BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Francisco Castillo Rodríguez

María Dolores Roldán Ruiz
Rafael Blasco Plá
María José Huertas Romera
Francisco J. Caballero Domínguez
Conrado Moreno-Vivián
Manuel Martínez Luque-Romero

Tébar

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Francisco Castillo Rodríguez (Coordinador)

María Dolores Roldán Ruiz
Rafael Blasco Plá
María José Huertas Romera
Francisco Javier Caballero Domínguez
Conrado Moreno-Vivián
Manuel Martínez Luque-Romero

Tébar
Editorial Tébar

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Datos de catalogación bibliográfica:

Biotecnología Ambiental
Castillo Rodríguez, Francisco

EDITORIAL TÉBAR, S.L., Madrid, año 2005

ISBN digital: 978-84-7360-395-9
Materias: 577 Biología Molecular
579 Microbiología
504 Ciencias del Medio Ambiente

Formato: 165 × 240 mm Páginas: 616

Agradecemos la cesión de la fotografía de la portada de este libro a *ECOLOGISTAS EN ACCIÓN*

www.ecologistasenaccion.org

www.editorialtebar.com

Todos los derechos reservados.
Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra sin contar con la autorización expresa de Editorial Tébar. La infracción de estos derechos puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y siguientes del Código Penal).

Biotecnología Ambiental
© 2005 Editorial Tébar, S.L.
C/ de las Aguas, 4
28005 Madrid (España)

ISBN digital: 978-84-7360-395-9

Diseño editorial: Rebeca Irazábal
Diseño de portada: Omega Estudio Gráfico

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

A Francisco Castillo Ramírez, Maestro Nacional, que me impulsó al estudio de la Biología y me enseñó el respeto a todos los seres y cosas de la Naturaleza.

Francisco Castillo Rodríguez

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ÍNDICE

Prólogo 13

Capítulo 1. **Introducción a la Biotecnología Ambiental** 17

Glosario 18
1.1. Ecosfera 19
1.2. Paleocambios globales 20
1.3. Antroposfera 26
1.4. Biotecnología Ambiental 30
1.5. Los microorganismos en Biotecnología Ambiental 34
Bibliografía 37

Capítulo 2. **El origen de la vida en la tierra. Aparición y evolución del metabolismo** 39

Glosario 40
2.1. Introducción 41
2.2. Dónde apareció la vida 43
2.3. Cuándo apareció la vida 44
2.4. Cómo apareció la vida 46
2.5. Evolución del metabolismo 60
2.6. Porqué apareció la vida 63
Bibliografía 64

Capítulo 3. **Bioenergética microbiana** 65

Glosario 66
3.1. Conceptos bioenergéticos básicos 69
3.2. Las diversas formas de energía biológica 72
3.3. Fermentación 79
3.4. Conservación de la energía mediante generación de fuerzas motrices de iones 82
3.5. Respiración 88
3.6. Fotosíntesis 93
Bibliografía 100

Capítulo 4. **Ciclos biogeoquímicos I** 103

Glosario 104
4.1. Los compuestos carbonados y la biosfera 105
4.2. El ciclo del carbono en la naturaleza 106
4.3. Bioquímica del ciclo del carbono 107
Bibliografía 122

Capítulo 5. **Ciclos biogeoquímicos II** 123

Glosario 124

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.1. Oxidación de compuestos monocarbonados 125
5.2. Metanogénesis 128
5.3. Fijación del CO_2 140
5.4. El ciclo del carbono y el calentamiento global 146
Bibliografía 149

Capítulo 6. **Ciclos biogeoquímicos III** 151

Glosario 152
6.1. Introducción 155
6.2. Ciclos del nitrógeno, azufre, hierro y otros elementos 155
6.3. Lluvia ácida 243
6.4. Dinámica de la capa de ozono atmosférica 246
6.5. Biominería 249
Bibliografía 254

Capítulo 7. **Bases bioquímicas de la adaptación biológica** 257

Glosario 258
7.1. Introducción 259
7.2. Adaptación de las plantas al clima y al suelo 260
7.3. Interacciones entre plantas y animales 268
7.4. Interacciones entre plantas 283
7.5. Interacciones entre plantas y patógenos 284
7.6. Interacciones entre microorganismos 287
Bibliografía 291

Capítulo 8. **Tecnología enzimática** 293

Glosario 294
8.1. Introducción 297
8.2. Introducción a la cinética enzimática 298
8.3. Obtención y producción de enzimas 303
8.4. Inmovilización de enzimas 305
8.5. Aplicaciones de la tecnología enzimática 309
Bibliografía 319

Capítulo 9. **Técnicas básicas de biología molecular y manipulación del DNA** 321

Glosario 322
9.1. Introducción 325
9.2. La información genética y el genoma 327
9.3. Enzimas utilizadas en la manipulación del DNA 328
9.4. Fundamentos de la clonación del DNA 330
9.5. Técnicas de transferencia e hibridación de ácidos nucleicos 335
9.6. Técnicas de análisis transcripcional y de expresión de genes clonados 339
9.7. Amplificación del DNA y del RNA por PCR y RT-PCR 345
9.8. Mutagénesis dirigida o *in vitro* 347
9.9. Secuenciación del DNA y análisis de las secuencias 348
9.10. Genómica y proteómica 352
Bibliografía 357

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Capítulo 10. **Contaminación química y biológica** 359

Glosario 360
10.1. Introducción a la contaminación química y biológica 361
10.2. Residuos 361
10.3. Compuestos xenobióticos 363
10.4. Biodegradación 366
10.5. Biocorrosión y biodeterioro 370
10.6. Contaminación biológica 373
Bibliografía 378

Capítulo 11. **Bioquímica y biotecnología de microorganismos extremófilos** 379

Glosario 380
11.1. Interés de los extremófilos 381
11.2. Bases bioquímicas de las adaptaciones a medios extremos 381
11.3. Astrobiología 392
11.4. Biotecnología de extremófilos 393
Bibliografía 399

Capitulo 12. **Biodegradación de compuestos naturales I** 401

Glosario 402
12.1. Celulosa y ligninas 403
12.2. Biodegradación de cianuro, cianato y sus derivados, CO y metilaminas 408
12.3. Biotecnologías correctoras de la contaminación: biosensores y biorreactores ... 414
12.4. Plásticos biodegradables 419
Bibliografía 422

Capítulo 13. **Biodegradación de compuestos naturales II** 423

Glosario 424
13.1. Petróleo y derivados 425
13.2. Residuos procedentes de la producción de aceite de oliva 433
13.3. Tratamiento biológico de catástrofes naturales. Corrección *in situ* de vertidos de crudo 436
Bibliografía 446

Capítulo 14. **Biodegradación de compuestos naturales III** 447

Glosario 448
14.1. Introducción 449
14.2. Biodegradación aeróbica de compuestos aromáticos naturales. El plásmido TOL 452
14.3. Biotecnología del plásmido TOL 461
Bibliografía 466

Capítulo 15. **Biodegradación de compuestos xenobióticos I** 467

Glosario 468
15.1. Introducción 469
15.2. Biodegradación de dioxinas y dibenzofuranos 470

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

15.3. Biodegradación de los policlorobifenilos (PCB) 473
15.4. Las bacterias como ingenieros metabólicos: evolución natural de las rutas catabólicas 484
Bibliografía 485

Capítulo 16. **Biodegradación de compuestos xenobióticos II** 487

Glosario 488
16.1. Los compuestos nitroaromáticos 489
16.2. Transformaciones bioquímicas de los compuestos nitroaromáticos 490
16.3. Metabolismo del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) 497
16.4. Metabolismo de hidrocarburos nitroaromáticos policíclicos 500
16.5. Biotecnología de los compuestos nitroaromáticos 501
Bibliografía 505

Capítulo 17. **Biotransformación** 507

Glosario 508
17.1. Biodegradación en plantas y animales: biotransformación 509
17.2. Fase I: el sistema P450 510
17.3. Fase II: conjugasas 523
17.4. Biotransformación y carcinogénesis 524
17.5. Biotransformación en plantas. El concepto de hígado verde 525
17.6. Interferidores hormonales 527
Bibliografía 529

Capítulo 18. **Biotecnología agrícola** 531

Glosario 532
18.1. La biotecnología como estrategia preventiva 533
18.2. Control biológico de plagas y enfermedades de las plantas cultivadas 534
18.3. Fitorremediación de metales pesados, radionúclidos y contaminantes orgánicos 538
18.4. Abonos artificiales y fijación biológica del nitrógeno 546
18.5. Miseria y esplendor de las plantas transgénicas 553
Bibliografía 555

Capítulo 19. **Tratamiento de residuos** 557

Glosario 558
19.1. Emisión y transporte de contaminantes 559
19.2. Tratamiento de residuos urbanos (RU) 564
19.3. Tratamiento de aguas residuales 571
Bibliografía 575

Capítulo 20. **Legalidad y ética de la biotecnología ambiental** 577

Glosario 578
20.1. La comunidad internacional y el medio ambiente 579
20.2. La UE y la política ambiental 582
20.3. España y la política ambiental 586
20.4. Hacia un cambio de comportamiento 586
Bibliografía 591

Listado de palabras, términos y nombres por orden alfabético 595

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

PRÓLOGO

Este libro de Biotecnología Ambiental pretende ser un texto para alumnos y profesores de las materias "Biotecnología Ambiental", "Microbiología" y "Bioquímica Ambiental" y, en general, de las materias de las Ciencias Biológicas y Químicas relacionadas con el Medio Ambiente y que se imparten en las licenciaturas de Ciencias, Ciencias Ambientales, Biotecnología y Bioquímica en las universidades españolas. Sin embargo, la obra también trata de ser atractiva y útil para todos los profesionales dedicados al estudio o a la gestión medioambiental, ya sea desde un enfoque biológico, sanitario o puramente tecnológico. Por esta razón se incluyen contenidos tan heterogéneos como el origen de la vida en la Tierra, la gestión de residuos tóxicos o el tratamiento de episodios concretos de contaminación ambiental.

Un libro de texto para estudiantes y profesores universitarios no debe ser sólo un compendio de datos y técnicas utilizables en este caso para la gestión medioambiental. Por esta razón se incluyen hasta 9 capítulos en un bloque introductor que pretende iniciar al lector en los conocimientos básicos que debe poseer un biotecnólogo ambiental. El capítulo 1 podría parecer superfluo para un técnico, pero la concepción orteguiana de la universidad aún no ha fenecido por fortuna y es opinión de los autores apoyar la formación integral de los profesionales universitarios incluyendo aspectos de Historia de las Ciencias, de la que los científicos tienen mucho que aprender a la hora de establecer hipótesis y diseñar proyectos de investigación. El capítulo 2 abunda en la profundización de los aspectos básicos de las Ciencias Ambientales y por eso describe la evolución del escenario donde los seres vivos juegan de forma armónica su papel y al que la irrupción humana amenaza con desequilibrar de forma tal vez irreversible: Es necesario conocer el pasado para tratar de construir un futuro en el que se intente alcanzar un equilibrio dinámico razonable entre el hombre y la naturaleza.

Los Capítulos 3 al 7 pretenden sentar las bases teóricas para la comprensión del funcionamiento bioquímico de los seres vivos, de las interacciones entre los componentes químicos de la biosfera y de las bases moleculares de la adaptación biológica.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Dado que son las bacterias y las plantas los actores principales de los grandes ciclos biogeoquímicos, se hace un énfasis especial en el metabolismo bacteriano y vegetal, aunque no se olvidan las interacciones entre los microorganismos, las plantas y los animales, que, al ser intervenidos por el hombre, son la base de no pocos problemas medioambientales que padecemos en la actualidad.

Los capítulos 8 y 9 cierran el bloque introductor describiendo las técnicas más usuales en la manipulación de proteínas y genes, base de la moderna biotecnología y que naturalmente son una de las herramientas claves en la biotecnología ambiental.

El segundo bloque del programa incluye ya aspectos concretos de los desequilibrios ambientales y su posible tratamiento biológico. Dado que uno de los más importantes desequilibrios afecta a la dispersión de sustancias químicas antropogénicas (compuestos xenobióticos), parece razonable asignar el grueso del texto a la descripción de tales desequilibrios, de su repercusión en microorganismos, plantas y animales y de las tecnologías aplicables para su corrección.

El capítulo 10 introduce el problema de la contaminación química y sus repercusiones sobre la Biosfera, que responde desencadenando procesos biodegradadores de los agentes químicos contaminantes. El capítulo 11 describe cómo un grupo muy heterogéneo de microorganismos está adaptado a las condiciones adversas de medios muy extremos, por lo que su estudio parece interesante para seguir profundizando en las bases bioquímicas de la adaptación y para diseñar biotecnologías que utilicen herramientas moleculares extraídas o copiadas de los extremófilos.

La biodegradación es un mecanismo de respuesta de los seres vivos ante la presencia de sustancias químicas potencialmente tóxicas o tóxicas *per se*, ya sean naturales o artificiales. Los capítulos 12 al 17 tratan del metabolismo biodegradador de compuestos naturales e industriales y de las biotecnologías correctoras que se derivan del conocimiento a nivel molecular (enzimático y genético) de las rutas catabólicas implicadas. Por su importancia económica y sus repercusiones sanitarias se hace mención especial a la contaminación por tóxicos naturales pero cuya producción está altamente incrementada por actividades industriales y por hidrocarburos derivados del petróleo, causantes de numerosas catástrofes ecológicas suficientemente conocidas.

Una parte muy importante del texto se dedica a la biodegradación de compuestos xenobióticos, sobre todo por parte de las bacterias, y concretamente a los derivados aromáticos clorados y nitrados, los más abundantes y persistentes en el medio ambiente. Los capítulos correspondientes incluyen también el diseño de biotecnologías correctoras y tratamientos preventivos.

La parte correspondiente a la biodegradación concluye con el capítulo 17, que trata de las repercusiones tóxicas de los compuestos xenobióticos en las plantas y los animales, así como al papel que juegan los citocromos P450 en la biotransformación y eliminación de toda clase de compuestos químicos, tanto de origen biológico como industrial.

Como colofón, se incluyen tres capítulos que tratan de estrategias preventivas de la contaminación ambiental, tratamiento de residuos y aspectos bioéticos y legales. El

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

capítulo 18 versa sobre biotecnología agrícola aplicada al control de plagas, limpieza de suelos afectados por contaminantes metálicos o radioactivos y alternativas al uso de abonos artificiales, las tres fuentes más importantes de contaminación del medio natural. No podía faltar una mención al tratamiento de aguas y residuos, que se recoge en el capítulo 19, y, por último, el capítulo 20 recapitula sobre la legislación ambiental vigente y sus perspectivas futuras y una reflexión sobre la utilización de organismos modificados genéticamente como instrumentos clave de la biotecnología ambiental.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Glosario
1.1. Ecosfera
1.2. Paleocambios globales
1.2.1. Ciclos de Milankovitch
1.2.2. Fraccionamiento isotópico
1.2.3. Historia del clima
Historia del oxígeno atmosférico
Transición Precámbrico-Cámbrico
Transición Paleoceno-Eoceno
1.3. Antroposfera
1.3.1. Situación ambiental actual de la Tierra
1.3.2. Desarrollo sostenible
1.4. Biotecnología Ambiental
1.5. Los microorganismos en Biotecnología Ambiental
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Antroposfera. Ecosistema formado por la humanidad y el medio ambiente.
Biodiversidad. Diversidad biológica a todos los niveles. Cuando se habla de diversidad (biológica) se refiere al nivel de especies.
Biomasa. Materia de origen biológico.
Biosfera. Biocenosis a escala planetaria.
Biotopo. Componente abiótico del ecosistema.
Biotecnología. Uso de organismos para obtener bienes y servicios.
Biotecnología ambiental. Aplicación de la biotecnología a la resolución o remediación de los problemas ambientales.
Capacidad de contaminación. Relación entre la energía consumida y la superficie terrestre ocupada.
Ciclos biogeoquímicos. Transformaciones de la materia entre los subsistemas terrestres debidas a los procesos biológicos y geológicos.
Ciclos de Milankovitch. Condiciones climáticas periódicas debidas a causas astronómicas.
Cinta transportadora oceánica. Modelo global de la circulación oceánica.
Circulación de materia. Transporte cíclico de la materia en virtud de la naturaleza cerrada (impermeable a la materia) del planeta.
Comunidad. Componente biótico del ecosistema.
Conservación. Gestión de la sucesión-regresión de los ecosistemas.
Contaminación (polución). Desequilibrio en la circulación de materia.
Economía ecológica. Política que prima la sensibilidad ambiental y grava su desconsideración.
Ecosfera. Ecosistema a escala planetaria.
Ecosistema. Nivel de organización biológica que integra biotopo y comunidad.
Educación ambiental. Política que antepone la educación como procedimiento para remediar los problemas ambientales.
ENSO. Modelo global de circulación atmosférica.
Explotación. Externalización de la productividad de un ecosistema.
Flujo de energía. Transporte unidireccional de la energía en virtud de la naturaleza abierta (permeable a la energía) del planeta. Equivalente a productividad bruta.
Hipótesis Gaia. Teoría que defiende que la evolución biológica es una coevolución entre biotopo y comunidad. Vida y sustrato se condicionan mutuamente.
Impacto ambiental. Perturbación brusca y asimétrica provocada por la antroposfera en los ecosistemas.
Medio ambiente. Biotopo donde vive la humanidad. Además de los factores físico-químicos incluye los culturales.
Nivel trófico. Componente de la red alimenticia.
Paleocambio. Cambio ambiental antiguo registrado en los testigos de sondeo.
Primavera silenciosa (R. L. Carson, 1962). Libro de amplia repercusión donde se denuncian las repercusiones ambientales del desarollo desbocado.
Productividad. Biomasa producida en un ecosistema por unidad de tiempo.
Relación isotópica. Medida de la distribución de los isótopos en una muestra.
Regresión. Involución del ecosistema.
Renovación. Materia que permanece en un depósito por unidad de tiempo. Es equivalente a la productividad neta.
Retroalimentación (***feed-back***). Repercusión de la salida en la entrada en los sistemas de control.
Sucesión. Evolución del ecosistema.
Testigo de sondeo. Muestra extraída de un depósito geológico.
Tiempo de renovación. Inverso de la renovación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

1.1. Ecosfera

Un ecosistema es una unidad básica de la Naturaleza definida por A. G. Tansley (1935) como "un conjunto formado por poblaciones de organismos y el complejo de factores físicos que constituyen su ambiente". La matriz o sustrato abiótico donde viven y se desarrollan los organismos se llama biotopo y el colectivo de especies se denomina comunidad. Factores ambientales o ecológicos son todos los elementos del ecosistema susceptibles de actuar sobre alguna fase del desarrollo de los organismos. Pueden ser directos e indirectos, abióticos y bióticos y se caracterizan por su predicibilidad, intensidad y variabilidad. Entre organismos y factores ecológicos se establecen interacciones energéticas no lineales (acciones, reacciones y coacciones) mediante sutiles y múltiples circuitos de retroalimentación (negativa y positiva) que complican extraordinariamente su dinámica. En los ecosistemas se acoplan un flujo de energía con una circulación de materia. La energía luminosa convierte los minerales oxidados en biomoléculas reducidas (biomasa), que se mueven por los diferentes niveles tróficos hasta reciclarse a minerales. El calor generado abandona el sistema para siempre (Fig. 1.1.A).

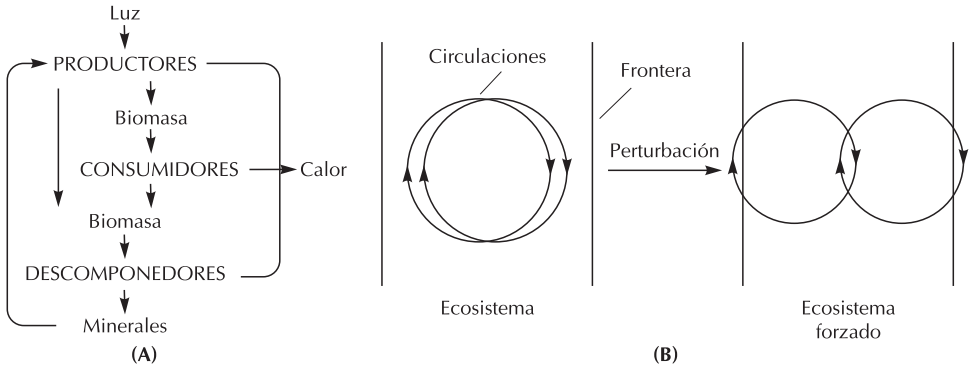


Figura 1.1. Modelo de red trófica (A). Respuesta del ecosistema al forzamiento (B).

Los ecosistemas son las estructuras biológicas de mayor nivel de integración y aunque su tamaño y complejidad varían mucho, presentan propiedades extensivas e intensivas genuinas tales como biomasa, productividad, tiempo de renovación, diversidad y estabilidad (conservación, sucesión, regresión, extinción). Si un ecosistema se fuerza (Fig. 1.1.B), desarrolla un tensión (R. Margalef, 1992) que se traduce en:

a) una disminución del tiempo de renovación (aceleración de la circulación) y/o

b) una deposición o inmovilización de materia en la frontera.

Ambos efectos son tanto más acentuados cuanto mayores sean los gradientes de densidad ρ y velocidad de transporte $\mathbf{v}$ (en cumplimiento de la ecuación de continuidad):

$$\nabla (\rho \mathbf{v}) = -\frac{\partial \rho}{\partial t} \tag{1.1}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los dos tipos de forzamientos más comunes son la explotación y la contaminación y ambos conducen a una regresión (retroceso de la sucesión). El conjunto de ecosistemas de la Tierra constituye la Ecosfera. La biocenosis a escala planetaria se llama Biosfera (B), vocablo introducido por E. Suess (1875) y desarrollado por V. Vernadsky (1919). Puede considerarse una delgada cáscara que ocupa la interfase de la atmósfera (A), hidrosfera (H) y geosfera (G), cuyo conjunto constituye el biotopo planetario. La Ecosfera es un sistema prácticamente cerrado (Fig. 1.2.A) y la circulación está organizada en torno al eje definido por la gravedad y la luz (Fig. 1.2.B).

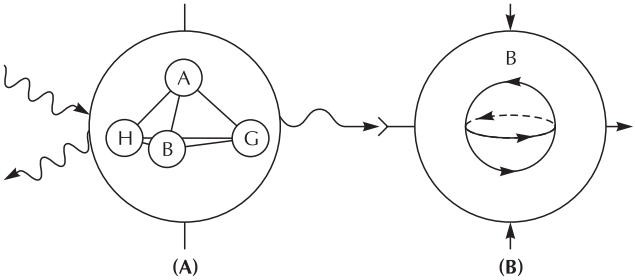


Figura 1.2. Organización fundamental de la Tierra (A) y Ecosfera (B).

Al distribuirse la irradiancia solar ($0{,}4 \times 10^{27}$ W) sobre una esfera de radio igual a la órbita terrestre, esto es, sobre una superficie de $0{,}28 \times 10^{24}$ m^2, se obtiene la "constante solar": $1{,}43 \times 10^3$ J s^{-1}m^{-2} (= $5{,}48 \times 10^{24}$ J año^{-1} = $1{,}78 \times 10^{17}$ W), repartiéndose desigualmente entre el ecuador (300 W m^{-2}año^{-1}) y los polos (80 W m^{-2}año^{-1}). Más del 99% de este flujo se transfiere entre la atmósfera y la superficie (calor sensible, calentamiento/enfriamiento conductivo del sustrato y calor latente de evaporación) y genera el gradiente de temperatura polo/ecuador que determina el transporte meridional de calor responsable del clima a gran escala y de los fenómenos geológicos externos. Menos del 1% es convertido en energía metabólica que impulsa los fenómenos biológicos. Equivale a unos 10^{37} bit s^{-1} y se cree que no ha variado significativamente durante los últimos 10^9 años. Si t es el tiempo que permanece la energía ε en la Biosfera, el flujo energético es:

$$J_E = \frac{\varepsilon}{t} \tag{1.2}$$

y concuerda con el valor de la productividad bruta. H. Morowitz (1968) ha calculado que la reconstrucción de la biomasa de *E. coli* a partir de una mezcla atómicamente equivalente es 0,27 eV átomo^{-1} y es del mismo orden del valor del flujo de energía que mantiene la Biosfera.

1.2. Paleocambios globales

La historia de la Biosfera está jalonada de cambios climáticos seculares, propiciados por acontecimientos periódicos y erráticos de índole astronómica, geológica y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

biológica. D. Jablonski (1993) ha indicado que uno de los patrones más característicos de la Biosfera es la alternancia de regímenes de fondo y de catástrofes con los altibajos bióticos correspondientes. Tales cambios han quedado registrados en los depósitos estratigráficos.

1.2.1. Ciclos de Milankovitch

El análisis de los testigos de hielo de Groenlandia y la Antártida y de las varvas del lago Baykal ha confirmado la existencia de ciclos climáticos debidos a que la radiación recibida por la Tierra depende de la longitud orbital y de la inclinación y precesión del eje de rotación.

La posición de la Tierra respecto al Sol sería la misma (y también la insolación) si éste ocupara el centro geomético de la órbira terrestre y la inclinación del eje de rotación fuera constante. L. Agassiz (1847) fue el primer geólogo que descubrió la existencia de glaciaciones y J. Croll 1875) sugirió que estaban causadas por cambios en la irradiancia solar debidas a ciclos astronómicos:

a) Ciclo orbital (100.000 años). La órbita terrestre pasa de ser casi circular a elíptica de pequeña excentricidad, variando la distancia Tierra-Sol unos 18,27 millones de kilómetros.
b) Ciclo de inclinación (41.000 años). El ángulo que forma el eje de rotación terrestre con el plano de la eclíptica varía de 21º 30′ a 24º 30′.
c) Ciclo de precesión (22.000 años). El eje de rotación terrestre describe una circunferencia que hace que apunte a distintas estrellas durante el transcurso del tiempo (actualmente lo hace a *Polaris*).

M. Milankovitch (1930) perfeccionó la teoría astronómica y sugirió que la variación de la irradiancia a 60º N es la causa impulsora del avance y retroceso de los mantos de hielo europeos y norteamericanos defendida por Agassiz. Las mediciones de las relaciones isotópicas realizadas con ^{1}H, ^{2}H, ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{16}O y ^{18}O en testigos de sondeo de muchas localidades y épocas han puesto de manifiesto que la temperatura y las concentraciones de CO_2 y O_2 han variado ampliamente a lo largo de los periodos geológicos. Así, aprovechando la circunstancia de que la composición isotópica (ver más adelante) de los caparazones de los foraminíferos depende de la temperatura del agua en que viven, J. Imbrie *et al.* (1976) han obtenido un termómetro geológico del último medio Ma que está de acuerdo con los ciclos de Milankovitch (Fig. 1.3.A).

Se desconoce la forma en que las sutiles variaciones de irradiancia se amplifican para producir los cambios espectaculares de clima y tampoco se sabe la causa de que las edades glaciares ocurran simultáneamente en ambos hemisferios pese a que dichas variaciones tengan efectos opuestos en el norte y en el sur. W. Broecker (1987) ha indicado que la cinta transportadora oceánica amplifica las débiles variaciones de temperatura y precipitación que se dan cerca de Groenlandia. Según D. P. Schrach (2000), una de las razones de centrarse en el Atlántico Norte es que la mayoría de los registros mejor datados proceden de esta parte y que el problema no se resolverá has-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

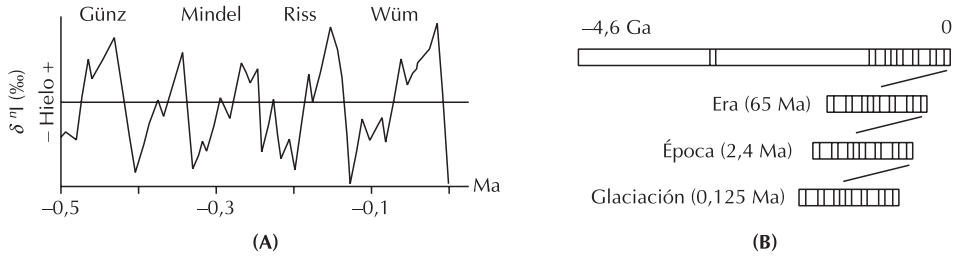


Figura 1.3. Registro de las paleotemperaturas en los últimos 0,5 Ma por medición de $\delta^{18}O$ (A). Eras, épocas y edades glaciales o glaciaciones (B).

ta que se haga lo propio con los registros del Pacífico tropical y se resuelvan los pautas climáticas de la Antártida.

En la historia terrestre hay documentadas siete eras glaciares (Fig. 1.3.B). Son periodos de 50-65 Ma en los que la temperatura media anual terrestre ha tenido un valor generalizado inferior a lo normal. La última era duró unos 65 Ma y tuvo seis épocas glaciares de varios Ma. La más cercana se llama Época Glaciar Pleistocena, duró 2,4 Ma y estuvo formada por varias edades glaciales o glaciaciones, de unos 100.000 años de duración, separadas por interglaciares de unos 10.000 años. Desde el punto de vista de las formaciones geológicas continentales se han descrito las glaciaciones alpinas Günz, Mindel, Riss y Würm, que jalonan la evolución humana (de *H. habilis* a *H. sapiens sapiens*). En el interglaciar Holoceno hubo tres periodos de frío, el último de los cuales se llama Pequeña Edad de Hielo (ss. XV-XIX), al que siguió un periodo más cálido que concluyó en 1960. Actualmente debiera haber un periodo de enfriamiento, pero el efecto invernadero antropógeno está actuando en contra.

1.2.2. Fraccionamiento isotópico

Los elementos químicos consisten en una mezcla de isótopos radiactivos y/o estables de distintas masas atómicas que pueden identificarse por radiometría y espectrometría de masas.

a) Los fenómenos biológicos seleccionan los isótopos de menor masa (fraccionamiento cinético) y provocan un desequilibrio característico en la distribución ($\delta\ ^{n}I$) de la mezcla que puede cuantificarse por la expresión:

$$\delta\ ^{n}I\,(‰) = \frac{\left[\left(\frac{^{n}I}{^{n-1}I}\right)_x - \left(\frac{^{n}I}{^{n-1}I}\right)_s\right]}{\left(\frac{^{n}I}{^{n-1}I}\right)_s} \qquad (1.3)$$

donde n es la masa atómica del isótopo y x y s se refieren a la relación del mismo en el problema y el patrón.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) Los fenómenos geológicos también producen diferentes fraccionamientos isotópicos. Unos dependen de la masa (las moléculas $H_2{}^{18}O$ se congelan más fácilmente que las $H_2{}^{16}O$ y el oxígeno respirable queda enriquecido en $^{16}O_2$, con lo que los caparazones de los foraminíferos que hayan vivido en periodos fríos tendrán mayor proporción de este isótopo) y otros no (pero se conoce que están promovidos por la luz UV). El punto interesante es que dejan en las rocas una firma diferente a la de los procesos biológicos.

1.2.3. Historia del clima

Para R. T. Pierrehumbert (2002), el clima es un *pas de deux* entre el dióxido de carbono y el agua. El estado de la atmósfera es función de la radiación solar (ciclos de Milankovich) y de los procesos de la Geosfera (ciclo carbonato/silicato) y la Biosfera (ciclo fotosíntesis/respiración). Los primeros son de naturaleza astronómica y, hasta ahora, intocables por el ser humano, pero la potente tecnología actual ha empezado a introducir palos entre los sutiles engranajes de los ciclos biogeoquímicos globales (Fig. 1.4). El análisis de las burbujas de aire atrapadas en el testigo de Vostok (una columna de hielo antártico de 2.200 m que abarca un periodo de tiempo de más de 160 Ma) ha revelado el estrecho paralelismo que hay entre la temperatura y la concentración de CO_2 de la atmósfera. Una diferencia de 10 ºC en la temperatura media mundial y un cambio en el CO_2 de 100 ppm condicionan la existencia de periodos glaciares e interglaciares con el consiguiente retroceso (extinciones) y desarrollo (bioexplosiones) de especies.

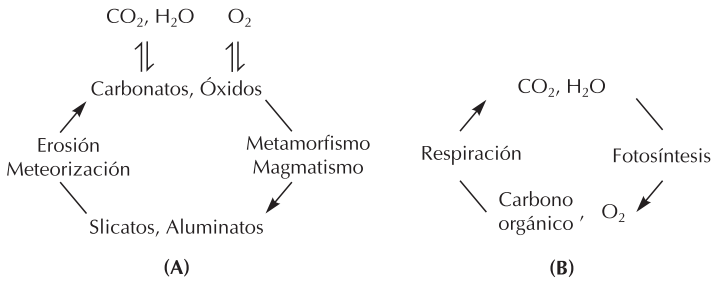


Figura 1.4. Ciclos carbonato/silicato (A) y fotosíntesis/respiración (B).

La hipótesis Gaia (J. Loveloeck, 1979) propone que vida y ambiente están tan estrechamente acoplados que la evolución concierne a ambos. Los parámetros geofisiológicos, como temperatura, estado rédox, pH, etc., se mantienen constantes a corto plazo gracias a *feed-backs* establecidos entre ambiente y biota y cambian en sincronía con las necesidades de ésta (Fig. 1.5).

Historia del oxígeno atmosférico

Los indicios paleobiológicos indican que hace unos 3,5 Ga las cianobacterias ya se habían establecido en la Tierra pero hay muchas pruebas geoquímicas en favor de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

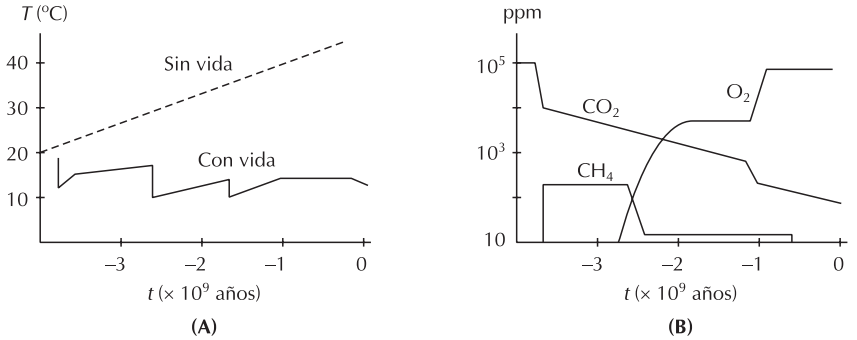


Figura 1.5. Probables temperaturas (A) y concentraciones gaseosas (B) terrestres (J. Loveloeck, 1988).

la idea de que hasta hace unos 2,5 Ga el oxígeno era un elemento muy escaso en la atmósfera (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Indicios de la escasez de O_2 en la atmósfera entre –3,5 y –2,5 Ga.

1) Las formaciones de hierro bandeadas (BIF) y los sedimentos ricos en pirita y uraninita son anteriores a 2,3 y 2,75 Ga, respectivamente.
2) Los paleosuelos ricos en hidróxido de hierro son posteriores a 2,3 Ga.
3) Las rocas formadas hace unos 2,2 Ga muestran un pico de ^{12}C que indica que el carbono orgánico enterrado empezó a aumentar por esa fecha (H. Holland y J. Karhu, 1996).
4) El fraccionamiento isotópico independiente de la masa cesó hace unos 2,45 Ga (J. Farquhar *et al.*, 2000).
5) Los gases emitidos por los volcanes empezaron a perder mucha de su capacidad reductora hace unos 2,7 Ga (L. Kump *et al.*, 2001).

¿Qué factores eliminaron de la atmósfera durante 1 Ga el oxígeno que se estaba produciendo por fotosíntesis? Se cree que éste pudo desaparecer al reaccionar con el carbono orgánico de los sedimentos o con los gases y minerales ferrosos volcánicos reductores. Los dos mecanismos implican a la Tectónica de Placas. J. Copley (2001) ha indicado que el aumento del oxígeno no es más que el primer paso de la danza que bailan la geología, el clima y la vida.

Transición Precámbrico/Cámbrico

El declive de los eucariotas unicelulares parece estar relacionado con los dilatados periodos glaciales (medidos en Ma) que hubo a finales del Precámbrico, debidos a un "efecto invernadero inverso" provocado por el enterramiento marino de biomasa y el consiguiente enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera. La fauna vendiense es de edad inferior a –700 Ma y el único indicio fósil de la vida multicelular más antigua. El origen de ésta está ligado al aumento de la concentración del oxígeno disuelto en agua y a las presiones selectivas ejercidas por la creciente depredación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

P. F. Hoffman *et al.* (1998) han indicado que, durante el periodo Criogénico del Precámbrico muy tardío (de –850 a –590 Ma), la Tierra experimentó dos glaciaciones que la convirtieron en una "bola de nieve". Los casquetes polares avanzaron hacia el ecuador impidiendo la fotosíntesis oceánica y las condiciones anóxicas aniquilaron la mayoría de la vida eucariota. La recuperación de la pCO_2 por emisiones volcánicas, y el consiguiente efecto invernadero, estimularían los procesos biológicos que llevaron a la Explosión Cámbrica. W. T. Hyde *et al.* (2000) creen que es más probable una versión menos cruda en la que coexistiesen condiciones de bola de nieve, que acabarían extinguiendo muchos linajes, con "calvas" circumecuatoriales fundidas que actuarían de refugios para las biota pelágica y bentónica.

Transición Paleoceno/Eoceno (P/E)

Los análisis isotópicos del oxígeno ($^{18}O/^{16}O$) de caparazones de los foraminíferos de testigos de la Antártida (J. P. Kennett y L. D. Stott (1991)) han puesto de manifiesto el máximo térmico producido en la frontera *P/E* (Fig. 1.6.A) y coincidente con la bajada de la proporción $^{13}C/^{12}C$ del carbono disuelto en el océano (Fig. 1.6.B). G. R. Dickens *et al.* (1995) explicaron el suceso suponiendo que a temperaturas normales, el metano biogénico del océano (enriquecido, por tanto, en ^{12}C) forma hidratos cristalinos que se liberan como metano y al salir a la atmósfera tanto él como su oxidación a CO_2 producen un efecto invernadero. A. C. Kurtz *et al.* (2003) explican el máximo térmico *P/E* suponiendo la existencia de incendios globales y milenarios de las turberas. Fundan su conclusión en el desacoplamiento de las curvas isotópicas del carbono y del azufre. Las bacterias reductoras del sulfato habrían producido también una pirita empobrecida en ^{34}S, y eso no se observa en los registros. Este desacoplamiento biogeoquímico implica, dicen los autores, que el carbono estaría enterrado fundamentalmente en los continentes.

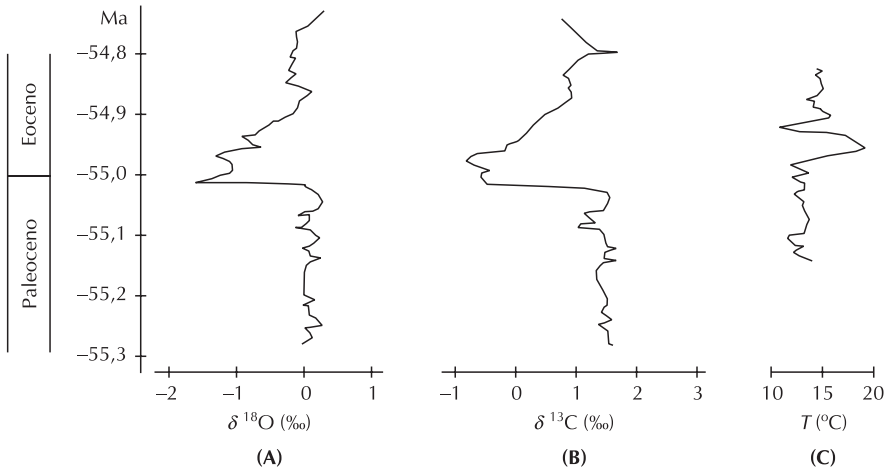


Figura 1.6. Análisis isotópicos de los caparazones de *Subbotina* ssp (A, B) y temperatura (C) en *P/E*.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Según S. Bains *et al.* (2000) el aumento de temperatura producido tras la liberación de metano propició un incremento de la fotosíntesis oceánica como reflejan los análisis de barita biogénica de muestras recogidas en el Programa de Dragado del Océano. (Generalmente se acepta que este mineral es un marcador apropiado de la productividad.) El consiguiente *feed-back* devolvió la concentración y temperatura atmosféricas a los niveles anteriores. Según los autores, la intensa escorrentía de un mundo invernadero enriquecería de nutrientes el océano y generaría el estallido de crecimiento.

1.3. Antroposfera

Una de las características sobresalientes de la Biosfera actual es la especial posición que ocupa la especie humana a pesar de que sólo representa la 0,00004 parte de la biomasa. La producción primaria de la Biosfera ha variado poco en los últimos milenios pero la biomasa de plantas y animales ha disminuido mucho y, en parte ha sido sustituida por la biomasa humana y sus artefactos. Aunque es más científico considerar al ser humano como una especie, resulta más práctico analizarlo como subsistema diferenciado (Antroposfera), formado por la Humanidad y el Medio Ambiente. En ésta cobra importancia el concepto de metabolismo exosomático (MEX, Fig. 1.7) como complementario del metabolismo en sentido estricto (endosomático, MEN).

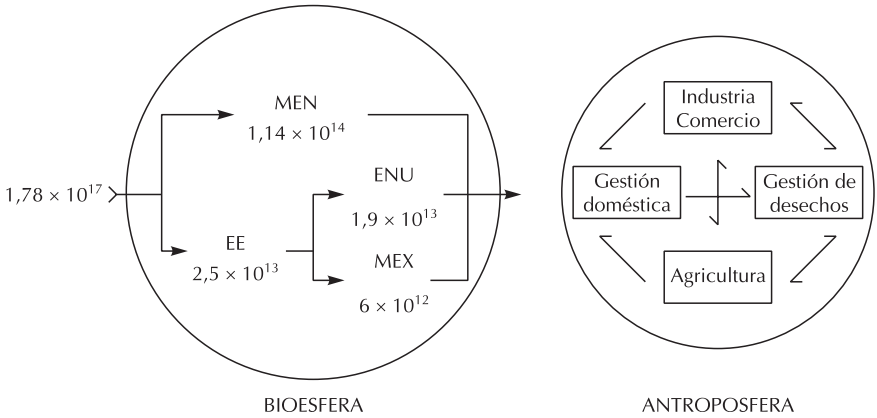


Figura 1.7. Biosfera y Antroposfera. Valores en watt. ENU = Energía no utilizable.

El metabolismo de un ser humano es de unos 150 W y morirse de hambre o de un atracón sólo representa una variación de –1 a +2 veces este valor. Por el contrario, el metabolismo exosomático varía desde 0 W (pobres de solemnidad) a 10 kW (millonarios despilfarradores y epicúreos). La energía externa (*EE*) es, por consiguiente, el parámetro más revelador de la Antroposfera, está relacionada con el transporte horizontal (R. Margalef, 1983), y constituye el agente fundamental de las perturbaciones antrópicas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El desarrollo de la Antroposfera ha sido vertiginoso cuando se compara con el ritmo al que suelen operar los procesos naturales. Se pueden considerar tres grandes etapas (Cuadro 1.2). Los seres humanos han explotado, modificado y contaminado los ecosistemas desde muy antiguo. Pero después de la Revolución Industrial esta perturbación de carácter discontinuo, brusco y asimétrico ha alcanzado la categoría de impacto ambiental y ha sido constatada explícitamente en el libro de G. P. Marsh (1864) *Man and Nature; or Physical Geography as modified by Human Action*. A. Stoppani acuñó la expresión *Era Antropozoica*: "Una nueva fuerza telúrica que en poder y universalidad es comparable a las más grandes de la Tierra" (1873).

Cuadro 1.2. Etapas del desarrollo de la Antroposfera.

ETAPA	AMBIENTE	ENERGÍA	TÉCNICA
Cazador/recolector	Silvestre	Renovable	Adaptación natural
Pastor/agricultor	Rural	Renovable	Tala/quema, Domesticación
Industrial	Urbano	No renovable	Maquinaria

1.3.1. Situación ambiental actual de la Tierra

P. J. Crutzen (2002) ha resumido la "Geología de la Humanidad"en los siguientes puntos:

1) En los últimos tres siglos la población humana ha crecido unas diez veces (Fig.1.8). Durante la mayoría de la Historia, los seres humanos han sobrevivido ¡e incluso florecido! con una esperanza de vida media en el nacimiento de 20 a 40 años. Este parámetro demográfico ha pasado de ser de 48 años en 1900 a 76 años en 2000. Esta ganancia de vida en un siglo equivale a la conseguida en los diecinueve siglos anteriores. Como indica la figura 1.8, la duplicación de la población humana (estimada en 250 Mhab en el año 0) se ha logrado en 1650, 200, 100 y 35 años. Actualmente hay "viviendo" en el planeta 6 Ghab. Se estima que la capacidad de carga del planeta no puede ser muy superior a 10 Ghab, cifra que se "logrará" antes del año 2050. ¿Qué ocurrirá entonces?

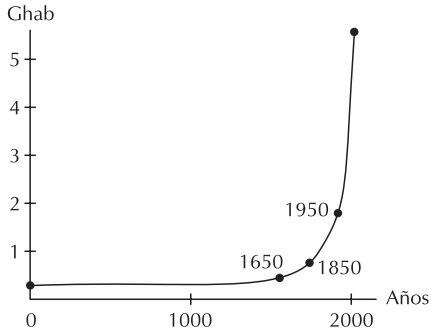


Figura 1.8. Demografía humana en los dos últimos milenios.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2) Los datos siguientes se refieren al 25% de la población.
   i) Uso de más de la mitad de toda el agua dulce accesible.
   ii) Empleo del 30-50% de la superficie emergida.
   iii) Explotación pesquera de más del 30% de la producción primaria.
   iv) Las emisiones antropógenas de SO_2 y NO superan a las naturales.
   v) Los abonos nitrogenados sobrepasan la fijación de nitrógeno natural.
   vi) La quema de combustibles ha producido un aumento del 30% del CO_2 y el 100% del CH_4 (alcanzando los niveles más altos de los últimos 0,4 Ma).
3) El consumo de energía ha crecido en el último siglo dieciséis veces y la temperatura media global ha aumentado unos 0,6 ºC (en los mares tropicales 1-2 ºC). Desde 1976 ha habido más fenómenos "Niño" y la velocidad de aumento ha sido la más rápida del último milenio (Panel Internacional sobre el Cambio Climático, 2001; Fig. 1.9.A). Según las previsiones del IPCC, la temperatura global de la Tierra será similar a la que existía en la época de la extinción de los dinosaurios dentro de uno a tres siglos (Fig. 1.9.B).

La estación de Mauna Loa (Islas Hawai) ha registrado desde los años 1950s un continuo aumento del CO_2 atmosférico. Los dientes de sierra de la gráfica (Fig. 1.9.C) se deben a los cambios estacionales verano-invierno propiciados por la actividad fotosintética (se han denominado "respiración de Gaia").

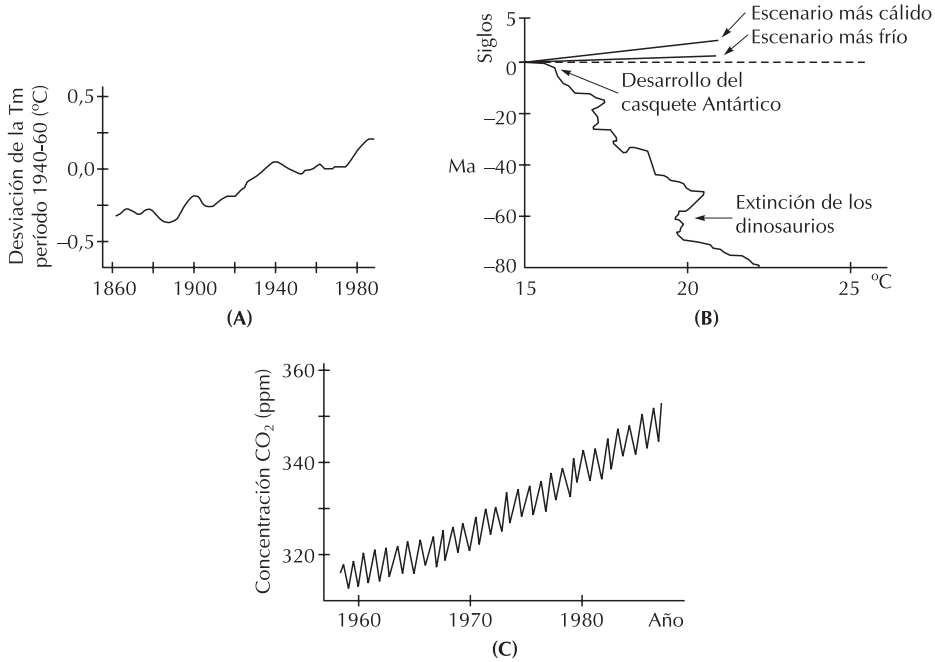


Figura 1.9. Aumento de la temperatura global a través de los últimos siglos (A) y millones de años (B). Aumento de la concentración de CO_2 atmosférico (C).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los datos de satélite revelan que a partir de los años 1960s, la cubierta de nieve y los mantos de hielo han disminuido un 10%. En las latitudes medias y altas del Hemisferio Norte, las precipitaciones (distribuidas fundamentalmente en otoño e invierno) han aumentado 0,5-1,0% por década, mientras que en las regiones subtropicales han disminuido un 0,3%. El verano de 2003 ha sido el más caluroso desde hace quinientos años.

Por consiguiente, en los últimos tiempos la variable antrópica ha cobrado relevancia en la ecuación del clima ya que generalmente se acepta que gran parte de los cambios de temperatura y de concentración del dióxido de carbono atmosféricos son consecuencia directa de la actividad humana. Aunque los expertos reconocen que la Tierra ha experimentado cambios climáticos a lo largo de su historia, en general también aceptan que el cambio climático actual es bastante rápido y está provocado en parte por acción humana. Es tema de discusión si los *feed-backs* podrán mantener la homeostasia geofisiológica.

Lo que sí parece estar claro es que fenómenos como el efecto invernadero antrópico, la reducción de la capa de ozono, la acumulación de residuos peligrosos, la lluvia ácida, la niebla tóxica y la sobreexplotación de recursos, están modificando la Tierra y mermando la biodiversidad, que es la propiedad más genuina de la Biosfera. Los modelos que estiman la velocidad de extinción se basan fundamentalmente en la relación número de especies/área y en la velocidad de destrucción del hábitat debida a deforestación. La inversión de la regla "duplicación/decuplicación" indica que si se reduce diez veces el área de una comunidad, se extingue la mitad de las especies. Tomando para las selvas tropicales una deforestación del 0,8% anual (en la actualidad se cree que sería del 2% anual), el modelo de McArthur y Wilson (1967) predice velocidades de extinción comprendidas entre el 0,1 y el 0,3% anual. ¡Es probable que en las tres últimas décadas se haya perdido la tercera parte de la biodiversidad! Suponiendo que en la Biosfera hay viviendo $1{,}4 \times 10^7$ especies y que las de los trópicos representan las dos terceras partes del total, se estima que la diversidad tropical está disminuyendo al ritmo de $1{,}4 \times 10^4$-$4{,}0 \times 10^4$ especies por año (2-5 por hora). J. B. Hughes *et al.* (1997) han estimado la pérdida de biodiversidad suponiendo que una especie tiene unas 220 poblaciones y que la extinción de éstas es una función lineal de la pérdida de hábitat. Sus cálculos arrojan la pérdida de $1{,}6 \times 10^7$ poblaciones por año (1.800 por hora). Esta cifra es tres órdenes de magnitud superior a la pérdida de especies. R. Leakey y R. Lewin (1997) hablan de "Sexta Extinción", pero en esta ocasión la catástrofe es de origen antrópico.

1.3.2. Desarrollo sostenible

El libro de R. L. Carson *Silent Spring* (traducido al castellano en 2001) marca el comienzo de los movimientos ambientalistas para frenar el desarrollo desbocado de la Antroposfera. A partir de los años setenta del siglo XX hay una conciencia generalizada sobre el deterioro ambiental y se presentan informes sobre el estado del planeta y las posibles soluciones de sus problemas (Ver 19.1). Desarrollo sostenible es el progreso social y económico que resuelve las necesidades del presente sin comprometer

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer las suyas. Actualmente no se discute la idea de que si el ser humano quiere optimizar el binomio calidad de vida-impacto ambiental debe cambiar de comportamiento. Este enfoque tiene una vertiente triple que implica al público en general y a los expertos y gobiernos en particular.

i) Economía ecológica que prime la sensibilidad ambiental (ahorro de recursos, reciclaje, producción "ecológica", etc.) y grave la desconsideración ambiental (consumo, perturbaciones).
ii) Educación ambiental.
iii) Conservación: Gestión del "juego" sucesión-regresión.

1.4. Biotecnología Ambiental

El término Biotecnología se define como la "utilización de organismos para la obtención de bienes y servicios". Aunque el ser humano ha usado procesos biotecnológicos (fabricación de bebidas y pan, por ejemplo) desde varios milenios antes de Cristo y desde muy antiguo ha seleccionado las razas silvestres de plantas y animales para obtener variedades mejoradas con fines agropecuarios, la revolución biotecnológica se caracteriza por una manipulación genética de organismos usando técnicas microbiológicas, bioquímicas y del DNA recombinado y, por consiguiente, deriva de la explosión de los conocimientos biológicos adquiridos en el siglo XX (Tabla 1.1). La Biotecnología repercute en todos los campos de la Antroposfera: Producción de energía, alimentación, farmacia, medicina, química industrial, minería, urbanismo, gestión ambiental y bioconservación.

Tabla 1.1. Hitos históricos de la Biotecnología.

ACONTECIMIENTO	AUTOR	AÑO
Domesticación / Cultivo	Desconocido	Neolítico
Fabricación artesanal de pan, vino y cerveza	Desconocido	Antigüedad
Fabricación industrial del vinagre	Proceso de Orleans	1667
Estequiometría de la fermentación alcohólica	A. Lavoisier / J-L. Gay-Lussac	1780
Etudes sur le vin	L. Pasteur	1866
Fermentación in vitro	E. Büchner	1897
Producción de acetona y butanol	C. Weizmann	1912
Patente de un detergente con enzimas	O. Röhm	1913
Agricultura científica	Varios	1920
Principios de la purificación de enzimas	O. Warburg *et al.*	1930
Fabricación de penicilina	A. Fleming, H. Florey y E. Chain	1939
Ingeniería genética	Varios	1970

El empleo de procedimientos biológicos y, por consiguiente, "naturales" no es, en principio, una garantía de inocuidad. Aunque se ha demostrado que los temores iniciales (Conferencia Internacional de Asilomar, 1975) eran exagerados, y los vaticinios de E. Chargaff en 1976 ("Mi generación ha sido la primera en emprender, bajo la di-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

rección de las ciencias exactas, una guerra colonial y destructora contra la naturaleza. El futuro nos maldecirá por ello") iban, según opinión de R. Dulbecco (1989), en dirección equivocada, la lógica y la prudencia aconsejan no bajar la guardia.

La Biotecnología Ambiental es la aplicación de la Biotecnología a la resolución, o remedio, de los problemas ambientales naturales, agrícolas y antrópicos y a la conservación de la calidad ambiental. De los cuatro tipos de perturbaciones que el ser humano realiza en los ecosistemas, a saber, destrucción de hábitats, sobreexplotación, introducción de especies y contaminación, la Biotecnología Ambiental cobra especial relevancia en los procesos de producción y en el tratamiento de la contaminación derivada de una gestión deficiente en el manejo de productos peligrosos o de las acciones intencionadas (actos bélicos, sabotajes) o fortuitas (accidentes) relacionadas con los mismos. Desde los años 60 ha habido unos ocho mil vertidos de crudo y derivados (Tabla 1.2), causados por accidentes de extracción/transporte o acciones de guerra, que suman 15 MTm.

Tabla 1.2. Vertidos al mar de petróleo causados por accidentes/sabotajes.

SUCESO	AÑO	LOCALIZACIÓN	CANTIDAD ($\times 10^3$ Tm)
Guerra Mundial	1940s	Costa oriental USA	417
Torrey Canyon	1967	Normandía	120
Urquiola	1976	Galicia	110
Amoco Cadiz	1978	Bretaña	230
Exxon Valdez	1989	Alaska	48
Mar Egeo	1991	Galicia	80
Guerra del Golfo	1991	Golfo Pérsico	840
Erika	1999	Bretaña	30
Prestige	2002	Galicia	77

Deben considerarse, además, otros tipos de catástrofes antrópicas relacionadas con la guerra, el desarrollo, la mala gestión o, simplemente, la mala suerte (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Recientes catástrofes medioambientales antrópicas.

AÑO	LOCALIZACIÓN	CATÁSTROFE
1960s	Vietnam	Empleo de 60 millones de litros de desfoliadores.
1976	Seveso	Escape de TCDD.
1997	Malasia	Incendios intencionados de 800.000 ha de selva.
1984	Bhopal	Filtración de 40 Tm de gases tóxicos.
1986	Chernóbil	Escape radiactivo afectando gravemente (más de 5 curios) a 2,5 millones de ha.
1998	Aznalcóllar	Derrame de 4,5 hm^3 de lodos con metales pesados.

Actualmente se estima en 350 MTm $año^{-1}$ la producción mundial de residuos peligrosos (España genera el 1% de esa cantidad; J. J. Rodríguez e A. Irabien, 1999). Como la nocividad es un concepto relativo (depende de la legislación, siempre a la zaga del conocimiento), la cifra real es muy superior. La mayoría de ellos proceden

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de la industria química y siderúrgica. A escala macroscópica, una medida de la capacidad contaminadora de un país podría indicarse mediante la relación gasto de energía/superficie (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Índice de la capacidad de contaminación.

PAÍS	ENERGÍA USADA/SUPERFICIE (1971)
Hong Kong	2,50
Bélgica	0,56
USA	0,10
España	0,05
URSS	0,01
Argentina	0,005
Mongolia	0,0003

Los agentes contaminantes (óxidos de carbono, nitrógeno y azufre, fosfatos, metales pesados, petróleo, plaguicidas y elementos radiactivos, Tabla 1.5) ejercen efectos muy variados en los subsistemas terrestres (Fig. 1.10), tanto local como globalmente y a corto y largo plazos.

Tabla 1.5. Contaminantes químicos más corrientes.

	INORGÁNICOS			ORGÁNICOS		
	AIRE	AGUA	SUELO	AIRE	AGUA	SUELO
Agricultura	NO_x	NO_3^-	NO_3^-	CH_4	Plaguicidas	Plaguicidas
Ciudades	O_3, Cl_2	$PO_4H_2^-$	$(SiO)_x$, EP	PAH, VOC, Hollín, PCB, PCDD, PCDF	PAH, Hollín, Deterg. Aceites	PAH, PCDD, PCB
Industria	CO_x, SO_2, NO_x	EP, H^+	EP, ER	PAH, VOC, CFC	PAH, VOC	PAH, VOC
Transporte	CO_x, EP			PAH, PAN, Hollín	Combustibles	PAN
Trat. Residuos	CO_x			PCDD, PCDF, CH_4		PCDF

EP = Elementos pesados; ER = Elementos radiactivos, PAH = Hidrocarburos aromáricos policíclicos; VOC = Compuestos orgánicos volátiles; PCDD, PCDF y PCB = Dibenzodioxinas/furanos y Bifenilos policlorados; CFC = Compuestos fluorocarbonados; PAN = Nitrato de peroxiacetilo.

Muchos de ellos son compuestos xenobióticos, es decir, extraños desde el punto de vista metabólico, debido fundamentalmente a su corta historia de existencia (Tabla 1.6). Por dicha razón los procesos selectivos y adaptativos naturales todavía no han tenido tiempo de operar dado que generalmente son lentos desde la perspectiva de la escala de tiempo que maneja el ser humano.

Se pueden considerar efectos a niveles celular, orgánico y ecológico.

A) *Celular y orgánico.* El metabolismo intenta procesar la sustancia xenobiótica usando las enzimas disponibles. Debe tenerse en cuenta que éstas no han evolucionado para dicho menester. Se producen biotransformaciones (oxidaciones, reducciones, hidrólisis) y conjugaciones que tienden a solubilizar y desactivar las moléculas extrañas con objeto de excretarlas (animales) o inmovilizarlas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

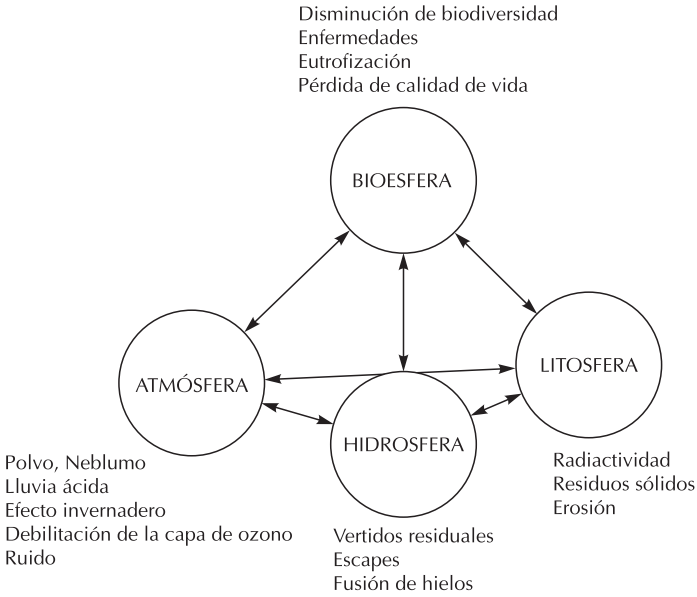


Figura 1.10. Efectos de la contaminación en los subsistemas terrestres.

Tabla 1.6. Cronología de las sustancias xenobióticas.

FECHA	ACONTECIMIENTO
1929	Introducción de los PCB
1938	Introducción del DDT
1940-50	1ª generación expuesta postnatalmente
1950-70	1ª generación expuesta prenatalmente
1970-90	1ª generación expuesta prenatalmente que alcanza la edad reproductora

(plantas). Las reacciones enzimáticas son muy similares en unos y otras, lo que ha conducido al concepto de "hígado verde" (H. Sandermann, 1994). En algunos casos se produce destoxificación, pero en otros hay una bioactivación del compuesto xenobiótico o una sobreproducción de radicales libres del oxígeno que tienen consecuencias desastrosas para el organismo afectado. Algunos compuestos xenobióticos actúan como interruptores hormonales de los procesos del crecimiento y desarrollo. Los radicales libres producen daños moleculares en los antioxidantes naturales.

B) *Ecológico.* La contaminación conduce a una regresión (simplificación de las redes tróficas). Ello implica:

a) Aumento de la velocidad de renovación (producción primaria/biomasa total).

b) Aumento de la productividad (biomasa/tiempo) y eficacia (respiración/biomasa total).

c) Favorecimiento de los estrategas de la *r* (especies de crecimiento rápido).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

d) Disminución de la diversidad, más a consecuencia de la intensificación del dinamismo trófico que a la reducción del número de especies resistentes a las nuevas condiciones.

e) Biomagnificación (elevación de la concentración a medida que pasa de un nivel a otro).

1.5. Los microorganismos en Biotecnología Ambiental

Según R. Margalef (1974), la contaminación (polución) es un desequilibrio entre la entrada (producción) y la salida (descomposición) de los ecosistemas, como consecuencia de una perturbación del transporte (horizontal) de materia, que no ha sido asimilada por la evolución. La estrategia fundamental para corregirla ha de consistir en la promoción del reciclaje ya que la contaminación es "una obstrucción del retorno". Un papel destacado en él juega el nivel de descomponedores que, aunque está todavía poco caracterizado, se compone mayoritariamente de microorganismos y, especialmente, bacterias y hongos. Los descomponedores transforman la materia orgánica de la biomasa en minerales, los cuales son reinyectados en el ecosistema y se solventa el problema derivado de la naturaleza cerrada de la circulación. Para ello estos organismos disponen de equipos enzimáticos exclusivos desarrollados mediante los mecanismos evolutivos convencionales (mutación/selección).

En la Tabla 1.7 se estima el número de bacterias que viven en los hábitats más significativos del planeta. La biomasa bacteriana (0,7-1,1 $\times 10^{15}$ kg) representa la mitad de la biomasa terrestre y, pese a ser del orden del 10^{-8}% de la masa planetaria (5,97 $\times 10^{24}$ kg), su influencia sobre la Tierra es equiparable a la ejercida por la tectónica, la meterorización y otros procesos geodinámicos (H. G. Schlegel, 1981).

Tabla 1.7. Estimación del número de bacterias (W. Wihtman, W. J. Wiebe (1999).

HÁBITAT	Nº DE CÉLULAS	% DEL TOTAL
Subsuelo marino	$3{,}6 \times 10^{30}$	66
Subsuelo continental	$1{,}4 \times 10^{30}$	26
Suelo	$2{,}6 \times 10^{29}$	4,8
Agua marina	$1{,}4 \times 10^{30}$	2,2
Agua continental	$2{,}3 \times 10^{26}$	$4{,}3 \times 10^{-3}$
Organismos eucariotas	$5{,}6 \times 10^{24}$	$1{,}7 \times 10^{-4}$
Hielo	$4{,}0 \times 10^{24}$	$7{,}4 \times 10^{-5}$

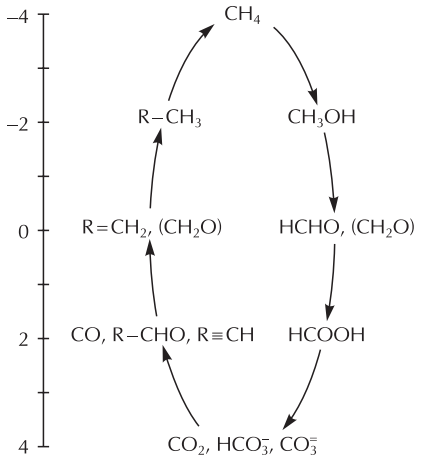
La frecuencia de mutación es 10^{-7} gen^{-1} $\times$ generación^{-1}, lo que significa que un gen común a todas las bacterias muta 2,5 veces $\times$ min^{-1}. El potencial biológico de las bacterias es, pues, impresionante. "Estamos en la edad de las bacterias... Son las triunfadoras en el relato de la vida. Ocupan una gama de ambientes más amplia y se extienden en un rango de constituciones bioquímicas más vasto que el de ningún otro grupo. Son adaptables, indestructibles y variadísimas" (S. J. Gould, 1994).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En el *Bergey's Manual* hay catalogadas varios miles de "especies" de bacterias pero experimentos de desnaturalización/renaturalización del DNA realizados por J. Goksöyr y V. Torsvik (1990) han puesto de manifiesto que en un gramo de suelo de un hayedo noruego puede haber 4-5 $\times 10^3$ especies (los autores suponen que dos "especies" han de poseer un grado de semejanza inferior al 70%). Es posible que se puedan aplicar a los hongos conclusiones similares. No cabe duda que los microbios son la cara oculta de la vida. "Si pudiera empezar de nuevo y perseguir mis visiones en el siglo XXI, me haría ecólogo microbiano" (E. O. Wilson, 1996).

Las bacterias (*Eubacteria* y *Archaea*) son los únicos organismos que cubren todo el espectro metabólico posible (fermentación/putrefacción, fotosíntesis anoxigénica y oxigénica y respiración aerobia y anaerobia). Esta increíble versatilidad bioquímica les confiere un protagonismo en los ciclos biogeoquímicos ya que la mayoría de las transformaciones químicas necesarias para cerrarlos son exclusiva competencia suya.

En el ciclo del carbono (Fig. 1.11), procesos tales como la metilotrofia, metanogénesis, homoacetogénesis y algunos tipos de fijación del CO_2 son exclusivamente bacterianos. En el del nitrógeno (Fig. 1.12), algunos tipos de respiración anaerobia, anamox (oxidación anaeróbica del amonio) y la mayoría de la fijación del dinitrógeno también son típicamente bacterianos. Otro tanto ocurre con el ciclo del azufre (Fig. 1.13).



BIOENERGÉTICA — kJ mol^{-1}

Metilotrofia

$CH_4 + 3/2\,O_2 \longrightarrow HCO_3^- + 3\,H^+ + 2\,e^-$ — −772

Metanogénesis

$HCO_3^- + 4\,H_2 + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3\,H_2O$ — −135

Homoacetogénesis

$2\,HCO_3^- + 4\,H_2 + H^+ \longrightarrow CH_3CH_2OH + 4\,H_2O$ — −104

Fermentación

$(CH_2O)_6 \longrightarrow CH_3CH_2OH + 2\,CO_2$ — −235

Resp. aerobia

$(CH_2O)_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$ — −680

BIOSÍNTESIS

Filación del CO_2

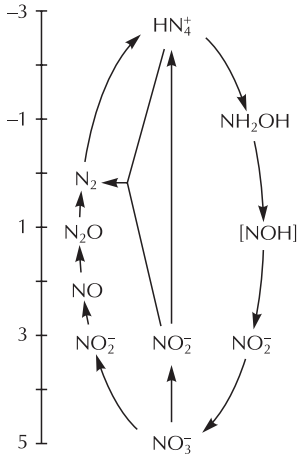
$6\,CO_2 + 6\,H_2O \longrightarrow (CH_2O)_6 + 6\,O_2$

$2\,CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_3COO^- + H_2O + H^+$

Figura 1.11. Ciclo del carbono. Estados de oxidación y procesos bioquímicos.

No parece exagerado afirmar, por consiguiente, que las bacterias son los organismos que confieren estabilidad asintótica a la Biosfera, propiedad físico-matemática imprescindible para que todo sistema dinámico tenga probabilidades de prosperar. No deja de ser sorprendente que algunas enzimas, moléculas al fin de cuentas, estén directamente implicadas a escala biogeoquímica. D. Yakir (2002) las ha denominado enzimas globales.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial



BIOENERGÉTICA kJ mol^{-1}

Fermentación

$NO_3^- + 10\,H^+ + 8\,e^- \longrightarrow NH_4^+ + 3\,H_2O$ –591

Respiración

$NO_3^- + 3\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{NAR} NO_2^- + H_2O$ –161

$NO_2^- + 2\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{NIR} NO + H_2O$ –76

$NO + 2\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{NOR} N_2O + H_2O$ –306

$N_2O + 2\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{NOS} N_2 + H_2O$ –340

Anamox

$NH_4^+ + NO_3^- + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow N_2 + 3\,H_2O$ –1.483

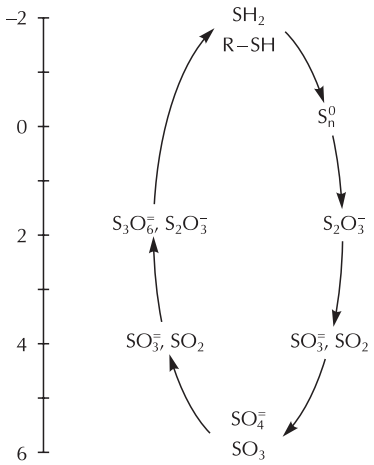
BIOSÍNTESIS

$N_2 + 10\,H^+ + 8\,e^- \xrightarrow{N_2asa} 2\,NH_4^+ + H_2$

$NO_3^- + 2\,H^+ + 2\,e^- \xrightarrow{NAS} NO_2^- + H_2O$

$NO_2^- + 8\,H^+ + 6\,e^- \xrightarrow{NIR} NH_4^+ + 2\,H_2O$

Figura 1.12. Ciclo del nitrógeno. Estados de oxidación y procesos bioquímicos.



BIOENERGÉTICA kJ mol^{-1}

Respiración

$SO_4^= + 10\,H^+ + 8\,e^- \longrightarrow SH_2 + 4\,H_2O$ –596

$S_n^0 + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow SH_2$

Dismutación

$4\,SO_3^= + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow 3\,SO_4^= + SH_2$ –235

$S_2O_3^- + e^- \longrightarrow SO_3^= + S_n^0$

Fotosíntesis

$SH_2 \longrightarrow S_n^0 + 2\,H^+ + 2\,e^-$

BIOSÍNTESIS

Quimiótrofos

$SO_4^= \longrightarrow APS \longrightarrow PAPS \longrightarrow SO_3^= \longrightarrow SH_2$

Fotótrofos

$SO_4^= \longrightarrow APS \xrightarrow{-SH} S_2O_3^= \longrightarrow 2\,SH_2$

Figura 1.13. Ciclo del azufre. Estados de oxidación y procesos bioquímicos.

En la actualidad, el potencial bacteriano natural se puede incrementar significativamente con las técnicas de la Ingeniería Genética (íntimamente ligada a la Microbiología, Tabla 1.8): diseño *ad hoc* y construccción de estirpes capaces de realizar tareas concretas.

Las palabras de H. B. S. Haldane en 1929 han resultado proféticas: "¿Quién se molestará en producir compuestos químicos cuando puede hacerlo un microbio?".

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 1.8. Hitos históricos de la Microbiología y la Ingeniería Genética.

ACONTECIMIENTO	AUTOR	AÑO
Descubrimiento de los microorganismos	A. van Leeuwenkoek	1680
Postulados de Koch	R. Koch	1876
Cultivos en condiciones anóxicas	P. Liborius	1886
Descubrimiento de la quimiolitotrofia	S. Winogradsky	1888
Cultivos de enriquecimiento	M.W. Beijerinck	1901
Unidad del metabolismo microbiano	A.J. Kluyver	1924
Descubrimiento de las bacterias fotosintéticas	C. van Niel	1931
Conjugación bacteriana	J. Lederberg y E. Tatum	1946
Descubrimiento de los plásmidos	N. D. Zinder y J. Lederberg	1952
Descubrimiento de las mono y dioxigenasas	H. S. Mason *et al.* / O. Hayaishi	1955
Primer mapa genético de *E. coli*	E. L. Wollman y F. Jacob	1957
Descubrimiento de la primera restrictasa	W. Arber y D. Dussoix	1962
Primer DNA recombinado	P. Berg	1971
Clonación molecular	S. N. Cohen, H. W. Boyer *et al.*	1973
PCR	C. Mullins *et al.*	1985
Interdependencia de los consorcios bacterianos	T. Leisinger *et al.*	1993

Bibliografía

ALDRIDGE, S. (1999). *El hilo de la vida*. Cambridge University Press. Madrid.

ATLAS, R. M., BARTHA, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología industrial*. Addison Wesley. Madrid.

CARLSON, R. L. (2001). *Primavera silenciosa*. Crítica. Barcelona.

COOMBS, J. (1989). *Diccionario de Biotecnología*. Labor S.A.

DULBECCO, R. (1989). *Ingenieros de la vida*. Pirámide. Madrid.

EHRLICH, H. L. (1996). *Geomicrobiology*. Marcel Dekker. New York.

GRIBBIN, J. (1991). *El efecto invernadero y Gaia*. Pirámide. Madrid.

LÓPEZ BONILLO, D. (2001). *El medio ambiente*, 3ª Ed. Cátedra. Madrid.

LOVELOECK, J. (1988). *The ages of Gaia*. OUP. Oxford.

MADIGAN, M.T. *et al.* (1997). *Brock Biology of microorganisms*, 8th Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River.

MARGALEF, R. (1974). *Ecología*. Omega. Barcelona.

MARGALEF, R. (1992). *Planeta azul, planeta verde*. Prensa científica. Barcelona.

NEWEL, J. (1990): *Manipuladores de genes*. Pirámide. Madrid.

PRENTIS, S. (1986). *Biotecnología*. Salvat. Barcelona.

RODRÍGUEZ, J. J., IRABIEN, A. (eds.) (1999). *Residuos peligrosos*. Síntesis. Madrid.

VEGA, J. M. *et al.* (1983). *La bioconversión de la energía*. Pirámide. Madrid.

WACKETT, C. D., HERSHBERGER, C. D. (2001). *Biocatalysis and Biodegradation*. ASM Press, Washington.

WAINWRIGHT, M. (1999). *An introduction to environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publishers. Boston.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 2

EL ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA. APARICIÓN Y EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO

Glosario
2.1. Introducción
2.2. Dónde apareció la vida
2.3. Cuándo apareció la vida
2.4. Cómo apareció la vida
2.4.1. Micromoléculas
2.4.2. Macromoléculas
2.4.3. Protocélulas
Modelo de la sopa prebiótica
Modelo del mundo del hierro-azufre
Modelo del mundo de RNA
2.5. Evolución del metabolismo
2.5.1. Metanogénesis
2.5.2. Sintrofia
2.5.3. Respiración
2.5.4. Fotosíntesis
2.5.5. Anabolismo
2.6. Porqué apareció la vida
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Arcaico: Eón del Precámbrico en el que surge la vida en la Tierra.
Archaea: Dominio sistemático procariota más emparentado con *Eucarya*.
Autómata celular: Conjunto espacial de celdillas especificado por su estado en un instante (lista de los valores asociados a cada una) y un algoritmo que permita describir su evolución discreta (paso de unos estados a otros).
Bacteria: Dominio sistemático procariota menos emparentado con *Eucarya*.
Biogénesis: Origen de la vida.
BIF: Formaciones sedimentarias usadas como marcadores geoquímicos.
Cámbrico: Primer periodo de la Era Paleozoica.
Cierre catalítico: Condición en la que el último paso de la síntesis de cada uno de los miembros de un conjunto de moléculas está catalizado al menos por otro miembro del mismo.
Cosmoquímica orgánica: Presencia de sustancias orgánicas en ambientes extraplanetarios.
Estromatolitos: Comunidades fósiles producidas por tapetes microbianos.
Hierro-azufre, Mundo del: Modelo de biogénesis propuesto por G. Wächtershäuser (1988) que aboga por un origen termoacidófilo y quimiótrofo de la vida.
Hiperciclo: Interacciones cooperativas entre cuasiespecies.
Humeros submarinos: Chimeneas volcánicas asociadas a las dorsales oceánicas.
Ligadura histórica: Imposición contingente o accidental.
LUCA: Antepasado común más reciente de todos los organismos vivos.
Origen de la vida sobre la Tierra: (1936). Libro de A. I. Oparin donde se desarrolla la primera teoría científica sobre biogénesis adelantada por el autor en 1924.
Panspermia: Hipótesis que defiende que la vida originada en un planeta puede instalarse en otro apropiado viajando a través del espacio.
Plantilla: Polímero usado como molde para fabricar otro.
Polimerasa: (Bio)Catalizador necesario en la fabricación de un polímero.
Prebiótico: Anterior a la vida.
Precámbrico: Anterior al Cámbrico.
Protocélula: Modelo de sistema físico-químico que se encuentra en un estado considerado interfase abiótico-biótico.
RNA, Mundo del: Modelo de biogénesis propuesto por W. Gilbert (1986) que aboga por el protagonismo del RNA y moléculas relacionadas en las primeras formas de vida.
Ribozima: RNA con capacidad catalítica.
Selección *in vitro*: Amplificación molecular en virtud de una idoneidad definida por el experimentador.
Sopa prebiótica: Expresión usada por J. B. S. Haldane (1928) para el caldo oceánico primordial de A. I. Oparin (1924) en el que se sintetizaron las "primeras células" mediante procesos químico-físicos graduales.
Sopa prebiótica, Mundo de la: Modelo de biogénesis propuesto por F. Dyson (1982) que aboga por la primacía de la encapsulación (compartimentación).
Teoría de grafos: Técnicas matemáticas para estudiar las propiedades de los conjuntos formados por nodos (moléculas) y aristas (reacciones químicas).
Tioéster-hierro, Mundo del: Modelo de biogénesis propuesto por C. de Duve (1991) que aboga por la primacía de la formación fotooxidativa de tioésteres.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2.1. Introducción

El problema de la biogénesis es una de las cuestiones más apasionantes de la ciencia y, sin lugar a dudas, la más fundamental de la Biología. Su resolución supone desbaratar las dos ligaduras históricas más fuertes que vertebran el cuerpo de los conocimientos biológicos actuales:

1) el aforismo *Ex ovo omnia* (W. Harvey, *Exercitationes de generatione animalium*, 1651) u *Omnis cellula e cellula* (R. Virchow, *Die Cellularpathologie*, 1858) y
2) la no linealidad/bucle DNA ↔ Proteínas,

relacionadas, respectivamente, con la teoría de la generación espontánea (enraizada en antiguos mitos egipcios) y el Paradigma Central de la Biología Molecular (F. H. Crick).

El "origen de la vida" fue tratado científicamente por primera vez por A. I. Oparin (1924) y J. B. S. Haldane (1928), quienes adelantaron la hipótesis de la generación progresiva heterótrofa según la cual las "primeras células" debieron sintetizarse por procesos químico-físicos graduales a partir de materiales prebióticos terrestres ("sopa prebiótica" de Haldane). Aunque la generación espontánea en las condiciones presentes no es posible ("No existe condición conocida en la actualidad en la que pueda afirmarse que los seres microscópicos vengan al mundo sin padres iguales a ellos", L. Pasteur, 1860), *ab initio* es la única concebible científicamente. Actualmente se acepta que la biogénesis es un segmento de la evolución cosmoquímica (Fig. 2.1) y abordable desde una perspectiva racional.

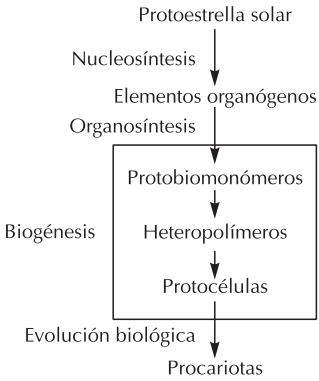


Figura 2.1. Evolución cosmoquímica y biogénesis.

M. Calvin (1969) y N. Lahav (1999) han discutido los enfoques del problema y C. de Duve (1991) lo ha planteado muy claramente haciendo uso de las *aitia* aristotélicas ¿dónde?, ¿cuándo?, ¿cómo? y ¿por qué? surgió la vida, cuestiones todas que, como se verá, están muy relacionadas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Desde el punto de vista operativo cabe considerar las visiones ascendente (pasado → presente), que por simulación/experimentación permite estudiar procesos, y la descendente (presente → pasado), que por interpretación/experimentación permite deducir patrones (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Intentos de reconstruir el origen de la vida.

Ascendente (estrategias cosmogeológica y biogeoquímica)
Condiciones específicas
Quimiorganotrofia: Oparin-Haldane (1920s), Dyson (1982). "Sopa prebiótica".
Quimiolitotrofia: A. G. Cairns-Smith (1985), Wächtershäuser (1988). "Mundo mineral".
Quimiorganotrofia/litotrofia: C. de Duve (1991). "Mundo del tioéster-hierro"
Sin condiciones específicas
Origen genotípico: Eigen-Schuster (1971-1977). "Hiperciclos".
Origen fenotípico: Kauffman (1977). "Conjuntos autocatalíticos".
Descendente (estrategia biológica)
Condiciones específicas
Paleobiología precámbrica: S. A. Tyler y E. S. Barhoorn (1954); J. W. Schopf (1993).
Sin condiciones específicas
Mundo RNA: Woese-Crick-Orgel-Cech (1960-1980): J. W. Szostak *et al.* (2001).

Hay tres grandes clases de modelos alternativos (Fig. 2.2) que comparten la secuencia Precursores → Micromoléculas → Heteropolímeros y difieren en aspectos relacionados con la compartimentación (temprana/tardía), el metabolismo (heterotrofia/autotrofia) y la información (orígenes fenotípico/genotípico).

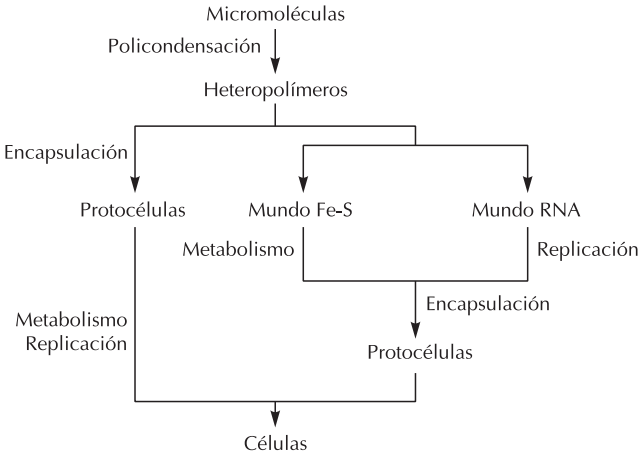


Figura 2.2. Tres posibles hipótesis para la biogénesis.

También hay consenso general en las grandes etapas de la biogénesis:

Mundo prebiótico → Mundo del RNA → Mundo del DNA

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2.2. Dónde apareció la vida

La vida está asociada a la evolución de los sistemas planetarios semejantes al solar porque los bioelementos sólo se producen en estrellas de cierta masa y las biomoléculas sólo son estables en un intervalo de condiciones físicas relativamente estrecho.

S. Arrhenius (1884) acuñó el término *panspermia* para referirse a la idea de que la vida originada en un planeta puede instalarse en otro apropiado viajando a través del espacio en forma de esporas o semillas convenientemente protegidas. Esta teoría entronca con la creencia de la eternidad de la vida, apuntada ya por Anaxágoras en el siglo V a.C. Autores distinguidos, como F. Hoyle y N. C. Wikramasinghe (1978) y F. Crick (1981), han dado argumentos en favor de un origen extraterrestre y P. Weber y J. M. Greenberg (1985) han presentado pruebas sobre la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* sometidas a condiciones del espacio interestelar. Las misiones espaciales a la Luna (Apollo) y Marte (Mariner y Viking) no han aportado indicios de la existencia de vida en estos astros y tampoco las misiones diseñadas para explorar las regiones alejadas del Sistema Solar (Voyager, Galileo), aunque apenas han sido estudiadas. El telescopio espacial Hubble ha descubierto recientemente planetas extrasolares en las regiones de Orión, Pegaso, Osa Mayor y Virgo, pero no se han caracterizado. Aunque el campo de la exploración espacial está prácticamente virgen, la visión más extendida, respaldada por el principio de economía, supone que la vida comenzó *de novo* en el lugar donde únicamente se sabe que existe, esto es, en el planeta Tierra. Incluso existen indicios basados en análisis de las divergencias horizontal y vertical de las secuencias de los tRNA que llevan a pensar que la edad del código genético no es mayor que la del planeta (M. Eigen *et al*. 1989).

V. Smil (2002) ha indicado que la definición más simple de habitabilidad espacial debe considerar las regiones en las que es posible la existencia de agua en estado líquido. Estas zonas quedan comprendidas entre dos envolturas esféricas (caliente y fría) centradas en una estrella de características apropiadas. La especificación de la zona habitable del Sistema Solar (0,95 a 1,37 UA) se basa en las dos consideraciones siguientes:

i) Una radiación solar de 1,1 veces el valor actual ($1{,}4 \times 10^3$ W m^{-2}) provoca la fotolisis del agua, con el consiguiente escape del hidrógeno.

ii) Una baja temperatura promueve la disolución del CO_2 troposférico (con formación de carbonato) y el pequeño efecto invernadero no puede compensar la disminución de radiación solar.

Estos requisitos están determinados por condicionantes planetarios, estelares y galácticos:

a) Los tres determinantes planetarios más importantes son los parámetros orbitales (traslación, excentricidad, rotación e inclinación) y la masa y composición del planeta porque de ellos depende la insolación, gravedad y topografía superficiales, presión y temperatura atmosféricas y flujo geotérmico.

b) La masa y sistema estelares condicionan el tiempo de permanencia en la secuencia principal, el espectro de radiación y la estabilidad de las órbitas de los

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

planetas asociados. Las estrellas masivas evolucionan con mucha rapidez, las enanas radian en el infrarrojo y las dobles y múltiples desestabilizan las órbitas.

c) El ambiente intragláctico determina:

   i) los parámetros orbitales de la estrella (una pequeña excentricidad impide que la traslación la acerque al centro galáctico y la poca inclinación evita que cruce mucho el plano galáctico) y

   ii) la ausencia de regiones de alta densidad interestelar (nebulosas).

   Ambas características reducen el riesgo de ser afectada por explosiones de supernovas u otros fenómenos violentos.

2.3. Cuándo apareció la vida

Los marcadores cronológicos (radioisótopos), geoquímicos (como las formaciones de hierro bandeadas, BIF) y el fraccionamiento isotópico cinético (la preferencia biológica de los isótopos ligeros), complementados con el análisis filogénico molecular permiten delimitar la época en la que se establecieron los sistemas biológicos en la Tierra. En la figura 2.3 se muestra un calendario del Precámbrico, el vasto periodo de tiempo geológico que abarca desde el comienzo de la formación de la Tierra hasta la fecha en que empiezan a abundar los fósiles. El Precámbrico comprende tres eones y todos los indicios indican que los primeros sistemas biológicos emergieron en el Arcaico (o Arqueano).

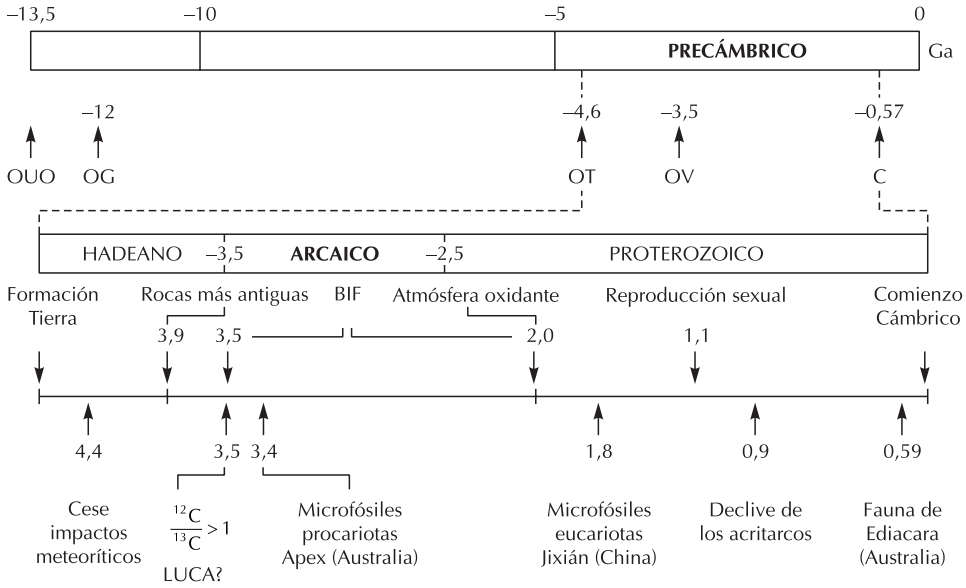


Figura 2.3. Cronología fundamental del Precámbrico.
(O = Origen, G = Galaxia, T = Tierra, V = Vida, C = Cámbrico).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

M. A. Line (2002) ha indicado el enigma que envuelve el origen de la vida, a saber, el poco tiempo transcurrido desde la fase de química prebiótica hasta LUCA (el último antecesor común de los tres dominios, también llamado *cenancestro*). Ir de una mezcla de compuestos prebióticos a una bacteria es conceptualmente mucho más complejo que salvar la brecha que existe entre un procariota y un ser humano. Por tal motivo, el origen de la vida en el planeta Tierra aparece como un suceso muy improbable. Lo cual lleva a pensar en algún tipo de panspermia que, a su vez, no deja de ser una pura conjetura.

Durante el Arcaico se depositaron las formaciones bandeadas de hierro (BIF). Se trata de yacimientos a nivel planetario constituidos por bandas de mm/cm de espesor en las que alternan capas enriquecidas y empobrecidas en óxidos de hierro (hematites y magnetita). Se interpretan como el resultado de la progresiva oxidación del planeta hasta que se agotó el hierro ferroso soluble oceánico. Otros indicadores geológicos (uraninita y pirita) también apoyan la creencia de que hasta hace unos 2 Ga, los sistemas biológicos sólo podían disponer de trazas de oxígeno (W. Schopf, 2000). Escasez de oxígeno en la atmósfera implica que el metano sería 10^2-10^3 más abundante que en la actualidad (D. C. Catling *et al.*, 2001) y también significa ausencia de ozono estratosférico y, por consiguiente, la luz ultravioleta llegaría a la superficie terrestre y produciría una intensa fotolisis (del metano y del agua). No es probable que la atmósfera primitiva tuviera amoniaco ya que es inestable por encima de 800 °C pero J. A. Brandes *et al.* (1998) han demostrado que esta imprescindible sustancia prebiótica puede producirse por reducción abiótica (con el concurso de hierro ferroso y agua) de dinitrógeno, nitrito o nitrato. El sulfuro de hidrógeno y los sulfuros y el fosfato (y polifosfato) son buenas fuentes del azufre y fósforo. E. Nisbet (2000) ha comentado los enclaves arcaicos que podrían considerarse como probables ecosistemas (Fig. 2.4).

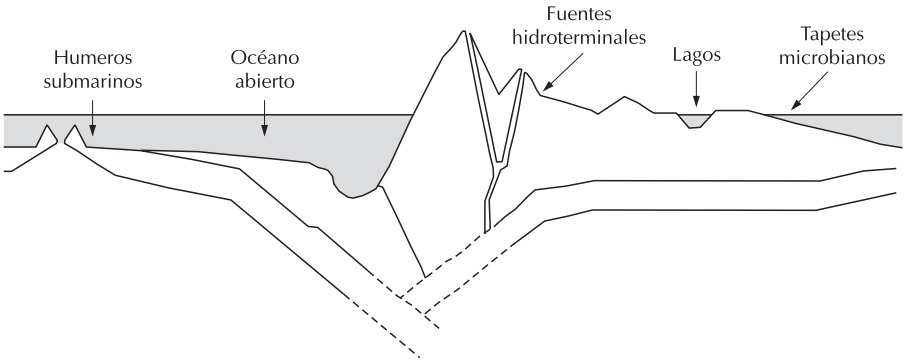


Figura 2.4. Ecosistemas arcaicos.

En los estudios de biogénesis han cobrado especial importancia los tapetes microbianos fósiles (estromatolitos), los humeros submarinos y las fuentes hidrotermales. N. Grassineau *et al.* (1999) han indicado que la abundacia de los isótopos ^{12}C y ^{32}S en sedimentos de –3,5 Ga apoyan la existencia de metanógenos y sulfatorreductores recicladores. B. Rasmussen (2000) ha presentado indicios microscópicos en fa-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

vor de la existencia de quimiótrofos hipertermófilos en rocas volcánicas submarinas de edad –3,2 Ga.

2.4. Cómo apareció la vida

2.4.1. Micromoléculas

Cuando el planeta condensado se enfrió, perdió todo el hidrógeno y se hizo inapropiado para generar los precursores orgánicos prebióticos pero la oxidación fotoquímica del Fe^{++} pudo producir vastas cantidades de equivalentes de reducción que enriquecieron la atmósfera en H_2, H_4C, H_3N, HCN, H_2O, H_2S y otras moléculas al tiempo que el Fe^{++} precipitaba como óxidos y complejos de Fe^{+++} que produjeron las primeras BIF. Las descargas eléctricas u otras formas de energía harían reaccionar los gases atmosféricos para formar micromoléculas orgánicas como aminoácidos, hidroxiácidos, ácidos dicarboxílicos y tioles, que se acumularon en lagos y océanos. Este material orgánico también pudo haber sido traído al planeta por meteoritos y cometas.

