO

- CATABOLISMO: Obtención de Energía por Oxidación (el sustrato pierde electrones) = Respiración y Fermentación.
- ANABOLISMO: Obtención de Compuestos Celulares por Reducción (los precursores ganan electrones) = Biosíntesis

Compuestos que almacenan energía



Energía

La generación de ATP puede ser mediante 3 vías principales:

- **1.Respiración**: tiene lugar en presencia de O_2 y da como resultado final CO_2 y H_2O . Es un proceso de oxidación *total*. Puede ocurrir sin O_2 con otro aceptor final de electrones.
- **2.Fermentación**: en condiciones sin oxigeno, oxidación *parcial* de las moléculas orgánicas con menor rendimiento energético.
- **3.Fotosíntesis**: obtiene la energía por absorción de luz visible a través de la clorofila.

Nutrición

- Los microorganismos requieren para su desarrollo y actividad celular compuestos químicos: nutrientes.
- Nutriente: sustancia que los microorganismos toman del medio ambiente para su metabolismo.
- Dependiendo de las cantidades que se requieran se habla de macronutrientes y micronutrientes.
- Existen diferencias en cuanto a los requerimientos nutricionales de cada especie de microorganismo.

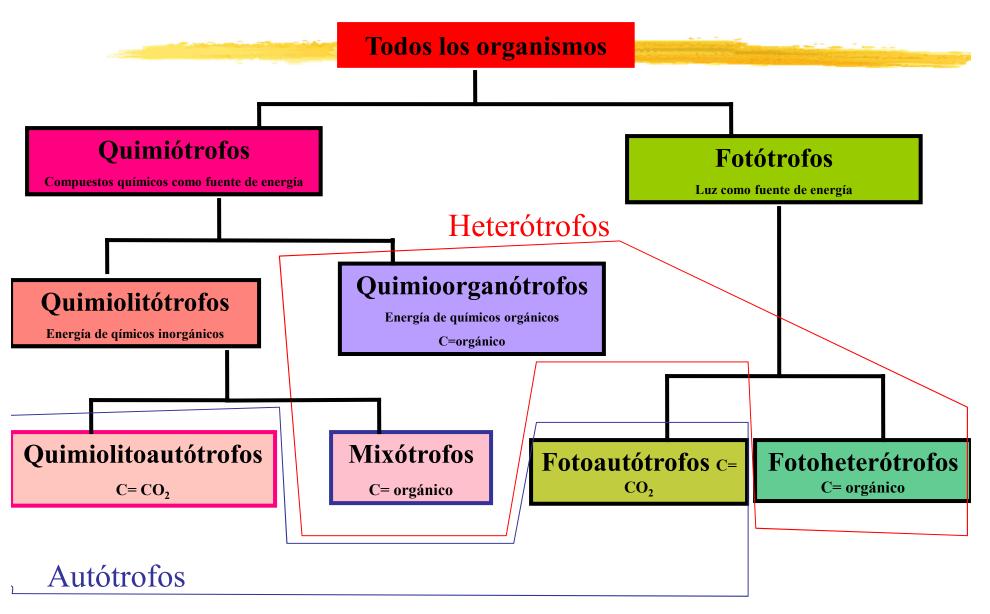
MACRONUTRIENTES	MICRONUTRIENTES
Carbono (C)	Cromo (Cr)
Oxígeno (O)	Cobalto (Co)
Nitrógeno (N)	Cobre (Cu)
Fósforo (P)	Manganeso (Mn)
Azufre (S)	Molibdeno (Mo)
Potasio (K)	Níquel (Ni)
Magnesio (Mg)	Selenio (Se)
Sodio (Na)	Tungsteno (W)
Calcio (Ca)	Vanadio (V)
Hierro (Fe)	Zinc (Zn)

Factores de crecimiento

 Se requieren en muy pocas cantidades y solo por algunas células (las que no pueden sintetizarlos).

Aminoácidos	Síntesis de proteínas
Purinas	Síntesis de ác. nucleicos
Pirimidinas	Síntesis de ác. nucleicos
Vitaminas	Producción de coenzimas
Biotina	Síntesis aminoácidos
Cobalamina	Síntesis de desoxiribosa
Riboflavina	Transporte de e-

En términos de la fuente de **Energía** y de **Carbono** para la formación de componentes celulares los organismos se clasifican en :

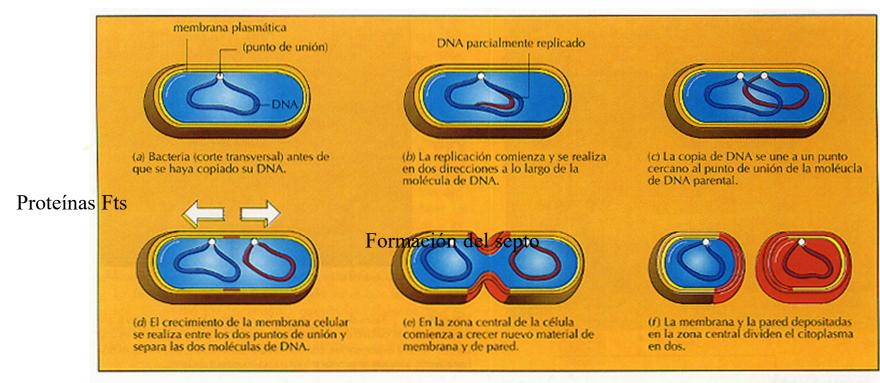


Tipos Nutricionales

Tipo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos
Fotoautótrofas	Luz	CO ₂	Algas y cianobacterias
Fotoheterótrofas	Luz	Compuestos orgánicos	Algas y bacterias fotosintéticas
Quimioautótrofas o quimiolitótrofas	Química inorgánica: H ₂ , NH ₃ , NO ₂ , H ₂ S	CO ₂	Pocas bacterias. Ej.: <i>Beggiatoa</i> (oxida H ₂ S)
Quimioheterótrofas o Heterótrofas	Química orgánica	Compuestos orgánicos: glucosa	La mayoría de las bacterias conocidas. Ej.: <i>E. coli</i> .

CRECIMIENTO BACTERIANO

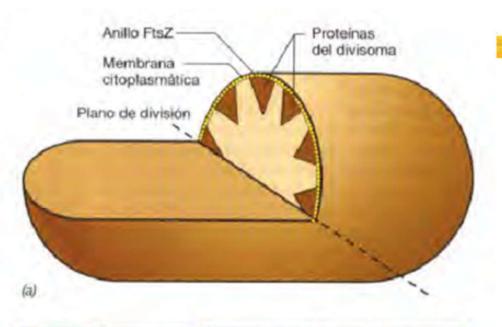
- Es importante conocer cómo se multiplican las bacterias, sus requisitos de crecimiento y su metabolismo para poder crecerlas, estudiarlas y usarlas.
- MULTIPLICACION: por fisión binaria transversal.
- Es un proceso asexual.

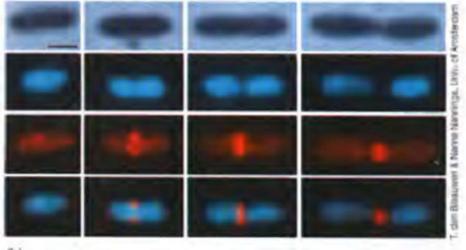


FISION BINARIA









Contraste de fase

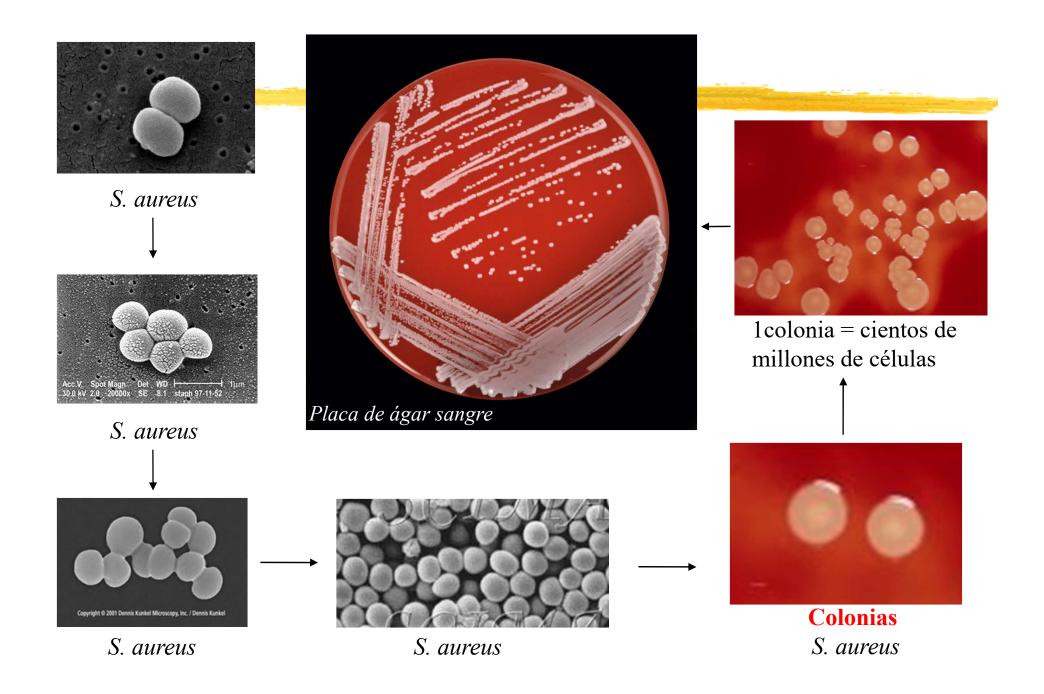
Tinción con DAPI

Tinción con anti-FtsZ

CURVA DE DESARROLLO BACTERIANO

- Las bacterias se multiplican por fisión binaria: 1, 2, 4, 8, 16, 32 ... = 2ⁿ. Crecimiento exponencial.
- Un cultivo bacteriano de *E. coli* se duplica cada 20 minutos. *E. coli* produciría en teoría 2¹⁴⁴ bacterias en 48hs.
- En condiciones ideales, se multiplican en forma logarítmica sólo durante 3 a 5 h., agotan sus nutrientes esenciales y acumulan productos tóxicos producto del metabolismo.

Crecimiento de una colonia: desde lo micro a lo macro



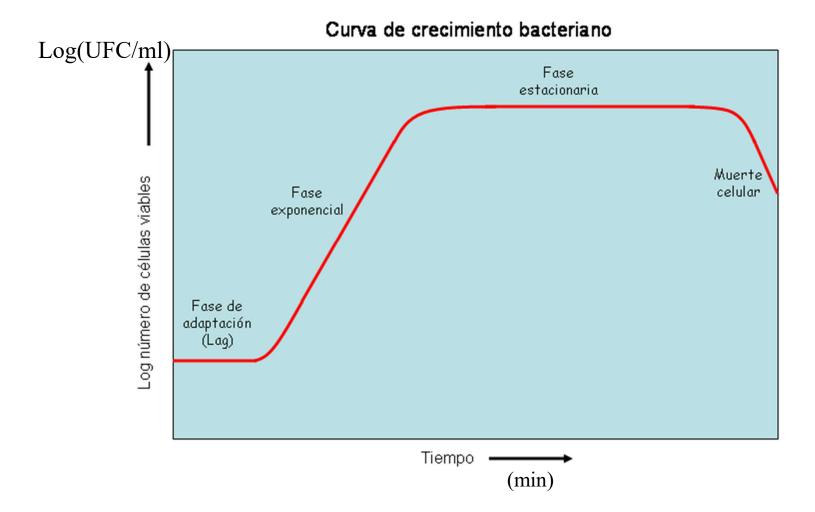
Crecimiento de poblaciones

- Es el aumento en el numero de celulas de una poblacion.
- Velocidad de crecimiento es el cambio en el numero de celulas o en la masa celular, experimentado por unidad de tiempo.
- Durante el ciclo de division celular, todos los componentes se duplican.

- Tiempo de generación: es el tiempo que se requiere para que la poblacion se duplique.
- Los tiempos de generacion varían ampliamente entre las diferentes especies, los nutrientes disponibles y las condiciones de la incubación (temperatura, oxígeno, presencia de desechos).
 - Ej.: 1 a 3 horas, 20 min, o varios días.

Curva de crecimiento bacteriano

Cultivo puro de bacterias en un medio líquido.



Fase 1: de adaptación, latencia o *lag*.

El crecimiento de la población no inicia inmediatamente, sino después de cierto periodo de tiempo, el cual puede ser breve o largo, dependiendo de varios factores.

Durante esta fase las células censan el medio, sintetizan macromoléculas y regulan su expresión génica.

Fase 2: de crecimiento exponencial o logarítmico

Es la consecuencia del hecho de que cada célula se divide en dos. Las bacterias se encuentran en un estado optimo.

Su velocidad esta influenciada por nutrientes, condiciones física del cultivo y acumulación de residuos metabólicos.

Fase 3: estacionaria

El medio de cultivo no se renueva, comienzan a acumularse metabolitos tóxicos, se modifica el pH, los nutrientes se agotan, la velocidad de multiplicación se retrasa y hay un equilibrio entre bacterias que nacen y bacterias que mueren.

Fase 4: Muerte

Cuando el cultivo continúa más allá de la fase estacionaria, se produce una inversión numérica con respecto a la fase exponencial.

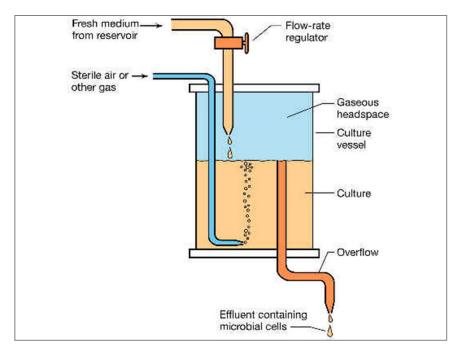
En este periodo son más las bacterias que mueren que las que nacen. Finalmente, todas mueren. El cultivo llega a su extinción.