S. L. Miller (1953) realizó los primeros experimentos modernos de síntesis prebiótica. Al someter la atmósfera reductora (CH_4, NH_3, H_2O) de un reactor a descargas eléctricas y recoger al cabo de varios días los productos disueltos, comprobó la presencia de algunas moléculas significativas, especialmente aminoácidos y ácidos carboxílicos. También se ha comunicado la formación de ácidos mono, di y tricarboxílicos, alcoholes grasos, nicotinamida, triazinas e imidazoles. Todavía no se ha demostrado la síntesis prebiótica de desoxirribosa, algunos ácidos grasos, aminoácidos básicos, porfirinas y la mayoría de las coenzimas derivadas de las vitaminas hidrosolubles. La síntesis de azúcares y bases es menos favorable termodinámica y cinéticamente que la de aminoácidos. La síntesis de nucleósidos y nucleótidos púricos no presenta problemas, al contrario de lo que ocurre con la formación de nucleósidos pirimidínicos. Se han calculado concentraciones de 0,3 mM para los aminoácidos y de 15 mM para las purinas. En la tabla 2.2 se resumen algunas de las contribuciones más significativas.

Tabla 2.2. Síntesis prebiótica de micromoléculas significativas.

AUTOR	CONDICIONES	MICROMOLÉCULAS
F. Whöler (1828)	Isocianato amónico, Calor	Urea
A. Strecker (1850)	Acetaldehído, HCN, NH_3	Alanina
S. L. Miller (1953)	Atmósfera reductora, Descargas	Aminoácidos, ácidos
J. Oró, A. P. Kimball (1961)	Ácido cianhídrico, Reflujo	Purinas
C. Ponnamperuma (1967)	Formaldehído, Caolinita, Calor	Azúcares
J. P. Ferris *et al.* (1968)	Cianoacetileno, Descargas	Pirimidinas
D. Ring *et al.* (1972)	Atm. no reductora, Descargas	Aminoácidos
W. D. Fuller *et al.* (1972)	B. nitrogenadas y azúcares,Calor	Nucleósidos púricos
R. Lohmann, L .E. Orgel (1976)	Nucleósidos y polifosfatos, Calor	Nucleótidos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En condiciones no tan reductoras (CO_2, N_2, H_2O), la síntesis prebiótica de micromoléculas es muy escasa y es necesario invocar aportaciones extraterrestres (meteoritos y cometas) de material orgánico, lo que no constituye ninguna condición especial ya que en estos cuerpos y en el espacio interestelar se ha demostrado la presencia de gran cantidad de sustancias orgánicas, tal como proponía la hipótesis de la "cosmoquímica orgánica" (J. Oró, 1962) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Moléculas encontradas en las nebulosas (J. Oró, 1972).

H_2	PH_3
CO_2	HCHO (formaldeído)
N_2	HCSH (tioformaldehído)
CO	CH_3CHO (acetaldehído)
NH_3	C_2N_2 (cianógeno)
CH_4	HCN (cianuro de hidrógeno)
H_2O	H_2NCH (cianamida)

2.4.2. Macromoléculas

El mundo prebiótico habría permanecido estéril sin ayuda energética y catalítica. La policondensación en medio acuoso (H_2O 55 M) está desfavorecida termodinámicamente ya que la K_{eq} va de 0,036 (8 kJ mol^{-1} de enlace peptídido) a 0,0002 (20 kJ mol^{-1} de enlace fosfodiéster):

$$M_1 + M_2 \longleftarrow R_1 - R_2 + H_2O \qquad (2.1)$$

Por tanto, hay que eliminar o secuestrar el agua adsorbiéndola a minerales o acoplando la deshidratación de los monómeros (M_i) con la hidratación de compuestos energéticos. Para apreciar la magnitud del problema de la polimerización en medio acuoso basta considerar que la concentración de equilibrio de un polímero de veinte enlaces de 12,5 kJ mol^{-1} (con monómeros a concentraciones M) es $3{,}7 \times 10^{-44}$ M. "Resulta claro que faltan algunas piezas en el *puzzle* de la polimerización" (S. L. Miller, 1992). En la tabla 2.4 se recogen algunas de las comunicaciones más significativas encontradas en la bibliografía.

Tabla 2.4. Policondensaciones prebióticas.

POLIPÉPTIDOS	POLINUCLEÓTIDOS
S. W. Fox *et al.* (1958, 1977)	L. E. Orgel *et al.* (1968, 1973)
S. A. Akabori (1959)	J. Oró *et al.* (1974)
C. Ponnamperuma y E. Peterson (1965)	L. E. Orgel *et al.* (1983, 1986)
M. Paecht-Horowitz y A. Katchalsky (1967)	G. von Kiedrowski (1986)
D. H. White y J .C. Erickson (1981)	
ACIDOS PÉPTIDONUCLEICOS	**POLINUCLEOTIANÁLOGOS**
P. E. Nielsen *et al.* (1991)	A. Schenmoser (1992, 1997)
M. Egholm *et al.* (1993)	S. Pitsch *et al.* (1993)

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2.4.3. Protocélulas

Modelo de la sopa prebiótica

El postulado fundamental de este modelo, adelantado por A. I. Oparin (1924), es la formación de coacervados en el "caldo universal primario" (océanos enriquecidos en materia orgánica). Se trata de microsferas estructuradas originadas al interaccionar en condiciones de fuerza iónica y pH apropiados polímeros de carga opuesta (A. I. Oparin, 1973). Este modelo ha sido estudiado experimentalmente por Fox *et al.* (S. W. Fox y K. Dose, 1977) y teóricamente por F. Dyson (1982, 1999) y D. Segré y D. Lancet (1999).

Las gotas coacervadas suspendidas en el líquido equilibrante confinan un volumen con monómeros difusibles y superficies químicamente activas (Fig. 2.5.A). Los monómeros pueden adsorberse a o desorberse de ellas y los que estén situados en localizaciones vecinas podrán experimentar reacciones de condensación. Se puede considerar que el metabolismo se origina cuando las reacciones de un estado inicial desordenado lo empujan contra el gradiente de probabilidad a acceder a otro estado final ordenado. Los coacervados crecen y se reproducen estadísticamente.

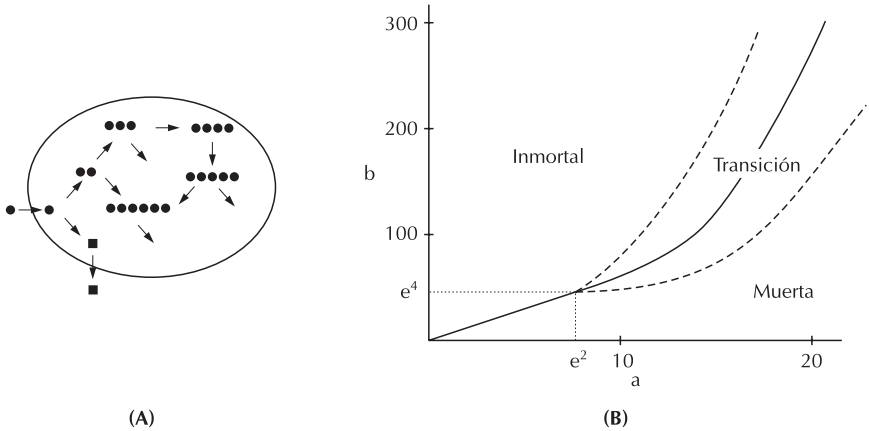


Figura 2.5.Protocélula (A) y espacio de estados (B) del modelo de Dyson.

El modelo de Dyson queda descrito por una exponencial de tres parámetros: *a* (diversidad química de los monómeros), *b* (grado de discriminación de los catalizadores) y *N* (tamaño de la población molecular). Las transiciones que tienen lugar con una probabilidad razonable desde el estado inicial hasta el final dependerán del intervalo de valores de dichos parámetros. En la figura 2.5.B se muestra las tres regiones del espacio de estados (*a*, *b*). La región "inmortal" carece de estados desordenados, la región "muerta" carece de estados ordenados y la región de "transición" contiene una mezcla de equilibrio de unos y otros y está circunscrita a los valores $a = 8\text{-}11$, $b = 60\text{-}100$ y $N = 2.000\text{-}20.000$. El valor $a = 10$ indica que la diversidad inicial de monómeros está más cerca de los aminoácidos (20 en las proteínas actuales) que de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

los nucleótidos (4 en los ácidos nucleicos actuales). Un catalizador orgánico sencillo tiene un parámetro $b = 50$ (en comparación con los de 5.000-10.000 de una polimerasa actual) y funciona con un índice de error de 0,25 (tres de cuatro monómeros están situados en la secuencia correcta), un nivel inaceptable para un sistema replicador. Una población con *N* de varios miles de monómeros unidos en unos cuantos cientos de polímeros ofrece una variedad estructural suficiente para permitir la existencia de ciclos catalíticos de interés.

S. A. Kauffman (1993), basándose en los principios de la química de polímeros y de la teoría de grafos aleatorios, ha presentado un modelo cuya conclusión fundamental es que el cierre catalítico exigido por la autorreproducción (Fig. 2.6) es una propiedad colectiva emergente de los conjuntos de polímeros catalíticos de suficiente complejidad (heterogeneidad y longitud máxima).

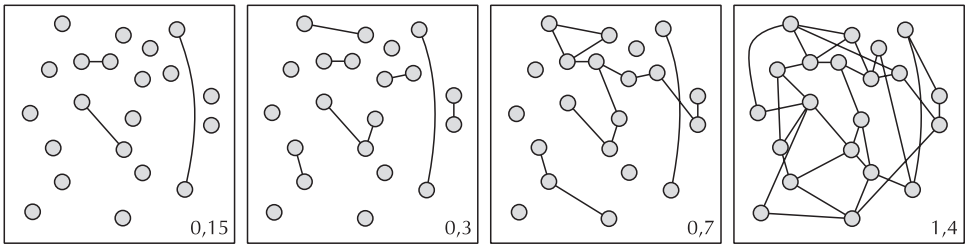


Figura 2.6. Cierre del grafo de *N* polímeros (círculos) y *K* reacciones (líneas). Los números indican la relación *K*/*N*.

Existen situaciones en las que el cierre se obtiene con conjuntos de menos de $3{,}5 \times 10^7$, o incluso con 6.200, polímeros aleatorios, según se tengan en cuenta exclusivamente reacciones de síntesis y escisión o se incluyan reacciones de intercambio con aparición de nuevos enlaces.

El modelo de la sopa prebiótica supone que las células primordiales habrían sido heterótrofas anaerobias que fermentaban las micromoléculas del medio y acoplaban las reacciones rédox con fosforilaciones a nivel de sustrato. La desaparición gradual de las condiciones prebióticas, el agotamiento de los nutrientes y el continuo aumento de la población celular propiciarían la evolución de procesos metabólicos independientes de la síntesis abiótica que contribuyeran a un imprescindible reciclaje de la materia. Estos sistemas autótrofos podrían haber sido quimiótrofos o fotótrofos anaerobios parecidos a los metanógenos o a las bacterias rojas/verdes actuales. Esta visión ha cambiado drásticamente en los últimos tiempos debido a los resultados obtenidos mediante estudios de bioquímica comparada y análisis filogénico (Ver 2.5.4).

Modelo del mundo de hierro-azufre

Un siglo después de que E. Haeckel propusiera un origen autótrofo de la vida, G. Wächtershäuser (1988) presentó una teoría según la cual los humeros submarinos ri-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cos en Fe(II) y H_2S serían un posible escenario para la síntesis prebiótica de micromoléculas y su ulterior evolución en tres fases, Precelular → Semicelular → Celular, en las que sucesivamente predominarían el metabolismo de superficie, el de superficie/membrana/citosol y el de membrana/citosol. El modelo se basa en consideraciones termodinámicas y cinéticas de las reacciones químicas producidas en la superficie cargada positivamente de los cristales de pirita formados en condiciones termoacidófilas (Fig. 2.7.A y B).

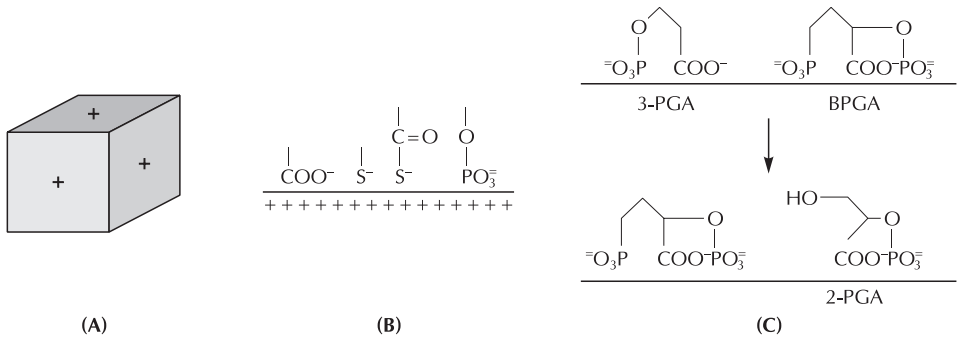


Figura 2.7. Cristal de pirita (A) al que se adsorben aniones (B) y se potencian las reacciones de transferencia (C) y de condensación.

Las reacciones iniciales fundamentales son la fijación autocatalítica de CO_2 (y CO) a 100 °C y 0,2 MPa impulsada por la formación oxidativa de pirita ya que el par H_2 / 2 H^+ + 2 e^- no es suficientemente reductor:

$$CO_2 + FeS + H_2S \longrightarrow HCOOH + FeS_2 \qquad \Delta G^o = -11{,}7 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$4\ CO_2 + 7\ FeS + H_2S \longrightarrow (CH_2{-}COOH)_2 + 7\ FeS_2 + 4\ H_2O \qquad \Delta G^o = -420 \text{ kJ mol}^{-1}$$

G. D. Cody *et al.* (2000) han presentado pruebas experimentales sobre la formación de piruvato a 250 °C y 200 MPa por doble carbonilación.

Los aniones se adsorben a las superficies teniendo lugar una primitiva compartimentación que, al mantenerlos en estrecha proximidad (sólo son posibles translaciones con dos grados de libertad), potencia reacciones de condensación y cuasiintramoleculares (transferencias, rédox), con formación de multitud de metabolitos azufrados, nitrogenados y fosforados, coenzimas incluidas, y polímeros. Es posible que funcionara una versión primitiva del ciclo de Krebs con participación de piruvato y metiltioacetato.

La capa monomolecular de sustancias orgánicas adsorbidas en la interfase mineral-agua constituye un "metabolista de superficie". Un subconjunto autosuficiente del mismo puede incorporar más nutrientes inorgánicos, experimentar reordenaciones y dispersarse. Esta extención es tanto un proceso de crecimiento como de reproducción ya que se generan más de tales subconjuntos. Es mantenida a raya por la tendencia a la desorción, que actúa así como agente selectivo. Los "organismos" de superficie con rutas metabólicas autocatalíticas no dependen de la copia de plantillas ya que pueden crecer, reproducirse y evolucionar sin maquinaria genética.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Al formarse isoprenoides, propensos a no despegarse, se acumulan y ejercen un efecto lipofilizante. Las primitivas sustancias exclusivamente hidrófilas empiezan a mezclarse con las lipófilas y, al actuar éstas de disolvente bidimensional, expulsan al agua de la superficie, reduciéndose la protonación e hidrólisis y promoviéndose la condensación. Al aumentar los lípidos tiene lugar una separación de fases con segregación de dominios hidrófobos. Las primeras membranas adheridas a la superficie están formadas por monoésteres de glicerol-fosfato interdigitados ya que sus cabezas tienen mayor sección que las colas. Posteriormente emergen diésteres y se forman bicapas.

La distribución bidimensional "aceite en agua" (Fig. 2.8.A) se invierte a otra de "agua en aceite" (Fig. 2.8.B) al ir aumentando la concentración lipídica y aparecen "estructuras semicelulares" que representan los primeros signos de individualización y sólo pueden prosperar en ambientes hipersalinos. Al ir apareciendo polipéptidos con restos lipófilos y básicos, las reacciones se liberan de la superficie y emerge un metabolismo membranal y citosólico. La celularización se logra por "astricción" o despegue del soporte mineral (Fig. 2.8.C), ayudadas por ósmosis, y tiene dos importantes repercusiones bioquímicas, imposibles de verificarse en la fase precelular:

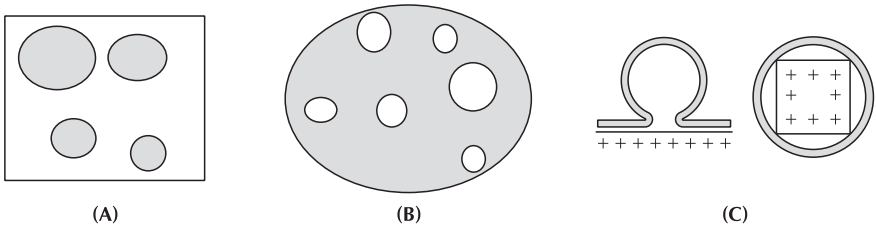


Figura 2.8. Estructuras precelulares (A), semicelulares (B) y celulares (C).

a) La conservación de la energía por fosforilación (a nivel de sustrato y de membrana, Fig. 2.9).

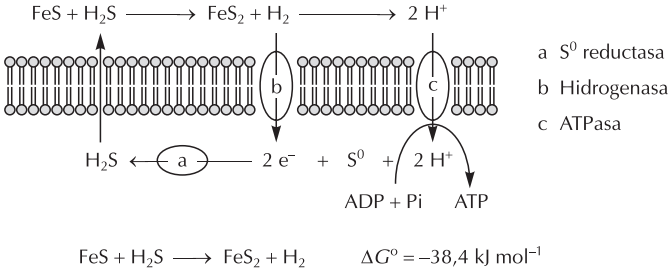


Figura 2.9. Hipotética fosforilación a nivel de membrana accionada por la formación de pirita.

b) La aparición de un catabolismo (heterotrofia) por salvamiento de las sustancias desorbidas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Para C. de Duve (1991) existen serias objeciones del origen ácido y caliente de la vida (inestabilidad y necesidad de altas concentraciones de sustratos) y ha propuesto un modelo denominado "Mundo del tioéster-hierro" cuyo postulado central es la esterificación de ácidos carboxílicos por tioles, ambas sustancias de origen prebiótico:

$$R'-SH + R-CO-COOH \longrightarrow R'-S-CO-R + CO_2$$

La síntesis de un enlace tioéster es un proceso endergónico en condiciones fisiológicas. De Duve ha analizado la formación espontánea termoacidófila y oxidativa. La primera posibilidad tiene los mismos inconvenientes del modelo de Wächtershäuser. Considerando la segunda, el autor se inclina por los iones férricos originados for fotooxidación ultravioleta (Fig. 2.10).

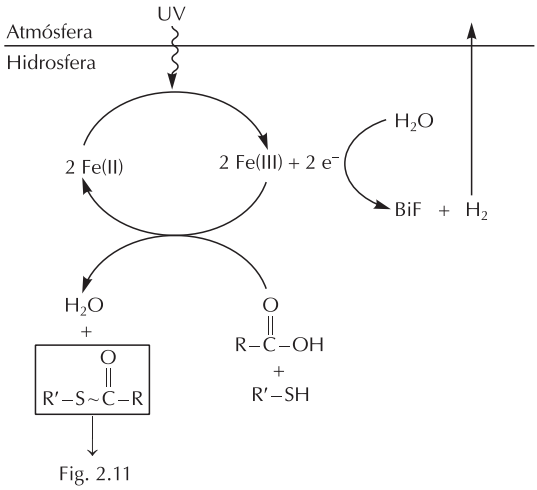


Figura 2.10. Formación fotoxidativa de tioésteres.

No obstante, en la Tierra arcaica habría muchos aceptores electrónicos apropiados (nitrato, nitrito, sulfato, azufre, nitrógeno y protones), para que tuviera lugar la síntesis oxidativa de tioésteres. Un ciclo Fe(II)/Fe(III) + e^- accionado por la luz UV soportaría la vida floreciente, igual que el ciclo H_2O / ½ O_2 + 2 H^+ + 2 e^- accionado por la luz visible soporta la vida actual, con la diferencia crucial de que el primero no requiere membranas, cromóforos o fotocatalizadores. La rotura de enlaces tioéster promovería un rico catálogo de reacciones metabólicas (Fig. 2.11).

La celularización (encapsulación) sería un proceso posterior.

Modelo del mundo de RNA

Los experimentos de selección *in vitro* realizados inicialmente por S. Spiegelman *et al.* (1967), analizados teóricamente por M. Eigen (1971), y el descubrimiento de las ribozimas (T. R. Cech *et al.*, 1981), han abierto extraordinarias expectativas para este

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

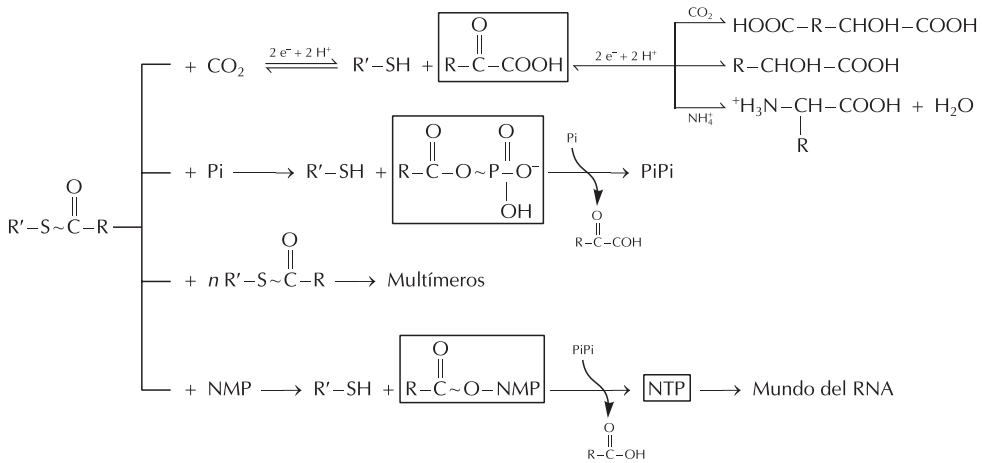


Figura 2.11. Tipos de reacciones promovidas por la rotura de tioésteres.

modelo de biogénesis. El mundo del RNA podría haber emergido como la primera forma de vida si se cumplieron los tres requisitos siguientes (W. Gilbert, 1986):

a) El ambiente prebiótico disponía de los monómeros apropiados.
b) Se dieron las condiciones para que pudieran formarse polirribonucleótidos.
c) Algunos de ellos eran capaces de autorreplicarse.

G. F. Joyce (2002) ha indicado las posibles avenidas que permiten superar la confusa química prebiótica y confieren fundamento al mundo del RNA ya que esta molécula posee varias propiedades que la hacen apropiada para comportarse como un sistema darwiniano simple:

a) No es imposible que pudieran darse las condiciones especiales que llevaran a la síntesis preferencial de β-D-nucleótidos activados y su polimerización.
b) Quizás la vida no comenzara con RNA, sino con polímeros análogos o precursores de él (Fig. 2.12).
c) Otra posibilidad es que el RNA fuera precedido por sistemas autorreplicadores que no se parecieran a los ácidos nucleicos, tales como arcillas politípicas (A. G. Cairns-Smith, 1966) o péptidos (D. H. Lee *et al.*, 1996).

La evolución del RNA *in vitro* implica, exactamente igual que la evolución de los organismos en la naturaleza, rondas repetidas de amplificación selectiva que acoplen la supervivencia de una especie molecular a una idoneidad definida por el experimentador como, por ejemplo, la capacidad de una secuencia de RNA de catalizar una reacción particular. Posteriormente, las moléculas seleccionadas se multiplican mediante técnicas moleculares estándar (retrotranscripción, PCR y transcripción) y se repite el procedimiento.

S. Spiegelman *et al.* (1967) hicieron los primeros experimentos de evolución *in vitro* mediante la técnica de transferencias en serie. Usaron un sistema tamponado con-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

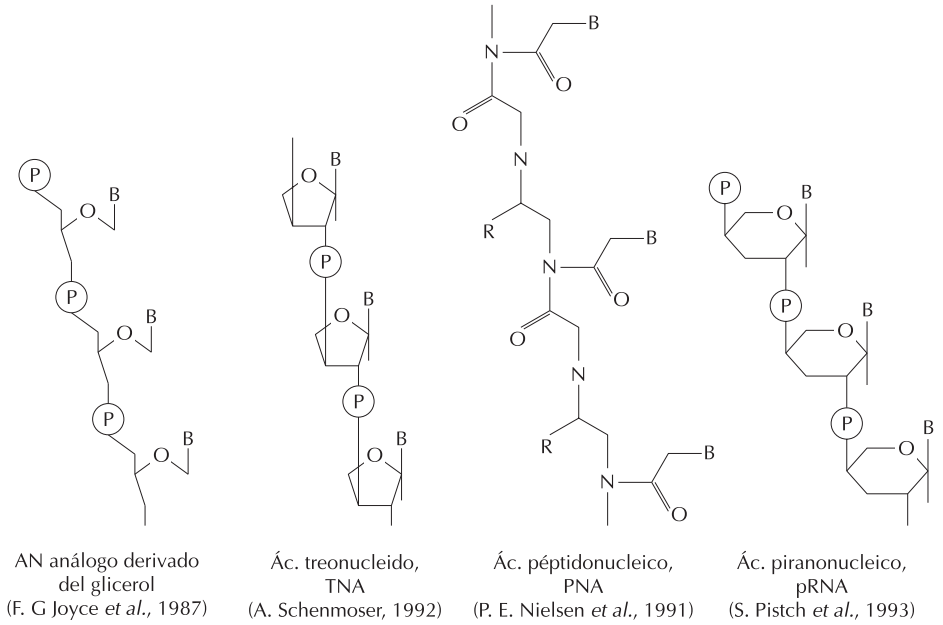


Figura 2.12. Modelos de polímeros análogos al RNA.

teniendo el RNA y la replicasa purificados del fago Qβ y un lote de NTP. Después de un cierto tiempo de incubación para que tenga lugar la replicación, se transfieren seriadamente pequeñas muestras a tubos conteniendo replicasa y NTP (Fig. 2.13.A). Estas transferencias seleccionan la velocidad de replicación (ya que en las alícuotas habrá mayor número de ciertas secuencias) y no el contenido informativo (con capacidad de infectar a *E. coli*) y, al cabo de unas cuantas generaciones, el RNA viral pierde su poder infeccioso (Fig. 2.14.B). Después de unos 70 pases, el sistema termina estabilizándose en una población de secuencias (equilibrio de selección) y, aunque

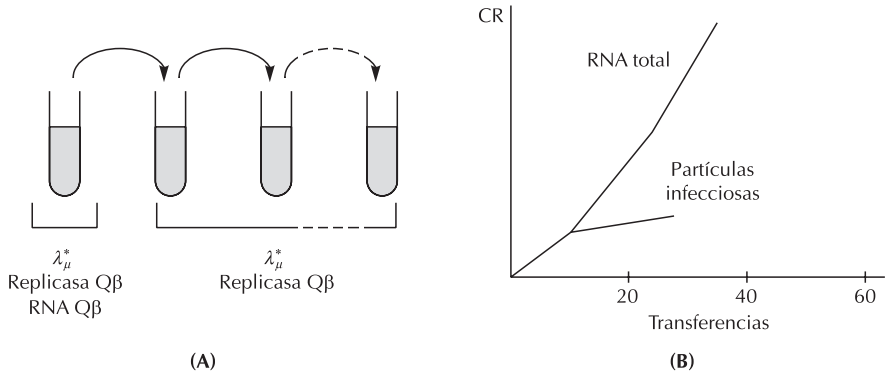


Figura 2.13. Experimentos de transferencia (A) y seguimiento de la replicación (B).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

éstas tienen el 17% del tamaño original, se replican unas 15 veces más rápidamente. Estas "minivariantes" constituyen un ejemplo de adaptación molecular.

Los experimentos de selección *in vitro* han sido exhaustivamente analizados por M. Eigen *et al.* a partir de los años 70, empleando un "reactor evolutivo" formado por una cámara de volumen constante con secuencias plantilla I_i, monómeros activados y replicasa Qβ (Fig. 2.14).

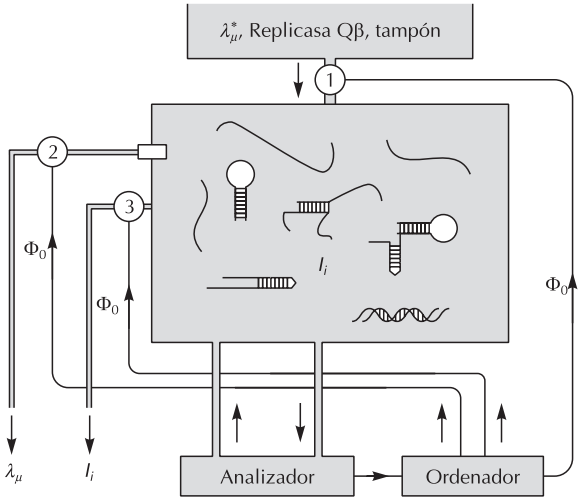


Figura. 2.14. Reactor de flujo para estudiar la evolución molecular.

Por la válvula 1 entran los monómeros activados λ_μ^* ($\mu = 4$ para AN) y por las válvulas 2 y 3 salen, respectivamente, moléculas de baja masa molecular (monómeros λ_μ y productos degradados) y de alta y baja masas moleculares (secuencias I_i). Un polímero del espacio de secuencias $\text{HPL}_{\lambda,\nu} = \lambda_\mu^\nu$ está sometido a los siguientes procesos:

a) Autorreplicación según sus capacidades cinéticas de amplificación A_i y de fidelidad de copia Q_i.
b) Degradación según su capacidad de hidrólisis D_i.
c) Abandono del sistema según su concentración, con un flujo proporcional a Φ_o.

En estas condiciones de estado estacionario se puede escribir el esquema cinético siguiente:

$$\begin{aligned}
&I_i + \lambda_\mu^* \xrightarrow{[A_i\, Q_i]} n\, I_i \\
&I_i + \lambda_\mu^* \xrightarrow{[A_i\,(1-Q_i)]} n\, I_i + m \sum_{j \neq i} I_j \\
&I_i \xrightarrow{[D_i]} \lambda_\mu \\
&(I_i)_i \xrightarrow{[\Phi_o]} (I_i)_o
\end{aligned} \tag{2.2}$$

y resolverlo numéricamente para ciertas condiciones de contorno.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la figura 2.15 se representan la soluciones gráficas de tres escenarios. Cuando la replicación es fiel ($Q_i = 1$) y la población no es constante (PNC), se produce una segregación en la que unas secuencias son más abundantes que otras (Fig. 2.15.A). Para el caso de población constante (PC), hay una secuencia llamada copia maestra (I_m) que se selecciona a expensas de las demás y el sistema acaba estabilizándose (equilibrio selectivo, Fig. 2.15.B). Por el contrario, para PC y replicación defectuosa ($Q_i < 1$), se da una evolución por selección (Fig. 2.15.C) ya que en cualquier momento puede aparecer una secuencia I'_m con mayor productividad que la copia maestra. En realidad siempre habrá una cola de error formada por secuencias ligeramente parecidas a la maestra. A dicho conjunto de secuencias se denomina cuasiespecie.

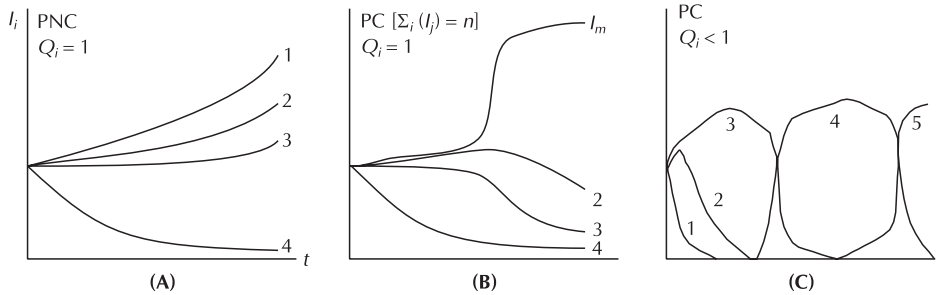


Figura 2.15. Segregación (A), selección (B) y evolución (C) de las secuencias.

La crisis del equilibrio selectivo únicamente se puede superar si se logra la coexistencia de diversas cuasiespecies mediante relaciones funcionales cíclicas que M. Eigen (1971) denomina hiperciclos. Aunque inicialmente propuso hiperciclos constituidos por ácidos nucleicos y enzimas, éstas pueden sustituirse perfectamente por ribozimas.

Para describir formalmente un hiperciclo elemental compuesto por las dos cuasiespecies I_1 e I_2 (Fig. 2.16.A1) hay que añadir al esquema cinético (2.2) otras cuatro ecuaciones que tengan en cuenta las autorreplicaciones fiel y defectuosa cruzadas, es decir, de I_1 catalizada por I_2 y de I_2 catalizada por I_1. Al resolver para las condiciones CP y $Q_i < 1$ se obtienen tres estados estacionarios, dos inestables y otro asintóticamente estable (Fig. 2.16.B1). Un hiperciclo elemental puede crecer ya sea disminuyendo el umbral de error de las unidades autorreplicativas (alargamiento de la secuencia) o incorporando nuevas unidades provenientes de la cola de error de alguna de las cuasiespecies preexistentes (Fig. 2.16.A2). Los hiperciclos de tres cuasiespecies también tienen estados asintóticamente estables (Fig. 2.16.B2) y a partir de cuatro elementos, algunos valores de las constantes k_{ij} llevan a ciclos límite y caos. Un hiperciclo puede aprovecharse exclusivamente de alguna ventaja selectiva si está compartimentado (reducido a un pequeño volumen) dado que le confiere individualidad y entonces puede competir con otros.

El postulado central del mundo del RNA es la replicación de dicho polímero catalizada por RNA (ribozimas). El mecanismo estándar sería la polimerización de mono-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

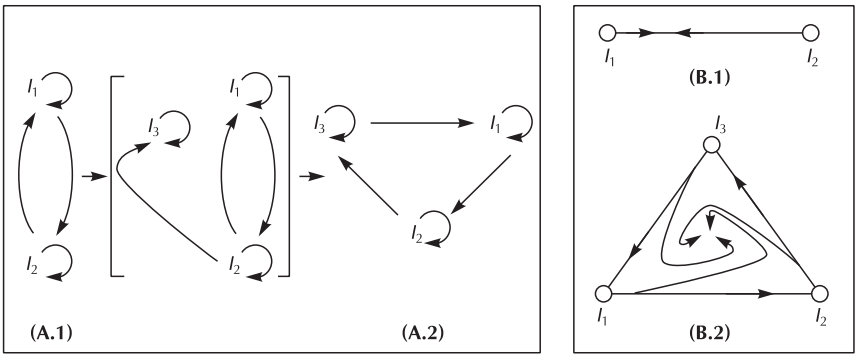


Figura 2.16. Hiperciclo elemental de dos cuasiespecies (A1) y crecimiento por incorporación (A2). Diagrama de fases de las soluciones (B).

nucleótidos activados dirigida por una plantilla, aunque también sería factible ligación de oligonucleótidos (ensamblaje modular). No se conoce ninguna ribozima celular capaz de polimerizar NTP sobre una plantilla pero mediante experimentos de evolución *in vitro* se han seleccionado ribozimas artificiales. Así, una ribozima de unos 200 nucleótidos, aislada por E. H. Ekland *et al.* (1995) a partir de la ligasa de la clase I, es capaz de alargar un cebo complementario a una plantilla externa, añadiendo con una fidelidad del 97% catorce nucleótidos por día (W. K. Johnston *et al.*, 2001). Aunque dicha actividad no sea suficiente para fundar la replicación de una molécula del tamaño del catalizador, en principio no existen obstáculos fundamentales que permitan conseguir la actividad adecuada, dados el enorme número de polimerasas teóricamente posibles y la potencia de los métodos de búsqueda.

Simulaciones *in silico* realizadas con autómatas celulares por P. Szabó *et al.* (2002) han puesto de manifiesto que después de millones de pasos evolutivos una población de cuasiespecies inicial puede mejorar sus propiedades replicadoras. Sea una población de macromoléculas formadas por combinaciones de los monómeros A, B, C, D que se encuentran adsorbidas en una superficie. Entre dos secuencias vecinas P y R puede ocurrir que P actúe de replicasa y copie a la plantilla R o que R haga de replicasa y copie a la plantilla P. El proceso de replicación depende de la estructura primaria y está determinado por tres propiedades: velocidad [$r(n)$] y fidelidad [$f(n)$] de la replicasa y calidad [$t(n)$] de la plantilla. A efectos de simulación se supone que cada propiedad está potenciada por un tipo distinto de resto (D se considera neutro en este sentido). También se considera que cada propiedad es una función sigmoidal del número n de restos de la porción contigua poliM más larga que tenga la macromolécula. Así, la velocidad de replicación es:

$$r(n_A) = \alpha_A + (1 - \alpha_A) \cdot \frac{n_A^{\beta_A}}{\gamma_A + n_A^{\beta_A}} \tag{2.3}$$

Con los parámetros apropiados α_B, β_B, γ_B y α_C, β_C, γ_C se definen de la misma forma las funciones $f(n_B)$ y $t(n_C)$. Dado que no se sabe calcular las propiedades partiendo de la secuencia, se supone que están asociadas con distintas porciones de la molécu-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

la y que existe un triple compromiso, esto es, una propiedad se puede realzar a costa de reducir las otras dos.

A $t = 0$ se siembra la mitad de los sitios (celdillas del autómata) con pentámeros de secuencia aleatoria y se sigue la evolución durante millones de generaciones. La selección favorece a los replicadores más rápidos y fieles y que actúen mejor como plantilla. Una secuencia que sea muy buena plantilla tiene alta probabilidad de ser copiada por las de los alrededores. La ventaja selectiva en lo que se refiere a velocidad y fidelidad es más sorprendente. Un replicador que posea tales capacidades copiará a sus vecinos con gran probabilidad pero para que ella pueda copiarse necesita tener buenos replicadores a su alrededor. Por tanto, la ventaja de estas moléculas surge de los patrones de agregación que vayan resultando y es esencial que se dé un altruismo recíproco molecular.

Partiendo de pentámeros poco funcionales se logra obtener replicadores más complejos y eficaces (Fig. 2.17.A, B) hasta alcanzarse el estado estacionario impuesto en el que la distribución de secuencias consta de dos picos (Fig. 2.17.C). El pico pequeño está formado por cortas secuencias con actividad replicasa deficiente pero con gran capacidad de actuar como buenas plantillas. Se comportan como parásitos ya que no pueden existir sin las replicasas vecinas pero al carecer ellas mismas de tal actividad no contribuyen al "bien" de la población. El pico 2 está fomado por secuencias largas y complejas con gran potencia catalítica y buena capacidad para actuar de plantilla.

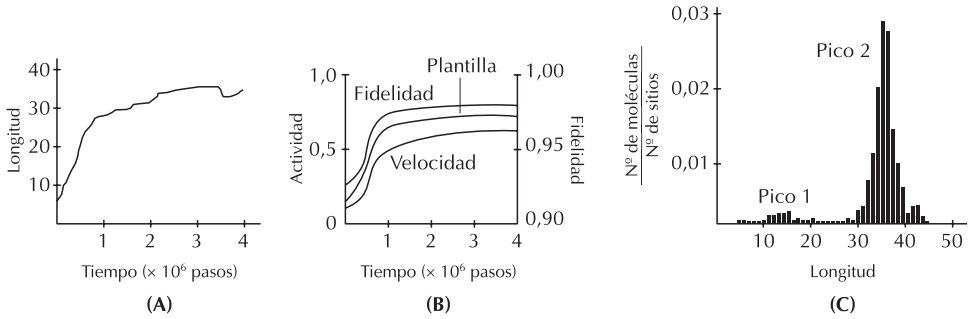


Figura 2.17. Evolución de los replicadores.

Las interacciones locales y la dispersión limitada garantiza que los parásitos no se extiendan por encima de cierto límite y compitan con los replicadores altruistas recíprocos. La estructura espacial juega un papel clave en la contención de los parásitos, como queda demostrado cuando se simula el "campo promedio", es decir, cuando se emplea un replicador que tenga unas facultades medias: la densidad cae en picado y se extingue. Si el modelo incorpora la difusión, los altruistas pierden fidelidad y sus propiedades declinan, confirmando, pues, que el aislamiento (individualización) es una propiedad esencial de la evolución.

J. W. Szostak *et al.* (2001) han diseñado un protocolo para sintetizar *de novo* un sistema que pueda considerarse vivo:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

a) Una población de secuencias de RNA susceptibles de actuar como plantillas y polimerasas, dos actividades en principio mutuamente excluyentes, no es imposible si opera el ciclo propuesto por P. A. Sharp (1985): la fusión de un ácido ribonucleico bicatenario puede en teoría proporcionar una ribozima (por ejemplo la cadena +) que catalice la polimerización de oligos sobre la plantilla complementaria (Fig. 2.18).

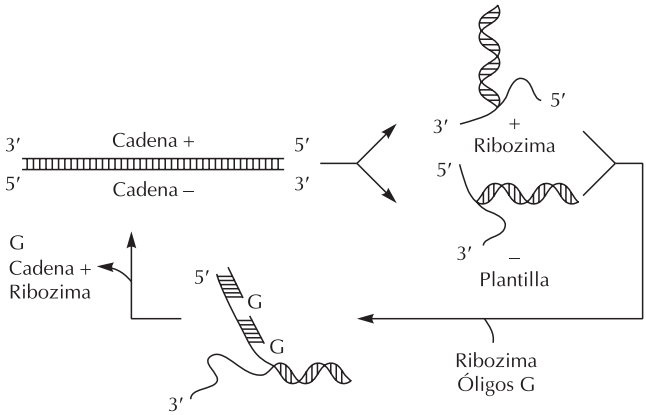


Figura 2.18. Ciclo de Sharp.

b) Para que la población adquiera la exclusividad que exige la evolución darwiniana tiene que aislarse del medio por compartimentación en vesículas. Micelas de mono o biésteres prebióticos podrían haber constituido el corazón de las membranas.

Una replicasa de RNA capaz de autorreplicarse dentro de un compartimento membranoso que pueda autoensamblarse y dividirse espontáneamente es una protocélula (Fig. 2.19.A). Para que ésta se convierta en célula es necesario que se acoplen replicasa y membrana (Fig. 2.19.B) y que el proceso confiera idoneidad.

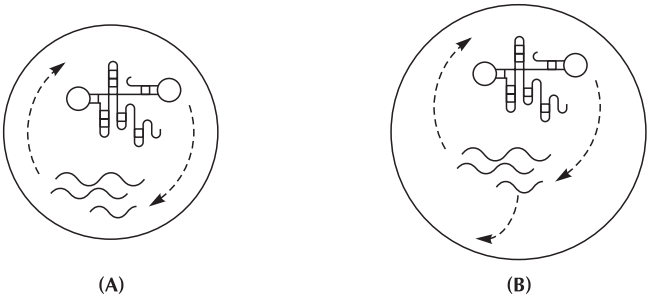


Figura 2.19. Protocélula (A) y célula mínima (B).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Aunque los materiales de partida (azúcares, precursores de las bases, polifosfato) para la emergencia del mundo del RNA podrían haber sido proporcionados por el ambiente prebiótico, en algún momento tuvo que aparecer una organización química específica asistida por catalizadores (metabolismo). Los experimentos de evolución *in vitro* también han proporcionado ribozimas que catalizan la formación de nucleótidos, su activación y otros tipos de reacciones, como transferencia de acilos, alquilación de N– y S– y síntesis de enlaces C–C y C–N. La síntesis de tetrapirroles y proteínas también son candidatos del mundo del RNA. No obstante, existen reacciones importantes que, hasta la fecha, no han podido ser catalizadas por ribozimas. Queda por especificar el problema de la compartimentación. Ésta pudo lograrse de forma pasiva, sea sobre la superficie de partículas, en el interior de poros o en aerosoles.

No resulta difícil imaginar que algunas ribozimas llegaran a funcionar como DNA polimerasas y otras, como peptidiltransferasas, facilitando la transición al mundo del DNA, caracterizado por los ribosomas, el código genético y las proteínas. Esta cuestión esencial permanece largamente abierta. Una vez formada la célula mínima, que podría haber tenido una complejidad inferior o parecida a la de los micoplasmas actuales, emergerían los procariotas y, de forma explosiva, los eucariotas unicelulares y pluricelulares.

2.5. Evolución del metabolismo

Actualmente se piensa que el antecesor común más reciente de todos los organismos vivos (LUCA) debió ser una entidad compleja conteniendo un sistema de fosforilación oxidativa acoplado a una o varias cadenas respiratorias aerobias y anaerobias junto con las enzimas que les proporcionaran los electrones (deshidrogenasas e hidrogenasas), un sistema fijador de nitrógeno y otro desnitrificador ya que tanto en *Archaea* como en *Bacteria* se encuentran las enzimas correspondientes (Fig. 2.20.A). Por el contrario, no es probable que LUCA fuera fotosintético ya que en *Archaea* no se han encontrado centros de reacción clorofílicos. En principio podría parecer un contrasentido pensar que la respiración aerobia apareciera antes de que las cianobacterias enriquecieran de oxígeno la atmósfera. Pero existen organismos capaces de respirar aeróbicamente a bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5%), que en aquellos tiempos podrían haber sido proporcionadas por la fotolisis UV del agua.

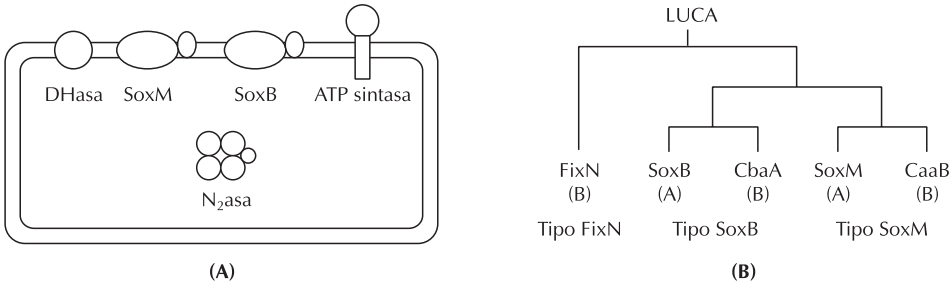


Figura 2.20. Complejidad mínima de LUCA (A). Árbol filogénico de la subunidad I de la citocromo oxidasa (B).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2.5.1. Metanogénesis

Las arqueobacterias metanógenas, relegadas actualmente a hábitats exóticos, son buenos candidatos para organismos muy primitivos ya que son tanto productores (quimiolitoautótrofos):

$$CO_2 + 4\ H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -131\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$4\ CO + 2\ H_2O \longrightarrow CH_4 + 3\ CO_2 \qquad \Delta G^{o\prime} = -210\ \text{kJ mol}^{-1}$$

como consumidores y recicladores (quimioorganotrofos):

$$CH_3OH + H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -113\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$4\ HCOOH \longrightarrow CH_4 + 3\ CO_2 + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -145\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$CH_3\ COOH + H_2O \longrightarrow CH_4 + CO_3H_2 \qquad \Delta G^{o\prime} = -31\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Los fragmentos monocarbonados se pueden convertir en Ac-CoA y, junto con el NH_4^+ producido por fijación, en las demás biomoléculas. El tiempo de residencia del metano en las condiciones anóxicas de la Tierra primitiva sería unas mil veces mayor que el actual (10 años) y produciría un efecto invernadero que paliaría la debilidad solar (respecto a la actual) y propiciaría los hábitats termófilos tan característicos de estos organismos.

2.5.2. Sintrofia

La fermentación es un buen procedimiento para producir energía metabólica en condiciones anaerobias. Aunque algunas fermentaciones no proporcionan la energía suficiente para vivir, pueden considerarse útiles cuando se acoplan a otras reacciones. Así, cuando la fermentación de alcohol a acetato de agunas especies ($\Delta G^{o\prime}$ = = 19,3 kJ mol^{-1}) se acopla a la metanogénesis de otras ($\Delta G^{o\prime} = -131$ kJ mol^{-1}) se puede lograr una transferencia de hidrógeno interespecífica que hace viable el consorcio:

$$2\ CH_3CH_2OH + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ CH_3COOH \qquad \Delta G^{o\prime} = -111\ \text{kJ mol}^{-1}$$

2.5.3. Respiración

El análisis filogénico de la superfamilia de la citocromo oxidasa (la enzima terminal de la respiración aerobia) ha puesto de manifiesto la existencia de tres familias distintas (Fig. 2.20.B). Dos de éllas (SoxB y SoxM) se encuentran en *Archaea* y *Bacteria* y la otra (FixN) es exclusiva de *Bacteria* y puede usarse como grupo externo con fines comparativos. La NO y NO_2 reductasas son homólogas de las subunidades I y II de las citocromo oxidasas y catalizan reacciones similares:

$$2\ NO + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow N_2O + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -306\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$N_2O + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow N_2 + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -339\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$\tfrac{1}{2}\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -120\ \text{kJ mol}^{-1}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

J. Castresana *et al.* (1995, 1999) han propuesto que las citocromo oxidasas de tipo FixN han evolucionado a partir de la NO reductasa y que la respiración aerobia deriva de la desnitrificación. El centro Fe – Fe que reduce el NO es más antiguo que el Fe – Cu reductor del O_2 y es probable que la primera citocromo oxidasa de LUCA usara el NO como aceptor de electrones.

En la cadena respiratoria aerobia sólo existe un aceptor terminal pero en la cadena respiratoria desnitrificadora hay muchos (NO_3^-, NO_2^-, NO y N_2O):

$$2\ NO_3^- + 12\ H^+ + 10\ e^- \longrightarrow N_2 + 6\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -555\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Desde una perspectiva filogénica y geológica también es probable que LUCA respirara alguno de los posible compuestos azufrados (sulfato, sulfito, tetrationato y azufre):

$$SO_4^= + 4\ H_2 \longrightarrow S^= + 4\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -596\ \text{kJ mol}^{-1}$$

2.5.4. Fotosíntesis

S. Granick postuló en 1965 que la clorofila (Chl) debió preceder a la bacterioclorofila (Bchl) dado que la biosíntesis de la primera requiere un paso menos de reducción (Fig. 2.21.A). D. H. Burke *et al.* (1993) han aprovechado la circunstancia de que los genes *bchL* y *bchX* tienen una notable semejanza con *nifH*, que codifica las ferroproteínas de la nitrogenasa y, usando la secuencia de éste como grupo externo, han establecido las relaciones filogénicas de las proteínas ferroclorofílicas (Fig. 2.21.B) que ponen de manifiesto que BChl es anterior a Chl.

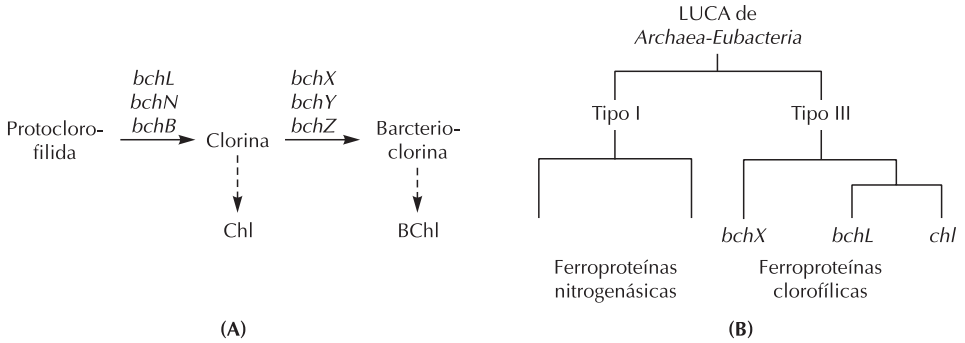


Figura 2.21. Biosíntesis de las clorofilas (A) y evolución de la fotosíntesis (B).

Sustancias orgánicas y sulfuro de hidrógeno proporcionarían en los organismos anaerobios los donadores de electrones:

$$2\ H_2S + CO_2 + h\nu \longrightarrow (CH_2O) + H_2O + 2\ S$$

Células facultativas, parecidas a algunas cianobacterias actuales, realizarían fotosíntesis oxigénica:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$H_2O + CO_2 + h\nu \longrightarrow (CH_2O) + O_2$$

Si, como supone W. Schopf (2000), los estromatolitos del grupo Warrawoona, de –3,5 a –3,2 Ga, fueron construidos por cianobacterias oxigénicas, el oxígeno resultante empezaría a oxidar el hierro ferroso del océano (formándose las BIF) hasta que el agotamiento de éste hizo posible la progresiva acumulación de aquél en la atmósfera.

2.5.5. Anabolismo

Lo más probable es que las células primitivas usaran la ruta del Ac-CoA para sintetizar biomoléculas. G. Wächtershäuser (1988) ha indicado que la formación de pirita puede impulsar la fijación autocatalítica de CO_2. Posteriormente evolucionaría el ciclo de Calvin.

R. Fani *et al.* (2000) han presentado pruebas filogénicas que indican que la fijación biológica de nitrógeno es anterior a –3,5 Ga y, por tanto, anterior a la divergencia de los tres dominios. Se supone que su primitiva función estaría relacionada con procesos de detoxificación de cianuros y compuestos relacionados ya que en las condiciones medianamente reductoras primitivas el NH_3 abundaría en la atmósfera. Al agotarse por causas físicas (fotolisis) y biológicas, la nitrogenasa se convertiría en mecanismo fijador antes de que la oxigenación de la atmósfera propiciara el advenimiento de la nitrificación.

2.6. Porqué apareció la vida

El término "vida" se define en el diccionario como "fuerza o actividad interna sustancial, mediante la que obra el ser que la posee. Estado de actividad de los seres orgánicos". La mayoría de los autores no tendrían inconveniente en admitir que un sistema está vivo si se autorreplica y está sujeto a evolución darwiniana y también que hay muchas clases de vida. El significado de muchas de ellas no sería cualitativamente distinto al de los entes no vivos, trátense de galaxias, montañas o cristales. Para algunos el problema deviene trascendental cuando se considera la vida humana y sus indudables misterios. Como la observación y la razón están preñadas de defectos (hecho evidente), según ellos hay que recurrir a una ayuda extracientífica ("*Fides praestat supplementum sensuum defectui*"). Para otros autores, incluso el significado de la vida humana es intrascendental porque leyes muy bien fundadas, léase Termodinámica, les conducen a pensar que "*Everything is driven by motiveless, purposeless decay*" (P. W. Atkins, 1981). Para M. Eigen (1992) "La vida no es una propiedad inherente de la materia sino una realidad histórica" y para S. A. Kauffman (1995) "La tensión creadora de la vida, equilibrada entre la sencillez estéril y la complejidad letal, no está enraizada en el ciego azar sino en la necesidad matemática". No es posible escapar de la sensación de ser víctimas de la verdad.

La biogénesis ha pasado de ser un misterio insondable a convertirse en un criptograma descifrable. Los avances logrados durante las últimas décadas son impresio-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

nantes pero todavía queda mucho camino por recorrer para encajar aceptablemente todas las piezas del rompecabezas. Es muy probable que la teoría que resulte ser la más adecuada contenga elementos de los tres modelos comentados (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Principales ventajas e inconvenientes de los modelos de biogénesis.

MODELO	VENTAJA	INCONVENIENTE
Sopa prebiótica	Facilidad de la polimerización	Propiedades de la membrana
Mundo del Fe-S	Elegancia, sencillez	Apoyo experimental
Mundo del RNA	Potencia de las técnicas	Inestabilidad del RNA?

La exploración espacial, los estudios de vida artificial (AL) y el desarrollo trepidante de las técnicas experimentales de la Biología Molecular seguirán acosando el problema de la biogénesis y, casi con toda seguridad, acabarán doblegándolo. El futuro que se vislumbra ahora en el horizonte no puede ser más prometedor.

Bibliografía

BERNAL, J. D. (1976). *El origen de la vida*. Destino. Barcelona.

BRODA, E. (1975). *The evolution of the bioenergetic processes*. Pergamon Press. Oxford.

CALVIN, M. (1969). *Chemical evolution*. OUP. London.

DE DUVE, C. (1991). *Blueprint for a cell*. Portland Press. Burligton.

DYSON, F. J. (1999). *Los orígenes de la vida*. CUP. Madrid.

EHRLICH, H. L. (1996). *Geomicrobiology*. Marcel Dekker. New York.

EIGEN, M. (1971). "Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules". *Naturwissenschaften*, 58, 465-523.

FOX, S. W., DOSE, K. (1977). *Molecular evolution and the origin of life*. Marcel Dekker. New York.

JONES, C. W. (1983). *Bacterial respiration and photosinthesis*. ASM. Washington.

JOYCE, G. F. (2002). "The antiquity of RNA-based evolution". *Nature*, 418, 214-221.

LAHAV, N. (1999). *Biogenesis*. OUP. New York.

LINE, M. A. (2002). "The enigma of the origin of life and its timing". *Microbiology*, 148, 21-27.

MADIGAN, M. T. *et al.* (1997). *Biology of microorganisms*. Prentice Hall. London.

MASON, S. F. (1991). *Chemical evolution*. OUP. Oxford.

MONTERO, F. *et al.* (1993). *Evolución prebiótica*. Eudena. Madrid.

OPARIN, A. I. (1973). *Origen de la vida sobre la Tierra*. Tecnos. Madrid.

SCHOPF, J. W. (2000). *La cuna de la vida*. Crítica. Barcelona.

SMIL, V. (2002). *The Earth's biosphere*. MIT Press. Cambridge, Ma.

WÄCHTERSHÄUSER, G. (1988). "Before enzymes and templates: Theory of surface metabolism". *Microbiol. Rev.*, 52, 452-484.

WILLS, C., BADA, J. (2000). *The spark of life*. OUP. Oxford.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 3
BIOENERGÉTICA MICROBIANA

Glosario
3.1. Conceptos bioenergéticos básicos
3.1.1. Los seres vivos cumplen las leyes de la Termodinámica
3.1.2. Medida de ΔG en función de las propiedades del sistema
La energía libre y las reacciones químicas
La energía libre y la transferencia de cargas eléctricas (iones, electrones)
La energía libre y la transferencia de masa
3.2. Las diversas formas de energía biológica
3.2.1. Energía luminosa
3.2.2. Potencial eléctrico
3.2.3. Potencial iónico
3.2.4. Impulso de reacciones endergónicas por Δp
3.2.5. Potencial de transferencia de grupos
3.3. Fermentación
3.3.1. Concepto de fermentación
3.3.2. Biotecnología de las fermentaciones
3.4. Conservación de la energía mediante generación de fuerzas motrices de iones
3.4.1. Descarboxilación
3.4.2. Fotoisomerización
3.4.3. Hidrólisis del ATP
3.4.4. Eflujo de ácidos
3.4.5. Intercambio de ácidos
3.4.6. Reacciones rédox
3.5. Respiración
3.5.1. Cadena respiratoria mitocondrial
3.5.2. Cadenas respiratorias de las eubacterias
3.5.3. Cadenas respiratorias de las arqueobacterias
3.6. Fotosíntesis
3.6.1. Tipos de fotosíntesis clorofílica
3.6.2. Centros de reacción fotosintéticos
Fotosistema de las bacterias púrpuras
Fotosistema de las bacterias verdes
La fotosíntesis oxigénica: acoplamiento PS II-PS I
3.6.3. Rendimiento de la fotosíntesis
Fotosíntesis anoxigénica
Fotosíntesis oxigénica
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Aceptor de electrones: Compuesto químico al que se pueden transferir electrones (oxidante).
Aerobio: Organismo que utiliza O_2 como aceptor de electrones en la respiración.
Anabólico: Proceso biosintético, consumidor de energía.
Anaerobio: Organismo que no utiliza O_2 como aceptor de electrones.
Anóxico: Desprovisto de O_2.
Autótrofo: Organismo que utiliza CO_2 como fuente de carbono para sintetizar biomasa.
Catabólico: Proceso degradativo, suministrador de energía.
Centro de reacción: Clorofila especial donde la energía luminosa se transforma en energía electrónica.
Centro FeS: Donador/aceptor universal de electrones que posee Fe y S lábil (Fe–S–Fe).
Citocromo: Donador/aceptor universal de electrones que posee grupo(s) hemo(s).
Clorofila: Pigmento captador de luz que posee Mg-porfirina.
Cloroplasto: Orgánulo subcelular que cataliza la fotosíntesis en los eucariotas.
Cromóforo: Grupo químico que absorbe luz a una determinada longitud de onda.
Donador de electrones: Compuesto químico que puede transferir electrones (reductor).
Δ: variación no infinitesimal de una magnitud.
Endergónico: Proceso que transcurre con aumento de G ($\Delta G > 0$).
Endotérmico: Proceso que absorbe calor.
Energía libre (*G*): Energía disponible en un sistema para realizar trabajo útil a P y T constantes.
º: Superíndice que denota condiciones estándares (para pH = 7 se emplea el superíndice º′).
Entalpía (*H*): Calor absorbido o desprendido en una reacción química a P constante.
Entropía (*S*): Grado de desorden o aleatoriedad de un sistema.
Exergónico: Proceso que transcurre con disminución de G ($\Delta G < 0$).
Exotérmico: Proceso que libera calor.
Feofitina: Clorofila desprovista de Mg.
Fermentación: Catabolismo anaeróbico donde la energía se conserva por fosforilación a nivel de sustrato.
Ferredoxina (Fd): Cofactor rédox FeS ($E^{0\prime}$ –0,42 V).
FeS: Agrupación de Fe y S unida a una proteína, que acepta y transfiere electrones.
Fosforilación a nivel de membrana: Síntesis de ATP a partir de una fuerza motriz de iones generada por una reacción química.
Fosforilación a nivel de sustrato: Síntesis directa de ATP a partir de un compuesto rico en energía química.
Fosforilación oxidativa: Síntesis de ATP a partir de una fuerza motriz de H^+ o Na^+ (FMP ó FMNa) generada por una reacción oxidativa.
Fotofosforilación: Síntesis de ATP a expensas de la FMP generada por energía solar.
Fotosíntesis: Transformación de la energía solar en FMP y energía electrónica con o sin liberación de O_2.
Fotosistema: Conjunto de transportadores de electrones donde la energía radiante se transforma en energía electrónica.
Fuerza motriz de iones (FMI): Estado energetizado de una membrana biológica que separa dos compartimentos con $[H^+]$ (Δp) ó $[Na^+]$ (Δn) diferentes.
Grana: Conjunto de sacos membranosos tilacoidales.
Hidruro: Ión H^-, equivalente a $1\ H^+ + 2\ e^-$.
Membrana biológica: Membrana formada por una bicapa fosfolipoproteica impermeable a los iones.
Mitocondria: Orgánulo subcelular donde tiene lugar la respiración aeróbica en los eucariotas.
μ: Potencial químico (μ_i) o energía libre de Gibbs molar de la sustancia i.
Nucleótido de flavina ($FADH_2$-$FMNH_2$): Donadores/aceptores universales de hidrógeno ($E^{0\prime}$ –0,2 V).
Nucleótido de nicotinamida y adenina (NAD(P)H): Donador/aceptor universal de hidruro ($E^{0\prime}$ –0,32 V).
Periplasma: En las bacterias Gram (+), espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa.
pH: Medida de la concentración de H^+ de un sistema ($pH = -\log [H^+]$).
Potencial de membrana (ΔΨ): Diferencia de potencial eléctrico entre las dos superficies de una membrana biológica.
Potencial rédox (*E*): Capacidad intrínseca de un sistema (expresada en V) para ceder o aceptar electrones.
Quinona (UQ, ubiquinona, MQ, menaquinona, o PQQ, pirrol-quinolín-quinona): Transportador de H soluble y móvil en la fase apolar de la membrana.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Reacción rédox: Transferencia de electrones desde un reductor a un oxidante.
Respiración: Reacción rédox normalmente acoplada a la generación de fuerza motriz de iones.
Sintetasa de ATP (F0F1): Enzima de la membrana que cataliza el proceso: $\Delta \boldsymbol{p} \leftrightarrow$ ATP.
Tilacoide: Saco membranoso donde se realiza la fotosíntesis oxigénica.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

3.1. Conceptos bioenergéticos básicos

Los seres vivos son sistemas dinámicos que se mantienen alejados del equilibrio gracias a flujos energéticos (solar o geotérmico) y al intercambio de materia (Fig. 3.1).

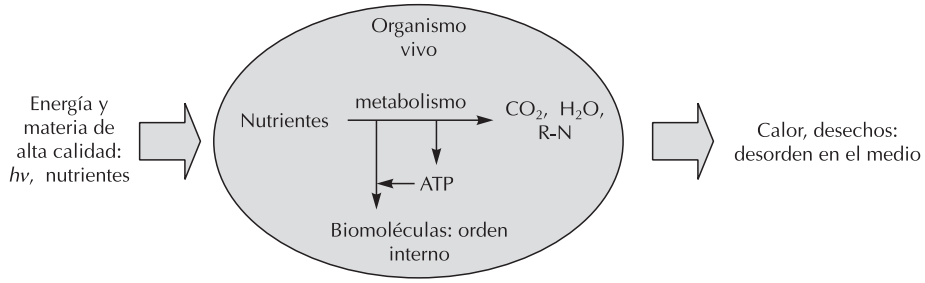


Figura 3.1. Los seres vivos utilizan la energía y los nutrientes mediante el metabolismo.

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas estructuradas en rutas catabólicas, que extraen energía y generan residuos, y rutas anabólicas, que utilizan energía y generan biomoléculas (azúcares, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) a partir de las cuales los seres vivos consiguen un alto grado de ordenación interna (estructura e información).

3.1.1. Los seres vivos cumplen las leyes de la Termodinámica

Primera ley: La cantidad total de energía de un sistema y su entorno es constante (en el Universo, la energía no se crea ni se destruye, únicamente se transforma):

$$\text{Glucosa} + O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + \text{energía calorífica} \qquad (3.1)$$

La primera ley exige que la energía potencial del sistema (Glucosa + O_2) liberada en la combustión se emplee para formar nuevos enlaces, se disipe como calor y/o se almacene de alguna forma.

En términos cuantitativos y para los sistemas bioquímicos (que evolucionan a presión constante) se puede describir la cantidad de calor asociada a la reacción anterior como la variación de entalpía (ΔH) del proceso, que se expresa en Julios o calorías (1 cal = 4,18 J) (*entalpía* significa *calentar el interior*) y que permite especular sobre la espontaneidad de los cambios. Así, la reacción de combustión de la glucosa libera calor al medio y es espontánea.

Pero no siempre los procesos espontáneos liberan calor: la expansión de un determinado número de moléculas de gas o soluto en un volumen mayor o la transferencia de calor desde un cuerpo caliente a uno frío son procesos espontáneos pero que transcurren con $\Delta H = 0$. Además, un proceso espontáneo puede incluso conllevar un $\Delta H > 0$: algunos solutos absorben tanto calor al disolverse que congelan el agua de disolución (Fig. 3.2).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

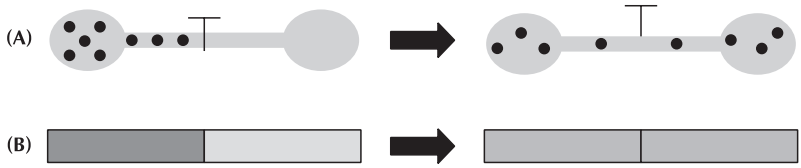


Figura 3.2. Procesos que ocurren espontáneamente sin cambio de entalpía ($\Delta H = 0$). (A) La materia fluye espontáneamente desde el compartimento donde su concentración o presión es mayor hacia donde es menor. (B) El calor fluye espontáneamente desde los cuerpos calientes a los fríos. A veces, un proceso espontáneo incluso absorbe calor ($\Delta H > 0$, disolución de CsCl en agua).

Estas observaciones condujeron a la búsqueda de una propiedad que señalara la espontaneidad de cualquier proceso de forma inequívoca y a la formulación de la segunda ley de la Termodinámica a partir de dos observaciones incontestables:

– Ningún artilugio es capaz de transformar toda la energía disponible en trabajo: parece como si parte de la energía del combustible se degradara a lo largo de su transformación en trabajo.
– Cualquier sistema evoluciona espontáneamente hacia un estado más probable o de máximo desorden.

El grado de desorden se cuantifica mediante la función de estado entropía (*en el cambio*), cuyas dimensiones son J K^{-1} ó cal K^{-1} y que depende de la cantidad de calor transferida a una T dada: $\Delta S = -\Delta H/T$ (el calor transferido al medio desordena éste).

La segunda ley establece que todo proceso espontáneo conlleva un aumento de entropía del universo (sistema + entorno): el ΔS del Universo (ΔS_{UNI}) > 0.

A primera vista, los seres vivos transgreden la 2ª Ley porque crecen de forma espontánea y autoorganizada [ΔS del sistema (ΔS_S) < 0], pero lo hacen desordenando aún más el medio que los rodea [ΔS del entorno (ΔS_E) $\gg$ 0], de forma que el cambio de S global (ΔS_{UNI}) es > 0.

En los sistemas biológicos es muy difícil determinar la entropía del medio, por lo que se hizo necesario encontrar una *función que tuviera en cuenta sólo las propiedades del sistema:*

Dado que

$$\Delta S_E = -\frac{\Delta H_S}{T}, \qquad \Delta S_{UNI} = \Delta S_S + \Delta S_E = \Delta S_S - \frac{\Delta H_S}{T}$$

de donde se deduce que

$$-T\,\Delta S_{UNI} = -T\,\Delta S_S + \Delta H_S \tag{3.2}$$

$-T\,\Delta S_{UNI}$ tiene dimensiones de energía y se denomina variación de la energía libre de Gibbs porque fue enunciada por John Willard Gibbs en 1878:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \tag{3.3}$$

La segunda ley exige que $\Delta S_{UNI} > 0$ y esto sólo ocurrirá si

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$\Delta S_S > \frac{\Delta H_S}{T} \qquad \text{ó bien} \qquad \frac{\Delta S_S}{T} > \Delta H_S$$

Por lo que S_{UNI} sólo aumentará si $\Delta H_S - T\,\Delta S_S < 0$, esto es, si $\Delta G < 0$.

Para cualquier cambio, la espontaneidad requiere que $\Delta G < 0$ y el proceso se denomina exergónico. El no-cambio (equilibrio), equivale a un estado de mínima energía libre y requiere que $\Delta G = 0$. Si $\Delta G > 0$ el proceso es no espontáneo o endergónico.

Los procesos que transcurren con disminución de energía libre (exergónicos) son aptos para realizar trabajo biológico como la síntesis o el transporte de biomoléculas.

3.1.2. Medida de ΔG en función de las propiedades del sistema

– La energía libre y las reacciones químicas

Para una reacción A → B se demuestra que

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{[B]}{[A]} \tag{3.3}$$

Siendo ΔG^{o} una constante del sistema, medida en condiciones estándares (concentración de solutos 1 M) y relacionada con la K_{eq} del mismo:

Si el sistema alcanza el equilibrio termodinámico, no hay cambio neto y $\Delta G = 0$, por lo que

$$\Delta G^{o} = -RT \ln \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = -RT \ln K_{eq} \tag{3.4}$$

– La energía libre y la transferencia de cargas eléctricas (iones, electrones)

Si se trata de un proceso donde se transfieren n cargas:

$$\Delta G = -nF\,\Delta E \tag{3.5}$$

F es la constante de Faraday (96.500 Culombios mol de cargas^{-1}), que permite calcular la energía (en Julios) asociada a un desplazamiento de cargas (en Culombios) a través de una diferencia de potencial ΔE (en Voltios): J = C × V.

– La energía libre y la transferencia de masa

Si el proceso consiste en la transferencia de moléculas desde un compartimento donde las moléculas están a una concentración c_1 a otro en el que están a una concentración c_2:

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_2}{c_1} \tag{3.6}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Estos tres tipos de procesos son muy importantes en bioenergética y constituyen la base del acoplamiento entre procesos exergónicos y endergónicos en los seres vivos:

Proceso exergónico $\longrightarrow$ Energía biológica $\longrightarrow$ Proceso endergónico

Unidades y constantes útiles en Bioenergética

Unidad de energía: joule ("julio"): Cantidad de energía asociada a 1 kg de masa en movimiento a 1 m s^{-1}.

Se necesitan 4,18 J (= 1 caloría) para aumentar 1 °C la temperatura de 1 g de agua pura (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Unidades y constantes utilizadas en Bioenergética.

(0 °C = **273,15** K)	Joule (J) = 1 kg m s^{-1} = **1 N m** = 1 CV
	Caloría (cal) = **4,18 J** (1 kcal = 10^3 cal)
Número de *Avogadro*:	N = **6,0221 × 10^{23}** moléculas mol^{-1}
Carga del electrón:	1,602 × 10^{-19} culombios
1 Culombio (C) equivale a **6,241 × 10^{18}** unidades de carga eléctrica (carga del e^-)	
Electrónvoltio (eV): energía asociada a la transferencia de 1 e^- para un ΔE = 1 V:	
	eV = 1,602 × 10^{-19} CV = 1,602 × 10^{-19} J
Constante de *Faraday* (carga de 1 mol de electrones):	
	F = N cargas e^- = **96.480 C/mol = 96.480 J V^{-1} mol^{-1}**
Constante de *Boltzmann* (coeficiente de proporcionalidad que permite pasar de J a K):	
	k_B = **1,3807 × 10^{-23}** J K^{-1}
Constante de los gases (valor del cociente PV/T para 1 mol de gas perfecto en condiciones estándares):	
	$R = Nk_B$ = **8,3145** J K^{-1} mol^{-1} = **1,9872** cal K^{-1} mol^{-1} = **0,082** L atm K^{-1} mol^{-1}
Constante de *Planck* (cuanto de acción):	h = 6,626 × 10^{-34} J s
Velocidad de la luz en el vacío:	c = 2,99 × 10^8 m s^{-1}

3.2. Las diversas formas de energía biológica

3.2.1. Energía luminosa

La luz es una forma de energía (radiante) que tiene a la vez naturaleza corpuscular y ondulatoria. Los cuantos de luz (fotones) poseen una energía que depende de la frecuencia (ν) o de la longitud de la onda (λ):

$$E = h\nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \qquad (3.7)$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La energía de 1 fotón de λ = 400 nm se calcula a partir de la λ:

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} = 6{,}626 \times 10^{-34}\ \text{J s} \times \frac{2{,}99 \times 10^{8}\ \text{m s}^{-1}}{400 \times 10^{-9}\ \text{m}} = 0{,}049 \times 10^{-17}\ \text{J}$$

Dada la escasa energía que transporta un fotón, es más cómodo expresarla en eV: $E = 0{,}049 \times 10^{-17}$ J = 3,0 eV.

En cambio, la energía de 1 mol de fotones (1 Einstein) se expresa mejor en kJ mol^{-1}. Así, la energía de 1 mol de fotones de 400 nm:

$$E = 0{,}049 \times 10^{-17}\ \text{J fotón}^{-1} \times 6{,}022 \times 10^{23}\ \text{fotones mol}^{-1} = 295\ \text{kJ mol}^{-1}$$

El factor de equivalencia entre kJ mol^{-1} y eV fotón^{-1} es:

$$1\ \text{eV fotón}^{-1} = 1{,}602 \times 10^{-22}\ \text{kJ fotón}^{-1} \times 6{,}022 \times 10^{23}\ \text{fotones mol}^{-1} =$$
$$= 96{,}48\ \text{kJ mol}^{-1}$$

De forma paralela, la energía asociada al trasvase de 1 e^- o de 1 H^+ o a la hidrólisis de 1 ATP se expresa en eV.

3.2.2. Potencial eléctrico (*E*)

Los seres vivos utilizan la energía asociada a la transferencia de electrones entre un reductor y un oxidante con diferente potencial rédox (*E*).

Esta energía rédox depende de la diferencia de potenciales rédox *E* (*V*) entre el donador de electrones (reductor) y el aceptor de electrones (oxidante), que puede expresarse en condiciones estándares (E^o constante) o fisiológicas (*E* varía con la concentración del oxidante y el reductor):

Dada la reacción

$$A_{ox} + B_{red} \longrightarrow A_{red} + B_{ox}$$

Se puede escribir:

$$\Delta G = \Delta G^o + RT \ln \frac{[B_{ox}]\,[A_{red}]}{[B_{red}]\,[A_{ox}]}$$

$$\Delta G = -nF\,\Delta E$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene la ecuación de Nernst:

$$\Delta E = \Delta E^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[B_{ox}]\,[A_{red}]}{[B_{red}]\,[A_{ox}]} \qquad (3.8)$$

Y para las medias reacciones: $B_{red} \longrightarrow B_{ox}$ y $A_{ox} \longrightarrow A_{red}$:

$$E_B = E_B^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[B_{ox}]}{[B_{red}]} \qquad (3.9)$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$E_A = E_A^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A_{red}]}{[A_{ox}]} \qquad (3.10)$$

El ΔG asociado a una reacción rédox se calcula fácilmente a partir de ΔE: si el E^o del donador de e^- es –0,4 V y el del aceptor +0,8 V, la diferencia de potencial es:

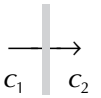
$$\Delta E^o = +0{,}8 - (-0{,}4) = +1{,}2 \text{ V}$$

y por tanto $\Delta G^o = -nF\,\Delta E^o = -2\ (96500\ \text{C})\ 1{,}2\ \text{J mol}^{-1} = -232\ \text{kJ/mol}$

3.2.3. Potencial iónico (FMI)

La transferencia de un soluto de un lado a otro de una membrana formada por una bicapa fosfolipídica genera ΔG.

Si se transfiere 1 mol de soluto desde el compartimento izquierdo (donde la concentración de soluto es c_1) al derecho (donde la concentración de soluto es c_2) se produce un cambio de energía libre ΔG:



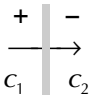
$$\Delta G\ (\text{J}) = \Delta\mu_i\ (\text{J}) = RT \ln \frac{c_2}{c_1}\ (\text{J}) \qquad (3.11)$$

Si $c_1 > c_2$: $\Delta G_C < 0$: proceso espontáneo, capaz de realizar trabajo útil.

Si $c_1 < c_2$: $\Delta G_C > 0$: proceso no espontáneo, consumidor de trabajo útil.

La fuerza conductora del trasvase de soluto es el gradiente (diferencia) de concentración Δc.

Si se transfiere un soluto cargado, ΔG tendrá dos componentes correspondientes a la concentración y a la carga eléctrica:



Si el compartimento derecho tiene carga (–) y el izquierdo tiene carga (+) existe un potencial de membrana $\Delta\Psi$ que, por convención, es < 0. El trasvase de 1 mol de soluto transcurrirá con un cambio de energía libre ΔG equivalente al potencial químico del sistema $\Delta\mu_i$:

$$\Delta G\ (\text{J}) = \Delta\mu_i\ (\text{J}) = RT \ln \frac{c_2}{c_1}\ (\text{J}) + ZF\ \Delta\Psi\ (\text{J}) \qquad (3.12)$$

siendo Z la carga del ion transferido.

En este caso, la fuerza conductora es la Fuerza Motriz de Iones (FMI), que se expresa en voltios: Δp si se transfieren H^+ y Δn si se transfieren iones Na^+:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$\frac{\Delta G}{F}(V) = \Delta p\ (\mathrm{V}) = \frac{RT}{F}\ln\frac{c_2}{c_1}(\mathrm{V}) + Z\ \Delta\Psi\ (\mathrm{V}) \qquad (3.13)$$

Si se transfieren H^+ ó Na^+, ambos componentes favorecen la transferencia del ión desde c_1 a c_2 y $\Delta G \ll 0$: el proceso es espontáneo (exergónico) y de él se puede extraer energía útil para impulsar reacciones (síntesis de ATP, transporte de electrones contra el ΔE) y otros procesos como el movimiento o el transporte de nutrientes.

Y viceversa, la transferencia de la misma cantidad de ión desde el compartimento 2 hasta el 1 consumiría la misma cantidad de energía libre, suministrada por diversos tipos de reacciones exergónicas.

Cálculo de la fuerza motriz de iones (FMI)

Si se transfieren H^+, FMI = Δp, por lo que se puede escribir (Fig. 3.3):

$$\Delta p = \Delta\Psi + \frac{RT}{F}\ln\frac{[H^+]_{in}}{[H^+]_{ex}}$$

$$\Delta p = \Delta\Psi + \frac{RT}{F}\times 2{,}303\log\frac{[H^+]_{in}}{[H^+]_{ex}} \qquad (3.14)$$

$$\Delta p = \Delta\Psi + 2{,}303\,\frac{RT}{F}\,(pH_{EX} - pH_{IN}) \qquad (3.15)$$

A 30 °C: $$2{,}303\times\frac{RT}{F} = 2{,}303\times\ 8{,}31\ \mathrm{J\,mol^{-1}\,K^{-1}}\times\ \frac{300\ \mathrm{K}}{96.500\ \mathrm{C\,mol^{-1}}} = 0{,}060\ (\mathrm{V})$$

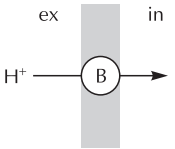


Figura 3.3. Transferencia de H^+ a través de una membrana biológica. B (canal o bomba de H^+).

Para H^+: $\Delta p = \Delta\Psi - 60\ \Delta pH$ (mV).

Para Na^+: $\Delta n = \Delta\Psi - 60\ pNa$ (mV).

En las mitocondrias se han medido valores de $\Delta pH = 0{,}75$ y de $\Delta\Psi = 0{,}17$ V, por lo que:

$$\Delta p = -170 - 60 \times 0{,}75 = -210\ \mathrm{mV}$$

Que equivalen a $\Delta G = F\,\Delta p = -20$ kJ mol^{-1} de H^+ ó 0,21 eV/H^+

Como se verá, esta energía es mayor que la requerida para la síntesis de ATP.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la tabla 3.2 se muestran los valores de Δp para los diferentes tipos de bacterias.

Tabla 3.2. Generación de los dos componentes de Δp en las bacterias.

GRUPO	pH_{EX}	pH_{IN}	$\Delta\Psi$ (mV)	60 pH	Δp (mV)
Neutrófilos	6	7	–150	–60	–210
Acidófilos	3	7	+10	–240	–230
Alcalófilos	10	8	–170	+120	–50

En los alcalófilos, un Δp tan pequeño no puede mantener el crecimiento a menos que el circuito de H^+ sea localizado y el medio alcalino no los neutralice (véase más adelante el requerimiento mínimo de Δp para sintetizar ATP).

3.2.4. Impulso de reacciones endergónicas por Δp

En las células, la energía rédox se conserva como un gradiente de iones y éste se transforma en diversas formas de energía, como el ATP (Fig. 3.4).

$$E_{\text{REDOX}} \longrightarrow E_{\text{GRADIENTE IÓNICO}} \xrightarrow{\text{FoF1}} E_{\text{QUÍMICA}} \text{ (ATP)}$$

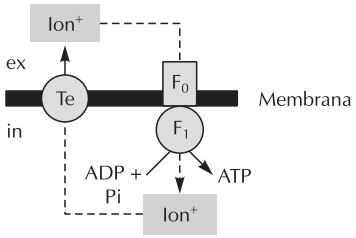


Figura 3.4. Acoplamiento entre la transferencia de electrones (*Te*), la FMI y la síntesis de ATP en la respiración.

El acoplamiento se lleva a cabo mediante los transportadores de electrones de la membrana y el complejo multiproteínico F0F1: enzima que deshace el gradiente iónico y sintetiza ATP mediante un nanorrotor movido por los iones.

El acoplamiento es variado y reversible:

La FMI puede impulsar también el giro del rotor flagelar bacteriano; de hecho, se ha comprobado que el factor F1 purificado gira en presencia de ATP o sintetiza ATP si se le hace girar con un artilugio de imanes a escala molecular: una vuelta completa del rotor consume 12 H^+ e impulsa la síntesis de 3 moléculas de ATP. Dado que $H^+/P = 4$, la síntesis de 1 ATP consume 4 H^+.

La energía requerida para sintetizar ATP en condiciones estándares, ΔG^o, se aproxima a –30 kJ mol^{-1}, pero este valor cambia en condiciones intracelulares, en que la *ratio* (ADP) (Pi)/(ATP) puede ser $< 10^{-3}$.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{(\text{ADP})\,(\text{Pi})}{(\text{ATP})} =$$

$$= -30{,}5 + 8{,}315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \times 298 \text{ K} \times 2{,}303 \log 10^{-3} = -47 \text{ kJ mol}^{-1}$$

El ATP puede sintetizarse a partir de la entrada de 4 H^+ si el Δp es suficiente. ¿Cuánto debe valer Δp?:

El trabajo realizado cuando se transfieren y H^+ a través de un potencial de H^+ Δp es:

$$W = y\,\Delta p \text{ (eV)} \tag{3.16}$$

Si los valores medidos de $P/H^+ = 3\text{-}4$, la ATP sintasa proporciona una energía de 3-4 eV.

Como la síntesis de ATP en condiciones fisiológicas requiere entre 45 y 50 kJ ó 0,5 eV, el valor mínimo de Δp para la síntesis de 1 ATP debe ser 0,5/3-4, es decir, entre 0,16 y 0,125 (V por cada H^+).

Como los valores reales de Δp se aproximan a 0,2 V, se concluye que el Δp es suficiente para permitir la síntesis *in vivo* de ATP. En los alcalófilos, $\Delta p = 0{,}05$ V, insuficiente para sintetizar ATP.

Existen diferentes procesos endergónicos impulsados por fuerzas motrices iónicas:

a) Síntesis de ATP.

Requiere la ATP-asa F1F0, una bomba iónica de tipo F embutida en la membrana plasmática:

F1: complejo multiproteínico compuesto por las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon\delta$.

F0: complejo multiproteínico compuesto por las subunidades $ab_2c_{10\text{-}14}$.

La F0F1 se había visualizado por microscopía electrónica hace varias décadas, pero recientemente se ha elucidado su estructura a nivel molecular: La enzima funciona como un rotor ($c\varepsilon\,\gamma\,\alpha\,\beta$) adosado a un estator ($ab\delta$) y cada giro de 360º de la subunidad γ genera 3 ATP (Fig. 3.5).

Los H^+ fluyen hacia el citoplasma porque la subunidad a posee dos medios canales, uno inferior que conecta el exterior (periplasma en las bacterias) con el rodillo c12 y otro superior que conecta éste con el citoplasma. Los datos cinéticos sugieren que la energía del gradiente de H^+ no se consume en la síntesis de ATP, sino en la salida de éste del centro activo hacia el citoplasma.

b) Transporte de solutos: simporte de un soluto S (no cargado)/H^+:

$$\text{Fuerza conductora} = y\,\Delta p + 60 \log \frac{[\text{S}]_{\text{in}}}{[\text{S}]_{\text{ex}}}, \quad \text{siendo} \quad y = \frac{H^+}{S} \tag{3.17}$$

En el equilibrio,

$$y\,\Delta p = -60 \log \frac{[\text{S}]_{\text{in}}}{[\text{S}]_{\text{ex}}} \tag{3.18}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

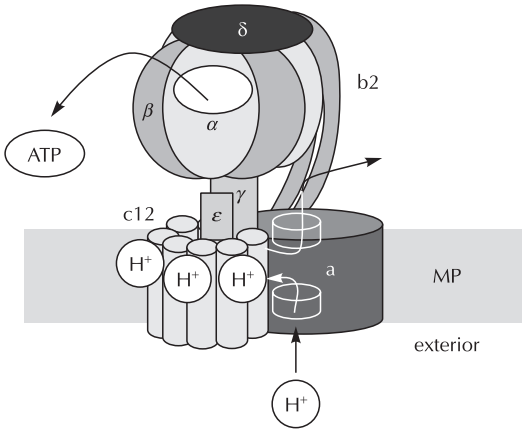


Figura 3.5. Representación esquemática de la ATPasa.

Para $y = 1$ y $\Delta p = 180$ mV: $\log \frac{[S]_{in}}{[S]_{ex}} = 3$; $\frac{[S]_{in}}{[S]_{ex}} = 10^3$

Un Δp de 180 mV puede mantener un gradiente de S de 10^3 para un simporte S/H^+ o de 10^6 para 2 S/H^+.

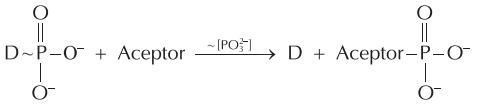
c) Movimiento:

El motor flagelar de las bacterias es un rotor de H^+ que gira a 100 RPS con un flujo de 10^3 H^+ por giro.

3.2.5. Potencial de transferencia de grupos

Con frecuencia, los procesos bioquímicos (especialmente los microbianos) no están ligados a transferencias de electrones o de iones a través de membranas, por lo que los ΔG dependen de otro tipo de energía química: el potencial bioenergético.

El PTG, o potencial de transferencia de grupo, mide la capacidad de un compuesto químico para transferir determinadas agrupaciones químicas (fosforilo, acilo, metilo) desde un donador (D) a un aceptor (A) (Fig. 3.6).



Si $PTG_D > PTG_A$, $\Delta G < 0$
Si $PTG_D < PTG_A$, $\Delta G > 0$

Figura 3.6. Transferencia del grupo fosforilo ($\sim PO_3^{2-}$) desde un donador (D) a un aceptor (A).

El PTG depende del ΔG de hidrólisis del compuesto que transfiere el grupo:

$$\text{Donador} \sim \text{P} + H_2O \longrightarrow \text{Donador} + \text{Pi} + \text{calor}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los PTG de los compuestos biológicos oscilan entre –10 y –60 kJ mol^{-1}:

1) Alto PTG (ΔG^o entre –60 y –40 kJ mol^{-1}): (P)-adenosín-P-sulfato (P)APS), fosfoenolpiruvato (PEP), 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) y acetil-P (AcP).
2) PTG medio ($\Delta G^o_H \approx -30$ kJ mol^{-1}): ATP, pirofosfato (PPi) y acetil-CoA.
3) PTG bajo ($\Delta G^o_H \approx -10$ kJ mol^{-1}): glucosa-6P, fructosa-6P y glicerol-3P.

Las transferencias de fosforilo (~P) se llevan a cabo en el orden marcado por el PTG:

$$\text{PEP} \longrightarrow \text{ATP} \longrightarrow \text{Glucosa-6P}$$

Así, el PEP puede ceder su grupo fosforilo al ADP para dar ATP (Fig. 3.7):

$$\Delta G^o = \Delta G^o_{\text{H PEP}} - \Delta G^o_{\text{H ATP}} = -30 \text{ kJ/mol}$$

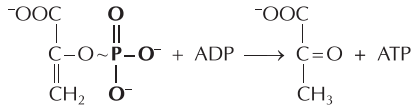


Figura 3.7. Fosforilación a nivel de sustrato catalizada por la piruvato kinasa glucolítica.

3.3. Fermentación

3.3.1. Concepto de fermentación

La fermentación se define como un tipo de catabolismo anaeróbico en la que no se produce una reacción rédox neta y cuya función es la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

La fermentación es un proceso rédox en ausencia de aceptores exógenos de electrones, que se generan en la propia ruta y que se reducen a un producto desechable por la célula (lactato, etanol, CO_2, acetato, H_2, butirato, acetona, etc.).

Durante la primera fase, el sustrato se degrada parcialmente y genera ATP y una coenzima reducida $CoEH_2$ que se consume en la segunda fase y regenera el oxidante CoE sin el que se detendría el proceso catabólico (Fig. 3.8).

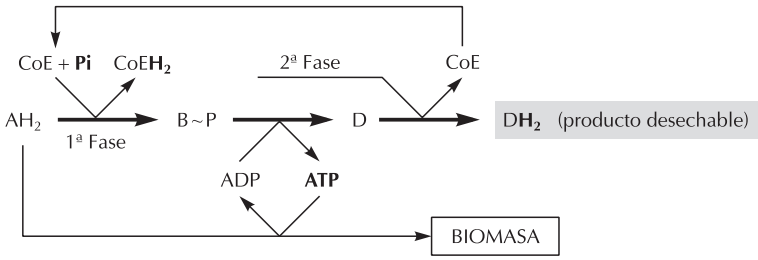


Figura 3.8. Mecanismo bioquímico de un proceso fermentativo. CoE (Coenzima rédox, NADH).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Una ruta metabólica clave en la fermentación es la glucolisis, que a partir de glucosa produce, dependiendo del microorganismo y las condiciones ambientales, diversos productos desechables: 2 lactato; 2 etanol + 2 CO_2; lactato + acetato + formiato; lactato + acetato + CO_2 + H_2, etc.

Durante la fermentación se produce un descenso de energía libre moderado (del orden de –200 kJ por mol de sustrato fermentable como la glucosa), que se debe a la generación de grupos funcionales donde es posible la deslocalización de los electrones (grupos carboxilo, CO_2) y la resonancia electrónica, que conlleva un descenso de energía adicional. Como no se producen CoE reducidos netos (NAD(P)H, FNH_2) no hay posibilidad de extraer energía rédox.

Por tanto, el rendimiento energético de las fermentaciones es escaso: 2 ATP por mol de glucosa para la fermentación láctica y alcohólica y ligeramente mayor para otras fermentaciones, a pesar de que valores de ΔG del orden de –200 kJ/mol son suficientes en teoría para la síntesis de 6 a 7 moles de ATP en condiciones estándares.

En condiciones fisiológicas, ΔG depende de las concentraciones de sustratos y productos *in vivo*, por lo que la síntesis de ATP requiere más de 30 kJ mol^{-1}: para la reacción ADP + Pi → ATP, si la razón [ATP]/[ADP][Pi] se aproxima *in vivo* a 10^3:

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{[P]}{[S]} = 30\ \text{kJ} + 2{,}303 \times 8{,}2\ \text{kJ K}^{-1} \times 300\ \text{K} \log 10^3 = 47\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Con lo que el rendimiento, *in vivo*, puede ser aún menor ya que si la síntesis de 1 mol de ATP "cuesta" del orden de 50 kJ, un descenso de energía libre de 200 kJ proporciona energía para la síntesis de sólo 4 ATP. Como sólo se generan 2 ATP, 2 ATP/4 ATP = 0,5, que equivale a un rendimiento del 50%. En la figura 3.9 se resumen las fermentaciones bacterianas más importantes.