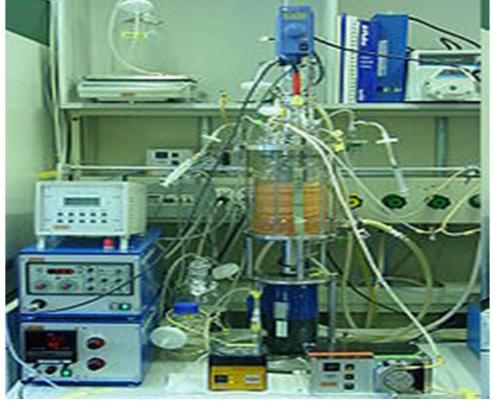
Si son bacterias con capacidad de esporular, se produce la esporulación en esta fase.

Cultivo continuo

El quimiostato es un aparato que se utiliza para obtener un cultivo continuo en **medio renovado**, permite mantener poblaciones de células en crecimiento exponencial por largos

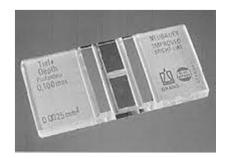
periodos de tiempo.

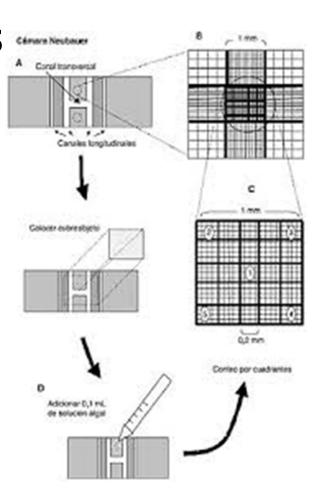




Medidas directas del crecimiento bacteriano

- 1. Recuento de células totales ----
 - Microscopía -





2. Recuento de celulas viables.

- Recuento de colonias -



UFC/ml

Medidas indirectas del crecimiento bacteriano

- Turbidez. Es un método muy rápido y útil de medir el crecimiento bacteriano.
 - fotómetro -
 - espectrofotómetro –

Ley de Beer-Lambert.
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Siendo ε el coeficiente de extinción molar, c la concentración y l la distancia de la celda o cubeta.



Condiciones que influyen: Temperatura

- La temperatura es un factor ambiental importante en el control de crecimiento microbiano.
- Los microorganismos pueden agruparse según los márgenes de temperatura que requieren.
- Se distinguen 4 grupos:
 - 1. Psicrofilos

2. Mesófilos

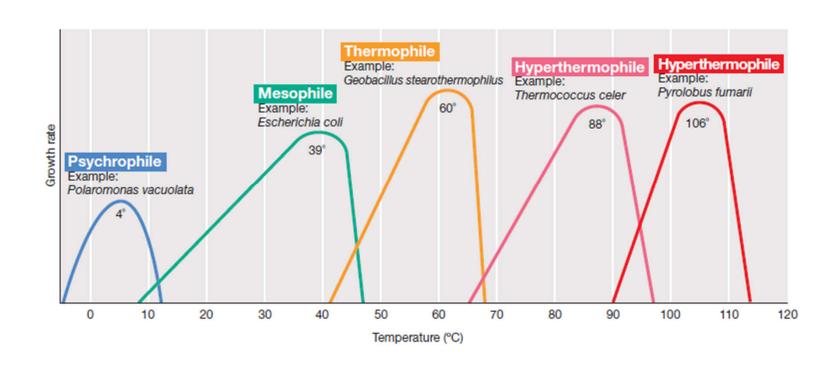
3. Termofilos

4. Hipertermofilos.

Clasificación según temperatura

Tipo	Rango de Temperatura	Temperatura Optima	M.O
Psicrófilo	0 - 20	15	Algas
Mesófilo	20 - 40	37	E. coli
Termófilo	40 - 70	60	Bacillus stearothermophillus
Hipertermófilos	90 - 115	106	Thermus acuaticus

Clasificación según temperatura



Condiciones que influyen: pH

 La acidez o alcalinidad de un medio tiene una gran importancia sobre el crecimiento microbiano. La mayoría crecen a un pH entre 6 y 8.

 El pH intracelular debe permanecer próximo a la neutralidad.

Condiciones que influyen: pH

Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH > 5.5 and <8)	7	Escherichia coli
Acidophile (pH < 5.5)	5	Rhodopila globiformis
	3	Acidithiobacillus ferrooxidans
	1	Picrophilus oshimae
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	Chloroflexus aurantiacus
	9	Bacillus firmus
	10	Natronobacterium gregoryi

Factores que influyen:

PO2 (presión de oxígeno)

Se clasifican en:

- **Aeróbicas:** se desarrollan en presencia de oxígeno atmosférico.
- •Anaerobias: no emplean oxígeno; anaerobias estrictas, atmósfera de oxígeno causan su muerte (hay anaerobios en la boca).
- Anaerobios facultativos: como *E. coli*, crecen en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.
- Microaerófilos: requieren baja presión de oxígeno.

Metabolismo

Catabolismo:

- ✓ Energía (ATP)
- ✓ Poder reductor (NADH)
- Precursores metabólicos (intermediarios)



Anabolismo:

biosíntesis (participan las enzimas)

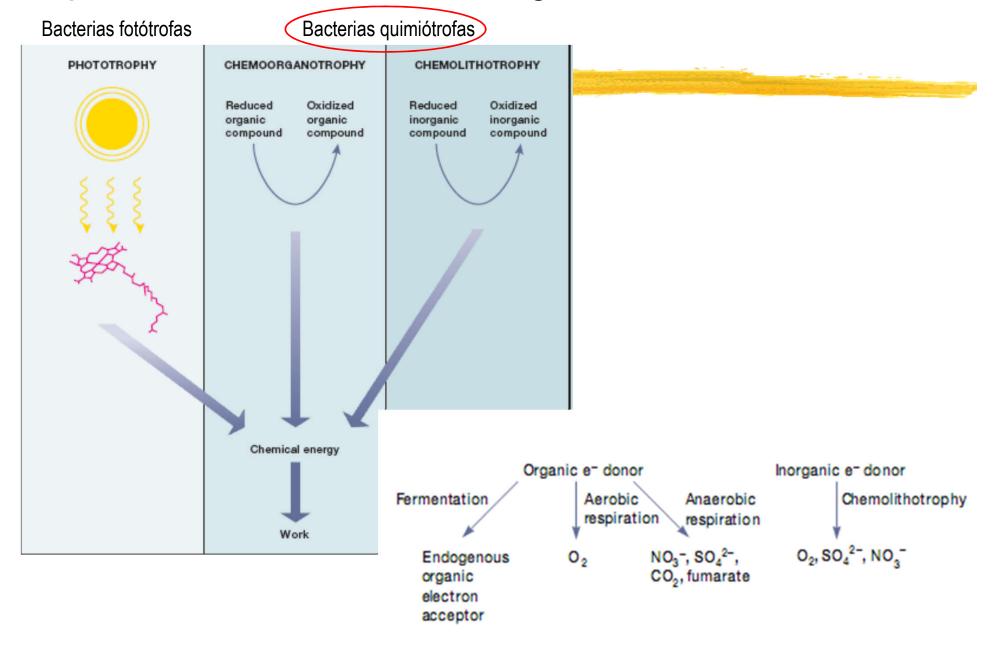
¿Cómo obtienen energía los quimiótrofos?

Mediante alguna de estas 3 posibilidades:

- > respiración aeróbica
- > respiración anaeróbica
- > fermentación

Difieren en la molécula/s que sirven como aceptor final de electrones.

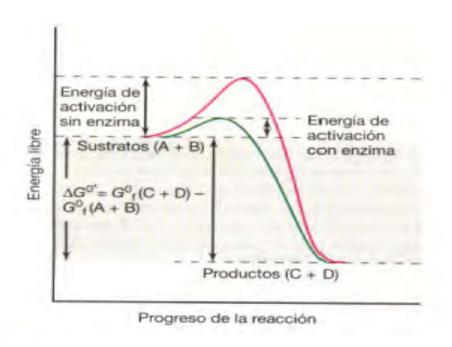
Tipos de metabolismos energéticos



Enzimas

- Catalizadores biológicos de naturaleza proteica.
- Su accionar es esencial en el metabolismo bacteriano.
- Actúan de manera especifica a través de un sitio activo, produciendo un efecto catalítico sobre las moléculas del sustrato, convirtiéndola en un producto especifico.
- Funcionan en forma secuencial: sistema multienzimático.

Enzimas



Curva roja en ausencia de enzima.

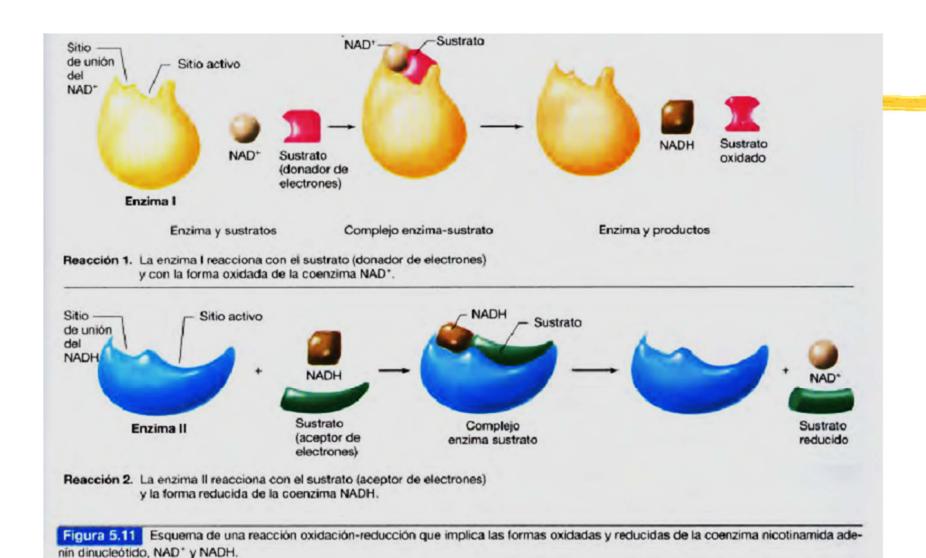
Curva verde en presencia de enzima.

$$\Delta G = G_{productos} \text{-} \ G_{reactivos}$$

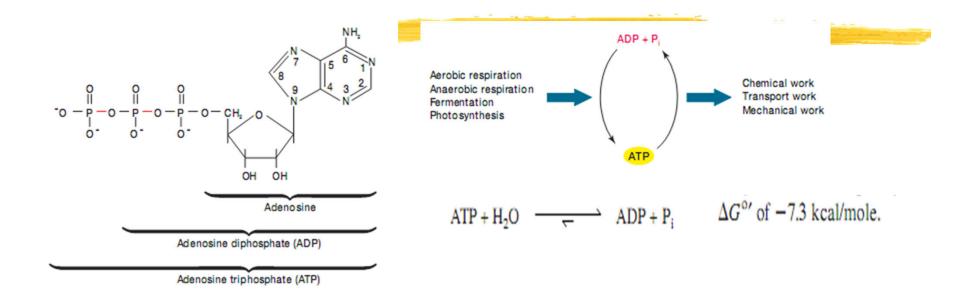
$$H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$$
 $\Delta G = -237 \text{ KJ}$ Sin embargo la reacción puede estar años sin ocurrir, ya que la velocidad es muy baja.

La **energía de activación** es la energía necesaria para que todos las moléculas estén en un estado reactivo.

Las enzimas disminuyen la energía de activación.



Producción de ATP



- ✓ Fosforilación a nivel de sustrato (fermentaciones)
- √ Fosforilación oxidativa (respiraciones con o sin oxígeno)
- √ Fotofosforilación (fotosíntesis)

Mecanismos de obtención ATP

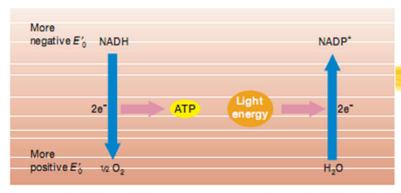
 Fosforilación a nivel de sustrato: el ATP se forma a partir de ADP por transferencia de un grupo fosfato de alta energía de un intermediario de una ruta catabólica.:

Acido 2 fosfoglicérico ----> Acido fosfoenolpirúvico + ADP ---> Acido pirúvico + ATP

 Fosforilación oxidativa (Transporte de electrones): el ATP se genera por transporte de electrones a través de una cadena de moléculas transportadoras. Cada miembro de la cadena es capaz de ser reducido por la molécula transportadora que le precede y oxidado por la que le sigue.

El aceptor final puede ser inorgánico: oxígeno o NO3; orgánicos: fumarato.

Redox y torre de electrones



Aerobic respiration

to an apoenzyme.

Oxygenic photosynthesis

Table 8.1 Selected Biologically Important Redox Couples

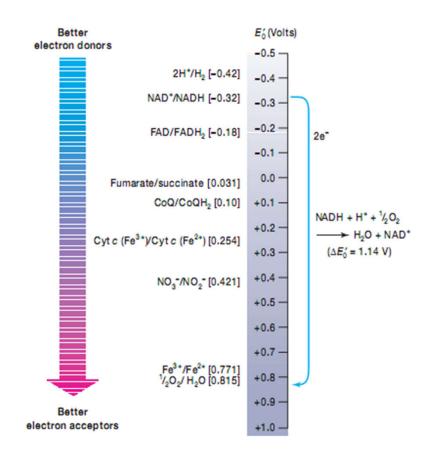
Redox Couple	E' ₀ (Volts) ^a
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	-0.42
$Ferredoxin(Fe^{3+}) + e^{-} \longrightarrow ferredoxin(Fe^{2+})$	-0.42
$NAD(P)^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NAD(P)H$	-0.32
$S + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S$	-0.274
Acetaldehyde $+ 2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ethanol	-0.197
Pyruvate ⁻ + $2H^*$ + $2e^ \longrightarrow$ lactate ²⁻	-0.185
$FAD + 2H^{+} + 2e^{-} \longrightarrow FADH_{2}$	-0.18 ^b
Oxaloacetate ²⁻ + $2H^+$ + $2e^ \longrightarrow$ malate ²⁻	-0.166
Fumarate ²⁻ + $2H^+$ + $2e^ \longrightarrow$ succinate ²⁻	0.031
Cytochrome b (Fe ³⁺) + e ⁻ \longrightarrow cytochrome b (Fe ²⁺)	0.075
Ubiquinone $+ 2H^+ + 2e^- \longrightarrow \text{ubiquinone } H_2$	0.10
Cytochrome c (Fe ³⁺) + e ⁻ \longrightarrow cytochrome c (Fe ²⁺)	0.254
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$	0.421
$NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \longrightarrow NH_4^+ + 2H_2O$	0.44
$Fe^{3+} + e^{-} \longrightarrow Fe^{2+}$	0.771
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$	0.815

b The value for FAD/FADH2 applies to the free cofactor because it can vary considerably when bound