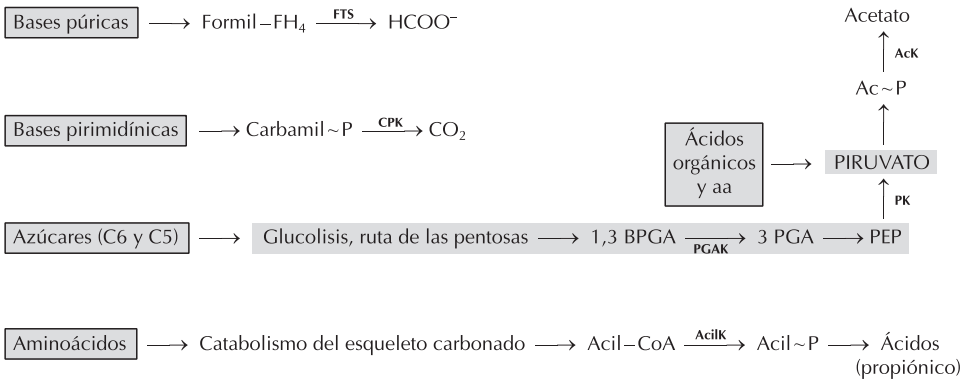


Figura 3.9. Fermentaciones bacterianas. En algunas fermentaciones, la fosforilación a nivel de sustrato se lleva a cabo durante las dos fases, glucolítica y generadora de ácidos (mayor rendimiento). 1,3 BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; 3 PGA, 3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; Ac~P, acetil fosfato.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las enzimas generadoras de ATP son la fosfoglicerato kinasa (PGAK), piruvato kinasa (PK), acetato kinasa (AcK), acil kinasas (AcilK), carbamil fosfato kinasa (CPK) y formiltetrahidrofolato sintetasa (FTS):

PGAK: 1,3-BPGA + ADP $\longrightarrow$ 3-PGA + ATP

AcK: Ac~P + ADP $\longrightarrow$ acetato + ATP

PK: PEP + ADP $\longrightarrow$ piruvato + ATP

CPK: C~P + ADP $\longrightarrow$ CO_2 + ATP

FTS: Formil-FH_4 + ADP $\longrightarrow$ Formiato + ATP

Las fermentaciones se describen mediante una ecuación en la que los sustratos y los productos deben estar equilibrados desde un punto de vista rédox, balance calculable a partir de los estados de oxidación de los átomos en los sustratos y los productos [compuesto orgánico (0); H(+1), O(–2), Ión$^{+/-n}$ (+/–*n*)] y que consiste en la equidad electrónica de ambos términos. En la tabla 3.3 se muestra el balance rédox de las fermentaciones alcohólica y ácida mixta:

Tabla 3.3. Balances rédox en las fermentaciones.

Hexosa $\longrightarrow$ 2 CH_3-CH_2OH + 2 CO_2		
Estado de oxidación medio del C en la hexosa = 0:	12 H × (+1) = +12;	6 O × (–2) = –12
Estado de oxidación medio del C en el etanol = –4:	6 H × (+1) = +6;	1 O × (–2) = –2
Estado de oxidación del C en el CO_2 = +4:	2 O × (–2) = –4	
Hexosa $\longrightarrow$ CH_3CH_2COOH + CH_3CH_2OH + CO_2 + H_2		
Estado de oxidación medio del C en la hexoxa = 0:	12 H × (+1) = +12;	6 O × (–2) = –12
Estado de oxidación medio del C en el butirato = –2:	6 H × (+1) = +6;	2 O × (–2) = –4
Estado de oxidación medio del C en el etanol (–4) y en el CO_2 (+4)		
Estado de oxidación del H_2 = +2		

Para alcanzar este balance, las bacterias requieren sumideros de electrones y poseen enzimas como la hidrogenasa, que consume el exceso de electrones reduciendo los H^+ (producto muy frecuente en las fermentaciones) a H_2, o enzimas que directamente producen H_2 a partir de un reductor fuerte (formiato-H_2 liasa, nitrogenasa).

3.3.2. Biotecnología de las fermentaciones

Las fermentaciones producen siempre un subproducto, que puede tener un interés industrial (biotecnología). Así se producen panificables, alcohol (bebidas y combustible), antibióticos, vitaminas (B12, Riboflavina), aminoácidos (Glu, Asp, Phe), hormonas (Progesterona → Cortisona), enzimas (extremófilos), ácidos (citrato, acetato), biomasa (levadura, microorganismos modificados por ingeniería génica), gases (H_2, CH_4), etc. (Fig. 3.10).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

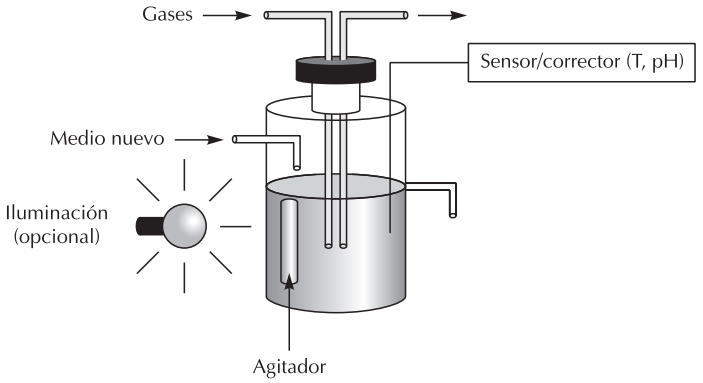


Figura 3.10 Esquema de un fermentador a escala de laboratorio.

La bioproducción de compuestos de interés industrial, farmacológico o alimentario mediante fermentación a gran escala puede contribuir a la corrección de desequilibrios ambientales al moderar el consumo de energías no renovables para la producción de bienes de consumo por métodos tradicionales, altamente contaminantes. Así se podrían diseñar planes para el ahorro de combustibles fósiles mediante la utilización de energías renovables como la fotoproducción de H_2 para pilas de combustible, la generación de combustibles alternativos a partir de biomasa (alcohol, metano), la propia producción de bienes de consumo, etc.

Durante la I Guerra Mundial, la Marina británica necesitaba acetona para fabricar explosivos y recurrió a una biotecnología diseñada por el bioquímico Chaim Weitzman basada en la fermentación aceto-butílica:

$$2\ \text{Glucosa} + 4\ \text{ADP} + 4\ \text{Pi} + 4\ \text{NAD}^+ \longrightarrow 2\ \text{Acetoacetil-CoA} + 4\ \text{NADH} + \\ + 4\ \text{ATP} + \mathbf{4\ H_2} + \mathbf{4\ CO_2}$$

$$\text{Acetoacetil-CoA} \longrightarrow \text{Acetocetato} \longrightarrow \text{Acetona} + CO_2$$

$$\text{Acetoacetil-CoA} + 4\ \text{NADH} \longrightarrow \text{Butanol} + 4\ \text{NAD}^+$$

Esta fermentación está catalizada por *Clostridium acetobutylicum* y produce inicialmente ácidos acético y butírico, derivando a alcohol y acetona cuando el pH del medio llega a 5.

El balance de la misma (mol por 100 mol de glucosa) es 4 butirato, 14 acetato, 221 CO_2, 135 H_2, 7 etanol, 56 butanol, 22 acetona.

3.4. Conservación de la energía mediante generación de fuerzas motrices de iones

Una reacción suficientemente exergónica puede impulsar una bomba de iones (+) a través de la membrana plasmática. La energía se puede expresar en kJ por mol H^+ ó en eV por H^+:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$y\,H^+_{in} \longrightarrow y\,H^+_{ex}$$

Para y moles de H^+: $\Delta G = y\,F\,\Delta p$ (J) (3.18)

Para y H^+: $\Delta G = y\,\Delta p$ (eV) (3.19)

3.4.1. Descarboxilación

Propionigenium modestum crece utilizando la energía asociada a la descarboxilación del succinato a propionato (Fig. 3.11). Esta reacción transcurre con un descenso moderado de energía libre ($\Delta G^o = -21$ kJ por reacción), insuficiente para dirigir la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, que requiere al menos 30 kJ por mol.

En terminos energéticos, el crecimiento de esta bacteria está basado en un proceso vectorial: la descarboxilación del succinato genera una fuerza motriz de sodio (Δn) capaz de impulsar la síntesis de ATP (Figs. 3.11 y 3.12).

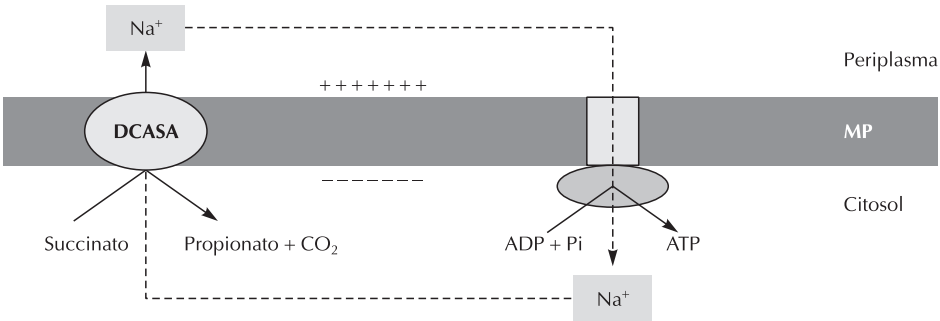


Figura 3.11. Acoplamiento de una reacción química a la generación de FMNa y a la síntesis de ATP; MP (membrana plasmática); DCASA (descarboxilasa).

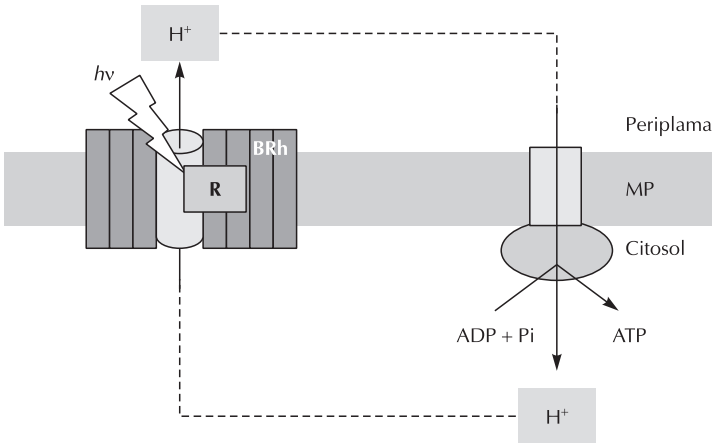


Figura 3.12. Acoplamiento de un proceso fotoquímico a la generación de Δp y a la síntesis de ATP; BRh (Bacteriorrodopsina); MP (Membrana plasmática); R (Retinal).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

3.4.2. Fotoisomerización (halobacterias)

La bacteriorrodopsina (BRh) es una bomba de H^+ formada por 7 Hélices transmembranales unida covalentemente a un grupo prostético de retinal que absorbe luz visible: la luz fotoisomeriza el retinal *todo-trans* a *13-cis*, lo que causa el desplazamiento de H^+ por el poro de la BRh mediante un mecanismo de saltos de protones ("H^+-*hops*"), mucho más rápido que la difusión. Este mecanismo requiere el concurso de los aminoácidos Glu 204 y 194, Arg 82 y Asp 85 y 96, que la secuencia de la cadena peptídica sitúa en el canal de H^+. La FMP generada (Δp) impulsa la síntesis de ATP:

$$h\nu \longrightarrow \Delta p \longrightarrow \text{ATP}$$

Las halobacterias poseen además una bomba de Cl^-, la halorrodopsina, impulsada por la luz. Como la BRh, la halorrodopsina sufre una fotoisomerización que, en este caso, la transforma en una bomba de Cl^-, necesaria para balancear la alta presión osmótica del medio externo de las halobacterias (3-4 M NaCl). Por último, otras dos rodopsinas, SR I y SR II detectan la luz naranja y azul, respectivamente: la luz libera fumarato, que, por sí mismo o interaccionando con las proteínas CheA/CheY, cambia el sentido de la rotación flagelar y promueve la fototaxis. Es este un caso llamativo de evolución convergente, en que la visión en los animales y la "visión" en las bacterias radica en el mismo tipo de proteína y de cromóforo, rodopsina-retinal en un caso y bacteriorrodopsina-retinal en el otro, aunque con mecanismos transmisores de la señal luminosa completamente diferentes.

3.4.3. Hidrólisis del ATP

En las bacterias en las que el ATP se produce únicamente por fosforilación a nivel de sustrato, el Δp se genera mediante el complejo F0/F1 funcionando como una hidrolasa de ATP (Fig. 3.13):

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$$

$$\Delta Gp = \Delta G^o + 2{,}3\, RT \log \frac{(\text{ATP})}{(\text{ADP})\,(\text{Pi})} \qquad (3.20)$$

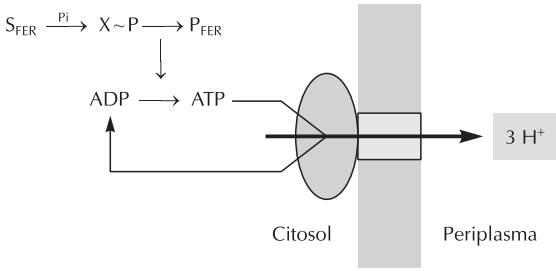


Figura 3.13. Generación de Δp a expensas de la energía del ATP. S_{FER} (Sustrato fermentable); P_{FER} (Producto fermentado).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$\boldsymbol{y}\ H^+_{in} \longrightarrow \boldsymbol{y}\ H^+_{ex} \qquad (3.21)$$

$$\Delta G = \boldsymbol{y}F\ \Delta p \qquad \Delta p = \frac{\Delta G}{\boldsymbol{y}F} \qquad (3.22)$$

Para $y = 3$ y Gp = 50 kJ mol^{-1}, la hidrólisis de 1 ATP genera un $\Delta p = 173$ mV

3.4.4. Eflujo de ácidos

Se puede generar Δp si se produce un simporte ácido/H^+ y se acopla el eflujo del ácido con su consumo por otra bacteria. La fuerza conductora será $Fc = \mathbf{y}\ \Delta p + \Delta\mu_S/F$ (mV), siendo **y** el número de H^+ y $\Delta\mu_S$ el potencial químico del ácido, con sus dos componentes de concentración y de carga.

En el caso de la figura 3.14, el transporte es electroneutro y no se genera $\Delta\Psi$: el eflujo del ácido sólo tiene el componente de concentración (Fig. 3.14).

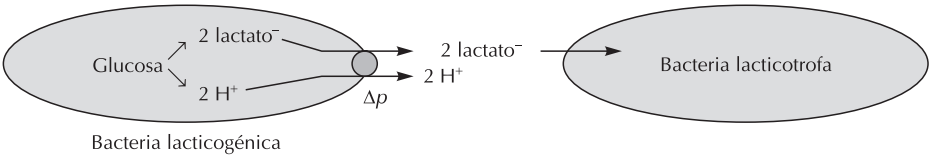


Figura 3.14. Generación de Δp mediante el eflujo de ácido láctico.

3.4.5. Intercambio de ácidos

Un antiporte electrogénico de ácidos (oxalato^{2-}/formiato$^-$) acoplado a una descarboxilasa que consume H^+ puede generar los dos componentes de Δp ($\Delta\Psi$ y ΔpH) (Fig. 3.15).

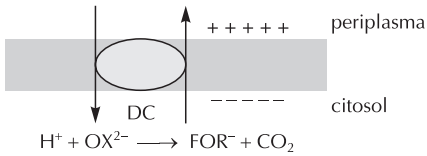


Figura 3.15. Generación de Δp por antiporte de ácidos en la bacteria *Oxalobacter formigenes*. OX^{2-} (oxalato); FOR^- (formiato) ; DC (descarboxilasa).

3.4.6. Reacciones rédox

La mayor parte de las bombas de H^+ están acopladas a reacciones rédox, como ocurre en la respiración y en la fotosíntesis.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En una reacción rédox se transfieren $n\,e^-$ desde un par donador de potencial E_1 a un par aceptor de potencial E_2, o viceversa.

Las reacciones rédox ocurren entre parejas o pares *reductor/oxidante*, caracterizados por su potencial estándar E^o (V), que determina la tendencia a la transferencia *espontánea* de electrones (Fig. 3.16).

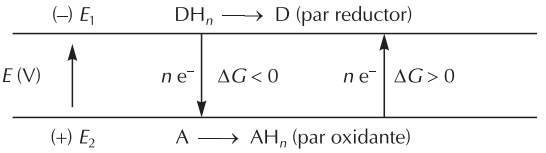


Figura 3.16. Transferencias electrónicas entre un par reductor DH/D (potencial E_1) y un par oxidante AH/A (potencial E_2, menos negativo o más positivo que E_1).

La respiración es un proceso exergónico ligado a membrana, en el que un donador electrónico DH_n cede $n\,e^-$ a un aceptor A de potencial más positivo o menos negativo:

$$DH_n + A \longrightarrow D + AH_n \qquad \Delta G < 0$$

La fotosíntesises un proceso exergónico ligado a membrana, en el que la luz impulsa la transferencia endergónica de $n\,e^-$ desde un donador AH_n a un aceptor D de potencial menos positivo o más negativo:

$$AH_n + D \longrightarrow A + DH_n \qquad \Delta G > 0 \quad \text{(en ausencia de luz)}$$

El proceso rédox más importante de la biosfera consiste en un ciclo de formación de agua a partir de H_2 y O_2 (respiración) y de fotolisis de la misma a H_2 y O_2 (fotosíntesis) mediante transferencias electrónicas entre metaloporfirinas, porfirinas, flavinas, quinonas y metaloproteínas cuyos potenciales rédox abarcan un intervalo de 1,22 V (ΔE^o entre el los pares rédox H_2O/O_2 y $H_2/2\,H^+$) (Fig. 3.17).

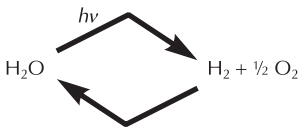


Figura 3.17. Ciclo fotosíntesis/respiración aerobia.

Los compuestos químicos rédox se agrupan en parejas constituidas por la forma oxidada y reducida de cada uno de ellos, caracterizadas por su E^o. Así, el par H_2O/O_2 posee un $E^{o\prime}$ de +0,82 V (pH 7) y es uno de los pares rédox más oxidantes en los seres vivos. Por el contrario, el par H_2/H^+ tiene un $E^{o\prime}$ de –0,42 V (pH 7) y es uno de los pares rédox más reductores en los seres vivos.

Los pares rédox de interés biológico se agrupan en la columna electrónica que se presenta en la tabla 3.4 Los situados en la parte superior de cada columna o en la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

columna izquierda transfieren electrones espontáneamente a los situados en la parte inferior o en la columna derecha, respectivamente (Tabla 3.4).

El par PO_3H^-/PO_4H^{2-} es el donador de e^- para la reducción de SO_4^{2-} a S^{2-} en la bacteria *Desulfotignum phosphitoxidans,* un autótrofo anaerobio estricto que utiliza como fuente de energía el fosfito producido por oxidación de fosfatos orgánicos en medios naturales (Tabla 3.4). Esta observación incorpora el P al grupo de bioelementos que sufren procesos biológicos rédox.

Tabla 3.4. Potenciales de los principales pares rédox de interés biológico.

Par rédox	E^o (mV)	Par rédox	E^o (mV)
P700*	–1.300	Malato / oxalacetato	–170
2-oxoglutarato / succinato	–670	Cit bL_{red} ⟶ cit bL_{ox}	–100
CO / CO_2	–540	MQH_2 / MQ	–74
SO_3^{2-} / SO_4^{2-}	–540	Cit b_{558} / cit $b_{558\ ox}$	–75 / –43
Fd (*Spinacea*) / Fd_{ox}	–520	UQ• / UQ	+30
Formiato / CO_2	–432	Succinato / fumarato	+33
H_2 / 2 H^+	–410	Cit bH_{red} / cit bH_{ox}	+50
Fd (*Clostridium*) / Fd_{ox}	–410	UQH_2 / UQH	+190
P680*	–400	UQH_2 / UQ	+100
$S_2O_3^{2-}$ / H_2S	–400	Cit b_{556} / cit $b_{556\ ox}$	+46 / +129
Isocitrato / 2-oxoglutarato	–380	Cit b_{562} / cit $b_{562\ ox}$	+125 / +260
NADH / NAD^+	–320	Cit b / cit b_{ox}	+260 / +280
FeS (C-I mit) / FeS_{ox}	–305	Cit c / cit c_{ox}	+250
Acetato / CO_2	–290	FeS (Rieske) / FeS_{ox}	+280
LIPOATO-H_2 / LIPOATO	–290	Cit a / cit a_{ox}	+290
1,3BPG ⟶ 3-PGA + Pi	–290	Cit c_{555} / cit $c_{555\ ox}$	+355
SH_2 / S	–270	NO / NO^{2-}	+365
PO_3H^- / PO_4H^{2-}	–267	Cit a_3 (mit) / cit $a_{3\ ox}$	+385
CH_4 / CO_2	–240	$P700^+$	+430
2 GSH / GSSG	–230	NH_4^+ / NO^2	+440
SH_2 / SO_4^{2-}	–220	NO_3^- / NO_2^- / NO_3^-	+430
$FADH_2$ / FAD	–220	Fe^{2+} / Fe^{3+}	+770
EtOH / acetaldehído	–197	H_2O / O_2 (1 atm)	+820
$FMNH_2$ / FMN	–190	$P680^+$	+1.200
Lactato / piruvato	–185	N_2 / N_2O	+1.360

Mecanismos que explican el flujo de H^+ acoplado a la transferencia de e^-.

a) Cambio conformacional:

La energía liberada en la transferencia de e^- se utiliza para producir un cambio conformacional que afecta al pKa de grupos protonables y para generar un canal de H^+ en el transportador electrónico de la membrana: la energía rédox desempeña el papel que la luz desempeña en la bacteriorrodopsina, produciendo un cambio conformacional en la proteína aceptora de electrones

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que modifica la afinidad por los H^+ de restos aminoacídicos internos de la estructura proteica, lo que favorece los saltos de H^+ y su trasvase al otro lado de la membrana (Fig. 3.18):

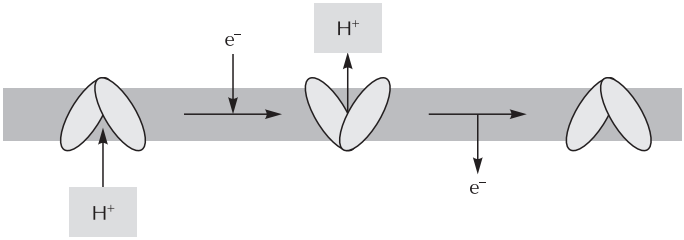


Figura 3.18. Trasvase de H^+ mediante cambio conformacional.

b) Alternancia entre transportadores de H_2 y de e^-:

Un transportador de H_2 tipo FNH_2 ó QH_2 acoplado a un aceptor de electrones (FeS ó citocromo) convenientemente situados en la membrana facilitan la captura de H^+ en un lado y su liberación en el otro lado de la membrana.

Al confluir un donador de H (nucleótidos de flavina, quinonas) con un aceptor de electrones (FeS, hemos), los H^+ sobrantes deben pasar a la fase soluble que sea accesible, normalmente el lado exterior de la membrana (periplasma en las bacterias, lumen del tilacoide o espacio intermembranal en las mitocondrias) (Fig. 3.19).

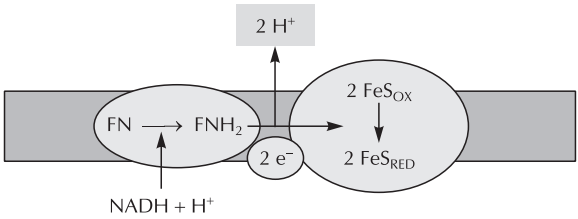


Figura 3.19. Trasvase de H^+ mediante alternancia de transportadores.

3.5. Respiración

Es un proceso exergónico en el que una transferencia neta de electrones se acopla a la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. Puede ser aerobia, si el aceptor es el O_2, o anaerobia, si el aceptor es un compuesto de N (NO_3^-), S (SO_4^{2-}) ó C (CO, CO_2, fumarato), un ión metálico (Fe^{3+}), etc.

La transferencia de electrones (*a*) está acoplada al eflujo de H^+ (*b*) (acoplada indica que uno no sucede sin el otro) y, salvo excepciones, ambos procesos están próximos al equilibrio:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$a: \quad UQH_2 + 2\ bc1_{OX} \longrightarrow UQ + 2\ bc1_{RED} + 2\ H^+ \qquad \Delta Ga = -nF\,\Delta E$$

$$b: \quad y\ H^+_{in} \longrightarrow y\ H^+_{ex} \qquad \Delta Gb = yF\,\Delta p$$

En el equilibrio, $$\Delta Ga = \Delta Gb - nF\,\Delta E = yF\,\Delta p \tag{3.23}$$

De donde se deduce que $$\Delta p = \frac{n\,\Delta E}{y} \tag{3.24}$$

Si se transfieren 2 e^- y 4 H^+ ($y = 4$, $n = 2$) y $\Delta E = 0{,}2$ V, se genera un $\Delta p = -0{,}1$ V.

Expresado de otra forma, si se transfieren 2 e^- a través de un ΔE de 0,2 V, la energía disponible es $2 \times 0{,}2 = 0{,}4$ eV, equivalente a una fuerza motriz de protones de 0,1 V.

A su vez, el Δp está acoplado a la síntesis de ATP, de tal forma que si $\Delta p = 0{,}1$ V, la energía disponible para sintetizar ATP será de 0,4 eV por cada H^+ trasvasado ó bien $0{,}4\ \text{eV} \times 96.500\ \text{C mol}^{-1} = 38{,}6\ \text{kJ mol}^{-1}$, casi suficiente para la síntesis de 1 mol de ATP *in vivo* (Fig. 3.20).

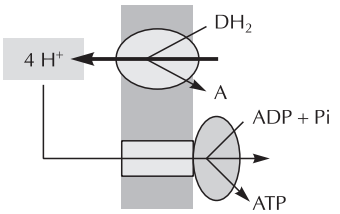


Figura 3.20. Acoplamiento entre la FMP y la síntesis de ATP en la respiración.

El hecho de que algunas reacciones rédox estén cercanas al equilibrio tiene unas consecuencias fisiológicas muy importantes: al igualarse las fuerzas conductoras de electrones y protones se puede invertir el sentido de la transferencia electrónica utilizando la fuerza conductora de Δp.

Esta es la base del metabolismo energético de bacterias que viven oxidando compuestos pobres en energía, cuyos E son positivos (NH_3, NO_2^-, S, succinato, etc.) y que necesitan reducir el NAD^+ ($E^{o\prime} = -0{,}32$ mV).

No obstante, existe una reacción rédox esencialmente irreversible en condiciones fisiológicas: la transferencia de electrones desde el citocromo *c* al O_2 para dar H_2O está acoplada a la citocromo oxidasa, una bomba de H^+ irreversible.

Por esta razón, el agua no puede ceder electrones en un sistema biológico salvo en el Fotosistema II, donde la energía solar genera un potente oxidante ($P680^+$) cuyo $E^{o\prime}$ es más positivo que el del agua (+1,2 V frente a +0,82 V).

En las bacterias nitrificantes (Capítulo 6), el crecimiento se debe a una reacción rédox cuyo potencial es positivo, incapaz por tanto de transferir electrones al NAD^+ (Fig. 3.21).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

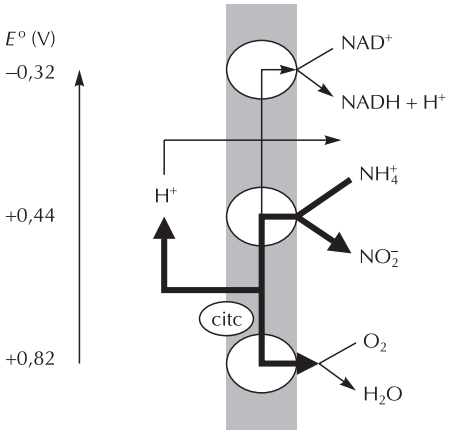


Figura 3.21. Acoplamiento de Δp a la reducción de NAD^+ con NH_4^+ como reductor en una bacteria nitrificante.

1. Las bacterias del género *Nitrosomonas* oxidan gran cantidad de NH_4^+ a NO_2^- y se genera un Δp.
2. El Δp impulsa la reducción endergónica del NAD^+ con NH_4^+ como reductor.

3.5.1. Cadena respiratoria mitocondrial

Está formada por enzimas y coenzimas rédox agrupados en complejos respiratorios (CR) incrustados en una bicapa lipídica y que transfieren los e^- en cadena. La cadena completa posee 4 CR (I, II, III y IV) y se encuentra en las mitocondrias y algunas bacterias aeróbicas (Fig. 3.22).

Como se observa en la figura 3.22, se trasvasan 10 H^+ por cada 2 e^- transferidos desde el NADH al O_2:

$$NADH + \tfrac{1}{2}\, O_2 + 11\ H^+_{IN} \longrightarrow NAD^+ + H_2O + \mathbf{10\ H^+_{EX}}$$

Los CR están situados en la membrana mitocondrial interna o en la membrana plasmática de los procariotas y su topología favorece el flujo de H^+ hacia el exterior siempre y cuando ΔE sea suficiente (> 0) como para producir un descenso de energía libre adecuado: $\Delta G = -nF\,\Delta E$.

El mecanismo de eflujo de H^+ consiste en tres bombas iónicas (C I, C III y C IV), de las cuales sólo es irreversible la bomba C IV. Esto indica que la cadena respiratoria puede generar Δp mediante reacciones rédox exergónicas ($\Delta E > 0$) o utilizar el Δp para impulsar reacciones rédox endergónicas ($\Delta E < 0$) a partir de reductores débiles, con excepción del agua.

El transporte inverso de electrones es común en las bacterias y utiliza como reductores succinato, NH_3, NO_3^-, S, SH_2, Fe^{2+}, etc., que se oxidan por enzimas periplásmicas que transfieren electrones al cit *c* o directamente a los CR III, II y I (Fig. 3.22).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

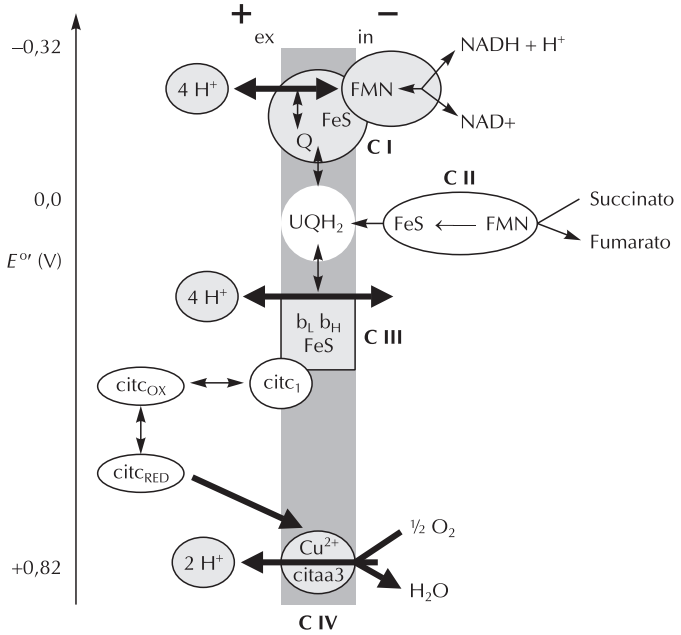


Figura 3.22. Complejos de la cadena respiratoria aeróbica.

La cadena respiratoria conserva la energía de forma eficaz:

Para la reacción $NADH + H^+ + ½\ O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$

$\Delta E = +0{,}82 - (-0{,}32) = 1{,}14$ V y $\Delta G = -2 \times 96{,}5 \times 1{,}14 = -220$ kJ

Si se transfieren 10 H^+ y el ΔG (medido) = –21 kJ mol^{-1} H^+, el ΔG total es 210 kJ, muy cercano al valor máximo de –220 kJ.

3.5.2. Cadenas respiratorias de las eubacterias

En las bacterias, las cadenas respiratorias varían entre los diferentes grupos sistemáticos y, dentro de un mismo grupo, dependen de los cambios ambientales. Como en las mitocondrias, los transportadores de electrones están agrupados en CR relacionados por quinonas o citocromos (Fig. 3.23).

Los reductores pueden ser citosólicos (NADH, $FADH_2$) o periplásmicos (H_2, HCOOH, CH_3OH) y los aceptores pueden ser O_2, NO_3^-, NO_2^-, NO, N_2O, SO_4^{2-}, SO_3^{2-}, S, fumarato, Fe^{3+}.

Así como la enzima respiratoria que reduce al O_2 se denomina citocromo oxidasa, la que reduce otros aceptores se llama reductasa terminal. Estas reductasas terminales pueden poseer grupos hemo y generar Δp y parece que son antecesoras de las oxidasas en un mundo anóxico.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

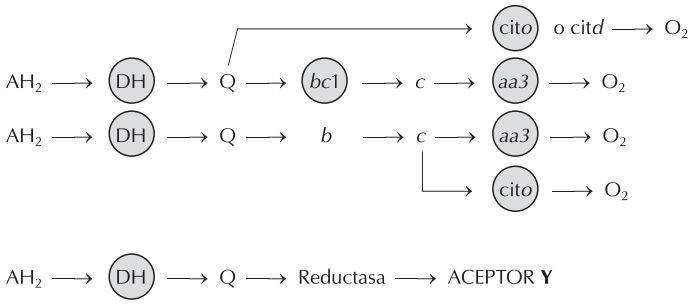


Figura 3.23. Cadenas respiratorias eubacterianas. Los círculos grises indican sitios de acoplamiento reacción rédox/Δ*p*.

La Km del citocromo *o* por el O_2 es mayor que la del cit *d*, lo que produce la adaptación a diferentes pO_2: cuando las bacterias facultativas perciben una disminución de la pO_2 mediante la proteína sensora ArcB, el factor de transcripción ArcA se fosforila y se une al DNA, reprime la síntesis del citocromo *o* e induce la del citocromo *d* (Capítulo 4). Algo similar ocurre en presencia de tóxicos: el CN^- induce una oxidasa alternativa resistente, insensible a la inhibición por CN^-. Otra fuente de versatilidad son las ramificaciones de la cadena, ya que difieren en el Δ*p* generado.

Las bacterias poseen dos NADH-Deshidrogenasas; la NADH DH 1 es sensible a la rotenona y similar al CR I mitocondrial y la NADH DH 2 contiene FAD y es una bomba de H^+. Otras NADH DH son bombas de Na^+, como la de *Vibrio alginolyticus*.

El CR III o citocromo *bc1* procede probablemente del metabolismo anaeróbico, porque se encuentra en las bacterias fototrofas. El citocromo *bc*1 es un dímero y genera los dos componentes de Δ*p*: es una bomba de H^+ y aumenta el potencial de membrana (interior negativo) gracias a la transferencia electrónica entre los grupos hemos b_L (lado externo, $E^o = -0{,}1$ V) y b_H (lado interno, $E^o = -0{,}05$ V) (Fig. 3.24).

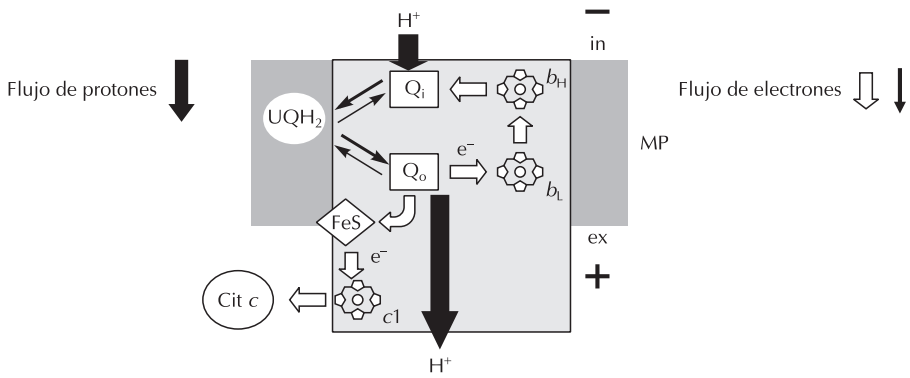


Figura 3.24. Transferencia de electrones y H^+ en el C III. El mixotiazol bloquea el sitio Q_o y la antimicina, el sitio Q_i. Un centro 2 Fe2S (Rieske) transfiere electrones al hemo *c*1 y éste al cit *c* del periplasma. MP (membrana plasmática o membrana mitocondrial interna).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Una versión del CR III, el citocromo *bf,* se encuentra en el aparato fotosintético de las cianobacterias y los cloroplastos, conectando los Fotosistemas I y II (Fig. 3.33).

Las oxidasas terminales de las bacterias aeróbicas poseen una estructura similar (Fig. 3.25).

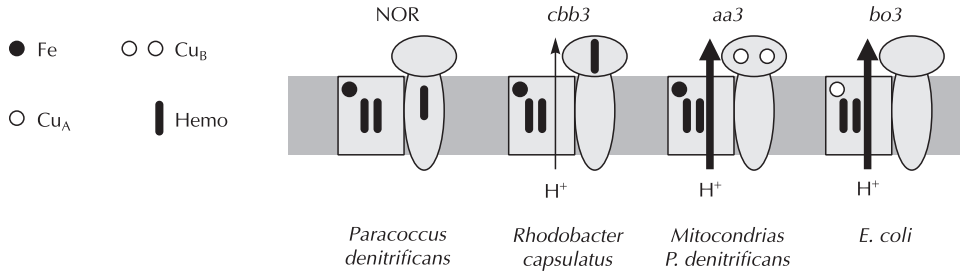


Figura 3.25. Estructura de la NO reductasa (NOR) y de las citocromo oxidasas bacterianas.

La presencia de diferentes grupos prostéticos determina la generación o no de Δp y la *Km* por el O_2: *cbb3* < *aa3* ó *bo3.* Las oxidasas terminales se bloquean por CN^- o azida, salvo algunas, que son resistentes a estos inhibidores.

3.5.3. Cadenas respiratorias de las arqueobacterias

Se parecen bastante a las de las eubacterias pero con cofactores inusitados: quinonas con grupos tiofeno, complejos I y II atípicos, sulfocianina, hemos prenilados más hidrofóbicos (termófilos) y supercomplejos IV Sox ABCD (sin FeS) o Sox M (con FeS Rieske). El Δp se genera mediante bombas de H^+ o por separación de cargas:

$$(H_2 \longrightarrow 2\ H^+)_{PER} \longrightarrow (S + H_2O \longrightarrow SH_2 - 2\ OH^-)_{CIT}$$

Por otra parte, la citocromo oxidasa carece de los restos de aminoácidos esenciales para el bombeo de H^+ por lo que $H^+/e < 2$.

3.6. Fotosíntesis

Consiste en la conversión de la energía radiante (*hv*) en energía química utilizable para el crecimiento.

En todos los tipos de fotosíntesis la energía solar se conserva como fuerza motriz de iones, que se transforma en energía química (ATP), de transporte de solutos o mecánica

$$hv \longrightarrow \Delta p \longrightarrow \text{ATP, movimiento, transporte de solutos}$$

En la fotosíntesis clorofílica, la energía solar se utiliza para impulsar una reacción rédox endergónica [síntesis de ferredoxina (Fd) o NAD(P)H]. La energía rédox se con-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

serva además como fuerza motriz de protones y ésta se transforma en energía química (ATP), de transporte de solutos o mecánica:

$$H_2O,\ H_2S \xrightarrow{h\nu} e^{-*} \longrightarrow Fd,\ NAD(P)^+$$

Un fotosistema está formado por pigmentos [clorofilas (CL), bacterioclorofilas (BCL), carotenos (CAR), xantofilas (XA) y ficobilinas (FB), asociados a proteínas inmersas en una membrana fosfolipídica]. Los fotosistemas absorben la luz y conservan la energía como una separación de cargas (+) y (–) en la membrana fotosintética (Fig. 3.26).

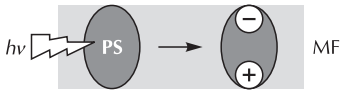


Figura 3.26. Separación de cargas en la membrana fotosintética (MF); PS (Fotosistema).

3.6.1. Tipos de fotosíntesis clorofílica

Las cianobacterias (incluído *Prochloron*), algas y plantas realizan la fotosíntesis oxigénica (liberan O_2); las bacterias fototrofas realizan la fotosíntesis anoxigénica (no liberan O_2) (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Tipos de fotosíntesis. C Org (Fuente de carbono orgánico); CL (Clorofila); BCL (Bacterioclorofila); FB (Ficobilinas; CA (Carotenos); XA (Xantofilas).

Organismo	Tipos de PS	Pigmentos	Reductor	Fuente de carbono	Respiración
Prochloron	I y II	CL a y b	H_2O	CO_2	–
Cianobacterias	I y II	CL a, FB	H_2O	CO_2	Sí
Algas y plantas	I y II	CL a y b CA y XA	H_2O	CO_2	Sí
Bacterias rojas azufradas	Tipo II	BCL a ó b, CA	S^{2-}, S, $S_2O_3^{2-}$, H_2, C Org, Fe^{2+}	CO_2, C Org	Sí
Bacterias rojas no azufradas	Tipo II	BCL a ó b, CA	H_2, C Org (S^{2-})	CO_2, C Org	Sí
Bacterias verdes azufradas	Tipo I	BCL a, c, d, ó e, CA	S^{2-}, S, $S_2O_3^{2-}$, H_2	CO_2, C Org	No
Bacterias verdes no azufradas	Tipo I	BCL a, cs, ó d, CA	S^{2-}, H_2, C Org	CO_2, C Org	Sí
Heliobacterium	Tipo I	BCL g, CA	C Org	C Org	No

Las bacterias rojas azufradas son γ-proteobacterias y utilizan compuestos azufrados (S, S^{2-}, $S_2O_3^{2-}$) (*Chromatium*); las bacterias rojas no azufradas son α- ó β-proteo-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

bacterias (*Rhodobacter*); las bacterias verdes pertenecen a otros *phyla* (*Chlorobium, Chloroflexus*) y las Heliobacterias son Gram (+).

3.6.2. Centros de reacción fotosintéticos

Un centro de reacción fotosintético está formado por una clorofila especial que actúa de trampa energética, de donde la energía radiante no puede transmitirse sino en forma de energía electrónica (Fig. 3.27).

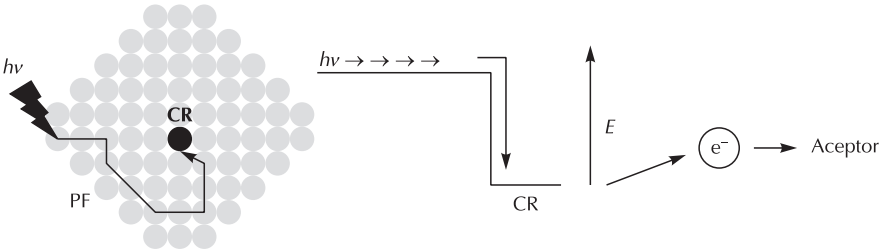


Figura 3.27. Centro de reacción fotosintético (CR). La energía radiante se transmite desde unos pigmentos fotosintéticos (PF) a otros hasta que es atrapada en un CR, cuyo nivel energético (E) es inferior.

El fotón de energía *hν* es captado por pigmentos (carotenos, clorofilas) que forman una antena receptora de luz (LHC). La molécula fotoexcitada transfiere esta energía (excitón) a otras moléculas no excitadas de propiedades electrónicas similares. El proceso implica la interacción entre orbitales moleculares de las moléculas participantes de forma análoga a la interacción entre péndulos de frecuencias similares acoplados mecánicamente. El excitón se transmite de manera que, si el acoplamiento electrónico es fuerte, el grupo de moléculas actúa como una supermolécula excitada. Al final, la energía es atrapada por el centro de reacción, trampa energética formada por un par clorofílico especial que transforma la energía radiante en energía electrónica.

En el centro de reacción (CR), la energía electrónica está asociada a un electrón situado en un nivel superior de energía (e*): en ocasiones, el e* vuelve a su estado basal y la energía se disipa como calor o se emite como un fotón de menor frecuencia (fluorescencia). Para evitarlo, los CR están incluidos en fotosistemas donde existen aceptores de electrones situados a una distancia adecuada para posibilitar la transferencia electrónica: $CL^* + A \rightarrow CL^+ + A^-$, lo que conlleva una separación de cargas y la conservación de la energía luminosa como energía rédox.

Fotosistema de las bacterias púrpuras

Este fotosistema es de tipo II, ya que se parece al PS II de la fotosíntesis oxigénica y no produce poder reductor directamente porque el primer aceptor de electrones estable (Q_B) posee un $E^{o\prime}$ cercano a 0,0 V , insuficiente para reducir NAD^+

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

($E^{o\prime}$ = –0,32 V). Para hacerlo, los e^- del donador (succinato, S^{2-}) se transfieren contra el gradiente de potencial eléctrico gracias al Δp generado a nivel del citocromo *bc*1 (Fig. 3.28).

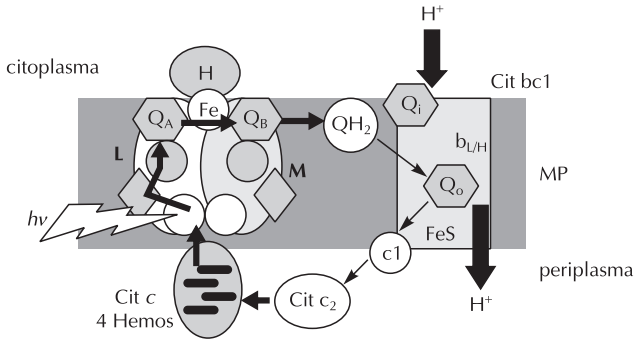


Figura 3.28. Estructura del PS de la bacteria roja *Rhodopseudomonas viridis* elucidada en 1985 por difracción de rayos X. H, L, M (polipéptidos de la membrana fotosintética); MP (membrana plasmática); Q (quinonas); CR P860 (círculos blancos); bacteriofeofitinas (rombos); Bacteriocloro-filas (círculos grises).

El PS consta de una antena captora de luz, tres polipéptidos, H, M y L y un citocromo *c* con cuatro grupos hemos que forman un circuito e^- cíclico generador de Δp (Fig. 3.29).

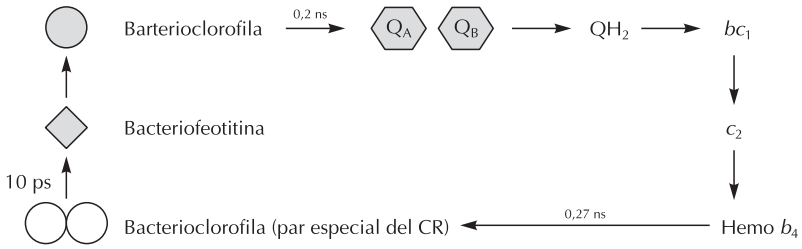


Figura 3.29. Flujo de electrones en el PS (P960) de las bacterias púrpuras.

Fotosistema de las bacterias verdes

En las bacterias verdes, el CR (P840) forma también un circuito cíclico con el aceptor primario Ao (bacterioclorofila 663), el aceptor A1 (Q), un centro FeS, QH_2, el citocromo *bc*1 y el citocromo c_{553}. Pero en este caso, el PS es de tipo I (se parece al PS I de la fotosíntesis oxigénica), ya que el aceptor FeS posee un $E^{o\prime}$ muy negativo (< –0,5 V) y los e^- se pueden transferir exergónicamente a la ferredoxina ($E^{o\prime}$ –0,42 V) y de ésta al NAD^+ ($E^{o\prime}$ –0,32 V). Para restablecer los "huecos" electrónicos en el CR, los electrones pueden fluir a éste desde un reductor exógeno (S^{2-}) a través de citocromos (c_{555}).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La figura 3.30 presenta los flujos electrónicos en la fotosíntesis basada en bacterioclorofila, cíclico en el caso de las bacterias púrpuras y cíclico/no cíclico en las bacterias verdes.

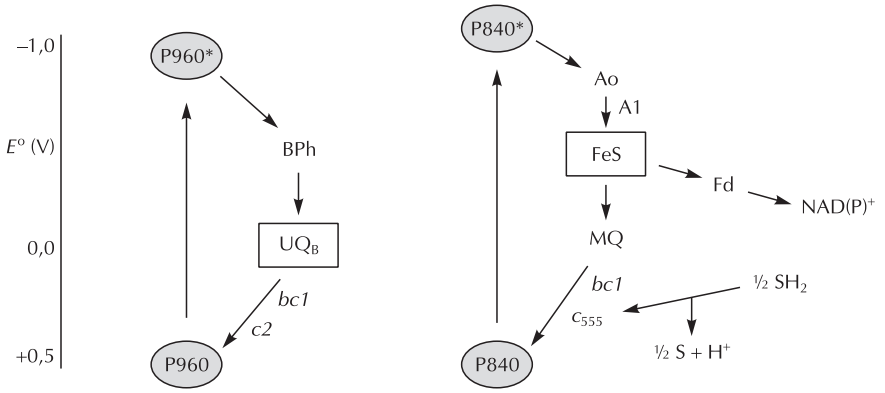


Figura 3.30. Flujos de electrones en las bacterias rojas (izquierda) y en las bacterias verdes (derecha).

Por su parte, las heliobacterias poseen un CR tipo I (P798), un aceptor primario hidroxi-bacterioclorofila *a* y un circuito e^- similar, por lo que tampoco requieren impulsar la transferencia electrónica con la FMP producida en las transferencias e^- citocrómicas (*bc*1).

La fotosíntesis oxigénica: acoplamiento PS II-PS I

En las cianobacterias, algas verdes y plantas superiores, el H_2O puede suministrar e^- gracias al acoplamiento entre el PS II (un análogo al PS de las bacterias rojas) y el PS I (un análogo al PS de las bacterias verdes) y a un complejo proteína $–Mn_4^{2+}$ altamente oxidante (OEC).

Este proceso se realiza en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o de sus ancestros endosimbióticos, las cianobacterias, y genera un fuerte Δp hacia el lumen tilacoidal (lumen ácido) produciendose O_2 en el compartimento lumenal y NADPH en el estroma (Fig. 3.31).

En la fotosíntesis oxigénica existen dos reacciones luminosas, una en el CR P680 del PS II, acoplada a la fotolisis del agua y a la reducción de una molécula de feofitina, y otra en el CR P700 del PS I, acoplada a la reducción del $NADP^+$.

En el PS II, la absorción de un fotón de luz "azul" genera un potente oxidante, el $P680^+$, que extrae e^- del agua gracias a un grupo prostético de Mn^{2+} del complejo productor de O_2 (OEC). P680 es un reductor débil, pero suficiente para reducir la feofitina, iniciando así una cadena de transferencia electrónica que une los dos fotosistemas (Fig. 3.32).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

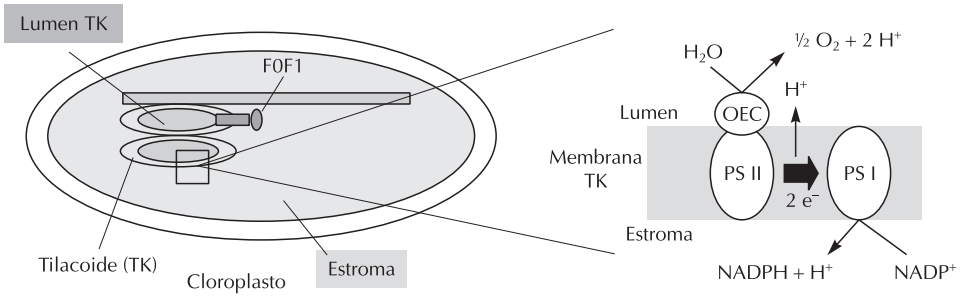


Figura 3.31. Acoplamiento entre los PS I y II en la fotosíntesis oxigénica. OEC (complejo productor de O_2); TK (tilacoide). La F0F1 (ATP sintetasa cloroplástica) está orientada hacia la producción de ATP en el estroma.

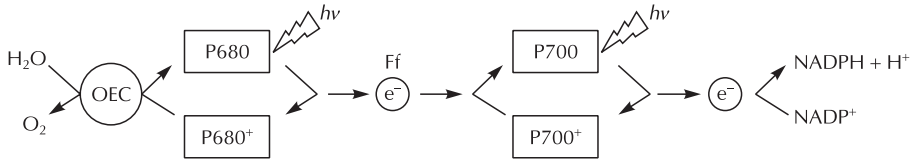


Figura 3.32. Acoplamiento de fotosistemas: generación de un oxidante fuerte en el PS II y un reductor fuerte en el PS I. Ff (Feofitina).

Por su parte, la absorción de un fotón de luz "roja" en el PS I genera un oxidante débil ($P700^+$), cuya contrapartida reducida, P700, es un potente reductor capaz de transferir electrones a la ferredoxina, tal como sucede en el PS de las bacterias verdes.

El e^- arrancado al P680 se transfiere a una molécula de feofitina, clorofila que tiene el Mg^{2+} sustituido por 2 H^+, cuyo E^o es –0,5 V; este proceso es similar al del PS de las bacterias rojas.

El e^- de la feofitina se transfiere a un par QA-QB y de éste, al conjunto de quinonas de la membrana tilacoidal (plastoquinona, PQ) y al cit *bf*, homólogo del *bc1*, donde se genera Δp por un ciclo similar al Qo-$b_L b_H$Qi de la cadena respiratoria y que transfiere 4 H^+ al lumen tilacoidal por cada 2 e^-.

El e^- pasa del cit *bf* a la Cu-proteína plastocianina (PC) y de ésta a la clorofila $P700^+$, oxidante moderado ($E^o = +0{,}5$ V), formado a raíz de la absorción de un fotón de luz "roja" por el CR P700.

Cuando P700 absorbe un fotón de luz "roja" se transforma en P700*, potente reductor ($E^o < -1{,}0$ V) que cede su e^- a una cadena AoA1FeS similar a la del PS de las bacterias verdes.

El e^- energetizado del centro (4Fe4S) pasa a una proteína 2Fe2S denominada ferredoxina (Fd) y ésta reduce al $NADP^+$ mediante la enzima Fd-$NADP^+$ reductasa, que contiene FAD como grupo prostético.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La Fd puede transferir los e^- a la PQ y no al $NADP^+$ por lo que en este caso se genera sólo Δp y no poder reductor (transporte cíclico de electrones) (Fig. 3.33).

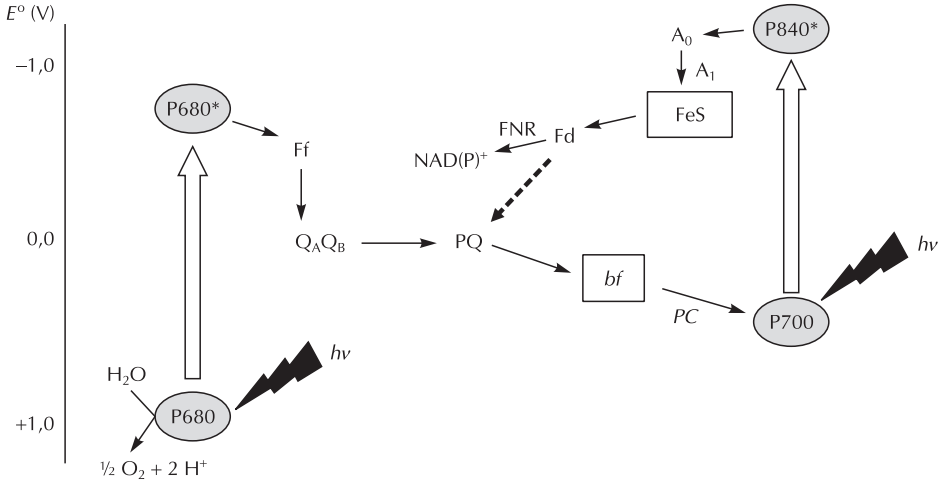


Figura 3.33. Transporte no cíclico de electrones y transporte cíclico (flecha punteada) en la fotosíntesis oxigénica. Ff (feofitina); PQ (plastoquinona); *bf* (citocromo *bf*); PC (plastocianina); FeS (centro sulfoférrico); A_0 (clorofila a); A_1 (filoquinona (Vit K); Fd (ferredoxina); FNR (Fd:$NADP^+$ reductasa).

La membrana tilacoidal tiene una ATP-asa FoF1 similar a la mitocondrial o bacteriana: el flujo de H^+ del lumen al estroma impulsa la síntesis de ATP (fotofosforilación).

La estequiometría de los 2 PS varía entre PS II/PS I = 0,34 (cianobacterias) y 1,4 (algas verdes). Para evitar la migración de los excitones al PS I (cuya energía de excitación es menor que la del PS II) y que el PS II quede en estado subexcitado permanentemente, el PS II se dispone en las membranas granales (MG) y el PS I en las intergranales (MIG) (Fig. 3.34).

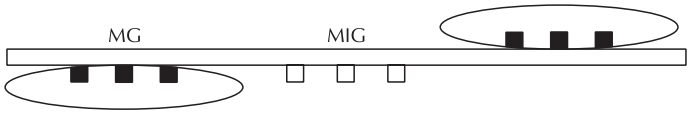


Figura 3.34. Disposición asimétrica de los PS I (cuadrados blancos) y II (cuadrados negros).

Durante el día, la luz solar intensa (rica en fotones azules) fotoexcita más el PS II que el PS I, por lo que la cadena de transporte de electrones entre el PS II y el PS I puede quedar reducida en exceso paralizando la conexión PS II/PS I. Para evitarlo, el complejo captor de luz del PS II (LHC II) es forzado a migrar hacia el PS I mediante su fosforilación por una kinasa de proteínas que se activa cuando aumenta la concentración de PQH_2.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

3.6.3. Rendimiento de la fotosíntesis

Fotosíntesis anoxigénica

Cociente $H^+/e^- = 2$ (*bc1*): cada e^- equivale al eflujo de 2 H^+

Cociente $P/e^- = ½$: cada e^- equivale a 0,5 ATP

Como la síntesis de 1 ATP requiere 4 H^+ y equivale a 50 kJ mol^{-1} (0,5 eV/ATP), se requieren 25 kJ para sintetizar 0,5 moles de ATP. Dado que 1 Einstein de luz de 890 nm posee una energía de 130 kJ, el rendimiento será:

$$r = \frac{25}{130} = 0{,}19 \qquad (19\%)$$

Fotosíntesis oxigénica

En los cloroplastos el ΔpH entre el estroma y el lumen tilacoidal es muy fuerte (3,5), pero $\Delta\Psi \approx 0$ V porque la membrana tilacoidal es permeable al Cl^- y al Mg^{2+}, en dirección opuesta, y esto deshace el $\Delta\Psi$. Por tanto, $\Delta p = 0{,}06 \times 3{,}5 = 0{,}21$ V, que equivalen a un $\Delta G = -20$ kJ mol^{-1} de H^+, valor muy parecido al observado en mitocondrias respirando.

Para una estequiometría de 4 H^+/ATP, el valor anterior equivale a un total de –80 kJ (0,8 eV), muy por encima del valor requerido para la síntesis de ATP *in vivo* (0,5 eV).

Cociente $H^+/e^- = 3$ (1 en OEC y 2 en *bc1*): cada e^- equivale al eflujo de 3 H^+

Cociente $P/e^- = 3/4$: cada e^- equivale a 0,75 ATP

Como la síntesis de 1 ATP requiere 4 H^+ y equivale a 50 kJ mol^{-1} (0,5 eV/ATP), se requieren 37,5 kJ (0,38 eV) para sintetizar 0,75 moles de ATP. Como el ΔE entre los pares O_2/H_2O y $NADP^+$/NADPH es –1,14 V, la transferencia electrónica entre el agua y el $NADP^+$ requiere al menos 1,14 eV.

Si por cada e^{-*} se sintetizan 0,75 ATP (0,38 eV) y ½ NADPH (1,14 eV), en total se necesitan 0,38 + 1,14 = 1,52 eV.

Para energetizar 1 e^- se requieren 2 fotones, uno de 680 nm (1,82 eV) y otro de 700 nm (1,8 eV), lo que hace un total de 3,62 eV, por lo que el rendimiento será:

$$r = \frac{1{,}52}{3{,}62} = 0{,}42 \qquad (42\%)$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Bibliografía

BAUER, C. E., ELSEN, S., BIRD, T. H. (1999). "Mechanisms for redox control of gene expression". *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 495-523.

BLANKENSHIP, R. L. (2002). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science.

EHRLICH, H. T. (1996). *Geomicrobiology*. Marcel Dekker Inc.

HIPKINS, M. F., BAKER, N. R. (eds.) (1986). *Photosynthesis. Energy transduction*. IRL Press.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. BROCK (2002). *Biology of Microorganisms*, Pearson Education Inc, 10th ed.

MARVAN, W., OESTERHELT, D. (2000). "Archaeal vision and Bacterial smelling". *ASM News*, 66, 83-89.

MOAT, A. G., FOSTER, J. W., SPECTOR, M. P. (2002). *Microbial Physiology*, Wiley-Liss, 4th ed.

NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach (1990)*. Sinauer Assoc. Inc.

NICHOLLS, D. G. *Bioenergetics (1982). An introduction to the Chemiosmotic Theory*. Academic Press.

OZAWA T., y PAPA, S. (eds.) (1987). *Bioenergetics. Structure and Function of Energy transducing systems*. Springer Verlag.

RELIMPIO, A. M., VEGA, J. M., GUERRERO, M. G., LOSADA, M. (1977). *Potenciometría y Bioenergética*, Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

SCHINK, B., THIEMANN, V., LAUE, H., FRIEDRICH, M. VW (2002). "*Desulfotignum phosphitoxidans* sp.nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate", *Arch. Microbiol.*,177, 381-391.

WHITE, D. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes (1997)*. Oxford University Press, 2nd ed.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 4
CICLOS BIOGEOQUÍMICOS I

Glosario
4.1. Los compuestos carbonados y la biosfera
4.2. El ciclo del carbono en la naturaleza
4.3. Bioquímica del ciclo del carbono
4.3.1. Degradación de compuestos carbonados
Glucolisis, ruta de Entner-Doudoroff y ruta de las pentosas-fosfato
Oxidación del piruvato
A) Rutas aeróbicas: descarboxilación del piruvato y ciclo de Krebs
B) Rutas anaeróbicas
a) Fermentaciones alcohólica, de maltosa y ácida mixta
b) Control del metabolismo anaerobio
c) Hidrogenasas
d) Homoacetogénesis (respiración de carbonato)
e) Oxidación anaerobia del acetato. Ruta del Ciclo de Krebs reductivo y ruta oxidativa del acetil-CoA
4.3.2. Biosíntesis de compuestos carbonados
Ruta del acetil-CoA
Ruta del glioxilato
Gluconeogénesis
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Arqueobacterias: Procariotas del domino *Archaea* que posee 3 *phyla*: *Korarchaeota, Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* y cuyos miembros están más relacionados evolutivamente con los eucariotas que con las eubacterias.
Autótrofos: Organismos que pueden utilizar CO_2 como fuente de carbono.
Carboxidotrofos: Bacterias que oxidan CO a CO_2.
Cianobacterias: Bacterias fotosintéticas oxigénicas con fotosistemas I y II.
Corrinoide: Anillo de la vitamina B12 que posee un ión Co^+ coordinado a grupos pirrol.
Efecto invernadero: Calentamiento producido por una pantalla que deja pasar los rayos solares pero retiene la radiación infrarroja.
Endosimbionte: Célula procariótica que coloniza el citoplasma de otra célula y evoluciona hacia un orgánulo especializado en el hospedador.
FeS: Grupo prostético compuesto por iones $Fe^{2+/3+}$ y S lábil.
Fuerza motriz de iones: Gradiente de protones (Δp) o de sodio (Δn) a través de la membrana plasmática.
Frecuencia de una radiación: Se define como el cociente c/λ siendo c la velocidad de la luz en el vacío y λ la longitud de onda de la radiación.
fg: Femtogramo, 10^{-15} g.
Gt: Gigatonelada, 10^{15} g.
Grupo prostético: Cofactor metálico u orgánico unido a una enzima que participa en la catálisis.
Homoacetógenos: Bacterias que respiran carbonato: reducen CO_2 a acetato.
Heterótrofos: Organismos que no pueden utilizar CO_2 como fuente de carbono.
Infrarrojo: Radiación de longitud de onda intermedia (1 mm > λ > 700 nm).
MDa: 10^6 daltones (1 Da = 1/12 de la masa atómica del isótopo ^{12}C).
Mt: Megatonelada, 10^{12} g.
Metanógenos: Arqueobacterias que reducen CO_2 o compuestos orgánicos a CH_4.
Metanotrofos: Bacterias que oxidan CH_4 a CO_2.
Metilotrofos: Bacterias que oxidan grupos $R-CH_3$ a CO_2.
Osmolito: Compuesto intracelular que contrarresta la presión osmótica del medio.
Pg: Petogramo, 10^{15} g.
Quimiolitotrofos: Organismos que utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono y energía.
Quimioorganotrofos: Organismos que utilizan compuestos orgánicos como fuente de C y energía.
Quimiosíntesis: Transformación de energía química en FMI.
Quimiosmótico: Mecanismo de síntesis de ATP a partir de gradientes iónicos a través de una membrana.
Reductores de sulfato: Anaerobios que utilizan SO_4^{2-} como aceptor de e^-.
Rumen: Parte del tubo digestivo de algunos herbívoros (rumiantes) donde una mezcla compleja de microorganismos degrada los polisacáridos de la dieta a ácidos, CO_2, CH_4, H_2, etc.
Tn: Tonelada, 10^6 g.
Tt: Teratonelada, 10^{18} g.
Sintrofia: Acoplamiento metabólico y energético entre una especie que genera endergónicamente un producto y otra especie que lo consume mediante una reacción exergónica.
Tabla de equivalencias entre unidades de peso y sus múltiplos:

Pg	10^{15} g	Gt
Tg	10^{12} g	Mt
Gg	10^9 g	Kt
Mg	10^6 g	Tn

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

4.1. Los compuestos carbonados y la biosfera

La química de los organismos vivos es la química del carbono, cuya estructura tetraédrica preside la configuración de las biomoléculas y es responsable de sus propiedades, desde la estereoisomería de las moléculas más simples hasta la superestructura de los grandes biopolímeros como los polisacáridos y las proteínas.

El carbono es uno de los elementos que la humanidad conoce desde hace más tiempo, ya sea en sus formas amorfas (carbón vegetal) o cristalinas (diamante, grafito) y es el elemento más abundante en la materia viva.

Su configuración electrónica $1s^2\ 2s^2\ 2p^2$ le capacita para formar enlaces covalentes C–C, C–H, C–O, C–N muy estables y, sobre todo, para formar largas cadenas carbonadas flexibles (C–C) o con puntos de rigidez (C=C) (Fig. 4.1).

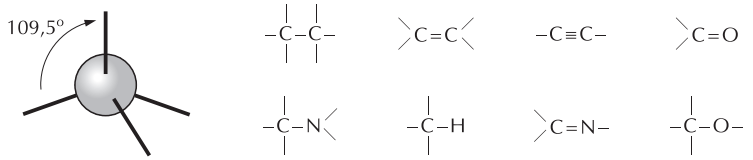


Figura 4.1. Versatilidad del carbono para formar enlaces consigo mismo y con los bioelementos.

Esta versatilidad para formar enlaces covalentes con los principales bioelementos hace del carbono la piedra angular de la bioquímica y determina que se movilicen anualmente decenas de miles de Mt de carbono, implicando compuestos sencillos o muy complejos en los que su estado de oxidación varía desde +4 hasta –4 (Tabla 4.1). La posición de algunos grupos (carboxilo, formilo), dependerá de la naturaleza del resto R– y de la reacción de que se trate.

Tabla 4.1. Estados de oxidación del carbono en los compuestos orgánicos monocarbonados. EO (número o estado de oxidación).

EO	Especies químicas						
+4	O=C=O dióxido de C	OH–C≡N cianato	R–COOH carboxilo	H_2CO_3 ácido carbónico			
+2	$\overset{-}{O} \equiv \overset{+}{C}$ monóxido de C	HCOOH ácido fórmico	R–CHO formilo	R≡CH metenilo	R–C=NH formimino	HC≡N cianuro	O=CH–NH_2 formamida
0	O=CH_2 formaldehído	(CH_2O) hidrato de C	R=CH_2 metileno				
–2	H_2C–OH metanol	R–CH_3 metilo	H_3C–NH_2 metilamina				
–4	CH_4 metano						

En la naturaleza el carbono se moviliza desde sus grandes depósitos en rocas y sedimentos (75×10^{15} Tn), aguas saladas (38×10^{12} Tn), combustibles fósiles (4×10^{12} Tn),

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

hidratos de metano del manto (10^{13} Tn) hasta las biomoléculas, que contienen alrededor de 2×10^{12} Tn (0,003% del carbono total del planeta, el 99,99% en la biomasa terrestre, especialmente en forma de *humus* o materia orgánica muerta). Estas cifras hacen reflexionar sobre el hecho de que el ciclo del carbono implica un intervalo de peso de 30 órdenes de magnitud entre las moléculas (fg, 10^{-15} g) y los reservorios de carbono (Pg, 10^{15} g).

El carbono se transfiere de forma muy rápida entre estos depósitos mediante el CO_2 atmosférico, un gas muy minoritario en la atmósfera actual (< 1%) pero que produce un fuerte calentamiento global al retener la radiación infrarroja que emite la Tierra (efecto invernadero).

4.2. El ciclo del carbono en la naturaleza

Tiene dos fases, una anaerobia y otra aerobia (Fig. 4.2).

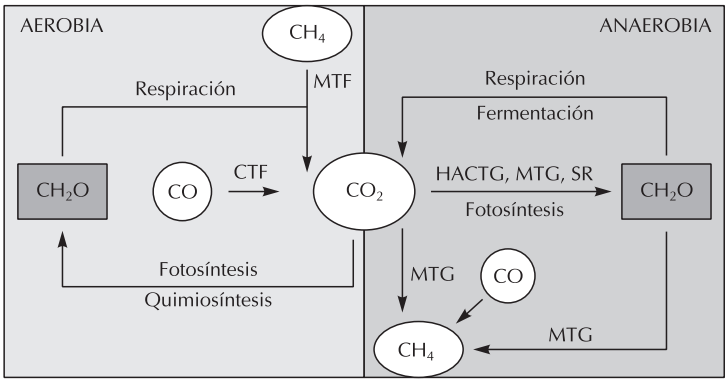


Figura 4.2. Ciclo del carbono. MTG (arqueobacterias metanogénicas); MTF (arqueobacterias y eubacterias metanotrofas y metilotrofas); CTF (eubacterias carboxidotrofas). HACTG (eubacterias homoacetógenas); SR (eubacterias reductoras de sulfato).

El fondo marino constituye un sumidero de carbono de origen biogénico que se mineraliza a roca (50×10^6 Gt) y el suelo constituye otro sumidero donde se forman hidrocarburos fósiles (5000 Gt).

El metano producido en medios anaeróbicos pasa rápidamente a medios aeróbicos, bien por su insolubilidad o por emisiones a partir de los hidratos de metano a través de humeros submarinos o volcanismo. En presencia de oxígeno, el metano se oxida a CO_2 por los metanotrofos y metilotrofos (Fig. 4.3).

El CO_2 producido por oxidación del CH_4 o del CO o por respiración y fermentación de biomasa es fijado de nuevo a la forma (CH_2O) por procesos fotosintéticos o quimiosintéticos.

De todo lo anterior se deduce que el carbono de la biosfera se encuentra en un delicado equilibrio entre sus formas oxidadas y reducidas en el que las plantas y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

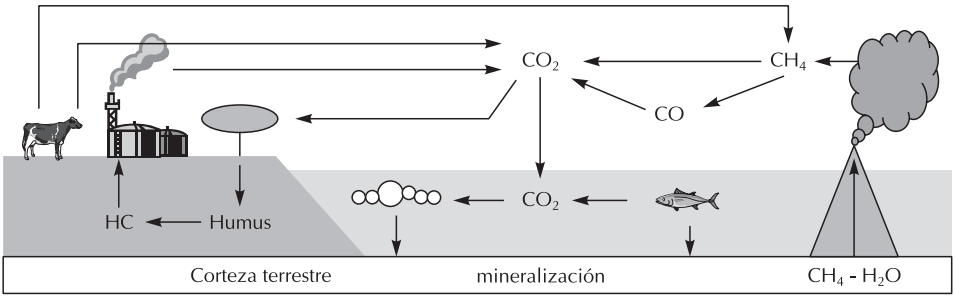


Figura 4.3. Los organismos vivos y el ciclo del carbono en la naturaleza. HC: hidrocarburos fósiles.

bacterias del suelo y las algas y bacterias de las aguas desempeñan un papel amortiguador de los cambios bruscos a escala geológica.

No obstante, la aparición del hombre y su tecnología está produciendo desplazamientos rápidos de este equilibrio hacia el CO_2 y el CH_4 atmosféricos, gases que generan un fuerte efecto invernadero, y cuya acumulación puede tener efectos imprevisibles.

4.3. Bioquímica del ciclo del carbono

Las plantas superiores son un sumidero de carbono en forma de celulosa y lignina, polímeros carbonados muy estables gracias a su composición química (enlaces glucosilo β ($1 \rightarrow 4$) en la celulosa y enlaces Ar–O–R en la lignina). Sólo un grupo muy reducido de bacterias y hongos es capaz de degradar estos polímeros produciendo derivados más fácilmente asimilables por el resto de los organismos. El otro polímero importante, el almidón, se degrada fácilmente gracias a glucosidasas que hidrolizan sus enlaces glucosilo α ($1 \rightarrow 4$).

Posteriormente, las unidades monosacarídicas (glucosa, fructosa, galactosa, manosa, pentosas) se degradan a compuestos tricarbonados mediante las denominadas rutas centrales del metabolismo carbonado (glucolisis, ruta de Entner-Doudoroff, ruta de las pentosas). Los derivados C3 se transforman en aminoácidos o se oxidan a C2 (acetato), que posteriormente se utiliza para la síntesis de lípidos o, en condiciones aeróbicas, se oxida a CO_2 por el ciclo de Krebs. En medios anaeróbicos, el acetato se reduce a CH_4, que también se produce a partir de CO, CO_2 y grupos R–CH_3. En medios aeróbicos o anaeróbicos, el CH_4 se reoxida a CO_2, cerrando así el ciclo del carbono en la naturaleza (Figs. 4.2 y 4.4).

4.3.1. Degradación de compuestos carbonados

Glucolisis, ruta de Entner-Doudoroff (ED) y ruta de las pentosas-fosfato (PP)

La glucolisis es una ruta anfibólica, esto es, se utiliza con fines preferentemente degradativos pero también biosintéticos, ya que conecta con la síntesis de aminoazú-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

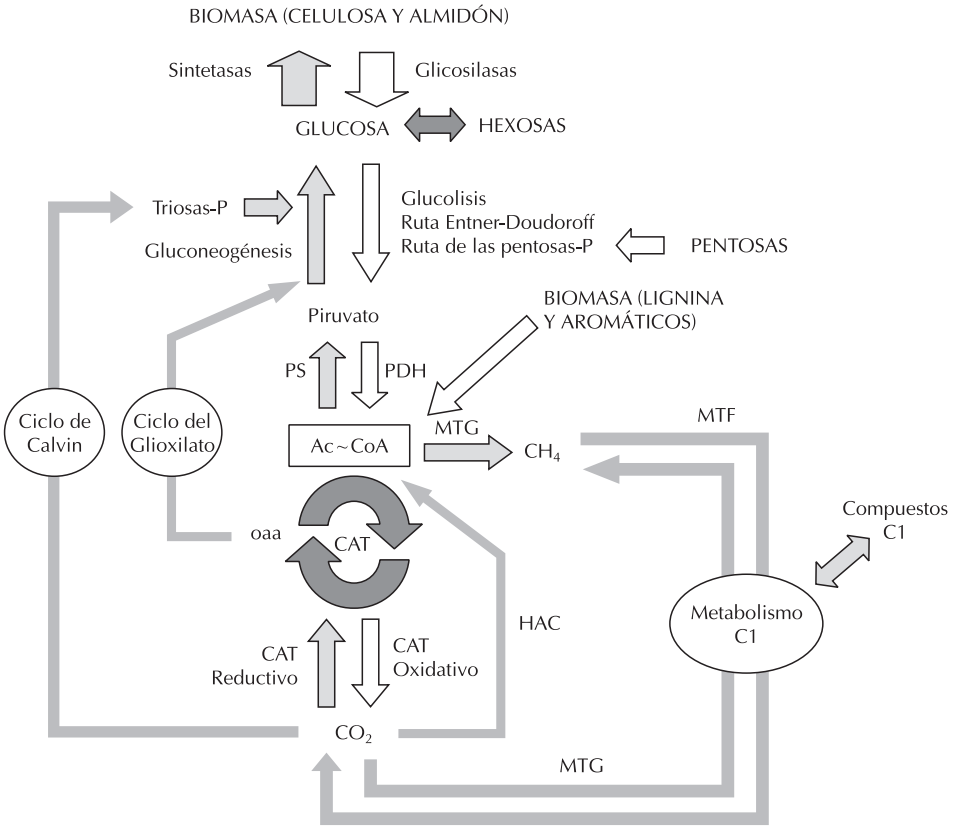


Figura 4.4. Esquema general del metabolismo del carbono en la biosfera. CAT (ciclo de Krebs); HAC (homoacetogénesis); MTG (metanogénesis); MTF (metanotrofia y metilotrofia); C1 (compuestos monocarbonados); PS (piruvato sintasa); PDH (piruvato deshidrogenasa); oaa (oxalacetato).

cares, la ruta PP (pentosas-P → bases-N; Er-4P → aa) y la síntesis de aminoácidos (3-PG, PEP, piruvato → aa). El flujo metabólico glucolítico está bajo control de la carga energética celular y algunos intermediarios: el ADP activa la fosfofructokinasa (PFK) y el ATP y el PEP la inhiben, mientras que la F1,6BP activa la piruvato kinasa.

La ruta de las PP es reversible en su fase 2 (conversión de azúcares de 3, 4, 5 y 6 C) y puede ser oxidativa (produce CO_2 + NADPH) o biosintética (produce pentosas-P, eritrosa-P, triosas-P y NADPH). Algunas estirpes de *Brucella* o *Thiobacillus* carecen de ruta ED y de la Fase 1 de la glucolisis, por lo que dependen de la ruta de las PP en su versión oxidativa.

La ruta ED genera menos ATP pero es imprescindible para el metabolismo del gluconato, un importante nutriente microbiano y para las bacterias que carecen de PFK. Algunas arqueobacterias poseen una versión modificada en la que utilizan azúcares y derivados no fosforilados y una kinasa que fosforila el 2-ceto-3-deoxigluconato a KDPG (Fig. 4.5).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la figura 4.5 se muestran las rutas degradativas de los carbohidratos.

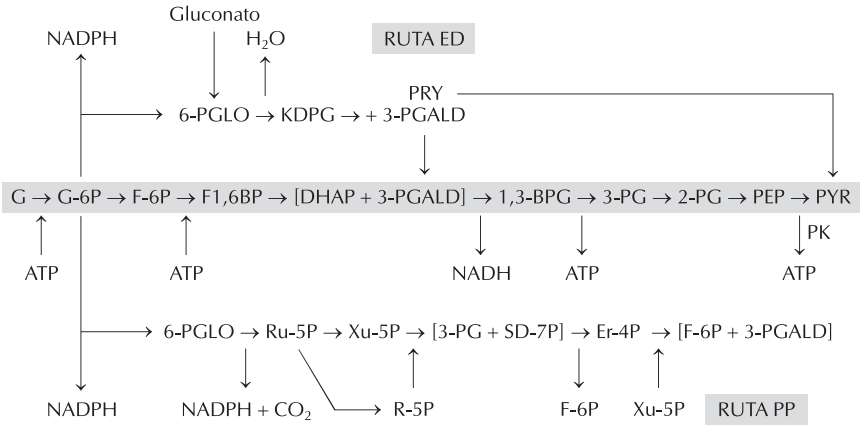


Figura 4.5. Esquema de las rutas glucolítica, ED y PP. G (glucosa), G-6P (glucosa-6-fosfato), 6-PGLO (6-fosfogluconato), KDPG (2-ceto-3-deoxi-6-P-gluconato), F-6P(fructosa-6-fosfato), F1,6BP (fructosa 1,6-bisfosfato), PFK (fosfofructokinasa), DHAP (dihidroxiacetona-fosfato), 3-PGALD (3-fosfogliceraldehído), PYR (piruvato), 1,3-BPG (1,3-bisfosfoglicerato), 3-PG (3-fosfoglicetaro), 2-PG (2-fosfoglicerato), PEP (fosfoenolpiruvato), Ru-5P (ribulosa-5-fosfato), Xu-5P (xilulosa-5-fosfato), R-5P (ribosa-5-fosfato), SD-7P (sedoheptulosa-7-fosfato), Er-4P (eritrosa-4-fosfato), PK (piruvato kinasa).

Balances netos:

Ruta ED: $\text{G-6P} + \text{NAD}^+ + \text{ADP} + \text{Pi} \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + \text{NADH} + \text{ATP}$

Glucolisis: $\text{G-6P} + 2\ \text{NAD}^+ + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{ATP}$

Ruta PP: $\text{G-6P} + 3\ \text{NADP}^+ \longrightarrow 3\ \text{CO}_2 + 3\ \text{NADPH} + \text{3-PGALD}$

Oxidación del piruvato

A) Rutas aeróbicas

a) Descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA

En aerobiosis, el piruvato se descarboxila y oxida por la piruvato deshidrogenasa (PDH), un complejo multienzimático (casi dos veces el tamaño del ribosoma en *E. coli*) que cataliza la reacción siguiente:

$$\text{Piruvato} + \text{NAD}^+ + \text{CoA-SH} \longrightarrow \text{Acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\Delta G^o = -40\ \text{kJ mol}^{-1}$$

La PDH tiene una masa molecular de varios MDa y está formada por tres enzimas, cada una con un grupo prostético: pirofosfato de tiamina (TPP), ácido lipoico y FAD. La primera enzima del complejo (descarboxilasa/deshidrogenasa) se inhibe por NADH/acetil-CoA y se activa por PEP/AMP.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) Ciclo de Krebs (CAT)

La oxidación del acetil~CoA a CO_2 requiere como paso previo la ruptura del enlace C–C, lo que se lleva a cabo en los organismos aerobios mediante una ruta cíclica: el acetil-CoA se condensa con el oxalacetato en el ciclo de Krebs y se forman una serie de compuestos fácilmente descarboxilables (isocitrato y 2-oxoglutarato) y oxidables (isocitrato, 2-oxoglutarato, succinato y malato) (Fig. 4.6).

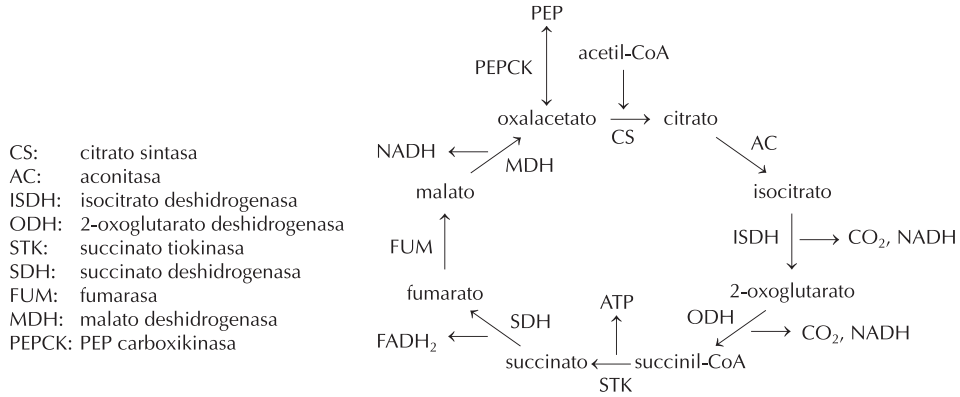


Figura 4.6. Reacciones y enzimas del Ciclo de Krebs.

El control del flujo metabólico en el CAT se produce por inhibición alostérica de la CS por NADH y 2-oxoglutarato o por ATP. Además, la ISDH de *E. coli* se inactiva por fosforilación reversible dependiendo de un sistema kinasa/fosfatasa que obedece a la concentración de compuestos carbonados precursores del CAT, AMP, ADP, etc.: si aumenta ésta, se activa la kinasa y se inhibe la ISDH (Ver sección 4.3.2).

El poder reductor generado en el ciclo de Krebs se transfiere al O_2 mediante la cadena respiratoria aeróbica siendo el agua el producto final (ver Capítulo 3). No obstante, la cadena respiratoria genera especies reactivas del O_2 (ROS), como el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que destruyen las biomoléculas a menos que sean transformados en productos inocuos:

$$O_2 + e^- \longrightarrow \mathbf{O_2^-} \xrightarrow{\text{SOD}} \mathbf{H_2O_2} + O_2$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Cat}} 2\,H_2O_2 + O_2$$

La superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Cat) son comunes entre los aerobios y evitan que se formen ROS aún más tóxicas como el radical hidroxilo ($HO^\bullet$) o el oxígeno singlete ($^1O_2$):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \longrightarrow \mathbf{HO^\bullet} + Fe^{3+} + H_2O$$

$$O_2 \xrightarrow{h\nu} \mathbf{^1O_2} \longleftarrow \mathbf{O_2^-}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El CAT no es una ruta común entre todas las bacterias aerobias (los metilotrofos carecen de ODH); en otros casos, la actividad del CAT no es completa y el acetil-CoA no se oxida totalmente (*Gluconobacter*). Por otra parte, algunos anaerobios (eubacterias verdes, eubacterias reductoras de sulfato tipo II y algunas *Arqueobacterias*) poseen un CAT reductivo. Una ruta complementaria del CAT, el ciclo del glioxilato, está catalizado por la isocitrato liasa (ISL) y la malato sintasa (MS) (ver sección 4.3.2).

Las acetobacterias son proteobacterias aerobias, acidófilos moderados (pH 5,0), que oxidan alcohol y producen acetato como subproducto debido a que carecen de 2-oxoglutarato deshidrogenasa (*Gluconobacter*) o a que el CAT se inhibe por etanol (*Acetobacter*). Los e^- se canalizan hacia la cadena respiratoria por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y una quinona especial, la pirrol-quinolín-quinona (PQQ). El acetato en exceso se libera al medio (producción industrial de vinagre) (Fig. 4.7).

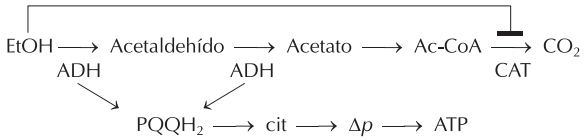


Figura 4.7. Oxidación incompleta de alcohol.

Estos organismos también pueden oxidar azúcares a ácidos (glucosa → gluconato) y se utilizan para producir ascorbato (vitamina C) a partir de sorbitol → sorbosa → ascorbato.

B) Rutas anaeróbicas

a) Fermentaciones

La fermentación alcohólica se produce por levaduras (*Saccharomyces*) y bacterias (*Zymomonas*) y es un proceso asociado a la biotecnología de bebidas alcohólicas desde tiempo inmemorial. Su estudio llevó al nacimiento de la Bioquímica metabólica y de la enzimología a finales del siglo XIX.

$$\text{Piruvato} \xrightarrow{\text{PDC-TPP}} \text{acetaldehído} \xrightarrow{\text{ADH-NAD}^+} \text{etanol}$$

La PDC (piruvato descarboxilasa), como la piruvato deshidrogenasa (PDH), posee pirofosfato de tiamina (TPP) para descarboxilar el piruvato sin oxidar el fragmento C2 aldehído. Por su parte, la ADH (alcohol deshidrogenasa) contiene un grupo prostético de Zn^{2+} y se induce en condiciones anaeróbicas tanto en las bacterias como en las levaduras y en las plantas superiores.

En la actualidad, se plantea la producción de alcoholes como alternativa al uso de combustibles fósiles (en los Estados Unidos se producen 400 MT de etanol por año a partir de almidón de cereales). El etanol industrial se utiliza como disolvente y como

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

gasohol, combustible sin plomo y que genera menos CO y óxidos de nitrógeno que la gasolina.

– Fermentación de maltosa por *Pyrococcus furiosus*.

  P. furiosus es un hipertermófilo (105 °C) que utiliza ADP como donador de fosforilo (~P) en la glucolisis y ferredoxina como oxidante en la glucolisis y en la descarboxilación oxidativa del piruvato (Fig. 4.8).

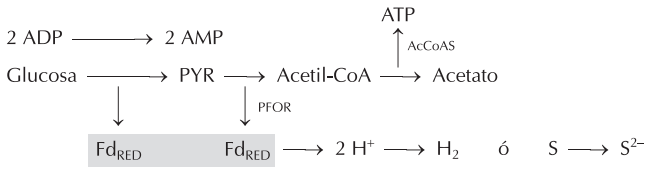


Figura 4.8. Fermentación de maltosa en *P. furious*. PFOR (piruvato:ferredoxina óxidorreductasa); AcCoAS (Acetil-CoA sintetasa); PYR (piruvato).

  La PFOR es la versión anaeróbica de la PDH y la AcCoAS permite la síntesis de 1 ATP extra en este tipo de fermentación.

– Fermentación ácida mixta

  Tiene lugar en las enterobacterias y produce etanol, ácidos carboxílicos (acetato, lactato, succinato) e hidrógeno molecular. En este caso, el piruvato no se descarboxila, sino que se descompone en formiato y acetil-CoA por la piruvato: formiato liasa. El formiato se oxida a CO_2 por medio de la formiato:hidrógeno liasa, una enzima acoplada a una hidrogenasa de producción de H_2.

  La disipación del exceso de poder reductor se lleva a cabo mediante la reducción de piruvato a lactato, la reducción de PEP a succinato y la reducción de H^+ a H_2. En esta fermentación se produce ATP extra gracias a la ruta fosforoclástica en la que el acetil~CoA se transforma en un fosfoanhídrido de alta energía, el acetil~P, y éste en acetato y ATP (Fig. 4.9).

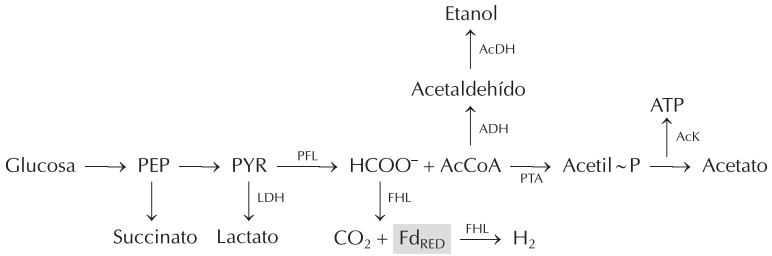


Figura 4.9. Fermentación ácida mixta en las enterobacterias. Enzimas: lactato deshidrogenasa (LDH); acetaldehído y alcohol deshidrogenasas (AcDH y ADH); fosfotransacetilasa (PTA); acetato kinasa (AcK); Fd_{RED} (ferredoxina reducida); FHL (formiato: hidrógeno liasa); PFL (piruvato: formiato liasa. El succinato se produce por la ruta PEP → Oxalacetato → Malato → Succinato (Fig. 4.6).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) Control del metabolismo anaerobio

En las enterobacterias anaerobias facultativas el metabolismo anaerobio está bajo control estricto de la presión de O_2 (Fig. 4.10).

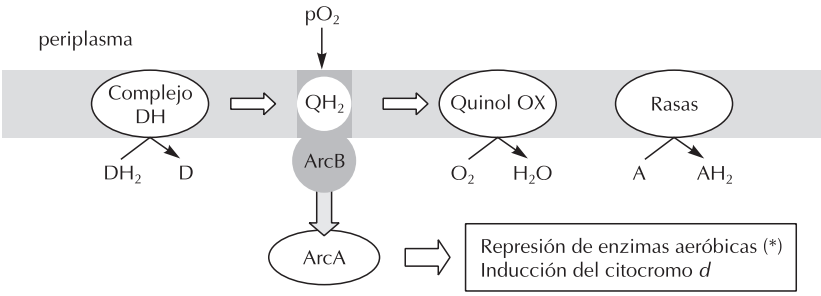


Figura 4.10. Control del metabolismo aeróbico. DH (deshidrogenasa); OX (oxidasa); Arc (*aerobic respiratory control*); Rasas (reductasas terminales); (*) enzimas aeróbicas: fumarasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa; succinato deshidrogenasa; piruvato deshidrogenasa; lactato deshidrogenasa; flavoproteína deshidrogenasa; citocromo *bo*; isocitrato liasa. El citocromo *d* tiene mayor afinidad por el O_2 que el citocromo *bo*.

En la figura 4.10 se muestra el cambio metabólico que causa el tránsito aerobiosis-microarobiosis. ArcB es una proteína que detecta cambios del estado de óxido-reducción de las quinonas (sensor rédox). Cuando la pO_2 disminuye, la *ratio* Q/QH_2 aumenta, ArcB se autofosforila en una histidina y transfiere el grupo fosforilo a un aspartato de ArcA, una proteína que controla la expresión de genes que codifican las enzimas aeróbicas.

Si la pO_2 disminuye aún más, se activa FNR, un factor de transcripción del tipo CRP (proteína regulada por AMP cíclico). Al estabilizarse su centro 4Fe4S, FNR promueve la activación de genes que codifican reductasas terminales capaces de generar Δp (formiato deshidrogenasa/nitrato reductasa respiratoria, fumarato reductasa, piruvato: formiato liasa, reductasas del dimetil sulfóxido y del óxido de trimetilamina). FNR también reprime genes aeróbicos, como los que codifican los citocromos *o* y *d*, succinato deshidrogenasa, superóxido dismutasa y la propia FNR.

De esta forma, en anaerobiosis, el Ciclo de Krebs se bloquea a nivel de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y se transforma en una ruta bifurcada que conduce a la síntesis de succinato (precursor del grupo hemo) y de glutamato (precursor de aminoácidos) (véase Figs. 4.6 y 4.11).

Para que los procesos catabólicos oxidativos no se detengan se necesita mantener un estado suficientemente oxidado de las coenzimas rédox (NAD^+, nucleótidos de flavina, ferrodoxina, quinonas).

En aerobiosis, el O_2 es un sumidero de e^- muy eficaz y la forma oxidada de las coenzimas rédox se regenera con facilidad, pero en anaerobiosis este proceso se dificulta porque los aceptores de e^- (piruvato, acetalhehído, nitrato, sulfato) poseen E^o menos positivos que el O_2.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

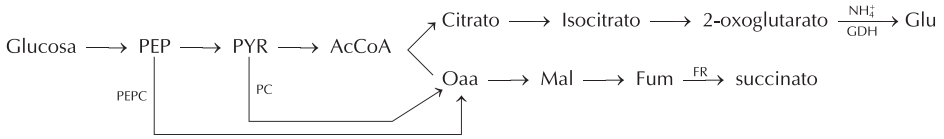


Figura 4.11. Ciclo de Krebs incompleto en anaerobiosis: PEPC y PC (fosfoenolpiruvato y piruvato carboxilasas); FR (fumarato reductasa): GDH (glutamato deshidrogenasa).

En anaerobiosis, la reducción de H^+ a H_2 actúa como una válvula de escape del exceso de poder reductor, produciéndose un balance medioambiental entre la producción y el consumo de H_2 por las hidrogenasas.

c) Hidrogenasas

La hidrogenasas son enzimas descubiertas por Stephenson y Stickland en 1931 en *E coli*, que catalizan la reacción de consumo o producción de H_2:

$$2\ H^+ + 2\ e^- \longleftrightarrow H_2 \qquad E^{o\prime} = -0{,}41\ V \quad (pH\ 7{,}0)$$

Las hidrogenasas (Ha) están ampliamente distribuídas por toda la escala biológica y se encuentran en las arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. De hecho, hay una hipótesis sobre la aparición de los eucariotas basada en la endosimbiosis de una eubacteria productora de H_2 y una arqueobacteria consumidora del mismo (en el citoplasma de ciertos protozoos ciliados actuales existen endosimbiontes metanogénicos consumidores de H_2).

Las Ha son de dos tipos, uno que contiene hierro y otro que contiene hierro, níquel y selenio. Las Ha-Fe poseen un grupo sulfoférrico F (4Fe4S) y otro H (6Fe). La estructura de algunas Ha se conoce a nivel atómico por difracción de rayos X, pero el interés de estas enzimas va más allá de la ciencia básica porque las hidrogenasas tienen un gran interés biotecnológico. Así, la fotoproducción de H_2 por el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es una base muy seria para la biotecnología asociada a las pilas de combustible.

Las Ha se pueden clasificar además en dos grupos, según que catalizen el consumo o reciclado del H_2 (HaR) o su producción (HaP). Además, estas enzimas poseen diferente localización intracelular, que está muy relacionada con su papel fisiológico:

Las HaR periplásmicas catalizan la oxidación del H_2 a H^+ en el periplasma y la transferencia de 2 e^- a través de la membrana plasmática hacia el citosol, por lo que generan los dos componentes de Δp y por tanto son conservadoras de la energía. Los e^- se transfieren a diferentes aceptores citosólicos:

$$\text{Ha}-\text{NiFe} \longrightarrow \text{MQ} \longrightarrow \text{cit } b \longrightarrow \text{fumarato} \quad (\textit{Wolinella})$$

$$\text{Ha}-\text{NiFe} \longrightarrow \text{cit } c3 \longrightarrow SO_4^{2-} \quad (\textit{Desulfovibrio})$$

$$\text{Ha}-\text{NiFe}-\text{FAD} \longrightarrow \text{F420} \quad (\textit{Methanobacterium})$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las HaR asociadas a la membrana plasmática transfieren los e^- a las quinonas (UQ, MQ) o a los citocromos y de éstos a la citocromo oxidasa y al O_2. En este caso se genera Δp a nivel del complejo IV de la cadena respiratoria (véase Capítulo 3), pero el NAD^+ no se puede reducir a expensas del H_2 porque el $\Delta E^{o\prime}$ entre los citocromos o las quinonas y el NAD^+ es desfavorable (entre –0,3 y –0,5 V). Estas bacterias reducen el NAD^+ mediante transporte inverso de e^- impulsado por el Δp.

Las HaR citosólicas catalizan la reducción del NAD^+ a partir del H_2, un proceso que transcurre con $\Delta G < 0$ dado que el $\Delta E^{o\prime}$ a pH 7,0 entre el par $H_2/2H^+$ y el par $NADH/NAD^+$ es favorable (+80 mV). Estas enzimas son Ha–FeNi y contienen además FMN como grupo prostético

Las HaP se acoplan a la oxidación exergónica de sustratos muy reductores como el formiato (FHL) o a la oxidación endergónica del NADH (el $\Delta E^{o\prime}$ entre H_2 y NADH es –0,18 V y por tanto el ΔG asociado es > 0), que sólo tendrá lugar si el H_2 es consumido por un oxidante fuerte (A) mediante una bacteria hidrogenotrofa (metanógenos o reductores de sulfato). Esta transferencia interespecífica de H_2 es un proceso de sintrofia (Fig. 4.12) y se tratará con detalle en el Capítulo 7:

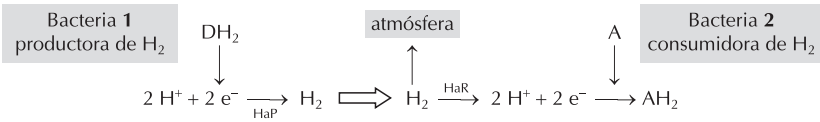


Figura 4.12. Transferencia interespecífica de hidrógeno (sintrofia).

d) Homoacetogénesis (respiración de carbonato)

Es un proceso anaerobio en el que el CO_2 es el aceptor de electrones y que conserva la energía mediante fosforilación a nivel de sustrato y generación de fuerza motriz de iones. La homoacetogénesis (HAC) puede producirse a partir de glucosa o a partir de CO_2 y H_2. La reacción global transforma la glucosa en 3 moléculas de acetato y 4 ATP mediante la glucolisis, la oxidación del piruvato, la ruta del acetil-CoA y la PTA/AcK (Fig. 4.13).

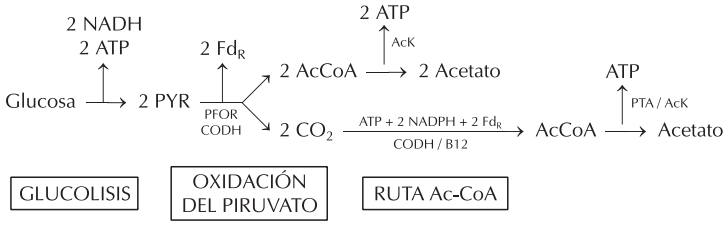


Figura 4.13. Homoacetogénesis. PFOR (piruvato:ferredoxina óxidoreductasa; CODH (CO deshidrogenasa); Fd_R (ferredoxina reducida); AcK (acetato kinasa); B12 (coenzima B12); PTA (fosfotranscetilasa).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los homoacetógenos (*Clostridium thermoaceticum*) utilizan la ruta del acetil-CoA, junto con los metanógenos y los reductores de sulfato autótrofos. Esta ruta es reversible y permite tanto la formación de un enlace C–C a partir de 2 CO_2 como la ruptura del mismo para dar 2 CO_2.

La homoacetogénesis requiere ácido fólico, vitamina B12 y la enzima CO-deshidrogenasa (CODH), que transporta fragmentos C1 oxidados (CO_2) o reducidos (–CO, $–CH_3$) (Fig. 4.14).

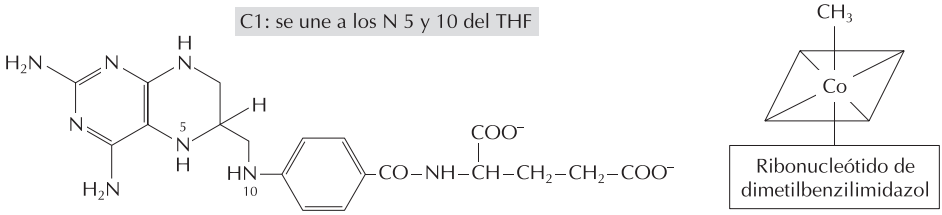


Figura 4.14. Estructuras del tetrahidrofolato (THF, izquierda) y la metil-B12 (derecha).

La CODH posee una capacidad única para romper y formar el enlace C–C del acetato, que en la mayoría de organismos se lleva a cabo mediante el ciclo de Krebs. La rotura reversible del enlace C–C por la CODH se debe al Centro A, una agrupación 4Fe4S que forma un puente tiolato con otro centro metálico binuclear M (Cu ó Ni)–Ni, además de otros centros FeS (C, B y D) (Fig. 4.15).

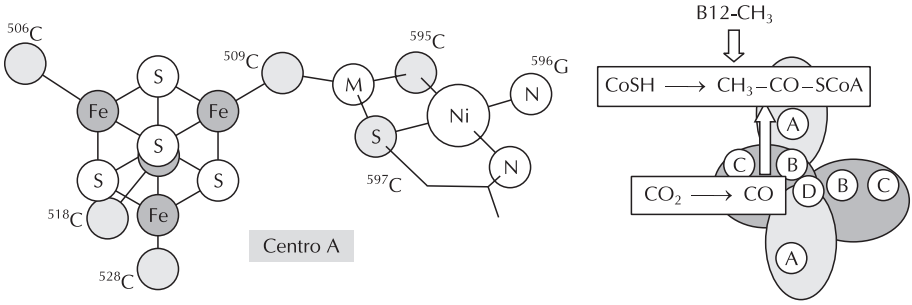


Figura. 4.15. Grupos prostéticos y estructura de la CODH.

La CODH es un tetrámero α(A)β(CB)β(CB)α(A) con un eje de 190 Å y un túnel de 138 Å que conecta el centro C con el A, por el que difunde el CO sin pasar al medio. Esta enzima participa en varias fases importantes del metabolismo anaerobio:

a) Respiración de CO_2 (homoacetógenos):

$$2CO_2 + 4H_2 \longrightarrow \text{acetil-CoA} \longrightarrow \text{Acetato} + \text{ATP}$$

b) Oxidación completa de acetato (anaerobios sin ciclo de Krebs):

$$CH_3COO^- + H^+ + 2\ H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

c) Metanogénesis (metanógenos acetotrofos):

$$CH_3COO^- \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

d) Síntesis de biomasa (homoacetógenos, reductores de sulfato y metanógenos autótrofos):

$$2CO_2 + 4H_2 \longrightarrow \text{acetil-CoA} \longrightarrow \text{Piruvato} \longrightarrow \text{Material celular}$$

Mecanismo bioquímico de la homoacetogénesis

La glucosa se degrada por la glucolisis dando 2 moléculas de piruvato. Cuando el piruvato se descarboxila por la PFOR, uno de los $2CO_2$ se transfiere de la PFOR a la CODH y se reduce a –CO por la Fd_R producida por la PFOR o la hidrogenasa ($H_2 \rightarrow Fd_R$).

El otro CO_2 se reduce a $HCOO^-$ por la FDH_R, enzima con un grupo prostético de W y Se que utiliza NADPH como donador de e^- (Fig. 4.16); posteriormente, el $HCOO^-$ se transfiere al THF, se reduce a metilo, se transfiere a la Vitamina B12 y de ésta, a la CODH. Al final, el –CO se transfiere al $-CH_3$ en la propia CODH, formándose Ac-CoA.

El THF y la Vitamina B12 transportan los dos fragmentos C1 (Fig. 4.16).

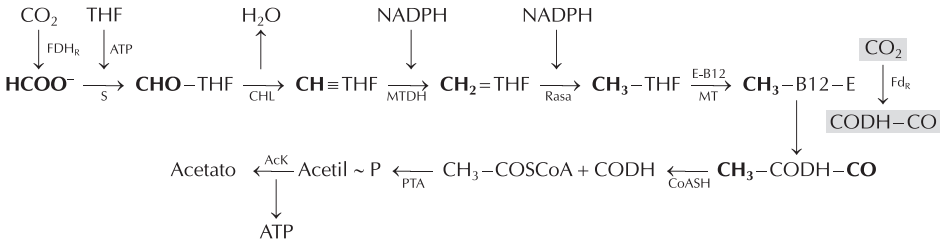


Figura 4.16. Síntesis de acetato a partir de CO_2 en los homoacetógenos: formiato deshidrogenasa reductora (FDH_R), CHO-THF sintetasa (S), ciclohidrolasa (CHL), metilén-THF deshidrogenasa (MTDH), metilén-THF reductasa (Rasa), metil transferasa (MT), enzima-B12 (E-B12), CO deshidrogenasa (CODH); AcK (acetato kinasa); PTA (fosfotransacetilasa).

La MTDH se denomina deshidrogenasa y no reductasa porque, dado el alto potencial negativo del par rédox $CH \equiv THF/CH_2 = THF$ (–535 mV), la reacción espontánea sería la contraria, la oxidación del $CH_2 = THF$ a $CH \equiv THF$ que se da en la ruta oxidativa del metano (véase metanotrofos, Capítulo 5). No obstante, en la homoacetogénesis, la reacción de reducción de $CH \equiv THF$ a $CH_2 = THF$ tiene lugar *in vivo* porque el proceso global de síntesis de acetato transcurre con un $\Delta G < 0$ (Fig. 4. 17).

En los homoacetógenos, la energía se conserva por fosforilación a nivel de sustrato y fuerza motriz de iones.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

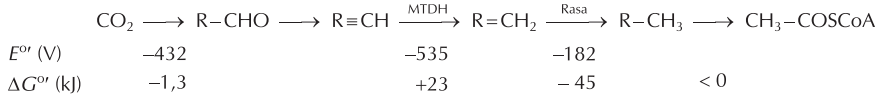


Figura 4.17. Energética de la homoacetogénesis.

En *Clostridium thermoaceticum*, la fuerza motriz de protones (Δp) se genera vía hidrogenasa periplásmica mediante un ciclo Q o transporte electrónico electrogénico (producción de H^+ en el periplasma y transferencia de e^- al citosol).

En *Acetobacterium woodi*, la fuerza motriz de sodio (Δn) se genera a nivel de la metilén-THF reductasa u otra reacción exergónica posterior, como la condensación CH_3-CO.

e) Oxidación anaerobia de acetato

a) Ruta del ciclo de Krebs reductivo

Algunos reductores de sulfato (*Desulfobacter*) oxidan acetato mediante una variante reductiva del ciclo de Krebs, cuya función es la fijación de CO_2 (Capítulo 5), pero operando en este caso en sentido descarboxilante (Fig. 4.18).

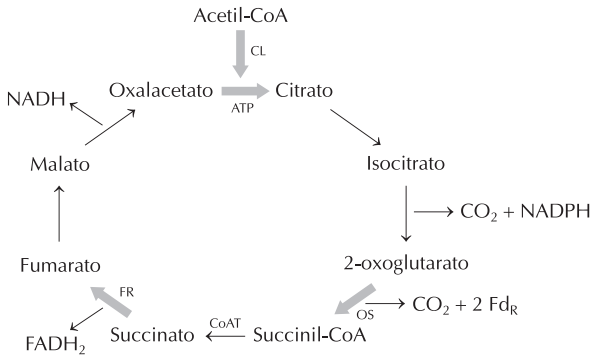


Figura 4.18. Ciclo de Krebs reductivo. Enzimas: FR (fumarato reductasa); CoAT (CoA transferasa); OS (2-oxoglutarato sintasa); CL (ATP-citrato liasa); FdR (ferredoxina reducida).

Así como el ciclo de Krebs requiere O_2 para regenerar las coenzimas reducidas NAD^+ y FAD, esta ruta oxidativa anaeróbica requiere un aceptor de electrones, como el SO_4^{2-}, para reoxidar las coenzimas reducidas $NAD(P)^+$, FAD y ferredoxina.

b) Ruta oxidativa del acetil-CoA

Algunos anaerobios reductores de sulfato oxidan acetato invirtiendo la ruta del acetil-CoA. Entre estos microorganismos se encuentran eubacterias como *Desulfotomaculum acetoxidans* y arqueobacterias como *Archaeoglobus fulgidus*. La

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

oxidación de 1 mol de acetato produce 4 equivalentes de poder reductor que se transfieren al sulfato en un proceso quimiosmótico que genera Δp (Fig. 4.19).

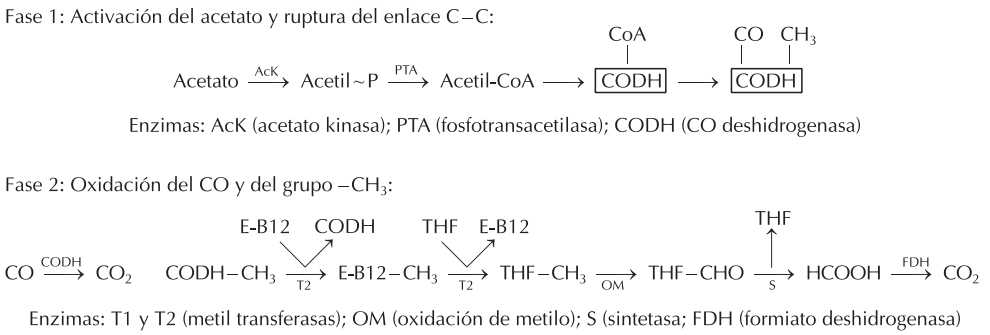


Figura 4.19. Oxidación de acetato por la ruta oxidativa del Acetil-CoA.

4.3.2. Biosíntesis de compuestos carbonados

En las bacterias, hongos, algas y plantas superiores, los carbohidratos, lípidos y proteínas se pueden sintetizar a partir de compuestos sencillos como el CO_2 y el acetato.

La ruta mayoritaria de síntesis de CO_2 es el ciclo de Calvin, que se verá con detalle en el Capítulo 5, así como otras rutas bacterianas de asimilación de compuestos monocarbonados.

En esta sección se van a estudiar las rutas metabólicas implicadas en la incorporación del acetato producido a partir de CO_2 o de compuestos carbonados (grasas) a la biomasa celular, mediante la reacción de la piruvato sintetasa, el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis.

Ruta del acetil-CoA

La ruta del acetil-CoA es anfibólica:

Con fines de obtención de energía, se emplea por los homoacetógenos para reducir CO_2 a acetato, por algunos reductores de sulfato para oxidar acetato a CO_2 y, como se verá en el Capítulo 5, por los metanógenos acetotrofos para reducir acetato a CH_4.

Con fines biosintéticos, se emplea tanto por los homoacetógenos como por los metanógenos autótrofos para el crecimiento en $CO_2 + H_2$. Algunos homoacetógenos autótrofos son Gram (+) y muchas estirpes Gram (–), y utilizan el ATP generado por fosforilación oxidativa para asimilar el acetato formado en la ruta del acetil-CoA.

La homoacetogénesis no produce ATP neto a nivel de sustrato (se consume 1 ATP en la reacción de la THF–CHO sintetasa y se produce 1 ATP en la reacción de la fos-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

fotransacetilasa (Fig. 4.16). Sin embargo, sí se forma ATP por fosforilación oxidativa gracias al Δp e Δn que se generan en el transcurso de las reacciones exergónicas de reducción del fragmento C1 unido al THF (Fig. 4.16).

Las reacciones de la piruvato deshidrogenasa (piruvato → acetil-CoA) y la piruvato kinasa (PEP → piruvato) transcurren con $\Delta G^{o} = -40$ y -30 kJ mol^{-1}, respectivamente, por lo que seguramente son irreversibles en condiciones fisiológicas. Para salvar esta barrera energética, algunas bacterias utilizan dos enzimas nuevas: la piruvato sintetasa, dependiente de ferredoxina reducida (un reductor más fuerte que el NADH) y la PEP sintetasa, que utiliza toda la energía disponible en el ATP. Posteriormente, el PEP se transforma en material celular por la ruta gluconeogénica.

En resumen, la síntesis de biomasa por los homoacetógenos autótrofos se inicia mediante los siguientes procesos:

1. Ruta del acetil-CoA: $2CO_2 \longrightarrow$ Acetil-CoA
2. Piruvato sintetasa: Acetil-CoA + CO_2 + $Fd_{RED} \longrightarrow$ Piruvato + Fd_{OX}
3. PEP sintetasa: Piruvato + ATP $\longrightarrow$ PEP + AMP + Pi

Ruta del glioxilato

Suministra compuestos carbonados para la gluconeogénesis y consiste en una desviación del ciclo de Krebs que requiere dos enzimas supletorias (isocitrato liasa y malato sintasa) con objeto de evitar las etapas descarboxilantes del CAT y canalizar el carbono de los ácidos grasos y el acetato hacia la síntesis de glucosa en las bacterias aerobias (Fig. 4.20).

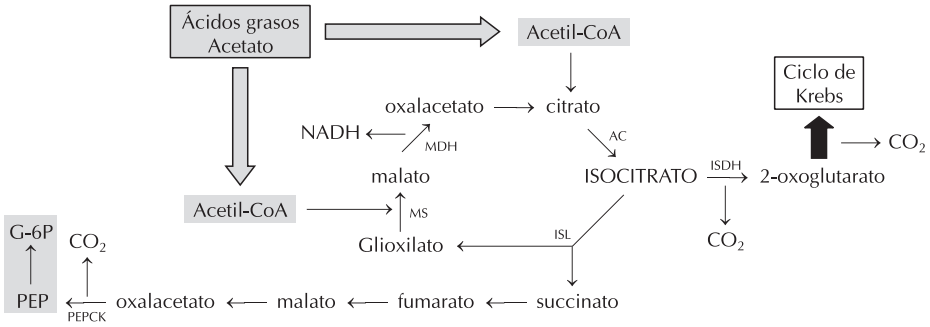


Figura 4.20. Ciclo del glioxilato (CG). Enzimas: CS (citrato sintasa); AC (aconitasa); ISDH (isocitrato deshidrogenasa); ISL (isocitrato liasa); MS (malato sintasa: cataliza una reacción similar a la citrato sintasa del ciclo de Krebs); MDH (malato deshidrogenasa); PEPCK (PEP carboxikinasa).

El balance del ciclo del glioxilato es:

$$2 \text{ acetil-CoA} + NAD^{+} \longrightarrow \text{succinato} + 2 \text{ CoA} + \text{NADH}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En las bacterias aeróbicas, el flujo del carbono se dirige hacia la ruta descarboxilante (ciclo de Krebs) o biosintética (ciclo del glioxilato) según las necesidades celulares. El control se efectúa a nivel de la isocitrato deshidrogenasa (ISDH), enzima que descarboxila el isocitrato a 2-oxoglutarato en el ciclo de Krebs (Fig. 4.21).

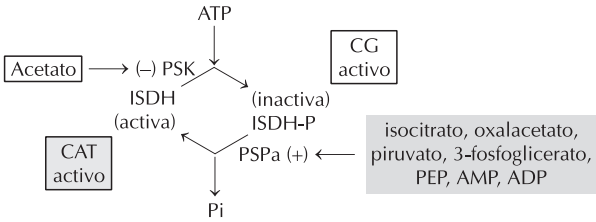


Figura 4.21. Control de la ISDH de *E. coli* por fosforilación reversible. CAT (Ciclo de Krebs); CG (ciclo del glioxilato); PSK (kinasa de la ISDH); PSPa (fosfatasa de la ISDH).

La PSK es una kinasa que fosforila a la ISDH en un resto de serina (las cargas negativas del grupo fosforilo repelen al isocitrato). La PSPa hidroliza el grupo fosforilo a Pi y reactiva a la ISDH. Las actividades PSK y PSPa radican en la misma proteína que actúa de una u otra forma dependiendo de la disponibilidad de sustratos y de la carga energética.

El control del ciclo del glioxilato se efectúa, además, a largo plazo, dado que la ISL y la MS se inducen en presencia de acetato.

El ciclo del glioxilato es muy importante para la conversión de triacilgliceroles en azúcares que tiene lugar en las semillas vegetales como paso previo a la germinación: un depósito de combustible y de carbono se transforma así en polisacáridos y proteínas.

El oxalacetato se puede formar además a partir de otros precursores como aminoácidos, vía transaminasas (aspartato → oxalacetato) o reacciones parciales del ciclo de Krebs (glutamato → 2-oxoglutarato; fenilalanina → tirosina → fumarato; metionina, isoleucina o valina → succinil-CoA, etc.).

Gluconeogénesis

Una vez sintetizado el compuesto C3 (PEP) a partir de precursores C2 (acetato), C3 (piruvato) ó C4 (oxalacetato), la síntesis de carbohidratos y proteínas se lleva a cabo mediante la ruta gluconeogénica, inversa de la glucolisis.

La reversión de la segunda fase de la glucolisis (síntesis de PEP) se puede llevar a cabo mediante tres tipos de reacciones:

Piruvato-P dikinasa: $\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{Pi} \longrightarrow \text{PEP} + \text{AMP} + \text{PPi}$

PEP sintetasa: $\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{PEP} + \text{AMP} + \text{Pi}$

Piruvato carboxilasa/PEPCK: $\text{Piruvato} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{OAA} \longrightarrow \text{PEP} + \text{CO}_2$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tanto la carboxilación del piruvato como la descarboxilación del oxalacetato para dar PEP son reacciones endergónicas, por lo que la piruvato carboxilasa y la PEPCK (PEP carboxikinasa) utilizan ATP como impulsor de las mismas. Obsérvese que las tres reacciones consumen la misma cantidad de energía, equivalente a 2~P.

La reversión de la segunda fase de la glucolisis requiere una enzima nueva, la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Fig. 22).

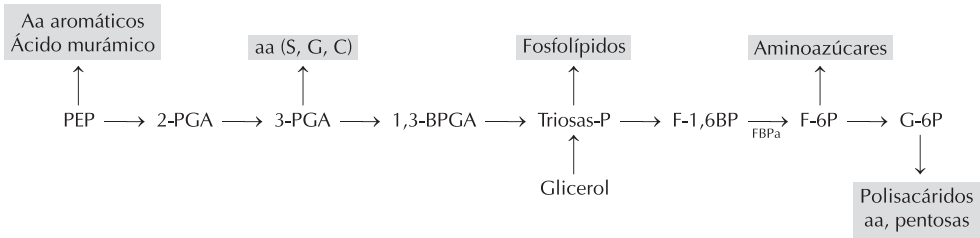


Figura 4.22. La gluconeogénesis como fuente de biomoléculas. FBPa (fructosa bisfosfatasa).

La FBPa se inhibe por AMP, un indicador de baja carga energética celular. Por el contrario, la enzima glucolítica fosfofructokinasa se activa por AMP y ADP y se inhibe por ATP.

Bibliografía

J. A. Hoch, J. A., Silhavy, T. J. (eds.) (1995). *Two-Component Signal Transduction*. ASM Press.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2002). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc, 10th ed.

Moat, A. G., Foster, J. W., Spector, M. P. (2002). *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, 4th ed.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sinauer Assoc. Inc.

White, D. (1997). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, 2nd ed.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 5
CICLOS BIOGEOQUÍMICOS II

Glosario
5.1. Oxidación de compuestos monocarbonados
5.1.1. Oxidación de CO. Bacterias carboxidotrofas
5.1.2. Oxidación de metano y grupos metilo. Bacterias metilotrofas
Clasificación de los metilotrofos
Bioquímica de la oxidación del metano y del grupo metilo
5.1.3. Oxidación anaerobia de metano
5.2. Metanogénesis
5.2.1. Fuentes de metano en la naturaleza
5.2.2. Energética de la metanogénesis
5.2.3. Factores medioambientales que influyen en la metanogénesis
5.2.4. La metanogénesis en el tubo digestivo
5.2.5. Bioquímica de la metanogénesis
Metanogénesis a partir de CO_2 e H_2
Metanogénesis a partir de grupos metilo
Metanogénesis a partir de acetato
Propiedades moleculares de las enzimas metanogénicas
Síntesis de ATP en los metanógenos
5.2.6. La producción de metano como problema medioambiental
5.3. Fijación del CO_2 en material celular
5.3.1. Ciclo de Calvin
5.3.2. Ciclo de Hatch-Slack
5.3.3. Ciclo de Krebs reductivo (biosintético)
5.3.4. Ciclo del hidroxipropionato
5.3.5. Ruta del acetil-CoA
5.3.6. Biosíntesis de material celular en los metilotrofos
Ciclo de la serina
Ciclo de la ribulosa monofosfato
5.4. El ciclo del carbono y el calentamiento global
5.4.1. El efecto invernadero
5.4.2. La Tierra como ser vivo: la hipótesis de Gaia
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Arqueobacterias: Procariotas del dominio *Archaea* que posee 3 *phyla*: *Korarchaeota, Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* y cuyos miembros están más relacionados evolutivamente con los eucariotas que con las eubacterias.
Autótrofos: Organismos que pueden utilizar CO_2 como fuente de carbono.
Carboxidotrofos: Bacterias que oxidan CO a CO_2.
Cianobacterias: Bacterias fotosintéticas oxigénicas con fotosistemas I y II.
Corrinoide: Anillo de la vitamina B12 que posee un ión Co^+ coordinado a grupos pirrol.
Efecto invernadero: Calentamiento producido por una pantalla que deja pasar los rayos solares pero retiene la radiación infrarroja.
Endosimbionte: Célula procariótica que coloniza el citoplasma de otra célula y evoluciona hacia un orgánulo especializado en el hospedador.
FeS: Grupo prostético compuesto por iones $Fe^{2+/3+}$ y S lábil.
Fuerza motriz de iones: Gradiente de protones (Δp) o de sodio (Δn) a través de la membrana plasmática.
Frecuencia de una radiación: Se define como el cociente c/λ siendo c la velocidad de la luz en el vacío y λ la longitud de onda de la radiación.
Gt: Gigatonelada, 10^{15} g.
Grupo prostético: Cofactor metálico u orgánico unido a una enzima que participa en la catálisis.
Homoacetógenos: Bacterias que respiran carbonato y reducen CO_2 a acetato.
Heterótrofos: Organismos que no pueden utilizar CO_2 como fuente de carbono.
Infrarrojo: Radiación de $\lambda > 700$ nm e inferior a 1 mm.
Ma: 10^6 años.
MDa: 10^6 daltones (1 Dalton = 1/12 de la masa atómica del isótopo ^{12}C.
Mt: Megatonelada, 10^{12} g.
Metanógenos: Arqueobacterias que reducen CO_2 o compuestos orgánicos a CH_4.
Metanotrofos: Bacterias que oxidan CH_4 a CO_2.
Metilotrofos: Bacterias que oxidan grupos $R-CH_3$ a CO_2.
Osmolito: Compuesto orgánico intracelular que contrarresta la presión osmótica del medio.
Quimiolitotrofos: Organismos que utilizan compuestos inorgánicos como fuente de C y energía.
Proclorofitos: Procariotas fotosintéticos oxigénicos sin ficobilinas pero con clorofilas *a* y *b*.
Tt: Teratonelada, 10^{18} g.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.1. Oxidación de compuestos monocarbonados

5.1.1. Oxidación del CO. Bacterias carboxidotrofas (CTF)

En la superficie de la Tierra se producen anualmente casi 4 gigatoneladas (1 Gt = 10^9 toneladas) de CO como consecuencia de la oxidación fotoquímica atmosférica del metano y otros hidrocarburos (1,5 GT), de procesos asociados a la fotosíntesis terrestre y óceánica (0,2 GT) y a la quema de combustibles (1,6 GT). Las bacterias CTF son capaces de oxidar CO a CO_2 con fines energéticos y biosintéticos y juegan un papel muy importante en el equilibrio de este gas en la biosfera. La letalidad del CO procede de su alta capacidad para formar fuertes complejos con las agrupaciones Fe-porfirina (hemoglobinas y citocromos).

Normalmente las CTF son eubacterias aerobias consumidoras de H_2 o sustratos orgánicos pero existen también anaerobios fotosintéticos y respiradores de nitrato que utilizan CO como fuente de e^-, así como homoacetógenos y metanógenos que producen acetato o metano a partir de CO.

La enzima implicada es la CO-deshidrogenasa (CODH), que cataliza la reacción:

$$CO \longrightarrow CO_2 \qquad E^{o\prime} = -540 \text{ mV} \tag{5.1}$$

Como en el caso del H_2, a pesar de que el $E^{o\prime}$ del par donador de electrones es muy negativo, la oxidación del CO por los aerobios no genera un reductor fuerte, sino que los e^- se transfieren a la UQ ($E^o \approx 0$ V), por lo que estas bacterias necesitan un transporte inverso de e^- propiciado por el Δp producido en la respiración (Fig. 5.1).

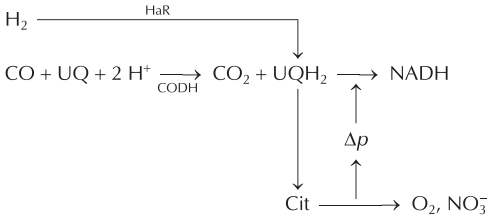


Figura 5.1. Metabolismo energético de las carboxidobacterias. HaR (hidrogenasa de reciclado); CODH (CO deshidrogenasa); Cit (citocromos).

En los aerobios, la CODH posee un cofactor de molibdopterina y en los anaerobios, un cofactor de níquel. Para la utilización de H_2 se requiere una hidrogenasa de reciclado (HaR).

Los carboxidotrofos aerobios desempeñan un papel muy importante en la biosfera dado que eliminan el exceso de CO producido anualmente. De hecho, la concentración de CO no ha aumentado en la atmósfera a pesar de las emisiones masivas de este gas letal para la mayoría de organismos que utilizan Fe-porfirinas para transportar O_2 o electrones.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.1.2. Oxidación de metano y grupos metilos. Bacterias metilotrofas (MTF)

Son bacterias aerobias que oxidan metano (CH_4), metanol (CH_3-OH), formaldehído (HCHO), formiato ($HCOO^-$), formamida ($HCO-NH_2$), metilamina CH_3-NH_2, dimetilamina $(CH_3)_2-NH$, trimetilamina $(CH_3)_3 \equiv N$, dimetiléter (CH_3-O-CH_3), dimetilcarbonato ($CH_3-O-COO-CH_3$), dimetilsulfóxido $(CH_3)_2-S=O$, dimetilsulfuro $(CH_3)_2S$, trimetil-N-óxido $(CH_3)\equiv N \rightarrow O$ y CO.

Clasificación de los metilotrofos

1) Por su capacidad de utilización del sustrato monocarbonado:

a) Metilotrofos obligados: sólo pueden crecer con compuestos monocarbonados.
   I) Crecen con metanol o metilamina: *Methylophilus* y *Methylobacillus.*
   II) Crecen con CH_4 o CH_3-OH (metanotrofos): *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylococcus*, *Methylobacter* y *Methylosinus.*

b) Metilotrofos facultativos: pueden crecer con compuestos mono- y multicarbonados: varios géneros (*Bacillus*, *Acetobacter*, *Methylobacterium*, *Nocardia*, etc.).

2) Por sus características morfológico-bioquímicas:

a) MTF de tipo I: sistema membranoso repartido por toda la célula, ciclo de Krebs incompleto, γ-6S RNA, asimilación del carbono vía ribulosa monofosfato.
b) MTF de tipo II: sistema membranoso periférico, ciclo de Krebs completo, α-16S RNA, asimilación del carbono vía ciclo de la serina.

Bioquímica de la oxidación del metano y del grupo metilo

El metano es muy abundante en la naturaleza. Se produce en grandes cantidades en ambientes anóxicos, forma parte de los depósitos de combustible fósil y existen enormes depósitos oceánicos y subcorticales de hidratos de metano que afloran periódicamente. No todos los metilotrofos oxidan metano, sino sólo los metanotrofos, aerobios obligados muy importantes en el ciclo del carbono porque reciclan el metano producido bióticamente en las zonas anóxicas sedimentarias o de origen geotérmico, oxidándolo a CO_2. También pueden vivir en simbiosis con moluscos bivalvos y esponjas en zonas metanogénicas.

La oxidación de metano requiere la metano monooxigenasa (MMOX), una hidroxilasa que oxida tanto CH_4 como NH_4^+ y que parece derivar de la NH_4^+ monooxigenasa de los aerobios nitrosos (bacterias nitrificantes que oxidan el NH_4^+ a NO_2^-). La oxidación de CH_4 a CO_2 transcurre mediante etapas de 2 e^- (Fig. 5.2).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

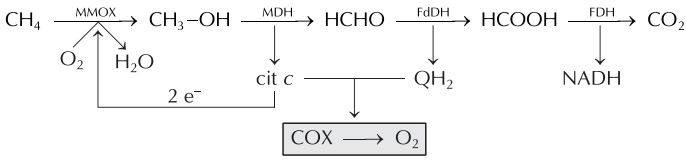


Figura 5.2. Transferencias de electrones en los metilotrofos: MMOX (metano monooxigenasa), MDH (metanol deshidrogenasa), FdDH (formaldehido deshidrogenasa), FDH (formiato deshidrogenasa); COX (citocromo oxidasa).

Existen dos tipos de MMOX: una unida a membrana, con Cu y Fe y que se induce por Cu^{2+} y otra forma soluble, que utiliza NADH como donador de e^-, con FAD y FeS y poco específica. Como la MMOX consume 2 e^-, se genera poder reductor sólo en la 3ª y 4ª reacción.

El metanol se oxida por la metanol deshidrogenasa-PQQ (MDH) y el HCHO y $HCOO^-$ por la FdDH y FDH, con grupos prostéticos de Se y W (Figs. 5.2 y 5.3).

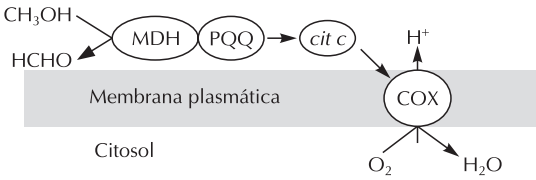


Figura 5.3. Generación de Δ*p* por la MDH-PQQ-cit *c* (*c551* en *Paracoccus denitrificans*). PQQ (pirrol-quinolín quinona).

La coenzima rédox de la metanol deshidrogenasa es la pirrol-quinolín quinona (PQQ), cuya estructura se muestra en la figura 5.4.

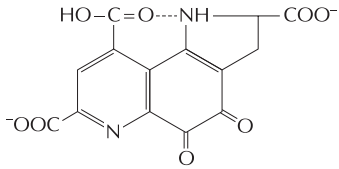


Figura 5.4. Estructura de la pirrol-quinolín quinona (PQQ).

Dados los $E^{o\prime}$ de los compuestos C1, la transferencia de e^- al NAD^+, Q ó citocromos transcurre con $\Delta G < 0$, excepto en la primera reacción (MMOX), donde no se transfieren sino que se consumen e^- (Fig. 5.5).

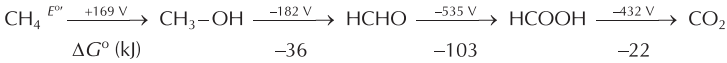


Figura 5.5. Energética de la oxidación del CH_4. Los valores de ΔG^o corresponden a transferencias de e^- a las quinonas ($E^{o\prime}$ 0 V, reacciones 2ª y 3ª) y al NAD^+ ($E^{o\prime}$ –0,32 V, reacción 4ª).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.1.3. Oxidación anaerobia de metano

En el subsuelo submarino se puede estar produciendo la oxidación anaerobia del metano, por parte de arqueobacterias emparentadas con metanógenos (*Methanosarcina*).

La oxidación anaeróbica de metano es endergónica pero tiene lugar de forma espontánea porque el H_2 o el acetato producido se consume por bacterias reductoras de sulfato.

Ambos grupos de bacterias se sitúan de forma concéntrica: los metanotrofos producen CO_2, H_2 y acetato, siendo éstos utilizados por los reductores de sulfato como fuente de e:

$$CH_4 + 2\ H_2O \longrightarrow CO_2 + 4\ H_2 \qquad \Delta G^{o\prime} = +131\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta G^{o\prime}\ \text{neto} = -25\ \text{kJ mol}^{-1}$$

$$SO_4^{2-} + 4\ H_2 \longrightarrow SH_2 + 4\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -156\ \text{kJ mol}^{-1}$$

En la figura 5.6 se muestran las interacciones bioquímicas entre los anaerobios metanotrofos y los reductores de sulfato.

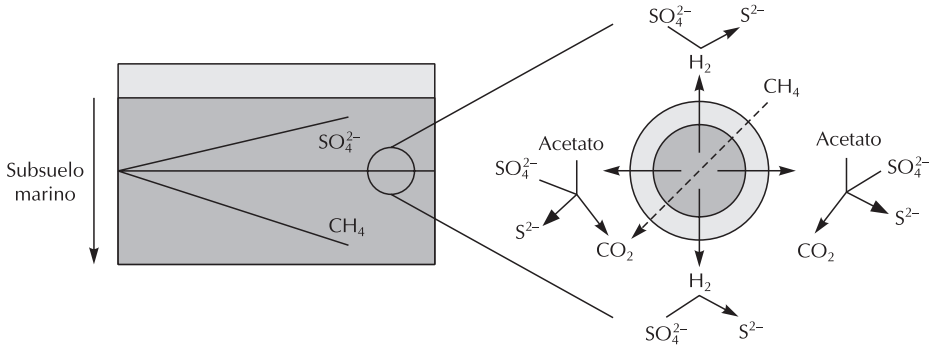


Figura 5.6. Oxidación anaeróbica de metano. Los círculos concéntricos a la derecha representan las poblaciones microbianas: metanotrofos en el centro y reductores de sulfato en la periferia. Modificada de E. F. DeLong, *Nature* 407, 577-578 (2000).

5.2. Metanogénesis

Como se ha dicho anteriormente, el metano es uno de los gases más importantes de la biosfera porque, si bien su concentración en la atmósfera es muy baja (2 ppm), ejerce un efecto invernadero 25 veces superior al del CO_2.

Los mayores depósitos de metano se encuentran en forma de hidratos cristalinos del manto terrestre (10^4 Gt de CH_4), más del doble de las reservas conocidas de combustibles fósiles. Esta forma es poco accesible, salvo por afloramientos masivos periódicos, de los que se sabe han producido calentamientos globales en épocas relativamente recientes (–50 Ma).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El metano también tiene un origen biogénico, a partir de un grupo heterogéneo de *Euryarchaeota* (los metanógenos, MG) que viven en hábitats muy diversos (sedimentos anaerobios, tubos digestivos de insectos y mamíferos, fuentes hidrotermales, humeros submarinos, citoplasma de protozoos anaerobios)

Existen 5 órdenes de metanógenos (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* y *Methanopyrales*) que utilizan como sustratos metanogénicos $H_2 + CO_2$, acetato, piruvato, metanol-metilaminas, CO, formiato, etc.

Methanocaldococcus jannaschii posee un cromosoma circular de 1,66 Mb y contiene 1.700 genes. Con relación a los genomas de eubacterias, las mayores similitudes corresponden a los genes metabólicos, mientras que los genes correspondientes a la ejecución del mensaje genético son más parecidos a los de *Eukarya*. No obstante, los MG poseen una identidad génica indudable al menos en un 50% de su genoma.

5.2.1. Fuentes de metano en la Naturaleza

El total anual supera las 300 Mt (biótico) y las 100 Mt (abiótico), con un máximo que se acercaría a las 10^3 Mt (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Fuentes de metano en la naturaleza.

Biogénicas		Abiogénicas	
Hábitats	**Mt por año**	**Procesos**	**Mt por año**
Rumiantes	100	Combustión de biomasa	30
Humedales	100	Emisión artificial	30
Arrozales	100	Emisión natural	20
Vertederos	50	Minas de carbón	20
Termitas	40	Hidratos de metano	2
Aguas dulces y saladas	15	Volcanes	0,5
		Automoción	0,5

5.2.2. Energética de la metanogénesis

El CH_4 es la forma más reducida del carbono (estado de oxidación –4), y la transferencia de e^- para producirlo tiene lugar desde el H_2 exógeno o desde reductores carbonados (Tabla 5.2).

Aunque hay pocas especies de metanógenos que utilizan acetato como sustrato, son muy importantes en la naturaleza dado que generan casi un 70% del metano en fangos activados.

5.2.3. Factores medioambientales que influyen en la metanogénesis

En los hábitats naturales, los diversos grupos de microorganismos compiten entre sí explotando sus fuentes de energía, jerarquizadas sobre una base de disponibilidad

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 5.2. Energética de los diversos procesos metanogénicos.

	ΔG^o	
Metanógenos autótrofos		
$CO_2 + 4\ H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O$	–131 kJ	(5.2)
$4\ HCOOH \longrightarrow CH_4 + 3\ CO_2 + 2\ H_2O$	–280 kJ	(5.3)
$4\ CO + 2\ H_2O \longrightarrow CH_4 + 3\ CO_2$	–209 kJ	(5.4)
Metanógenos metilotrofos		
$CH_3{-}OH + H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O$	–113 kJ	(5.5)
$4\ CH_3{-}OH \longrightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O$	–319 kJ	(5.6)
$4\ CH_3NH_2 + 2\ H_2O \longrightarrow CH_4 + CO_2 + 4\ NH_3$	–230 kJ	(5.7)
Metanógenos acetotrofos		
$CH_3{-}COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^-$	–31 kJ	(5.8)

de sustrato y de rendimiento energético. Así, para los aceptores de electrones, la jerarquía la establece el ΔE entre el dador de e^- y el aceptor:

$$O_2 > NO_3^- > MnO_2 > FeOOH > SO_4^{2-} > CO_2$$

El O_2 y el NO_3^- son suficientemente oxidantes ($E^{o\prime} > +0{,}5$ V) como para que los microorganismos puedan oxidar completamente los reductores complejos que existen en hábitats naturales (materia orgánica). Sin embargo, la transferencia de e^- a los demás aceptores se facilita si la materia orgánica sólo se puede mineralizar mediante su degradación previa por bacterias fermentativas a ácidos grasos, etanol y H_2 y consumo posterior de estos productos por las cadenas respiratorias de otros microorganismos (ver Capítulo 7).

Los metanógenos pertenecen a este segundo grupo de microorganismos que necesitan el aporte de moléculas sencillas transformables en metano ($CO_2 + H_2$, CO, CH_3OH, HCOOH, acetato, dimetilsulfuro, metilaminas, e incluso propanol), siendo más o menos versátiles en cuanto a su utilización: *Methanobacterium thermoautotrophicum* sólo puede oxidar H_2, mientras que *Methanococcoides methylutens* es metilotrofo y *Methanosarcina barkeri* es capaz de utilizar una amplia gama de sustratos metanogénicos.

La $[H_2]$ varía según la situación ambiental, ya que oscila entre 0,2 nM en condiciones reductoras de hierro, 1-1,5 nM en condiciones de reducción de sulfato y 7-10 nM en condiciones metanogénicas.

Los reductores de sulfato poseen una mayor afinidad por el H_2 y el acetato que los metanógenos y predominan sobre éstos, especialmente en medios donde abunda el sulfato (sedimentos marinos). Por debajo de la zona de agotamiento de sulfato predominan los metanógenos (véase Fig. 5.6), una situación que también se da en las aguas dulces, donde escasea el sulfato.

El aporte de materia orgánica en los sedimentos agota los oxidantes más potentes en la superficie, sobre todo si éstos escasean (sedimentos continentales) y posibilita la metanogénesis en las capas más profundas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La temperatura es otro factor importante: los metanógenos proliferan mejor a temperaturas superiores a las óptimas para el resto de microorganismos. En cuanto al pH, los ambientes ácidos favorecen la acetogénesis y, por tanto, la metanogénesis a partir de acetato.

Por lo que respecta a la salinidad, ya se ha dicho que en los sedimentos marinos predominan los reductores de sulfato sobre los metanógenos autótrofos o acetotrofos. No obstante, se están aislando cada vez más metanógenos metilotrofos en ambientes marinos, dado que éstos no compiten por el H_2 del medio. Los sustratos preferentes son el metanol, las aminas metiladas y los compuestos de azufre metilados abundantes, como el dimetilsulfuro, DMS (45 Mt por año), formado a partir de metionina, de propionato de dimetilsulfonio (un osmolito de las algas), o de dimetilsulfóxido. El DMS se metaboliza mediante rutas oxidativas (sulfato) o, si su concentración es alta, por la vía metanogénica, en la que los grupos metilo se reducen a metano. La trimetilamina es otro sustrato metanogénico producido por reducción del N-óxido de trimetilamina, otro soluto con funciones osmóticas y de excreción de nitrógeno en peces de agua salada.

Por último, y como se ha mencionado en el apartado 5.1.3, el CH_4 se oxida anaeróbica y aeróbicamente por los metanotrofos, que cierran de esta forma el flujo de carbono entre sus formas más reducida y oxidada. Entre los factores que favorecen la metanotrofia están la concentración de O_2, la luz (la fotosíntesis suministra O_2), el tipo de material orgánico sedimentario, la concentración de CH_4 (hasta 20 mM) y su coeficiente de difusión y el aporte de nitrógeno (Fig. 5.7).

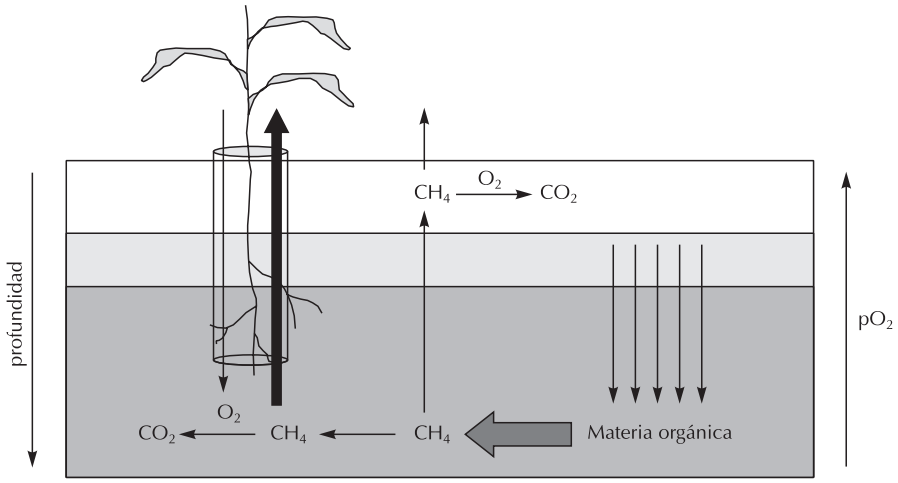


Figura 5.7. Flujo de carbono en un arrozal. El CH_4 se produce en la zona anóxica del fondo y se oxida en las zonas aerobias superficiales o cercanas a las raíces. El 90% del CH_4 se libera a través de la planta, un 10% por burbujeo y menos del 1% por difusión.

5.2.4. La metanogénesis en el tubo digestivo

Al contrario que en los ambientes anaerobios naturales externos descritos anteriormente, en el complejo estómago de los rumiantes (rumen) y en el intestino grueso de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

otros mamíferos se acumulan grandes cantidades de ácidos a partir de carbohidratos, lípidos y proteínas (los rumiantes satisfacen sus necesidades de glucosa por gluconeogénesis a partir de propionato) y la metanogénesis se realiza a expensas de H_2 y CO_2. Además, en el tubo digestivo el proceso transcurre en 20-40 h, 10 o 20 veces más rápido que en los ecosistemas naturales externos donde los microorganismos consumidores de ácidos y alcoholes tienen tiempos de generación muy largos, absolutamente inapropiados para la dinámica del microambiente del tubo digestivo.

La estequiometría de la metanogénesis en ambos tipos de medios es por tanto muy diferente:

Rumen:

$$57{,}5\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 65 \text{ acetato} + 20 \text{ propionato} + 15 \text{ butirato} + \\ + 35\ CH_4 + 60\ CO_2 + 25\ H_2O \qquad (5.9)$$

Sedimentos:

$$57{,}5\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 172{,}5\ CH_4 + 172{,}5\ CO_2 \qquad (5.10)$$

La comunidad microbiana del rumen es muy compleja (bacterias, hongos y protozoos) y el ambiente es anaeróbico ($E = -0{,}35$ V, pH 6,5), produciéndose grandes cantidades de gases (hasta 200 l de CH_4 por día para un bóvido de 500 kg). Los gases presentes son el CH_4 (27%) y el CO_2 (65%), además de trazas de O_2, N_2 e H_2 (éste a una presión parcial de 10^{-4} atm).

El sistema funciona de forma semicontinua: para un volumen total de 70 litros, el trasiego diario de líquido es de unos 100 litros por día.

La ruta fermentativa principal es la glucolisis, que oxida los carbohidratos a piruvato, que se reduce posteriormente con NADH para regenerar el NAD^+ o se oxida a AcetilCoA dando H_2 y CO_2. Las proteínas y ácidos grasos se degradan a ácidos carboxílicos. Los productos (alcoholes y ácidos) se oxidan por otras bacterias para dar acetato, H_2 y CO_2, sustratos metanogénicos. El consumo de H_2 disminuye la presión parcial del H_2 hasta 10^{-2} kPa, lo que facilita la conversión NADH $\rightarrow H_2$, muy desfavorable termodinámicamente en condiciones normales (Fig. 5.8).

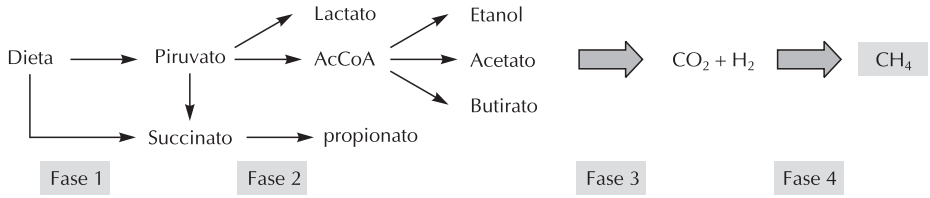


Figura 5.8. La cadena alimenticia en el rumen. Fase 1 (hidrólisis de polímeros); Fase 2 (fermentaciones); Fase 3 (producción de H_2 a partir de NADH); Fase 4 (metanogénesis).

El sistema continuo del rumen cambia el metabolismo de las bacterias:

Ruminococcus albus es una bacteria que degrada la celulosa a piruvato y produce, a partir de éste y en cultivo puro, etanol, formiato, CO_2 y acetato. Sin embargo,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cuando se cultiva *R. albus* en presencia de un metanógeno consumidor de H_2, el NADH se reoxida vía ferredoxina y H_2, que se utiliza para reducir CO_2 a CH_4: un cocultivo de *R albus* y *Methanobrevibacter smithii* produce un 100% más de acetato, un 75% menos de etanol y un 50% menos de CO_2.

El cambio brusco de alimentación de forraje a cereales aumenta la población de *Streptococcus bovis* de 10^7 a 10^{13} células ml^{-1} lo que aumenta la fermentación láctica y produce una brusca acidificación que afecta a la metanogénesis.

Entre los metanógenos del rumen hay especies de *Methanobrevibacter* (autótrofo) y, en menor proporción, de *Methanosarcina* (metilotrofo). El metabolismo del rumen es parecido al de los sistemas digestivos de marsupiales, paquidermos, equinos e incluso primates y pájaros. En los humanos se produce CH_4 en el colon (3 l por persona y día comparado con 200 litros por día (bovinos), 30 litros por día (ovinos) y 8 litros por día (porcinos). Los productos metabólicos son, en cantidades relativas: acetato (100), propionato (100), butirato (100), CH_4 y CO_2 (100) (metabolismo metanogénico), o bien acetato (100), propionato (100), butirato (100) y CO_2 (50) (metabolismo no metanogénico).

La metanogénesis es muy poco importante en la mayoría de humanos, dependiendo de la dieta y de la población de metanógenos en el colon (entre pocas bacterias g^{-1} y 10^8 bacterias g^{-1}), y su evacuación es por vía pulmonar (20%) o flato (80%). En los humanos se han detectado *M smithii* y *Methanosphaera stadtmanae*. Este último produce CH_4 al reducir metanol (procedente de la degradación bacteriana de pectinas) con H_2. El resto de los metanógenos utilizan CO_2 como sustrato.

En los ambientes metanogénicos digestivos influye, además de las presiones de CH_4 y H_2, la concentración de sustratos fermentables, que puede hacer negativo el cambio de energía libre de las fermentaciones secundarias:

$$\text{Propionato} \longrightarrow \text{acetato} + CO_2 + 3\ H_2 \qquad \Delta G = -5{,}5\ \text{kJ mol}^{-1} \qquad (5.11)$$

$$\text{Butirato} \longrightarrow \text{acetato} + 2\ H_2 \qquad \Delta G = -17{,}6\ \text{kJ mol}^{-1} \qquad (5.12)$$

$$\text{Benzoato} \longrightarrow 3\ \text{acetato} + CO_2 + 3\ H_2 \qquad \Delta G = -18\ \text{kJ mol}^{-1} \qquad (5.13)$$

No obstante, estas reacciones no son suficientemente exergónicas como para sostener un crecimiento importante de los fermentadores secundarios sintróficos, como *Synthrophomonas wolfei*, incluso en presencia de metanógenos.

5.2.5. Bioquímica de la metanogénesis

La homoacetogénesis y la metanogénesis poseen un metabolismo energético similar, pero los homoacetógenos generan ATP por fosforilación a nivel de sustrato y Δp, mientras que los metanógenos lo hacen exclusivamente a través de fuerza motriz de H^+ y de Na^+.

Las reacciones de la metanogénesis son las inversas de la metanotrofia y si los intermediarios de ésta son reductores fuertes ($E^{o\prime}$ negativos, con excepción del par

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CH_3OH/CH_4) y generan $\Delta G \ll 0$ al transferir e^- al O_2, también son oxidantes débiles y no es fácil que generen ΔG muy negativos, cuando se reducen por reductores fisiológicos (Fd, NAD(P)H), salvo en las reacciones $HCHO \rightarrow CH_3-OH \rightarrow CH_4$ (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Balances energéticos de la metanogénesis.

$CO_2 + H_2 \longrightarrow HCOO^- + H^+$	$E^{o\prime} = -432$ mV	$\Delta G^{o\prime} = -1{,}3$ kJ mol^{-1}	(5.14)
$HCOO^- + H^+ + H_2 \longrightarrow HCHO^- + H_2O$	$E^{o\prime} = -535$ mV	$\Delta G^{o\prime} = +23$ kJ mol^{-1}	(5.15)
$HCHO^- + H_2 \longrightarrow CH_3-OH$	$E^{o\prime} = -182$ mV	$\Delta G^{o\prime} = -44{,}8$ kJ mol^{-1}	(5.16)
$CH_3OH + H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O$	$E^{o\prime} = +169$ mV	$\Delta G^{o\prime} = -112{,}5$ kJ mol^{-1}	(5.17)

En la metanogénesis, como en la homoacetogénesis o en la metanotrofia, los intermediarios reales no son HCHO ni CH_3-OH, pero en este caso son transportados por coenzimas específicos de los metanógenos. Aunque los metanógenos son arqueobacterias con características propias, donde adquieren una especial singularidad es en las coenzimas rédox que utilizan para sus transferencias e^- (Fig. 5.9).

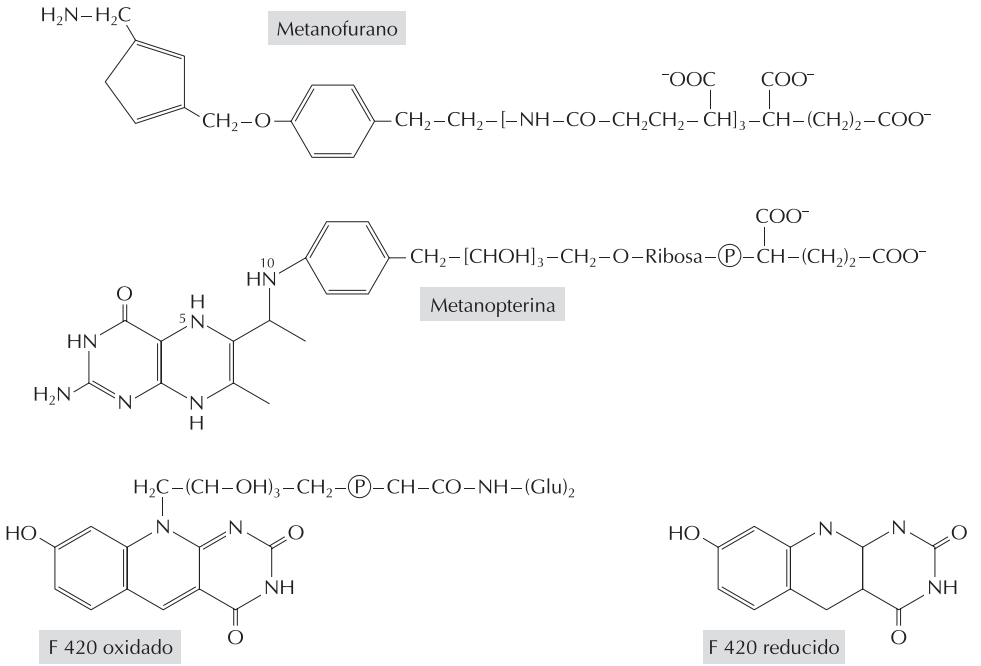


Figura 5.9. Coenzimas de los metanógenos. El transportador de C1 es la tetrahidrometanopterina (THMP) y el CO_2 no se reduce a formiato, sino que se fija al metanofurano (MTF) y se reduce a formil-MTF, que transfiere el grupo –CHO a la THMP. Posteriormente, el grupo –CHO se reduce a $-CH_3$ y éste se transfiere a la CoM. Glu (glutamato).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

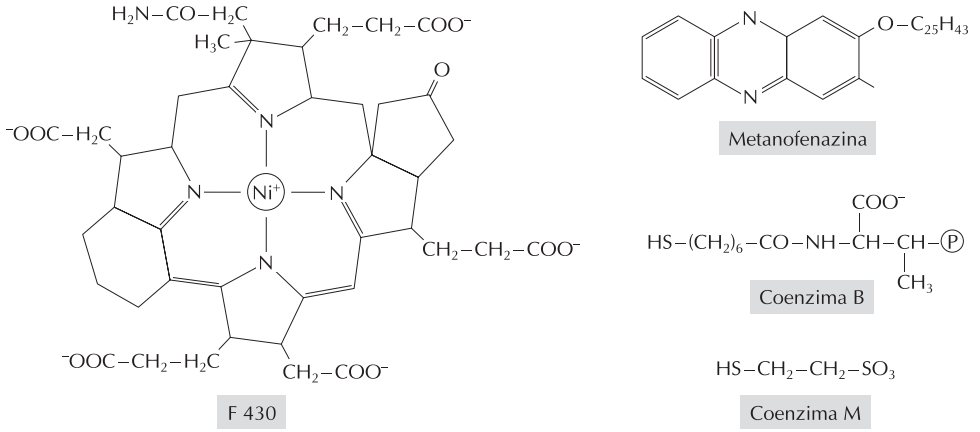


Figura 5.9. (*Continuación*).

Metanogénesis a partir de CO_2 e H_2 (MG hidrogenotrofos o litotrofos)

Los MTG litotrofos (*Methanobacterium*) utilizan H_2 como donador de e^- (Fig. 5.10):

$$CO_2 + 4\ H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -131\ \text{kJ mol}^{-1} \qquad (5.\ 18)$$

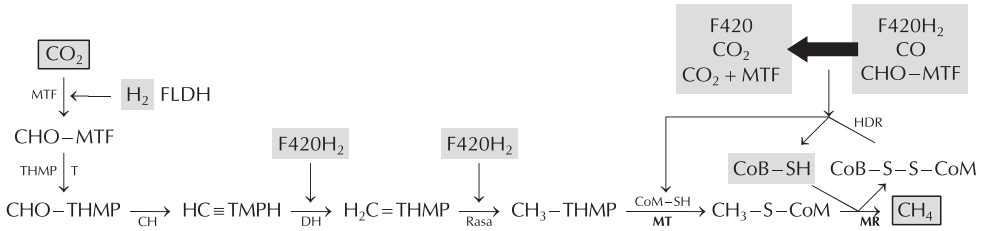


Figura 5.10. Reducción de CO_2 a CH_4. Enzimas: FLDH (formil-MTF deshidrogenasa FeS); T (formil transferasa); CH (ciclohidrolasa); DH (deshidrogenasa); Rasa (reductasa); MT (metil transferasa); MR (metil reductasa); HDR (heterodisulfuro reductasa).

Metanogénesis a partir de grupos metilo (MG metilotrofos)

En ausencia de reductor exógeno, el CH_3-OH cede e^- al F420 para reducir el grupo $-CH_3$ a CH_4:

$$4\ CH_3-OH \longrightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = -319\ \text{kJ} \qquad (5.19)$$

El proceso es similar (MT-MR) e inverso (ruta THMP oxidativa) al de los MTG litotrofos, con una reacción adicional de transferencia del metilo a un corrinoide (Co) (Fig. 5.11).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

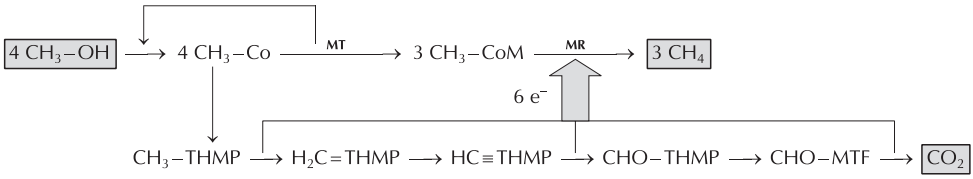


Figura 5.11. Reducción de CH_3–OH a CH_4. Enzimas: MT (metil transferasa); MR (metil reductasa). La oxidación de un grupo –CH_3 a CO_2 proporciona e- para reducir 3 –CH_3 a 3 CH_4.

Los $E^{o\prime}$ de H_2C=THMP y CHO–MTF (–535 mV y –432 mV, respectivamente) son suficientes para reducir el F420, dador de e^- de la MR. Pero el $E^{o\prime}$ de CH_3–THMP (–182 mV) es insuficiente; esta transferencia endergónica de e^- se acopla a una fuerza motriz de sodio (Δn) generada por la MT (Fig. 5.12).

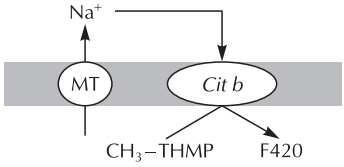


Figura 5.12. Acoplamiento CH_3–THMP / Δn.

Los metanógenos metilotrofos poseen cadenas de transporte de e^- que implican la metanofenacina y citocromos *b* (Fig. 5.13).

Figura 5.13. Transferencias de e^- en los metanógenos metilotrofos. HaR (hidrogenasa); DH (deshidrogenasa); *b*1 y *b*2 (citocromos b); MPN (metanofenacina); HDR (heterodisulfuro reductasa).

Metanogénesis a partir de acetato (MG acetotrofos)

El acetato se activa a acetil-CoA mediante la acetato kinasa/fosfotransacetilasa (*Methanosarcina*) o la acetil-CoA sintetasa (*Methanothrix*) según las reacciones:

Posteriormente, utilizan la CODH para romper el enlace C–C y para oxidar el fragmento –CO a CO_2 ($E^{o\prime}$ = –520 mV) (Fig. 5.14).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

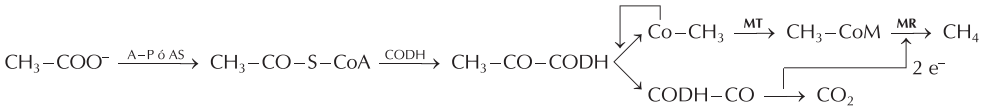


Figura 5.14. Reducción de acetato a CH_4. A-P (acetato kinasa/fosfotransacetilasa; AS (AcCoA sintetasa); CODH (CO deshidrogenasa); MT (metil transferasa; MR (metil reductasa).

En los MG acetotrofos las transferencias electrónicas vía citocromos *b* se utilizan para generar Δp (Fig. 5.15).

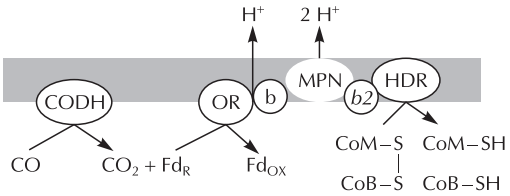


Figura 5.15. Transferencias de e- en los metanógenos acetotrofos. CODH (CO deshidrogenasa); OR (óxidorreductasa); *b* y *b*2 (citocromos *b*); MPN (metanofenacina); HDR (heterodisulfuro reductasa); Fd_R (ferredoxina reducida); Fd_{OX} (ferredoxina oxidada).

Propiedades moleculares de las enzimas metanogénicas

a) Hidrogenasas de tipo Fe-Ni. Una de ellas se acopla al F420 y la otra a una cadena de transporte de e^- que incluye cit *b*, metanofenacina y la heterodisulfuro reductasa (Fig. 5.13). Estas cadenas de transporte e^- generan Δp (Figs. 5.13 y 5.15).

b) Citocromos *b* (metanógenos metilotrofos).

c) F420 deshidrogenasa: la enzima de *Methanolobus tindarius* (120 kDa) es pentamérica y posee FAD y centros FeS.

La metil transferasa es una enzima de membrana octamérica, con un grupo prostético derivado de la vitamina B2 Coα-[α-(5-hidroxibenzimidazolil)]-cobamida y que cataliza la reacción:

$$Co^{I} + CH_3{-}THMP \longrightarrow Co^{III}{-}CH_3 \longrightarrow Co^{I} + CH_3{-}CoM$$
$$\Delta G^{o\prime} = -30 \text{ kJ mol}^{-1} \qquad (5.21)$$

La cobamida está unida reversiblemente a un ligando His de la subunidad MtA, lo que provoca un cambio conformacional en la MT que impulsa el bombeo de Na^+ al periplasma y la generación de una fuerza motriz de sodio (Δn de 60 mV).

La metil reductasa tiene dos componentes:

El primero posee F430 y cataliza la reacción:

$$CoM{-}CH_3 + CoB{-}SH \longrightarrow CH_4 + CoB{-}S{-}S{-}CoM$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El segundo (heterodisulfuro reductasa), posee FAD y cataliza la reacción:

$$CoB-S-S-CoM + 2\ H^{(*)} \longrightarrow CoB-SH + CoM-SH$$

(*) Los H proceden de la CODH, de la F420 DH o del CHO–MTF por oxidación del CO o del CHO–MTF a CO_2 o del F420–H_2.

Síntesis de ATP en los metanógenos

Algunas reacciones metanogénicas consumen energía (1) y otras la generan (2 y 3):

1) CHO–MF sintetasa:

$$MF + CO_2 + H_2 \longrightarrow CHO-MF + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = +29\ kJ\ mol^{-1} \qquad (5.22)$$

2) Metil transferasa:

$$CH_3-THMPT + HS-CoM \longrightarrow CH_3-SCoM + THMPT$$
$$\Delta G^{o\prime} = -20\ kJ\ mol^{-1} \qquad (5.23)$$

3) Heterodisulfuro reductasa:

$$CoM-S-S-CoB \longrightarrow CoMSH + CoBSH \qquad \Delta G^{o\prime} = -58\ kJ\ mol^{-1} \qquad (5.24)$$

En los metanógenos metilotrofos, la oxidación del metanol es exergónica en su totalidad, pero hay una reacción que consume energía, la oxidación de CH_3–THMP a H_2C=THMP ($E^{o\prime}$ –182 mV) por el F420 ($E^{o\prime}$ –400 mV).

El ATP se sintetiza por un mecanismo quimiosmótico. Se ha demostrado que la producción de metano está acoplada a la formación de fuerza motriz de protones (Δp) y a la síntesis de ATP (Fig. 5.16).

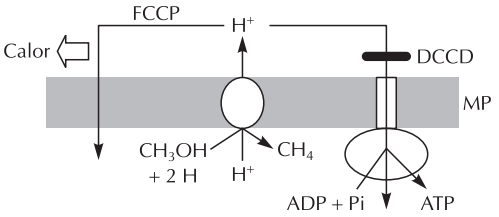


Figura 5.16. Acoplamiento de la producción de metano con la generación de Δp y la síntesis de ATP. La FCCP (carbonil cianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona) disipa el Δp generando calor e impide así la síntesis de ATP, pero no inhibe la transferencia e^- al CH_3OH; La DCCD (diciclohexilcarbodiimida) bloquea la ATP-asa y la reducción de CH_3OH, pero no afecta al Δp.

El efecto de los desacoplantes (FCCP) e inhibidores (DCCD) se explica sobre la base del triple engranaje transferencia de e^-/transferencia de H^+/síntesis de ATP. La FCCP desvía el flujo de H^+ a la generación de calor y dificulta la síntesis de ATP sin bloquear la transferencia de e^- (desengrana la rueda motriz del eje motor). Por su parte, la DCCD atasca el flujo de H^+ y el sistema de transferencia de e^- acoplado a él sin disipar Δp (bloquea el eje motor y por tanto, la rueda motriz).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El mecanismo quimiosmótico implica la generación de fuerzas motrices de Na^+ y de H^+. La fuerza motriz de sodio se produce por la reacción de la metil transferasa y, posiblemente, impulsa la reacción endergónica de oxidación del CH_3–THMP en los metanógenos metilotrofos o la propia síntesis de ATP mediante una ATP-asa dependiente de Na^+.

La fuerza motriz de protones se produce en la reacción de la heterodisulfuro reductasa (todos los metanógenos) y en la cadena de transporte de e^- a través de hidrogenasas periplásmicas, óxidorreductasas, metanofenacina y citocromos *b* hacia la heterodisulfuro reductasa (metanógenos metilotrofos y acetotrofos) (Figs. 5.11 y 5.14).

Los metanógenos poseen varios ATPasas de tipo F0F1 con una estructura similar: la propia F0F1 y la A0A1, que también se encuentra en arqueobacterias extremófilas (*Haloferax volcanii* y *Sulfolobus acidocaldarius*), y posee una subunidad accesoria (C) similar a la de la ATP-asa vacuolar (VoV1).

El proteolípido c de F0F1 tiene una versión (K) en la ATP sintetasa A0A1, que forma uno, dos o cuatro bucles transmembranales, con restos aminoacídicos protonables, en los diferentes metanógenos. Estos bucles se agrupan en las 24 hélices del componente c12 que transfieren los H^+ de forma circular (véase Capítulo 3).

Al parecer, el Δn generado por la metil transferasa se utiliza para producir un Δp que impulsa la síntesis de ATP vía A0A1. En *Methanosarcina mazei* la F0F1 cataliza la síntesis de ATP dirigida por el gradiente electroquímico de sodio.

5.2.6. La producción de metano como problema medioambiental

En 1989, y solamente en los Estados Unidos de Norteamérica, se produjeron $8{,}2 \times 10^{12}$ l de metano, más del 90% debido al ganado bovino cárnico.

Una forma de evitar esta producción masiva de CH_4 es desviar el metabolismo ruminal a la reducción de CO_2 a acetato (homoacetogénesis), un proceso que ocurre de hecho en sistemas digestivos animales. De esta forma, además, el carbono ingerido y la energía de los nutrientes no se pierden para el animal y se mejora su productividad.

Se han aislado homoacetógenos a partir del rumen bovino (*Acetomaculum ruminis*), por lo que la desviación del metabolismo metanogénico al acetogénico es una posibilidad digna de tener en cuenta para el diseño de biotecnologías dirigidas a corregir las excesivas emanaciones de CH_4 a partir de animales que, como los rumiantes, poseen una indudable importancia económica.

Por otra parte, la producción de metano en los vertederos, que comienza a ser preocupante desde un punto de vista cuantitativo y de riesgo de incendios o explosiones, se puede canalizar hacia la generación de electricidad a partir de vertederos enterrados, convertibles en zonas verdes. También se ha comprobado que el metano producido por digestión anaerobia de residuos agropecuarios puede transformar una granja de unos 500 ejemplares de ganado porcino en una entidad autosuficiente por lo que respecta al consumo energético.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.3. Fijación del CO_2

En las bacterias, la asimilación del CO_2 se puede llevar a cabo por tres rutas: el ciclo de Calvin, el ciclo de Krebs reductivo y la ruta del acetil-CoA.

5.3.1. Ciclo de Calvin

Tiene lugar en los cloroplastos y en procariotas fotosintéticos y litotrofos, pero no en las arqueobacterias o en las eubacterias microaerobias o anaerobias obligadas. Consiste en la síntesis de 3-P-gliceraldehido (PGALD) a partir de 3 moléculas de CO_2:

$$3\ CO_2 + 9\ ATP + 6\ NADPH + 9\ H^+ + 5\ H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow PGALD + 9\ ADP + 8\ Pi + 6\ NADP^+ \qquad (5.25)$$

En el ciclo de Calvin se pueden considerar dos fases:

Fase I. Carboxilación de la ribulosa 1,5-bisfosfato y síntesis de PGALD (Fig. 5.17).

$$3\ CO_2 + 3\ RuBP + 3\ H_2O \xrightarrow{RUBISCO} 6\ PGA \qquad 6\ PGA + 6\ ATP \xrightarrow{PGAK} 6\ BPGA + 6\ ADP$$

$$6\ BPGA + 6\ NADPH + 6\ H^+ \xrightarrow{DH} 6\ PGALD + 6\ NADP^+ + 6\ Pi$$

Figura 5.17. Fase I del ciclo de Calvin. RuBP (ribulosa 1,5-bisfosfato); RUBISCO (ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa); PGA (3-P glicerato); PGAK (3-fosfoglicerato kinasa); BPGA (1,3-bisfosfoglicerato); PGALD (3-fosfogliceraldehído); DH (3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa).

El estado de oxidación del C en el CO_2 es (–2) y el estado de oxidación medio del C en el material celular tipo carbohidrato es (0), por lo que se requieren 6 equivalentes de reducción [2 H] para sintetizar la triosa a partir de CO_2

La reacción reductiva, catalizada por la 3-PGALD deshidrogenasa, requiere un gasto previo de ATP para disminuir el potencial rédox del par oxidante (3-PGALD/3-PGA, $E^{o\prime}$ –0,52 V) y acercarlo al potencial del par reductor (NAD(P)H/NAD(P)$^+$, $E^{o\prime}$ –0,32 V). De lo contrario, el ΔE entre ambos pares sería positivo y el $\Delta G^{o\prime}$ de la reacción sería muy desfavorable:

$$3\text{-PGA} + NAD(P)H \longrightarrow PGALD + NAD(P)^+ \qquad (5.26)$$

$$\Delta G^{o\prime} = -nF\,\Delta E^{o\prime} = -2 \times 96{,}5 \times (-0{,}2) = +\ 38{,}6\ kJ\ mol^{-1}$$

Para salvar esta barrera energética, las células utilizan la energía del ATP que fosforila al oxidante 3-PGA, lo que disminuye su potencial rédox hasta –0,3 V:

$$3\text{-PGA} + ATP \longrightarrow 1{,}3\text{-BPGA} + ADP \qquad (5.27)$$

Siendo ahora el par aceptor PGALD/1,3-BPGA ($E^{o\prime}$ –0,3 V), el $\Delta G^{o\prime}$ de la reacción reductiva se hace ligeramente negativo:

$$1{,}3\text{-BPGA} + NAD(P)H \longrightarrow PGALD + NAD(P)^+ \qquad (5.28)$$

$$\Delta G^{o\prime} = -nF\,\Delta E^{o\prime} = -2 \times 96{,}5 \times (+0{,}02) = -3{,}86\ kJ\ mol^{-1}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Como consecuencia, el proceso *in vivo* transcurrirá con un cambio de energía libre razonablemente negativo sin necesidad de aumentar de forma no fisiológica las concentraciones de los sustratos de la reacción.

Fase II. Regeneración de la RuBP, el aceptor de CO_2.

Consiste en la síntesis de 3 RuBP a partir de 5 moléculas de PGALD.

a) En primer lugar, 5 triosas (C3) se transforman en 1 Ribosa (C5) y 2 Xilulosas (C5) (Fig. 5.18).

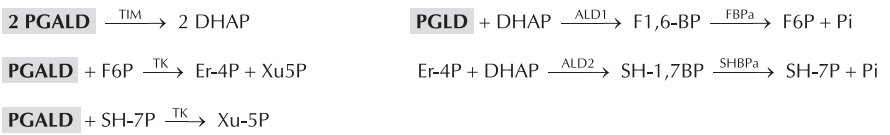


Figura 5.18. Síntesis de pentosas. DHAP (dihidroxiacetona fosfato); TIM (triosa fosfato isomerasa); ALD 1: fructosa bisfosfato aldolasa; FBPa (fructosa bisfosfatasa); Er-4P (eritrosa 4-P); TK (transcetolasa); SH 1,7-BP (sedoheptulosa 1,7BP); ALD2 (sedoheptulosa bisfosfato aldolasa); SHBPa (sedoheptulosa bisfosfatasa; R-5P (ribosa-5P); Xu-5P (xilulosa-5-P).

b) En segundo lugar, la ribosa-5P y la xilulosa-5P se isomerizan a ribulosa-5P (Fig. 5.19).

Figura 5.19. Síntesis de Ribulosa-P. Ru-5P (ribulosa-5P); IS (ribosa-5P isomerasa); EP (fosfopentosa epimerasa).

c) En tercer lugar, la Ru-5P se fosforila a Ru-1,5 Bis-P por la Ru-5P kinasa (RuK):

$$3\ \text{Ru-5p} + 3\ \text{ATP} \xrightarrow{\text{RuK}} 3\ \text{Ru}\,1{,}5\text{-BP} + 3\ \text{ADP} \qquad (5.29)$$

Según las estequiometrías que se presentan en las figuras 5.17 y 5.18:

$$3\ \text{RuBP (15C)} + 3\text{CO}_2 \longrightarrow 6\ \text{PGALD} \qquad (5.17)$$

$$5\ \text{PGALD} \longrightarrow 3\ \text{RuBP} \qquad (5.18)$$

La sexta molécula de PGALD se utiliza para la síntesis de glucosa y otros carbohidratos mediante la reversión de la fase I de la glucolisis.

Triosa-P isomerasa:	PGALD $\longleftrightarrow$ DHAP	(5.30)
F1,6BP aldolasa:	PGALD + DHAP $\longrightarrow$ F1,6-BP	(5.31)
Fructosa bisfosfatasa:	F1,6-BP $\longrightarrow$ F-6P + Pi	(5.32)
G-6P isomerasa:	F-6P $\longrightarrow$ G-6P $\longrightarrow$ Carbohidratos	(5.33)

Las plantas cuyo primer producto estable de la fijación de CO_2 es el 3-PGA se denominan C3 y proliferan principalmente en climas templados (Capítulo 7).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

5.3.2. Ciclo de Hatch-Slack

La RUBISCO cataliza dos reacciones, la de carboxilación de la RuBP y formación de 3-PGA y la de oxidación de la RuBP con formación de 3-PGA y P-Glicolato. Este consumo de O_2 en la luz se denomina fotorrespiración (Fig. 5.20).

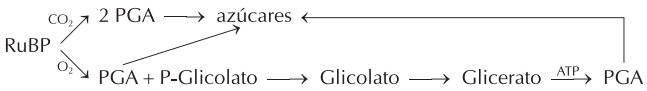


Figura 5.20. Dos reacciones catalizadas por la Ribulosa Bis-P carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO).

La reacción de la oxigenasa es la mitad de productiva que la carboxilasa porque el P-glicolato pierde el grupo –P en su conversión a glicerato y se consume otro ATP en fosforilar éste a 3-PGA para proceder a la síntesis de azúcares (Fig. 5.20). La actividad oxigenasa se incrementa a altas temperaturas (35 ºC) y al aumentar la *ratio* O_2/CO_2, muy alta en la atmósfera actual. Además, la Km para el CO_2 es menor a 25 ºC que a 35 ºC, lo que disminuye aún más la actividad carboxilasa a altas temperaturas.

Las plantas tropicales evitan la fotorrespiración fijando el CO_2 en la superficie foliar (mesófilo) mediante una enzima (PEP carboxilasa) que no posee actividad oxigenasa, acoplada a la malato deshidrogenasa. El malato formado se exporta al interior de la hoja (vaina) donde se descarboxila y mantiene una alta concentración de CO_2. Como en la vaina existe una *ratio* O_2/CO_2 muy baja, se favorece la reacción carboxilasa de la RUBISCO. Estas plantas se denominan C4 porque su primer producto estable de la fijación de CO_2 es el oxalacetato (Fig. 5.21).

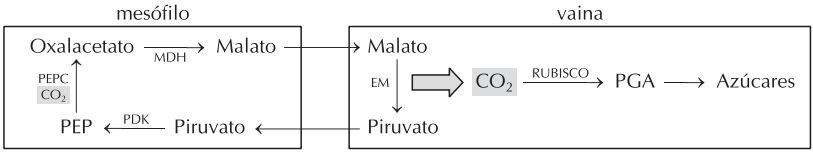


Figura 5.21. Ciclo de Hatch-Slack de las plantas C4. PEPC (PEP carboxilasa); PDK (piruvato fosfato dikinasa); MDH (malato deshidrogenasa); EM (enzima málica).

Las repercusiones adaptativas de este ciclo y sus variantes se verán en el Capítulo 7.

5.3.3. Ciclo de Krebs reductivo (biosintético)

Se encuentra en los anaerobios estrictos fototrofos (*Chlorobium*) o quimiotrofos (*Desulfobacterium*) y en aerobios como *Hydrogenobacter* y requiere ferredoxina reducida ($E^{o\prime}$ –0,42 V) para salvar la etapa irreversible de síntesis de 2-oxoglutarato (Fig. 5.22). La estequiometría de este ciclo es:

$$2\ CO_2 + 4\ [H_2] + 2\ ATP \longrightarrow \text{Acetil-CoA} + 2\ ADP + 2\ Pi \qquad (5.34)$$

Por su parte, la síntesis de material celular a partir de acetil-CoA consume 3 equivalentes de ATP, 1 Fd_R y 1 NADPH (Fig. 5.23).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

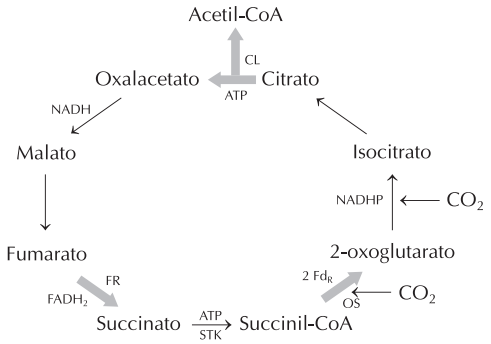


Figura 5.22. Ciclo de Krebs reductivo. Enzimas: FR (fumarato reductasa); STK (succinato tiokinasa); OS (2-oxoglutarato sintasa); CL (ATP-citrato liasa); Fd_R (ferredoxina reducida).

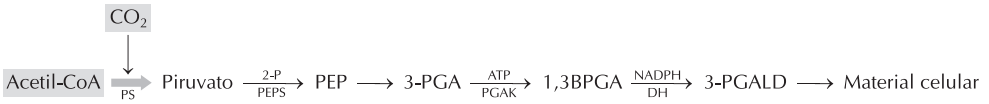


Figura 5.23. Biosíntesis de material celular a partir de AcCoA en *Chlorobium*. PS (piruvato sintasa: reacción similar a la 2-oxoglutarato sintasa); PEPS (PEP sintetasa); PGAK (3-fosfoglicerato kinasa); DH (PGALD deshidrogenasa); Fd_R (ferredoxina reducida).

En total, la síntesis de PGALD a partir de 3 CO_2 por esta ruta consume 6 [H_2] y 5 ATP; el consumo de poder reductor es idéntico al del ciclo de Calvin porque en ambos casos se reduce CO_2 (^{+4}C) a PGALD (^{0}C).

El menor requerimiento de ATP se explica porque en el Ciclo de Krebs reductivo los aceptores de CO_2 se activan mediante el consumo de un solo equivalente de ATP (succinil-CoA, acetil-CoA) o no requieren ser activados (2-oxoglutarato). En cambio, en el ciclo de Calvin se consume siempre ATP para regenerar la RuBP, el único aceptor de CO_2.

5.3.4. Ciclo del hidroxipropionato

En el fototrofo anaerobio no azufrado *Chloroflexus*, el CO_2 se fija en forma de glioxilato (Fig. 5.24).

5.3.5. Ruta del acetil-CoA

La ruta del acetil-CoA se emplea por los homoacetógenos para reducir CO_2 a acetato (Capítulo 4), por algunos reductores de sulfato para oxidar acetato a CO_2 y por los metanógenos acetotrofos para reducir acetato a CH_4 (sección 5.2.5).

La ruta reductiva del acetil-CoA se utiliza para el crecimiento en $CO_2 + H_2$, tanto por los homoacetógenos como por los metanógenos autótrofos:

$$2\ CO_2 + CoA \longrightarrow \text{Acetil-CoA}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

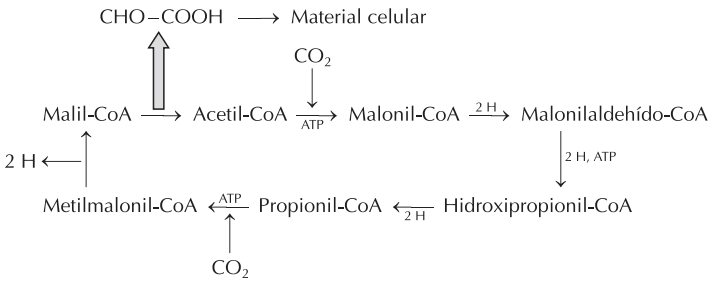


Figura 5.24. Fijación de CO_2 en *Chloroflexus*. El CO_2 se incorpora mediante la acetil-CoA carboxilasa (AC) y la propionil-CoA carboxilasa (PC). El glioxilato se transforma en material celular vía glicina/serina/hidroxipiruvato/glicerato o glicina/hidroxiaspartato/oxalacetato (ruta descrita en *Micrococcus denitrificans*).

A continuación, el Acetil-CoA se incorpora al material celular (Fig. 5.25).

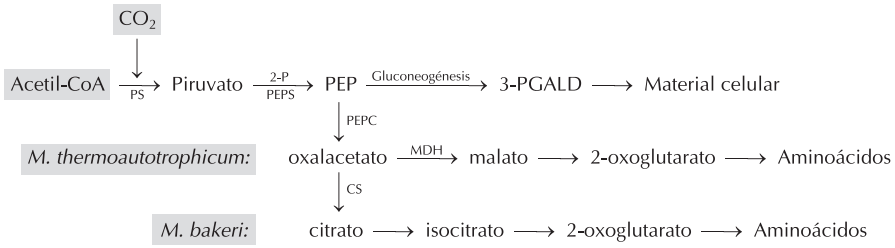


Figura 5.25. La síntesis de biomasa en los metanógenos requiere la piruvato sintasa (PS) y la PEP sintetasa (PEPS). El glutamato se sintetiza vía PEPC (PEP carboxilasa) y MDH (malato deshidrogenasa) y ciclo reductivo de Krebs o vía CS (citrato sintasa) y ciclo de Krebs (ambos incompletos).

5.3.6. Biosíntesis de material celular en los metilotrofos

Durante la oxidación de metano a CO_2 se produce HCHO, parte del cual no se oxida a CO_2 sino que se incorpora al material celular a través de dos rutas: el ciclo de la serina y el ciclo de la ribulosa monofosfato.

Junto con el ciclo de Calvin, estas dos rutas poseen una importancia excepcional en el equilibrio de los compuestos monocarbonados en la biosfera dado que fijan el exceso de CH_4 y de CO_2 en la biomasa bacteriana.

Ciclo de la serina

Consiste en la fijación de CO_2 y HCHO y se lleva a cabo por los metilotrofos tipo II:

$$\begin{aligned} HCHO + CO_2 + CoA + 2\,(NADH + H^+) + 2\,ATP \longrightarrow\ & Acetil\text{-}CoA + \\ & + 2\,NAD^+ + 2\,ADP + 2\,Pi + 2\,H_2O \end{aligned} \qquad (5.35)$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El consumo de poder reductor y ATP es mucho menor que en el ciclo de Calvin debido a que el C del HCHO ya posee el estado rédox del material celular (0) y sólo hay dos reacciones que consumen ATP (Fig. 5.26).

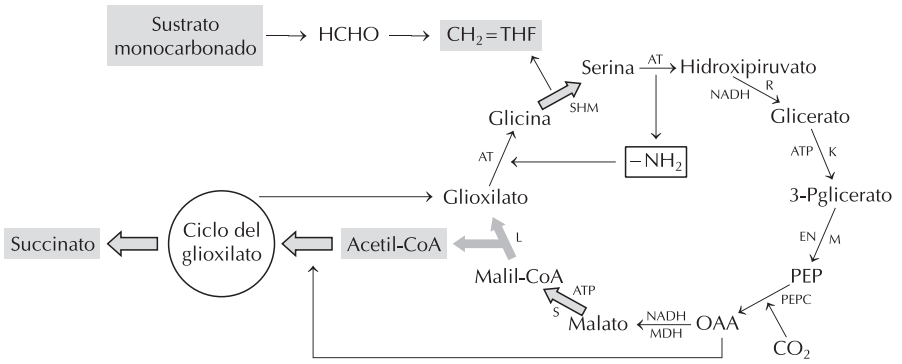


Figura 5.26. Ciclo de la serina-glioxilato. SHT (serina hidroximetilasa); AT (transaminasa); R (reductasa); K (kinasa); M (mutasa); E (enolasa); PEPC (PEP carboxilasa); MDH (malato deshidrogenasa); S (malil-CoA Sintetasa); L (malil-CoA Liasa).

En algunos metilotrofos, la síntesis de material celular ocurre a través de la isocitrato liasa mediante una segunda vuelta del ciclo hasta oxalacetato:

$$\text{oxalacetato} + \text{acetil-CoA} \longrightarrow \text{citrato} \longrightarrow \text{isocitrato} \longrightarrow \longrightarrow \text{glioxilato} + \text{succinato} \qquad (5.36)$$

El succinato se asimila a material celular vía OAA y PEP y el glioxilato se incorpora a la segunda ronda del ciclo de la serina o bien el succinato produce la segunda molécula de OAA y el glioxilato se incorpora al material celular vía ciclo de la serina y 3-PGA (Fig. 5.27).

$$2\ \text{HCHO} + 2\ CO_2 + 3\ (\text{NADH} + H^+) + 3\ \text{ATP} \longrightarrow \textbf{Succinato} + 3\ NAD^+ + 3\ \text{ADP} + 3\ \text{Pi} + 2\ H_2O$$

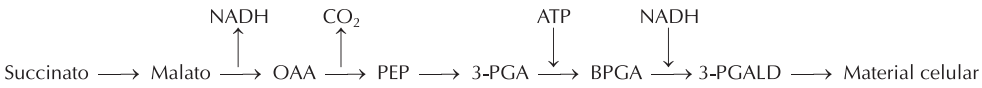


Fig. 5.27. Síntesis de material celular a partir de succinato.

Ciclo de la ribulosa monofosfato

Utiliza únicamente HCHO como fuente de carbono y por tanto no consume poder reductor sino sólo 1 ATP:

$$3\,\text{HCHO} + \text{ATP} \longrightarrow \text{3-PGALD} + \text{ADP}$$

Es la más eficaz de las rutas que fijan el carbono y la llevan a cabo los metilotrofos de tipo I, que pertenecen al grupo α de las bacterias púrpuras y poseen un ciclo de Krebs incompleto.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El ciclo de la Ribulosa-5P posee 3 fases:

1. Condensación del HCHO y la Ru-5P (Fig. 5.28).

$$3\ \text{HCHO} + 3\ \text{Ru-5P} \xrightarrow{S} 3\ \text{Hexulosa-6P} \xrightarrow{IS} 3\ \text{Fructosa-6P}$$

Figura 5.28. Síntesis de F-6P a partir de HCHO. Enzimas: S (sintasa); IS (isomerasa).

2. Ruptura de la F-6P mediante la F 1,6-BP aldolasa o la ruta Entner-Doudoroff (RED) (Fig. 5.29).

$$\text{F-6P} \xrightarrow{\text{ATP, PFK}} \text{F1,6-BP} \xrightarrow{\text{ALD}} \text{DHAP} + \text{PGALD} \quad \text{(metilotrofos facultativos)}$$

$$\text{F-6P} \xrightarrow{\text{RED}} \text{Piruvato} + \text{PGALD} \quad \text{(metilotrofos obligados)}$$

Figura 5.29. Síntesis de C3. Enzimas: PFK (fosfofructokinasa); ALD (F1,6-BP aldolasa).

3. Reordenamiento de azúcares para regenerar la Ru-5P (Fig. 15.30).

Ruta TAld (utiliza enzimas de la ruta PP): $2\ \text{F-6P} + \text{PGALD} \longrightarrow \text{Ru-5P}$

Ruta SDBPa (utiliza enzimas del CCB): $\text{F-6P} + 2\ \text{PGALD} + \text{DHAP} \longrightarrow \text{Ru-5P}$

Figura 5.30. Regeneración de la Ru-5P. Enzimas: TAld (transaldolasa); SDBPa (sedoheptulosa bisfofatasa); PP (enzimas de la ruta de las pentosas-P); CCB (enzimas del ciclo de Calvin).