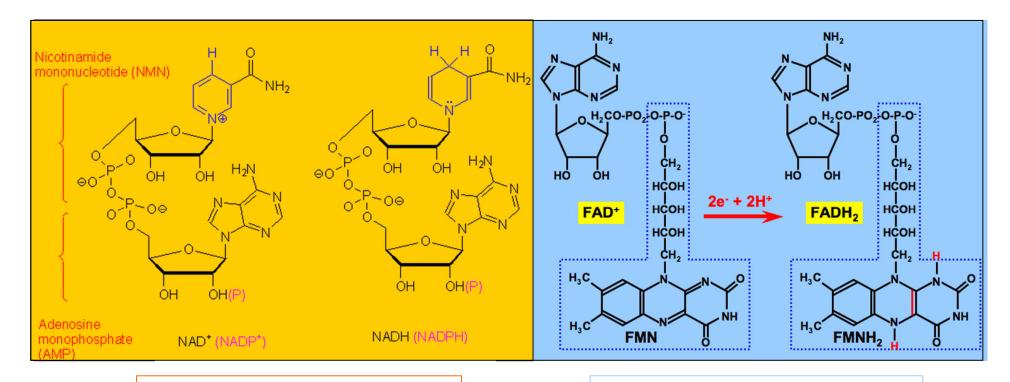
Reacciones redox exergónicas

$$\Delta G^{0}' = - \mathbf{n} \cdot \mathbf{F} \cdot \Delta E^{0}$$

△E⁰ es la diferencia entre los potenciales de reducción del donador y del aceptor



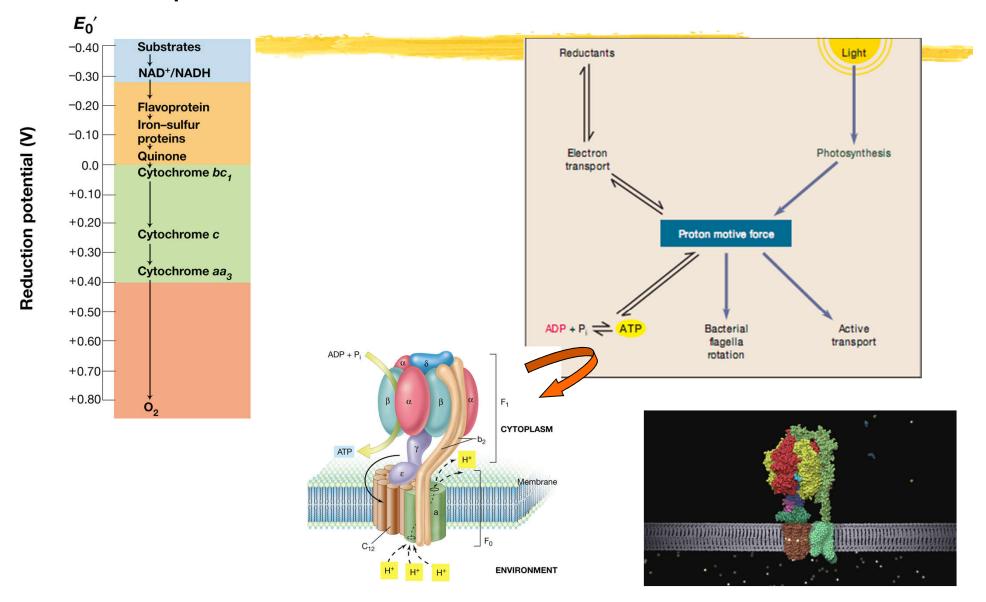
Transportadores de electrones



$$NAD^{+} + H^{+} + 2e^{-} \longrightarrow NADH$$

$$FAD + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow FADH_2$$

Cadenas de transportadores de electrones y fuerza protón motriz



QUIMIOLITOTROFÍA

- En los quimiolitotrofos, el donador de electrones es una molécula inorgánica reducida. Esta capacidad sólo ha evolucionado en ciertos grupos de procariotas.
- ✓ **Quimiolitotrofos "típicos":** son por lo general respiradores **aerobios**
- ✓ <u>Fijan CO₂ por el ciclo de Calvin</u>, disponen de reservas de RuBisCo (enzima)

Bacterias del hidrógeno (facultativas)	Oxidan el H ₂ hasta H ₂ O Alcalígenes eutrophus, Pseudomonas facilis, Aquaspirillum autotrophicum, etc Nitrobacter
del hierro	Oxidan ferroso (Fe ²⁺) a férrico (Fe ³⁺) Thiobacillus ferrooxidans
del azufre	Oxidan sulfuros (S ² -) y azufre elemental (S ⁰) a ácido sulfúrico (SO ₄ H ₂) Thiobacillus thiooxidans, Sulfolobus acidocaldarius
oxidadoras de amoniaco (nitrosas)	Oxidan amoníaco (NH ₃) para convertirlo en nitrito (NO ²⁻) Nitrosomonas
oxidadoras del nitrito (nítricas)	Oxidan NO ²⁻ para dar nitrato (NO ³⁻) Nitrobacter

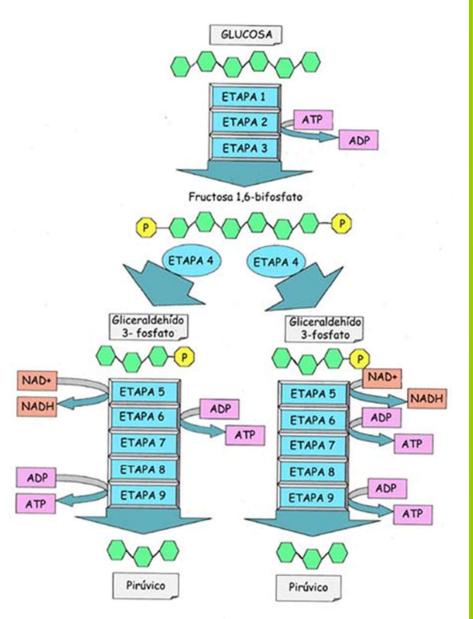
Bacterias anaeróbicas quimiolitotróficas