5.4. El ciclo del carbono y el calentamiento global

5.4.1. El efecto invernadero

Se denomina efecto invernadero al fenómeno de reflexión de radiación infrarroja (calor) hacia la superficie terrestre por parte de determinados componentes de la atmósfera como el H_2O, el CO_2, el CH_4, el N_2O y los compuestos clorofluorocarbonados (CF_2Cl_2).

La radiación electromagnética produce en las moléculas transiciones electrónicas o nucleares. Para que una molécula absorba una radiación de una frecuencia determinada, la energía de la radiación debe ser del mismo orden de la transición molecular y, dada su naturaleza electromagnética, debe modificar el campo eléctrico de la molécula, es decir, su momento dipolar. La radiación infrarroja posee una frecuencia menor que la visible o la UV ($\lambda > 700$ nm) y sólo promueve la vibración de los núcleos (Fig. 5.31).

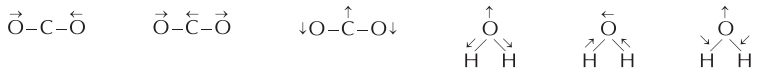


Figura 5.31. Tipos de vibración molecular del CO_2 y H_2O: simétrica, asimétrica y de flexión.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Entre las moléculas diatómicas, el N_2 y el O_2 poseen un momento dipolar cero, por lo que no absorben este tipo de radiación. Otras moléculas diatómicas como el CO y NO sí poseen momento dipolar porque ambos átomos tienen diferente afinidad electrónica, pero su concentracón atmosférica es muy pequeña (< 0,1 ppm). Por el contrario, el CO_2 y el H_2O son moléculas bipolares muy abundantes y absorben la radiación infrarroja, especialmente el agua, que puede vibrar de las tres formas, mientras que el CO_2 sólo puede vibrar de forma asimétrica y de flexión. Además, la concentración de agua en la atmósfera es un orden de magnitud superior a la del CO_2 (0,4%) y aumenta al incrementarse la cantidad de CO_2 y la temperatura, produciéndose la retroalimentación del efecto invernadero.

Un segundo tipo de transición molecular impulsada por la radiación infrarroja es la rotacional, de la que existe una gama para cada transición vibracional, lo que aumenta la efectividad del H_2O y del CO_2 como gases de efecto invernadero (GEI): entre ambos componentes absorben la radiación emitida por la superficie terrestre entre 4.000 y 8.000 nm y entre 12.000 y 24.000 nm, existiendo una zona no absorbida (entre 8.000 y 12.000 nm) denominada ventana infrarroja. Esta radiación es la única que podría escapar de la Tierra al espacio, si no fuera porque es precisamente la que absorben los compuestos clorofluorocarbonados, que de esta forma multiplican el efecto invernadero a pesar de su baja concentración.

Las emisiones de gases con efecto invernadero (GEI) se han ido incrementando desde la revolución industrial y especialmente durante las últimas décadas (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Aumento de la concentración de GEI en la atmósfera. CFC (compuestos clorofluorocarbonados).

	ppm (1950)	ppm (2000)
CO_2	275,00	365,00
CH_4	0,6	1,75
N_2O	0,27	0,31
CFC	0,00	$0,3 \times 10^{-3}$

La producción de CH_4 se ha desacelerado en los últimos años, probablemente por mejoras en la conducción de este gas, cuyas pérdidas eran del orden de 32 Mt en el año 1990.

Entre todos los GEI, el CO_2 sigue siendo el principal responsable del efecto invernadero, por lo que es imprescindible conocer datos acerca de su reciclado entre las diferentes fases del ciclo biogeoquímico del carbono.

La producción anual de CO_2 es de 6.300 Mt por la quema de combustibles fósiles y de 1.600 Mt por la desforestación. La respiración implica cifras 100 veces mayores, pero se compensa por la fijación fotosintética del CO_2. La generación de CO_2 es estacional (mínima en verano, por el efecto fotosintético, y máximo en invierno, por la degradación de la biomasa vegetal).

De todo el CO_2 producido, sólo un 40% (3,3 Gt/año) permanece en la atmósfera, que posee un total de 770 Gt de CO_2. El resto podría ser absorbido por el agua

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

oceánica, aunque el intercambio CO_2 atmosférico/HCO_3^- sólo ocurre en una capa superficial de un centenar de metros y de forma lenta, por lo que este proceso respondería sólo del 50% del CO_2 "deslocalizado" (algo más de 2.000 Mt/año), que se iría incorporando a los reservorios de CO_2 oceánico (38 Tt) y de carbonato en rocas y sedimentos (50.000 Tt). El otro 50% del CO_2 podría estar en el sumidero biológico, sobre todo los ecosistemas boscosos del Hemisferio Norte, y por esta razón cobra una enorme importancia la contribución de la biosfera a la amortiguación de las desviaciones que sufre el estado estacionario del carbono en la superficie terrestre.

5.4.2. La Tierra como un ser vivo: la hipótesis de Gaia

El ciclo del carbono en la naturaleza recicla al menos dos gases con efecto invernadero: el CO_2 y el CH_4, este último mucho menos abundante (1-2 ppm en la atmósfera) pero 25 veces más potente en su capacidad de retención de la radiación infrarroja.

Está fuera de toda duda que la alteración en la concentración de CO_2 atmosférico puede desencadenar cambios climáticos globales. Los registros fósiles realizados en el aire atrapado en el hielo antártico han revelado una concentración de CO_2 menor de 200 ppm hace unos 15000-30000 años, en la época de la última glaciación. Es, por tanto, evidente que existe una relación entre la temperatura media de la Tierra y el CO_2 atmosférico, y existen pruebas de oscilaciones bruscas de una y otro en el pasado.

Aunque existen depósitos masivos de CH_4 en el subsuelo submarino en forma de hidratos de metano poco accesibles a la atmósfera, en el pasado han tenido lugar afloramientos significativos de este hidrocarburo de los que se tiene constancia a través de registros fósiles: cambios paleoclimáticos y extinciones masivas (véase Capítulo 1, Paleocambios globales). El CO_2 resultante de la oxidación del metano puede ser incorporado al ciclo del carbono y depositarse en los sedimentos en forma de carbonato cálcico ($CaCO_3$) como ha ocurrido probablemente con anterioridad.

Las emisiones de CO_2 como consecuencia de actividades industriales humanas se han ido incrementando a lo largo del último siglo. A pesar de la pequeñez de esta contribución antropogénica (8 Gt de CO_2/año frente a cifras 2 o 3 órdenes de magnitud superiores en las fases de respiración, fotosíntesis y disolución del CO_2) es precisamente el factor humano el que contribuye al efecto invernadero porque el flujo de carbono por los canales naturales de su ciclo biogeoquímico está perfectamente compensado. De hecho, existen ya datos fiables que permiten prever incrementos significativos de la temperatura y variaciones en el nivel del mar que podrían afectar de forma catastrófica a la civilización humana.

La fijación de CO_2 por parte de organismos fotosintéticos y la oxidación de CH_4 por parte de los metanotrofos y metilotrofos podría constituir un factor de amortiguamiento del cambio climático global. La elevación de la concentración de CO_2 podría llevar a las plantas y al fitoplancton a un paraíso fotosintético, dado que la fijación de CO_2 depende de la actividad carboxilasa de la RUBISCO, fuertemente dependiente de la temperatura y de la relación CO_2/O_2. Esta capacidad amortiguadora podría verse sin embargo afectada por tres factores:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

a) El ritmo actual de producción de CO_2
b) El ritmo actual de desforestación
c) La contaminación oceánica, que podría afectar al equilibrio de las comunidades fitoplanctónicas más productivas como los proclorofitos

Experimentos a muy corto plazo realizados en la actualidad en parcelas experimentales terrestres sometidas a elevadas concentraciones de CO_2 han revelado fuertes incrementos en la actividad fotosintética que no han afectado a la composición de la flora microbiana del suelo, con excepción de los hongos celulolíticos, cuya abundancia incrementó considerablemente la población de insectos fungívoros.

La cuestión que permanece sin resolver por el momento es si la Tierra será capaz de amortiguar el lento pero inexorable aumento en la concentración de CO_2 atmosférico antes de que se produzcan fenómenos irreversibles que hagan inhabitable el Planeta en un futuro no tan lejano.

Bibliografía

FERRY, J. E. (1993). *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Chapman & Hall.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2002). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education Inc, 10th ed.

MOAT, A. G., FOSTER, J. W., SPECTOR, M.P. (2002). *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, 4th ed. (2002).

NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sinauer Assoc. Inc.

R. M. ATLAS, R. M., BARTHA, R. (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Addison Wesley, 4th ed.

ROGERS, J. E. y WHITMAN, W. E. (eds.) (1991). *Microbial production and comsumption of Greenhaus gases: Methane, Nitrogen oxides and halomethanes*. ASM.

SCHÄFFER, G., ENGELHARD, M., MÜLLER, V. (1999). "Bioenergetics of the Archaea". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 570-620.

WHITE, D. (1997). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, 2nd ed.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 6
CICLOS BIOGEOQUÍMICOS III

Glosario
6.1. Introducción
6.2. Ciclos del nitrógeno, azufre, hierro y otros elementos
6.2.1. Ciclo del nitrógeno
Fijación del nitrógeno molecular
Fijación simbiótica de nitrógeno
Asimilación de nitrato
Asimilación de amonio
Amonificación
Nitrificación
Desnitrificación
Reducción desasimiladora de nitrato
Oxidación anaerobia de amonio (Anamox)
6.2.2. Ciclo del azufre
Asimilación de sulfato
Reducción respiratoria de sulfato (desulfuricación)
Reducción no asimiladora de compuestos azufrados
Oxidación de compuestos azufrados (sulfuricación)
Metabolismo del azufre en las fuentes hidrotermales submarinas
6.2.3. Ciclo del hierro
Reducción respiratoria de Fe^{3+}
Oxidación bacteriana de Fe^{2+}
6.2.4. Ciclo del fósforo
6.2.5. Ciclos de otros elementos
Sodio y potasio
Calcio y magnesio
Manganeso
Mercurio
Plomo
Cinc y cadmio
Silicio y boro
Aluminio
Cobre, níquel y cobalto
Molibdeno, wolframio, vanadio y cromo
Arsénico
Selenio
6.3. Lluvia ácida
6.4. Dinámica de la capa de ozono atmosférica
6.5. Biominería
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Adenililación: Transferencia de un grupo –AMP desde el ATP a un grupo –OH (usualmente tirosina) de una proteína.

Anóxico: Desprovisto de oxígeno (anaerobio).

Asimilación: Proceso metabólico que conlleva la incorporación de un elemento químico (C, N, S, P, Fe, etc.) al material celular.

Bacteroides: Estructuras pleomórficas derivadas de las bacterias simbióticas que forman un filamento de infección, capaces de fijar N_2.

Biogeoquímicos, ciclos: Procesos metabólicos en los que los bioelementos se reciclan en la biosfera.

Calvin, ciclo de: Ruta metabólica cíclica de fijación del CO_2 en organismos autótrofos.

Caja: Secuencia de bases en el DNA que reconoce y une proteínas específicas.

Desasimilación: Proceso metabólico en que un compuesto químico sufre un proceso rédox con fines no asimiladores ni de generación de Δp.

Dismutación (desproporción): Reacción en la que un compuesto o ión se transforma en otros dos, uno más oxidado y otro más reducido que el de partida.

Diazotrofo: Organismo procariota capaz de utilizar N_2 como fuente de nitrógeno mediante su reducción a NH_3.

Dos componentes: Sistema de control común en las bacterias en el que una proteína sensora detecta un cambio ambiental, se autofosforila en histidina y transfiere el grupo ~P a un resto de aspartato de una proteína reguladora de la respuesta al cambio. Una variante, el fosforrelé, posee más de dos componentes y se encuentra en las bacterias, hongos y plantas superiores.

Filamento de infección: Canal de celulosa formado por la planta a través del que progresan las bacterias simbióticas fijadoras de N_2 hacia los tejidos internos.

Fuerza motriz de protones (o protón-motriz): Gradiente de H^+ (Δp) que se establece a través de una unidad de membrana gracias a la energía suministrada por una reacción química, normalmente rédox.

Heterocistos: Células especializadas de las cianobacterias filamentosas que carecen de fotosistema II y donde se lleva a cabo la fijación de N_2.

Leghemoglobina: Proteína hemínica de las plantas fijadoras de N_2 que une O_2 con gran afinidad.

Lixiviación: Separación de dos componentes de una mezcla por contacto con un disolvente apropiado.

Micorrizas: Asociación entre hongos del suelo y raíces de plantas superiores a las que facilitan el aporte de nutrientes.

Nodulinas: Proteínas sintetizadas por plantas fijadoras de N_2 en respuesta a la infección de las bacterias simbióticas.

Nódulos: Agrupaciones celulares infestadas de bacteroides donde se lleva a cabo la fijación del N_2.

Número de oxidación (NO): Número de electrones ganados o perdidos por un elemento químico al formar parte de un compuesto. Se calcula teniendo en cuenta las siguientes reglas:

- La suma de los NO de todos los átomos de un compuesto neutro es cero
- El NO de un elemento en estado libre es cero, aún en el caso de que forme moléculas biatómicas.
- El NO de un ión es su carga.
- En los compuestos con H, el NO del H es +1, salvo en los hidruros de metales alcalinos y alcalinotérreos.
- En los compuestos con oxígeno, el NO de éste es –2, salvo en el H_2O_2 y sus derivados, donde sería –1.
- En los haluros, el NO del halógeno es –1.
- En los sulfuros, el NO del azufre es –2.

Número de valencia: Véase número de oxidación.

Osmorregulador: Compuesto químico intracelular que contrapesa la presión osmótica exterior.

Óxico: Ambiente oxigenado (aerobio).

Periplasma: Espacio situado entre la membrana plasmática y la membrana externa en las bacterias Gram negativas.

Potencial reductor: Tendencia de un donador de electrones a cederlos a un aceptor. Se expresa en voltios.

Potencial oxidante: Tendencia de un aceptor de electrones a recibirlos de un donador. Se expresa en voltios.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Promotor: Secuencia de bases en el DNA reconocida por la RNA polimerasa para iniciar un proceso transcripcional.

Respiración: Proceso metabólico rédox, ligado a una unidad de membrana, en el que la transferencia de electrones entre un donador y un aceptor genera Δp.

Unidad de membrana: Membrana fosfolipoproteínica que separa dos compartimentos celulares en los organismos vivos.

Unidad transcripcional: Conjunto de genes que se transcriben a partir de un promotor común.

Uridililación: Transferencia de un grupo –UMP desde el UTP a un grupo –OH (usualmente de tirosina) de una proteína.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

6.1. Introducción

A lo largo de este capítulo se van a considerar los ciclos biogeoquímicos de otros elementos que también son necesarios para el mantenimiento de la vida sobre la Tierra, haciendo especial hincapié en aquellos que, junto con el carbono, el oxígeno y el hidrógeno, son esenciales en el desarrollo de los organismos vivos. Fundamentalmente se estudiarán los ciclos del nitrógeno, del azufre, del fósforo y del hierro, pero sin olvidar aquellos otros (sodio, calcio, magnesio, ...) sin los que, aunque se necesitan sólo en pequeñas concentraciones, tampoco se podrían llevar a buen fin los procesos vitales. Estos elementos reciben el nombre de nutrientes minerales y sus ciclos se denominan ciclos minerales. La mayoría de estos elementos tienen ciclos relativamente sencillos que comprenden la disolución en medio acuoso, la incorporación a la materia orgánica, su mineralización y, finalmente, la sedimentación. Algunos de los más importantes (N, S, Fe, P, Mn) se encuentran en la biosfera en varios estados de valencia entre los que se producen diferentes procesos de oxidorreducción, en muchos de los cuales juegan un papel muy importante los organismos vivos. En otros casos (Na, K, Ca, Mg, Si), sin embargo, sólo presentan un único estado de valencia. Generalmente todos estos elementos se encuentran disponibles en los diferentes ecosistemas en cantidades suficientes para mantener un crecimiento adecuado, aunque en algunos casos se pueden producir ciertos desajustes (generalmente ligados a efectos antropogénicos) que pueden llegar incluso a provocar la destrucción de aquellos.

6.2. Ciclo del nitrógeno, azufre, hierro y otros elementos

6.2.1. Ciclo del nitrógeno

El metabolismo del nitrógeno es crucial para los organismos, puesto que es el elemento limitante en la síntesis de proteínas. Además, la cantidad y calidad de la proteína que contienen los seres vivos son decisivas para determinar la utilidad de éstos como alimento.

Los estados de oxidación en los que el nitrógeno puede presentarse en la naturaleza oscilan entre +5, en el nitrato, y –3, en el amoniaco y en la mayoría de compuestos orgánicos (Tabla 6.1). Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en las células es el nitrógeno. El nitrógeno forma parte de aminoácidos, nucleótidos y aminoazúcares, así como de sus correspondientes polímeros.

En la naturaleza, la mayor parte del nitrógeno disponible se encuentra en forma inorgánica, como amoniaco (NH_3), nitratos (NO_3^-), o dinitrógeno (N_2). A pesar de que este último es el componente más abundante de la atmósfera (79% del total, equivalente a $3{,}8 \times 10^{15}$ toneladas), son muy pocos los organismos capaces de usarlo como fuente de nitrógeno. Otro reservorio importante de nitrógeno lo constituyen las rocas ígneas ($1{,}4 \times 10^{16}$ toneladas) y las sedimentarias ($4{,}0 \times 10^{15}$ toneladas), aunque aquí se encuentra en forma de nitrógeno fijado, no intercambiable, por lo que no está directamente disponible. La meteorización fisicoquímica y la degradación biológica liberan amoniaco de estas rocas, pero muy lentamente, por lo que apenas tienen influencia

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 6.1. Estados de oxidación de compuestos de nitrógeno en la biosfera.

Compuesto		Número de oxidación
N orgánico	$R-NH_2$	–3
Amoniaco	NH_3	–3
Dinitrógeno	N_2	0
Óxido nitroso	N_2O	+1
Óxido nítrico	NO	+2
Nitrito	NO_2^-	+3
Dióxido de nitrógeno	NO_2	+4
Nitrato	NO_3^-	+5

en el ciclo global. Las únicas reservas naturales disponibles de nitrato se han formado a partir de la descomposición del guano procedente de las deposiciones de las aves, y se encuentran en algunas islas de Chile, en las que gracias a su clima seco no se ha producido la lixiviación del nitrato.

Los iones amonio, nitrato y nitrito se encuentran como sales muy solubles en agua, por lo que se encuentran ampliamente distribuidos en la biosfera como soluciones acuosas diluidas. En climas templados, el humus, materia orgánica de los suelos, constituye una abundante reserva de nitrógeno relativamente estable, cuya mineralización puede durar décadas o siglos. En las regiones de clima tropical, la temperatura y la humedad favorecen una mineralización rápida, lo cual limita la acumulación de dicho elemento.

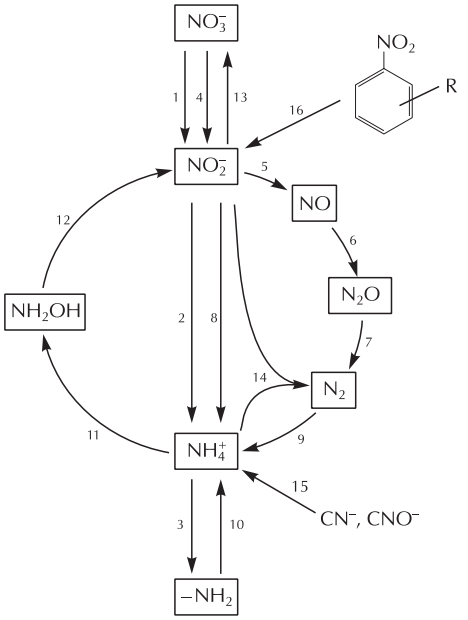
El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende en gran medida de la actividad de los microorganismos. Muchos hábitats dependen de las plantas para el suministro de carbono orgánico que pueda ser utilizado como fuente de energía, pero todos los hábitats dependen de la fijación bacteriana de nitrógeno atmosférico o de la intervención humana, a través de la distribución de abonos nitrogenados. Las plantas no podrían continuar su metabolismo fotosintético si no dispusieran de formas fijadas de nitrógeno que les proporcionan los microorganismos o los abonos sintéticos.

La mayoría de las bacterias son capaces de utilizar amoniaco como única fuente de nitrógeno, mientras otras pueden usar, además, los nitratos. Sólo algunas bacterias, las fijadoras de nitrógeno (diazotróficas), son capaces de utilizar el nitrógeno gaseoso como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Pese a su número limitado de especies, se ha estimado que la cantidad de N_2 fijado por estos microorganismos es de 10^8 toneladas por año, alrededor del 60% de todo el nitrógeno que se fija en la Tierra. Los procesos industriales (fundamentalmente por el proceso de Haber-Bosch) fijan otro 25%, mientras que el 15% restante se fija por la acción de los rayos y de la radiación ultravioleta.

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno comprende las diferentes transformaciones de éste que permiten la circulación del nitrógeno atmosférico a través de los ambientes terrestres y acuáticos e incluye los procesos de la fijación de N_2, la nitrificación, la desnitrificación, la asimilación y la amonificación (Fig. 6.1). Este movimiento del

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

nitrógeno a través de la biosfera determina en gran medida la productividad ecológica de los ambientes terrestres.



Enzimas:
1: Nitrato reductasa asimiladora
2: Nitrito reductasa asimiladora
3: Glutamina sintetasa / Glutamato sintasa
4: Nitrato reductasa respiradora
5: Nitrito reductasa respiradora
6: NO reductasa
7: N_2O reductasa
8: Nitrito reductasa amonificante
9: Dinitrogenasa
10: Desaminasas y aa oxidasas
11: Amonio monooxigenasa
12: Hidroxilamina oxidorreductasa
13: Nitrito oxidasa
14: Anamox
15: Varias
16: Oxigenasas

Procesos:
Asimilación de nitrato y amonio: 1, 2, 3
Desnitrificación (respiración): 4, 5, 6, 7
Fijación de nitrógeno: 9
Amonificación: 8, 10
Nitrificación: 11, 12, 13
Oxidación anaerobia de amonio: 14
Cianotrofia: 15
Oxidación de nitroaromáticos: 16

Figura 6.1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

En tierra, la fijación de nitrógeno es de unos 135×10^6 toneladas por año, procedentes en gran parte de la actividad de los microorganismos en los cultivos de leguminosas. En los ambientes marinos la cantidad total fijada por los microorganismos es sensiblemente menor (40×10^6 toneladas por año). La entrada antropogénica de nitrógeno en el ciclo biogeoquímico se produce en forma de abonos sintéticos (30×10^6 toneladas por año), combustibles (19×10^6 toneladas por año), así como mediante los cultivos de leguminosas y otras plantas (44×10^6 toneladas por año). Estos valores se acercan a la fijación total de nitrógeno realizada en las praderas (45×10^6 toneladas por año), en los bosques (40×10^6 toneladas por año), en otras zonas terrestres (10×10^6 toneladas por año) y en los ambientes marinos (40×10^6 toneladas por año). La actividad volcánica, la radiación ionizante y las descargas eléctricas aportan formas complementarias de nitrógeno combinado a la atmósfera; cuando estos compuestos precipitan por la lluvia, el nitrógeno combinado queda disponible en la biosfera, generalmente en forma de nitratos. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno disponible por esta vía resulta insuficiente para mantener la vida vegetal, ya que se calcula que no se incorpora más de un 10-20% de la cantidad fijada de forma biológica.

Pero los microorganismos no se ven implicados sólo en los procesos de fijación del nitrógeno, ya que a ellos se debe en gran parte la vuelta del nitrógeno molecular a la atmósfera, fundamentalmente a través de la desnitrificación. Antes

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de la intervención humana, los procesos de fijación de nitrógeno y de desnitrificación estaban prácticamente equilibrados, pero con el aumento de la entrada antropogénica el equilibrio se ha visto alterado.

Como se puede observar en la figura 6.1, la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2, estado de oxidación 0) hasta amoniaco/amonio (NH_3/NH_4^+; –3) por las bacterias y cianobacterias fijadoras de nitrógeno no es la única vía de incorporación de nitrógeno. Aunque el amoniaco puede ser utilizado directamente por la mayoría de los seres vivos, una gran parte de éste es utilizado por las bacterias del suelo en procesos rédox que les permiten obtener energía. Estas bacterias oxidan el amoniaco (–3) a nitrito (NO_2^-; +3) y a nitrato (NO_3^-; +5) en un proceso que se denomina nitrificación. La abundancia de este tipo de bacterias en el suelo y su actividad nitrificante hacen que casi todo el amoniaco sea oxidado a nitrato. De cualquier forma, esto no resulta un problema para otros microorganismos ni para las plantas, ya que el nitrato se puede incorporar y reducir fácilmente a amoniaco por acción de las enzimas nitrato y nitrito reductasas, mediante el proceso que se conoce como asimilación. El amoniaco formado es incorporado a los aminoácidos por las plantas, lo que les permite fabricar proteínas y los demás compuestos nitrogenados. Los animales utilizan las plantas como fuente de aminoácidos, esenciales y no esenciales, para su metabolismo anabólico. Cuando los organismos mueren, las bacterias saprófitas devuelven el amoniaco al suelo (amonificación), en donde las bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo en nitrito y nitrato. Por último, en ambientes anaeróbicos, las bacterias desnitrificantes utilizan estas formas oxidadas de nitrógeno, en lugar del O_2, como aceptor terminal de electrones en procesos respiratorios ligados a membrana.

Fijación del nitrógeno molecular

En última instancia, todo el nitrógeno de las biomoléculas proviene del nitrógeno atmosférico fijado por algunos pocos géneros de bacterias, cianobacterias y arqueobacterias, bien en vida libre o en asociación simbiótica con diversas plantas, generalmente leguminosas.

La fijación abiótica de N_2, para obtener fertilizantes, se lleva a cabo mediante el proceso conocido como síntesis de Haber-Bosch (inicialmente propuesto por Fritz Haber en 1910), que consiste en la reacción del N_2 con H_2 gaseoso (obtenido normalmente a partir de gas natural) en presencia de un catalizador de hierro a 400-540 °C y a una presión de 80-350 atm (Fig. 6.2). Estas condiciones tan drásticas son necesarias para salvar la inercia química debida a la elevada energía del triple enlace entre los átomos de N en el N_2 (942 kJ mol^{-1}, frente a los 493 kJ mol^{-1} del enlace O=O). De hecho, Lavoisier denominó al nitrógeno gaseoso *"azote"*, que significa *"sin vida"*, por lo poco reactivo que resulta. El amoniaco resultante se podría introducir directamente en el terreno de cultivo, sin embargo, la forma de aplicación más conveniente y común es como nitrato amónico, obtenido por oxidación de parte del amoniaco a ácido nítrico y posterior recombinación de éste con el amoniaco remanente.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

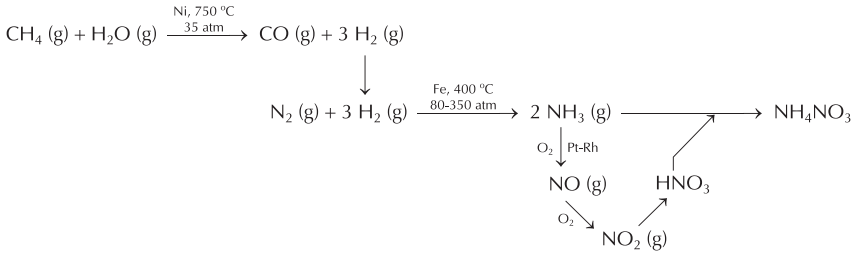


Figura 6.2. Procedimiento para la obtención de fertilizantes.

La gran cantidad de energía necesaria para superar el desafío cinético de romper el enlace N≡N hace que el proceso biológico de fijación de nitrógeno, que se lleva a cabo a presión y temperaturas biológicas, requiera de una enzima compleja y con varios centros rédox. Sólo un número relativamente reducido de organismos pueden llevar a cabo la reacción de reducción del N_2 a NH_3, proceso exergónico en el que intervienen, en principio, seis electrones.

$$N_2 + 6\ e^- + 6\ H^+ \longrightarrow 2\ NH_3 \qquad (\Delta G^{o\prime} = -33{,}5\ \text{kJ mol}^{-1})$$

Además, en el proceso se forma H_2, por lo que es necesario un par de electrones adicionales. Estos electrones son proporcionados, generalmente, por proteínas del tipo de la ferredoxina o de la flavodoxina, reducidas en procesos ligados a la fotosíntesis. La elevada barrera de energía de activación se supera, en parte, por la unión e hidrólisis de al menos 16 ATP, por lo que la reacción global puede escribirse como

$$N_2 + [16\text{-}24]\ ATP + 8\ e^- + 8\ H^+ \longrightarrow 2\ NH_3 + H_2 + [16\text{-}24]\ ADP + [16\text{-}24]\ P_i$$

El "complejo nitrogenasa", que lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno, consta de dos proteínas muy conservadas, la dinitrogenasa reductasa (llamada también componente II o hierroproteína) y la dinitrogenasa (componente I o molibdohierroproteína). La dinitrogenasa reductasa es un homodímero (M_r 60.000) que contiene un centro rédox de 4Fe–4S, capaz de intercambiar un electrón, y dos centros de unión para el ATP. La dinitrogenasa es un tetrámero (M_r 240.000) formado por dos tipos de subunidades distintas ($\alpha_2\beta_2$) aunque bastante parecidas entre sí, que contiene dos complejos de hierro y azufre diferentes: las agrupaciones P, localizadas en la interfase α–β, con 8 hierros y 7 azufres en forma de dos cubos 4Fe–3S conectados mediante un S central (Fig. 6.3), y el cofactor de hierro y molibdeno (CoFeMo), que contiene 7 hierros, 9 azufres y un ion molibdeno unido a una molécula de homocitrato (Fig. 6.3, derecha, abajo). El CoFeMo se encuentra además unido a la subunidad α mediante un residuo de histidina y otro de cisteína. Por molécula de dinitrogenasa hay dos agrupaciones P y dos CoFeMo.

Los electrones procedentes de moléculas reducidas, como el piruvato, son transferidos a transportadores de potencial muy negativo, como la ferredoxina o la flavodoxina, dependiendo de los organismos. De aquí son transferidos a la dinitrogenasa reductasa que, a su vez, resulta reducida. En estas condiciones la reductasa se une a uno de los dos sitios de unión que existen en la dinitrogenasa y le transfiere los

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

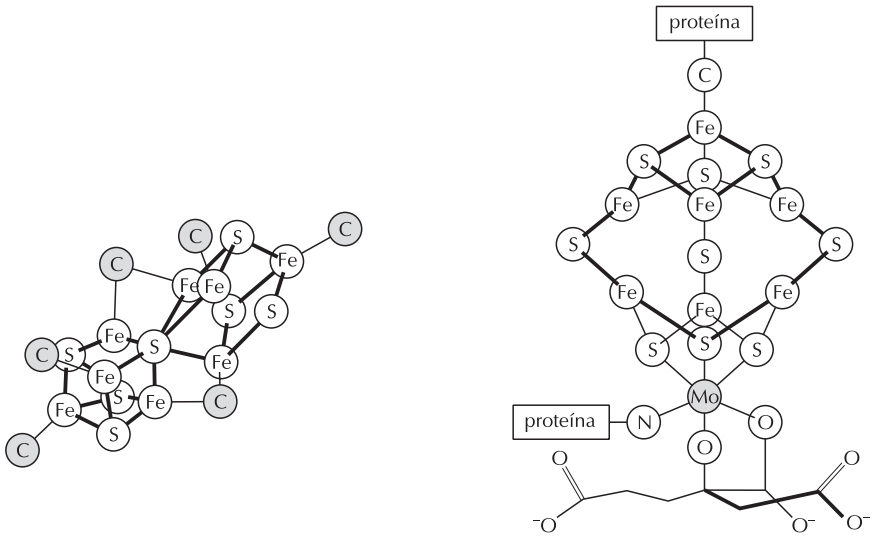


Figura 6.3. Cofactores de la fijación de nitrógeno. Agrupación P (izquierda); CoFeMo (derecha).

electrones de uno en uno, disociándose la forma oxidada. Este proceso se repite hasta que se han transferido los ocho electrones. Para la transferencia se precisa la hidrólisis de 2-3 ATP por electrón por parte de la reductasa. La unión de una molécula de ATP a la reductasa provoca un cambio conformacional de ésta que hace más negativo su potencial de reducción, pasando de –250 a –400 mV. Este incremento del potencial reductor es necesario para la transferencia de los electrones a la dinitrogenasa. La estructura de la región de unión al ATP indica que pertenece a la familia de NTPasas con bucle P, siendo un ejemplo de como este dominio se ha seleccionado durante la evolución por su capacidad para acoplar la hidrólisis de nucleósidos trifosfato a cambios conformacionales.

Los electrones se incorporan a las agrupaciones P de la dinitrogenasa y de éstas al cofactor de hierro y molibdeno (Fig. 6.4), que es donde tiene lugar la reducción del N_2, probablemente entre los átomos de hierro que existen en su cavidad central (Fig. 6.4).

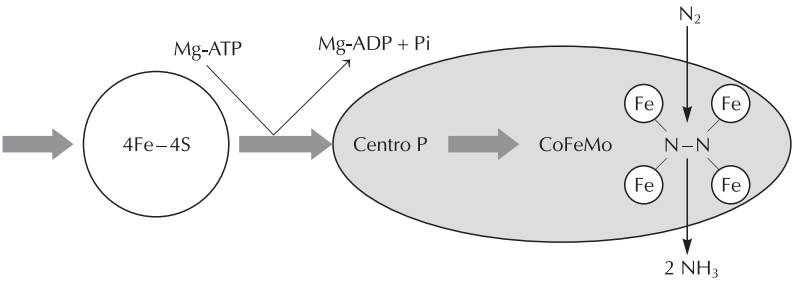


Figura 6.4. Mecanismo de la transferencia electrónica en la dinitrogenasa.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El resumen del proceso de reducción del N_2 se presenta en la figura 6.5, donde se indican además los genes que codifican los diferentes componentes del proceso.

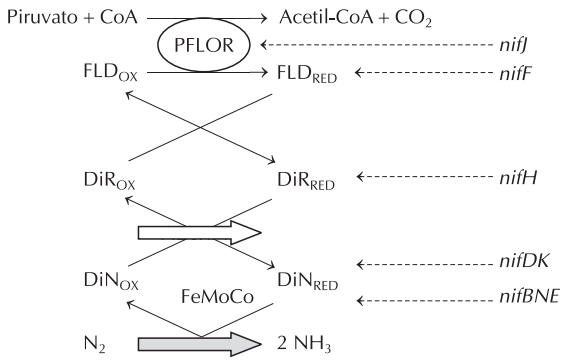


Figura 6.5. Fases de la transferencia electrónica en la fijación de N_2. PFLOR (piruvato:flavodoxina óxido-reductasa); FLD (flavodoxina); DiN (dinitrogenasa); DiR (dinitrogenasa reductasa). Las flechas discontinuas indican los genes que codifican las respectivas enzimas (*nifJFHDK*) y el CoFeMo (*nifBNE*).

La fijación biológica de nitrógeno requiere condiciones muy reductoras y el oxígeno inhibe el proceso porque la dinitrogenasa reductasa es inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 (con una vida media de 30 s), incluso cuando se aísla de fijadores de nitrógeno aeróbicos, como *Azotobacter*. Se ha observado que muchas bacterias aerobias fijadoras de N_2 lo hacen de una forma más eficaz cuando la concentración de O_2 está por debajo de la atmosférica (21%). Estas condiciones son frecuentes en el subsuelo y en los sedimentos. En estos organismos la inactivación por el O_2 se evita por diversos métodos: evitando su presencia (ambientes anaeróbicos); proteínas protectoras (Shetna); aumentando la tasa de respiración; retardando su entrada mediante la producción de capas mucosas; llevando a cabo la fijación en células especiales, denominadas heterocistos, que permanecen en anaerobiosis al estar rodeadas por una gruesa pared con un alto contenido en glucolípidos. Este último es el caso de la fijación en cianobacterias filamentosas como *Anabaena*. Estas cianobacterias, además, llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica, por lo que los heterocistos pierden el fotosistema II, generador de oxígeno, durante el proceso de diferenciación de las otras células vegetativas. Entre esas células y los heterocistos se establece un intercambio activo; las células vegetativas proporcionan disacáridos generados por fotosíntesis a los heterocistos y éstos les aportan formas fijadas de nitrógeno, fundamentalmente glutamina (Fig. 6.6).

Se han descrito diversas nitrogenasas "alternativas" que no contienen Mo, sino que en su lugar tienen V, con cofactor de Fe-V, o sólo hierro, pero con una agrupación sulfoférrica similar a los CoFeMo y CoFeV. Estas nitrogenasas no se sintetizan cuando hay suficiente Mo, lo que indica que la nitrogenasa con Mo es el sistema nitrogenasa principal en las células, mientras que las otras se supone que sirven como mecanismo de apoyo para asegurar la fijación de N_2 cuando el hábitat está limitado en Mo. Recientemente se ha descubierto un sistema nitrogenasa en la bacteria

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

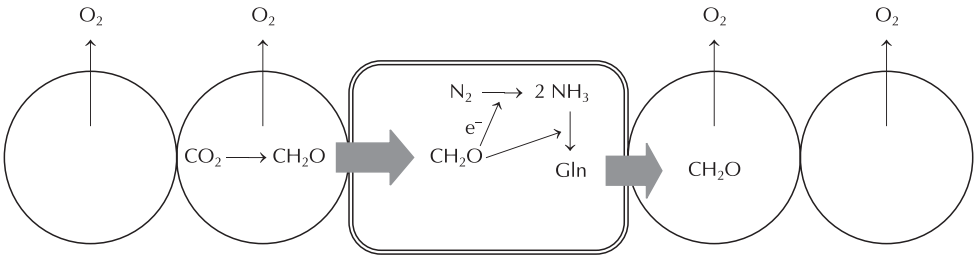


Figura 6.6. Función de los heterocistos (centro) en la cianobacteria *Anabaena*. CH_2O (carbohidratos).

quimiolitotrofa termófila *Streptomyces thermoautotrophicus* que, aunque contiene Mo, es funcional y estructuralmente diferente a los sistemas encontrados en el resto de organismos (Fig. 6.7). En este caso el donador de electrones es el CO a través de una CO deshidrogenasa, que contiene Mo y que forma iones superóxido (O_2^-) por reducción de O_2. Estos iones superóxido son reoxidados por el componente Str2 del complejo nitrogenasa (proteína dimérica que funciona como la reductasa de la nitrogenasa clásica, aunque estructuralmente es muy parecida a las superóxido dismutasas que contienen Mn). Los electrones se transfieren finalmente al componente dinitrogenasa, denominado Str1, que reduce al N_2. Esta molibdoproteína contiene tres polipéptidos diferentes que presentan algunas semejanzas estructurales con los de las otras dinitrogenasas. El requerimiento energético de esta nitrogenasa es inferior (entre un 50 y un 75%) al de las clásicas y además no es lábil al O_2, lo que permite pensar que este sistema puede ser un buen candidato para obtener por ingeniería genética plantas fijadoras de N_2.

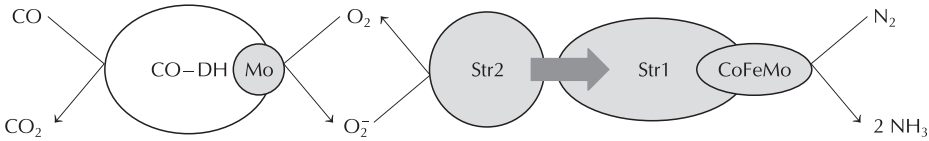


Figura 6.7. Reacción de fijación de N_2 en *Streptomyces thermoautotrophicus*. CODH (CO-deshidrogenasa). Mo (molibdopterina); CoFeMo (cofactor de Fe y Mo); Str (componentes del complejo dinitrogenasa).

La genética de la fijación del nitrógeno ha sido estudiada muy intensamente, gracias a los notables beneficios que supondría para las plantas la transferencia de la capacidad fijadora del N_2 atmosférico, con lo que además se reduciría la necesidad de emplear fertilizantes nitrogenados. Debido al elevado gasto energético que supone para la célula el proceso de fijación de nitrógeno, hay también un riguroso sistema de control de la síntesis del complejo de la nitrogenasa y de su actividad, lo que implica, a su vez, que se precisa de un número importante de genes, denominados *nif*. Uno de los organismos más estudiado en este sentido es *Klebsiella pneumoniae*, donde los genes *nif* se encuentran agrupados en una región de 24 kb,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

denominada "regulón *nif*" (Fig. 6.8), que consiste en un sistema complejo de operones. En dicho regulón, que contiene 20 genes dispuestos en varias unidades transcripcionales, no sólo se encuentran los genes estructurales que codifican para la reductasa (*nifH*) y para los dos tipos de subunidades de la dinitrogenasa (*nifD*, para la subunidad α y *nifK* para la β), sino que también contiene los genes *nifF* y *nifJ* que codifican, respectivamente, la flavodoxina y la oxidorreductasa que le transfiere los electrones desde el piruvato. También se encuentran diversos genes relacionados con la síntesis y procesamiento del CoFeMo (*nif*N, *V*, *Z*, *W*, *E*, *X*, *Y*, *B* y *Q*), así como reguladores positivos y negativos del proceso, como los genes *nifA* y *nifL*. La nitrogenasa es una proteína altamente conservada y genes similares a los *nifHDK* de *Klebsiella* están presentes en todos los organismos fijadores de nitrógeno (con la excepción del caso particular de *S. thermoautotrophicus*), lo que sugiere que los requerimientos genéticos para la nitrogenasa son bastante específicos. Las nitrogenasas alternativas están codificadas por genes *vnfHDK*, para el sistema con vanadio, y *anfHDK*, para el que sólo contiene hierro, que presentan una homología significativa de secuencias con *nifHDK*.

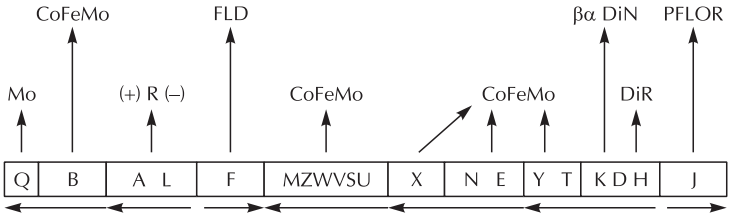


Figura 6.8. Región de los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*. Q (procesado del Mo); B (síntesis del CoFeMo); A (regulador positivo); L (regulador negativo); F (flavodoxina, FLD); ZW (síntesis de CoFeMo); V (síntesis de homocitrato); SU (síntesis de centros metálicos); NE (síntesis de CoFeMo); XY (inserción del CoFeMo); K (subunidad β de la dinitrogenasa, DiN); D (subunidad α de la DiN); H (dinitrogenasa reductasa, DiR); J (piruvato:flavodoxina óxido-reductasa, PFLOR). Las flechas representan las unidades transcripcionales y el sentido de la transcripción.

La síntesis del complejo nitrogenasa se bloquea por la presencia de O_2 o de nitrógeno fijado (NH_4^+, NO_3^- y algunos aminoácidos). La mayor parte de los procesos de regulación tienen lugar a nivel transcripcional, siendo las proteínas NifA, NifL y NtrC las que fundamentalmente están implicadas en ellos. NifA es un regulador positivo que activa la transcripción de los genes estructurales *nif*, mientras que NifL, que contiene FAD, es un regulador negativo que interrumpe la transcripción de los genes *nif* cuando detecta la presencia de O_2 en cantidades suficientes. La flavina es crítica en este proceso de detección. La represión por amoniaco está mediada por la proteína NtrC, cuya actividad está regulada por el estado de nitrógeno de la célula. Cuando hay limitación de amoniaco, NtrC está fosforilada y activa y promueve la transcripción de *nifA*, lo que da lugar a que aumente la concentración de NifA y, consecuentemente, se favorezca la transcripción del resto de genes *nif*. Un exceso de NH_4^+ tiene los efectos contrarios y la síntesis se reprime rápidamente, con lo que se evita el gasto inútil de ATP que supondría la reducción del N_2 para producir más amoniaco. En algunas bacterias fijadoras de nitrógeno, sobre todo en las fototróficas,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

la actividad nitrogenasa también está regulada por el amonio, que actúa como un "interruptor" provocando una modificación covalente reversible de la dinitrogenasa reductasa, de forma que el exceso de amoniaco la inactiva, pero cuando éste desaparece la reductasa vuelve a la forma activa y se restaura la fijación de nitrógeno. Éste es un mecanismo rápido y reversible para controlar la cantidad de ATP que se consume por la nitrogenasa.

Fijación simbiótica de N_2

La fijación simbiótica de nitrógeno es un proceso de enorme importancia en la agricultura y constituye una de las interacciones más interesantes y destacadas entre las bacterias y las plantas. Generalmente se produce entre bacterias Gram negativas fijadoras de nitrógeno y leguminosas (Tabla 6.2), aunque se han descrito otras asociaciones, como la que tiene lugar entre la cianobacteria *Anabaena azollae* y el helecho acuático *Azolla*, o entre el actinomiceto *Frankia* y ciertos árboles como el Aliso común (*Alnus glutinosa*).

Tabla 6.2. Asociaciones *Rhizobio*-planta.

Género	Especie de Rhizobio	Planta huésped
Rhizobium	*leguminosarum* bv. *viciae*	Guisante (*Pisum*), arveja (*Vicia*) y otras leguminosas
	leguminosarum bv. *trifolii*	Trébol (*Trifolium*)
	leguminosarum bv. *phaseoli*	Haba (*Phaseolus*)
	galegae	(*Galega*)
	tropici	Haba (*Phaseolus*), alfalfa (*Medicago*) y otras leguminosas
	etli	Haba (*Phaseolus*), alfalfa (*Medicago*)
Sinorhizobium	*meliloti*	Alfalfa (*Medicago, Melilotus*)
	fredii	Soja (*Glycine*) y otras leguminosas
	sp. NGR234	Leguminosas tropicales (*Vigna, Leucaena, Macroptilium*); *Parasponia* (ulmiácea, no leguminosa)
Mesorhizobium	*loti*	Loto (*Lotus*)
	ciceri	(*Cicer arietinum*)
	huakuii	Astrágalo (*Astragalus sinicus*)
Allorhizobium	*undicola*	*Neptunia natans* (acuática; Senegal)
Bradyrhizobium	*japonicum*	Soja (*Glycine*) y otras leguminosas
	elkanii	Soja (*Glycine*) y otras leguminosas
	spp.	Leguminosas tropicales (*Arachis, Leucaena, Stylosanthes*)
Azorhizobium	*caulinodans* spp.	*Sesbania rostrata* [nodula en tallo y raíz]
	spp.	*Parasponia* (ulmiácea, no leguminosa)

La importancia agrícola de la fijación de nitrógeno por la simbiosis leguminosa-bacteria radica en el aumento significativo que se produce en la cantidad de nitrógeno combinado en el suelo (más de 120×10^6 toneladas de nitrógeno al año). Esto permite que las leguminosas capaces de ser infectadas (Tabla 6.2) ofrezcan una ventaja selectiva frente a otras plantas y les permite, además, desarrollarse en terrenos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

deficientes en nitrógeno sin necesidad de añadir ningún tipo de abono nitrogenado. La relación simbiótica resuelve a la vez las necesidades energéticas de la reacción (proporcionada por la planta en forma de glúcidos e intermediarios del ciclo del ácido cítrico) y la labilidad de las enzimas frente al O_2, ya que la planta infectada sintetiza una hemoproteína fijadora de oxígeno, denominada leghemoglobina, que proporciona el ambiente reductor necesario para el proceso. En el interior del nódulo la relación entre el O_2 ligado a la hemoglobina y el O_2 libre es del orden de 10.000:1. Además, esta proteína suministra eficazmente el oxígeno necesario al sistema de transporte de electrones de la bacteria.

La infección se produce, generalmente, a través de los pelos radicales de la leguminosa y provoca la formación de nódulos en sus raíces, aunque en algunas especies tropicales (*Sesbania rostrata*, por ejemplo) la nodulación se produce en el tallo. Existe un marcado grado de especificidad entre las especies de leguminosas y las cepas bacterianas (Tabla 6.2). Cada cepa puede, por lo general, infectar a ciertas especies de leguminosas, pero no a otras, formando nódulos de color rojizo, debido a la presencia de la leghemoglobina, capaces de fijar N_2. En todos los casos, la secuencia de etapas que provocan la formación de nódulos es la de la figura 6.9:

1) reconocimiento mutuo, mediado por estímulos químicos en la rizosfera, entre la planta y la bacteria, que se adhiere a los pelos radicales;
2) síntesis y excreción de factores Nod por la bacteria, que provoca el rizado del pelo radical;
3) invasión del pelo radical por la bacteria y formación de un "tubo de infección", dirigido por ésta, en donde se multiplica;
4) desplazamiento de la bacteria hacia la raíz principal a través del tubo o filamento de infección, que provoca la estimulación de la división de las células radicales cercanas;
5) transformación de las células bacterianas en el interior de las células vegetales, convirtiéndose en bacteroides que ya son capaces de fijar nitrógeno;
6) división continua de las células vegetales y de los bacteroides hasta formar el nódulo maduro.

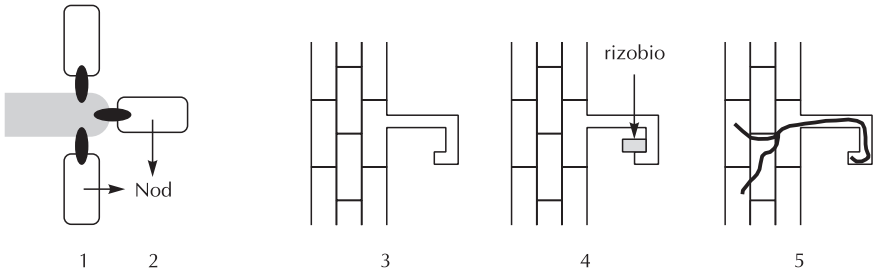


Figura 6.9. Fases de la formación de nódulos radiculares en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. La fase 1 de reconocimiento mutuo está facilitado por ricadhesinas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las sustancias producidas por las leguminosas son, generalmente, flavonoides (Fig. 6.10) que regulan la expresión de los genes *nod*, que dirigen las etapas de la nodulación, en los rizobios que se encuentran en el suelo cerca de la planta. La naturaleza química de estos flavonoides es, en gran parte, responsable de la especificidad observada entre la planta y la bacteria en el proceso simbiótico. Algunas plantas segregan diferentes flavonoides, lo que les permite interaccionar con diferentes estirpes de bacterias simbiontes.

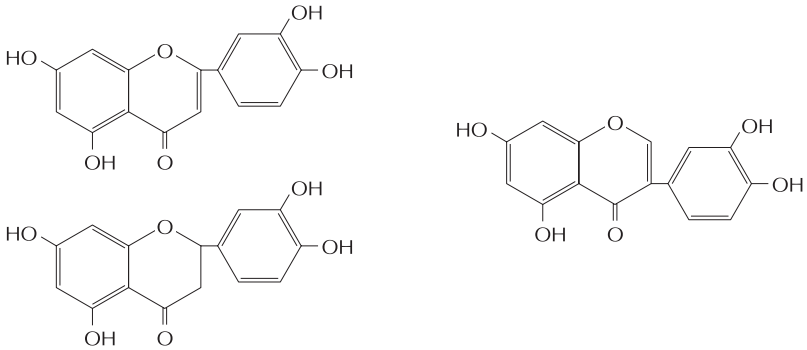


Figura 6.10. Flavonoides producidos por leguminosas. Arriba, izquierda, 5,7,3′,4′-tetrahidroxiflavona; abajo, izquierda, 5,7,3′,4′-tetrahidroxiflavanona (inductores); derecha, 5,7,4′-trihidroxiisoflavona (inhibidor).

Muchos de los genes *nod* de diferentes especies de *Rhizobium* están muy bien conservados y, en general, se transmiten mediante megaplásmidos, denominados *Sym*, donde además se encuentran otros genes de especificidad, denominados *nol* y *noe*, que restringen una cepa de *Rhizobium* a una determinada planta hospedadora, así como los genes *nif*, encargados de la fijación de nitrógeno en los nódulos (Fig. 6.11).

Figura 6.11. Genes *nodOTNMLEFABCIJX*, y *nolR* (blanco) de *R. leguminosarum*. *nodD* es un gen regulador.

La expresión de los genes *nod* depende de la presencia de flavonoides y está mediada por un factor endógeno que activa la transcripción, el producto del gen *nodD*. Algunas bacterias producen una única proteína NodD mientras que otras sintetizan varias formas diferentes de la proteína, lo que les permite respuestas reguladoras diversas, como es la respuesta a otro tipo de activadores (betaínas). Los productos de los genes *nod*, llamados "factores Nod", son oligosacáridos y son los responsables del rizado de los pelos radicales de la leguminosa y de la inducción de la división de las células corticales, lo que determina la formación del nódulo. Químicamente, los factores Nod consisten en un esqueleto de *N*-acetilglucosamina al que

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

se unen diversos radicales, que determinan la especificidad del hospedador (Fig. 6.12 y Tabla 6.3).

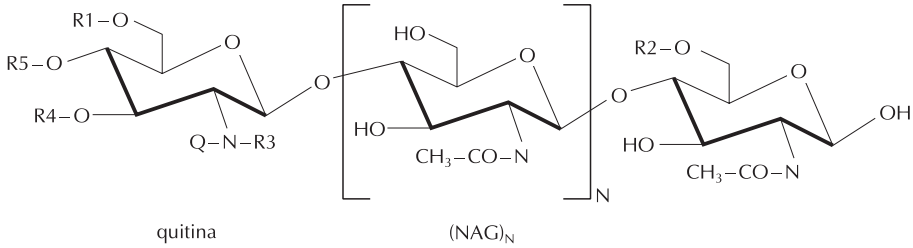


Figura 6.12. Factores Nod. La N-acetilglucosamina (NAG) se repite N veces.

Tabla 6.3. Estructura de lipo-quito-oligosacáridos producidos por diferentes estirpes de *Rhizobium*.

Estirpe	*N*	Q	R1	R2	R3	R4, R5
R. leguminosarum bv. *viciae* RBL5560	2, 3	$C_{18\Delta 2,4,6,11}$ $C_{18\Delta 11}$	CH_3CO	H	H	H
S. meliloti AK41	1, 2, 3	$C_{16\Delta 2,9}$ $C_{16\Delta 2,4,9}$	H CH_3CO	SO_3H	H	H
S. meliloti 2011	2, 3	$C_{16\Delta 9}$ $C_{16\Delta 2,9}$ $C_{16\Delta 2,4,9}$ (Ω)-OH C_{18-26}	H CH_3CO	SO_3H	H	H
R. tropici CFN299	3	$C_{18\Delta 11}$	H	SO_3H	CH_3	H
B. japonicum USDA110	3	$C_{18\Delta 9}$	H	2-*O*-Me-Fuc	H	H
B. japonicum USDA135	3	$C_{18\Delta 9}$ C_{16}	H CH_3CO	2-*O*-Me-Fuc	H	H
B. japonicum USDA61	2, 3	$C_{18\Delta 9}$	H CH_3CO	Fuc 2-*O*-Me-Fuc	H CH_3	H
S. fredii USDA257	1, 2, 3	$C_{18\Delta 11}$	H	2-*O*-Me-Fuc	H	H
Rhizobium sp. NGR234	3	$C_{18\Delta 11}$ C_{16}	H	2-*O*-Me,4-*O*-SO_3H-Fuc 2-*O*-Me,3-*O*-CO-CH_3-Fuc		H NH_2CO
A. caulinodans ORS571	2, 3	$C_{18\Delta 11}$ C_{18}	H NH_2CO	H D-arabinosil	CH_3	H

Los genes *nodABC* participan en la producción de los esqueletos de los oligosacáridos en la mayoría de los casos. Nod C y Nod B funcionan, respectivamente, como una quitina sintasa y una quitina desacetilasa, dando lugar a un intermedio clave en la síntesis de los factores Nod, denominado metabolito Nod BC. La proteína Nod A se encuentra implicada en la adición de la fracción ácido graso (Q) a dicha molécula. Se conoce la función de otras proteínas Nod, como por ejemplo Nod L, que es una acetil transferasa, o Nod S, una metil transferasa, responsables de la presencia de grupos *O*-acetilo y *N*-metilo, respectivamente, en el extremo no reductor del oligosacárido (Fig. 6.13). Nod I y Nod J son proteínas de membrana que transportan los factores Nod al exterior de las células bacterianas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

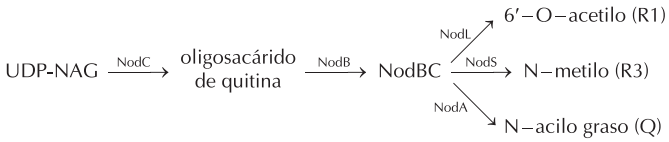


Figura 6.13. Biosíntesis de factores Nod. NodC (quitina sintasa); nodB (quitina desacetilasa); NodL (acetil transferasa); NodS (metil transferasa); NodA (adición de Q). NodBC es el núcleo de la figura 6.12 (sin restos −O−R).

En *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, cuyo genoma se ha secuenciado recientemente, la adherencia a la planta está mediada por una proteína, la ricadhesina, que está localizada en la superficie de la bacteria. Esta proteína capta el calcio y puede actuar uniéndose a los complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Las lectinas, proteínas que contienen carbohidratos, también participan en el proceso de adherencia.

La penetración en el pelo radical se produce por su extremo y se provoca, además del rizado de éste, la formación de un tubo de celulosa, el tubo de infección, por el que avanzan las bacterias hasta las células adyacentes, donde los factores Nod estimulan la división celular de las mismas. El proceso comienza por la desdiferenciación de ciertas células del córtex y la formación de un meristemo, cuya actividad da lugar a la formación del nódulo. Allí las bacterias se multiplican y transforman en bacteroides, con formas hinchadas y ramificadas, que quedan rodeadas, individualmente o en pequeños grupos, por porciones de la membrana vegetal, formando los simbiosomas. De esta forma, el microorganismo queda en una forma intracelular, pero extracitoplásmica.

En respuesta a la diferenciación bacteriana, las células de la planta expresan unas proteínas, denominadas nodulinas tardías, entre las que se encuentran la leghemoglobina y diversas proteínas de la asimilación del nitrógeno (Fig. 6.14).

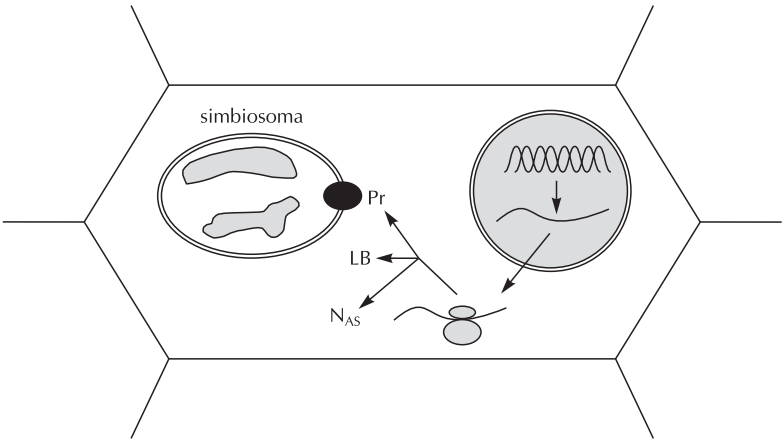


Figura 6.14. Expresión de nodulinas en células nodulares. Pr (canales iónicos y transportadores); LB (leghemoglobina); N_{AS} (enzimas asimiladoras de NH_4^+).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. A través de la membrana de los simbiosomas, la planta les proporciona, fundamentalmente, malato, succinato y fumarato, intermediarios de cuatro carbonos del ciclo del ácido cítrico, que se emplean como donadores de electrones para la producción de ATP y para la reducción del N_2, una vez transformados en piruvato. El NH_3 formado (en forma de NH_4^+) es exportado al citoplasma de la célula vegetal para su asimilación, aunque los bacteroides pueden asimilar una pequeña parte del amoniaco formado (Fig. 6.15).

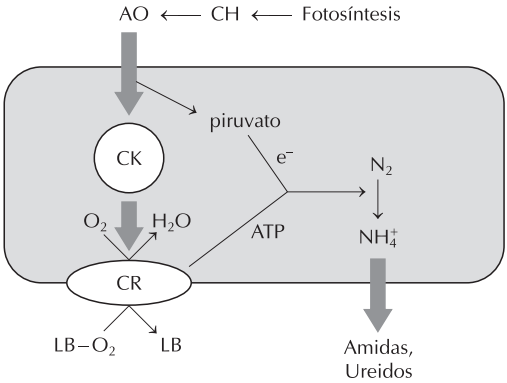


Figura 6.15. Intercambio de nutrientes planta-bacteroide. CK (ciclo de Krebs); CR (cadena respiratoria); LB (leghemoglobina); CH (azúcares); AO (ácidos orgánicos).

Asimilación de nitrato

La capacidad de reducir nitrato a amoniaco, para su incorporación al material celular, es común a la mayor parte de las plantas, los hongos, las algas y las bacterias. El proceso, que comprende la reducción de nitrato a nitrito y la de éste a amoniaco, se denomina asimilación de nitrato y produce la transformación de más de 10^{10} toneladas de nitrógeno inorgánico al año. La importancia agrícola del nitrato radica en que constituye la mayor fuente de nitrógeno para las plantas, y para su absorción y asimilación éstas emplean una cantidad apreciable de sus reservas energéticas y de compuestos carbonados. En estos organismos, el nitrato actúa a la vez como nutriente y como señal que provoca cambios significativos en su metabolismo y crecimiento. La asimilación del nitrato en las plantas y en algunas bacterias está íntimamente relacionada con los procesos fotosintéticos según ha demostrado el grupo del profesor M. Losada (1981).

El proceso de reducción asimiladora del nitrato, que implica la transferencia de ocho electrones al N, transcurre en dos pasos. En el primero, catalizado por la nitrato reductasa (NR) asimiladora, el nitrato (NO_3^-, con el N en estado de oxidación +5) se reduce a nitrito (NO_2^-, +3) con dos electrones aportados por el NADH o el NADPH, en el caso de los organismos eucariotas y de muchos procariotas, o por la ferredoxina (flavodoxina), en el caso de las cianobacterias y otros microorganismos. A continuación, el

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

NO_2^- se reduce hasta amonio (NH_4^+, –3) por la transferencia de seis electrones catalizada por la nitrito reductasa (NiR). El donador de electrones para el proceso puede ser la ferredoxina, en el caso de las plantas y diversos microorganismos, o el NAD(P)H, en otras bacterias.

La nitrato reductasa asimiladora de eucariotas es una molibdoproteína homodimérica que se encuentra en el citosol y que, además, contiene hierro hemínico (citocromo b_{557}) y FAD. El Mo se encuentra unido a un cofactor que contiene un anillo de pteridina (molibdopterina; Fig. 6.16) formando lo que se denomina cofactor de molibdeno (CoMo). Este cofactor es muy diferente del CoFeMo de la nitrogenasa, pero muy similar a los que se encuentran en todas las demás molibdoenzimas conocidas.

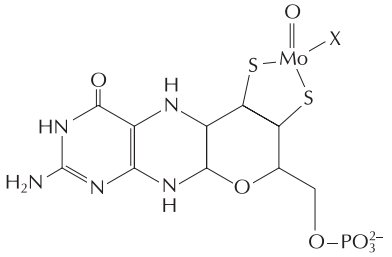


Figura 6.16. Cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa.

En cada monómero (100-120 kDa) se pueden distinguir tres dominios estructurales que están muy conservados, y que contienen el cofactor de molibdeno (extremo amino terminal), el grupo hemo y el FAD (extremo carboxílico), respectivamente (Figura 6.17). Estas tres regiones funcionales están conectadas por dos regiones bisagra, que contienen un sitio regulador al que se unen el fosfato y proteínas 14-3-3, que modulan la actividad nitrato reductasa.

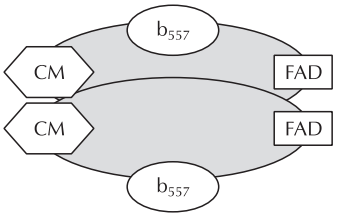


Figura 6.17. Estructura de la nitrato reductasa de eucariotas. CM (cofactor de molibdeno); b_{557} (citocromo b_{557}).

El NAD(P)H se une en el dominio del FAD, al que transfiere los electrones. La flavina los cede al hierro hemínico del citocromo b_{557} y éste al CoMo que, finalmente, los transfiere al NO_3^- (Fig. 6.18).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

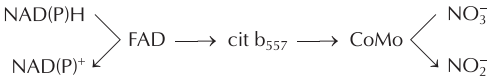


Figura 6.18. Transferencia de electrones en la nitrato reductasa de eucariotas. CoMo (cofactor de molibdeno).

En la mayoría de las plantas, la síntesis de la NR se induce por el sustrato, aunque se han descrito algunos casos de formas constitutivas. En las hojas se requiere, además, la existencia de cloroplastos funcionales, lo que se relaciona con la posible acumulación de NO_2^-, que es tóxico. Además de a esta señal primaria, la reducción de nitrato está ligada a otras como a la fotosíntesis, al metabolismo del carbono y a los ciclos circadianos diurnos. Así, para que la inducción de los mRNA de la NR sea máxima se requiere la presencia de luz o de una fuente reducida de carbono, como la sacarosa. La regulación por los ciclos diurnos está relacionada con la concentración de glutamina, de forma que al aumentar la concentración de ésta en el transcurso del día, disminuye la cantidad de mRNA de NR. Por otra parte, la nitrato reductasa de plantas se inactiva por fosforilación reversible que tiene lugar en la oscuridad.

Como paso previo a su reducción, el nitrato debe transportarse al citoplasma. En eucariotas se han descrito diversos sistemas de transporte de alta y baja afinidad, específicos para el nitrato, y que muestran distinta regulación y especificidad en función de las condiciones nutricionales y ambientales. Esta multiplicidad de transportadores le permite a la célula disponer del nitrato, necesario para su crecimiento, en condiciones metabólicas muy diferentes y a concentraciones externas de NO_3^- que pueden oscilar entre 5 µM y 50 mM. Este transporte de nitrato se realiza acoplado al transporte, en sentido contrario, de H^+ por una ATPasa que mantiene el gradiente electroquímico a través de la membrana.

En organismos procariotas el proceso de reducción de nitrato a nitrito es similar, aunque con notables diferencias desde el punto de vista bioquímico. En primer lugar, y como se verá más adelante, la reducción de nitrato en bacterias no sólo está ligada a procesos de tipo asimilador, sino que puede llevarse a cabo para obtener energía, empleando el NO_3^- como aceptor terminal de electrones en procesos anaeróbicos (respiración) y, también, para disipar el exceso de poder reductor en ciertas condiciones metabólicas (desasimilación). Esta complejidad de funciones lleva a la existencia de tres tipos diferentes de NR, con diferente localización, estructura, regulación, etc. No obstante, y como ocurre en el caso de los organismos eucariotas, la reducción siempre está ligada al átomo de Mo. Las nitrato reductasas de los microorganismos no poseen el mismo cofactor de Mo que se ha visto en las células eucariotas, sino que poseen un cofactor de *bis*-molibdopterina y guanina (*bis*MGD). Las diferentes NR pueden estar simultáneamente presentes en la misma bacteria, donde pueden desempeñar las diferentes funciones según sean las condiciones metabólicas.

La nitrato reductasa asimiladora (Nas) de organismos procariotas es citosólica, aunque en cianobacterias se encuentra asociada a las membranas fotosintéticas. La enzima se induce por nitrato y se reprime por amonio o por una relación C/N baja. La NR que emplea NADH como donador de electrones para la reducción es

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

un heterodímero constituido por una subunidad catalítica (95 kDa, producto del gen *nasA*), que presenta un centro de 4Fe–4S, en el extremo N-terminal, y el cofactor *bis*MGD, y una subunidad diaforasa (45 kDa, codificada por *nasC*), con FAD. Por su parte, la nitrato reductasa que es dependiente de ferredoxina, presente en cianobacterias, es un monómero (75-85 kDa, *narB*) que posee el cofactor *bis*MGD y el centro sulfoférrico (Fig. 6.19). En *Azotobacter vinelandii* se ha descrito una proteína similar, aunque de mayor tamaño (105 kDa), que emplea flavodoxina como donador de los electrones.

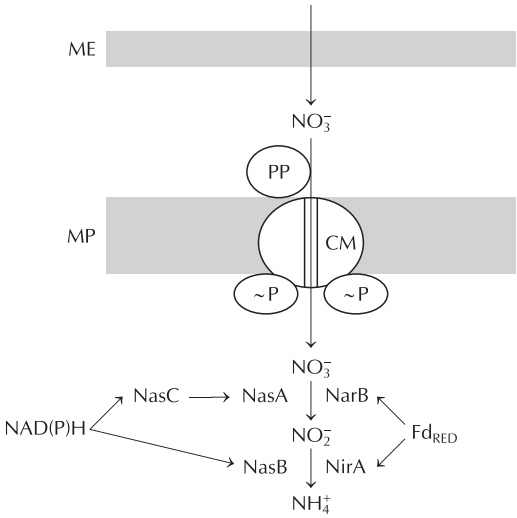


Figura 6.19. Sistemas de asimilación de nitrato en bacterias. PP (proteína periplásmica: NrtA en cianobacterias y NasF en bacterias); CM (canal de membrana: NrtB en cianobacterias y NasE en bacterias); ~P (ATPasa: NrtC/D en cianobacterias y NasD en bacterias); NarB (nitrato reductasa de cianobacterias (4Fe4S-bisMGD); NirA (nitrito reductasa de cianobacterias (FeS-sirohemo); NasC (diaforasa de bacterias (FAD); NasA (nitrato reductasa de bacterias (4Fe4S-bisMGD); NasB (nitrito reductasa de bacterias (FAD-FeS-sirohemo); MP (membrana plasmática); ME (membrana externa).

En general, el sistema de transporte de nitrato en los microorganismos consiste en un transportador multicomponente de tipo ABC ("ATP-binding cassette") que requiere una proteína periplásmica de unión (Fig. 6.19), aunque en algunos organismos, como *Bacillus subtilis*, el transportador de nitrato asociado al sistema regulador es del tipo MFS ("major facilitator superfamily") que depende del gradiente electroquímico de protones. Los genes que codifican estos sistemas de transporte suelen estar agrupados, junto con los genes estructurales del sistema de asimilación reductiva del nitrato, así como con diversos genes reguladores. Su expresión suele estar sometida a un control doble, positivo por parte del nitrato o del nitrito y negativo por parte del amonio, aunque los sistemas de regulación difieren según el organismo.

La reducción del NO_2^- hasta NH_4^+ tiene lugar en un único paso que implica la transferencia de seis electrones, para reducir el N desde el estado de oxidación +3 hasta –3, que está catalizada por la nitrito reductasa.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$NO_2^- + 6\ e^- + 8\ H^+ \longrightarrow NH_4^+ + 2\ H_2O$$

La NiR también es diferente para los organismos eucariotas y procariotas. En los primeros, la enzima está localizada en los cloroplastos y es un monómero de 60-70 kDa que posee dos dominios funcionales, uno en el extremo N-terminal que posee el sitio de unión de la ferredoxina, mientras que en el dominio del extremo C-terminal se encuentra el sitio de unión del nitrito, además de dos centros rédox: una agrupación 4Fe–4S y un grupo sirohemo, una ferroporfirina parcialmente reducida (Fig. 6.20). Los dos grupos prostéticos se encuentran muy próximos y ligados por un puente de S en el que se encuentran implicadas cuatro cisteínas de la enzima.

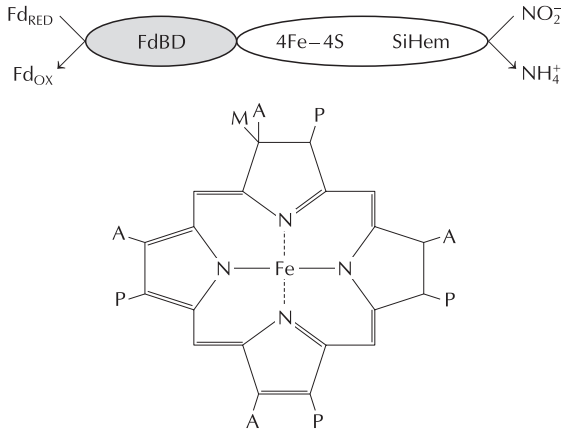


Figura 6.20. Arriba: Nitrito reductasa de plantas. FdBD (dominio de unión a ferredoxina); SiHem (sirohemo); Fd (ferredoxina). Abajo: Estructura del sirohemo. A (acetilo); M (metilo); P (propionato).

La fuente de electrones para este proceso, la ferredoxina reducida, se obtiene en los cloroplastos a partir del flujo fotosintético no cíclico. En los tejidos no fotosintéticos, como las raíces, los electrones para reducir a la ferredoxina provienen del NADPH obtenido en el ciclo de las pentosas fosfato, mediante una reacción catalizada por la ferredoxina-$NADP^+$ reductasa.

En general, y debido a la toxicidad del nitrito, la NiR se regula, a nivel transcripcional, de forma coordinada con la NR, respondiendo su síntesis a la luz y a la concentración de NO_3^- (o NO_2^-).

En el caso de las bacterias, y como ocurre con el nitrato, el nitrito puede participar en rutas metabólicas diferentes, pudiendo reducirse a amonio (asimilación o destoxificación) o a óxido nítrico (respiración). También como en el caso del nitrato, cada uno de estos procesos está catalizado por un tipo distinto de nitrito reductasa.

La reducción asimiladora del nitrito en las bacterias tiene lugar en el citoplasma y puede emplear NADH o ferredoxina como donador de electrones, siendo diferentes las NiR que utilizan cada uno de ellos (estando codificadas por los genes *nasB* y *nirA*, respectivamente), aunque todas poseen sirohemo y centros sulfoférricos (Fig. 6.19). La

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

NiR dependiente del NADH contiene además un FAD. Es de resaltar el hecho de que la nitrito reductasa de las cianobacterias, que utiliza ferredoxina, es muy similar a la de algas y a la de plantas, que también son dependientes de ferredoxina, conservándose en todas ellas los restos de cisteína implicados en la unión del sirohemo y del centro sulfoférrico. En *E. coli* existen dos tipos más de nitrito reductasa, una de membrana conectada a la generación de Δp y otra, citosólica, cuyo papel es disipador del exceso de poder reductor en anaerobiosis y que se parece a la nitrito reductasa asimiladora descrita anteriormente.

Asimilación de amonio

Independientemente de la fuente de nitrógeno oxidado utilizada (N_2, NO_3^- o NO_2^-), ésta es convertida finalmente en amonio, que posteriormente se combina con un compuesto carbonado, el 2-oxoglutarato, para producir los aminoácidos glutamina y glutamato. Este proceso se realiza, casi exclusivamente, por la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), conocida como ruta GS/GOGAT (Fig. 6.21). La importancia de esta ruta se pone de manifiesto si se considera que la mayoría de aminoácidos adquieren su grupo amino por transaminación con el glutamato, mientras que el grupo amida de la glutamina es la fuente de grupos amino para una amplia gama de procesos biosintéticos. Además, en algunos microorganismos el glutamato juega un papel importante para mantener el equilibrio osmótico entre el citosol y el medio exterior. Por otro lado, en organismos superiores uno o ambos aminoácidos suelen encontrarse a concentraciones bastante más elevadas que el resto de aminoácidos.

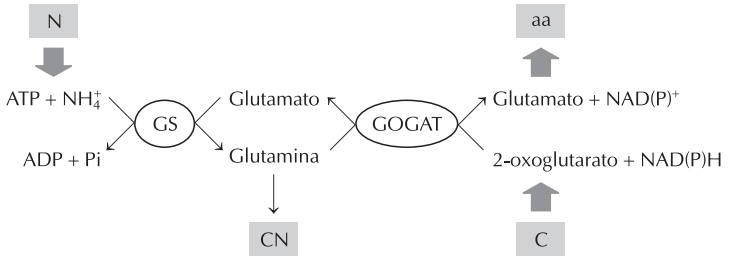


Figura 6.21. Asimilación de amonio. GS (glutamina sintetasa); GOGAT (glutamato sintasa); CN (compuestos nitrogenados); C (fuentes de carbono); N (fuentes de nitrógeno).

La primera enzima de la ruta de asimilación de amonio, la GS, es el punto clave de control del flujo de nitrógeno en la mayoría de los organismos, procariotas y eucariotas. La GS cataliza la incorporación del amonio al grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato para producir glutamina. Esta reacción transcurre con gasto de ATP, requiere cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y en ella se forma γ-glutamilfosfato, intermedio que permanece unido al centro activo:

$$NH_4^+ + Glu + ATP \longrightarrow Gln + ADP + P_i + H^+$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La enzima de bacterias (denominada GSI) suele tener estructura homododecamérica (con subunidades de ~50 kDa), formada por la superposición de dos hexámeros que muestran 12 sitios activos situados entre los dominios C- y N-terminal de subunidades adyacentes. Por el contrario, la GS de eucariotas (GSII) tiene estructura octamérica, con dos tetrámeros superpuestos y con 8 sitios activos. En cianobacterias existen dos tipos de GS, una dodecamérica similar a la GSI de bacterias y otra, GSIII, con seis subunidades iguales (80 kDa), que tiene un papel secundario.

Por otro lado, en plantas existen diversas formas isoméricas de la GS localizadas en el citosol (GS1) y en el cloroplasto (GS2), productos de diferentes genes nucleares homólogos. La enzima cloroplástica, codificada por un único gen, es la predominante en las hojas, en las células del mesófilo fotosintético, donde participan en la asimilación de amonio liberado en la reducción de nitrato y en la reasimilación del amonio fotorrespiratorio. Las isoformas de GS1, codificadas por varios genes (2 a 4), están formadas por homo- o heterooctámeros, en función de las diferentes fases del desarrollo de la planta y en respuesta a diferentes estímulos externos. Estas GS1 abundan en la raíz y en otros tejidos no fotosintéticos, jugando un papel importante en los procesos primarios de asimilación en las raíces, así como en los de fijación de nitrógeno en los nódulos.

Dado su papel central en el metabolismo como punto de entrada del nitrógeno, la GS está sometida a diversos mecanismos de regulación, tanto a nivel de síntesis como de actividad. En bacterias la GS está sujeta a un control transcripcional, de forma que existe un promotor constitutivo y otro regulado por el sistema NTR. Además, se ha descrito un doble sistema de regulación de la actividad GSI mediante inhibición alostérica acumulativa (por alanina, glicina, y otros productos de su metabolismo) y por modificación covalente. Esta última se lleva a cabo mediante un mecanismo complejo que provoca la inhibición de la GS al transferirse un grupo AMP a un resto de tirosina (Y) situada cerca de cada uno de los 12 sitios activos. Este proceso (adenililación) tiene lugar cuando las necesidades celulares de N están cubiertas; el proceso inverso (desadenililación), sucede cuando existe un déficit de N en relación con el C y provoca la reactivación de la enzima. Tanto el proceso de adenililación como el de desadenililación están catalizadas por una enzima adenililante/desadenililante (AT/ED), cuya actividad está modulada por la unión de una proteína reguladora (PII):

C/N alto: UMP transferasa activa:

$$\text{PII} \longrightarrow \text{PII}-(\text{Y}-\text{UMP})_3 \longrightarrow (+)\ \text{ED} \longrightarrow \text{GS(Y-OH)}$$

C/N bajo: UMP transferasa inactiva:

$$\text{PII}-(\text{Y}-\text{OH})_3 \longrightarrow (+)\ \text{AT} \longrightarrow \text{GS-(Y-AMP)}_{12}$$

La glutamina y el P_i inhiben a la uridililtransferasa y provocan la adenililación (inactivación) de la GS. Por contra, el 2-oxoglutarato y el ATP inducen la desadenililación (activación) de la GS, ya que provocan un efecto contrario sobre la uridililtransferasa y facilitan la unión del UMP a la proteína PII.

En cianobacterias la regulación de la síntesis de la GSI también tiene lugar a nivel transcripcional, mediante el activador NtcA. Por su parte, la actividad de la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

enzima se regula por la acción de dos proteínas de baja masa molecular, IF7 e IF17 (de 7 y 17 kDa, respectivamente), que se unen a ella formando un complejo inactivo en respuesta a la presencia de amonio en cantidades suficientes. La eliminación de estos factores inactivantes por una proteasa específica provoca la reactivación de la GS.

En plantas la expresión de las dos formas de GS presenta patrones específicos de expresión dependientes del tipo de tejido que se considere, con genes diferentes que codifican las isoformas citosólica (GS1) y cloroplástica (GS2). La regulación de estos genes está ligada a la relación C/N existente en los tejidos, siendo la disponibilidad de 2-oxoglutarato y de glutamina los factores que actúan de forma positiva o negativa, respectivamente. Este balance sufre cambios importantes como consecuencia de la actividad fotosintética, de la disponibilidad de nutrientes o de la movilización de reservas de unos órganos a otros en distintos contextos fisiológicos como la germinación o en condiciones de estrés. La cantidad relativa de GS1 y GS2 no depende sólo del tipo de tejido sino que también varía con la etapa de desarrollo y con el estado fisiológico. En la regulación de la actividad GS se encuentra implicada una proteína similar a la PII que actúa en la regulación bacteriana.

Además de su importancia en la asimilación de amonio por plantas y bacterias, la GS juega un importante papel en el metabolismo de los aminoácidos en los mamíferos, al convertir el amonio libre, que es tóxico, en glutamina para su transporte en la sangre.

La glutamato sintasa (GOGAT; glutamina-oxoglutarato amidotransferasa) es la enzima encargada en microorganismos y plantas de la producción de glutamato mediante la transferencia del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato (Fig. 6.21). En esta reacción se produce además la reducción del oxoácido, para lo cual se emplean electrones proporcionados por el NAD(P)H o la ferredoxina.

$$\text{2-oxoglutarato} + \text{Gln} + 2\ e^- \longrightarrow 2\ \text{Glu}$$

En función del donador de electrones que emplee, existen dos clases de glutamato sintasas, la NAD(P)H-GOGAT y la Fd-GOGAT. En la mayoría de las bacterias sólo existe la forma dependiente de piridín nucleótidos, mientras que en eucariotas y en cianobacterias se han descrito las dos isoformas.

La GOGAT bacteriana emplea como donador de electrones el NADPH y es un dímero con una subunidad grande (α, ~160 kDa) que contiene FMN y un centro 3Fe–4S, además del sitio activo en su extremo N-terminal, y otra subunidad pequeña (β, ~50 kDa) con FAD y el dominio de unión del NADPH. En cianobacterias, donde además existe la isoforma dependiente de ferredoxina, la enzima también es un dímero con subunidades similares en estructura y grupos prostéticos a las de las otras bacterias, pero emplea el NADH como donador de electrones. En plantas, sin embargo, la NADH-GOGAT está constituida por una única subunidad de ~200 kDa, aunque la comparación de secuencias entre las diferentes NADH-GOGAT indica que la enzima de plantas proviene de la fusión de las dos subunidades de la enzima de cianobacterias, presentando el dominio de unión del NADH en el extremo C-terminal y el sitio activo en el extremo N-terminal.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las Fd-GOGAT de eucariotas y cianobacterias son similares y están formadas por una única subunidad de ~170 kDa, con FMN y un centro 3Fe–4S como grupos prostéticos. Su secuencia de aminoácidos presenta homología con la de la subunidad grande de la NADH-GOGAT. La transferencia de electrones va de la ferredoxina al centro sulfoférrico y de ahí al FMN, que es el que reduce al 2-oxoglutarato.

En las células vegetales, ambas isoformas se encuentran en los cloroplastos, aunque su actividad relativa depende de los tejidos que se consideren. Así, la Fd-GOGAT es la isoforma predominante en las hojas (95-97% de la actividad GOGAT total), mientras que la NADH-GOGAT constituye la isoenzima predominante en tejidos no fotosintéticos como las raíces. La presencia de Fd-GOGAT en las hojas es esencial para la reasimilación del amonio producido en la fotorrespiración.

En circunstancias especiales, como puede ser una concentración de amonio suficientemente alta como para impedir que actúe la ruta GS/GOGAT, la asimilación de amonio puede seguir caminos alternativos como puede ser la incorporación directa del amonio al 2-oxoglutarato, una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima que está presente en todos los organismos y que emplea NAD(P)H como donador de electrones:

$$\text{2-oxoglutarato} + NH_4^+ + NAD(P)H \longrightarrow \text{glutamato} + NAD(P)^+ + H_2O$$

La elevada K_m de la GDH para el amonio (> 10 mM), así como su localización mitocondrial en el caso de los eucariotas, sugieren que esta enzima está más relacionada con el catabolismo y que es la reacción inversa (la desaminación oxidativa del glutamato), también catalizada por la GDH, la que tiene verdadero significado fisiológico.

Amonificación

La mayoría de organismos, procariotas y eucariotas, pueden llevar a cabo el proceso de amonificación, que consiste en la liberación de amonio, o amoniaco, de los compuestos orgánicos nitrogenados tales como aminoácidos y nucleótidos. Este proceso de mineralización del nitrógeno de la materia orgánica, viva o muerta, es fundamental para que se mantenga la productividad de los ecosistemas. La liberación del amoniaco desde los compuestos orgánicos implica la participación de enzimas como la GDH, descrita en el apartado anterior, que en combinación con diferentes aminotransferasas recupera el amonio de los diferentes aminoácidos. Otra fuente importante de amonio la constituye la urea, de la que se puede liberar el amonio por la acción de la ureasa, una enzima que posee dos átomos de Ni en su centro activo y que se encuentra en vacuolas en los organismos eucariotas:

$$NH_2-CO-NH_2 + H_2O \longrightarrow 2\ NH_3 + CO_2$$

En ambientes acuosos ácidos o neutros se encuentra en forma de ion amonio, mientras que en medios alcalinos se forma amoniaco que es volátil y se libera, en parte, a la atmósfera, donde es relativamente inaccesible para los sistemas biológicos. A escala global, sin embargo, el amoniaco sólo constituye el 15% del nitrógeno

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

liberado a la atmósfera, puesto que la mayor parte lo es en forma de N_2 o de N_2O, procedentes de los procesos de desnitrificación. Todas estas formas de nitrógeno se encuentran sometidas a transformaciones químicas y fotoquímicas y, además pueden ser arrastradas a la superficie por la lluvia. Se ha calculado que de esta forma se precipitan entre 38 y 85×10^6 toneladas de amoniaco al año.

En los sedimentos anóxicos, la forma que predomina es la de amoniaco, que en esas condiciones es bastante estable. En los suelos, la mayor parte del amoniaco liberado por descomposición aeróbica se recicla rápidamente por los microorganismos y las plantas.

Nitrificación

La nitrificación consiste en la oxidación del amonio a nitrato que, principalmente, tiene lugar en suelos bien aireados y de pH neutro por la acción de un número muy limitado de bacterias autótrofas, denominadas nitrificantes. Aunque es uno de los principales procesos que tienen lugar en la naturaleza, y en él se obtiene nitrato que es fácilmente asimilable por las plantas, su importancia desde el punto de vista agrícola es muy limitada, debido a su alta solubilidad en agua que provoca el que se lave rápidamente en los suelos que reciben mucha agua de lluvia. Como resultado se produce la contaminación por nitrato y nitrito de las aguas circundantes. Por contra, el NH_4^+ es absorbido rápidamente por las arcillas, que están cargadas negativamente. La adición a los suelos de materia orgánica rica en proteínas, como el estiércol o las aguas residuales, aumenta la tasa de nitrificación. Para inhibir la nitrificación en los suelos agrícolas tratados con abonos nitrogenados (generalmente con iones amonio), y de esta forma aumentar su eficacia, se añaden productos químicos como el 2-cloro-6-tricloromethilpiridina (nitrapirina o N-Serve) que inhibe específicamente el primer paso de la nitrificación.

La oxidación aeróbica completa del amoniaco a nitrato tiene lugar por la acción secuencial de dos grupos de microorganismos ampliamente distribuidos en suelos y aguas. El primero de ellos, que se denomina nitrosoficante (*Nitrosomonas* es el género más representativo), oxida amoniaco a nitrito, mientras que el segundo grupo (*Nitrobacter* es su representante más común) completa la oxidación hasta nitrato. Aunque cada una de las oxidaciones la lleva a cabo una población bacteriana distinta, los dos procesos están muy relacionados y no se produce acumulación de nitrito.

Ambos procesos son exergónicos y estas bacterias, que son quimiolitotrofas, utilizan la energía derivada de la nitrificación para asimilar el CO_2. Los electrones de los compuestos nitrogenados entran en una cadena de transporte de electrones, y el flujo a través de ella establece un potencial de membrana y una fuerza protón motriz suficiente para producir ATP. No obstante, la cantidad de ATP que se puede obtener por cada par de electrones introducido en la cadena transportadora, se encuentra muy limitada por los potenciales de reducción relativamente altos de los pares NO_2^-/NH_4^+ y NO_3^-/NO_2^- (+0,34 V y +0,43 V, respectivamente), lo que conlleva que sólo puedan incorporarse a la cadena en los últimos pasos del proceso global y, por tanto, sólo puede

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

utilizarse un punto de fosforilación. Además, estos potenciales son demasiado positivos para reducir al NAD^+, por lo que es necesario un flujo inverso de electrones para generar el poder reductor, necesario en gran cantidad para la fijación del CO_2. Este flujo se consigue con gasto de parte del ATP derivado de la cadena respiratoria. Por estas razones el crecimiento neto de las bacterias nitrificantes, como el de la mayoría de quimiolitotrofos, es relativamente bajo.

Los seis electrones producidos en la oxidación del amonio hasta nitrito no se transfieren en un único paso, sino en tres etapas de dos electrones cada una (Fig. 6.22).

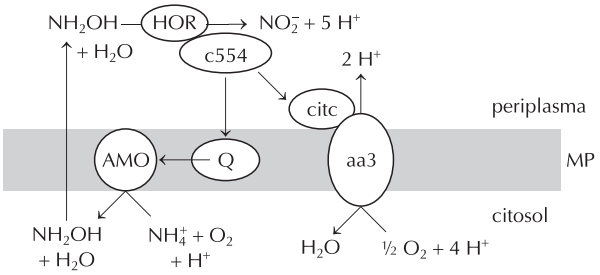


Figura 6.22. Oxidación de NH_4^+ y flujo de electrones en la primera etapa de la nitrificación. AMO (amonio monooxigenasa); HOR (hidroxilamina óxido-reductasa); c554 (citocromo c_{554}); aa3 (citocromo aa_3); Q (quinonas); MP (membrana plasmática).

En la primera de ellas, catalizada por la amonio monooxigenasa, se incorpora uno de los átomos de oxígeno del O_2 atmosférico a la molécula de amonio, formándose hidroxilamina. Los dos pasos siguientes están catalizados por la hidroxilamina óxido-reductasa. En primer lugar, la hidroxilamina se oxida con una molécula de H_2O a nitrosilo (que permanece unido al sitio activo), el cual se oxida finalmente a NO_2^-:

$$NH_3 + \mathbf{O}_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow NH_2\mathbf{O}H + H_2\mathbf{O}$$

$$NH_2OH + H_2O \longrightarrow (NOH) \longrightarrow NO_2^- + 5\ H^+$$

La amonio monooxigenasa es una enzima integral de la membrana plasmática, mientras que la hidroxilamina óxido-reductasa se encuentra en el periplasma.

En la reacción que lleva a cabo la monooxigenasa se requiere el suministro exógeno de dos electrones y dos protones para reducir el otro átomo del O_2 a H_2O. Estos electrones se originan en la oxidación de la NH_2OH por la oxidorreductasa, que los transfiere a un citocromo c_{554} soluble y éste, a su vez, a la ubiquinona (Fig. 6.22). De esta forma, sólo dos de los cuatro electrones producidos en dicha oxidación son transferidos, vía un citocromo *c* de membrana, a la oxidasa terminal, que es un citocromo aa_3. En el proceso global se produce la acidificación del periplasma y la alcalinización del citoplasma, por lo que el paso de protones a favor de gradiente a través de una ATPasa provoca la fosforilación del ADP.

Las bacterias del grupo nitro emplean una nitrito oxidasa para oxidar el nitrito a nitrato. Esta óxido-reductasa es una molibdoproteína localizada en la parte interna de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

la membrana. Al contrario de lo que pudiera pensarse, el nitrito no es oxidado directamente por el O_2, sino por el H_2O, que se utiliza como donador de H_2 para la reducción concomitante del NAD^+. El O_2 sólo sirve como aceptor terminal de los electrones (Fig. 6.23). La reacción global es

$$NO_2^- + \tfrac{1}{2}\, O_2 \longrightarrow NO_3^- \qquad (\Delta G^{o\prime} = -74{,}1 \text{ kJ/mol})$$

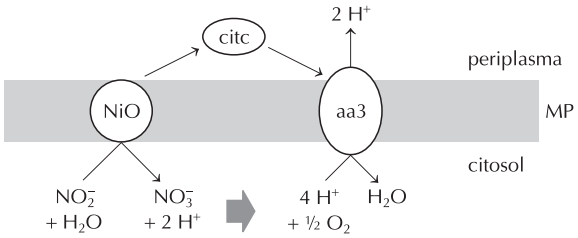


Figura 6.23. Oxidación de nitrito a nitrato y flujo de electrones en las bacterias nítricas. NiO (nitrito oxidasa); aa3 (citocromo *aa*$_3$). MP (membrana plasmática).

Aunque la energía liberada en la oxidación sería suficiente para la fosforilación de dos moléculas de ADP, parece que sólo se sintetiza una molécula de ATP, probablemente debido a la corta cadena de electrones que se establece, debido al elevado potencial del par NO_3^-/NO_2^-. Los electrones son transportados desde el nitrito al oxígeno a través de una cadena que incluye a los citocromos *a, c* y *aa*$_3$ (Fig. 6.23). La generación de la fuerza protón motriz que dirige la síntesis de ATP ocurre por acción de la oxidasa terminal, el citocromo *aa*$_3$. Debido al bajo rendimiento energético de su oxidación, es necesario oxidar hasta cinco moléculas de nitrito para conseguir la reducción de una de NAD^+, mediante el transporte inverso de electrones. El bajo rendimiento energético de este proceso se pone de manifiesto si se considera que es necesario oxidar unos 100 moles de nitrito para fijar un mol de CO_2. En el caso de la oxidación de amoniaco sólo se necesitan 35 moles por mol.

La nitrificación no es un proceso exclusivo de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, ya que hay especies de los géneros *Nitrosospira, Nitrosococcus, Nitrosovibrio y Nitrosolobus*, que pueden oxidar amoniaco a nitrito, e incluso algunas especies de *Nitrosolobus* se ha visto que juegan un papel destacado en la nitrificación de suelos agrícolas. Por su parte, la oxidación de nitrito a nitrato se ha descrito en diferentes miembros de los géneros *Nitrococcus, Nitrospira* y *Nitrospina*. Cualquier tipo de estrés puede afectar gravemente al proceso de nitrificación, especialmente al segundo paso, por lo que en condiciones estresantes puede producirse una acumulación de nitrito.