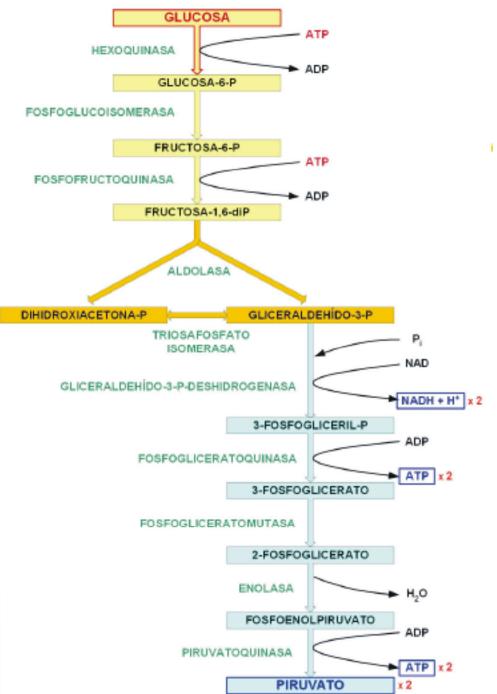
Dador inorgorgánico de e	Grupo	Especies
$H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4$	Respiradores de carbonatos, metanogénicas.	Methanobacterium thermoautotrophicum
H ₂ + CO ₂ → CH ₃ -COOH	Respiradores de carbonatos, acetogénicas.	Acetobacterium woodii
$H_2 + SO_4^{=} \rightarrow SH_2$	Respiradores de sulfatos, sulfurogénicas	Desulfovibrio desulfuricans, Desulfobacterium autotrophicum
$H_2 + S^0 \rightarrow SH_2$	Respiradores del azufre, sulfurogénicas	Desulfuromonas acetoxidans
$H_2 + NO_3^- \rightarrow N_2$	Respiradoras de nitratos, desnitrificación	Paracoccus denitrificans

¿Cómo obtienen energía los quimio<u>orga</u>nótrofos?

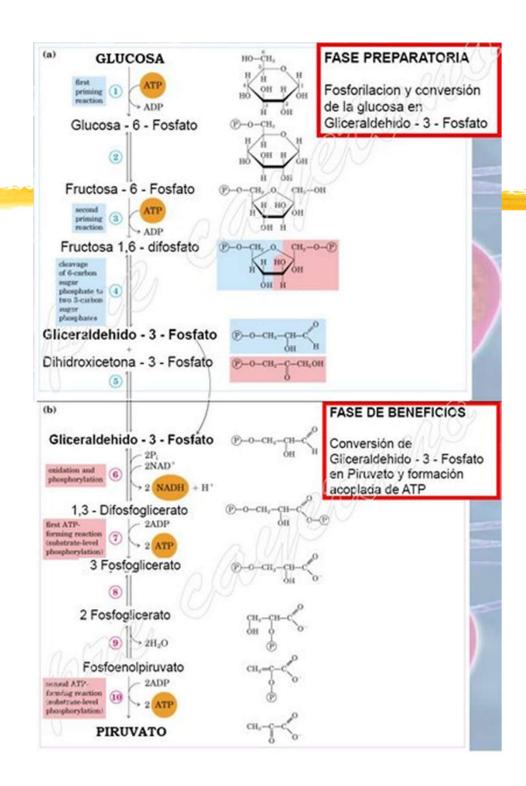
- Comenzando por la GLUCOLISIS, también denominada vía de Embden-Meyerhof, luego hará fermentación o respiración.
- Alternativamente, puede haber una vía de Entner-Duodoroff en reemplazo de Embden-Meyerhof.

GLUCOLISIS





GLUCOLISIS



GLUCOLISIS

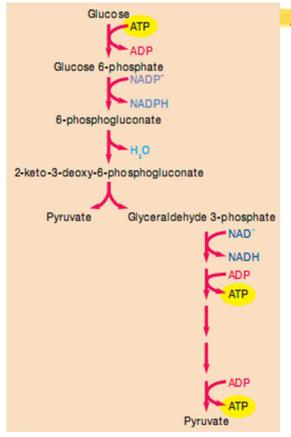
Reactions of glycolysis

Step	Reaction	Enzyme	Туре*	ΔG
1	Glucose + ATP → glucose 6-phosphate + ADP + H ⁺	Hexokinase	а	-4.0
2	Glucose 6-phosphate === fructose 6-phosphate	Phosphoglucose isomerase	C	+0.4
3	3 Fructose 6-phosphate + ATP → Phosphofructokinase fructose 1,6-diphosphate + ADP + H ⁺		а	-3.4
4	Fructose 1,6-diphosphate ==== dihydroxyacetone phosphate + glyceraldehyde 3-phosphate	Aldolase	е	+5.7
5	Dihydroxyacetone phosphate glyceraldehyde 3-phosphate	Triose phosphate isomerase	С	+1.8
6	Glyceraldehyde 3-phosphate $+ P_i + NAD^+ \Longrightarrow$ Glyceraldehyde 3-phosphoglycerate $+ NADH + H^+$ dehydrogena		f .*	+1.5
7	1,3-Diphosphoglycerate + ADP === 3-phosphoglycerate + ATP	Phosphoglycerate kinase	а	-4.5
8,	3-Phosphoglycerate ==== 2-phosphoglycerate	Phosphoglyceromutase	b	+1.1
9	2-Phosphoglycerate ⇒ phosphoenolpyruvate + H₂O	Enolase	d	+0.4
10	Phosphoenolpyruvate + ADP + H ⁺ → pyruvate + ATP	Pyruvate kinase	a	-7.5

*Reaction type: (a) Phosphoryl transfer (b) Phosphoryl shift (c) Isomerization

- (d) Dehydration
- (e) Aldol cleavage
- (f) Phosphorylation coupled to oxidation

Vía de Entner-Doudoroff



Pseudomonas, Rhizobium, Azotobacter, Agrobacterium, E. faecalis

La mayoría de las bacterias presentan vía glucolítica y vía de las pentosas. En algunas la vía glucolítica puede ser sustituida por la vía de ED (por ausencia de fosfofructokinasa).

FERMENTACION

Una fermentación es una reacción de oxidación parcial de un sustrato donde se obtiene ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

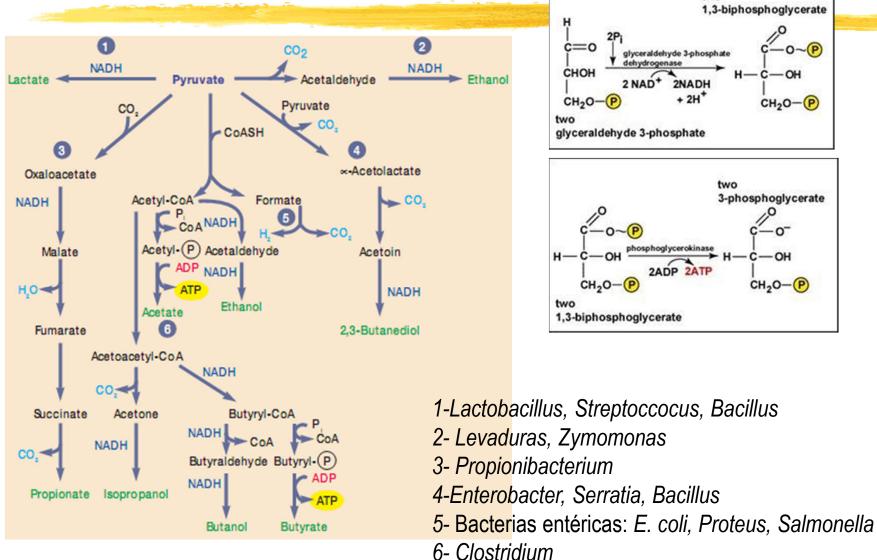
- •Ocurre en microorganismos facultativos y en algunos anaeróbicos que crecen en ausencia de oxígeno atmosférico.
- •Su característica es que un intermediario orgánico actúa como aceptor final de electrones para dar típicamente ácidos orgánicos y alcoholes.
- •Algunos anaerobios del género *Clostridium*, fermentan aminoácidos y producen sustancias como cadaverina y putrescina a manera de productos terminales, olor desagradable.