Recientemente se ha demostrado que algunos eucariotas (*Fabaceae*) llevan a cabo un proceso nitrificante *sui generis*, consistente en la oxidación de aminoácidos a compuestos nitroalifáticos (3-nitropropionato y 3-nitropropanol), que pueden liberar el grupo nitro como nitrito y nitrato. Cuando esto sucede en plantas fijadoras, se produce un compendio del ciclo del nitrógeno en un solo sistema bacteria-planta (Fig. 6.24).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

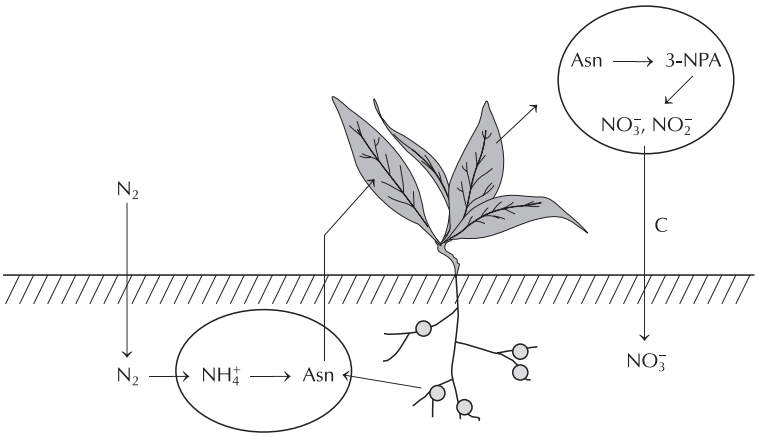


Figura 6.24. Acoplamiento fijación de N_2/asimilación de amonio/nitrificación en plantas fijadoras. 3-NPA (3-nitropropionato); C (caída de la hoja).

Desnitrificación

El nitrato, además de como fuente de nitrógeno para el crecimiento, puede ser utilizado por una amplia variedad de microorganismos como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno. Este proceso de respiración anaeróbica se denomina desnitrificación, da lugar a la formación de diversas especies reducidas de nitrógeno y va acompañada de la oxidación simultánea de materia orgánica. El rendimiento energético de la reducción desasimiladora (respiración) de nitrato es superior al que se obtiene de la fermentación de los correspondientes compuestos orgánicos.

Existen dos tipos de organismos desnitrificantes, según que la reducción anaeróbica del nitrato termine en NH_4^+ (ocurre fundamentalmente en enterobacterias), o que transcurra con formación de diversos óxidos de nitrógeno, además del nitrito, y que termine con la liberación de N_2. Este último proceso es el que se conoce normalmente como desnitrificación y a las bacterias que los llevan a cabo se las denomina desnitrificantes.

Dado que tanto los óxidos de nitrógeno que se forman en la desnitrificación (NO y N_2O) como el N_2 son compuestos gaseosos, se pierden a la atmósfera y empobrecen los suelos en compuestos nitrogenados, por lo que es un proceso perjudicial para la agricultura. Sin embargo, y por las mismas razones, resulta beneficioso para el tratamiento de aguas residuales, ya que se convierte NO_3^- en N_2, disminuyendo significativamente la cantidad de nitrógeno disponible para el crecimiento no deseado de algas y de diferentes microorganismos.

La desnitrificación necesita condiciones anóxicas o de presiones de oxígeno bajas, aunque en algunas ocasiones puede darse en ambientes aeróbicos si éstos contienen microhábitats anóxicos. Es más frecuente en aguas estancadas que en aguas corrientes y ríos. La tasa de desnitrificación es más elevada en el hipolimnio de los lagos eutróficos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

durante los periodos de estratificación de verano e invierno, que durante los periodos de mezcla de primavera y otoño.

Los procesos de nitrificación y desnitrificación en el suelo ocurren a menudo en el mismo lugar, de manera que una parte del nitrato formado en el primero se difunde hacia la zona de desnitrificación anaeróbica, donde se reduce a N_2.

La diversidad taxonómica de las bacterias desnitrificantes es muy grande, ya que entre los microorganismos que llevan a cabo la desnitrificación se encuentran organotrofos (*Pseudomonas, Alcaligenes, Bacillus, Agrobacterium, ...*), quimiolitotrofos (*Thiobacillus, Thiomicrospira, Nitrosomonas*), diazotrofos (*Rhizobium, Azospirillum*), fototrofos (*Rhodopseudomonas*), arqueobacterias (*Halobacterium*), y otros. La mayoría pueden reducir NO_3^- a N_2, pero algunas bacterias carecen de una o varias de las enzimas que participan en el proceso global, por lo que sólo pueden llevar a cabo la reducción a partir de NO_2^- o sólo pueden llegar a alguno de los productos intermedios.

La primera fase de la reducción respiratoria de nitrato consiste en su conversión a nitrito. Esta reacción está catalizada por una nitrato reductasa, desasimiladora, que presenta unas características estructurales, funcionales y reguladoras diferentes a las de la nitrato reductasa asimiladora. Aunque también es una molibdoproteína, con un cofactor de molibdeno similar (MGD), la enzima desasimiladora se encuentra asociada a la membrana, está formada por tres subunidades diferentes, no se inhibe por amonio y su síntesis se induce por nitrato y se reprime por el oxígeno molecular. La subunidad catalítica (α, NarG) es la mayor (112-140 kDa) y contiene el cofactor MGD, mientras que en la subunidad β (NarH; 52-64 kDa) hay un centro de 3Fe–4S y tres 4Fe–4S, y en la subunidad γ (NarI; 19-25 kDa), que es una proteína integral de membrana, existe una agrupación bihemo *b* que oxida al ubiquinol (Fig. 6.25). Las subunidades α y β se encuentran unidas a la cara citosólica de la subunidad γ y se pueden solubilizar por tratamiento con detergentes o por calor.

Los electrones para la reducción proceden de la formiato deshidrogenasa, a través de una cadena transportadora que implica citocromos bc_1 y las quinonas de la membrana. La fuerza protón motriz para la producción de ATP se genera por un mecanismo en el que la oxidación de las quinonas por el hemo *b* de NarI localizado en la cara periplásmica de la membrana provoca la liberación de 2 H^+ al periplasma. La transferencia de electrones tiene lugar primeramente entre los grupos hemo *b* de NarI, de bajo y alto potencial, localizados en caras opuestas de la membrana. A través de los centros Fe–S de NarH pasan a NarG donde, con la participación del cofactor MGD, permiten la reducción de nitrato, reacción en la que se consumen además 2H^+ citoplásmicos. Debido al potencial de reducción del par NO_3^-/NO_2^- (+0,43 V), el rendimiento energético de la respiración anaeróbica con nitrato es inferior al que se obtiene cuando se emplea oxígeno como aceptor terminal de los electrones (½ O_2/H_2O, +0,82 V).

En *E. coli* y otras enterobacterias, el nitrito formado se reduce a amonio en el periplasma, con generación de fuerza protón motriz y producción de ATP, o mediante una nitrito reductasa citoplásmica que tiene como función disipar el exceso de poder reductor en anaerobiosis, sin que haya fosforilación de ADP. Al no responder la reducción del nitrito a necesidades celulares de nitrógeno, el amonio formado en este

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

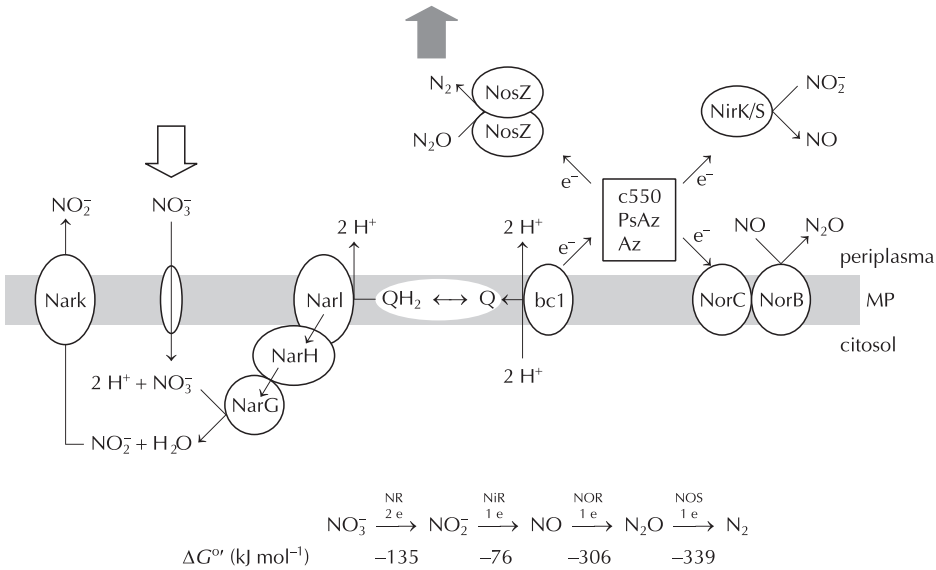


Figura 6.25. Respiración de nitrato y desnitrificación en bacterias. Nitrato reductasa respiratoria (NR): NarI (hemo b); NarH (3(4Fe4S), 3Fe4S); NarG (MGD); c550 (citocromo c_{550}); PsAz (pseudoazurina); Az (azurina); Nitrito reductasa (NiR): NirK (Cu) ó NirS (citocromo cd_1); NO reductasa (NOR): NorC (citocromo *c*), Nor B (citocromo *b*); N_2O reductasa (NOS): Nos Z (CuZ_2-CuA_2); Q (quinonas).

proceso suele ser excretado en concentraciones relativamente elevadas. No obstante, la importancia ecológica de este proceso de amonificación del nitrato es menor que la de la desnitrificación.

Las bacterias desnitrificantes reducen el nitrito en el periplasma a óxidos de nitrógeno y N_2 como producto final (Fig. 6.25). Una nitrito reductasa periplásmica, que puede contener Cu (NirK: homotrímero con dos átomos de Cu por subunidad) o un citocromo cd_1 (NirS: homodímero con un hemo *c* y un hemo d_1 por monómero), reduce el nitrito a óxido nítrico (NO), que es bastante tóxico, por lo que su concentración debe mantenerse por debajo de nanomolar. Esto se consigue mediante el acoplamiento adecuado con la óxido nítrico reductasa, una enzima integral de membrana que posee dos subunidades, una pequeña (NorC, 17 kDa) que contiene un hemo *c* y otra mayor (NorB, 38 kDa) que incluye un hemo de tipo *b*. La producción del óxido nitroso (N_2O) tiene lugar en su cara periplásmica. El último paso consiste en la reducción del N_2O a N_2 catalizada por la óxido nitroso reductasa periplásmica (NosZ). Esta es una enzima dimérica que posee en cada monómero (~70 kDa) dos centros binucleares de Cu, denominados Cu_A y Cu_Z, siendo este último centro el que cataliza la transferencia de electrones al N_2O. En el proceso de transferencia de electrones también se encuentran implicados el citocromo bc_1 de la membrana y un citocromo c_{550} periplásmico. Durante el mismo se produce una fuerza protón motriz, con producción de ATP adicional, debido a que la NO reductasa de membrana está ligada a la extrusión de protones.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Todas las enzimas respiratorias de este sistema se inducen en anaerobiosis por sus sustratos (NO_3^-, NO_2^-, NO y N_2O), independientemente del balance C/N. El control se lleva a cabo a nivel transcripcional mediante reguladores tipo FNR, factor de transcripción que detecta aumentos en la pO_2, IHF y NarXL/NarPQ, sistema de dos componentes (sensor/regulador) que se fosforila en respuesta a cambios en la concentración de nitrato o nitrito. En los organismos desnitrificantes se produce una red compleja de interacciones entre diversos estímulos ambientales (presencia de oxoaniones nitrogenados y O_2) y proteínas de tipo FNR, que controlan la transcripción de los genes *nar, nir, nor* y *nos*. La N_2O reductasa es la que resulta más severamente inhibida por la presencia de oxígeno, por lo que su presencia provoca la acumulación de N_2O que termina liberándose a la atmósfera, siendo uno de los gases que contribuyen al efecto invernadero y a la destrucción de la capa de ozono.

Reducción desasimiladora de nitrato

Además de la reducción del nitrato con fines biosintéticos (asimilación) y como mecanismo para conservar la energía (respiración), existe una tercera vía (desasimilación) para la que se han propuesto diferentes funciones fisiológicas y que está ampliamente representada entre las bacterias gram-negativas. La reducción desasimiladora de nitrato a amonio es cuantitativamente de menor importancia, a nivel global, que los otros dos procesos, pero su existencia impide la reducción de nitrato a N_2, por lo que en algunas circunstancias se considera como un "cortocircuito" dentro del ciclo del nitrógeno.

Uno de los factores ambientales que determinan el tipo de ruta que seguirá el nitrato es la relación C/N. A valores bajos se favorece la desnitrificación, mientras que a valores altos, lo que significa que se limita la cantidad de aceptor de electrones (el nitrato), predomina la reducción desasimiladora. También influye el tipo de fuente reductora. Así, las bacterias fermentadoras llevan a cabo la reducción a amonio en presencia de sustratos fácilmente fermentables, mientras que predomina la desnitrificación si son sustratos no fermentables.

El primer paso de esta reducción lo lleva a cabo una nitrato reductasa periplásmica compuesta por dos subunidades, una catalítica (NapA, 90 kDa) que contiene el cofactor de molibdeno (MGD) y un centro 4Fe–4S en su extremo N-terminal, y otra más pequeña (NapB, 15 kDa) que posee un centro bihemo de tipo *c* y es la encargada de aceptar los electrones de otra proteína (NapC, 25 kDa) unida a membrana y que posee 4 hemos de tipo *c*. La transferencia electrónica no está ligada a ninguna cadena transportadora que implique translocación de protones, por lo que el proceso de reducción no se emplea para conservar energía en forma de ATP. Al igual que ocurre con las otras dos nitrato reductasas, la actividad desasimiladora se estimula por la presencia de nitrato, pero a diferencia de las otras no se afecta por la presencia de amonio o de oxígeno. La presencia de una fuente reducida de carbono, como butirato, estimula también la actividad de esta enzima, lo que sugiere una dependencia del estado rédox de la bacteria.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El nitrito formado por el sistema Nap puede ser excretado al medio, o bien ser utilizado con fines asimiladores o respiratorios por el mismo organismo o por otros de su entorno. De esta forma algunas bacterias desnitrificantes pueden llevar a cabo el proceso de desnitrificación en condiciones aeróbicas, acoplando la nitrato reductasa desasimiladora, que no se ve afectada por el O_2, a la reducción de nitrito por la nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso reductasas (véase Capítulo 18, sección abonos naturales).

Oxidación anaeróbica de amonio (Anamox)

Recientemente se ha encontrado que una bacteria poco común, *Brocadia anammoxidans* (un planctomiceto que carece de peptidoglicano y que contiene compartimentos intracelulares rodeados por membranas, entre los que se encuentra una estructura análoga al núcleo eucariota), es capaz de llevar a cabo la formación de N_2 a partir de amonio y nitrito, bajo condiciones anaerobias:

$$NH_4^+ + NO_2^- \longrightarrow N_2 + 2\ H_2O \qquad (\Delta G^{o\prime} = -357\ \text{kJ mol}^{-1})$$

El descubrimiento de este proceso, que se conoce como "anamox" (o "anammox", de "anaerobic ammonia oxidation"), es relevante desde el punto de vista ambiental, ya que hasta ahora se pensaba que el amoniaco era estable en medios anóxicos, pero ahora se abren perspectivas interesantes en campos como, por ejemplo, el tratamiento de aguas residuales anóxicas para eliminar el amoniaco y las aminas. Aunque estas bacterias son litoautotróficas, se ha visto que pueden utilizar simultáneamente amonio y acetato como donadores de electrones para la reducción de NO_3^- a N_2, mediante una combinación de dos vías diferentes, la anamox y la desnitrificación (Fig. 6.26).

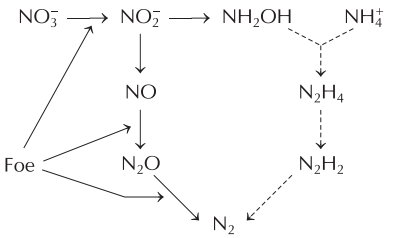


Figura 6.26. Acoplamiento entre la desnitrificación y la anamox para la eliminación de nitrógeno. Foe (fuente orgánica de electrones).

La adición de nitrato al efluente de un reactor anaerobio puede permitir la eliminación simultánea de amonio, la forma de nitrógeno más abundante en las aguas residuales, y de materia orgánica.

Este proceso también se puede dar acoplado a la producción de nitrato por bacterias nitrificantes, aerobias estrictas. En este caso, el nitrito se obtiene de la oxidación de amoniaco por las bacterias nitrificantes. Ambos grupos de bacterias oxidadoras de amoniaco, aerobias (nitrificantes, como *Nitrosomonas*) y anaerobias (*Brocadia*), pueden

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

coexistir en ambientes ricos en dicho compuesto (como son las aguas residuales y otras de desecho), ya que en ellos se encuentran partículas en suspensión que presentan zonas óxicas y anóxicas. La proporción de amoniaco oxidado por la anamox depende, en último término, de la concentración de O_2 en el sistema.

La producción de N_2 mediante anamox en zonas oceánicas anóxicas puede ser muy importante en el ciclo del nitrógeno. La capa superficial oceánica produce materia orgánica a razón de 106 C/16 N/1 P, que cuando se descompone produce CO_2, NH_4^+ y HPO_4^{2-} en la misma proporción y gran parte del N amoniacal (28%) es devuelto a la atmósfera como N_2 a través de su reacción con el NO_2^- (anamox oceánica). De hecho, se ha demostrado la existencia de organismos anamoxotrofos oceánicos mediante la detección de laderanos (lípidos que rodean los anamoxosomas en los planctomicetos de los digestores) y secuenciación de DNA.

6.2.2. Ciclo del azufre

El azufre es un elemento básico como componente de diversas biomoléculas importantes, como es el caso de las proteínas, el coenzima A, la tiamina o el glutatión. La presencia de S, formando puentes disulfuro, es necesaria para el mantenimiento de las conformaciones activas de muchas proteínas, así como para el mecanismo catalítico de determinadas enzimas, en los que participan grupos –SH de cisteínas, o diversas agrupaciones sulfoférricas.

El ciclo del azufre en la naturaleza es más complejo que el del nitrógeno, debido a que este elemento puede presentarse en una variedad mayor de estados de oxidación (desde –2 hasta +6, Tabla 6.4) y a que algunas de sus transformaciones se producen a velocidad y en cantidad apreciables tanto por la actividad biológica como por procesos químicos. El azufre es muy abundante en la corteza terrestre, donde se encuentra en sedimentos y rocas, principalmente en forma de sulfuros (FeS_2, pirita) y de sulfatos de calcio ($CaSO_4 \times 2H_2O$, yeso) y magnesio, aunque la mayor cantidad de este elemento se encuentra en los océanos (950 ppm), en forma de sulfatos inorgánicos y de dimetilsulfuro (DMS, CH_3SCH_3).

Tabla 6.4. Estados de oxidación de compuestos de azufre en la biosfera.

Compuesto		Número de oxidación
S orgánico	R–SH	–2
Sulfuro	H_2S	–2
Azufre elemental	S^0	0
Tiosulfato	$S_2O_3^{2-}$	+2 (promedio)
Dióxido de azufre	SO_2	+4
Sulfito	SO_3^{2-}	+4
Sulfato	SO_4^{2-}	+6

El ciclo del azufre (Fig. 6.27) se encuentra controlado en gran parte por los procesos de interconversión que llevan a cabo los microorganismos. Así, por ejemplo, las

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

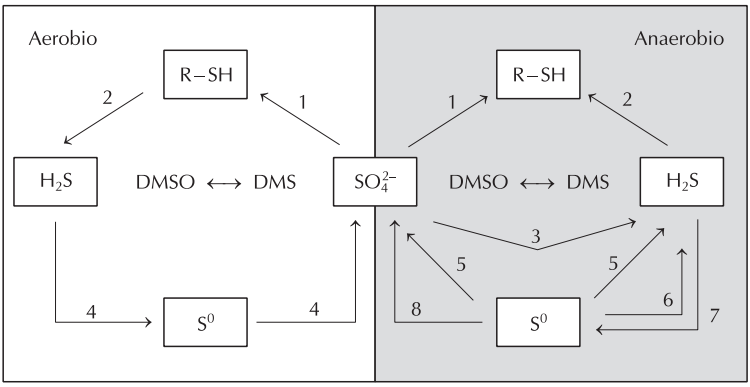


Figura 6.27. Ciclo del azufre. 1 (asimilación); 2 (desulfurilación); 3 (respiración de sulfato); 4 (oxidación quimiolitotrófica); 5 (desproporción); 6 (reducción de S^0); 7 (oxidación anaeróbica de H_2S); 8 (oxidación anaeróbica de S^0); DMSO (dimetilsulfóxido); DMS (dimetilsulfuro).

principales emisiones naturales de azufre terrestre se originan por la reducción bacteriana de SO_4^{2-} a H_2S, siendo responsables del olor a azufre y de la coloración negra, por la formación de sulfuros de hierro, de muchos ambientes acuáticos. El DMS, que es el compuesto orgánico de azufre más abundante en la naturaleza, es un compuesto volátil producido por bacterias marinas que da a los mares su olor característico. Este compuesto se origina a partir de la hidrólisis del propionato de dimetilsulfonio, uno de los principales osmorreguladores en las algas marinas, lo que permite al fitoplancton mantener su balance osmótico en las aguas saladas de los océanos. Mas de la mitad de la cantidad anual de azufre emitida a la atmósfera se estima que es en forma de DMS. En la atmósfera se oxida a metilsulfato (MSA, $CH_3SO_3^-$), SO_2 y, posteriormente, a H_2SO_4. Todos estos compuestos son higroscópicos y forman partículas que sirven como núcleos de condensación para la formación de nubes. Otra fuente de emisiones de compuestos gaseosos de azufre la constituyen los volcanes y demás fuentes geoquímicas de sulfuro, que introducen en la atmósfera cantidades elevadas de H_2S y SO_2.

El ciclo del azufre se ve alterado por las actividades humanas. La quema de combustibles fósiles, en especial de carbón, provoca la emisión de elevadas cantidades de SO_2. Lo mismo ocurre con la oxidación de sulfuros minerales en los procesos metalúrgicos. Se estima que la emisión de SO_2 antropogénico es superior a las 50×10^6 toneladas al año, cantidad muy superior a la emitida por las fuentes naturales. Por otro lado, el tráfico marítimo internacional, que emplea como combustible las fracciones residuales que quedan después de eliminar los hidrocarburos ligeros (con niveles de azufre de ~3%), también contribuye de forma notable a incrementar el nivel de aerosoles de sulfato (en regiones con tráfico costero elevado, hasta un 30%). Además, las altas temperaturas a las que trabajan esos motores diesel provocan la formación de elevadas cantidades de NO_x, que contribuyen a la formación de aerosoles. El azufre siempre se ha considerado como un nutriente no limitante para la agricultura. Sin embargo, en la actualidad hay una serie de áreas que necesitan ser fertilizadas con sulfato para mantener la calidad y el rendimiento de las explotaciones. Esta

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

deficiencia de azufre, que afecta especialmente a algunas zonas del norte de Europa, se ha producido como consecuencia de las limitaciones en la emisión de gases contaminantes como el SO_2, que actuaban como "abonos" naturales tras su conversión atmosférica en H_2SO_4 y deposición por el agua de lluvia.

Aunque con importantes diferencias, hay una gran analogía entre la forma en que los microorganismos afectan a los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del azufre. La forma en que suelen estar presentes en los organismos vivos es en la más reducida: –3 en el nitrógeno (grupos amino, $-NH_2$) y –2 en el azufre (grupos sulfhidrilo, R–SH). En la descomposición bacteriana de los compuestos orgánicos, el azufre se excreta generalmente en forma de H_2S, de forma similar a lo que ocurre en el caso del nitrógeno, excretado como NH_3. Algunos microorganismos producen azufre elemental (sólido amarillo) de forma comparable a la producción de N_2 gaseoso. Diversos compuestos de azufre, como el SO_4^{2-}, pueden emplearse como aceptores de electrones en reacciones que permiten conservar parte de la energía libre en forma de ATP, al igual que ocurre con los procesos de respiración con NO_3^-. Como en el caso del nitrógeno, en estos procesos de conservación de energía, la utilización de los distintos compuestos de azufre puede tener lugar tanto en condiciones óxicas como anóxicas (Fig. 6.27).

Asimilación de sulfato

Las plantas, algas, hongos y muchos microorganismos heterótrofos, asimilan el azufre en forma de sulfato. La mayoría de los sulfatos son muy solubles en agua (salvo los de hierro y calcio), siendo el segundo anión más importante en el agua de mar, por lo que representa una gran reserva de azufre que se recicla lentamente. Los animales no pueden reducir el sulfato y necesitan incorporarlo, ya reducido, a través de los alimentos.

La absorción directa del azufre en forma de sulfuro no es posible para la mayoría de los organismos, debido a la elevada toxicidad del H_2S. Para incorporarse como sulfhidrilo a los aminoácidos (cisteína y metionina) y a algunas coenzimas, el sulfato debe reducirse a sulfuro mediante un proceso que implica la reducción previa a sulfito. El ion sulfato es más estable que el nitrato y, al contrario que éste, la reducción asimiladora no puede producirse si antes no se activa con ATP para formar adenosina fosfosulfato (APS) y, posteriormente, fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS). Estas reacciones de activación están catalizadas, respectivamente, por las enzimas ATP sulfurilasa y APS quinasa (Fig. 6.28).

La ATP sulfurilasa (más correctamente denominada sulfato adenililtransferasa) cataliza el desplazamiento de un grupo pirofosfato de la posición 5′ del ATP por el sulfato inorgánico. La energía libre de formación del APS es de +41,8 kJ mol^{-1}, lo que hace que la reacción termodinámicamente favorecida sea la contraria y que en el equilibrio la concentración de APS sea del orden de 10^{-7} M. Sin embargo, esta reacción tiene lugar *in vivo* por el acoplamiento de la hidrólisis del PP_i por una pirofosfatasa y por el consumo del APS en las reacciones siguientes. En plantas existen dos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

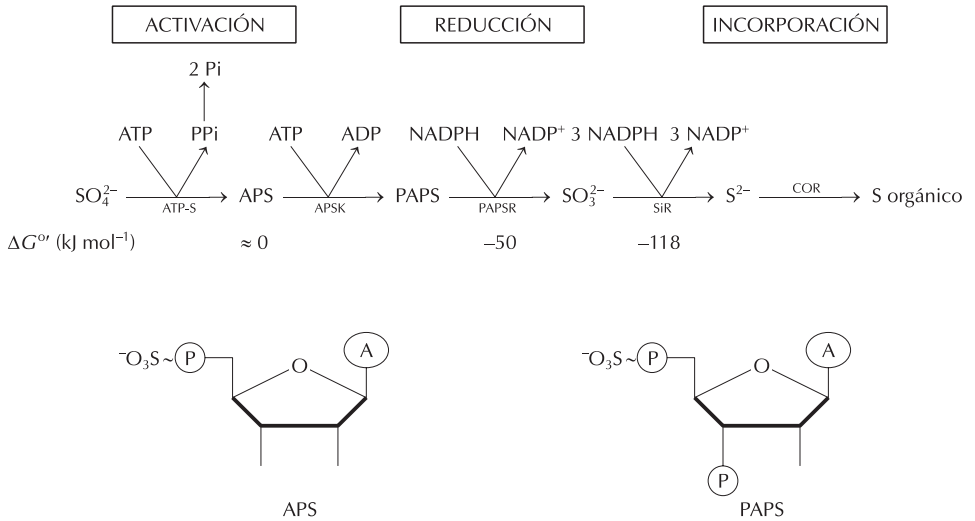


Figura 6.28. Reducción asimiladora de sulfato en bacterias. ATP-S (ATP sulfurilasa); APSK (APS quinasa); PAPSR (PAPS reductasa); SiR (sulfito reductasa); COR (carbono orgánico); APS (fosfoadenosín fosfosulfato; PAPS (fosfo-APS).

isoformas de la ATP sulfurilasa, la mayoritaria localizada en los cloroplastos, donde se localizan también el resto de enzimas de la ruta, y la otra isoforma que es citosólica y cuya función fisiológica no está clara. Ambas son homotetrámeros de 49-50 kDa y presentan constantes cinéticas similares. En los organismos procariotas asimiladores de sulfato, la enzima está formada por un hexámero con dos tipos de subunidades, agrupadas en forma dimérica: una catalítica más pequeña y otra que contiene un dominio alostérico, de forma que interaccionan el sitio catalítico de un dímero con el sitio alostérico de otro. En las plantas, la expresión de los genes de la ATP sulfurilasa está regulada por las necesidades de compuestos con azufre.

En bacterias y cianobacterias, la siguiente etapa consiste en la fosforilación del APS por una APS quinasa, con gasto de otro ATP, para producir PAPS como paso previo a la reducción a sulfito por la PAPS reductasa (Fig. 6.28), empleando NADPH como donador del par de electrones necesarios. La forma activa de la APS quinasa de bacterias es un homodímero (~21 kDa cada subunidad), cada uno de ellos con un motivo de unión de ATP (tipo P). La enzima, fosforilada en una Ser de cada subunidad, une APS y le transfiere el grupo fosfato a la posición 5′, formándose PAPS. A continuación la PAPS reductasa, enzima homodimérica (~28 kDa cada uno) cataliza la transferencia de la mitad sulfonilo del PAPS a la tiorredoxina reducida (por lo que también se denomina PAPS sulfotransferasa), formándose un derivado tiorredoxina–S–SO_3^-, el cual es subsecuentemente reducido, liberándose sulfito y fosfoadenosil fosfato (PAP).

En las plantas y otros organismos eucariotas, la reducción hasta sulfito transcurre sin formación de PAPS, sino que se produce a través de una reacción catalizada por una APS reductasa que utiliza glutatión como fuente de electrones (Fig. 6.29).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

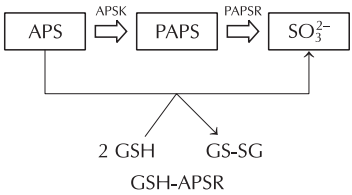


Figura 6.29. Formación de SO_3^{2-} en bacterias (arriba) y en plantas (abajo). APSK (APS quinasa); PAPSR (PAPS reductasa); GSH (glutatión reducido); APSR (APS reductasa).

Esta enzima, que se encuentra en el cloroplasto, actúa como una sulfotransferasa y posee en su extremo C terminal un domino con la agrupación CPFC, que es característica del sitio rédox activo de las glutarredoxinas (que son reducidas específicamente por el glutatión). Teniendo en cuenta que la glutatión reductasa, que controla el estado rédox del glutatión, emplea NADPH, los electrones utilizados en la reducción del APS provienen, en último término, del NADPH generado en la fotosíntesis o en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato.

En plantas, no obstante, existe también una APS quinasa que cataliza la formación de PAPS, pero éste no es reducido a sulfito como en las bacterias, ya que no existe la correspondiente PAPS reductasa, sino que se emplea directamente en la biosíntesis de compuestos como los glucosinolatos, los sulfolípidos o los flavonol sulfatos.

En animales existe una PAPS sintetasa, enzima bifuncional que cataliza la síntesis de PAPS mediante las dos reacciones secuenciales a partir de ATP y SO_4^{2-}. Esta enzima presenta un dominio ATP sulfurilasa y otro APS quinasa, con regiones altamente conservadas respecto a las de las correspondientes enzimas de microorganismos (dominios de unión de ATP, de transferencia de fosforilo, de ruptura del enlace fosfodiéster y de unión del pirofosfato). En estos organismos, el PAPS funciona como donador universal del grupo sulfato en las reacciones de sulfatación, que representan la segunda forma más frecuente de modificación de las biomoléculas.

El sulfito es reducido a sulfuro en una reacción que implica la transferencia de 6 electrones y que está catalizada por la sulfito reductasa (SiR). La enzima de plantas, que emplea ferredoxina como donador de electrones, está formada por 2 ó 4 subunidades iguales (64-71 kDa) y, en su extremo C-terminal posee un grupo sirohemo y un centro de 4Fe–4S, unidos por un puente de S, al igual que la nitrito reductasa dependiente de ferredoxina.

Sin embargo, la sulfito reductasa de bacterias y levaduras utiliza NADPH como donador de electrones para la reducción y presenta una estructura cuaternaria de $\alpha_8\beta_4$ (780 kDa), con una flavoproteína (subunidad α, ~70 kDa, con FAD y FMN) y una hemoproteína (β, ~65 kDa, con un sirohemo y un centro 4Fe–4S). Ésta última presenta una elevada homología con la enzima de plantas. Los electrones, procedentes del NADPH, se transfieren secuencialmente al FAD, al FMN, al centro 4Fe–4S y, finalmente, al sirohemo donde se produce la reducción del sulfito. La SiR es una enzima constitutiva y su actividad no se ve sensiblemente afectada por las necesidades celulares de azufre. Esta falta de regulación puede deberse al carácter

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tóxico del sulfito, que puede dañar a la célula si se acumula por una deficiencia en dicha actividad.

El sulfuro formado se incorpora rápidamente a la *O*-acetilserina (OAS) para dar lugar al aminoácido cisteína, a partir del cual se sintetizan la mayoría de compuestos celulares con azufre. La síntesis de cisteína se lleva a cabo por la actuación de dos enzimas, la serina acetiltransferasa (SAT) y la *O*-acetilserina(tiol)liasa (OASTL). La SAT cataliza la formación de OAS a partir de serina y acetil-CoA y para ser activa necesita estar formando un complejo con la OASTL, la cual se disocia de dicho complejo enzimático (inactivándose, por tanto, la SAT) cuando la cantidad de OAS es elevada (Fig. 6.30). Por el contrario, una alta concentración de sulfuro favorece la formación del complejo y, por tanto, la síntesis de OAS y de cisteína. La OASTL es la enzima que finalmente cataliza la incorporación del sulfuro a la OAS. Esta enzima, que contiene piridoxal fosfato como grupo prostético, no es activa cuando forma parte del complejo con la SAT, en donde actúa como "subunidad" reguladora, debiendo estar libre para catalizar la síntesis de cisteína (Fig. 6.30). En cualquier caso, y como la cantidad de OASTL que hay en los cloroplastos es muy superior a la de SAT (incluso hasta 300 veces), no existe problema para la catálisis. La OAS actúa como regulador positivo en la expresión de los genes del transportador de sulfato, de la ATP sulfurilasa y de la APS reductasa. Teniendo en cuenta que la síntesis de la OAS depende del balance C/N, se puede considerar a esta molécula como un sensor que liga el metabolismo celular del C, el N y el S. Por otra parte, la cisteína inhibe alostéricamente a la SAT, incluso en presencia de exceso de serina y sulfuro, con lo que impide su propia síntesis (retroinhibición).

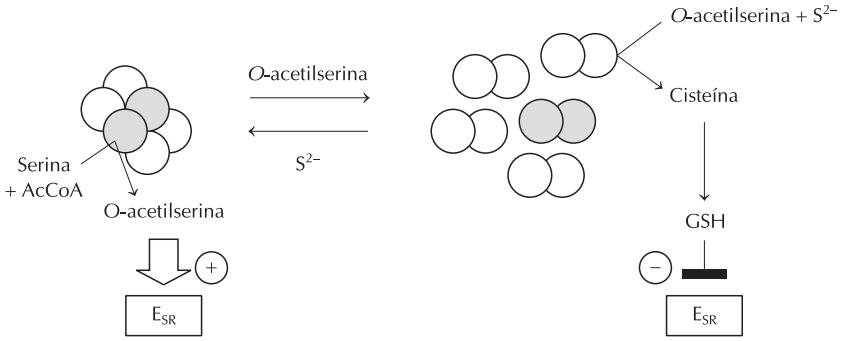


Figura 6.30. Síntesis de cisteína y mecanismos de control. La serina acetil transferasa (SAT, círculos grises) sintetiza *O*-acetilserina, un regulador positivo de las enzimas de la reducción del sulfato (E_{SR}). La *O*-acetilserina tiol transferasa (OASTL, círculos blancos) sintetiza cisteína a partir de *O*-acetilserina y S^{2-}. El GSH (derivado de la cisteína) es un regulador negativo de la reducción de sulfato.

Como paso previo a la activación y a la reducción, el ion sulfato debe penetrar en las células, para lo que se emplean transportadores específicos. En el caso de las cianobacterias y bacterias heterotróficas, se lleva a cabo por medio de un mecanismo de transporte facilitado, mientras que en plantas y otros eucariotas el transporte se lleva a cabo mediante permeasas. El sistema descrito en los organismos procariotas está

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

formado por dos componentes: una proteína soluble extracelular, que une el sulfato, y otra integrada en la membrana, que lo introduce en la célula, gracias a la energía obtenida de la hidrólisis del ATP. Las permeasas de sulfato sólo están formadas por una larga cadena peptídica, que contiene doce regiones que atraviesan la membrana, características de cotransportadores catión/soluto.

Por último, cabe destacar que algunos lipooligosacáridos empleados como señales de reconocimiento durante la formación de los nódulos radicales en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno, poseen grupos sulfato como sustituyentes del anillo de azúcar (Tabla 6.3). En la esterificación por sulfato de dichos hidroxilos está implicado el operón *nodHPQ* de *Rhizobium*. Los genes *nodPQ* codifican las dos subunidades de una ATP sulfurilasa, mientras que el gen *nodQ* codifica también una actividad APS quinasa, con lo que el sulfato puede ser activado hasta PAPS. El producto del gen *nodH* tiene una actividad sulfotransferasa que es la encargada del proceso final.

Reducción respiratoria de sulfato (desulfuricación)

La reducción de sulfato a H_2S se puede emplear, como en el caso de la reducción del nitrato, para impulsar la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa actuando el sulfato como aceptor final de los electrones. Este proceso lo llevan a cabo un grupo de bacterias anaerobias estrictas ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en ambientes anóxicos acuáticos como terrestres, denominadas bacterias sulfato reductoras. Pertenecen a los géneros *Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfobacter, Archaeoglobus,* y otros, y utilizan compuestos orgánicos (lactato, piruvato, acetato y otros ácidos) o H_2 como donadores de electrones. El H_2S formado en este caso no se incorpora en forma de cisteína, sino que se excreta al medio, siendo estas bacterias las responsables del olor a azufre (a sulfhídrico) y de la coloración negra, debida a los sulfuros de hierro, que presentan algunos ambientes acuáticos. Aunque el H_2S es volátil, la forma de sulfuro presente en el ambiente depende del pH, ya que si éste es superior a 7 las formas que predominan son el HS^- y el S^{2-}. Debido a la necesidad de donadores orgánicos de electrones, la reducción de sulfato tiene lugar únicamente en ambientes con niveles adecuados de sulfato y ricos en materia orgánica. El vertido al mar de aguas residuales, lodos y basuras, que son ricas en materia orgánica, provoca el aumento de la tasa de reducción de sulfato y el aumento de la contaminación por HS^-, que al ser tóxico para muchos organismos (se combina con el hierro de los citocromos, por ejemplo) es un peligro potencial.

El rendimiento energético de la reducción respiratoria de sulfato es inferior al de los procesos respiratorios de O_2 o de NO_3^-, ya que tiene un potencial rédox más negativo, por lo que el crecimiento de un organismo se encuentra más limitado cuando crece con SO_4^{2-} que cuando lo hace con O_2 o NO_3^-. No obstante, la energía libre que se obtiene en el proceso cuando se emplea el donador de electrones adecuado es suficiente para la síntesis de ATP. Así, con H_2 es:

$$SO_4^{2-} + 4\ H_2 + H^+ \longrightarrow HS^- + 4\ H_2O \qquad (\Delta G^{o\prime} = -152\ \text{kJ mol}^{-1})$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Como donador de electrones para la reducción de sulfato, numerosas bacterias pueden utilizar el acetato, oxidándolo completamente a CO_2 a través de la vía del acetil-CoA

$$SO_4^{2-} + CH_3COO^- + 3\ H^+ \longrightarrow H_2S + 2\ CO_2 + 2\ H_2O \qquad (\Delta G^{o\prime} = -57{,}5\ \text{kJ mol}^{-1})$$

Como en el caso de la reducción asimiladora, también es necesaria la activación del sulfato, aunque en este caso sólo hasta APS, por acción de la ATP sulfurilasa. La reducción hasta sulfito la cataliza una APS reductasa, con liberación de AMP. Esta enzima, que no presenta homología con la enzima del mismo nombre que participa en la reducción asimiladora en plantas, es una flavoproteína que posee además un centro sulfoférrico. El sulfuro se forma en el paso final que está catalizado por la sulfito reductasa dependiente de NADPH. La SiR desasimiladora es un hexámero compuesto por tres tipos diferentes de subunidades ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). La subunidad α (49 kDa) contiene un sirohemo y un centro 4Fe–4S, ligados por una cisteína, mientras que la subunidad β (43 kDa), con una secuencia de aminoácidos muy similar, sólo presenta el centro sulfoférrico. La subunidad γ (11 kDa) está codificada en un *locus* diferente al de las otras dos y su función no está clara. A diferencia de lo que ocurre en la reducción asimiladora, la transferencia de los seis electrones no transcurre en un único paso, produciéndose tritionato ($S_3O_6^{2-}$) y tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) como intermediarios en la reducción desasimiladora de sulfito.

La reducción respiratoria de sulfato utiliza una serie de transportadores de electrones ligados a la membrana y que dan lugar a la formación de una fuerza protón motriz que impulsa la síntesis de ATP por la ATPasa. El principal transportador de electrones es el citocromo c_3, que es periplásmico, de bajo potencial y que se reduce por una hidrogenasa periplásmica. El citocromo c_3 cede los electrones a un complejo proteico asociado a la membrana (Hmc), que los transporta hasta la cara citoplásmica y los cede tanto a la APS reductasa como a la sulfito reductasa, que son enzimas citoplásmicas (Fig. 6.31).

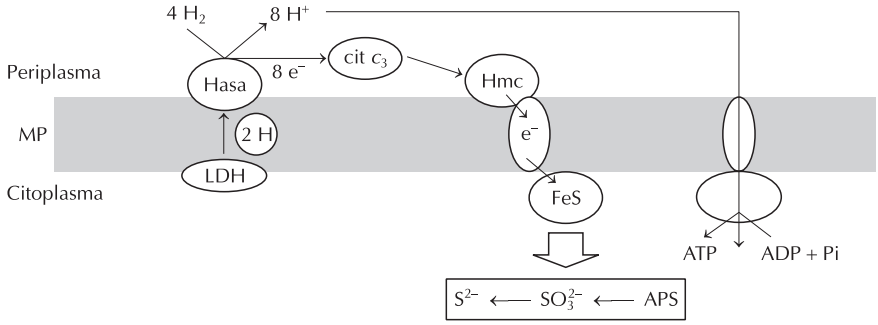


Figura 6.31. Transporte de electrones y conservación de la energía en las bacterias reductoras del sulfato. LDH (lactato deshidrogenasa); Hasa (hidrogenasa); Hmc (complejo proteínico); APS (adenosín fosfosulfato); MP (membrana plasmática).

El lactato y el piruvato pueden actuar como donadores de electrones para la reducción de sulfato (Fig. 6.31). El lactato es oxidado a piruvato por la lactato

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

deshidrogenasa asociada a la cara interna de la membrana plasmática y el piruvato es convertido en CO_2, H_2 y acetilfosfato. El H_2 producido atraviesa la membrana y es oxidado por una hidrogenasa periplásmica, que transfiere los electrones generados al citocromo c_3. Por otro lado, el acetilfosfato es un intermediario de alta energía que da lugar a la producción de ATP extra por un proceso de fosforilación a nivel de sustrato.

Un aspecto interesante de la reducción microbiana del azufre es la capacidad que tienen los microorganismos para fraccionar los isótopos de azufre. Las bacterias reductoras de sulfato muestran una ligera preferencia por el isótopo de ^{32}S frente al de ^{34}S, por lo que en los sulfuros formados por esta vía hay una mayor proporción de este isótopo que en el sulfato original. De esta manera se pueden distinguir los depósitos de sulfuro de origen biológico de los que se han formado a partir de procesos geoquímicos.

Reducción no asimiladora de compuestos azufrados

El proceso de reducción de azufre elemental hasta H_2S lo llevan a cabo algunas bacterias de los géneros *Desulfuromonas, Sulfurospirillum, Campylobacter* y otros, las cuales pueden crecer en anaerobiosis acoplando esta reducción a la oxidación de un sustrato orgánico (acetato, etanol, ...). Estos organismos no pueden reducir sulfato a sulfuro, aunque algunos de ellos, que son quimioorganotrofos anaerobios facultativos, también pueden reducir otros compuestos de S como el tiosulfato, el sulfito o el dimetilsulfóxido. *Desulfuromonas acetoxidans*, anaerobio estricto, sólo puede emplear azufre elemental como aceptor de electrones (Fig. 6.32).

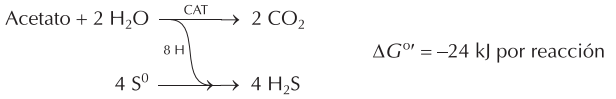


Figura 6.32. Reducción de azufre elemental. CAT (ciclo de Krebs).

Estas bacterias se encuentran en los mismos hábitats que las reductoras de sulfato y, en algunas ocasiones, forman asociaciones con las bacterias verdes del azufre, que producen azufre a partir de H_2S y CO_2. El azufre producido se vuelve a reducir a H_2S por las reductoras de azufre, con lo que se completa un ciclo anaeróbico del azufre.

Algunas arqueobacterias de los géneros *Sulfolobus, Pyrodictium, Thermoproteus* y otros, que son hipertermófilas (viven en hábitat volcánicos o en fondos marinos, con temperaturas incluso por encima de los 100 °C), también emplean la reducción del S^0 a H_2S, acoplada a la oxidación de H_2 o de compuestos orgánicos, como reacción para la obtención de energía en condiciones anaerobias.

A) Dismutación

Algunas bacterias reductoras de sulfato pueden llevar a cabo reacciones de dismutación (en las que se forma un compuesto más reducido y otro más oxidado que el de partida), usando compuestos de azufre de estado de oxidación intermedio.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La reacción de dismutación del tiosulfato a sulfato (más oxidado) y sulfhídrico (más reducido) produce energía suficiente para hacer posible el crecimiento de bacterias como *Desulfovibrio sulfodismutans*:

$$S_2O_3^{2-} + H_2O \longrightarrow SO_4^{2-} + H_2S \qquad (\Delta G^{o\prime} = -21{,}9 \text{ kJ mol}^{-1})$$

En este caso, la oxidación del tiosulfato impulsa la formación de una fuerza protón motriz que *D. sulfodismutans* emplea para la fosforilación del ADP. La enzima implicada en esta reacción de desproporción es la rodanasa (tiosulfato sulfurotransferasa), que rompe el enlace S–S presente en el tiosulfato. En estas bacterias quimiolitotrofas se trata de una proteína monomérica (21 kDa) que se encuentra unida a la cara periplásmica de la membrana. La enzima está formada por dos dominios globulares, con una elevada homología entre ellos, unidos por una región bisagra, y posee una cisteína característica en el centro activo, que sirve para unir la mitad sulfano del tiosulfato. La actividad se regula por un mecanismo de fosforilación mediado por una proteína quinasa.

Otros compuestos, como el sulfito o el azufre elemental, también pueden sufrir reacciones de desproporción por la rodanasa y emplearse como fuente de energía por diversas bacterias reductoras de sulfato de los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*:

$$4\ SO_3^{2-} + 2\ H^+ \longrightarrow 3\ SO_4^{2-} + H_2S \qquad (\Delta G^{o\prime} = -241{,}3 \text{ kJ mol}^{-1})$$

Estas formas de metabolismo permiten a las bacterias sulfato reductoras recuperar energía a partir de los intermedios de azufre producidos en la oxidación del H_2S debida a los quimiolitotrofos del azufre con los que coexisten.

La rodanasa también participa en el catabolismo de la cisteína, donde cataliza la reacción de transferencia del azufre sulfano del tiosulfato al cianuro para formar tiocianato (SCN^-), por lo que en un número elevado de organismos, procariotas y eucariotas (donde se encuentra en las mitocondrias), juega un importante papel en la destoxificación del cianuro. También participa de forma activa en la formación de centros sulfoférricos y en diversos procesos, como la reactivación de la nitrogenasa.

B) Metabolismo del dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetilsulfuro (DMS, $CH_3–S–CH_3$) es el compuesto orgánico de azufre más abundante en la naturaleza y se origina, principalmente, en ambientes marinos como producto del metabolismo del propionato de dimetilsulfonio (DMSP), que es uno de los principales osmorreguladores en las algas marinas. El DMSP también se emplea como crioprotector y como repelente frente a los herbívoros del fitoplancton. Los microorganismos pueden emplear el DMSP como fuente de carbono y energía para el crecimiento, catabolizándolo a DMS y acrilato, un derivado del propionato, reacción catalizada por la DMSP liasa. Esta reacción también la llevan a cabo diversas algas marinas. La producción bacteriana anual de DMS, que se libera a la atmósfera, es superior a las 45×10^6 toneladas, confiriendo un olor picante característico a los

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

hábitats marinos donde se produce. En la atmósfera, el DMS se oxida fotoquímicamente produciendo dimetilsulfóxido (DMSO, CH_3 SO CH_3), metilsulfato ($CH_3SO_3^-$), SO_2 y SO_4^{2-} (Fig. 6.33).

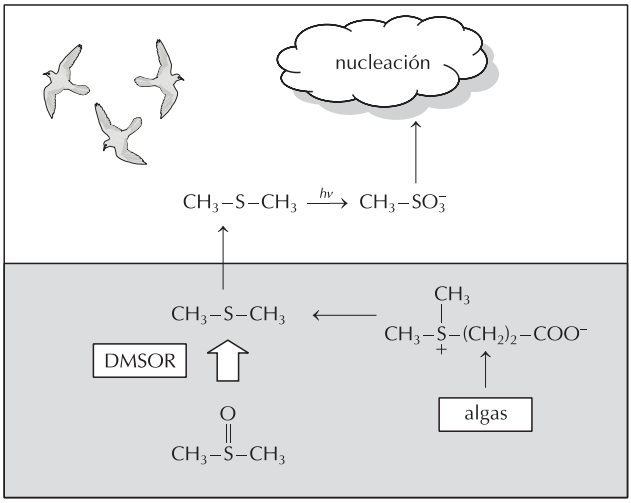


Figura 6.33. Metabolismo del DMSO. DMSOR (DMSO reductasa).

El DMS puede emplearse en anaerobiosis por los microorganismos en, al menos, tres procesos diferentes: como donador de electrones en el metabolismo energético de algunos quimioorganotrofos y quimiolitotrofos; como donador de electrones en la fijación fotosintética de CO_2 por bacterias rojas fotosintéticas; o como sustrato para la metanogénesis. En los dos primeros casos, el DMS se oxida a DMSO y en el último, se reduce a H_2S y CH_4.

Diversas bacterias, como *Campylobacter, Escherichia* y muchas proteobacterias pueden emplear DMSO como aceptor de electrones para la generación de energía. El potencial de reducción del par DMSO/DMS es de +0,15 V, lo que significa que la cadena de transportadores de electrones tiene que ser bastante corta. En *E. coli*, la transferencia electrónica se realiza por el sistema menaquinol/menaquinona, mientras que en otros casos están implicados citocromos de tipo *b*, con potenciales rédox cercanos a 0 V. La enzima implicada en este proceso rédox es la DMSO reductasa, una molibdoproteína con un cofactor de molibdeno del tipo MGD, similar al de la nitrato reductasa (Fig. 6.34).

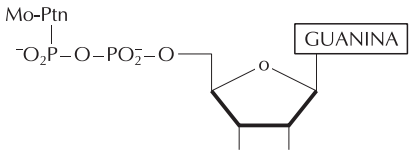


Figura 6.34. Cofactor MGD (dinucleótido de Mo y guanina). Mo-Ptn (molibdopterina).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En diversas bacterias, como *E. coli*, la enzima es trimérica, con dos de las subunidades situadas en la cara citoplásmica de la membrana formando un dímero y una tercera cadena peptídica que está integrada en la misma. En este caso, la subunidad catalítica (DmsA, 87 kDa) contiene el cofactor MGD, la otra subunidad citoplasmática (DmsB, 23 kDa) posee 4 centros 4Fe–4S con potenciales rédox decrecientes (–50, –120, –240 y –330 mV), mientras que la cadena hidrofóbica (DmsC, 31 kDa) posee un sitio de unión para el menaquinol. En el caso de los organismos fototróficos, sin embargo, la enzima es periplásmica y con una única cadena peptídica (85 kDa), siendo el cofactor de molibdeno, unido a dos moléculas de MGD, el único centro rédox que poseen. Además de reducir al DMSO, esta enzima también puede emplear como sustrato el *N*-óxido de trimetilamina (TMAO), transfiriéndole dos electrones y convirtiéndolo en trimetilamina (TMA), responsable del olor y sabor característicos del pescado en descomposición. Esta reacción es utilizada por algunas bacterias fototróficas rojas para el metabolismo anaeróbico en la oscuridad.

La importancia ambiental de este proceso se pone de manifiesto a dos niveles diferentes. En primer lugar, y debido su olor característico, el DMS es reconocido por las aves marinas como un indicador de productividad en el océano próximo. Además, se ha observado que existe una estrecha relación entre la producción de DMS y la formación de nubes. Este mecanismo regulador del clima asociado al DMS es debido al carácter higroscópico de algunos de los compuestos que se forman en su fotooxidación, como el metilsulfato o el H_2SO_4, lo que favorece que dichas moléculas actúen como núcleos para la formación de gotículas de agua que, finalmente, provocan la formación de nubes. Estas nubes, además de contribuir a modular la temperatura de la Tierra, provocan una disminución de la tasa de crecimiento del fitoplancton, productores del DMS, por lo que se ha propuesto que estos microorganismos actúan como reguladores homeostáticos del clima.

Oxidación de compuestos de azufre (sulfuricación)

Aunque el H_2S puede reaccionar espontáneamente con O_2 para dar $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} y S^0, existe una variedad de proteobacterias que pueden utilizar diversos compuestos reducidos de azufre para crecer quimiolitotróficamente. Estos procesos de oxidación pueden llevarse a cabo tanto en condiciones óxicas, donde compiten con la reacción exclusivamente química, como en condiciones anóxicas.

En el primer caso, participan bacterias aerobias de los géneros *Thiobacillus, Beggiatoa, Thiomicrospira* y otros, algunas de las cuales son, además, acidófilas que pueden crecer quimiolitotróficamente a pH 2 utilizando Fe^{2+} como donador de electrones. Estos organismos suelen vivir en la interfase entre un ambiente anaeróbico (sedimentos) y otro aeróbico (agua en contacto con el sedimento) y acumulan dentro de las células los gránulos de azufre (amarillo) que se producen en la oxidación del H_2S. Estos gránulos se oxidan lentamente a sulfato cuando se agota el H_2S. Un hábitat interesante de *Beggiatoa* lo constituye la rizosfera de plantas que, como el arroz, viven en suelos encharcados, ya que al oxidar el H_2S desempeñan una beneficiosa

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

función de destoxificación, ya que este compuesto es tóxico para la mayoría de organismos aerobios.

Entre las que oxidan los compuestos reducidos de azufre en condiciones anaeróbicas se encuentran las bacterias fototróficas verdes (*Chlorobium*) y rojas (*Chromatium, Thiocapsa*) del azufre, algunas de las cuales son halófilas extremas (*Halorhodospira*). Estas bacterias viven en zonas anóxicas de lagos, y otros hábitat acuáticos, donde se acumula el H_2S, el cual lo utilizan como donador de electrones para la reducción fotosintética del CO_2, oxidándolo a S^0, que en el caso de la mayoría de las bacterias rojas también es almacenado en forma de gránulos dentro de las células, donde más tarde es oxidado hasta sulfato. Las bacterias verdes excretan el azufre fuera de las células.

Algunas bacterias, como *Thiobacillus denitrificans* o *Thioploca*, pueden acoplar la oxidación, en anaerobiosis, de compuestos reducidos de azufre con la reducción de nitrato, que actúa como aceptor final de los electrones, hasta N_2. Estos organismos no pueden, sin embargo, realizar la reducción asimiladora de nitrato y necesitan amonio como fuente de nitrógeno.

$$3\ S^0 + 4\ NO_3^- \longrightarrow 3\ SO_4^{2-} + 2\ N_2$$

La oxidación de H_2S, S^0 o $S_2O_3^{2-}$ libera energía suficiente para la generación de ATP acoplada al transporte electrónico en la membrana y a la producción de fuerza protón motriz:

$$H_2S + \tfrac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow S^0 + H_2O \qquad (\Delta G^{o\prime} = -210\ \text{kJ mol}^{-1})$$

$$H_2S + 2\ O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad (\Delta G^{o\prime} = -798\ \text{kJ mol}^{-1})$$

$$S^0 + H_2O + 1\ \tfrac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad (\Delta G^{o\prime} = -587\ \text{kJ mol}^{-1})$$

$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2\ O_2 \longrightarrow 2\ SO_4^{2-} + 2\ H^+ \qquad (\Delta G^{o\prime} = -818\ \text{kJ mol}\ [S_2O_3^{2-}]^{-1} = -409\ \text{kJ mol}\ [SO_4^{2-}]^{-1})$$

Como consecuencia de que en las reacciones anteriores se producen H^+, tiene lugar un descenso del pH, siendo la acidificación del medio una consecuencia de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. La presencia en el medio de H_2SO_4 tiene algunas consecuencias ambientales graves, como son la solubilización de aluminio y de metales pesados, muy tóxicos para las plantas.

La oxidación del compuesto más reducido (H_2S, –2) a sulfato (+6) implica la participación de un total de ocho electrones y ocurre en varios pasos (Fig. 6.35), en el primero de los cuales una sulfuro oxidasa cataliza la transferencia de dos electrones y origina S^0, que se acumula y sirve como reserva de energía para el caso de que se agote el H_2S, mediante la oxidación a sulfato. Debido a la baja solubilidad del azufre elemental en agua, éste se acumula en muchos casos en forma de gránulos en el interior de las bacterias y, cuando se encuentra en el exterior de la célula, el organismo debe crecer unido a la partícula de azufre para obtener eficazmente los átomos que necesita.

La oxidación del S^0 hasta sulfito se lleva a cabo por la acción de una azufre oxidasa, un paso que implica la transferencia de cuatro electrones y en el que se forma un

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

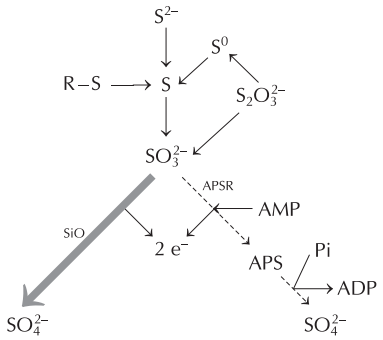


Figura 6.35. Oxidación de compuestos reducidos de azufre. SiO (sulfito oxidasa); APSR (APS reductasa).

complejo con glutatión. Los electrones son transferidos a un citocromo *c* de la cadena de transporte de electrones de la membrana.

La mayoría de estas bacterias pueden emplear también tiosulfato (e incluso tetrationato, $S_4O_6^{2-}$) como donador de electrones para el crecimiento quimiolitotrofo. Dependiendo de la especie de bacteria que se considere existen diversas formas de oxidar el tiosulfato: mediante la desproporción en sulfito y azufre elemental, catalizada por la rodanasa; por la acción de un complejo enzimático, denominado tiosulfato oxidasa, que genera directamente dos moléculas de sulfato; por la desproporción en sulfito y sulfuro, catalizada por la tiosulfato reductasa; mediante la oxidación a sulfato por la tiosulfato:aceptor óxido-reductasa, pasando previamente por la formación de tetrationato y tritionato ($S_3O_6^{2-}$).

Para la oxidación de sulfito a sulfato se han descrito dos vías diferentes: una catalizada por la sulfito oxidasa, que es la más frecuente, y otra en la que intervienen la APS reductasa y la ATP sulfurilasa, que es la vía principal en algunas bacterias fototróficas. La sulfito oxidasa es una molibdoproteína ligada a la membrana que transfiere los electrones directamente del sulfito al citocromo *c*. Esta enzima también se encuentra presente en organismos eucariotas, aunque en éstos su función no está relacionada con procesos de tipo energético. En plantas, la sulfito oxidasa se encuentra sólo en los peroxisomas y su función es de destoxificación, para eliminar el sulfito, que es un potente inhibidor de la catalasa de los peroxisomas. En animales, la enzima se localiza en el espacio intermembrana de las mitocondrias de células hepáticas y su función es la de oxidar el sulfito, producido en el catabolismo de la cisteína, hasta sulfato, que es usado en la formación de PAPS, y de esa forma se puede reincorporar al metabolismo. La enzima de eucariotas consiste en un homodímero (45 kDa cada subunidad), cada uno de los cuales presenta dos dominios funcionales: el N-terminal con un grupo hemo del tipo del citocromo b_5 y el C-terminal que contiene el cofactor de molibdopterina. En la sulfito oxidasa, los electrones pasan del sulfito a la molibdopterina, de ésta al citocromo b_5, que es el que termina cediéndolos al citocromo *c*. El dominio de la molibdopterina de la sulfito oxidasa presenta una elevada homología

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

con el de la nitrato reductasa, presentando un residuo de cisteína invariable que está implicado en la unión del cofactor a la enzima.

En algunas especies de *Chromatium* y de *Chlorobium* la oxidación del sulfito tiene lugar por una ruta que supone la inversión de la vía que se sigue en el proceso de asimilación por las bacterias reductoras de sulfato. La primera de las enzimas, la APS reductasa cataliza la unión de una molécula de AMP al sulfito que, simultáneamente, se oxida a sulfato, obteniéndose APS. En la reacción siguiente, catalizada por la ATP sulfurilasa, se libera el sulfato y se produce un compuesto de alta energía al convertir el AMP en ADP, por un mecanismo de fosforilación a nivel de sustrato.

Todos los electrones de los compuestos reducidos de azufre entran finalmente en la cadena de transportadores electrónicos, dependiendo de su potencial de reducción el que los electrones se incorporen a una flavoproteína (–0,2 V) o al citocromo *c* (+0,3 V) (Fig. 6.36).

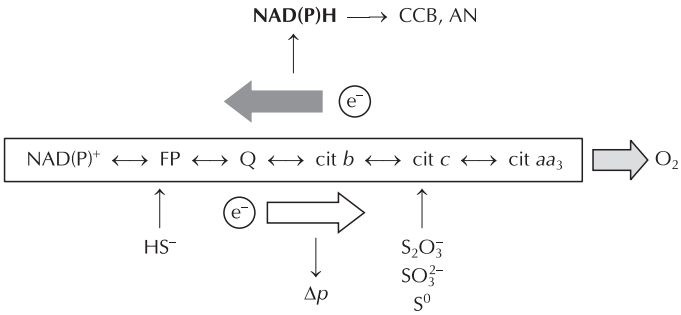


Figura 6.36. Metabolismo oxidativo del azufre. FP (flavoproteína); Q (quinonas); CCB (asimilación de CO_2); AN (asimilación de nitrógeno); Δp (fuerza motriz de protones).

Los electrones son transportados normalmente al oxígeno, actuando una citocromo oxidasa de tipo aa_3 como donadora terminal de los electrones. Cuando la oxidación de los compuestos de azufre se realiza en anaerobiosis y se acopla con un proceso de desnitrificación, como es el caso de *Thiobacillus denitrificans*, el citocromo *c* cede los electrones al nitrato a través de la nitrato reductasa. Este transporte electrónico genera la fuerza protón motriz que da lugar a la síntesis de ATP por la ATP sintetasa. Al igual que en otros procesos de las bacterias quimiolitotrofas, el potencial rédox de los compuestos de azufre utilizados no permite la reducción directa del $NAD(P)^+$, por lo que para la fijación autotrófica de CO_2 es necesario el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones en sentido inverso. Este flujo inverso de electrones posibilita la producción de NAD(P)H y el que se fije CO_2 por el ciclo de Calvin.

Metabolismo del azufre en fuentes hidrotermales submarinas

Los ecosistemas que se han considerado hasta ahora dependen directamente de la oxidación de la materia orgánica producida fotosintéticamente. Sin embargo, existen

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

algunos hábitats, como las comunidades asociadas a las fuentes termales de las grandes profundidades marinas, que son independientes de la entrada de energía solar. En estos ambientes, la energía que se emplea es de origen geotérmico y procede de manantiales asociados a zonas de expansión del fondo oceánico. En estos puntos, el agua penetra profundamente en la corteza terrestre y entra en contacto con la roca basáltica caliente provocando la disolución de minerales. Cuando el agua vuelve a salir, a gran presión y temperatura (~350 °C), contiene una gran cantidad de compuestos inorgánicos reducidos, como H_2S, S^0, H_2, NH_4^+, NO_2^-, Fe^{2+}, Mn^{2+}, CH_4 y CO. Al entrar en contacto con el agua fría del mar (2-3 °C) se desarrollan unas formaciones características que se conocen como fuentes hidrotermales, que son de dos tipos fundamentales en función de su génesis: templadas (chimeneas blancas), cuya temperatura varía entre 5 y 23 °C, y calientes (chimeneas negras), ricas en sulfuros minerales y que pueden alcanzar temperaturas cercanas a los 350 °C (a 2600 m de profundidad la temperatura de ebullición del agua es de ~450 °C). En las proximidades de estas fuentes se desarrollan comunidades muy activas de invertebrados, que incluyen gusanos tubícolas (de 2 m de longitud) y gran número de mejillones y almejas gigantes (20 y 25 cm, respectivamente). Estos animales dependen de la actividad de bacterias quimiolitotrofas que emplean las fuentes inorgánicas de energía procedentes de las propias fuentes hidrotermales. Entre los microorganismos que allí se desarrollan abundan los oxidadores de azufre, como *Beggiatoa, Thiomicrospira, Thiobacillus* y *Thiothrix*, que emplean H_2S, S^0 y $S_2O_3^{2-}$ como donadores de electrones para los procesos de obtención de la energía que sostiene a la comunidad global. Además, también existen bacterias nitrificantes, oxidadoras de hierro o de hierro y manganeso, metanógenos, metilotrofos y reductoras de sulfato. Los animales de estos hábitats no se alimentan de las bacterias, si no que es su capacidad autotrófica la que les proporciona el alimento. Algunas bacterias incluso viven en asociación directa con los animales, como es el caso de la bacteria oxidadora de azufre *Thiovulum*, que se encuentra en el tejido del trofosoma del tubo digestivo del gusano *Riftia* (Fig. 6.37).

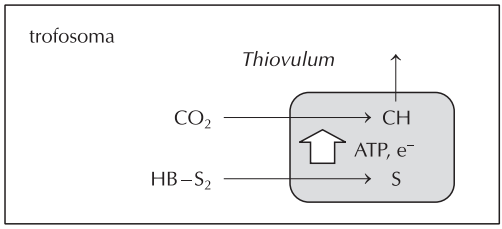


Figura 6.37. Asociación entre el gusano *Riftia pachyptila* y la bacteria *Thiovulum*. HB (hemoglobina). CH (azúcares).

Este gusano posee una hemoglobina que puede unir H_2S además de O_2, lo que les permite transportarlos hasta las bacterias sin resultar intoxicados. La presencia en el trofosoma de la Rubisco y de otras enzimas del ciclo de Calvin permiten la fijación del CO_2, que abunda en la sangre de *Riftia* (20-30 mM), por *Thiovulum*. Una asociación similar se ha encontrado también en las branquias de las almejas y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

mejillones gigantes, donde existen comunidades de bacterias oxidadoras de sulfuro. Mediante estudios de secuenciación de ácidos nucleicos y análisis filogenéticos se ha comprobado que todos los animales que viven en las fuentes hidrotermales submarinas albergan una bacteria simbionte principal, que varía entre los diferentes grupos de animales.

6.2.3. Ciclo del hierro

El hierro es un elemento esencial para la práctica totalidad de organismos vivos, llevando a cabo numerosas e importantes funciones fisiológicas, gracias a su estructura electrónica particular que le permite cambios reversibles en su estado de oxidación en un amplio rango de potenciales rédox: desde +300 mV, en citocromos de tipo *a*, hasta –490 mV, en algunas proteínas sulfoférricas. Debido a su versatilidad rédox, el hierro participa como cofactor en muchas enzimas y proteínas reguladoras, en la forma de grupo hemo (citocromos, hemoglobina, nitrato reductasa, catalasa, peroxidasa, ...), o de grupos con enlaces Fe–S (ferredoxina, nitrogenasa, muchas reductasas, ...). Sin embargo, existen algunos microorganismos, como *Lactobacillus plantarum* y *Borrelia burgdorferii*, que no contienen hierro y utilizan Mn o Co como componente metálico de las proteínas que normalmente contienen hierro.

El hierro es, después del Si, el O y el Al, el elemento más abundante en la corteza terrestre (~5%), mientras que los suelos se estima que poseen una media del 3,8% de hierro. En la naturaleza se encuentra, principalmente, en la forma ferrosa (Fe^{2+}) o en la férrica (Fe^{3+}), siendo generalmente el Fe^0 producto de la actividad humana para obtener hierro fundido. Por tanto, el ciclo biogeoquímico del hierro (Fig. 6.38) queda reducido a la conversión entre las formas ferrosa y férrica, que en función de las condiciones ambientales, puede ser tanto química como biológica, acoplada en este caso a procesos de conservación de la energía. El único aceptor de electrones capaz de oxidar espontáneamente al Fe^{2+} es el O_2, a pH neutro o básico, ya que a pH ácido, el Fe^{2+} es estable.

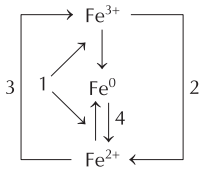


Figura 6.38. Ciclo del hierro. 1 (fundido de menas); 2 (reducción química o bacteriana); 3 (oxidación química o bacteriana); 4 (oxidación química).

En suelos anóxicos, el hierro suele encontrarse como Fe^{2+} y es soluble, mientras que la forma que abunda en condiciones aeróbicas es la de Fe^{3+}, que suele formar hidróxidos insolubles, lo que limita la cantidad de este metal que está realmente disponible. La solubilización del hierro de estos minerales se consigue gracias a diversos agentes quelantes orgánicos, denominados sideróforos. Las bacterias del suelo y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

los hongos producen estos compuestos orgánicos de baja masa molecular, con una alta afinidad por el Fe^{3+} y cuya síntesis se induce a bajas concentraciones de hierro. Generalmente son derivados de catecoles, en el caso de las enterobacterias (enteroquelina y enterobactina), o de hidroxamatos, como los sintetizados por estreptomicetos y otros grupos de bacterias (ferrioxaminas). En cada caso, el Fe^{3+} está quelado por numerosos grupos hidroxilo o carbonilo de varias moléculas de sideróforo. Por tanto, debido a su tamaño (entre 0,5 y 1,5 kDa), los complejos Fe^{3+}-sideróforos no pueden difundir libremente a través de la membrana externa de los microorganismos, por lo que se necesitan receptores específicos que se encuentran asociados a proteínas de transporte y enzimas que facilitan su penetración hasta el lugar de utilización fisiológica (Fig. 6.39). En *E. coli* la expresión del sistema está ligada a un operón que contiene tres genes que codifican la síntesis del sideróforo, la del receptor de membrana y la de una proteína citoplásmica represora, denominada Fur (17 kDa). La deficiencia de hierro induce la síntesis del sideróforo y del receptor, mientras que cuando se encuentra en exceso, el Fe se une a la proteína reguladora y este complejo Fe-proteína se fija a la región promotora del operón, reprimiendo la síntesis. Cuando la concentración de hierro disminuye, éste se disocia de la proteína, que se libera del DNA y cesa la represión.

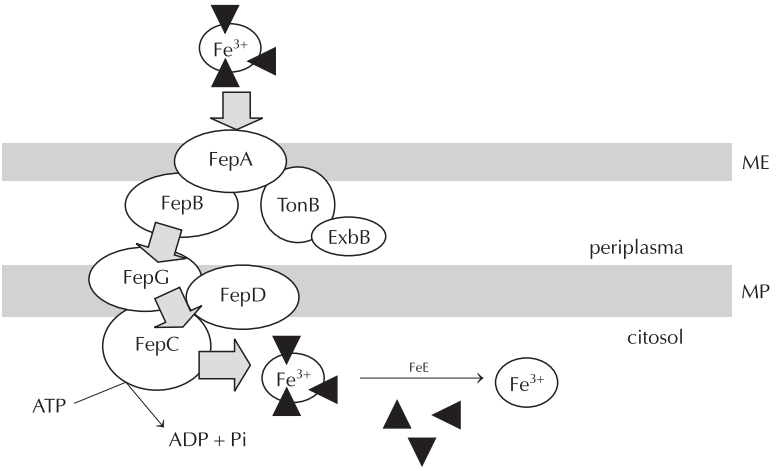


Figura 6.39. Transporte de hierro por el sistema de las enteroquelatinas. Las enteroquelatinas (triángulos negros) son derivados del catecol que forman complejos con el Fe^{3+} y lo transportan vía proteínas FepABCDG al citoplasma, donde la esterasa FeE libera el Fe^{3+}. El transporte requiere energía en forma de ATP (FepC) y Δp (TonB).

Las plantas, por su parte, pueden emplear dos estrategias distintas para solubilizar el hierro del suelo y absorberlo a través de las raíces. Así, las plantas dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas excretan protones y ácidos orgánicos (citrato y malato) a la rizosfera, con lo que se facilita la formación de complejos de Fe^{3+} que son reducidos por una férrico reductasa inducible de la membrana plasmática (Fig. 6.40 A). Los iones Fe^{2+} que se obtienen, más solubles, atraviesan dicha membrana a

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

través de un transportador de alta afinidad para dichos iones (K_m = 150 nM). Por su parte, las gramíneas excretan fitosideróforos, derivados de la metionina (ácidos muginéico y avénico), para solubilizar el Fe^{3+} de la rizosfera (Fig. 6.40 B). La excreción y reabsorción de los fitosideróforos requiere la inducción de dos proteínas transportadoras específicas, así como la de una nicotianamina sintasa, enzima homodimérica (30 kDa cada subunidad) encargada de la síntesis de nicotianamina a partir de tres moléculas de *S*-adenosilmetionina, como intermediario clave en la síntesis de los fitosideróforos.

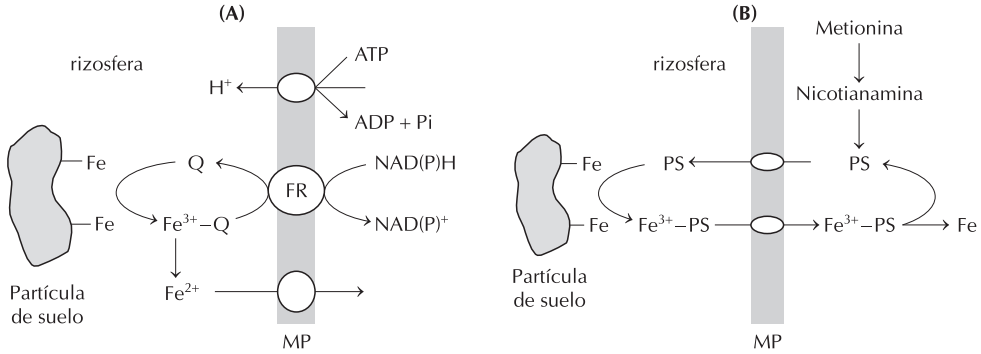


Figura 6.40. Absorción de Fe por dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas (izquierda) y por gramíneas (derecha). Q (quelante); FR (reductasa férrica); PS (fitosideróforos); MP (membrana plasmática).

En las aguas marinas superficiales, donde la concentración de hierro es del orden de 3,4 ppb (pg ml^{-1}), algunos microorganismos también emplean agentes quelantes para concentrar el hierro. La estructura de estos sideróforos es más compleja, ya que además de la porción peptídica que sirve para quelar el Fe^{3+} poseen una porción lipídica asociada que les permite interaccionar con la membrana celular. Sideróforos de este tipo, como la aquaquelina (Fig. 6.41), después de formar complejos con el Fe^{3+} se agregan en micelas y lo transportan al interior de la célula.

En la mayoría de los océanos, el polvo y la arena procedentes de la tierra proporcionan al fitoplancton la cantidad de hierro necesaria para su crecimiento, habiéndose observado (por mediciones realizadas con satélites) una buena correlación entre los perfiles de polvo en el aire y el crecimiento del fitoplancton. La limitación del hierro sobre la productividad biológica de los océanos afecta sobre todo al ciclo del carbono, ya que disminuye la fijación fotosintética del CO_2. La adición externa de hierro en zonas pobres en dicho metal (especialmente el Pacífico Ecuatorial o las aguas antárticas a una latitud superior a los 60º sur) incrementa la velocidad de este proceso y estimula el crecimiento del fitoplancton, produciéndose una disminución de hasta 60 ppm en los niveles de CO_2 atmosférico.

Por otro lado, concentraciones elevadas de hierro dentro de las células pueden ser tóxicas, principalmente por la capacidad que tiene de catalizar la producción de radicales libres a partir del oxígeno molecular. Por esta razón, los sistemas de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

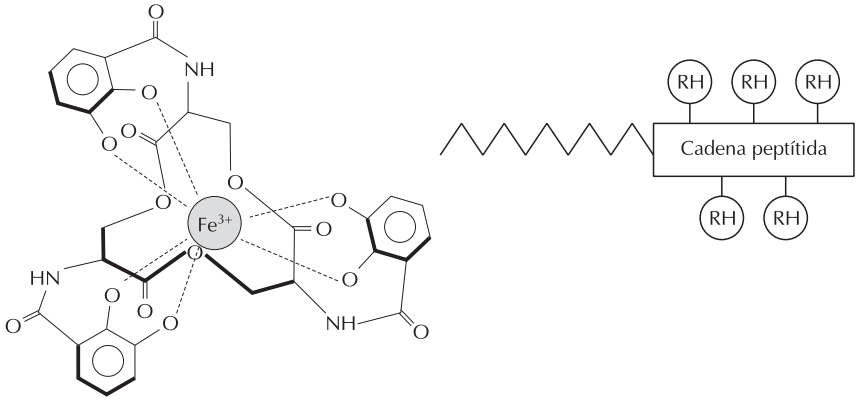


Figura 6.41. Estructura de sideróforos bacterianos. Izquierda: enterobactina de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Derecha: aquaquelina de bacterias marinas. RH (restos hidrofílicos: CH_2-OH, $-CHOH-COO-$, $-(CH_2)_3-NOH-COO-$, $-CH_2-CH_2-CO-NH_2$). La zona hidrofóbica se une a la membrana plasmática y la cadena peptídica forma el complejo con el Fe^{3+}.

adquisición de hierro están regulados y, además, en algunos organismos existen proteínas que secuestran el hierro libre en exceso, como la ferritina, la lactoferrina o la transferrina de los mamíferos. Esta última proteína es uno de los objetivos de algunos microbios patógenos, como es el caso de algunas cepas de *E. coli* que sintetizan un sideróforo, la aerobactina, que obtiene fácilmente el hierro que necesitan para crecer a partir del metal unido a la transferrina y, de esa forma, pueden iniciar la infección.

Reducción respiratoria de Fe^{3+}

En ambientes adecuados, como suelos encharcados, turberas o sedimentos anóxicos de lagos, algunos microorganismos (*Bacillus, Pseudomonas, Proteus, Alcaligenes* y otros) pueden utilizar Fe^{3+} como aceptor de electrones, consistiendo en una forma importante de respiración anaeróbica. Esta reducción es una de las reacciones geoquímicas más importantes en los sedimentos acuáticos anóxicos, debido a las implicaciones sobre la química orgánica e inorgánica de dichos ambientes. La forma en que se presenta el Fe^{3+} es crítica respecto a su biodisponibilidad: el hierro amorfo o goethita (FeOOH) se reduce 50 veces más rápido que la hematita (Fe_2O_3).

Dado el potencial de reducción del par Fe^{3+}/Fe^{2+} (+0,2 V a pH 7), la reducción del Fe^{3+} se puede acoplar a la oxidación de diversos donadores de electrones orgánicos (etanol, propanol, piruvato, acetato) e inorgánicos (H_2S, S^0, H_2). Se ha estimado que ~65% de la materia orgánica oxidada en los sedimentos anaeróbicos está asociada a la reducción microbiana de Fe^{3+}, desempeñando este proceso un papel muy importante en la eliminación de contaminantes orgánicos de acuíferos ricos en hierro férrico. Los electrones procedentes de estos compuestos se transfieren a través de una cadena de transportadores electrónicos hasta llegar a un sistema hierro férrico reductasa,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

dando lugar a una fuerza protón motriz que se puede emplear para la síntesis de ATP. La reacción en el caso de *Geobacter metallireducens*, que puede oxidar acetato con Fe^{3+} como aceptor de electrones, es:

$$H_3C{-}COO^- + 8\ Fe^{3+} + 4\ H_2O \longrightarrow 2\ HCO_3^- + 8\ Fe^{2+} + 9\ H^+$$
$$(\Delta G^{o\prime} = -233\ \text{kJ mol}^{-1})$$

La hierro férrico reductasa de microorganismos consiste en una proteína monomérica (32 a 41 kDa), que se encuentra asociada a la membrana y a la cadena de transporte de electrones en muchos de ellos (como *Shewanella, Geobacter* o *Magnetospirillum*), aunque en otras ocasiones es soluble y puede encontrarse en el citoplasma o en el periplasma (*Mycobacterium, Pseudomonas, Bacillus* o *Rhodopseudomonas*). La enzima requiere NADH como donador de electrones y FMN como cofactor, habiéndose descrito la participación de citocromos de tipo *b* y *c* en el proceso de reducción desasimiladora del Fe^{3+}. La actividad de la enzima está regulada, además de por la concentración de hierro, por la presencia de nitrato, debido a la competición entre ambos por los reductores comunes para la respiración.

En levaduras y plantas, la férrico reductasa que participa en la adquisición de hierro se localiza en la membrana y su síntesis se induce junto con la de proteínas transportadoras de alta y baja afinidad por el Fe^{2+}. La regulación de este sistema es a nivel transcripcional en respuesta a la deficiencia de hierro o de cobre. En las plantas, la enzima se localiza en la raíz y pertenece a la superfamilia de los flavocitocromos que transportan electrones a través de la membrana, empleando NAD(P)H como donador de electrones.

Oxidación bacteriana del Fe^{2+}

En condiciones alcalinas o neutras y en presencia de oxígeno, el hierro ferroso es inestable y se oxida espontáneamente a hierro férrico. En esas condiciones, los microorganismos no pueden obtener energía de los procesos de oxidación. No obstante, en la interfase entre las aguas subterráneas anóxicas ricas en hierro y el aire, algunos quimioorganotrofos (*Gallionella* y *Leptothrix*) pueden oxidar Fe^{2+}. Sin embargo, es en condiciones ácidas y ambientes oxigenados, donde el Fe^{2+} es bastante estable y, por tanto, algunos microorganismos acidófilos (*Thiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferrooxidans* y algunas cepas de *Sulfolobus acidocaldarius*) pueden oxidarlo quimiolitotróficamente a Fe^{3+}

$$2\ Fe^{2+} + \tfrac{1}{2}\ O_2 + 2\ H^+ \longrightarrow 2\ Fe^{3+} + H_2O \qquad (\Delta G^{o\prime} = -32{,}9\ \text{kJ mol}^{-1})$$

Estos organismos son muy comunes en medios ácidos contaminados, como las escorrentías de las minas de carbón. Con la excepción de *L. ferrooxidans*, estas mismas bacterias pueden oxidar también compuestos reducidos de azufre.

Debido a que en este proceso se genera muy poca energía, estas bacterias tienen que oxidar grandes cantidades de hierro para poder desarrollarse, lo que lleva consigo la formación de una gran cantidad de Fe^{3+}, más insoluble, que precipita en forma de $Fe(OH)_3$.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El potencial rédox del par Fe^{3+}/Fe^{2+} (+0,77 V a pH 2) está muy próximo al del par ½ O_2/H_2O (+0,82 V), por lo que una cadena de transporte de electrones entre ambos sería muy corta y difícilmente generará ATP por fosforilación oxidativa. En la práctica, en el acidófilo *Thiobacillus ferrooxidans* dicha cadena está formada por una proteína periplásmica con cobre, la rusticianina, y citocromos de tipo *a* y *c* (Fig. 6.42). La oxidación del Fe^{2+} tiene lugar en el periplasma y está catalizada por la rusticianina, proteína monomérica (16,8 kDa) asociada a la membrana, que contiene cobre (del tipo de las cupredoxinas), con un alto potencial rédox (+0,68 V a pH 2) y que presenta una gran estabilidad en medios ácidos. Los electrones son transferidos al oxígeno a través de un citocromo c_4 de alto potencial y de éste a un citocromo *a*, que actúa en la cara citoplasmática. Los protones necesarios para formar H_2O se obtienen del citoplasma, por lo que mientras exista Fe^{2+} disponible, la célula puede bombearlos desde el medio externo, a través de la ATP sintetasa, con la consiguiente síntesis de ATP. Debido al elevado gradiente natural de protones a través de la membrana de *T. ferrooxidans* (el pH en el citoplasma es de ~6 y en el periplasma es ~2), los H^+ que entran en el citoplasma tienen que ser consumidos para mantener el pH interno dentro de unos límites aceptables. Por lo que respecta a la obtención del poder reductor necesario para la fijación de CO_2, y al igual que ocurre en las bacterias nitrificantes, el alto potencial del par Fe^{3+}/Fe^{2+} impide reducir directamente al NAD^+, por lo que una parte importante de la energía producida en la oxidación del hierro se emplea en las reacciones del flujo inverso de electrones. Esto redunda, de nuevo, en que el rendimiento energético y de biomasa del proceso de oxidación del hierro ferroso sea pobre y en la gran cantidad de hierro que es necesario oxidar para producir incluso pequeñas cantidades de material celular, lo cual provoca que se acumulen grandes cantidades de precipitados de Fe^{3+}.

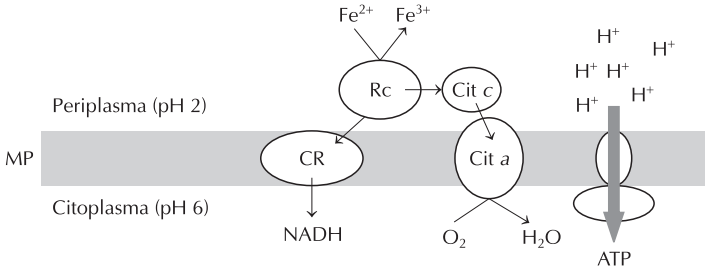


Figura 6.42. Metabolismo del Fe^{2+} en *Thiobacillus ferrooxidans*. Rc (rusticianina); CR (cadena respiratoria (complejos III y I). El NADH generado por transporte inverso de e^- y el ATP generado por el fuerte ΔpH (4 unidades) se utilizan para fijar CO_2 por el ciclo de Calvin.

Algunas bacterias fototróficas anoxigénicas pueden oxidar Fe^{2+} en condiciones anaeróbicas. En este caso, el Fe^{2+} sirve como donador de electrones para la reducción del CO_2 y no para la obtención de ATP. A pH neutro el potencial del par Fe^{2+}/Fe^{3+} es de +0,2 V, y los electrones pueden reducir el citocromo *c* del fotosistema de las bacterias rojas del azufre, relacionadas filogenéticamente con *Chromatium*. Estas bacterias también pueden usar FeS. En estas condiciones, tanto el Fe^{2+} como el S^{2-} pueden

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ser donadores de electrones. Algunas bacterias fototrofas verdes del azufre (*Chlorobium*) también pueden emplear el Fe^{2+} como donador de electrones fotosintético. La capacidad de oxidar Fe^{2+} en condiciones anóxicas por las bacterias fototróficas anoxigénicas ofrece una explicación plausible a la formación de los grandes depósitos de hierro férrico presentes en sedimentos antiguos.

Algunos microorganismos reductores de nitrato que viven en sedimentos marinos y de agua dulce, pueden emplear en condiciones anóxicas el Fe^{2+} como donador de electrones y el NO_3^- como aceptor. La reducción del nitrato se produce con la acumulación concomitante de óxidos de hierro férrico:

$$10\ Fe^{2+} + 2\ NO_3^- + 24\ H_2O \longrightarrow 10\ Fe(OH)_3 + N_2 + 18\ H^+$$

Entre estos organismos que acoplan la oxidación del hierro a la reducción de nitrato se encuentra la arqueobacteria termófila *Ferroglobus placidus*, un anaerobio obligado que vive a pH neutro en fuentes hidrotermales marinas templadas (~85 ºC). Además de Fe^{2+}, puede emplear H_2 y S^{2-} como donadores de electrones para la reducción del NO_3^-. En presencia de $S_2O_3^{2-}$ y de Fe^{2+}, *F. placidus* crece produciendo FeS y SO_4^{2-}.

6.2.4. Ciclo del fósforo

El fósforo es uno de los componentes esenciales para todos los seres vivos, ya que forma parte de diversos compuestos de fosfato indispensables para la vida. El fosfato forma parte de la molécula de ATP, cuya hidrólisis (la de un enlace fosfato) para formar ADP constituye la base de una gran parte de las reacciones de transferencia de energía en los sistemas biológicos. Los fosfolípidos, que contienen grupos fosfato hidrofílicos, son uno de los componentes principales de las membranas biológicas. Los enlaces fosfodiéster forman las uniones de los nucleótidos en los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Muchas de las coenzimas también contienen fósforo (FMN, NADH, NADPH) Además, forma parte de una gran cantidad de azúcares fosfatados y de ésteres de fosfato. El fosfato, además, se emplea como un agente modificador de la estructura de muchas proteínas, que se ven afectadas sensiblemente en su función.

En una gran parte de ecosistemas, como pueden ser los acuáticos, los principales nutrientes limitantes del crecimiento son el carbono, el nitrógeno y el fósforo. Teniendo en cuenta la composición media de las moléculas biológicas que forman los seres vivos, la relación atómica que se requiere de estos tres elementos es de 106:16:1, respectivamente. A pesar de que es el que se necesita en mayor proporción, el carbono suele estar en exceso, bien en forma de CO_2 o en forma de moléculas orgánicas sencillas. Por su parte, el nitrógeno suele ser limitante en los suelos, debido a que la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico se encuentra muy restringida y otras formas, como el nitrato o el nitrito, no abundan en muchos ecosistemas. Sin embargo, en el agua la presencia de organismos fijadores es bastante común, por lo que no suele ser tampoco limitante, a pesar de que en algunas regiones, especialmente en los océanos, su concentración es baja (60 ppb). Por tanto, queda el fósforo como el elemento que normalmente limita el crecimiento.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la naturaleza, el fósforo prácticamente no está presente en forma gaseosa, por lo que no se puede obtener de la atmósfera. Tampoco es apreciable la cantidad de este elemento que está disponible por lixiviación de los suelos, ya que sus cargas negativas le hacen unirse fuertemente a las partículas del suelo, formándose fosfatos poco solubles con metales divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}, fundamentalmente) y con el Fe^{3+}, a pH neutro o alcalino. Por tanto, en las aguas superficiales, la mayoría del fósforo se encuentra en la biomasa del fitoplancton, por lo que su disponibilidad depende del reciclado de la biomasa por parte de las bacterias.

En los ecosistemas acuáticos, parte del fósforo se deposita en forma de fosfatos en los sedimentos, donde también se depositan los organismos muertos. La solubilidad del fosfato en estos sedimentos se favorece con la anoxia, que provoca la reducción y solubilización de los iones metálicos, y con la acidificación, ya que la disminución del pH origina otras formas más solubles de fosfato: HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$ y H_3PO_4. Las corrientes de convección provocan que, durante el invierno, el fósforo se transporte hacia las capas superiores, más frías, y permite el crecimiento en la superficie del plancton durante la primavera.

Otra gran reserva de fósforo inerte lo constituyen las rocas fosfatadas como la fosforita, rica en apatito [$3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(FeCl)_2$], aunque la industria de los abonos está explotando cada vez más esta reserva. La mayoría de este fósforo añadido como fertilizante queda inmovilizado rápidamente en los suelos en forma de sales inorgánicas, y en la mayoría de los casos se ha observado que no migra más de 2-3 cm desde el grano de fertilizante. No obstante una pequeña parte es arrastrado por el agua, en forma de partículas y de sedimentos suspendidos, y termina perdiéndose en el mar.

Al contrario de lo que sucede en los ciclos de los otros elementos, durante la mayor parte del ciclo microbiano del fósforo su estado de oxidación se mantiene en +5. La mayoría de las transformaciones mediadas por los microorganismos se refieren a transferencias de fosfato inorgánico a orgánico, o de formas de fosfato insolubles e inmovilizadas a otras solubles y móviles (Fig. 6.43). Lo mismo ocurre con los organismos eucariotas.

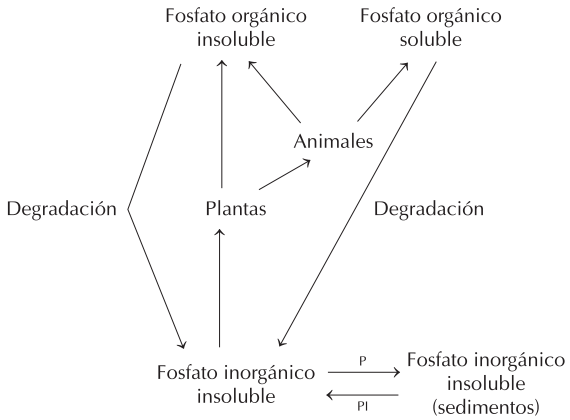


Figura 6.43. Ciclo del fósforo. P (precipitación). PI (procesado industrial).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Diversos microorganismos han desarrollado sistemas de transporte para facilitar la obtención del fosfato presente en el ambiente. Así en *E. coli* existe un sistema complejo, denominado Pst, que promueve la adquisición de fosfato inorgánico en presencia de cationes divalentes (Mg^{2+}, Ca^{2+} y Mn^{2+}) que forman fosfatos metálicos solubles, de fórmula $MHPO_4$, que son transportados mediante un sistema de simporte con protones, por lo que resulta inhibido si disminuye el pH interno. Este sistema (Fig. 6.44) está formado por una porina (homotrímero de PhoE), que se sitúa en la membrana externa, la proteína periplasmática de unión (PBP, codificada por el gen *pstS*) y el sistema de transporte del fósforo a través de la membrana plasmática, formado por los polipéptidos PstA, PstB y PstC. Además, existe otra proteína en el periplasma que libera fosfato inorgánico de compuestos organofosfatados, de manera que puede unirse a PBP. Se trata de una fosfatasa alcalina (PA) que está codificada por el gen *phoA*. También se han descrito dos proteínas reguladoras primarias, PhoR (que se encuentra integrada en la membrana plasmática) y PhoB (citoplásmica), que llevan a cabo un ciclo de autofosforilación-transfosforilación. Por último, otra proteína citoplásmica, PhoU, estimula la desfosforilación de PhoB. El sitio de unión al DNA para la proteína PhoB fosforilada es la caja *Pho*.

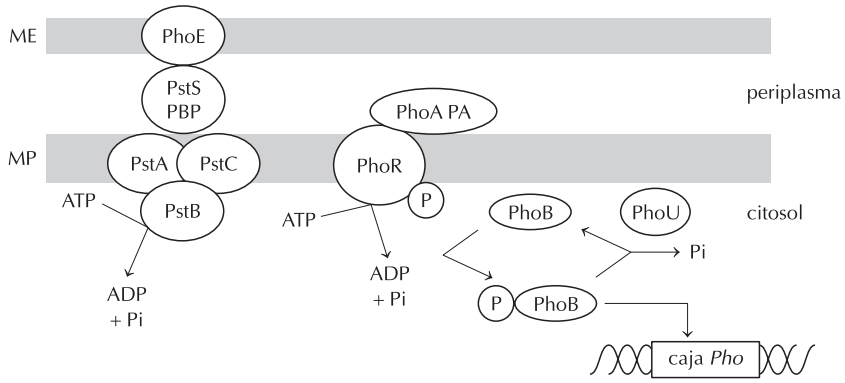


Figura 6.44. Sistema de transporte de fosfato (Pst) en *E. coli*. MP (membrana plasmática); ME (membrana externa).

Las plantas llevan a cabo un transporte activo del fosfato a través de la raíz, debido a que éste debe pasar de un medio, la rizosfera, donde se encuentra a una concentración ~1 μM, al interior de las células donde la concentración citoplásmica de P_i es milimolar. El proceso, al igual que el de otros aniones importantes (NO_3^-, SO_4^{2-}, ...) está mediado por un cotransporte acoplado al de los H^+ (dos o más H^+ por cada PO_4^{3-}), lo que implica que en muchas ocasiones se alcalinice el medio externo y se acidifique el citoplasma. El transportador de fosfato consiste en una proteína con seis dominios transmembranales en el extremo N-terminal y otros seis en el extremo C-terminal unidos por una región central hidrofílica, que se sitúa en el citoplasma y que presenta un sitio de fosforilación mediada por la proteína quinasa C. En el extremo C-terminal posee otro sitio de fosforilación, pero en este caso mediada por la caseína quinasa II, y un sitio de N-glucosilación. El transportador presenta una alta afinidad

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

para el fosfato (K_m = 1 a 5 μM) y se encuentra regulado, a nivel transcripcional, por la concentración interna de P_i.

En animales, el transporte del fosfato inorgánico está ligado al del Na^+, habiéndose descrito hasta tres tipos diferentes de transportadores Na^+/P_i, que se expresan en el córtex renal (tipos I y II), así como en otros muchos tejidos (tipo III). Todos ellos se encuentran sometidos a retrorregulación por parte del P_i.

En muchos hábitats, los fosfatos se combinan con el calcio, volviéndose inaccesibles para las plantas y para muchos microorganismos. La solubilización del fosfato se lleva a cabo por las bacterias heterótrofas, normalmente excretando ácidos orgánicos, aunque algunos organismos quimiolitotrofos, como *Nitrosomonas* y *Thiobacillus*, movilizan el P_i gracias a la producción de ácido nitroso y ácido sulfúrico, respectivamente. En el caso de suelos con fosfatos insolubles de hierro, magnesio o aluminio, la solubilización suele estar ligada a la reducción del metal. Así, los microorganismos reducen el hierro férrico a ferroso, en condiciones anóxicas, favoreciendo la solubilización del fosfato. En muchos casos, la movilización del fosfato por las bacterias es beneficiosa para las plantas, pero en otras muchas ocasiones ambos compiten por los recursos de fosfato existentes, ya que la asimilación de fósforo para formar los componentes celulares (membranas, ácidos nucleicos, etc.) lo elimina del reservorio disponible.

Para resolver el problema de la limitación de P en el suelo, así como su baja solubilidad, las plantas emplean diversas estrategias, como la de excretar al medio ácidos orgánicos y H^+ para solubilizar los fosfatos inorgánicos, exudar fosfatasas para liberar el fosfato orgánico unido al suelo, aumento de la densidad de pelos radicales, asociación simbiótica de la raíz con hongos del suelo (micorrizas, véase Capítulo 18), alteración de la forma de la raíz, etc.

En las células también se produce el fenómeno inverso a la asimilación, la mineralización del fosfato orgánico catalizada por enzimas del tipo fosfatasa, que pueden ser producidas por muchos microorganismos:

$$\text{R-O-PO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R-OH} + \text{HPO}_4^{2-}$$

Además, algunas bacterias y hongos producen la enzima fitasa, que libera fosfatos inorgánicos solubles a partir del ácido fítico (hexafosfato de inositol), que sirve como molécula de almacenamiento de nutrientes minerales (P, Mg^{2+}, K^+ y, en menor extensión, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+} y Fe^{2+}) en semillas:

$$\text{Hexafosfato de inositol} + 6\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{inositol} + 6\ \text{PO}_4^{3-}$$

Recientemente se ha demostrado que, además de como fosfato (estado de oxidación +5), el fósforo también puede participar en el ciclo biogeoquímico en diferentes formas más reducidas: el fosfonato ($R\text{-}PO(OH)_2$) y el fosfito (HPO_3^{2-}), con valencia +3; el fosfinato ($R_2PO(OH)$) y el hipofosfito (HPO_2^{2-}), con +1; y una forma equivalente al NH_3, denominada fosfina o fosfuro de hidrógeno (PH_3), con –3. Fosfonato y fosfinato presentan enlaces directos P–C, y son compuestos importantes del metabolismo secundario de los organismos en que se encuentran, incluyendo humanos, plantas y bacterias. Por ejemplo, en *Tetrahymena* un 30% de los lípidos de membrana están en

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

forma de fosfonolípidos. Algunas bacterias pueden emplear los fosfonatos como fuente de fósforo para los procesos de biosíntesis durante el crecimiento.

Existen diferentes microorganismos que pueden utilizar las reacciones de oxidación de los compuestos de fósforo como fuente de energía para su crecimiento. La bacteria quimiolitotrofa *Desulfotignum phosphitoxidans*, filogenéticamente relacionada con *Desulfobacter*, es capaz de acoplar la oxidación de fosfito a fosfato en condiciones anaeróbicas, actuando el fosfito como único donador de electrones, con la reducción de sulfato a sulfuro. En estas condiciones, la bacteria lleva a cabo un crecimiento autotrófico reduciendo CO_2 a acetato:

$$4\ HPO_3^{2-} + SO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow 4\ HPO_4^{2-} + HS^-$$
$$(\Delta G^{o\prime} = -91\ \text{kJ mol fosfito}^{-1} = -364\ \text{kJ mol sulfato}^{-1})$$

$$4\ HPO_3^{2-} + 2\ CO_2 + 2\ H_2O \longrightarrow 4\ HPO_4^{2-} + CH_3COO^- + H^+$$
$$(\Delta G^{o\prime} = -77\ \text{kJ mol fosfito}^{-1} = -308\ \text{kJ mol acetato}^{-1})$$

La energía proporcionada por la reacción de oxidación del fosfito es suficiente para generar ATP, probablemente por fosforilación a nivel de sustrato, debido a que no se conocen transportadores que puedan aceptar electrones a un potencial tan negativo como el del par fosfato/fosfito (–0,69 V). En ausencia de sulfato, este microorganismo, anaerobio estricto, puede acoplar la oxidación de fosfito a la síntesis homoacetogénica de acetato.

Pseudomonas stutzeri posee un sistema enzimático que posibilita la oxidación de fosfito e hipofosfito hasta fosfato. La oxidación del hipofosfito transcurre en dos pasos, con formación de fosfito como intermedio. La primera de las enzimas (HtxA) es una hipofosfito dioxigenasa que utiliza O_2 como aceptor de electrones, 2-oxoglutarato como cofactor y produce fosfito, succinato y CO_2. El NO_3^- no puede sustituir al O_2 en este proceso. La oxidación del fosfito está catalizada por una fosfito deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (PtxD). Esta enzima produce estequiométricamente NADH y fosfato a partir de NAD^+ y fosfito. La reacción inversa no se da debido a que, al ser tan negativo el potencial redox del par fosfato/fosfito, la reducción del NAD^+ con fosfito es muy exergónica ($\Delta G^{o\prime} = -63{,}62$ kJ mol^{-1}). De hecho, esto convierte a PtxD en una enzima muy útil para sistemas que necesiten estar regenerando continuamente NADH (Fig. 6.45).

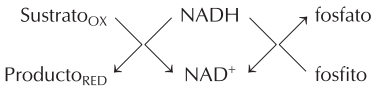


Figura 6.45. Regeneración de NADH por la fosfito deshidrogenasa (NAD^+: fosfito óxido-reductasa); ox (oxidado); red (reducido).

Junto con los genes que codifican estas enzimas se encuentran otros para sistemas de transporte de fosfito (PtxABC) y de hipofosfito (HtxBCDE), similares a los que hay en *E. coli* para el transporte de fosfonatos. Aunque, hasta el momento, no se ha detectado la presencia de fosfito ni de hipofosfito en el ambiente, el hecho de que existan

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

organismos que pueden usar fosfito como única fuente de energía y de que en otros existan sistemas específicos para su oxidación, sugieren que realmente deben estar presentes. Se ha sugerido que el fosfito se puede producir en medios anóxicos, a partir de la degradación de compuestos orgánicos fosforados.

Por otro lado, en *E. coli* se ha encontrado que la fosfatasa alcalina de esta bacteria posee una actividad hidrogenasa, en la que la producción de H_2 depende de la oxidación del fosfito a fosfato. Esta reacción no tiene precedentes en la bioquímica del H ni en la del P, y en ella se produce la transferencia del hidruro desde el sustrato a los protones procedentes del agua.

La fosfina es un gas incoloro, de olor desagradable, inflamable y que explota a temperatura ambiente. Es un compuesto muy tóxico y se suele emplear como agente para matar ratas en almacenes de grano. En la naturaleza, la fosfina se puede originar en la descomposición de la materia orgánica por microorganismos y se ha detectado en suelos, sedimentos, tracto intestinal de los animales, lodos fecales, estiércol, plantas de tratamiento de aguas residuales y zonas pantanosas. Se ha propuesto que en estas condiciones, anóxicas y en ausencia de nitrato y sulfato, el fosfato puede actuar como aceptor final de los electrones y se reduce a PH_3, probablemente a través de una ruta que implique la formación de fosfito, hipofosfito o fósforo, como intermediarios.

La fosfina es volátil y arde espontáneamente en contacto con el O_2, produciendo un brillo verde característico. En zonas pantanosas o en cementerios, donde la descomposición de materia orgánica es intensa, se produce además CH_4, que también se inflama con la fosfina, causando el fenómeno conocido como "fuegos fatuos". El PH_3 también se produce en los sedimentos de arrozales y en la atmósfera local, ya que una pequeña fracción de la fosfina no queda retenida y se emite a la atmósfera. Los niveles de PH_3 determinados en la atmósfera de los extensos arrozales de China son muy superiores a los que se puedan medir en Europa o América.

En los ambientes acuáticos, la concentración de fosfato está muy relacionada con la eutrofización. Los lagos, en los que el fosfato es un factor limitante, suelen ser oligotróficos, es decir, que en ellos escasean los nutrientes necesarios para un crecimiento normal. Un suministro excesivo de fosfato, a través de actividades antropogénicas (vertidos de polifosfatos de algunos detergentes o de tipo agrícola, especialmente en zonas de empleo masivo de fertilizantes), puede originar un aumento de la producción biológica y una potencial disminución del contenido de oxígeno que terminen produciendo la eutrofización. Las floraciones de algas y cianobacterias en estos ambientes con limitación de fósforo son proporcionales al exceso de este elemento añadido. El incremento de biomasa y su subsiguiente descomposición eleva la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua, lo que provoca una disminución del oxígeno disponible para otros organismos y da lugar a una gran mortalidad piscícola.

Los polifosfatos, empleados sin control durante mucho tiempo en la elaboración de detergentes para lavadoras, presentan una serie de propiedades diferentes a las del fosfato. Estos compuestos, son mucho más solubles que el fosfato, incluso en aguas duras con elevadas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+}, con los que forman complejos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

solubles (Fig. 6.46), impidiendo la formación de carbonatos insolubles al aumentar la temperatura y el pH del agua, condiciones a las que trabajan los detergentes orgánicos. Uno de los que más corrientemente se ha empleado es el tripolifosfato sódico (STP) que se degrada fácilmente a fosfato, que puede ser usado como nutriente por los organismos (biodegradable). El problema de la eutrofización se plantea cuando se produce el vertido indiscriminado de los detergentes con polifosfatos. Por esta razón, en muchos países se ha limitado drásticamente su uso, habiéndose sustituido, principalmente, por las zeolitas, minerales sintéticos de aluminosilicatos que intercambian Ca^{2+} y Mg^{2+} con Na^{+}.

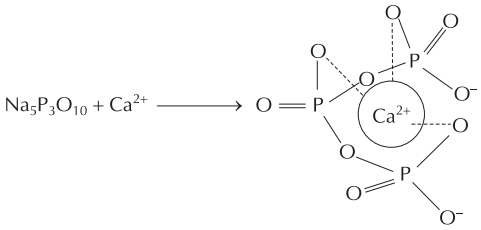


Figura 6.46. Formación del complejo STP–Ca^{2+}.

6.2.5. Ciclos de otros elementos

Además de los ciclos descritos en los apartados anteriores, se pueden considerar los de algunos otros elementos, aunque la importancia de éstos y su influencia sobre el desarrollo de los organismos es claramente inferior. No obstante, hay que aclarar que algunos de estos elementos son esenciales para todos, o al menos, para la gran mayoría de los organismos.

Sodio y potasio

El sodio y el potasio son dos nutrientes minerales que, en forma de cationes monovalentes, juegan un papel importante en muchas células. Entre sus funciones se encuentran las de generar gradientes y diferencias de potencial eléctrico a través de la membrana, la transmisión de impulsos nerviosos, mantener el equilibrio osmótico y de carga, etc. Las concentraciones intracelulares de estos iones deben mantenerse constantes frente a las concentraciones de esos mismos iones en el medio externo, que pueden diferir en varios órdenes de magnitud (Tabla 6.5).

En la conservación de estos gradientes, los organismos deben emplear una parte importante de la energía producida para mantener un sistema homeostático de flujos iónicos. Un papel importante que llevan a cabo estos iones, principalmente el potasio, es el de equilibrar las cargas negativas del interior celular, ya que al pH fisiológico una gran cantidad de compuestos orgánicos son aniónicos (DNA, RNA, lípidos, sustratos, etc.). Parte de estos efectos osmóticos y de carga se compensan también

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 6.5. Concentración de los principales cationes y aniones en el interior de las células de los organismos vivos y en sus ambientes (mM).

Sistema	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HPO_4^{2-}	HCO_3^-
Agua de mar	460	10	10	52	550	< 1	30
*Valonia**	80	400	1,5	50	50	5	~10
Glóbulos rojos	11	92	10^{-4}	2,5	50	3	~10
Plasma sanguíneo	160	10	2	2	100	~3	30

* *Valonia* es un alga unicelular marina

con la eliminación de iones Cl^- y con la participación de otros cationes, como el Mg^{2+}. En estos movimientos de iones, que deben atravesar las membranas lipídicas apolares, son necesarios sistemas de transporte pasivo (canales iónicos), que funcionan a favor de gradiente, o bombas específicas que, con gasto de ATP, transportan activamente los iones en contra de su gradiente. En algunos casos se pueden intercambiar iones a través de la membrana (Na^+ por H^+, $2Na^+$ por Ca^{2+}, ...).

En general, la concentración de potasio en el material biológico es del orden de quince veces superior a la del sodio. La importancia del Na^+ y del K^+ varía de unos organismos a otros, dándose la circunstancia de que, por ejemplo, en las plantas, el K^+ se considera uno de los macronutrientes esenciales y se encuentra en los tejidos a una concentración de ~17 mM, mientras que el Na^+, que se encuentra a concentraciones del orden de µM o inferiores, no es esencial para muchas de ellas, aunque su presencia puede ser beneficiosa para el crecimiento de algunas. Para la mayoría de las plantas terrestres el Na^+ es tóxico a bajas concentraciones. No obstante, en el caso de algunas algas marinas, como *Acetabularia*, los iones Na^+ sustituyen a los H^+ en un proceso tan importante como es el de la entrada en las células de NO_3^- y de algunos aminoácidos. En estas algas, la adquisición de NO_3^- se realiza acoplada al simporte con iones Na^+, proceso que se ve impulsado por la alta concentración de Na^+ en el mar (~480 mM).

Aunque son dos elementos del mismo grupo de la tabla periódica (metales alcalinos) y, por tanto, muchas de sus propiedades son parecidas, sodio y potasio presentan un comportamiento geoquímico algo diferente. Ambos son componentes de muchos feldespatos, de los que son fácilmente liberados por meteorización, siendo adsorbidos por las arcillas y materiales orgánicos (humus), que tienen en sus superficies cargas negativas, pero el potasio es adsorbido más fuertemente. El sodio puede ser reemplazado isomórficamente en los silicatos por el calcio, debido a que tienen un radio iónico parecido, mientras que el potasio se encuentra en minerales procedentes de rocas ígneas (ortoclasa y micas). Al contrario que el sodio, el potasio se reincorpora con facilidad a la estructura de los silicatos formando minerales arcillosos. Además, el potasio se intercambia con más dificultad que el sodio de las estructuras aluminosilicatadas de dichos minerales. La solubilidad de las sales sódicas es mayor que la de las correspondientes potásicas, siendo mucho más elevada la concentración de Na^+ que la de K^+, tanto en aguas dulces como en los mares (en el océano es de 10,54 g dm^{-3} la de Na^+ y 0,39 g dm^{-3} la de K^+, mientras que en agua dulce la concentración de K^+ es la tercera parte de la del Na^+).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Además, el potasio es, junto con nitrógeno y fósforo, uno de los tres mayores elementos fertilizantes. Al contrario de lo que ocurre con el nitrógeno, el exceso de potasio no es lixiviado sino que permanece en el suelo adsorbido en las arcillas, de donde es retirado cuando lo necesitan las plantas. No obstante, esa capacidad de retención puede representar un problema, ya que cuando se administra un fertilizante con K^+ a un suelo empobrecido en este elemento, parte de él queda retenido en las arcillas y el aumento de la cosecha que se observa es menor del que cabría esperar.

El K^+ es el catión más abundante en las células vegetales, oscilando su concentración en el citoplasma de los distintos tipos de células entre 80 y 200 mM. Puede actuar como un elemento osmorregulador, equilibrando las cargas de otros iones, activando más de 50 enzimas y participando en numerosos procesos metabólicos, como la fotosíntesis, el metabolismo oxidativo o la síntesis de proteínas. El K^+ del suelo penetra en las plantas a través de las raíces mediante dos sistemas de transporte, uno de alta afinidad (K_m = 5 a 30 μM), que es saturable y funciona cuando hay poco potasio disponible (menos de 100 μM), y otro de baja afinidad, que es activo cuando la concentración externa de K^+ es alta. El primero de los sistemas implica un transporte activo ligado a la hidrólisis de ATP, mientras que en el segundo el K^+ se transporta de forma pasiva, a través de un canal iónico, a favor del gradiente de concentración (cinética lineal de primer orden). Este canal está formado por cuatro cadenas peptídicas iguales que contienen seis dominios hidrofóbicos cada una y que atraviesan la membrana plasmática. Por su parte, el transportador de alta afinidad está constituido por una proteína de 79 kDa con doce dominios hidrofóbicos transmembrana.

Calcio y magnesio

El calcio y el magnesio son otros dos elementos esenciales para los organismos vivos. Ambos son importantes para la actividad de numerosas enzimas, así como en su regulación. El calcio es también un estabilizante de muchos componentes estructurales de la pared celular bacteriana, y forma parte de diversos sistemas importantes de algunos eucariotas (huesos, conchas, etc.). Los iones Ca^{2+} son uno de los factores necesarios en la activación del fibrinógeno para la coagulación sanguínea. Cada tipo de orgánulo y cada tipo de vesícula de los organismos eucariotas tiene su particular concentración de Ca^{2+} libre y de proteínas que lo unen. Las corrientes de calcio a través de las membranas regulan importantes procesos celulares. Por su parte, el magnesio juega un papel fundamental en el metabolismo del fosfato, incluidas las reacciones en las que participan el ATP, que generalmente forma complejos Mg-ATP^{2-}, y los otros NTP. La fotosíntesis está ligada también a la presencia de Mg^{2+} en las clorofilas. En las membranas y paredes celulares, el magnesio se emplea como elemento que estabiliza los entrecruzamientos, mediante la unión a grupos carboxilo y fosfato de los polímeros que las forman. El Mg^{2+} juega también un papel fundamental en el plegamiento y en la estructura que adoptan el DNA y los RNA, participando además en el proceso autocatalítico de las ribozimas.

Calcio y magnesio, metales alcalinotérreos, son dos de los mayores constituyentes de la corteza terrestre y, junto con el hierro, son los principales cationes que forman

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

las rocas ígneas básicas. Se presentan en forma de cationes divalentes y, como en el caso de sodio y potasio, su estructura electrónica similar hace que muchas propiedades químicas sean comunes. No obstante, sus radios iónicos son muy diferentes (65 pm el del Mg^{2+} y 100 pm el del Ca^{2+}), lo que hace que la sustitución entre ellos en sus respectivos minerales sea muy rara. El Fe^{2+} (radio iónico de 61 pm) y el Na^{+} (de 102 pm) suelen intercambiarse con Mg^{2+} y Ca^{2+}, respectivamente. Los ciclos geoquímicos de estos dos elementos son también similares a los del Na^{+} y el K^{+}, aunque existen grandes diferencias respecto de la solubilidad de los diferentes compuestos que forman. El menos soluble de éstos es el carbonato cálcico, $CaCO_3$, que se forma en el mar a partir del calcio disuelto transportado por los ríos y que se deposita en forma de rocas sedimentarias calizas, que también contienen un pequeño porcentaje (~5%) de $MgCO_3$.

La precipitación biológica del $CaCO_3$ y su solubilización como bicarbonato ($Ca[HCO_3]_2$) tienen una gran importancia, ya que la precipitación del carbonato está ligada a fenómenos como es la formación del exoesqueleto de muchos microorganismos y de algunos vertebrados. El equilibrio entre el HCO_3^- y el CO_3^{2-} está influenciado por el pH, la temperatura y por la pCO_2, que al disolverse en agua forma ácido carbónico, llegándose a un equilibrio final entre las diferentes formas:

$$Ca(HCO_3)_2 \longleftrightarrow CaCO_3 + CO_2 + H_2O$$

En ambientes bien tamponados, con un pH neutro o ligeramente alcalino, donde abunde el ion Ca^{2+}, el CO_2 procedente de las oxidaciones microbianas da lugar a la precipitación de una parte de éste en forma de $CaCO_3$. Procesos como la amonificación, o las reducciones de nitrato y sulfato, que aumentan la alcalinidad del medio, favorecen la precipitación del carbonato. Aunque la mayor contribución biológica a la formación de precipitados de $CaCO_3$ proviene de la fotosíntesis, que al dar lugar a la asimilación del CO_2 por los organismos hace disminuir su concentración, desplazando el equilibrio hacia la formación de $CaCO_3$ y su precipitación. De esta forma, algas y cianobacterias contribuyen como endosimbiontes a la formación del exoesqueleto de los foraminíferos y otros invertebrados, como corales, braquiópodos y moluscos. El $MgCO_3$, que también es muy abundante en las aguas marinas, no se emplea en la formación de estructuras exoesqueléticas de organismos marinos debido a que es mucho más soluble que el $CaCO_3$.

En el suelo, la disolución de los carbonatos y su movilización se ve favorecida por aquellos procesos metabólicos microbianos que producen ácidos orgánicos o inorgánicos, como son las fermentaciones y la nitrificación o la oxidación de azufre, respectivamente. Por el contrario, la presencia de fosfato provoca la formación de $Ca_3(PO_4)_2$ que es muy insoluble y que no es apto para ser tomado por los organismos. La acidificación del suelo por los microorganismos puede solubilizar este fosfato, ayudando también a la movilización del fósforo en suelos y sedimentos.

Otro aspecto importante relacionado con el calcio y el magnesio es el que se refiere a su relación con la "dureza" de las aguas y los efectos que pueden ocasionar sobre el metabolismo de diferentes organismos. La dureza de las aguas se mide por su contenido en Ca^{2+} y Mg^{2+}, y puede ser permanente, si el anión que contienen es el

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

sulfato, o temporal, que es lo más frecuente, cuando contienen bicarbonatos. En este último caso, la dureza se puede disminuir por ebullición, ya que a esas temperaturas gran parte del calcio y del magnesio precipitan como carbonatos. Por el contrario, la dureza permanente de las aguas no puede disminuirse por ebullición, ya que la solubilidad de los correspondientes sulfatos no disminuye apreciablemente con la temperatura. Las aguas blandas suelen tener también un pH ácido, ya que las bajas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} generalmente reflejan una baja disponibilidad de carbonatos en el suelo para los procesos de neutralización. Uno de los principales efectos de esta dureza de las aguas es la formación de sales insolubles entre los detergentes orgánicos aniónicos y estos cationes divalentes, con lo que, además, pierden su capacidad de disolución de la grasa y la suciedad, quedando los precipitados que se forman pegados a los objetos. En las aguas blandas, por el contrario, las largas cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de detergente forman micelas solubles, con dichas cadenas dirigidas hacia el interior y los grupos polares en contacto con el agua. Durante el proceso de lavado, en el interior de las micelas, hidrofóbico, se solubiliza la grasa y las partículas de suciedad, eliminándolas de la ropa, los platos, etc. Las micelas flotan libremente, sin asociarse unas con otras, mediante repulsiones iónicas entre ellas.

Para evitar los efectos de la dureza de las aguas sobre la eficacia de los detergentes, se les suele añadir compuestos que retiren el calcio y el magnesio. Uno de estos agentes quelantes, empleado durante mucho tiempo de forma indiscriminada, es el tripolifosfato sódico, cuyos efectos sobre la eutrofización de los ambientes acuáticos se discutió en el apartado 6.2.4 de este mismo capítulo (Fig. 6.46).

Por otro lado, las aguas demasiado blandas se han relacionado con el fenómeno de los infartos de miocardio. Como se indicó anteriormente, las aguas blandas suelen tener un cierto carácter ácido, lo que provoca la solubilización de diversos metales, incluido el plomo de algunas conducciones, cuyos efectos negativos sobre la salud son conocidos desde la antigüedad (saturnismo). El aumento de plomo y otros metales, como el cadmio, en las aguas de consumo humano puede provocar un aumento de la presión arterial, uno de los factores de riesgo para los infartos. En algunos lugares se ha podido observar una cierta correlación entre la falta de calcio y magnesio de las aguas y el número de infartos de miocardio de la población. La adición de cal al agua corriente, para aumentar su pH, puede disminuir en gran parte los efectos negativos.

Manganeso

El manganeso es un metal de transición que es micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de los animales, las plantas y para muchos microorganismos. En la naturaleza se presenta en forma manganosa (Mn^{2+}) y en forma mangánica (Mn^{4+}), aunque también puede existir en un estado de oxidación intermedio (Mn^{3+}). El manganeso aparece en muchas ocasiones asociado en rocas y minerales al hierro, con el que comparte muchas propiedades físicas y químicas, pudiendo llegar incluso a sustituirlo como componente metálico de las proteínas en algunas bacterias, como *Lactobacillus plantarum* y *Borrelia burgdorferii*. El manganeso actúa como activador de muchas enzimas y se encuentra presente en algunas superóxido dismutasas y catalasas,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

además de ser el componente metálico de la enzima que fragmenta el agua en el fotosistema II de los fototrofos oxigénicos. También desempeña un papel importante en la estabilización de las conformaciones del RNA. El Mn en exceso, no obstante, puede unirse al DNA y actuar como un agente mutágeno, especialmente en las células eucariotas, las cuales lo acumulan, mayoritariamente, en proteínas de orgánulos como mitocondrias y cloroplastos (de ascendencia procariota), con preferencia al citoplasma. En animales superiores el manganeso se almacena en huesos, músculos y órganos sexuales, habiéndose asociado su deficiencia con diversas patologías (malformaciones óseas, infecundidad y dificultades en el crecimiento).

En presencia de oxígeno el ion manganoso es estable sólo en medio ácido (pH < 5,5), aunque también es estable a valores de pH superiores en condiciones anóxicas. La reacción de oxidación con O_2 es espontánea a pH alcalino (> 8) formándose MnO_2, que es insoluble en agua y no puede ser asimilado directamente por las plantas. En algunos hábitats marinos y de agua dulce, los precipitados de MnO_2, junto con hidróxidos de Fe^{3+}, dan lugar a la formación de nódulos de formas características. Estos nódulos ferromanganosos se forman en la interfase entre los ambientes óxico y anóxico de la columna de agua. En los sedimentos anóxicos, las bacterias reductoras de manganeso producen Mn^{2+}, soluble, a partir de MnO_2, insoluble. Parte del Mn^{2+} se libera de estos sedimentos y alcanza la zona óxica del agua, donde se oxida de nuevo a MnO_2, en parte por acción de las bacterias, que forman los nódulos característicos.

La oxidación del Mn^{2+} la pueden llevar a cabo diversas bacterias acuáticas y del suelo, de géneros tan diferentes como *Pseudomonas, Arthrobacter, Gallionella, Leptothrix* o *Bacillus*, entre otros. Algunos hongos, como *Phanerochaete crysosporium*, también pueden catalizar la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{4+}. En el caso de algunas bacterias se ha asociado dicha oxidación a la fijación de CO_2. En muchos casos la oxidación del Mn^{2+} se produce en organismos que oxidan también Fe^{2+} y, al igual que en dicho proceso, la energía que se libera se puede acoplar a la síntesis de ATP:

$$Mn^{2+} + \tfrac{1}{2}\, O_2 + H_2O \longrightarrow MnO_2 + 2\, H^+ \qquad (\Delta G^{o\prime} = -68 \text{ kJ mol}^{-1})$$

Aunque en ocasiones la oxidación del manganeso se lleva a cabo por oxidasas o catalasas, en la proteobacteria filamentosa *Leptothrix discophora*, se ha aislado un gen que codifica para una proteína que oxida el manganeso. Dicha proteína (~110 kDa), que presenta semejanzas con diversas oxidasas que contienen Cu, es extracelular y se encuentra en la vaina que rodea a la bacteria, en donde se depositan el MnO_2 y el $Fe(OH)_3$ formado en los procesos oxidativos. Además del posible beneficio energético que la bacteria puede obtener, el Mn^{4+} formado en la oxidación del Mn^{2+} por estas bacterias, provoca la liberación de los ácidos húmico y fúlvico, que son nutrientes para su crecimiento.

En las fuentes hidrotermales de los fondos marinos, donde abunda el Mn^{2+}, también se ha observado la existencia de bacterias termófilas que lo oxidan a Mn^{4+}.

En ambientes anóxicos, muchos microorganismos quimioorganotrofos, como *Shewanella oneidensis* o *Geobacter sulfurreducens*, pueden emplear el Mn^{4+} como aceptor de electrones para el crecimiento con acetato y otras fuentes de carbono no

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

fermentables. La actividad manganeso reductasa se encuentra presente en diferentes bacterias que usan los óxidos de manganeso como sumidero de electrones o como aceptor de electrones para el metabolismo respiratorio. El potencial de reducción del par Mn^{4+}/Mn^{2+} es muy alto (+0,798 V), lo que implica que hay varios compuestos capaces de ceder electrones para la reducción de Mn^{4+} en la respiración anaerobia. En ambientes ricos en sulfuros, los compuestos de Fe^{3+} y de Mn^{4+} son reducidos químicamente por el H_2S, producido por las bacterias reductoras de sulfato, dando lugar a azufre elemental. En ambientes ácidos, bacterias de los géneros *Thiobacillus* y *Sulfolobus* pueden utilizar este azufre para catalizar nuevos procesos de reducción:

$$3\ MnO_2 + S^0 + 4\ H^+ \longrightarrow 3\ Mn^{2+} + SO_4^{2-} + 2\ H_2O$$

$$6\ FeOOH + S^0 + 10\ H^+ \longrightarrow 6\ Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 8\ H_2O$$

De esta forma, el poder reductor del H_2S es transferido gradualmente al hierro y al manganeso. Cuando estos metales reducidos difunden hacia zonas óxicas, son reoxidados y transfieren los electrones al O_2. El hierro y el manganeso actúan como transportadores de electrones entre el sulfuro y el oxígeno en ambientes como los sedimentos marinos (Fig. 6.47).

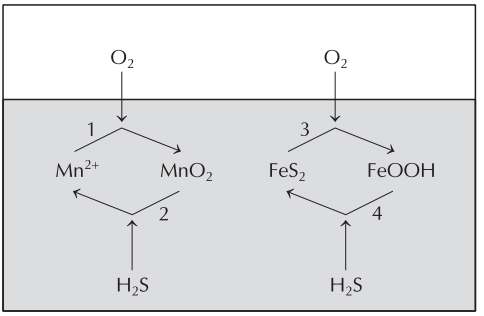


Figura 6.47. Ciclos del Mn y del Fe en sedimentos marinos.
1) $4\ Mn^{2+} + 2\ O_2 + 4\ H_2O \longrightarrow 4\ MnO_2 + 8\ H^+$
2) $4\ MnO_2 + H_2S + 6\ H^+ \longrightarrow 4\ Mn^{2+} + SO_4^{2-} + 4\ H_2O$
3) $FeS_2 + 3\ ¾\ O_2 + 2\ ½\ H_2O \longrightarrow FeOOH + 2\ SO_4^{2-} + 4\ H^+$
4) $2\ FeOOH + 2\ H_2S + 2\ H^+ \longrightarrow FeS_2 + Fe^{2+} + 4\ H_2O$

Shewanella oneidensis, cuyo genoma se ha secuenciado completamente (está formado por un cromosoma circular, con 4.969.803 bp, y un plásmido, con 161.613 bp), posee un número de citocromos de tipo *c* mayor que el de cualquier otra especie examinada hasta la fecha (al menos 38, frente a los 7 descritos en *E. coli*), estando una gran parte de ellos asociados a la membrana externa de esta bacteria (denominados Omc, "outer membrane cytochrome"), donde pueden entrar en contacto directo con los óxidos metálicos extracelulares. El sistema de transporte de electrones asociado a la reducción del MnO_2 es complejo e implica diversos componentes, como la menaquinona y un citocromo *c* tetrahémico (21 kDa), localizados en la membrana citoplásmica, así como otros citocromos localizados en la membrana externa. Las lipoproteínas OmcA y OmcB son dos de estos citocromos, de 83 y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

60 kDa, respectivamente, que contienen 10 hemos de tipo *c* cada uno. Además de los anteriores, otras proteínas, entre las que algunas presentan localización periplásmica, como MtrA, otro citocromo *c* decahémico, o Cct, un citocromo de tipo c_3 que contiene 4 grupos hemo, participan en la transferencia electrónica al Mn^{4+}.

Al igual que *Shewanella* y *Geobacter*, algunos microorganismos hipertermófilos, como *Pyrobaculum islandicum*, que vive a ~100 ºC en fuentes hidrotermales anaeróbicas, utilizan H_2 como donador de electrones para la reducción de diversos metales: Fe^{3+}, Mn^{4+}, Co^{3+}, Cr^{6+}, Tc^{7+} y U^{6+}, formándose, respectivamente, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Tc^{4+} o Tc^{5+}, que son insolubles, y U^{4+}, que también precipita y forma el mineral uraninita. La reducción a Mn^{2+}, da lugar a la formación de carbonato de manganeso.

Los microorganismos que reducen Fe^{3+} y Mn^{4+} ejercen una importante influencia en los ciclos biogeoquímicos de ambientes sedimentarios anaeróbicos. El resultado de la reducción del Mn^{4+} es que, como ocurre en el caso de la reducción del Fe^{3+}, se obtiene un producto que es más soluble y, por tanto, más accesible para otros organismos. Además, la reducción de estos iones facilita la solubilización de fosfato y de trazas de metales absorbidos en los óxidos de Fe^{3+} y Mn^{4+}, lo que es significativo desde un punto de vista ambiental, debido a la toxicidad de los metales y a que el fosfato suele ser limitante para el desarrollo de las plantas en los sistemas acuáticos. La reducción de Mn^{4+}, y de Fe^{3+}, provoca un incremento del pH, de la fuerza iónica del medio y de la cantidad de otros cationes en disolución, lo que afecta al crecimiento de las plantas y a la composición y calidad de las aguas subterráneas.

Debido a su elevado número de citocromos, a su capacidad para eliminar distintos metales considerados como contaminantes ambientales, y a que puede crecer sin problemas en presencia o en ausencia de O_2, *Shewanella oneidensis* está considerado como un microorganismo modelo para los estudios de biorremediación de compuestos metálicos, sobre todo en los ambientes acuáticos contaminados por las centrales nucleares.

Mercurio

El mercurio es, tal vez, el metal más tóxico de todos los que el ser humano emplea con fines industriales (minería, electrónica, medicina, alimentación, cosmética, etc.). Dicha toxicidad le viene dada, fundamentalmente, por la alta afinidad que muestra el Hg^{2+} por los grupos tiólicos e imínicos de las proteínas, lo que facilita su desnaturalización. Además, el mercurio es absorbido a mayor velocidad de la que puede ser eliminado, por lo que se acumula en los tejidos vivos, fenómeno conocido como bioacumulación. A lo largo de la cadena trófica, la concentración relativa de mercurio aumenta, por lo que se habla de biomagnificación. El envenenamiento por compuestos de mercurio, debido a su bioacumulación y a la biomagnificación del efecto, puede llegar a producir episodios como el de la bahía de Minamata (Japón), con más de 2.200 casos de personas intoxicadas y 750 muertos.

Éste es el único metal que es líquido a temperatura ambiente y su densidad es muy elevada (15,5 g ml^{-1}). El mercurio metálico, Hg^0, forma amalgamas fácilmente con

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

muchos metales, por lo que se emplea en diversos procesos industriales. Además, es muy volátil, por lo que es la forma en la que normalmente se encuentra en la atmósfera, donde se oxida fotoquímicamente a Hg^{2+}. El Hg^0 es muy tóxico por inhalación, ya que es capaz de atravesar las membranas pulmonares y entrar en el torrente sanguíneo, pudiendo llegar al cerebro, donde origina graves efectos neurológicos. En el suelo, la forma más común es la del mineral cinabrio, HgS, que por calentamiento en presencia de oxígeno se reduce a la forma metálica, con producción de SO_2. A escala mundial, la producción y uso del mercurio metálico se estima en 40.000 toneladas anuales, de las que sólo una pequeña cantidad es reciclada; la mayor parte acaba en el ambiente como contaminante. Sólo la quema de combustibles fósiles libera más de 3.000 toneladas. Además, el aporte natural, procedente de la meteorización de rocas que contienen dicho elemento, supone otra cantidad adicional importante.

El mercurio no forma parte de los macronutrientes necesarios para el crecimiento de los diferentes organismos, aunque algunos microorganismos poseen un aparato enzimático específico para su transformación. En el ciclo biogeoquímico de este elemento juegan un papel importante las formas mono- y dimetiladas, producidas por distintos microorganismos como mecanismo de destoxificación (Fig. 6.48).

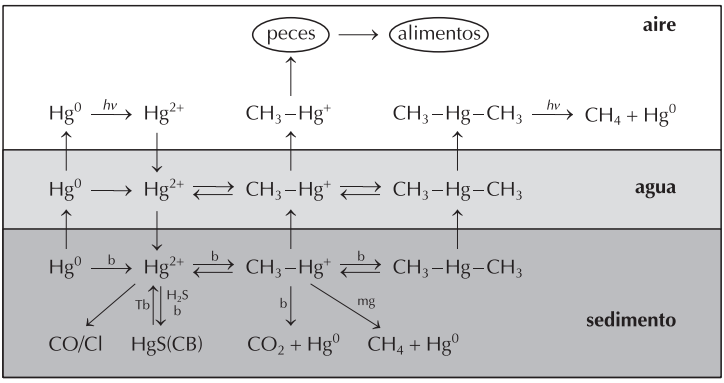


Figura 6.48. Ciclo biogeoquímico del mercurio. b (procesos bacterianos); Tb (*Thiobacilli*); mg (metanógenos); CO/CI (complejos orgánicos e inorgánicos); CB (cinabrio).

En los ambientes acuáticos, el mercurio suele encontrarse en forma de Hg^{2+}, que se adsorbe fácilmente a las partículas, lo que favorece su metabolización por los microorganismos. La metilación del mercurio es la principal reacción que, para minimizar sus efectos tóxicos, llevan a cabo un importante número de bacterias, fundamentalmente del grupo de las reductoras de sulfato, en las condiciones anóxicas de los fondos y sedimentos marinos. En ambientes con limitación de sulfato, se ha observado que la transferencia interespecífica de H_2 y acetato entre metanógenos y bacterias reductoras de sulfato juega un papel importante en el proceso de metilación del mercurio. La formación del metilmercurio (CH_3Hg^+) implica la adición al Hg^{2+} de un grupo metilo, que es proporcionado por la metilcobalamina (CH_3B_{12}). La transferencia de un segundo metilo produce dimetilmercurio (CH_3HgCH_3), que es muy volátil y se

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

libera a la atmósfera. El metilmercurio, presente en los fluidos biológicos como CH_3HgCl, es mucho más tóxico que el propio Hg^{2+} (× 100), debido a que la presencia del metilo le permite atravesar con facilidad las membranas biológicas y, ya en el interior de la célula, el cloruro es desplazado por los grupos sulfhidrilo de las proteínas. A pesar de la pequeña cantidad de metilmercurio que se genera en los fondos marinos, este fenómeno es suficiente para contaminar las cadenas tróficas acuáticas, ya que se incorpora en peces y mariscos a través de las branquias, y en ellos se acumula en las proteínas de los tejidos, preferentemente, y actúa como una potente neurotoxina. Aunque la metilación del mercurio se produce en todos los sedimentos, los niveles de mercurio son mayores en peces y mariscos de zonas donde se producen vertidos de residuos contaminados (fábricas y aguas residuales, principalmente). La biometilación del mercurio no sólo se produce en los sedimentos, sino que también puede tener lugar por la actividad de los microorganismos anaerobios del intestino y otros órganos. En el caso de los humanos y de otros animales, el metilmercurio, que además de por el consumo de peces se puede absorber a través de la piel, se excreta muy lentamente y afecta al tejido del sistema nervioso central, acumulándose en los músculos, en el hígado y en los riñones.

La proporción en la que las bacterias forman el metil- y el dimetilmercurio depende del pH, de forma que a pH básico se favorece la doble metilación, mientras que el CH_3Hg^+ se forma preferentemente a pH ácido. Por tanto, la acidificación de las aguas tiene como consecuencia adicional el aumento de la relación CH_3Hg^+/CH_3HgCH_3, y por tanto un aumento de la toxicidad del mercurio.

Además de la metilación del Hg^{2+}, las bacterias reductoras de sulfato de los sedimentos anóxicos, como *Clostridium desulfuricans*, catalizan la reacción de formación del HgS, insoluble, a partir de H_2S y Hg^{2+}, lo que implica una disminución del Hg^{2+} disponible en solución. Como paso previo a la formación del HgS, se forma el sulfuro de dimetilmercurio [$(CH_3Hg)_2S$]. Si estos sedimentos se airean, el HgS puede ser oxidado, principalmente por los tiobacilos, produciéndose Hg^{2+}, que resulta metilado. Empleando $^{14}CH_3Hg^+$, se ha comprobado que las bacterias reductoras de sulfato también pueden llevar a cabo una desmetilación oxidativa del metilmercurio, con producción de Hg^0 y liberación de $^{14}CO_2$, utilizando el CH_3Hg^+ de forma parecida a otros compuestos monocarbonados, como el metanol. Las bacterias metanógenas, por su parte, pueden reducir el metilmercurio a mercurio metálico, con producción de metano. En los sedimentos en los que están presentes estos dos tipos de microorganismos, se detecta la producción de CO_2 y de CH_4 a partir del metilmercurio, siendo la actividad mayor en los sedimentos con elevados niveles de contaminación.

Diferentes tipos de bacterias han desarrollado mecanismos para disminuir la toxicidad del mercurio, eliminando el Hg^{2+} y el CH_3Hg^+, que son los que presentan las mayores afinidades por los grupos tiólicos e imínicos de las proteínas. De esta forma pueden crecer y llevar a cabo un metabolismo normal en medios con elevadas concentraciones de dichos iones. El mecanismo más extendido de resistencia al mercurio es el que viene caracterizado por los denominados genes *mer*, que se encuentran asociados en un operón, normalmente dentro de un plásmido. Estos operones pueden ser: de espectro limitado, si sólo permiten destoxificar el Hg^{2+} (y, en algunos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

casos, un limitado número de organomercuriales), o de espectro amplio, si además confieren resistencia a los diferentes organomercuriales, incluido el metilmercurio. Con pocas diferencias, este sistema se da tanto en bacterias Gram negativas como en las Gram positivas, aunque se ha estudiado con mayor profundidad en las primeras. La presencia de Hg^{2+} en el medio (o de CH_3Hg^+, en el caso de los de espectro amplio) induce la expresión de una serie de proteínas que posibilitan el paso del ion al periplasma, y de aquí al citoplasma, donde es reducido a Hg^0, que difunde al medio (Fig. 6.49). Se han descrito varios plásmidos que contienen los genes de la resistencia al mercurio: pVS1, en *Pseudomonas aeruginosa*, NR1, en *Shigella flexneri*, pKLH2, en *Acinetobacter calcoaceticus*, y otros, observándose la presencia de una serie de genes (*merRTPAD*) comunes a todos ellos. En *Shigella flexneri*, uno de los organismos más estudiados, el operón *mer* (4,6 kb) se encuentra en el transposón Tn*21* (19,7 kb) del plásmido autotransmisible NR1 (94,5 kb). El transposón Tn*501*, de *Pseudomonas aeruginosa*, es muy similar, aunque carece del gen *merC*, mientras que en Tn*5053*, de *Xanthomonas* sp. W17, en lugar de *merC* posee un gen diferente, *merF*. En los organismos de espectro amplio, existe un gen adicional, *merB*, que codifica una organomercurial liasa citoplásmica, que permite la ruptura del enlace C – Hg y la liberación del Hg^{2+} (Fig. 6.49).

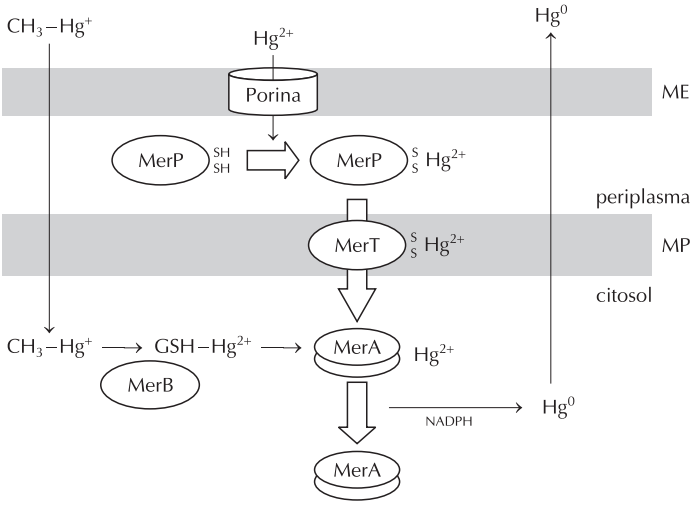


Figura 6.49. Mecanismo molecular de la resistencia a mercurio en las bacterias. MP (membrana plasmática); ME (membrana externa); GSH (glutatión reducido).

El diagrama de la figura representa el modelo para las bacterias Gram negativas. Los iones Hg^{2+} del medio pasan al periplasma bacteriano a través de las porinas de la membrana externa. Allí se unen a los dos residuos de cisteína de la proteína periplásmica MerP, la cual los transfiere a cisteínas de la cara periplásmica de la proteína MerT, que se encuentra en la membrana plasmática y posee 3 hélices α que la atraviesan. De aquí, el Hg^{2+} se transfiere a otras cisteínas de la cara citoplásmica de MerT y, de éstas, a cisteínas del extremo amino terminal de la mercúrico reductasa (MerA),

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

donde son reducidos a mercurio elemental, que se libera de la enzima y, al ser volátil, difunde a través de las membranas bacterianas hasta el medio. MerA es una flavoproteína homodimérica, con dos centros de reducción de Hg^{2+}, cada uno de ellos formado con dos cisteínas de una subunidad y otras dos de la otra, de su extremo C-terminal. Los dos electrones necesarios para la reducción proceden del NADPH, que los cede al FAD, el cual los transfiere al Hg^{2+} unido a las cisteínas del sitio activo. Las proteínas MerC y MerF, que sólo están presentes en algunos microorganismos, se encuentran en la membrana plasmática, y también transportan los iones Hg^{2+} al citoplasma, lo que puede conferir a dichos organismos una ventaja selectiva en presencia de elevadas concentraciones de dicho ion.

En los microorganismos que tienen un operón *mer* de espectro amplio, también se puede eliminar el metilmercurio. Este compuesto puede difundir a través de las membranas bacterianas hasta el citoplasma donde, por acción de la enzima organomercurial liasa (MerB), se libera Hg^{2+} y CH_4. El gen *merB* no está presente en los operones *mer* de espectro limitado. El Hg^{2+} que se forma se une al glutatión, que lo transfiere a la mercúrico reductasa, donde se reduce a Hg^0.

Además de los genes estructurales, en el operón *mer* existen, al menos, dos genes reguladores: *merR* y *merD*. La proteína MerR regula la expresión del resto de genes *mer* mediante la unión a una región operadora/promotora bidireccional (*merOP*), así como su propia síntesis. MerR posee un dominio, con dos cisteínas, que sirve para la unión del Hg^{2+}, con una elevada afinidad. La formación del complejo MerR-Hg^{2+} facilita la unión con la RNA polimerasa en la región *merOP*, activándose la transcripción de *merTPCAD*. En ausencia de Hg^{2+}, MerR se une también a dicha región, pero en una conformación que reprime su expresión. En el caso de los operones de espectro amplio, la secuencia C-terminal de MerR es diferente, lo cual le posibilita responder también a la presencia de CH_3Hg^{2+}. El papel regulador de MerD, proteína que se sintetiza a concentraciones muy pequeñas, es secundario y está ligado a la modulación de la expresión, mediante la unión a la región *merOP*, reprimiéndola cuando baja la concentración de Hg^{2+}.

Se han encontrado otros genes *mer* en diferentes organismos, pero sus funciones no están claras y, en cualquier caso, no son fundamentales para la resistencia al Hg^{2+}.

Plomo

El plomo es un elemento relativamente abundante en la naturaleza (13 ppm en la corteza terrestre, fundamentalmente como PbS) y prácticamente ausente en los océanos (0,03 ppb). El plomo suele estar en rocas ácidas (ricas en sílice, granitos, etc.), en pizarras y, en algunos casos, en calizas. La mayor parte del plomo que participa en el ciclo biogeoquímico es de origen antropogénico (se ha calculado que más del 90% del plomo en la atmósfera tiene su origen en las actividades humanas). Al igual que el mercurio, el plomo no juega ningún papel en el metabolismo normal de los organismos, aunque éstos se ven afectados por su presencia, debido a su capacidad para unirse a la materia orgánica, incluyendo aminoácidos, hemoglobina, diversas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

enzimas, RNA y DNA. Sus efectos en el ser humano se manifiestan, fundamentalmente, por problemas en la síntesis del grupo hemo (a concentraciones tan bajas como 20-200 μg Pb kg^{-1}), hipertensión, hiperactividad y daños cerebrales.

En la actualidad, el plomo se emplea en la fabricación de baterías para los automóviles (más del 50%), en aleaciones para soldaduras (~10%), en gasolinas "con plomo" (como tetraetil plomo, $(C_2H_5)_4Pb$), en laminados, tuberías, pinturas, pigmentos (minio, cromatos), vidrios, materiales cerámicos, etc.

De todas las sustancias químicas tóxicas presentes en el ambiente, el plomo es el más persistente (el tiempo medio de residencia en el ser humano es de 5 años, en general, de más de 20 años en los huesos, y de 20-30 días en tejidos blandos) y cada año origina miles de envenenamientos, especialmente en niños de áreas urbanas. Al contrario que otros contaminantes habituales, como el cadmio, el plomo no se acumula en el interior de las plantas. No obstante, el plomo puede estar presente en los alimentos, ya que es muy frecuente en las partículas de polvo que se depositan sobre las plantas o durante el procesado de los alimentos. El plomo presente en el polvo es la principal vía de adquisición de este elemento por parte de los organismos. Este plomo se ha originado, fundamentalmente, en la combustión de las gasolinas "con plomo", donde forma micropartículas de $PbCl_2$ o $PbBr_2$ (de menos de 2 μm de diámetro) que son expulsadas al aire junto con los gases de escape y que pueden ser fácilmente respiradas o absorbidas a través de la piel. Estas partículas se pueden transportar por el aire a grandes distancias, aunque la mayoría se depositan en las proximidades de la emisión. Las partículas de plomo también se originan en la combustión de petróleos y carbones, en las industrias metalúrgicas, en las incineradoras de residuos, a partir del plomo contenido en pinturas empleadas en las viviendas [$Pb_3(OH)_2(CO_3)_2$, "plomo blanco"], en las de protección de las estructuras metálicas frente a la corrosión (PbO_3, "plomo rojo"), o en la señalización de las carreteras ($PbCrO_4$, "plomo amarillo"). Otra vía de exposición al plomo es a través del agua potable, donde éste puede encontrarse por disolución del que se encuentra en las soldaduras o el de las propias tuberías, especialmente en las viviendas antiguas. En estos casos, la reacción del plomo metálico con el O_2 disuelto en el agua provoca su oxidación y solubilización en forma de Pb^{2+}, sobre todo en medio ácido. Este problema se ve agravado en el caso de las aguas blandas, que tienen menor capacidad para neutralizar la acidez del agua de lluvia. Para solucionar este problema, se suele añadir $CaCO_3$ que aumenta el pH y la dureza del agua y forma $PbCO_3$, que crea una película que recubre las tuberías y previene la solubilización de más plomo. Como agentes protectores, también se suelen emplear fosfatos o hidróxido cálcico. El plomo de la dieta también puede verse incrementado por la disolución del metal que está presente en gran parte de los recipientes de cerámica vidriada, sobre todo si éstos se emplean para líquidos calientes, ya que la velocidad de disolución aumenta con la temperatura. Otra fuente de este elemento son las soldaduras de plomo en los recipientes de estaño empleados para las latas de alimentos y bebidas. La ingestión de balas o anzuelos de plomo por las aves acuáticas, y por las rapaces que se alimentan de ellas, también son una causa frecuente de envenenamiento por plomo. En la actualidad, el uso del plomo para las distintas aplicaciones está bastante restringido, cuando no suprimido, por lo que los niveles medios de plomo medidos en la atmósfera y en la sangre han disminuido sensiblemente.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Además, el plomo es un veneno acumulativo, que desde el torrente sanguíneo llega a los tejidos blandos y se deposita fácilmente en los huesos, donde desplaza al Ca^{2+}, que tiene un radio iónico muy parecido. Una parte del plomo ingerido se acumula en el pelo, siendo su concentración un buen indicador del grado de exposición al que ha estado sometido el organismo en los meses precedentes. El contenido de plomo en los huesos aumenta con la edad y puede ser movilizado nuevamente, pasando a la sangre, lo que da lugar a efectos tóxicos adicionales. La presencia de plomo provoca que en lugar de sintetizarse el grupo hemo con hierro se una el cinc a la porfirina, formando un complejo que se detecta fácilmente por su fluorescencia. El plomo también disminuye la velocidad de la transmisión nerviosa y provoca, a concentraciones elevadas, la degeneración del nervio. El mecanismo bioquímico de la actuación del plomo no se conoce con exactitud, pero está ligado a su capacidad para unirse al S o al N de las proteínas, interfiriendo su actividad. La forma de eliminarlo del organismo es mediante el empleo de agentes quelantes (EDTA, d-penicilina) en forma de complejo con Ca^{2+}, con el fin de disminuir la movilización y liberación de Ca^{2+} y de otros iones metálicos débilmente unidos. El Pb^{2+} forma un complejo que es más estable y desplaza al Ca^{2+}, excretándose a través de los riñones:

$$Pb^{2+} \text{ (tóxico)} + Ca^{2+}\text{-EDTA} \longrightarrow Ca^{2+} \text{ (nutriente)} + Pb^{2+}\text{-EDTA (se excreta en la orina)}$$

Los microorganismos también se ven afectados por el incremento de la concentración de plomo en el medio, debido a las interferencias que provoca en diferentes metaloproteínas. Así, por ejemplo, se ha descrito que la nitrato reductasa de *Aspergillus* es muy sensible a diferentes metales pesados, entre los que el Pb^{2+} es uno de los más efectivos. Para contrarrestar sus efectos, las bacterias han desarrollado diferentes estrategias, habiéndose descrito resistencia al plomo en bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas de ambientes contaminados con este metal. Algunas, como *Pseudomonas marginalis*, lo excretan al exterior, mientras que otras (*Bacillus megaterium*) lo acumulan en el citoplasma. *Staphylococcus aureus* y *Citrobacter freundii* también lo acumulan en su interior, inmovilizándolo en forma de fosfato de plomo, aunque se desconoce el mecanismo de destoxificación. En algunos microorganismos se ha observado que el Pb^{2+} puede ser excretado utilizando sistemas de translocación de metales pesados que implican la intervención de una ATPasa de tipo P, las cuales contienen un dominio de unión para metales pesados (con la secuencia consenso Cys-X-X-Cys) y están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis metálica. Este es el caso de las ATPasas CadA de *S. aureus* (resistencia frente al Cd^{2+}) o ZntA de *E. coli* (resistencia al Zn^{2+}), que también pueden translocar Pb^{2+} y otros metales. En la proteobacteria *Ralstonia metallidurans* se ha descrito un sistema que es específico para la resistencia al Pb^{2+}. Este sistema, designado como *pbr*, es similar al sistema *mer* de resistencia al Hg^{2+}, en algunos aspectos (Fig. 6.50). Los genes *pbr* están localizados en el plásmido pMOL30 de *Ralstonia* y codifican para las proteínas estructurales PbrT, que está localizada en la membrana plasmática y transporta el Pb^{2+} al citoplasma, PbrA, que es una ATPasa de tipo P que une Pb^{2+} y lo excreta, PbrD, una proteína citoplásmica que une Pb^{2+} y lo traslada hasta PbrA, PbrB, una lipoproteína que facilita el transporte de Pb^{2+} desde el periplasma al exterior, y PbrC, que se sitúa en la membrana plasmática y tiene actividad prolipoproteína

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

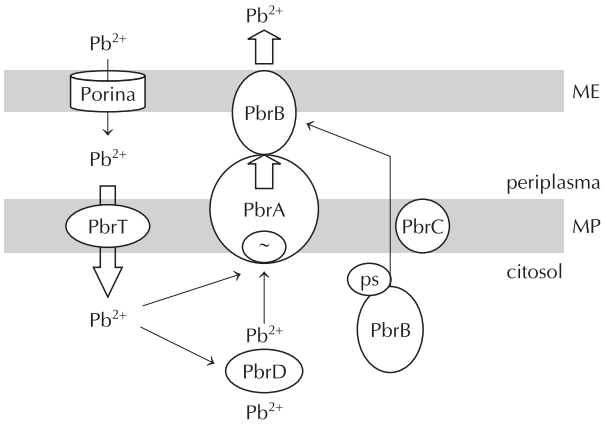


Figura 6.50. Mecanismo molecular de resistencia al plomo en *R. metallidurans*. MP (membrana plasmática); ME (membrana externa); (~) indica consumo de ATP; ps (péptido señal).

señal peptidasa y es la encargada del procesamiento de PbrB. Además, en el operón existe un gen, *pbrR*, cuyo producto controla la transcripción de los demás genes *pbr*, de forma parecida a como ocurre en el operón *mer*. Como respuesta a la presencia de Pb^{2+}, PbrR se une a una región operadora/promotora (*pbrOP*) bidireccional similar a la que se encuentra en el operón *mer* activando la expresión de *pbrABCD*, que se encuentran en una unidad transcripcional. La transcripción de *pbrT* está ligada a la de *pbrR*.

Aunque PbrA es una ATPasa de tipo P excretora, filogenéticamente ligada a CadA y ZntA, se diferencia de éstas porque posee dos motivos de unión para el Pb^{2+}, en lugar de uno, y con una secuencia de aminoácidos diferente: Cys-Pro-Thr-Glu-Glu, donde la segunda Cys se reemplaza por dos Glu, probablemente como consecuencia de que el Pb^{2+} se coordina mejor con el oxígeno que con el azufre.

En este proceso, el plomo no cambia en ningún momento su estado de oxidación, al contrario de lo que ocurre en el caso del sistema *mer*, donde el Hg^{2+} termina reduciéndose a Hg^{0}, que al ser volátil termina desapareciendo del medio. Con el sistema del operón *pbr*, aparentemente fútil, la bacteria consigue minimizar los efectos debidos a la presencia de Pb^{2+}. Así, el resultado del transporte hacia el citoplasma por la proteína PbrT es que se reduce la cantidad de Pb^{2+} en el periplasma y, por tanto, se disminuye el daño que éste puede causar sobre las proteínas periplásmicas y sobre la propia membrana. Una vez que el Pb^{2+} ha entrado en el citoplasma, puede ser exportado por la ATPasa PbrA o unirse transitoriamente a PbrD, con lo que se consigue que la concentración de Pb^{2+} libre en el citoplasma sea menor. La labor conjunta de las proteínas PbrA y PbrB hace que el Pb^{2+} sea expulsado de nuevo al medio externo, con lo que se compensa la entrada promovida por PbrT. Por otro lado, la organización de *pbrABCD* en una unidad transcripcional tiene como resultado el ajuste fino entre la regulación transcripcional, por PbrR, y el procesamiento postranscripcional, por PbrC.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Cinc y cadmio

Aunque se encuentran en el mismo grupo del sistema periódico que el Hg, las propiedades químicas de Cd y Zn difieren de las de aquel. Por otro lado, la semejanza entre ellos afecta a la distribución del cadmio y aumenta sus propiedades tóxicas, ya que puede desplazar al cinc de las enzimas que lo contienen. El cadmio siempre aparece asociado al cinc en la corteza terrestre y se obtiene como un subproducto en la minería y extracción del cinc, además acompaña siempre como contaminante al cinc y a sus productos, como puede ser el acero galvanizado (acero tratado con cinc, para prevenir la corrosión). Además, el cinc se emplea en fertilizantes, aleaciones, pinturas, tintes y llantas. Por su parte, el cadmio se emplea también como galvanizante, o como estabilizante de plásticos, en pigmentos, en soldaduras y en las baterías de Ni-Cd.

El cinc es un micronutriente esencial para los organismos, jugando un papel más importante en las células eucariotas que en las procariotas, probablemente debido a la menor disponibilidad de este metal en la tierra primitiva. En estas células el cinc está considerado como el segundo metal en importancia, sólo por detrás del hierro. Por el contrario, no se conoce ninguna función biológica para el cadmio. Las características del ion Zn^{2+} (radio iónico pequeño, 65 pm, y alta carga) le confieren carácter de ácido de Lewis, por lo que participa en las actividades enzimáticas como tal, sin variar su estado de oxidación. En animales y plantas aparece como componente de más de un centenar de enzimas diferentes, la mayoría de ellas extracelulares o vesiculares y con función digestiva (fosfolipasa, carboxipeptidasa, fosfatasa alcalina, ...), aunque también pueden ser citoplásmicas (anhidrasa carbónica, aspartato transcarbamilasa, RNA/DNA polimerasas, ...). En el centro activo de algunas de estas enzimas puede haber más de un átomo de Zn, aunque las agrupaciones que forma, generalmente con histidina y glutamato o aspartato, son más flexibles que las que forma el hierro en los centros 4Fe – 4S, por ejemplo. En otras proteínas el Zn puede actuar como elemento de enlace entre cuatro grupos tiólicos, o una combinación de tiolatos e histidina (alcohol deshidrogenasa, aspartato transcarbamilasa). El cinc también forma parte de proteínas no enzimáticas, actuando en estos casos como un estabilizador de la estructura terciaria (metalotioneína). Un ejemplo importante de este último grupo de proteínas lo constituyen los denominados dedos de cinc ("zinc fingers"), proteínas que se unen al DNA de células eucariotas en las regiones promotoras, controlando su expresión. Es interesante hacer notar que el número de proteínas relacionadas con los dedos de cinc aumenta con el desarrollo evolutivo de los distintos organismos: no existen en *E. coli*, hay unas 150 en levaduras, 550 en el gusano *C. elegans*, y unas 2.000 en los seres humanos. Algo similar ocurre con el número de metaloproteasas dependientes de cinc: 1-2 en levaduras, ~100 en el gusano, y un número mucho mayor en humanos.

El cinc es uno de los principales factores que controlan el crecimiento de los organismos eucariotas, dependiendo la velocidad del proceso de división celular de la concentración de este metal y de su transferencia, por lo que es considerado como una hormona (de hecho, su deficiencia causa enanismo). El cinc es componente de numerosos factores de transcripción y tiene una gran influencia en la síntesis de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

proteínas, por lo que su deficiencia se traduce en una importante disminución tanto de la síntesis proteica como de la de otros factores. En plantas de arroz, se ha observado que la deficiencia de cinc limita la síntesis de ribosomas 80S, esenciales para la traducción de los mRNA.

La importancia del cinc en la agricultura sólo ha sido reconocida recientemente, habiéndose encontrado que una tercera parte de la superficie cultivada es deficiente en este metal. Para solucionar este problema se emplean abonos suplementados con cinc, sin embargo, y debido a la inevitable presencia del cadmio, que además es un contaminante de los fosfatos, éste puede terminar acumulándose en los terrenos agrícolas, ser incorporado de forma activa por las plantas y terminar acumulándose en los alimentos (la principal fuente de adquisición de cinc y cadmio por los animales son los vegetales y los granos). El cadmio, al igual que diferentes metales pesados, se concentra en el tallo y las hojas de algunas plantas, consideradas hiperacumuladoras, por lo que se emplean para la recuperación de suelos contaminados. En el caso del tabaco, el cadmio se acumula en las hojas, por lo que las personas fumadoras inhalan una dosis extra de este metal. Se ha determinado que la concentración de cadmio en la sangre de las personas muy fumadoras es el doble que la de los no fumadores. Los niveles de cadmio pueden incrementarse también por el empleo para el riego de aguas contaminadas (de fundiciones de cinc, aguas residuales, etc.). En el valle del Jinzu (Japón) se produjo un episodio de envenenamiento debido al uso de agua contaminada con cadmio para el riego de los campos de arroz, dando lugar a una enfermedad degenerativa de los huesos ("itai-itai"), sobre todo en mujeres mayores, similar a la osteoporosis. El pH del suelo es un factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la contaminación por el cadmio, el cual es más retenido en suelos neutros o básicos que si el pH del suelo es ácido, como ocurre en el caso de los arrozales de Jinzu (pH de 5,1). La presencia de $CaCO_3$ y de óxidos de hierro y manganeso, buenos absorbentes del cadmio, también minimizan sus efectos. La exposición crónica al cadmio también se ha relacionado con la aparición de enfermedades coronarias y pulmonares, con la supresión del sistema inmune y con diversas enfermedades de hígado y de riñón.

En los organismos fotosintéticos, uno de los requerimiento más importantes de cinc está relacionado con la anhidrasa carbónica, necesaria para transportar y suministrar CO_2 y HCO_3^- a la Rubisco durante la fijación de carbono. La velocidad de fijación fotosintética de CO_2 está limitada por la cantidad de CO_2 y por la concentración de cinc. Esto puede ocurrir en el caso de los lagos eutróficos, donde el crecimiento descontrolado de las algas agotan el CO_2 y el cinc disponibles.

Las plantas toman el cinc presente en el suelo a través de transportadores específicos en las células radicales. Este sistema, que también puede transportar otros cationes divalentes (Cd^{2+} y Cu^{2+}), es selectivo para el Zn^{2+}, para el que presenta una baja K_m (µM). No obstante, hay que tener en cuenta que la velocidad de transporte va a venir limitada por la concentración de Zn^{2+} en el suelo, que oscila entre 1 nM y 1 µM, generalmente, valores que están por debajo de la K_m. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado varios sistemas de transporte para el Zn^{2+} (ZIP1-4), con valores de K_m entre 2 y 14 µM. Al igual que otros sistemas de transporte descritos, éstos constan de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ocho regiones de hélice α que atraviesan la membrana, con un dominio citoplásmico rico en histidinas, entre la tercera y la cuarta hélices, que está relacionado con el sitio de unión del metal para su transporte. ZIP1 y ZIP3 son los transportadores implicados en la absorción del Zn^{2+} del suelo, ya que se expresan en las raíces en respuesta a su deficiencia en las células. ZIP4, que se expresa en la raíz y en el tallo, es un transportador intracelular de Zn^{2+} que no se encuentra localizado en la membrana plasmática.

En la planta hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* (miembro de la familia Brassicaceae), que acumula en tallo y hojas grandes cantidades de Cd y Zn (40 mg g^{-1} de peso seco, frente a una concentración habitual en los tejidos de 100-200 μg g^{-1}), existe en las raíces un sistema de transporte de Zn^{2+} similar al de *Arabidopsis*, denominado ZNT1, con una K_m = 6-8 μM, pero con un valor de velocidad máxima cinco veces superior al observado en *T. arvense*, planta relacionada pero que no es acumuladora. ZNT1 se expresa en la raíz y en las hojas de *T. caerulescens* en gran cantidad, independientemente de que en las condiciones celulares exista deficiencia o suficiencia de Zn^{2+}, mientras que en *T. arvense* ZNT1 sólo se expresa cuando la planta no tiene Zn^{2+} suficiente para su crecimiento. Como en el caso de los transportadores ZIP, ZNT1 también puede transportar Cd^{2+} y Cu^{2+}, aunque menos eficientemente.

La exposición a metales pesados como el Cd^{2+}, induce en las plantas y en las levaduras la síntesis de unos polímeros con la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$Gly (n = 2-11), denominados fitoquelatinas. Estos polímeros se sintetizan a partir de unidades de glutatión, por transpeptidación y pérdida de Gly. Las fitoquelatinas, ricas en grupos SH, retiran el Cd^{2+}, o el exceso de otros metales, del citoplasma y lo acumulan en vacuolas, donde, finalmente, se forman cristales de CdS. En el caso de los animales, existe una proteína, la metalotioneína, rica en cisteínas y con una gran afinidad por los metales pesados, a los que se une y retira del medio.

En las levaduras también se han descrito sistemas de transporte específicos para el Zn^{2+}. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que existen dos sistemas de transporte, uno de alta y otro de baja afinidad. La transcripción de la proteína de alta afinidad (ZRT1; K_m = 0,5-1 μM) está regulada por concentraciones bajas de Zn^{2+}, mientras que el transportador de baja afinidad (ZRT2; K_m = 10 μM) también se encuentra regulado por la concentración interna de Zn^{2+}, aunque no está claro si es a nivel de la transcripción o si es postranscripcional.

Aunque el cinc juega un papel menos importante en los organismos procariotas, su presencia sigue siendo esencial para ellos, participando en actividades catalíticas (anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa) y de estabilización de la estructura de diversas enzimas (RNA y DNA polimerasas). Como elemento esencial, pero potencialmente tóxico, la homeostasis del Zn es crucial para todos los organismos. En los procariotas la homeostasis se consigue regulando la entrada y la salida del metal. En *E. coli* y en *Haemophilus influenzae*, se han descrito dos sistemas de transporte, ZnuABC y ZntA, que cumplen este cometido. Por un lado, la deficiencia de Zn en la bacteria induce la expresión de un sistema específico para su entrada en la célula, denominado ZnuABC, el cual es un transportador de tres componentes del tipo ABC con una actividad ATPasa asociada. ZnuA es una proteína periplásmica (36 kDa) encargada de captar el Zn^{2+} y transferirlo a ZnuB, que es una proteína de la membrana

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

plasmática (28 kDa), que transloca el catión hacia el citoplasma en conjunción con la ATPasa ZnuC (28 kDa). El sistema resulta reprimido, cuando hay Zn^{2+} suficiente, por una proteína, Zur, que se une a la región promotora de los genes *znu*. Por otro lado, cuando la concentración de cinc en el medio es elevada, se induce otro sistema de transporte, ZntA, que funciona expulsándolo del interior de la bacteria. ZntA es una ATPasa del tipo P transportadora de Zn, específica para el transporte de Zn^{2+}, aunque también puede acoplar la hidrólisis de ATP al transporte de Cd^{2+} y Pb^{2+}, por lo que también confiere resistencia a estos cationes. La transcripción de *zntA* se encuentra regulada positivamente por ZntR, de forma análoga a como actúa MerR. Proteínas análogas a ZntA se han descrito en otras bacterias Gram negativas, como *Salmonella typhimurium, Vibrio cholerae, Yersinia pestis, Deinococcus radiodurans* y *Proteus mirabilis*. En la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* se ha descrito una proteína análoga a ZntA, denominada CadA, que confiere resistencia a cadmio, y que forma parte de un sistema de dos componentes, donde CadA es una ATPasa de tipo P y CadC, el otro componente, es un represor de la transcripción, al contrario que en el caso de ZntA y su activador ZntR.

Estos sistemas de transporte, que están ampliamente distribuidos entre los organismos, y de los que se han descrito más de 50, se conocen como "ATPasas translocadoras de iones metálicos débiles" (soft metal ion-translocating ATPases) o, más abreviadamente, "ATPasas de metales débiles" (soft metal ATPases), donde el término débil hace referencia a su carácter de ácidos débiles de Lewis, e incluye ATPasas de tipo P y de tipo ABC, capaces de transportar y conferir resistencia a metales de transición (cobre y cinc), a metales pesados (cadmio y plomo) y a metaloides (arsénico y antimonio).

Silicio y boro

El silicio es el segundo elemento más abundante de la corteza terrestre, sólo superado por el oxígeno, representando casi el 30% del total. Normalmente se presenta asociado con el oxígeno formando silicatos (H_4SiO_4) o dióxido de silicio (SiO_2), compuestos muy insolubles y que forman la base de muchos minerales y suelos. Aunque el silicio es un elemento muy relacionado con el carbono, e incluso puede formar polímeros ($HO-Si^{2+}-O-Si^{2+}-O-Si^{2+}-OH$, siloxanos), su importancia biológica se encuentra limitada a determinados grupos de organismos, como las plantas herbáceas, algunos moluscos, las esponjas o diversos organismos unicelulares. Incluso, en alguno de ellos, como en las diatomeas, es uno de los elementos más abundantes. En general, sus funciones son de tipo estructural, llegando a formar estructuras bastante complejas. La forma dominante en los exoesqueletos de diatomeas, radiolarios o silicoflagelados, es el $SiO_2 \times n\ H_2O$, amorfo. En la mayoría de animales superiores, sin embargo, sólo se necesitan trazas de silicio, aunque en el hombre, por ejemplo, hay tanto silicio como magnesio, y se encuentra implicado en la formación de huesos y cartílagos, contribuyendo también a la fortaleza del colágeno. Además, el silicio participa en la formación de glucosaminoglucanos. La concentración de Si es particularmente alta en las mitocondrias de las células osteogénicas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

También se ha relacionado el contenido de silicio en los tejidos conjuntivos con el envejecimiento.

Hongos, cianobacterias y líquenes pueden disolver la sílice de las rocas en las que viven mediante la excreción de ciertos ácidos orgánicos (2-cetoglucónico, cítrico, oxálico), lo que contribuye al proceso de meteorización de las rocas y a la formación del suelo.

Las diatomeas, por el contrario, son las principales responsables de la precipitación de la sílice disuelta. El ácido silícico disuelto es un nutriente esencial, y a veces limitante, para el desarrollo de las diatomeas, y es el principal causante de la sucesión estacional de diatomeas en algunos lagos. La absorción y precipitación organizada de sílice comprende la formación de complejos de sílice orgánica con enlaces Si–C o Si–O–C y la deposición de la sílice de forma ordenada sobre una matriz orgánica preformada. En la diatomea *Cylindrotheca fusiformis* se han caracterizado cinco genes relacionados con el transporte de silicio (*sit*) cuya expresión se induce antes y durante la síntesis de la pared celular.

Un aspecto importante del comportamiento biológico del silicio es que, salvo en las condiciones patológicas de la enfermedad de Alzheimer, no forma aluminosilicatos, que son muy abundantes en la naturaleza. Por otro lado, el silicio actúa frecuentemente como protector frente a la intoxicación por aluminio, por ejemplo en los peces.

El boro, como el silicio, es un elemento no metálico que es esencial para las plantas superiores. Al contrario que el silicio, el boro es bastante escaso (menos de 1 ppm en la corteza terrestre) y, normalmente, se encuentra en depósitos localizados de boratos o poliboratos metálicos, como el de sodio (bórax, $Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$), que se obtiene de los depósitos que se forman en los lagos desecados. En el agua del mar los boratos, junto con carbonatos, fosfatos y sulfatos, también contribuyen al mantenimiento del pH:

$$H_3BO_3 \longleftrightarrow H_2BO_3^- + H^+ \longleftrightarrow HBO_3^{2-} + H^+ \longleftrightarrow BO_3^{3-} + H^+$$

En animales y hongos no se ha demostrado la necesidad de boro, pero si lo es para ciertas algas, esponjas y diatomeas, además de para las plantas, donde se condensa con la pectina y forma parte de la pared celular. Por tanto, el boro se comporta en las plantas como el silicio en animales y plantas, ya que ambos se unen para estabilizar tejidos conjuntivos. El ácido bórico H_3BO_3 condensa con *cis*-dioles de polisacáridos específicos de las plantas, dando lugar a productos de condensación, moderadamente lábiles, como la boromicina y la aplasmomicina. El tartrolón B, un antibiótico con boro aislado a partir de un cultivo de una mixobacteria, presenta una estructura similar a la boromicina.

En las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, también se ha determinado la necesidad de boro para estabilizar la estructura de los heterocistos. En estas células, especializadas en la fijación de nitrógeno, los grupos OH de la capa glicolipídica interna de las membranas interaccionan con el boro formando complejos estables, de manera parecida a como ocurre en las plantas superiores.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Aluminio

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre y el tercero entre todos los elementos (8,2%), estando en forma de aluminosilicatos, generalmente, como componente de feldespatos y arcillas. La proporción relativa de aluminio en los minerales se incrementa con el proceso de meteorización de las rocas, formando finalmente óxidos de aluminio ($Al_2O_3 \times 3\ H_2O$, gibsita). El aluminio, tanto en forma de aluminosilicato como de óxido hidratado, es muy estable, mientras que, en las condiciones oxidantes que existen en la superficie terrestre, el alumino metálico es menos estable, incluso, que el hierro metálico ($\Delta G^{o\prime} = -1.580$ kJ mol^{-1}, para la formación de Al_2O_3 a partir de Al^0; y –740 kJ mol^{-1}, para la oxidación del Fe^0 a Fe_2O_3). No obstante, debido a sus propiedades (ligereza, buena conductividad térmica y eléctrica, maleabilidad, resistencia a la corrosión, etc.), se emplea ampliamente en la construcción, para transporte y almacenamiento, en la industria eléctrica, etc. La resistencia a la corrosión la adquiere por la formación de una capa de Al_2O_3 (alúmina), que es muy poco soluble en un rango amplio de pH (4,5-10), y protege de posteriores oxidaciones. Los iones Cl^-, abundantes en los ambientes marinos, destruyen esta capa protectora por formación de complejos solubles con el aluminio.

La toxicidad del aluminio se basa, principalmente, en su capacidad para sustituir al Mg^{2+} en las reacciones biológicas. La unión del aluminio al ATP es 10^7 veces más fuerte que la del magnesio y su velocidad de intercambio de ligando 10^{-5} veces más lenta, de ahí la inhibición de las enzimas dependientes de magnesio. El crecimiento de *E. coli* se inhibe a concentraciones milimolares de Al^{3+}, y el de la cianobacteria *Anabaena cylindrica* incluso a concentraciones micromolares. Sin embargo, existen algunos organismos acidófilos, como *Acidiphilium cryptum, Acidithiobacillus thiooxidans* o *Acidobacterium capsulatum*, que se desarrollan en ambientes ácidos (pH ~3) con una concentración 100-200 mM de aluminio. La resistencia al aluminio en estos microorganismos no se induce por Fe^{3+} ni por metales divalentes, respondiendo sólo a la presencia de aluminio en el medio.

El aluminio es mucho menos tóxico para los animales que para las plantas, y además éstas están más expuestas a la intoxicación por el metal, ya que mientras que la cantidad de aluminio disuelto en agua es, normalmente, muy baja (50 μg dm^{-3}), las raíces de las plantas se desarrollan en un ambiente donde las concentraciones de aluminio son altas, aunque las formas fitotóxicas del aluminio son poco solubles en la mayoría de condiciones ambientales, con suelos neutros o ligeramente ácidos o básicos. No obstante, si el pH del suelo disminuye por debajo de 5 (lluvia ácida, drenaje de minas), se puede movilizar el aluminio, lo que afecta al crecimiento y a las funciones de la raíz. La toxicidad por el aluminio es uno de los factores más importantes que limitan el rendimiento de las cosechas en suelos ácidos, que son más del 10% de la superficie cultivada, encontrándose la mayoría en países tropicales (más del 60%) y subtropicales. Por otro lado, el uso intensivo de fertilizantes con sales amónicas provoca la acidificación de los suelos agrícolas, incrementando el problema de la toxicidad del aluminio. Un remedio que se puede emplear consiste en neutralizar el suelo con una solución de cal, pero el tratamiento de grandes superficies resulta caro.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La intoxicación por aluminio provoca, en primer lugar, una inhibición del crecimiento de la raíz y hace a la planta más sensible a las carencias nutricionales y a otros tipos de estrés. A largo plazo, se bloquean los canales de Ca^{2+} y K^{+}, lo que provoca deficiencias de nutrientes minerales. La forma fitotóxica es el Al^{3+}, que es la que abunda a pH < 5, que puede formar complejos con grupos sulfato, fosfato o carboxilato, como los que se encuentran en muchas macromoléculas biológicas. Los efectos tóxicos del aluminio son mayores en la zona apical de la raíz, que es también donde se desarrollan la mayoría de mecanismos de tolerancia al metal.

La resistencia de las plantas frente al aluminio puede desarrollarse mediante la acumulación de éste en el simplasma, o por exclusión de la zona apical de la raíz. Los primeros implican la quelación del aluminio con ligandos de baja masa molecular (malato, citrato) o proteínas citoplásmicas ligantes de aluminio, y su almacenamiento en vacuolas. Por su parte, la exclusión del aluminio se puede conseguir por la liberación de quelantes de baja masa molecular en la rizosfera (oxalato, catequina y otros derivados fenólicos de tipo flavonoide); por el aumento del pH de la rizosfera, mediado por la raíz e inducido por el aluminio; inmovilizando el aluminio en la pared celular; disminuyendo la permeabilidad de la membrana plasmática a la entrada de aluminio; y uniendo el aluminio al mucigel asociado al ápex de la raíz.

Cobre, níquel y cobalto

Estos tres metales son micronutrientes esenciales en la mayoría de los organismos, aunque las concentraciones que se necesitan son tan pequeñas que raramente son limitantes para el crecimiento y normal desarrollo celular. De los tres, el que participa en un mayor número de biomoléculas es el cobre, mientras que el cobalto, incluso, no es considerado como esencial para la mayoría de las plantas, aunque su presencia sí es beneficiosa. En la naturaleza, suelen presentarse en minerales asociados junto con otros metales, en forma de sulfuros, Cu_2S (calcocita), $CuFeS_2$ (calcopirita), CoS, NiS, aunque no son muy abundantes. No obstante, cuando por motivos naturales o antropogénicos se encuentran en el agua o en el suelo a concentraciones altas se convierten en tóxicos para los organismos. El cobre, además, es uno de los pocos metales que puede encontrarse en la forma metálica en estado libre, aunque son más frecuente los sulfuros, el óxido (Cu_2O, cuprita) y el hidroxicarbonato [$Cu_2(CO_3)(OH)_2$, malaquita].

El cobre es el componente metálico de un amplio número de proteínas, con funciones muy diversas, generalmente relacionadas con la transferencia electrónica, oscilando con facilidad entre las formas de Cu^{2+} y Cu^{+} ($E^{o\prime}$ del par Cu^{2+}/Cu^{+} varía entre 280 y 800 mV, dependiendo del microambiente proporcionado por las diferentes proteínas). La mayoría de las proteínas de cobre no son citosólicas, pudiendo ser extracelulares (galactosa oxidasa, amino oxidasa, lacasa), de membrana (citocromo oxidasa, metano oxidasa, receptor de etileno), o vesiculares (dopamina monooxigenasa, glicina-terminal oxidasa). Por su parte, las cuproproteínas citosólicas suelen estar relacionadas con el metabolismo oxidativo (superóxido dismutasa, que también contiene Zn). Los centros de cobre en estas proteínas pueden ser de varios tipos, con estructuras muy diferentes, en los que pueden participar uno o más átomos de cobre, normalmente

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ligados a átomos de N de cadenas laterales de histidinas, a O de tirosinas, o a S de cisteínas. También pueden participar otros grupos, como glutamato o metionina. En los organismos fotosintéticos, incluidos los procariotas, el cobre también participa en el proceso de la fotosíntesis, formando parte de la plastocianina. El cobre juega también un papel muy importante en la respiración del nitrato (reducción desasimiladora) por las bacterias desnitrificantes, ya que la nitrito y la óxido nitroso reductasas, dos de las enzimas implicadas en el proceso, que es periplásmico, contienen cobre.

La intoxicación por altas concentraciones de cobre no suele ser frecuente, debido a la baja solubilidad de los minerales de cobre. En las células animales, el cobre en exceso en el citoplasma (cuya concentración se mantiene en torno a 10^{-15} M) es unido a los grupos SH de la proteína metalotioneína (MT), que puede unir ocho iones Cu^{+}. Los complejos Cu–MT se almacenan en vesículas, al contrario de lo que ocurre con los complejos que forma esta proteína con los iones Zn^{2+} y Cd^{2+}, que permanecen en el citoplasma. En las células vegetales, aunque también poseen metalotioneína, son las fitoquelatinas las encargadas de retirar el exceso de cobre en el medio y almacenarlo en vacuolas. Se han descrito diversos sistemas de transporte específicos para el Cu^{+} a través de la membrana, como la ATPasa de tipo CP-x (tiene una región de cisteína/prolina, CP), o en el citoplasma, para el intercambio de cobre (ATx-1, LYS-7 o COX-17, que contienen una secuencia M-X-C-X-X-C, específica para la unión de Cu^{+}).

La presencia de níquel y cobalto en las proteínas se suele relacionar con organismos primitivos y con el metabolismo de compuestos simples como CH_4, CO e H_2, al contrario de lo que ocurre con el cobre, que se asocia, en general, con organismos evolucionados y con la presencia de O_2. No es de extrañar, por tanto, que la concentración de ambos metales en el suero humano sea inferior a 1 μg dm^{-3}, frente a las de cinc, hierro o cobre, que son del orden de 100 μg dm^{-3}. En los organismos superiores, la ureasa, que contiene dos iones níquel en su centro catalítico, es la única proteína con este metal, aunque las bacterias anaeróbicas en simbiosis con algunos organismos mantienen el uso del níquel en varias reacciones. En los vertebrados no se conoce ningún proceso propio en el que participe directamente el níquel. En los microorganismos anaerobios, el níquel es el componente metálico de muchas hidrogenasas, así como de enzimas tan importantes como la monóxido de carbono deshidrogenasa. En las arqueobacterias metanogénicas, el níquel forma parte de uno de sus coenzimas exclusivos, el coenzima F430, anillo tetrapirrólico que contiene Ni^{+} (véase Capítulo 5).

Por su parte, el papel del cobalto (como Co^{3+}) está casi exclusivamente relacionado con su función como vitamina B_{12}, o cobalamina, que es esencial para gran parte de los seres vivos, y que participa en diversas reacciones como coenzima portador de grupos metilo. En las plantas, esta función la lleva a cabo el metionil-CoA, con enzimas que utilizan cinc, hierro o manganeso. Existen otras proteínas en las que el Co^{2+} no se encuentra unido al núcleo tetrapirrol de corrina, como es el caso de la metionina aminopeptidasa, que se encuentra en el citoplasma de muchos organismos procariotas y eucariotas. Esta enzima, encargada de eliminar la metionina terminal, posee dos átomos de cobalto en el sitio activo, unidos a grupos N y O de la proteína. Entre

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

los microorganismos, la variedad de enzimas con cobalto es mayor: adenilato quinasa, glucosa isomerasa, aldehído descarboxilasa, etc.

Los problemas de toxicidad por níquel y cobalto derivan de la semejanza que presentan los hidratos de estos iones con el de magnesio, con el que comparten, además, sistema de transporte en plantas y bacterias. Dado que el magnesio es absolutamente esencial, níquel y cobalto deben ser retirados del medio, por ejemplo, en vacuolas en el caso de las plantas. En algunas bacterias, como *E. coli* se han descrito sistemas de transporte específicos para estos metales. Así, para el níquel existe un sistema codificado por el operón *nikABCDE*, que incluye una ATPasa transportadora con una serie de histidinas que sirven para unir el metal. NikA es una proteína periplásmica que une Ni con una alta afinidad ($K_d < 0{,}1$ μM), NikB y NickC forman un poro que permite el paso del Ni, y NikD y NikE acoplan la hidrólisis de ATP al transporte del metal. Algo similar ocurre con los genes *cob*, implicados en el procesamiento de la vitamina B_{12}. La expresión de estos genes se encuentra bajo el control de los factores de transcripción FNR y ARC.

Molibdeno, wolframio, vanadio y cromo

De estos cuatro metales de transición, sólo el molibdeno es esencial para la mayoría de organismos, formando parte de un importante número de proteínas rédox. Por su parte, vanadio y wolframio (tungsteno) se necesitan para el crecimiento de algunos microorganismos particulares, mientras que el cromo, el menos estudiado, se ha postulado como elemento que juega un papel importante en algunos procesos de los seres vivos.

El molibdeno, aunque no es muy abundante en la corteza terrestre (0,5-5 ppm en los suelos) está fácilmente disponible por los sistemas biológicos ya que sus sales son muy solubles. Además, el molibdeno es el metal de transición más abundante en los mares. Las formas más abundantes en la naturaleza son como Mo^{4+} (MoS_2, molibdenita) y como Mo^{6+} (MoO_4^{2-}, a pH < 5, y $HMoO_4^-$, a pH > 5). En los sistemas biológicos su estado de oxidación oscila también entre esos dos valores, aunque la valencia +5 también es posible, lo que le permite actuar de intermediario entre los sistemas rédox de uno y de dos electrones.

El wolframio, que presenta algunas propiedades muy parecidas a las del molibdeno y es igualmente versátil, reemplaza a éste en los pocos organismos que no requieren molibdeno. Incluso, en condiciones anaeróbicas, el wolframio muestra algunas ventajas sobre el molibdeno, ya que es más soluble y tiene un potencial rédox más negativo. Por esto, las proteínas con W se encuentran en microorganismos anaeróbicos obligados, por lo general termófilos, y muchos de ellos arqueobacterias. Algunos organismos mesofílicos pueden usar Mo o W en algunas proteínas, dependiendo de la disponibilidad de cada uno de ellos y de las condiciones de crecimiento.

El vanadio, cuya concentración en las aguas marinas es algo inferior a la del molibdeno, pero mayor que la de wolframio, también puede llevar a cabo el papel del molibdeno en la catálisis enzimática. En un gran número de procariotas fijadores de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

nitrógeno, como *Azotobacter chroococcum,* se han descrito nitrogenasas alternativas que poseen V en lugar de Mo. El cofactor de hierro y vanadio (CoFeV) y la enzima conservan sus propiedades y, en ausencia de molibdeno, suministran al organismo suficiente amonio para mantener un crecimiento normal.

Salvo en el caso de la agrupación con el hierro en el CoFeMo de la nitrogenasa bacteriana, las molibdoenzimas (y las que contienen W) son mononucleares, con el metal unido a un cofactor de pterina por dos S (molibdopterina; Fig. 6.16). La presencia de molibdeno en las enzimas está relacionada con su participación en procesos rédox, como la reducción de nitrato, o la oxidación de sulfito o de xantina, etc. En algunas enzimas (DMSO reductasa, formiato deshidrogenasa, arsenito oxidasa) el Mo se une a dos moléculas de pterina. La síntesis de este cofactor implica la acción de más de doce proteínas y es uno de los procesos conservados universalmente. La importancia de la síntesis de pterina se pone claramente de manifiesto si se considera que todos los organismos conocidos contienen dicha ruta biosintética, mientras que, por ejemplo, la síntesis del grupo hemo está ausente en algunos microorganismos (lactobacilos y algunos enterococos). Otra característica de la mayoría de las enzimas que contienen molibdeno es la presencia de otros cofactores que participan en las reacciones de óxido-reducción, como son las flavinas o los centros sulfoférricos.

Para el transporte de molibdeno al interior celular, las bacterias emplean el sistema codificado por los genes *modABCD*. La proteína MoD A es la encargada de recoger el MoO_4^{2-} en el exterior de las células y transferirlo al interior, a través de MoD B, que bombea el molibdato con gasto de ATP. MoD C es una proteína citoplásmica que une Mo y lo distribuye, mientras que MoD D es un factor de transcripción que activa la transcripción del operón *mod,* cuando se le une el molibdeno.

La mayoría de las enzimas con wolframio que se conocen tienen una molibdoenzima análoga en el mismo organismo o en alguno estrechamente relacionado. Sin embargo, en la arqueobacteria hipertermófila *Pyrococcus furiosus*, para la cual el wolframio es un elemento esencial, se han caracterizado tres aldehído:ferredoxina óxido-reductasas que contienen wolframio unido a dos pterinas en el sitio activo, además de un centro de 4Fe–4S. En estas enzimas, el W no puede ser reemplazado por Mo.

El vanadio suele presentarse en la naturaleza en forma de anión vanadato (VO_4^{3-}), aunque también puede existir en otras formas iónicas combinadas con oxígeno (VO^{2+}, VO_2^{+}), que actúan como agentes oxidantes, en combinación con azufre (VS_4^{3-}, VS^{2+}, $VSSH^{+}$) o como catión V^{3+}. En esta última forma se almacena, en concentraciones elevadas (~250 mM en *Ascidia gemmata*), en vacuolas (vanadóforos) de las células sanguíneas (conocidas como vanadocitos) de los urocordios, animales procordados que normalmente viven fijos en los fondos marinos. El vanadio se encuentra en estas células a una concentración 10^7 veces superior a la que existe en el agua del mar. El papel del V^{3+}, agente reductor fuerte, se ha relacionado con la síntesis de la túnica (sustancia parecida a la celulosa) por reducción de CO_2.