Fermentaciones

• Uso de piruvato o derivados como aceptores internos de e- para re-oxidar NADH.

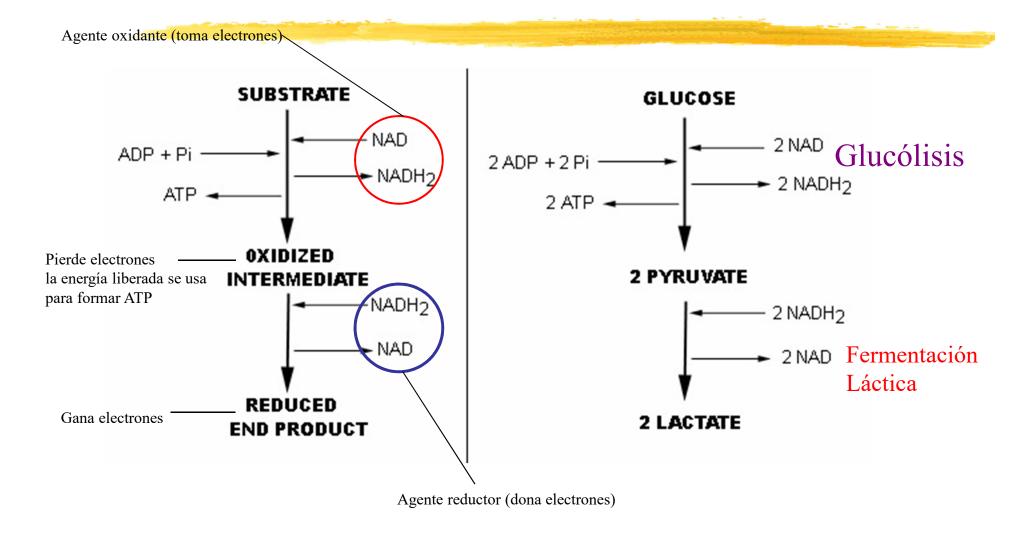
Proceso anaeróbico en el que el sustrato se oxida sólo parcialmente y se produce

fosforilación a nivel de sustrato.



Tipo de fermentación	Producto(s)
Fermentación láctica	Lactato
Fermentación alcohólica	etanol, CO ₂
Fermentación ácida-mixta	etanol, succinato, acetato, formiato, lactato, CO ₂ , H ₂
Fermentación butilénglicólica	butilénglicol, CO ₂
Fermentación aceto-butírica	acetato, acetona, butirato, butanol, etanol, CO ₂ , H ₂

Modelo de fermentación

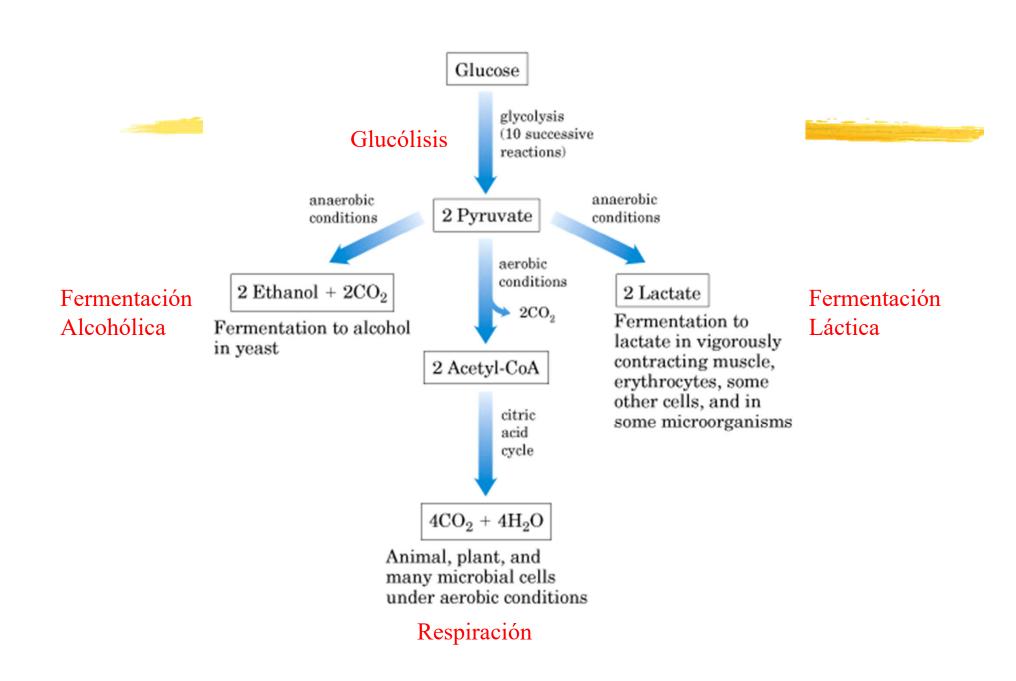


FERMENTACIÓN

 Oxidación parcial de un sustrato a un compuesto orgánico (etanol, lactato, acetato, etc)

- 2ATP
- +4ATP

+ 2 ATP de la fermentación de 1 Glucosa



RESPIRACIÓN

 Aerobia: el aceptor final de electrones de O₂ (se reduce y se forma H₂O)

 Anaerobia: el aceptor final de electrones no es O₂ (nitrato, sulfato)

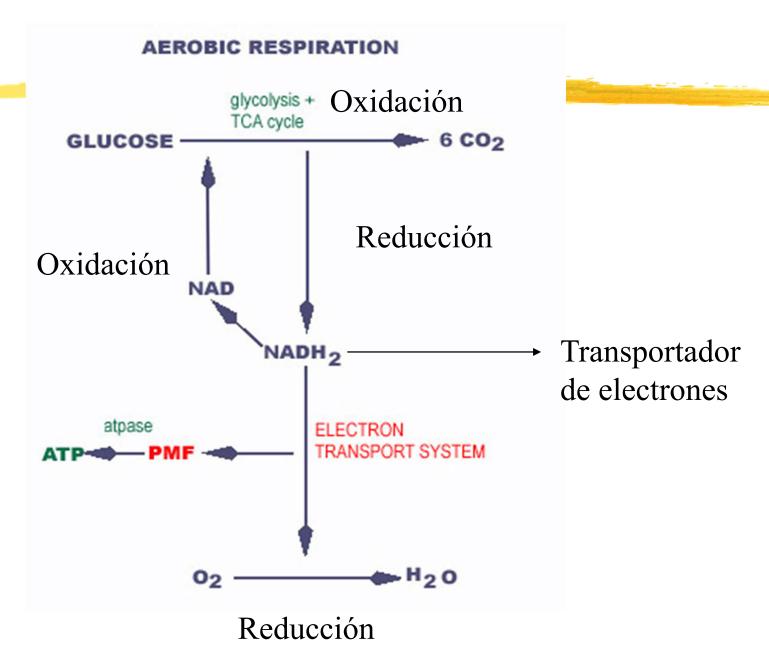
RESPIRACIÓN AERÓBICA

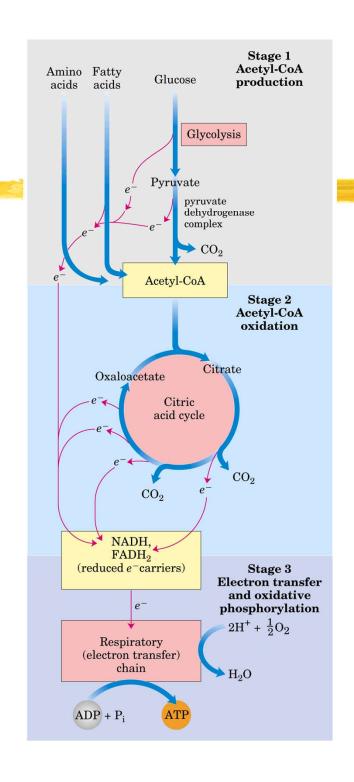
 Deben contar con los ciclos metabólicos para transformar estas sustancias en productos que puedan metabolizarse aún más mediante vías metabólicas centrales, como la vía de EMBDEN- MEYERHOF (glucólisis) o el CICLO DE ACIDO TRICARBOXÍLICO (ciclo llamado también CICLO DE KREBS o Ciclo del Ácido Cítrico).

RESPIRACION ANAEROBICA

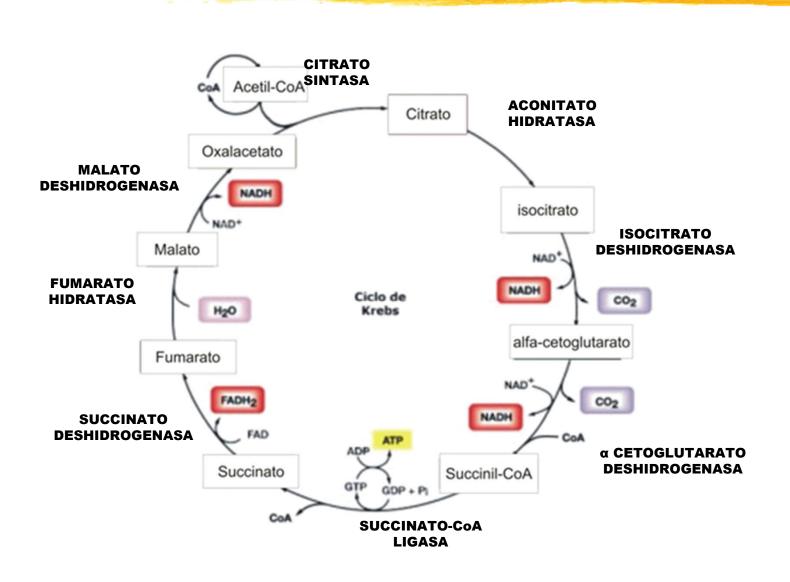
- Algunos anaeróbicos y anaerobios facultativos metabolizan los azúcares por vía anaeróbica a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs.
- Algunos microorganismos anaeróbicos y facultativos emplean nitratos como aceptores finales de electrones en condiciones anaeróbicas al transformarlos en nitritos.
- Se utiliza la prueba de REDUCCION DE NITRATOS, para determinar esta propiedad y así ayudar a la identificación de microorganismo.

RESPIRACIÓN AEROBIA





Ciclo de Krebs o ciclo del Acido Cítrico



RESPIRACIÓN AEROBIA

- Oxidación completa de 1 molécula de piruvato a 3 CO₂
- 4 NADH (12ATP)
- 1 FADH₂ (2ATP)
- 1 GTP (1ATP)

15 ATP x molécula de piruvato
 X2 piruvatos por glucosa

30 ATP por glucosa

8 ATP de la Glucólisis

38 ATP's por la oxidación total de una molécula de Glucosa

Volviendo al tema oxígeno...

Los microorganismos son muy variables en cuanto a la necesidad del oxígeno.

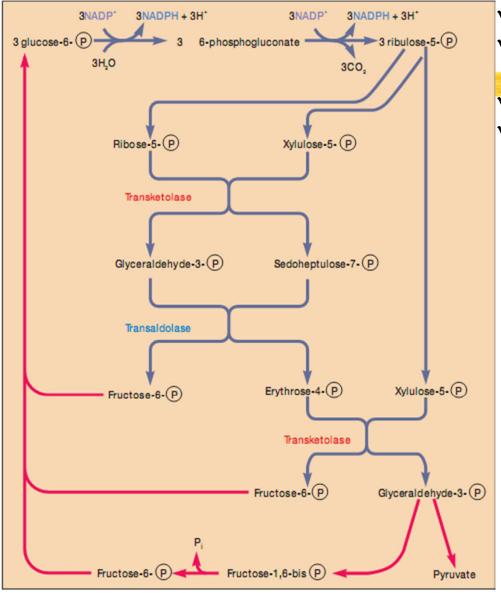
Se dividen dependiendo del efecto del oxígeno:

- 1. Aerobios estrictos: los que requieren oxigeno como aceptor terminal de electrones, no proliferan en ausencia de O_2 . ej. *Mycobacterium bovis*.
- 1. Microaerofilos: utilizan O₂ a niveles muy bajos. Un 12%. No proliferen en la superficie de un medio sólido. Ej. *Haemophillus suis*

Oxígeno

- 3. Anaerobios estrictos: las que no emplean oxígeno para su metabolismo, sino que obtienen su energía de reacciones fermentativas. Ej. Clostridium tetani
- 4. Anaerobios aerotolerantes: pueden vivir en presencia o ausencia de oxígeno, pero la energía la obtienen por fermentación. Ej. Bacterias acidolacticas.
- 5. <u>Anaerobios facultativos</u>: son bacterias que proliferan mediante procesos oxidativos, utilizando oxigeno como aceptor terminal de electrones, o en anaerobiosis, empleando reacciones de fermentación para obtener energía. Ej. *Streptococcus, E. coli*

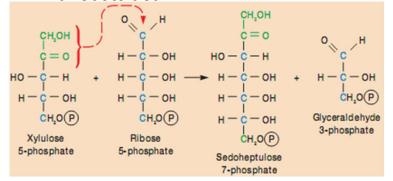
Vía de las pentosas



Funciones catabólicas y anabólicas:

- ✓ NADPH como dador de e en biosíntesis
- ✓ Eritrosa 4P para síntesis de aa aromáticos y vit B6
- ✓ Ribosa 5P componente de ácidos nucleicos
- ✓ Producción de ATP

Transcetolasa



Transaldolasa