El cromo puede presentarse en el ambiente como Cr^{6+} (mutágeno para procariotas y eucariotas, incluidos los mamíferos) o, más usualmente, como Cr^{3+} ($FeCr_2O_4$, cromita),

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que es ~1.000 veces menos tóxico y que es esencial (trazas) para el metabolismo de carbohidratos en humanos. El Cr^{6+} se produce en algunos procesos industriales, como en los cromados, tratamientos del cuero y conservación de maderas. Los vertidos de estas industrias han producido un aumento de su concentración en diversos medios acuáticos.

Algunas bacterias reductoras de sulfato, como *Desulfovibrio vulgaris* o *Desulfotomaculum reducens* pueden llevar a cabo la reducción del Cr^{6+} a Cr^{3+}, utilizando H_2 como donador de electrones, utilizando el citocromo c_3 como catalizador del proceso. Incluso, *D. reducens* puede crecer en anaerobiosis empleando la energía liberada en el anterior proceso de reducción del Cr^{6+} para la oxidación de diversos compuestos orgánicos (butirato, lactato, valerato). También se ha descrito que un consorcio de bacterias, formado por bacterias degradadoras de fenol y por *E. coli*, puede llevar a cabo, simultáneamente, la reducción del cromo y la degradación de fenol, en condiciones anaeróbicas. En estas condiciones, *E. coli* utiliza los metabolitos formados en la degradación del fenol por las otras bacterias como fuente de electrones para la reducción del cromo. El interés de esta doble eliminación radica en que ambos suelen encontrarse como contaminantes de los mismos acuíferos.

En humanos, el Cr^{3+} se ha descrito como componente del "factor de tolerancia a la glucosa" (GTF), que potencia la acción de la insulina y es esencial para mantener los niveles de glucosa. En este sentido, se ha visto que el cromo puede unirse a un péptido de bajo peso molecular (< 10 kDa), denominado cromodulina, en proporción de cuatro Cr^{3+} por monómero. El complejo formado estimula una actividad quinasa relacionada con el receptor de insulina.

Arsénico

En la naturaleza el arsénico se presenta en los estados de oxidación +3 y +5, y, generalmente, es tóxico para los organismos, aunque algunos problemas de crecimiento y en la reproducción de algunos organismos se han asociado a su deficiencia. La toxicidad del arsénico viene dada por su reacción con los grupos SH de las proteínas. Diversos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia al arsénico y poseen enzimas que oxidan el As^{3+} hasta As^{5+}, y otras que catalizan la reducción en sentido contrario, siendo la formación de compuestos de metilarsénico uno de los procesos más empleados para la destoxificación.

El arsénico sobre la superficie terrestre proviene, en último término, de la actividad volcánica y en los suelos se encuentra a concentraciones muy bajas, que van desde 0,1 a 100 ppm. La concentración en ambientes acuosos naturales oscila entre valores de 0,4 y 2,6 ppb. Sin embargo, en zonas mineras o industriales la concentración en el polvo atmosférico puede llegar a ser del orden de 400 ppm. Las sales de arsénico se han empleado durante mucho tiempo en medicina (enfermedades por protozoos), en agricultura (herbicida) y en ganadería (aditivo para la comida de los animales). También se emplea como agente conservante en muchos alimentos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El ciclo biogeoquímico del arsénico está ligado fundamentalmente a los microorganismos, mientras que el papel de animales y plantas queda reducido al de su bioacumulación en los ambientes en los que viven. Los efectos antropogénicos más importantes sobre el ciclo están ligados a la utilización en la industria minera y, más recientemente, en la de semiconductores.

El arseniato (AsO_4^{3-}), el compuesto de arsénico más abundante en los ambientes marinos, es transformado en arsenito (AsO_3^{3-}) por diversos organismos (fitoplancton, algas, crustáceos, moluscos y peces). El arsenito formado puede sufrir diversas reacciones de metilación y reducción dando lugar a compuestos como el metilarsenato ($CH_3AsO_3^{2-}$) o el dimetilarsenito [$(CH_3)_2AsO_2^-$], o es convertido en diferentes arsinas (dimetilarsina, $HAs(CH_3)_2$, trimetilarsina, $As(CH_3)_3$, óxido de trimetilarsina, $As(CH_3)_3O$), que son excretadas al medio. Sin embargo, parte de estos compuestos son metabolizados por algunos microorganismos formando compuestos orgánicos complejos. Algunas algas pueden formar dimetilarsenoazúcares, solubles en agua, o arsenolípidos, solubles en lípidos, que finalmente son transformados por diversos organismos marinos (algas, crustáceos, etc.) en arsenobetaína [$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$]. La arsenobetaína es degradada por los microorganismos de los sedimentos costeros, produciendo metilarsenato y arsénico inorgánico, con lo que se completa el ciclo en los biosistemas marinos.

Diversos hongos pueden formar trimetilarsina, que es volátil y con olor a ajo. Este compuesto también pueden sintetizarlo bacterias anaeróbicas, algunas de ellas en tejidos animales, como las bacterias del intestino de los ratones, lo que les confiere una cierta resistencia al arsénico.

El arseniato suele ser introducido en las células por los mismos sistemas de transporte que el fosfato, dadas sus semejanzas estructurales. Así, se ha determinado que *E. coli* puede emplear el sistema Pst de tres componentes (PstB, PstC y PhoS), que hidroliza ATP, o el transportador Pit, que está acoplado a un potencial. Por su parte, el arsenito es transportado por la proteína GlpF, una gliceroporina tetramérica que normalmente transporta glicerol.

Algunos microorganismos poseen genes *ars*, que confieren resistencia específica frente al arsénico, normalmente en operones situados en plásmidos, aunque en *E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* estos determinantes se encuentran en el cromosoma. La resistencia se consigue gracias a una bomba que expulsa arsénico del citoplasma, haciendo que disminuya su concentración intracelular. El sistema de *E. coli* y de otras bacterias Gram negativas consiste en un complejo ATPasa de dos componentes: ArsA, que es un componente soluble con actividad ATPasa, y que se asocia físicamente con una proteína integral de membrana, ArsB, la cual transporta específicamente As^{3+}, que también activa a ArsA. Para conseguir que todo el arsénico esté en la forma transportable, contiguo a *arsB* en el operón se encuentra *arsC*, cuyo producto es una arseniato reductasa citoplásmica monomérica, que emplea glutatión reducido como donador de electrones para pasar As^{5+} a As^{3+}. Un cuarto gen, *arsR*, actúa como regulador de la transcripción. Un operón de resistencia muy similar se ha descrito en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En algunos organismos, como *M. tuberculosis*, los genes *arsB* y *arsC* se encuentran fusionados,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

obteniéndose una proteína única con 498 residuos, mientras que en otras bacterias, como *P. aeruginosa*, existen dos copias de *arsC*, ambas funcionales, sin homología entre sus secuencias, probablemente con orígenes evolutivos diferentes.

Se ha determinado que existen, al menos, tres tipos diferentes de arseniato reductasas (ArsC). Uno de ellos emplea glutarredoxina y glutatión para la reducción, siendo la enzima de *E. coli* un ejemplo representativo. Otras arseniato reductasas, como la de *S. aureus*, emplean tiorredoxina como reductor. El tercer grupo, representado por la arseniato reductasa de *S. cerevisiae*, se encuentra más relacionado estructuralmente con proteínas de la familia de las tirosina fosfatasas que con las arseniato reductasas de bacterias. En este caso, la enzima es homodimérica y emplea glutatión y glutarredoxina en la reducción.

Además de estas arseniato reductasas citoplásmicas, existen otras que son periplásmicas y que participan en procesos de reducción desasimiladora, como componentes de una cadena de transporte de electrones respiradora, en la cual el arseniato es el aceptor terminal de los electrones en ausencia de oxígeno. En algunos ambientes acuáticos con altas concentraciones de arsénico disuelto (~200 μM), se ha descrito la respiración de arseniato por microorganismos como *Bacillus selenitereducens*. La enzima de *Chrysiogenes arsenatis* es una molibdoproteína heterodimérica con centros sulfoférricos.

Por otra parte, la oxidación de As^{3+} también puede emplearse como un proceso de destoxificación del arsenito por algunas bacterias. La arsenito oxidasa de *Alcaligenes faecalis* se localiza en la superficie exterior de la membrana citoplásmica y puede ceder los electrones al citocromo *c*. Es una proteína heterodimérica que contiene molibdopterina y un centro 3Fe–4S en la subunidad mayor (88 kDa), y otro centro 2Fe–2S de tipo Rieske en la subunidad pequeña (14 kDa). Los electrones obtenidos en el proceso se transfieren a la cadena de electrones aerobia, sin embargo, la energía producida no es suficiente para que la bacteria pueda crecer.

La liberación de formas iónicas tóxicas de As se puede producir a partir de sedimentos hacia los acuíferos con el concurso de bacterias anaerobias reductoras de Fe^{3+} (Fig. 6.51).

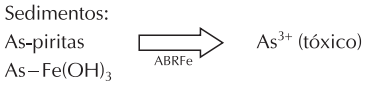


Figura 6.51. Liberación de arsénico a partir de sedimentos. ABRFe (reducción anaerobia de Fe^{3+}).

Selenio

Aunque es un elemento no metálico, el selenio posee algunas de las características de los metales, como por ejemplo su brillo. También comparte propiedades con el azufre, que es de su mismo grupo del sistema periódico, y junto con el que suele presentarse en

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

la naturaleza, en forma de seleniuros metálicos, como el de cobre y plomo (zorgita). Es un micronutriente esencial para un número importante de organismos, animales y bacterias, aunque puede llegar a ser muy tóxico. Normalmente, en las células se encuentra en forma del aminoácido selenocisteína, como parte integrante de diversas proteínas, generalmente ligadas al metabolismo oxidativo, aunque también puede aparecer como selenometionina. En algunos organismos, como *E. coli*, se ha determinado que la selenocisteína tiene su propio tRNA, que reconoce a un codón UGA (normalmente de terminación) dentro de un determinado contexto.

Debido a su potencial rédox ($E^{o\prime}$ = 475 mV, para el par Se^{6+}/Se^{4+}), el grupo SeH, selenol, de la selenocisteína es más reductor, y presenta un carácter más nucleofílico, que el grupo tiólico, SH, de la cisteína, lo que influye en las propiedades catalíticas de las selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa de mamíferos, enzima encargada de eliminar H_2O_2 y diversos peróxidos orgánicos en el citoplasma, con glutatión como donador de electrones, función similar a la que desarrolla la vitamina E en las membranas. En mamíferos se conocen más de una decena de proteínas con Se, algunas con funciones tan importantes como la yodotironina desyodinasa, encargada de la producción de la hormona tiroidea triyodotironina (T_3) a partir de la tiroxina (T_4).

Los microorganismos pueden oxidar la forma más reducida, seleniuro (Se^{2-}), hasta Se^0, selenito (SeO_3^{2-}), o seleniato (SeO_4^{2-}), de forma similar a como ocurre con sus equivalentes de azufre, empleándose la energía obtenida para el crecimiento quimiolitotrófico. De igual forma, en condiciones anóxicas, el seleniato y el selenito pueden aceptar electrones durante la oxidación de H_2 o de diferentes compuestos orgánicos reducidos. El seleniato puede incorporarse a las células utilizando los mismos mecanismos que el sulfato, ya que son estructuralmente muy parecidos.

La reducción desasimiladora de seleniato a Se^0 la llevan a cabo bacterias tan diversas como *Wolinella succinogenes, Desulfovibrio desulfuricans, Pseudomonas stutzeri* o *Enterobacter cloacae*. En algunos casos la reducción se lleva a cabo mediante reductasas no específicas para el selenio, como por ejemplo, en *E. coli*, donde la nitrato reductasa de la membrana puede reducir también el seleniato a selenito. En otros casos, sin embargo, se han descrito seleniato reductasas específicas, como es el caso del anaerobio facultativo *Thauera selenatis*, que puede crecer con acetato y seleniato o nitrato como aceptores de electrones. Cada uno de estos compuestos es reducido por una reductasa diferente. La seleniato reductasa de *T. selenatis* es una enzima periplásmica con molibdeno, hierro y azufre lábil, que está compuesta por tres subunidades: α (96 kDa), β (40 kDa) y γ (23 kDa), que es un citocromo *b*. Esta enzima es muy específica para la reducción de seleniato a selenito (K_m = 16 μM), y no reduce nitrato, nitrito, clorato ni sulfato. En *Sulfospirillum barnessi*, sin embargo, la enzima se encuentra en la membrana, reduce el seleniato a selenio elemental y, además, puede reducir nitrato, tiosulfato y fumarato. La reducción hasta Se^0 representa un mecanismo de destoxificación, ya que este compuesto, al contrario que seleniato y selenito, es un sólido poco reactivo.

Además el selenio inorgánico puede ser metilado por diversos hongos y levaduras (*Scopulariopsis brevicaulis, Penicillium* sp.) a dimetilseleniuro [$(CH_3)_2Se$] o a dimetildi-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

seleniuro [$(CH_3)_2Se_2$], que es volátil y mucho menos tóxico, por lo que representa otro mecanismo de destoxificación de suelos y sedimentos aeróbicos. En condiciones anóxicas, el dimetilseleniuro se obtiene a partir de compuestos orgánicos de selenio. En estos procesos, la metilcobalamina y la S-adenosilmetionina son los donadores de grupos metilo. En condiciones anaeróbicas, diversos metanógenos y bacterias reductoras de sulfato pueden llevar a cabo el proceso contrario, liberando seleniuro, junto con CH_4 y CO_2. Por otra parte, algunas bacterias del suelo, de los géneros *Pseudomonas, Xanthomonas* y *Corynebacterium*, utilizan los metilseleniuros como única fuente de carbono.

6.3. Lluvia ácida

Como se ha visto en las secciones anteriores, durante el metabolismo microbiano se producen emisiones a la atmósfera de dióxido de azufre (SO_2), de ácido sulfhídrico (H_2S) y de dimetilsulfuro (DMS, $CH_3S\ CH_3$) (Fig. 6.52).

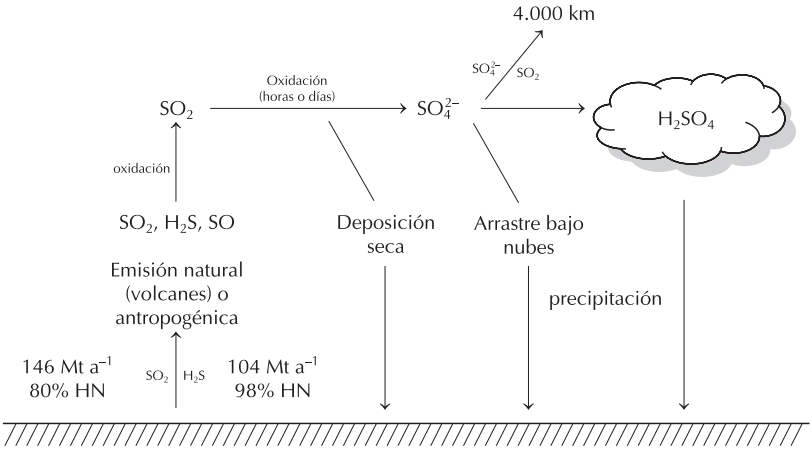


Figura 6.52. Dinámica de los compuestos azufrados en la atmósfera. HN (hemisferio norte); Mt (10^6 toneladas); SO (sulfuros orgánicos).

Las erupciones de volcanes y las emisiones de las fuentes hidrotermales, también contribuyen al aumento de la concentración de compuestos de azufre en la atmósfera (se calcula que la emisión anual de azufre es de ~20×10^{12} g). En este punto hay que hacer notar que ~80% de estas emisiones naturales se producen en el hemisferio norte, donde es más abundante la superficie de tierra firme y el número de zonas con actividad volcánica también es mayor. Las condiciones oxidantes de la atmósfera y la radiación solar provocan que, en pocas horas, el azufre esté mayoritariamente como SO_2. Éste, a su vez, se va oxidando lentamente hasta trióxido de azufre, SO_3, que reacciona con las gotas de agua de las nubes dando lugar al correspondiente ácido sulfúrico (Fig. 6.52):

$$2\ SO_2\ (g) + O_2\ (g) + 2\ H_2O\ (l) \longrightarrow 2\ H_2SO_4$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la reacción de oxidación del SO_2 por el O_2 participan diversas especies radicales, especialmente el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y puede llevarse a cabo por diferentes vías, denominadas oxidación homogénea (sin diferenciación de fases) y oxidación heterogénea (con unos reactantes en fase acuosa y otros en fase gaseosa). Parte del H_2SO_4 se neutraliza en la atmósfera mediante las partículas de amoniaco y carbonato cálcico.

Los óxidos de nitrógeno producidos durante la desnitrificación (óxido nitroso, N_2O, y óxido nítrico, NO) también se emiten a la atmósfera, donde terminan siendo oxidados hasta dióxido de nitrógeno, NO_2. Por otro lado, el componente mayoritario de la atmósfera es el N_2, gas muy inerte, pero que por acción de la energía eléctrica (de los rayos) puede reaccionar con el O_2 atmosférico produciendo diversas especies oxidadas que, finalmente, dan lugar a la formación de más NO_2. Al igual que ocurre con el SO_2, el dióxido de nitrógeno termina convirtiéndose en ácido nítrico cuando entra en contacto con las gotas de agua de las nubes.

El CO_2 es, después del N_2 y del O_2, el compuesto más abundante en la atmósfera, y como en el caso de SO_2 y NO_2, también reacciona con el agua atmosférica, estableciéndose un equilibrio entre la forma gaseosa y la hidratada (H_2CO_3, ácido carbónico).

$$CO_2\,(g) \longleftrightarrow CO_2\,(ac) + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3$$

La presencia natural de este ácido es lo que provoca que el agua de lluvia tenga un pH inferior a 7 (generalmente alrededor de 5,6). La contribución a este pH de los ácidos sulfúrico y nítrico, producidos de forma natural en la atmósfera, sólo se aprecia localmente sobre los ecosistemas en los que se lleva a cabo un metabolismo muy activo del azufre o del nitrógeno, pero globalmente su importancia es mínima.

El fenómeno contemporáneo conocido como "lluvia ácida", está provocado por el aumento en la atmósfera de especies oxidadas de azufre y de nitrógeno, debido a efectos antropogénicos. Como resultado de las altas concentraciones de estos óxidos generadores de ácidos, en algunas zonas industriales o urbanas muy contaminadas, e incluso en regiones alejadas de ellas, el pH del agua de lluvia puede alcanzar valores de hasta 4 ó 3, y en algunos lugares en que la niebla es ácida, se han llegado a medir valores de pH de 2,3 (del mismo orden que los que presentan el vinagre y el zumo de limón). Este aumento de la acidez se debe principalmente a las emisiones de SO_2, provocadas en la combustión de carbón y petróleo (y sus derivados), que contienen entre el 1 y el 3% de azufre. En presencia de oxígeno y a las altas temperaturas a que tienen lugar los procesos de combustión, el dióxido de azufre se forma fácilmente:

$$S + O_2 \longrightarrow SO_2$$

Otra fuente antropogénica de SO_2 la constituye el proceso de obtención de óxidos metálicos a partir de los correspondientes sulfuros minerales (tostación), como paso previo a la obtención del metal. Así, por ejemplo, a partir de la calcocita (Cu_2S):

$$Cu_2S + 2\,O_2 \longrightarrow 2\,CuO + SO_2$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La emisión antropogénica de óxidos de nitrógeno se produce fundamentalmente por los gases de escape de los automóviles y, aunque la introducción de catalizadores ha disminuido el porcentaje de emisión, el continuo aumento del parque automovilístico y del transporte de mercancías por carretera, hace que el volumen total de gases nitrogenados no descienda apreciablemente.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los países más industrializados se encuentran en el hemisferio norte, y que estas emisiones nocivas van ligadas a la industrialización y a las zonas urbanas que están relacionadas con ella, se ha calculado que ~98% del SO_2 de origen antropogénico se produce en dicho hemisferio, por lo que es aquí donde los problemas inherentes a la lluvia ácida son más acuciantes.

Los principales efectos de la lluvia ácida se pueden observar sobre edificios y monumentos, especialmente los construidos con calizas y mármol ($CaCO_3$), que se deterioran rápidamente:

$$2\ CaCO_3 + H_2SO_4 + 2\ HNO_3 \longrightarrow CaSO_4 + Ca(NO_3)_2 + 2\ CO_2 + 2\ H_2O$$

También los ecosistemas se pueden ver afectados dramáticamente por la lluvia ácida, especialmente los acuáticos. Precisamente, el estudio de la disminución de la fauna de los lagos y ríos de Suecia y Noruega, entre los años 1960 y 1970, fue el que dio la alarma sobre la importancia y la gravedad de este tipo de contaminación. De hecho, en algunos de estos ríos y lagos se ha producido la desaparición de peces y otros organismos sensibles a los cambios de pH. Por debajo de pH 5,5, hay muchas especies de peces y anfibios que no pueden desarrollarse, y a ese pH son muy pocos los crustáceos y moluscos que pueden vivir. El efecto es especialmente grave en los lagos situados en terrenos graníticos, como los de la península escandinava, que están débilmente tamponados y se ven muy afectados por la persistencia de la lluvia ácida.

La eficacia de los suelos como filtro químico de los compuestos ácidos depende de su composición y de la velocidad de la deposición ácida. A mayor proporción de carbonatos de calcio y magnesio en las rocas, mayor es su efecto neutralizador. Los suelos graníticos (rocas ácidas) son los que tienen una menor capacidad tampón, mientras que las zonas donde abundan las rocas calizas (básicas) se ven menos afectadas por la lluvia ácida. Si hay $CaCO_3$ en el suelo, su pH se mantiene cercano a 8, y la presencia de ácido se neutraliza mediante la disolución del carbonato, que libera CO_2. Si la lluvia ácida persiste y la cal desaparece el pH disminuye hasta 5,5, a medida que el ácido sustituye los cationes básicos del suelo (Ca^{2+}, Mg^{2+} y K^+). Cuando todos éstos se han sustituido, el pH baja hasta 4, lo que provoca la disolución del $Al(OH)_3$, que es transportado por las aguas de los ríos hasta los lagos y causa el envenenamiento de los peces.

Los ecosistemas terrestres también se ven afectados, aunque la relación causa-efecto no está tan clara en algunas ocasiones. Las plantas y microorganismos del suelo se ven afectados por la lluvia ácida, porque disminuye la cantidad disponible de elementos esenciales como son calcio, magnesio y potasio. Además, el aluminio y diversos metales pesados puestos en circulación son muy dañinos para las plantas. Además, la deposición ácida sobre las hojas de las plantas puede disolver la protección de cera que las recubre y las protege del ataque de hongos y bacterias. Diversas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

zonas forestales de Europa central y del norte de América se encuentran muy afectadas por los efectos de la lluvia ácida.

Hay que tener en cuenta que el efecto de la lluvia ácida no tiene lugar sólo sobre el espacio que rodea a la fuente emisora, ya que estos contaminantes gaseosos, con vidas medias de permanencia en la atmósfera de dos a seis días, pueden ser dispersados por el viento hasta distancias de cientos de kilómetros (incluso, se han medido efectos a distancias de ~4.000 km), sobre todo cuando son emitidos a la atmósfera desde chimeneas muy altas. Con el empleo de estas chimeneas se disminuyen los efectos nocivos en las zonas cercanas, pero se aumenta el radio del territorio que se ve afectado. Así, gran parte de la lluvia ácida que cae sobre Escandinavia tiene su origen en las zonas industrializadas de Inglaterra y del valle del Rhur en Alemania.

La deposición ácida debida al H_2SO_4 y al HNO_3 atmosféricos, no sólo tiene lugar asociada con la lluvia o la nieve (conocida como "deposición húmeda"), ya que estos ácidos también pueden absorberse sobre superficies húmedas, como la vegetación, edificios mojados, suelos, etc. ("deposición seca").

Los sistemas para eliminar las emisiones de SO_2 y óxidos de nitrógeno suelen resultar caros y presentan algunos problemas operacionales. Entre las soluciones adoptadas, se encuentran las de eliminar el azufre del petróleo, o emplear carbones con bajo contenido en azufre. También se está fomentando el empleo de fuentes de energía alternativas, como la solar o la eólica.

6.4. Dinámica de la capa de ozono atmosférica

El análisis de la radiación electromagnética procedente del Sol muestra que la cantidad de radiación ultravioleta (UV), de alta energía, que llega a las capas superiores de la atmósfera es mucho mayor que la que alcanza la superficie de la Tierra. Esto es debido a que en la estratosfera (capa de la atmósfera que se extiende entre los 20 y los 50 km) existe suficiente cantidad de ozono (O_3), que absorbe las radiaciones UV en el intervalo de longitudes de onda entre 200 y 300 nm, y que sirve como filtro de las mismas. Debido a este hecho, dicha zona se conoce como "capa de ozono" y es, en gran parte, la responsable de que la vida sobre la Tierra se desarrolle tal como la conocemos. La razón es que los fotones correspondientes a la radiación UV de 200-320 nm son lo suficientemente energéticos como para hacer posibles muchas reacciones fotoquímicas, letales para los organismos vivos. Como ejemplo, la gran mayoría de los cánceres de piel están asociados a la exposición excesiva a las radiaciones UV que logran atravesar la capa de ozono. Además de la función de protección frente a los efectos nocivos de la radiación UV, las reacciones fotoquímicas, exergónicas, que tienen lugar en la capa de ozono proporcionan la fuente de calor que origina la estratificación térmica de la atmósfera, en una zona tranquila, la estratosfera, y otra turbulenta, la troposfera.

La formación de la capa de ozono está ligada al aumento de la concentración de O_2 en la atmósfera terrestre, provocada por la aparición de organismos con una fotosíntesis oxigénica. En las capas altas de la atmósfera, se produce la fotólisis del

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

O_2, al absorber las radiaciones UV de longitud de onda inferior a 242 nm, formándose O atómico, que es muy reactivo y puede reaccionar con otra molécula de O_2 para formar O_3:

$$O_2 + h\nu\ (< 240\ \text{nm}) \longrightarrow 2\ O$$

$$O + O_2 + M \longrightarrow O_3 + M^*$$

donde M es una especie molecular que participa en la reacción absorbiendo parte de la energía generada, y sin cuya presencia el O_3 formado se destruiría a la misma velocidad que se forma.

El ozono está continuamente formándose y destruyéndose en la estratosfera, ya que él también absorbe radiación UV y puede reaccionar con el oxígeno atómico:

$$O_3 + h\nu\ (< 320\ \text{nm}) \longrightarrow O + O_2$$

$$O + O_3 \longrightarrow 2\ O_2$$

La concentración de O_3 depende de las velocidades relativas de las reacciones de formación y destrucción, permaneciendo en un estado estacionario cuando se igualen dichas velocidades. Debido a que la energía libre de la molécula de O_3 es más alta que la del O_2, la concentración de ozono en el equilibrio es muy baja. No obstante, la concentración de O_3 en el estado estacionario puede ser mayor, ya que hay una contribución de energía externa (fotones), que mantiene el sistema fuera del equilibrio. Además, la concentración de ozono está sujeta a grandes variaciones, ya que la radiación solar varía a lo largo del día y con la estación del año. La altitud también influye en la cantidad y calidad de la radiación que puede ser absorbida y, por tanto, también influye en la concentración de ozono. Se ha calculado que la máxima concentración de O_3 tiene lugar a ~30 km de altitud (8 ppm). A altitudes superiores, aumenta su velocidad de fotólisis, mientras que por debajo, se forma menos O_3 porque también hay menos O atómico disponible.

Como unidad de medida del nivel de ozono, se suelen emplear las DU (unidades Dobson). 100 DU de ozono equivalen a la cantidad del gas, medidas en condiciones de presión y temperaturas normales, necesaria para formar una capa de 1 mm de espesor. En los trópicos los niveles de ozono se mantienen entre 250 y 300 DU a lo largo del año, mientras que en las regiones templadas las oscilaciones estacionales suelen ser mayores, entre 475 DU y menos de 300 DU. En la Antártida, en primavera, durante la formación del "agujero de ozono" se han llegado a medir valores tan bajos como de ~100 DU. Hay que aclarar que el término "agujero" es inadecuado, ya que lo que realmente se produce es un adelgazamiento de la capa de ozono, sin que nunca llegue a faltar éste por completo.

En la estratosfera, además de las especies de oxígeno, existen otras muchas moléculas gaseosas, algunas de las cuales alteran de una forma apreciable la concentración de O_3, ya que actúan como catalizadores de diversas reacciones que consumen ozono. De estas moléculas, de origen natural y antropogénico, las que ejercen un efecto más importante son los radicales hidroxilo, los átomos de cloro y bromo y el óxido nítrico.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los radicales hidroxilo ($HO^{\bullet}$) actúan en las capas más bajas de la estratosfera y son los responsables de la desaparición del 50% del O_3 de estas regiones. Se forman en la troposfera por reacción entre el agua, o el metano, y átomos de O excitados, procedentes de la fotólisis del propio ozono. Los radicales hidroxilo reaccionan con el ozono formando agua:

$$H_2O + O^* \longrightarrow 2\ HO^{\bullet}$$

$$2\ HO^{\bullet} + O_3 \longrightarrow H_2O + 2\ O_2$$

Aunque en la atmósfera se encuentran de forma natural agua y metano, el aumento de las concentraciones de este último por efectos antropogénicos puede acelerar la eliminación del ozono.

La mayoría de compuestos naturales de cloro y bromo son destruidos antes de que puedan alcanzar la estratosfera, fundamentalmente por acción de los radicales hidroxilo. Sólo el cloruro y el bromuro de metilo logran alcanzar la capa de ozono y catalizan su destrucción. Sin embargo, la contribución de estas especies no es importante y más si se compara con el efecto que producen otros compuestos de cloro de origen antropogénico, denominados genéricamente CFC, clorofluorcarbonos. Estos compuestos contienen un átomo de carbono sustituido por cuatro átomos de halógenos (F, Cl o Br) y se han empleado como refrigerantes, propelentes para aerosoles, en espumas plásticas y como disolventes. Los derivados con Br, denominados también CBC y halones, se han empleado en la extinción de incendios en espacios cerrados. Además, estos compuestos no son tóxicos ni inflamables y son muy inertes en la troposfera, incluso frente a la acción de los radicales hidroxilo. Sólo cuando estas moléculas alcanzan la estratosfera se ven afectadas por las radiaciones UV, que originan la ruptura de enlaces Cl–C o Br–C:

$$Cl_3CF\ (\text{o}\ Cl_2CF_2) + h\nu \longrightarrow Cl + Cl_2CF\ (\text{o}\ ClCF_2)$$

Los átomos de Cl y Br que se forman reaccionan con O_3 y con O en una serie de reacciones en las que, finalmente, se regenera el halógeno:

$$Cl + O_3 \longrightarrow ClO + O_2$$

$$ClO + O \longrightarrow Cl + O_2$$

Además de éstas, se han descrito otras reacciones que también contribuyen a la destrucción de ozono, como, por ejemplo:

$$ClO + BrO \longrightarrow Cl + Br + O_2$$

Se ha estimado que ~20% de las pérdidas de ozono sobre la Antártida se deben al efecto producido por los átomos de Cl y Br.

La firma del Protocolo de Montreal, y sus posteriores revisiones, han tenido como efecto la prohibición total de la utilización de estos compuestos, y su eliminación, a partir de 1996 en los países industrializados y de 2010 para los países en vías de desarrollo. Algunos de sus sustitutos, como los HCFC (hidroclorofluorcarbonos) y los HFC (hidrofluorcarbonos), son mucho menos nocivos para la capa de ozono, pero,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

por contra, son potentes gases invernaderos, y su contribución al calentamiento global por molécula, es mucho mayor que la del CO_2.

La mayoría de óxidos de nitrógeno producidos de forma natural (desnitrificación, tormentas) o en procesos de combustión (automóviles, fábricas) no alcanza la estratosfera, ya que son transformados en HNO_3 y devueltos con la lluvia a la superficie terrestre. Sin embargo, el N_2O, que es menos reactivo, sí puede llegar a alcanzarla y, por encima de los 30 km, se fotoliza originando N_2 y átomos de O excitados, con los cuales puede volver a reaccionar una parte del N_2O para producir óxido nítrico:

$$N_2O + h\nu\,(UV) \longrightarrow N_2 + O^*$$

$$N_2O + O^* \longrightarrow 2\,NO$$

El NO puede actuar como catalizador de la destrucción del ozono, originando NO_2, que puede reaccionar con otras formas activas que consumen O_3, retirándolas del medio:

$$NO + O_3 \longrightarrow NO_2 + O_2$$

$$NO_2 + ClO \longrightarrow ClONO_2$$

$$NO_2 + HO^\bullet \longrightarrow HNO_3$$

La formación de nubes estratosféricas polares (PSC), originadas a 193 K, por condensación de partículas de ácido nítrico hidratado ($HNO_3 \times H_2O$), y a 187 K, por condensación de partículas de hielo, también se ha implicado en la destrucción del O_3 y en la formación del agujero de ozono sobre la Antártida. La presencia de estas nubes facilita una serie de reacciones que serían muy lentas en fase gaseosa, y que dan lugar a la acumulación de Cl_2 y HOCl durante el invierno polar. Con la llegada de la primavera, se renueva el aire y la radiación solar UV origina una elevada concentración de $Cl^\bullet$ y $HO^\bullet$, que reaccionan con el O_3:

$$Cl_2 + h\nu \longrightarrow 2\,Cl^\bullet$$

$$HOCl + h\nu \longrightarrow HO^\bullet + Cl^\bullet$$

La cantidad de Cl_2 y HOCl originado no sólo depende de la cantidad de cloro en la estratosfera, sino que también aumenta con el número de partículas disponibles en las PSC para producir las reacciones en la superficie del hielo. Así, por ejemplo, la erupción del volcán Pinatubo (1991) provocó la emisión de SO_2 en grandes cantidades, lo que originó la formación de un aerosol de sulfato que incremento la superficie de reacción y, como consecuencia, se produjo una reducción un 20% mayor de lo normal en la capa de ozono en la primavera siguiente. El efecto, aunque en menor cuantía, afectó al agujero de ozono antártico durante los dos años siguientes.

6.5. Biominería

El conocimiento de los ciclos biogeoquímicos de elementos como el azufre, el hierro y diversos metales, ha llevado a emplear diversos microorganismos en la recuperación

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de metales de menas de minerales pobres, o de baja ley. La recuperación de metales mediante el empleo de microorganismos se denomina minería microbiana, biominería o biohidrometalurgia.

Las menas con bajo contenido metálico no son adecuadas para su extracción directa por los métodos físicos y químicos tradicionales, por lo que, ante la escasez de algunos de ellos, se han buscado métodos alternativos. En el caso de menas sulfurosas, o que contengan sulfuros, se puede llevar a cabo la extracción del metal, de forma económicamente rentable, mediante el empleo de bacterias oxidadoras del azufre. Son múltiples los trabajos de este tipo que se han publicado, generalmente, con *Thiobacillus ferrooxidans*, que oxida minerales sulfurados y libera los metales presentes: cobre, oro, plata, uranio, radio, etc. El proceso de liberación de los metales se conoce como biolixiviación o lixiviado microbiano. En la actualidad, estos procesos se emplean a escala comercial para la recuperación de cobre, oro y uranio a partir de menas de baja calidad, especialmente en el caso del primero, ya que un 25% del cobre que se obtiene en el mundo es mediante el procedimiento de lixiviado. A nivel de laboratorio, también ha sido posible la recuperación de diversos metales y no metales, como níquel, cinc, cobalto, estaño, cadmio, molibdeno, plomo, antimonio, arsénico y selenio a partir de menas sulfurosas de baja calidad.

T. ferrooxidans es una bacteria Gram negativa quimiolitotrofa obligada, que oxida hierro ferroso y azufre, los cuales le sirven como fuente de energía para su crecimiento, y que vive en aerobiosis en medios con un pH entre 2 y 3,5. Los detalles de estos procesos de oxidación se describen, respectivamente, en las secciones 6.2.3 y 6.2.2 de este capítulo. *T. ferrooxidans* puede llevar a cabo el proceso de lixiviado de forma directa, oxidando el sulfuro metálico hasta sulfato, que suele ser soluble:

$$MS + 2\ O_2 \text{ — (}\textit{T. ferrooxidans}\text{)} \longrightarrow MSO_4$$

La lixiviación también puede hacerse de una forma indirecta: la bacteria oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+}, y el $Fe_2(SO_4)_3$ que se forma es un oxidante fuerte, capaz de disolver químicamente una amplia variedad de sulfuros metálicos:

$$2\ FeS_2 + 7\ O_2 + 2\ H_2O \text{ — (}\textit{T. ferrooxidans}\text{)} \longrightarrow 2\ FeSO_4 + 2\ H_2SO_4$$

$$2\ FeSO_4 + \tfrac{1}{2}\ O_2 + H_2SO_4 \text{ — (}\textit{T. ferrooxidans}\text{)} \longrightarrow Fe_2(SO_4)_3 + H_2O$$

$$Fe_2(SO_4)_3 + MS \text{ — (espontánea)} \longrightarrow MSO_4 + 2\ FeSO_4$$

Al igual que ocurre con el mismo ion sulfuro, la mayoría de los sulfuros metálicos pueden oxidarse espontáneamente en contacto con el oxígeno atmosférico, pero es un proceso muy lento. El papel de *T. ferrooxidans* consiste, fundamentalmente, en catalizar este proceso, que depende de distintos factores, como la naturaleza del mineral, su grado de fragmentación, la aireación, disponibilidad de otros nutrientes (amonio, fosfato, sulfato y magnesio, fundamentalmente), etc. Las menas de sulfuros de hierro y cobre (FeS, pirrotita; FeS_2, pirita; CuS, covelita; Cu_2S, calcocita; $CuFeS_2$, calcopirita), por ejemplo, son lixiviadas con mucha más facilidad que las de plomo o molibdeno. Así, en presencia de covelita, el porcentaje de Cu liberado aumenta exponencialmente con el número de tiobacilos presentes.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Para acelerar el proceso de lixiviado es conveniente fragmentar el mineral, para hacer que la superficie de contacto con la bacteria sea la mayor posible. Por quimiotaxis, la bacteria se dirige a las zonas del mineral con mayor concentración de sulfuro y, cuando está en contacto con él, *T. ferrooxidans* sintetiza un mucopolisacárido para favorecer su interacción con el mineral y facilitar la oxidación del azufre. Por técnicas de microscopía óptica se ha podido observar que la bacteria perfora la superficie de los cristales, con una profundidad que depende del mineral y varía de acuerdo con su composición química.

Una vez fragmentado el mineral y amontonado sobre una superficie impermeable al agua, se bombea hacia la parte superior de la pila una solución diluida de H_2SO_4, para mantener el pH ~2, y el agua, al filtrarse a través de la mena, arrastra los sulfatos metálicos formados por la acción bacteriana (Fig. 6.53). Este líquido de lixiviado se recoge en la base de la pila y se transporta a un tanque donde se recupera el metal, generalmente por reacción con hierro metálico (procedente, en muchos casos, de chatarra de hierro):

$$MSO_4 + Fe^0 \longrightarrow M^0 + FeSO_4$$

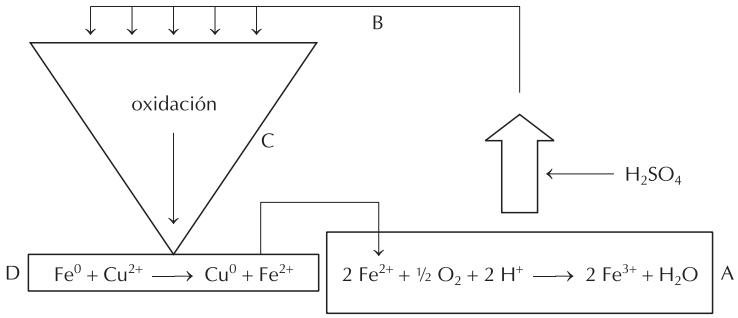


Figura 6.53. Pila de lixiviación para obtención de cobre metálico (Cu^0) a partir de mineral de cobre de baja calidad (CuS). El Fe^{2+} se oxida en un tanque que contiene *T. ferrooxidans* (A) y el efluente acidificado se bombea y esparce (B) sobre el CuS (C), recuperándose cobre metálico al final del proceso (D).

Las reacciones que tienen lugar en el dispositivo de oxidación del mineral de cobre de baja calidad son bacterianas (1, 2) o químicas (2, 3):

1) $Cu_2S + ½\ O_2 + 2\ H^+ \longrightarrow CuS + Cu^{2+} + H_2O$

2) $CuS + 2\ O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + SO_4^{2-}$

3) $CuS + 8\ Fe^{3+} + 4\ H_2O \longrightarrow Cu^{2+} + 8\ Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 8\ H^+$

Cuando las condiciones geológicas son apropiadas, los microorganismos pueden llevar a cabo el proceso de lixiviación *in situ*, sin extracción mecánica en las rocas que contienen el metal. Esto ocurre cuando, por ejemplo, el mineral es suficientemente poroso y se encuentra sobre un lecho rocoso impermeable.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La luz, fundamentalmente a causa de las radiaciones de longitud de onda cortas, puede actuar de forma negativa sobre el proceso de lixiviado, ya que inhibe el desarrollo de algunas especies de *Thiobacillus*. No obstante, las partículas de hierro férrico en suspensión proporcionan una cierta protección frente a este efecto no deseado.

El aumento de la temperatura de algunos depósitos minerales, que se produce en el propio proceso de lixiviación microbiana, puede llegar a constituir un grave problema para la supervivencia de *T. ferrooxidans*, que es una bacteria mesófila (temperatura óptima entre 20 y 30 °C). En estos casos, se emplean especies termófilas de *Thiobacillus*, o de otra bacteria oxidadora de azufre, *Leptospirillum ferrooxidans*, que predomina en ambientes más ácidos (pH 1-2), y que pueden vivir a temperaturas de hasta 50 °C. Para temperaturas superiores, se utilizan otros organismos termófilos oxidadores de azufre, como *Sulfolobus*, una arqueobacteria acidófila y termófila, que oxida hierro ferroso y azufre de una manera muy parecida a *Thiobacillus*, pero a temperaturas más elevadas (60-80 °C). Esta bacteria se ha empleado, por ejemplo, en el biolixiviado de la molibdenita (MoS_2).

Aunque la aireación es deseable, en la mayoría de los casos no llega a ser limitante. De hecho, dado que las pilas de lixiviado son muy grandes, es difícil que penetre el aire, por lo que normalmente el interior de la pila es anóxico. Para los procesos de oxidación, sin embargo, lo que limita es la cantidad de Fe^{3+} disponible para que pueda ser usado por *T. ferrooxidans* como aceptor de electrones, en ausencia de oxígeno. Estas condiciones se consiguen añadiendo grandes cantidades de hierro oxidado procedente de la chatarra.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de utilizar una bacteria u otra para los procesos de biolixiviación, es la toxicidad del metal liberado sobre el propio microorganismo. Así, por ejemplo, *Sulfolobus* es menos sensible al molibdeno que *Thiobacillus*, por lo que tendrá menos problemas para llevar a cabo el proceso.

Entre los procesos de biolixiviación mejor conocidos se encuentra la utilización de *T. ferrooxidans* para obtener cobre. En este proceso, se produce tanto la oxidación directa del Cu_2S (calcocita) como la oxidación indirecta por los iones Fe^{3+}.

La oxidación directa del Cu_2S, se produce sin la oxidación del azufre, sólo se oxida el Cu^+ a Cu^{2+}, reacción que puede ser utilizada por la bacteria como fuente de energía:

$$2\ Cu_2S\ (\text{calcocita}) + O_2 + 4\ H^+ \longrightarrow 2\ CuS\ (\text{covelita}) + 2\ Cu^{2+} + 2\ H_2O$$

Parte del sulfuro de la covelita puede oxidarse a sulfato con el oxígeno atmosférico, de forma espontánea, o por la acción de las bacterias:

$$CuS + 2\ O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + SO_4^{2-}$$

El Fe^{3+}, generado por *T. ferrooxidans* a partir del FeS, que suele estar presente en las minas de cobre, provoca también la oxidación química de la covelita:

$$CuS + 8\ Fe^{3+} + 4\ H_2O \longrightarrow Cu^{2+} + 8\ Fe^{2+} + SO_4^{2-} + 8\ H^+$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El cobre metálico, que precipita, se obtiene a partir del Cu^{2+}en solución por reducción con hierro metálico, en forma de limaduras. Esta reacción se da de forma espontánea, sin la participación de bacterias:

$$Cu^{2+} + Fe^{0} \longrightarrow Cu^{0} + Fe^{2+}$$

Finalmente, en un estanque de oxidación, *T. ferrooxidans* regenera el Fe^{3+} a partir del Fe^{2+} que se forma en el proceso. Si es necesario, el estanque se acidifica para mantener el pH óptimo para la proliferación bacteriana y conservar el Fe^{3+}:

$$4\ Fe^{2+} + O_2 + 4\ H^{+} \longrightarrow 4\ Fe^{3+} + 2\ H_2O$$

El líquido que se obtiene en el estanque de oxidación, rico en Fe^{3+}, se bombea de nuevo hasta la cabecera de la pila y se reinicia el proceso de lixiviado del cobre. Mediante este sistema se puede llegar a recuperar hasta el 70% del cobre contenido en las menas de baja calidad (en el laboratorio, la recuperación puede ser superior al 97%), con un coste que oscila entre el 30 y el 50% del coste de la fundición directa. El mayor inconveniente del método de biolixiviación es que es más lento.

La biolixiviación también se ha empleado con buenos resultados en el caso de algunas menas pobres de oro (con una recuperación de oro entre el 75 y el 90%). En el caso de las menas de oro, la biolixiviación resuelve además algunos problemas que se presentan en los procesos químicos. Usualmente, el oro se recupera por lixiviación del metal con NaCN, pero en muchas menas pobres el oro se encuentra acompañado por sulfuros, lo que provoca que el tratamiento con cianuro no sea eficaz y se precise eliminar previamente dichos sulfuros, lo que encarece la extracción. Mediante el proceso catalizado por *T. ferrooxidans* y otros microorganismos relacionados, el oro se puede obtener libre de sulfuros. También es frecuente que, junto con el oro, en el mineral se encuentren elementos como el arsénico. Mediante la biolixiviación se libera el oro atrapado en estos minerales:

$$2\ FeAsS\ [Au] + 7\ O_2 + 2\ H_2O + H_2SO_4 \longrightarrow Fe_2(SO_4)_3 + 2\ H_3AsO_4 + [Au]$$

El oro así obtenido puede tratarse ya por los métodos tradicionales, formando complejos con cianuro. La biolixiviación del oro se suele hacer a menor escala que la del cobre mediante el uso de biorreactores en donde se introducen, además del mineral que contiene el oro, diversos microorganismos oxidadores de hierro y azufre, como *T. ferrooxidans, T. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. En algunos casos, además de estos organismos o en su lugar, se emplea la arqueobacteria termófila *Sulfolobus*, para disminuir los efectos negativos del aumento de la temperatura en los reactores. El arseniato que se produce en la reacción precipita con el hierro y el exceso de cianuro se oxida por las bacterias a CO_2 y urea en fases posteriores del proceso. Debido a su rentabilidad, en la actualidad existen varias plantas de biolixiviado de oro en diferentes países, como Ghana, Australia y Estados Unidos, y está sustituyendo a los costosos procedimientos tradicionales, que además, son contaminantes, debido a los vertidos de aguas con cianuro.

Otro metal cuya eficacia en los procesos de biolixiviado también se ha probado, es el uranio. Por razones obvias, la recuperación del uranio de menas pobres o de residuos nucleares es un proceso interesante desde los puntos de vista

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

energético, económico y ambiental. En las menas pobres, el uranio se encuentra como UO_2 (con U^{4+}), que es insoluble, pero la oxidación indirecta, con Fe^{3+} producido a partir de pirita (FeS) por *T. ferrooxidans*, da lugar al correspondiente sulfato de uranilo (con U^{6+}), que es soluble y del que ya puede recuperarse el uranio sin problemas:

$$UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 \longrightarrow UO_2SO_4 + 2\ FeSO_4$$

El Fe^{2+} se reoxida por la acción de la bacteria, con lo que de nuevo hay Fe^{3+} para oxidar más UO_2. *T. ferrooxidans* también puede catalizar la oxidación directa de U^{4+} a U^{6+}, empleando O_2 como aceptor terminal de electrones, pero por los datos existentes, la oxidación indirecta es cuantitativamente más importante en la biolixiviación de uranio. Este proceso es adecuado, sobre todo, en menas de óxido de uranio que contienen pirita, mientras que las que son ricas en carbonatos o carecen de minerales de hierro, son menos adecuadas.

Un problema relacionado con los procesos de biolixiviación de minerales de azufre es el drenaje ácido de las minas, que se produce de forma natural por la acción de las bacterias oxidadoras de azufre sobre los depósitos de mineral desechado, cuando éstos contienen pirita. Este es el caso de muchas minas de carbón, algunas de ellas abandonadas. La acción de *T. ferrooxidans*, por ejemplo, sobre el FeS_2 cuando éste se encuentra en contacto con el O_2 atmosférico, y las reacciones espontáneas que le siguen, terminan produciendo cantidades considerables de H_2SO_4 y de $Fe(OH)_3$ que son arrastrados por el agua de lluvia a los ríos cercanos o se filtran y terminan contaminando los acuíferos subterráneos. La reacción global de este proceso es:

$$4\ FeS_2 + 15\ O_2 + 14\ H_2O \longrightarrow 4\ Fe(OH)_3 + 8\ H_2SO_4$$

Por cada mol de pirita que se oxida se produce un mol de hidróxido férrico, que forma un precipitado pardo (jarosita), y dos moles de ácido sulfúrico, que provocan que el pH del agua de las zonas cercanas a estas minas sea inferior a 3, creando un problema de contaminación local severo, con lixiviación del aluminio y de diferentes metales pesados que afectan a la flora y a la fauna del entorno. Como en el caso de la lluvia ácida, los efectos dependen fundamentalmente de la naturaleza y capacidad de tamponamiento de los suelos sobre los que se produce este drenaje ácido.

Este problema es difícil de evitar, ya que el recubrimiento eficaz del mineral abandonado, para evitar el contacto con el aire y con la lluvia, resulta complicado y muy costoso. Como solución alternativa, el incremento de la acidez se puede paliar, en parte al menos, con la adición periódica de cal a los cauces de agua cercanos a la mina.

Bibliografía

ANDREWS, S. C., ROBINSON, A. K. y RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. (2003). "Bacterial Iron Homeostasis". *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-237.

APARICIO TEJO, P. M. (ed.) (2002). *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Biología Molecular a la Agronomía*. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ATLAS, R. M., BARTHA R. (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología ambiental*. Addison Wesley, 4th ed.

BORREMANS, B., HOBMAN, J. L., PROVOOST, A., BROWN, N. L. y VAN DER LELIE, D. (2001). "Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34". *J. Bacteriol.* 183, 5651-5658.

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville. Maryland.

CÁNOVAS, D., CASES, I. y DE LORENZO, V. (2003). "Heavy Metal Tolerance and Metal Homeostasis in *Pseudomonas putida* as Revealed by Complete Genome Analysis". *Environ. Microbiol.* 5, 1-15.

CÁNOVAS, F. M. y FLORENCIO, F. J. (eds.) (2000). *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular*. Publicaciones e Intercambio de la Universidad de Málaga.

DALSGAARD, T., CANFIELD, D. E., PETERSEN, J., THANDRUP, B., ACUÑA-GONZÁLEZ, G. (2003). *Nature*, 422, 606-608.

EHRLICH, H. E. (1996). *Geomicrobiology*. 3ª ed., Marcel Dekker, Inc.

FRAUSTO DA SILVA, J. R. y WILLIAMS, R. J. P. (2001). *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of life*. 2ª ed. Oxford University Press. Oxford.

GUERRERO, M. G., VEGA, J. M., LOSADA, M. (1981). "The assimilatory nitrate reducing system and its regulation". *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 162-204.

HALL, J. L. (2002). "Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance". *J. Exp. Bot.* 53, 1-11.

HAN,S.-H., ZHUANG, Y.-H., LIU, J.-A. y GLINDEMANN, D. (2000), "Phosphorous Cycling through Phosphine in Paddy Fields". *Sci. Total Environ.* 258, 195-203.

HIPKIN C. R., SIMPSON, D. J., WAINWRIGHT, S. J., SALEM, M. A. (2004). "Nitrification in plants that also fix nitrogen". *Nature*, 430, 98-101.

HILLE, R. (2002). "Molybdoenzymes and Tungsten in Biology". *TIBS*, 27, 360-367.

KUYPERS, M. M. M., *et al.* (2003). *Nature*, 422, 608-611.

LEUSTEK, T., MARTIN, M. N., BICK, J.-A. y DAVIES, J. P. (2000). "Pathways and Regulation of Sulfur Metabolism Revealed Through Molecular and Genetic Studies". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 141-165.

LOVLEY, D. R. (ed.) (2000). *Environmental Microbe-Metal Interactions*. ASM Press.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Education Inc, 10ª ed. Madrid.

MENDEL, R. R. y HÄNSCH, R. (2002). "Molybdoenzymes and Molybdenum Cofactor in Plants". *J. Exp. Bot.* 53, 1689-1698.

MOAT, A. G., FOSTER, J. W., SPECTOR, M. P. (2002). *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, 4th ed.

MONZA, J., MÁRQUEZ, A. (2004). *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Ed. Almuzara.

MORENO-VIVIÁN, C., CABELLO, P., MARTÍNEZ-LUQUE, M., BLASCO, R., CASTILLO, F. (1999). "Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional dintinction among bacterial nitrate reductases". *J. Bacteriol.* 181, 6573-6584.

MUKHOPADHYAY, R., ROSEN, B. P., PHUNG, L. T. y SILVER, S. (2002). "Microbial Arsenic: from Geocycles to Genes and Enzymes". *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 311-325.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

MYERS, C. R. y MYERS, J. M. (2002). "MtrB is Required for Proper Incorporation of the Cytochromes OmcA and OmcB into the Outer Membrane of *Shewanella putrefaciens* MR-1". *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5585-5594.

NIES, D. H. (2003). "Efflux-Mediated Heavy Metal Resistance in Prokaryotes". *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313-339.

O'NEILL, P. (1985). *Environmental Chemistry*. Chapman & Hall. Londres.

RICHARDSON, D. J. (2000). "Bacterial Respiration: a Flexible Process for a Changing Environment". *Microbiology* 146, 551-571.

SCHINK, B., THIEMANN, V., LAUE, H., FRIEDRICH, M.VW (2002). "*Desulfotignum phosphitoxidans* sp.nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate". *Arch. Microbiol.* 177, 381-391.

SPIRO, T. G. y STIGLIANI, W. M. (2004). *Química Medioambiental*. 2ª ed. Pearson Educación. Madrid.

VRTIS, J. M., WHITE, A. K., METCALF, W. W. y VAN DER DONK, W. A. (2001). "Phosphite Dehydrogenase: An Unusual Phosphoryl Transfer Reaction". *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2672-2673.

VEGA, J. M., APARICIO, P. J., CASTILLO, F., MALDONADO, M. (1998). *Avances en el metrabolismo del nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular*. Publicaciones Universidad de Sevilla.

WHITE, D. (1997). *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, 2nd ed.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 7

BASES BIOQUÍMICAS DE LA ADAPTACIÓN BIOLÓGICA

Glosario
7.1. Introducción
7.2. Adaptación de las plantas al clima y al suelo
7.2.1. Adaptación al clima
Adaptación a la temperatura y la radiación solar
Adaptación a temperaturas extremas
7.2.2. Adaptación a la anaerobiosis
7.2.3. Adaptación a la humedad ambiental
7.2.4. Adaptación a la presencia de metales
7.2.5. Adaptación a la salinidad
7.3. Interacciones entre plantas y animales
7.3.1. Polinización
7.3.2. Toxinas defensivas de las plantas
7.3.3. Interacciones hormonales entre plantas y animales
7.3.4. Interacciones tróficas entre plantas y animales
7.4. Interacciones entre plantas
7.5. Interacciones entre plantas y patógenos
7.6. Interacciones entre microorganismos. Sintrofia y señalización intercelular
7.6.1. Sintrofia
Mecanismo bioquímico de la sintrofia
Sintrofia intracelular
La cadena alimenticia anaeróbica
7.6.2. Señalización intercelular en las bacterias
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Adaptación: Carácter que contiene idoneidad o aptitud.

Alcaloides: Compuestos orgánicos de origen natural, normalmente producidos por las plantas, que contienen nitrógeno básico, en general formando parte de un sistema heterocíclico.

Alelopatía: Influencia de una especie vegetal sobre otras mediante metabolitos secundarios.

Descenso crioscópico: Descenso del punto de congelación del agua causado por un soluto biocompatible.

Detección de quórum: Sistema de señalización intercelular mediante el que las bacterias detectan la densidad de la población.

Eón: Período de tiempo correspondiente a 10^9 años. Equivalente a gigaaño (Ga)

Esteroides: Compuestos que poseen el ciclo 1,2-ciclopentanoperihidrofenantreno (esteroles, ácidos biliares, hormonas sexuales y adrenocorticales, glicósidos cardíacos y sapogeninas).

Feromonas: Compuestos químicos de estructura variable que liberan al medio los organismos vivos y que influyen en el desarrollo o el metabolismo y el comportamiento.

Fitoalexinas: Compuestos químicos producidos por las plantas para la defensa contra los patógenos.

Glicósidos: Acetal mixto que resulta de sustituir el H hemiacetálico de una aldosa o cetosa cíclicas por un radical orgánico.

Haustorios: Invaginaciones de la membrana plasmática previas a un proceso de infección o parasitismo en plantas.

Isopreno: 2-metil-1,3-butadieno.

Ma: Megaaño (10^6 años).

Receptores serpentina: Proteínas de la membrana plasmática de los eucariotas que detectan señales internas (hormonas, neurotransmisores) o externas (feromonas, nutrientes, sabores, olores, fotones), que poseen una estructura molecular con 7 α-hélices transmembranales y que transmiten la señal a través de proteínas G.

Sintrofia: Interacción entre dos especies de microorganismos en la que un producto metabólico de una de ellas es utilizado como nutriente por la otra.

Sistema de dos componentes: Mecanismo de control de la expresión génica en bacterias, hongos y plantas en el que una proteína sensora de una señal se autofosforila en histidina y transfiere el grupo fosforilo a un resto de aspartato de un factor de transcripción que se une al DNA y modifica la expresión génica como respuesta a la señal.

Soluto biocompatible: Molécula producida por un ser vivo para adaptarse a situaciones extremas (temperatura, salinidad, etc.).

Terpenos: Compuestos derivados de la polimerización del isopreno. Según el número de unidades isoprénicas se denominan monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), triterpenos (6) y tetraterpenos (8).

Toxinas fotodinámicas: Toxinas de plantas que se activan en la luz.

Toxina HC: Toxina de hongos fitopatógenos que inhibe la histona desacetilasa de la planta huésped.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

7.1. Introducción

La ecología y la bioquímica son dos ciencias que difieren básicamente en su metodología, observante en un caso y experimental y de búsqueda de explicaciones moleculares en el otro. Sin embargo, recientemente, los científicos han procurado un acercamiento o solapamiento entre ambas disciplinas que ha cristalizado en avances considerables en el conocimiento de las bases moleculares de la adaptación biológica de los microorganismos, plantas y animales al medio físico y a sus cambios, así como de las interacciones entre los diferentes reinos biológicos. Este acercamiento ecológico-bioquímico está siendo muy pronunciado en los últimos tiempos, debido sobre todo a la secuenciación de genomas, y puede constituir una base considerable para el desarrollo de tecnologías correctoras de desequilibrios ambientales, como el abuso de los tratamientos químicos para mejorar el rendimiento de las cosechas, bien sea en el aporte de nutrientes o en la lucha contra plagas.

Como fruto de esta compenetración ha aparecido una rama de la bioquímica (o de la ecología, según se mire), denominada bioquímica ecológica (o ecología bioquímica), cuyos contenidos tienen que ver con la búsqueda de las bases moleculares de la adaptación al medio y de las estructuras de control que propician la captación de los cambios ambientales y que modifican la morfología, la fisiología y el metabolismo de los seres vivos para responder a dichos cambios. Como paradigma de las bases bioquímicas de la adaptación biológica se puede citar la aparición de rutas metabólicas de síntesis de metabolitos secundarios por parte de las plantas como mecanismo de defensa contra la predación por parte de los herbívoros, acompañada por la inducción por éstos de los correspondientes mecanismos de biotransformación de estos tóxicos vegetales. Esta coevolución es tan ajustada que a veces ambos contendientes utilizan diferentes versiones de la misma herramienta molecular, los citocromos P450 (véase Capítulo 17). En otras ocasiones, plantas y animales utilizan la misma ruta metabólica para la síntesis de metabolitos defensivos, como las toxinas cianogénicas linamarina y australina, que derivan de los aminoácidos valina e isoleucina.

La adaptación biológica se puede contemplar como un fenómeno dilatado en el tiempo, que afecta a la evolución de una especie y al propio fenómeno de la especiación, o desde un punto de vista individual, sobre todo en el caso de organismos de vida libre, que necesitan respuestas rápidas y eficaces ante un medio ambiente cuyas fluctuaciones comprometen la supervivencia en ausencia de estructuras amortiguadoras. Así, la respuesta de una bacteria ante la falta de glucosa se produce mediante el aumento de la concentración de AMP cíclico, que activa la expresión de genes responsables de la asimilación de fuentes de carbono alternativas. En los animales, la falta de glucosa también produce un aumento de AMP cíclico, pero en este caso a través de hormonas distribuidas por el torrente sanguíneo, que necesitan una maquinaria transductora compuesta por receptores de membrana y proteínas transmisoras de la señal que conducen a la síntesis de nueva glucosa por parte del hígado y el riñón y al ahorro de la glucosa disponible. En cualquier caso, la respuesta individual de una bacteria o de un animal ante una situación de falta de glucosa está basada en la evolución de mecanismos adaptativos desarrollados a lo largo de millones de años de evolución y que implican circuitos y redes génicas y proteínicas. Por otra parte,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

todos los reinos biológicos, y sobre todo los organismos fotosintéticos, presentan respuestas adaptativas a los cambios en la intensidad luminosa o en la calidad (frecuencia) de la radiación electromagnética.

Existen diferentes factores ambientales que producen diferentes respuestas bioquímicas por parte de los seres vivos y que conciernen básicamente al clima, al suelo, a los compuestos xenobióticos y a la presencia de otros organismos del mismo o diferente reino.

7.2. Adaptación de las plantas al clima y al suelo

La Teoría de la Selección Natural fue desarrollada al mismo tiempo por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace, a raíz de observaciones sobre plantas y animales realizadas en Sudamérica (viaje del HMS Beagle) y Malasia. El 1 de julio de 1858 se presentaron en la Sociedad Linneana de Londres sendos manuscritos sobre la Selección Natural, y muy pronto el propio Darwin publicaría "El Origen de las Especies". La teoría se afianzó a raíz del desarrollo de la genética a principios del siglo XX y ha alcanzado su clímax con el reciente desarrollo de la biología molecular, el neodarwinismo y la sociobiología.

Por su parte, la teoría de la radiación adaptativa da cuenta de la evolución de las especies, incluida la humana, sobre la base de cambios climático-edáficos más o menos catastróficos que han producido la desaparición de especies antiguas, mal adaptadas al cambio, y la aparición de especies nuevas con la morfología, fisiología y metabolismo adecuados para hacer frente al nuevo medio físico.

7.2.1. Adaptación al clima

El efecto del clima sobre la adaptación bioquímica se hace aparente si se consideran las diferencias metabólicas de la misma especie a diferentes latitudes.

Adaptación a la temperatura y la radiación solar

Como se ha visto en el capítulo 5, la fijación biológica del CO_2 constituye un mecanismo clave en la amortiguación de los desequilibrios que se pueden producir en el ciclo biogeoquímico del carbono como consecuencia de emanaciones de metano, fuegos masivos que afecten a la cubierta vegetal o de procesos industriales que usan combustibles fósiles.

El ciclo de Calvin es la ruta de fijación de CO_2 predominante en climas templados, pero su enzima clave, la ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) posee una actividad "parásita" en la que se despilfarra el 50% de la energía del compuesto aceptor de carbono, la ribulosa 1,4-bisfosfato. Este tipo de plantas que asimilan el CO_2 a través del 3-fosfoglicerato como primer compuesto carbonado estable se denomina C3.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La actividad oxigenasa aumenta con la temperatura, por lo que en climas cálidos se puede agravar la disipación de energía fotosintética disminuyendo el rendimiento del proceso de fijación del CO_2 en azúcares (Fig. 7.1). En estos climas proliferan otros tipos de plantas en las que el CO_2 se fija mediante otras rutas metabólicas en las que el primer compuesto carbonado estable posee 4 carbonos y se denominan plantas C4.

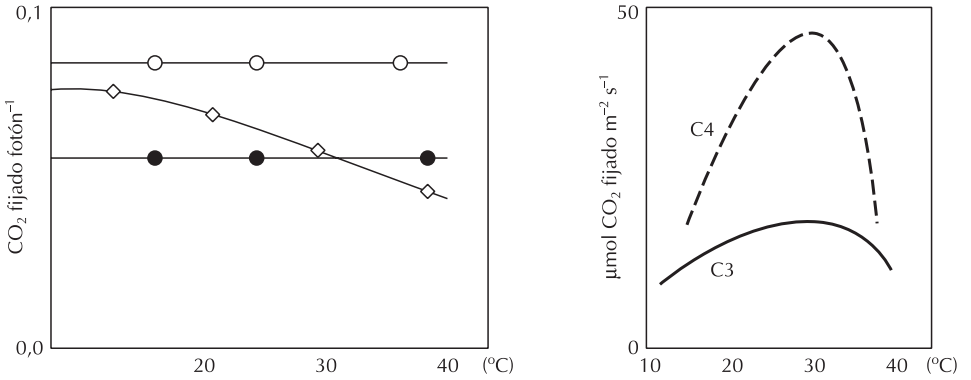


Figura 7.1. Efecto de la temperatura sobre la fijación de CO_2 por plantas C3 y C4. Izquierda, círculos blancos (C3, 1% O_2); rombos (C3, 21% O_2); círculos negros (C4, 21% O_2).

En la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), una gramínea tropical, se descubrió una ruta metabólica que evita la actividad oxigenasa de la Rubisco confinándola en un microambiente enriquecido en CO_2 y enrarecido en O_2: las células internas de la vaina de la hoja. Por su parte, el CO_2 atmosférico se fija en las células superficiales del mesófilo (donde su proporción es mucho menor que la del O_2) mediante una enzima carboxilasa que no posee actividad oxigenasa y que sintetiza compuestos de 4 carbonos que se desplazan del mesófilo a la vaina. Esta ruta se denomina de Hatch-Slack (HS) (Fig. 7.2).

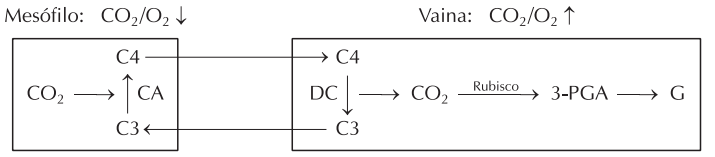


Figura 7.2. Fijación de CO_2 en plantas de clima cálido. C3 (compuesto de 3 C); C4 (compuesto de 4 C; CA (carboxilasa); DC (descarboxilasa); G (glucosa).

El compuesto C4 es el oxalacetato, que se transforma en malato por la malato deshidrogenasa o en aspartato por la aspartato aminotransferasa. Uno u otro se transfieren a la vaina donde actúan dos tipos de descarboxilasas: las enzimas málicas dependientes de $NAD(P)^+$, que oxidan y descarboxilan el malato a piruvato, o la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), que descarboxila el oxalacetato, formado a partir de aspartato, a fosfoenolpiruvato. El CO_2 se asimila por la Rubisco (cuya actividad

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

oxigenasa es pequeña en el microambiente empobrecido en O_2 de la vaina) y el compuesto C3 resultante (piruvato, fosfoenolpiruvato o alanina) se reenvía al mesófilo (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Variantes bioquímicas de la ruta C4.

Descarboxilasa de la vaina	Coenzima utilizado	Sustrato carboxilado (mesófilo → vaina)	Sustrato reciclado (vaina → mesófilo)
$NADP^+$-EM	$NADP^+$	Malato	Piruvato
NAD^+-EM	NAD^+	Aspartato	Alanina/piruvato
PEPCK	ATP	Aspartato	PEP

El aceptor C3 de CO_2 en el mesófilo es el PEP, que se sintetiza en la vaina mediante la PEPCK o en el mesófilo por la piruvato fosfato dikinasa (PPDK), esta última la única enzima distintiva de la ruta C4:

$$\text{OAA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PEPCK}} \text{PEP} + \text{ADP}$$

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{Pi} \xrightarrow{\text{PPDK}} \text{PEP} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

La ruta C4 ha evolucionado a partir de la ruta C3 y de hecho en algunas plantas como *Atriplex* o *Panicum,* coexisten ambas rutas. Además, los herbívoros manifiestan preferencias por las plantas C3, donde el almidón es más accesible por estar situado hacia la superficie, el contenido en nitrógeno es mayor y menor el contenido en lignina.

Las plantas adaptadas a ambientes desérticos poseen una variante de la ruta C4 denominada metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM), donde las rutas C3 y C4 operan a diferentes tiempos. Durante el día, con estomas cerrados, se retiene el agua y el CO_2, por lo que funciona la ruta C3. Durante la noche, los estomas se abren y se intercambia agua y CO_2, por lo que se favorece la ruta C4. El malato sintetizado se almacena en las vacuolas y se libera durante el día para utilizarlo como fuente de CO_2 mediante su descarboxilación por la enzima málica (Fig. 7.3).

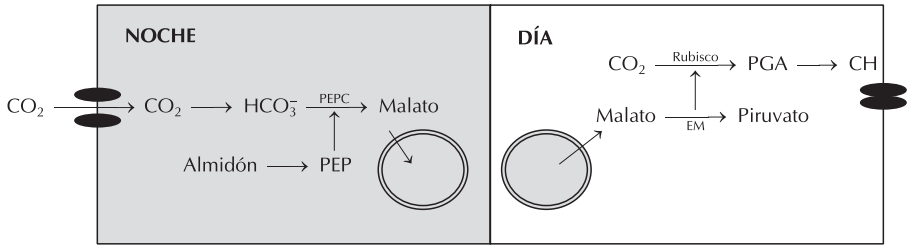


Figura 7.3. Metabolismo ácido de las Crasuláceas. CH (carbohidratos: almidón y sacarosa); PEPC (PEP carboxilasa); EM (enzima málica).

El malato se concentra en la vacuola (0,2 M), lo que evita la disminución del pH citosólico. Las plantas CAM poseen las mismas variantes bioquímicas que las C4 (enzimas málicas y PEPCK). En algunos casos, la ruta de fijación de CO_2 depende de las

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

condiciones de irrigación. Así, *Weltwitshia mirabilis*, una gimnosperma del desierto de Namibia, puede adoptar el metabolismo C3 o CAM. Se han descrito 25 familias de plantas CAM que agrupan 109 géneros cuyo metabolismo varía según las condiciones ambientales: las especies de *Euphorbia* de zonas subtropicales de América poseen la ruta C4 mientras que las de Africa tropical son de tipo CAM.

La propia Rubisco posee variantes ambientales. La enzima de plantas posee 8 subunidades mayores y 8 pequeñas que han evolucionado a partir de un tipo bacteriano más sencillo. Las secuencias de las subunidades grandes se han conservado pero no las de las subunidades pequeñas, lo que produce una base molecular para la tolerancia a altas temperaturas de las plantas C3.

La Rubisco es una enzima muy antigua en la escala evolutiva dada su ubicuidad entre diversos tipos de procariotas fotótrofos y autótrofos y de eucariotas fotosintéticos. Como la atmósfera primitiva poseía probablemente una *ratio* O_2/CO_2 muy baja, la actividad oxigenasa no constituyó un problema de despilfarro energético. Sin embargo, la *ratio* O_2/CO_2 actual es muy baja, y lo ha sido posiblemente a lo largo del último eón, por lo que resulta paradójico que los mecanismos evolutivos no hayan purgado a la Rubisco de su actividad oxigenasa.

En climas donde la temperatura es alta, las plantas C4 han resuelto el problema creando un microcosmos paradisíaco desde el punto de vista fotosintético: la vaina posee una atmósfera similar a la ancestral, con baja *ratio* O_2/CO_2 donde la Rubisco prácticamente está exenta de actividad oxigenasa.

En climas templados, las plantas C3 se defienden de la fotorrespiración gracias a la activación de la carboxilasa a temperaturas suaves (a 25 °C disminuye la Km para el CO_2).

No obstante, la fotorrespiración podría tener un papel fisiológico: disminuir la concentración de O_2 en la luz, con lo que disminuye el riesgo de generación de especies reactivas del O_2, o bien ajustar las concentraciones de ATP y NADPH para optimizar el flujo de electrones fotosintético.

Adaptación a temperaturas extremas

Las temperaturas extremas, con frecuencia por debajo de los 0 °C o muy por encima de los 30 °C, pueden afectar gravemente tanto a la propia estructura biológica como a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que determinan su buen funcionamiento. Para evitar los efectos de la congelación, las plantas y animales utilizan el descenso crioscópico que ciertos solutos biocompatibles producen en el punto de congelación del agua. Este papel anticongelante lo desempeñan en las plantas superiores azúcares como la glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa, manitol, sorbitol y glicerol. Estos solutos tienen un efecto osmótico, disminuyendo la cantidad de hielo en la vacuola, o bioquímico, mediante su metabolización a otras sustancias como los alcoholes polihidroxílicos. Por otra parte, la *ratio* ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados en las membranas celulares podría controlar la fluidez de la membrana y su

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

funcionamiento a bajas temperaturas. Las plantas también poseen proteínas anticongelantes, como en *Nothofagus nombeyii*, del bosque húmedo chileno, donde se ha aislado una proteína de 35 kDa que protege de la congelación hasta los –20 °C.

En los animales, los solutos crioscópicos son azúcares, como el glicerol en los insectos, o macromoléculas, como las glicoproteínas anticongelantes de los peces antárticos o de los peces de aguas templadas en invierno. Las proteínas anticongelantes poseen una masa molecular entre 3 y 34 kDa y una estructura característica, con secuencia repetitivas AAT y disacáridos como el galactosil-*N*-acetilglucosamina unidos a restos de treonina.

La adaptación a altas temperaturas es clave por la inestabilidad de las biomoléculas (ATP, RNA, DNA) a temperaturas superiores a 40 °C. En este sentido, las bacterias hipertermófilas son un ejemplo extremo: *Pyrodictium* requiere para crecer temperaturas superiores a 80 °C pero tolera hasta 110 °C gracias a una proteína que constituye el 80% de su proteína total y que posee dos actividades: una ATPasa y una chaperonina molecular que impide la desnaturalización térmica de las proteínas celulares. Los procariotas hipertermófilos producen biomoléculas estructurales características como el lipoglicano tetraéter de *Thermoplasma*, solutos biocompatibles como el 2,3-difosfoglicerato cíclico de *Methanopyrus*, proteínas tipo histona que estabilizan el DNA en *Methanothermus*. En general, la secuencia de las proteínas de los termófilos e hipertermófilos procariotas es muy característica y asegura una adecuada actividad fisiológica a altas temperaturas. Estas proteínas son termoestables porque poseen muchos puentes salinos y el interior de la macromolécula es altamente hidrofóbico. Además, la membrana celular no contiene ácidos grasos sino hidrocarburos de larga cadena con unidades repetitivas de fitano, como sucede en las *Archaea* termófilas.

Los eucariotas están excluidos de los ambientes con temperaturas superiores a 60 °C. De hecho, en el árbol evolutivo, los organismos más cercanos al origen son *Archaea* o *Eubacteria* hipertermófilos, mientras que la aparición de los eucariotas es muy posterior (1 eón). Probablemente, la existencia de orgánulos intracelulares imposibilita la termofilia por la necesidad de la existencia de membranas porosas para las biomoléculas (ATP, aminoácidos, etc.). No obstante, los eucariotas poseen proteínas de choque térmico (HSP) que poseen papeles fisiológicos muy variados como el control de la expresión génica o la protección frente a las mutaciones. La síntesis de HSP es sorprendentemente muy rápida y requiere períodos de adaptación: las semillas de soja no soportan temperaturas de 45 °C, salvo si han sido expuestas previamente a 40 °C durante 2 h.

En las plantas existen dos grupos de HSP asociadas a las biomoléculas nucleares, uno de alta masa molecular (68, 70, 84 y 92 kDa) y otro de baja masa molecular (15 a 23 kDa).

7.2.2. Adaptación a la anaerobiosis

Un gran número de especies vegetales sufren procesos de encharcamiento de las raíces, lo que disminuye drásticamente el aporte de O_2 y produce un ambiente micro-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

aeróbico. Dentro del mismo género, hay especies tolerantes al encharcamiento (*Iris pseudocorus*) y especies que no lo son (*Iris germanica*). Como se vio en el capítulo 3, en los procariotas (*Enterobacteriaceae*) existe un mecanismo de adaptación aerobiosis-microaerobiosis-anaerobiosis consistente en la represión de rutas metabólicas aeróbicas (citocromos *b* y *d*, enzimas del ciclo de Krebs) y en la inducción de rutas anaeróbicas (alcohol deshidrogenasa, reductasas terminales unidas a la membrana). Las plantas sufren un tipo similar de diversificación metabólica, con el inconveniente de la toxicidad del alcohol sobre las células vegetales (Fig. 7.4).

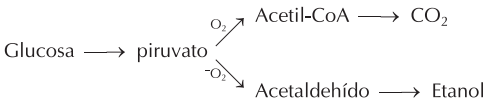


Figura 7.4. Diversificación metabólica en la anaerobiosis.

Por otra parte, el ambiente anaeróbico puede producir otros efectos tóxicos, debidos a metales (hierro) y a desequilibrios hormonales.

En ciertas plantas, la adaptación consiste en la rápida eliminación del etanol por el flujo de agua (arrozales). En otros casos se han propuesto varias hipótesis de tipo bioquímico para explicar la adaptación al encharcamiento. Así se ha sugerido (aunque no verificado) que los intermediarios glicolíticos se dirigen hacia otras rutas no productoras de etanol y cuyos productos finales son el malato (*Juncus effussus*), la alanina, el glicerol o el lactato (*Alnus incana*). También se ha propuesto que un escape del malato vacuolar podría ser responsable de la acidosis citosólica causante del daño celular en anaerobiosis. Por otra parte, el daño podría causarlo no la anaerobiosis, sino el retorno a la aerobiosis: la oxidación del etanol a acetaldehído, también altamente tóxico, la peroxidación lipídica post-anóxica en *Iris germanica*, etc.

En los animales se acumulan una serie de metabolitos en condiciones anóxicas, como los ácidos láctico y pirúvico (músculo esquelético de mamíferos), ácidos acético y succínico (bivalvos), lactato y alanina (quelonios marinos), glutamato y aspartato (anélidos), octopina (cefalópodos), sorbitol y glicerol (insectos).

7.2.3. Adaptación a la humedad ambiental

Las plantas xerófitas están adaptadas a vivir en ambientes secos mediante modificaciones morfológico-anatómicas que aumentan la capacidad de absorción o disminuyen las pérdidas, como las cubiertas cerosas, la conversión de hojas en espinas o el control de la apertura de los estomas.

Los mecanismos de control de la apertura estomática operan sobre el tiempo (minutos) o sobre el ritmo (día-noche) de apertura. Con este objeto se producen una serie de moléculas (sesquiterpenos) que cierran los estomas, como los ácidos abcísico y faseico, el farnesol o la xantoxina (Fig. 7.5).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

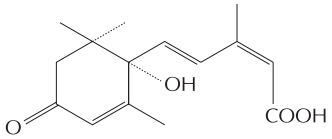


Figura 7.5. Ácido abcísico.

En las plantas sometidas a estrés hídrico como *Sorghum*, el (E)(E)-farnesol aumenta la permeabilidad de la membrana del cloroplasto del mesófilo, se libera ácido abscísico que se transporta a las células guarda estomáticas y se produce el cierre de los estomas.

Otro tipo de adaptación es bioquímica y consiste en la acumulación de prolina, hasta un 30% del total de aminoácidos de la planta, o pinitol (legumbres), lo que constituye un indicador de estrés hídrico. Este mecanismo requiere un control sobre la ruta de la prolina, consistente en la pérdida del retrocontrol, la disminución de la oxidación de la prolina o de su incorporación a proteínas (Fig. 7.6).

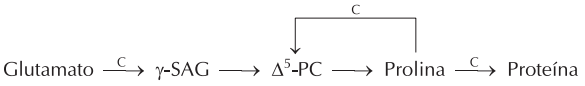


Figura 7.6. Control de la acumulación de prolina. C (puntos de control); γ-SAG (γ-semialdehído glutámico); Δ^5-PC (Δ^5-pirrolín-5- carboxilato).

7.2.4. Adaptación a la presencia de metales

La aparición de metales en los suelos constituye otro tipo de estrés que puede repercutir a lo largo de la cadena alimenticia si las plantas acumulan ciertos metales pesados o de transición (ver capítulo 6).

El selenio es un elemento que se acumula en suelos de ciertas áreas continentales (Asia Central, Norteamérica y Australia). Entre las plantas adaptadas al Se y que acumulan este elemento están algunas especies de legumbres del género *Astragalus* (5.000 ppm frente a 5 ppm de las plantas no acumuladoras). Aunque los seres vivos requieren trazas de Se para enzimas claves como la glutation peroxidasa, es muy tóxico para los herbívoros si se sobrepasa el límite de 1-5 ppm. Los acumuladores de Se evitan esta toxicidad mediante la separación de la incorporación del S y del Se a los aminoácidos metionina y cisteína (Fig. 7.7).

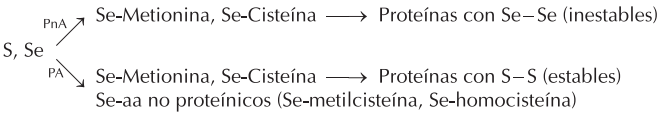


Figura 7.7. Toxicidad del Se. PnA (plantas no acumuladoras); PA (plantas acumuladoras).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las plantas pueden también adquirir resistencia a los metales pesados, como *Festuca ovina*, que vive en zonas mineras, o *Agrostis tenuis*, capaz de crecer en suelos con un 1% de plomo. La adaptación consiste en cambios bioquímicos a nivel de la superficie radicular y que afecta a actividades enzimáticas como la fosfatasa alcalina que se inhibe fuertemente por Pb a partir de 50 μM en plantas no adaptadas.

Otro tipo de adaptación bioquímica consiste en la inducción de péptidos que unen metales (fitoquelatinas), con una estructura general (glutamil-cisteinil)$_n$-glicina (n = 2-8). En los animales, esta función la desempeñan las metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína, que también se encuentran en los microorganismos, y que poseen una sorprendente homología entre grupos evolutivamente muy alejados.

En las plantas, los ácidos vacuolares (citrato y malato) también pueden contribuir a fijar metales formando complejos coordinados (Zn, Cr, Ni). La adaptación al cobre y al plomo se produce mediante su inclusión en la pared celular, o su transporte y compartimentación.

En general, cada planta posee mecanismos propios de adaptación a diferentes metales, que a veces están agrupados (co-tolerancia). Esta capacidad permite la utilización de las plantas en la prospección minera o en la detección de contaminantes metálicos: *Hybantus furibundus*-Ni, *Eriogonum ovalifolium*-Ag, *Astragalus*-U, *Pacelia sericea*-Au (21 ppb de oro en las hojas). Algunas plantas marinas muestran también este comportamiento, como *Ecklonia radiata*, de cuyos arsenofuranósidos el As pasa a la cadena alimenticia, acumulándose arsenobetaína en los crustáceos (Fig. 7.8).

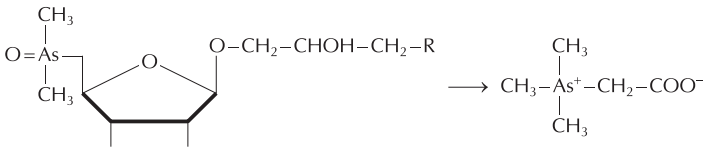


Figura 7.8. Metabolismo del As en la cadena alimenticia marina. Los As-furanósidos (izquierda) se descomponen anaeróbicamente, se oxidan y se metilan a As-betaína (derecha).

7.2.5. Adaptación a la salinidad

La mayoría de las especies vegetales no soportan más del 0,1% de NaCl en el suelo (glicofitos). Sin embargo, hay plantas halófitas que viven en ambientes salinos, llegando a tolerar hasta el 20% en algunos casos, aunque la mayor parte de los halófitos viven en suelos que contienen entre el 2 y el 6% de sal. Entre las plantas resistentes a la salinidad existen especies costeras (*Armeria*, *Plantago*, *Thalassia*) y desérticas (*Atriplex*, *Suaeda*).

La adaptación se debe a diversos mecanismos como la acumulación de sal en las vacuolas (hasta un 10% en *Salicornia*), la resistencia a la entrada del NaCl o su dilución en la planta, y la aparición de solutos compatibles como la prolina y la glicina-betaína, que pueden llegar a acumularse hasta valores de 50 mg y 500 mg por 100 g de peso fresco, respectivamente, en glicófitos resistentes (*Chloris*) y halófitos (*Suae-*

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

da). En otros casos se acumulan otros iones como el S-dimetilsulfonio (*Ulva*), o polioles como el sorbitol y pinitol. Esto solutos citosólicos actúan compensando la alta presión osmótica de la vacuola cargada de NaCl y normalizan el potencial hídrico en la planta.

Otro mecanismo se da en plantas que crecen en hábitats ricos en sulfato y consiste en la síntesis de flavonoides que unen este anión (Fig. 7.9).

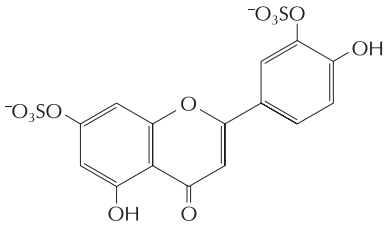


Figura 7.9. Luteolina-7,3′-disulfato.

7.3. Interacciones entre plantas y animales

7.3.1. Polinización

Las angiospermas y gimnospermas son plantas que por lo general no requieren el medio acuático para la reproducción sexual: la fecundación se lleva a cabo mediante la dispersión de los gametos masculinos en forma de polen, en un proceso de polinización por viento (gimnospermas y algunas angiospermas, como las gramíneas) o por animales (angiospermas). Los animales polinizadores (insectos, pájaros, murciélagos y roedores) han coevolucionado durante 130 Ma con las angiospermas, cuyas flores han experimentado una adaptación tan acentuada que solamente son polinizadas por un tipo de animal.

La polinización animal es absolutamente imprescindible para las plantas cuyas flores poseen solamente aparato genital de un sexo, particularmente las dioicas, y para las plantas hermafroditas que son autoincompatibles, como la mayoría de las angiospermas.

Los polinizadores poseen preferencias por las plantas que visitan, dependiendo del perfume y color de las flores, así como del sabor del néctar y el polen.

Los flavonoides son los pigmentos vegetales más importantes y dan origen a coloraciones anaranjadas, rojas, amarillas, azules y blancas. Otros pigmentos son los carotenoides (amarillo y anaranjado o rojo), clorofilas (verde) y quinonas (rojo y amarillo).

Los colores ciánicos (de rojo a azul) se deben a un grupo de flavonoides, las antocianidinas pelargonidina (rojo, A_{max} a 510 nm), cianidina (azul y magenta, A_{max} a 525 nm) y delfinidina (malva, A_{max} a 535 nm), que varían en el número de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

grupos –OH (R1 y R2) del anillo B (–H, –H; –OH, –H; y –OH, OH), respectivamente. La pérdida del 3 –OH causa un desplazamiento de la absorción a λ más cortas (Fig. 7.10).

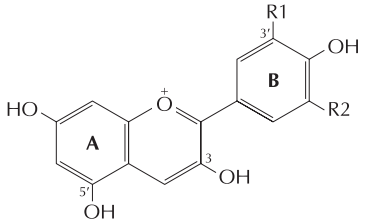


Figura 7.10. Estructura de las antocianidinas.

Otras modificaciones estabilizan este tipo de cromóforos, como la metilación en R1 (peonidina, R2–H, petunidina, R2–OH) y R2 (malvidina), que absorben a 430-435 nm, o la glicosilación (antocianinas). La presencia de co-pigmentos como las flavonas o el flavonol también estabiliza las antocianinas en el medio ácido de la flor (pH 4,5) proporcionando una coloración azul, junto con otros factores como la acilación aromática o la presencia de metales. Las glicosil-flavonas son co-pigmentos interpuestos entre las antocianinas (*Fucsia hibrida*) mientras que la acilación aromática de los grupos glicosilo de las antocianinas es un tipo de copigmentación intramolecular (*Ipomoeba*).

Los colores amarillos se deben a carotenoides y xantofilas (β-caroteno, zeaxantina, licopeno, flavoxantina, etc.) así como a flavonoides como flavonoles y chalconas, como la buteína de *Coreopsis*, que absorbe a 382 nm (Fig. 7.11).

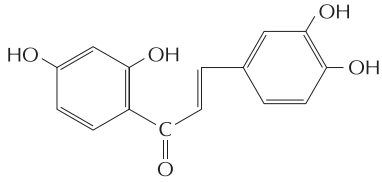


Figura 7.11. Estructura de la buteína.

Por su parte, los colores blancos, poco asequibles al ojo humano, sí son apreciables por los insectos, que detectan la luz UV. Se deben a flavonas (luteína y apigenina) o flavonoles (kampferol y quercetina), que absorben entre 350 y 370 nm (Fig. 7.12).

En las angiospermas, la polinización ha sido el motor que ha impulsado la coevolución pigmentos florales-polinizador. Las rutas metabólicas que han originado los colores de las flores han partido de la cianidina (magenta), el pigmento más común en las gimnospermas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

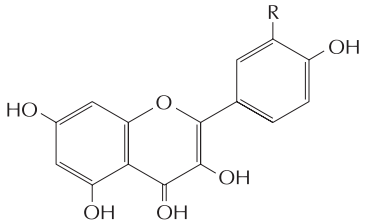


Figura 7.12. Estructura del kampferol (R–H) y la quercetina (R–OH).

La evolución es divergente hacia dos grupos: uno con pérdida de los –OH en 3′ y 3 que determinan colores anaranjado (pelargonidina) y amarillo (apigenidina) y otro con adquisición de –OH en 5′, que causa color púrpura (delfinidina) y metilación en 3′, que causa color malva (petunidina) y 5′, que causa color rojo (malvidina). Este segundo grupo da origen a colores azules mediante copigmentación y formación de complejos metálicos.

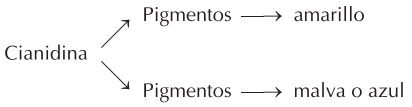


Figura 7.13. Evolución de los pigmentos florales en las angiospermas.

En los trópicos se propagan los alelos que codifican enzimas que participan en la síntesis de pigmentos rojos, que atraen a las aves polinizadoras (colibríes) mientras que en los climas templados, la selección natural favorece las rutas que proporcionan pigmentos azulados, que atraen a los insectos (abejas). Las plantas que sintetizan el pigmento más apropiado para el hábitat del polinizador se reproducen más y colonizan mejor dicho hábitat. En ocasiones, se producen cambios muy rápidos (semanas) en la coloración dependiendo de cambios bruscos en el tipo de polinizador.

Otro aspecto importante es la distribución local de los pigmentos en las flores que constituye verdaderas guías para conducir a los polinizadores hacia el centro donde se encuentran los órganos sexuales de la flor. Las guías debidas a pigmentos de tipo antocianina forman patrones visibles para el ojo humano (*Digitalis*), mientras que las flores de color amarillo uniforme por su contenido en carotenoides muestran guías visibles en el UV debidas a flavonoles como la patuletina (*Rudbeckia*): el color amarillo atrae a las abejas a distancia y una vez que el insecto llega a la flor, la guía UV lo dirige hacia el centro de la misma.

Los polinizadores también son atraídos por una serie de compuestos volátiles de las flores, entre los que están monoterpenos (limoneno), sesquiterpenos (bisabolol) y compuestos aromáticos (vanillina, eugenol, etc.).

Desde el punto de vista antropocéntrico existen perfúmenes agradables y fragantes (Fig. 7.14) o desagradables (aminoides). Entre éstos se encuentran las monoaminas (metilamina), diaminas (putrescina) e indoles (escatol) y atraen a ciertos polinizadores.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Así, *Arum nigrum* y *Arum maculatum* poseen flores con un apéndice púrpura muy visible que se abre de noche exponiendo un pedúnculo donde se producen aminas que se evaporan gracias a una alta actividad respiratoria donde la energía no se conserva como fuerza motriz de protones y se disipa como calor. El insecto, además, queda atrapado durante 24 horas por una secreción oleaginosa, lo que facilita la transferencia de polen desde las flores masculinas situadas por encima de las femeninas, dispuestas en el fondo del pedúnculo. El escape del insecto es importante en el caso de *Arum* para la polinización cruzada, pero en ciertas plantas carnívoras se producen alcaloides (coniina) que además de atraer paralizan al insecto.

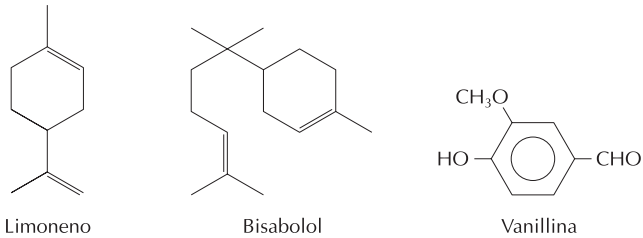


Figura 7.14. Aromas más comunes de las flores.

El comportamiento de los insectos (alimentación, sexo, defensa, etc.) está regido por señales químicas (feromonas) que actúan a concentraciones muy bajas (40 ng). La estructura de las feromonas de insectos varía entre los simples alcoholes o ácidos alifáticos de cadena corta (valerato) o las más comunes de los ácidos y ésteres de cadena larga (acetato de hexadecanilo) o terpenoides. Algunas plantas producen feromonas de insectos para atraer a éstos, como las orquídeas del género *Ophrys*, que además de atraer las abejas por la forma y el color de la flor producen una sustancia que imita el olor de las feromonas sexuales del insecto, en este caso sesquiterpenos del tipo cadineno (Fig. 7.15), monoterpenos o ésteres y ácidos de cadena media (octanol, decilacetato y linalool). Algunas orquídeas producen más de 60 fragancias diferentes, como euglenol, vanillina, benzilcinamato, etc., que son recogidas por abejas polinizadoras y utilizadas como feromonas sexuales. Este tipo de interacciones da lugar a numerosos episodios coevolutivos entre abejas y orquídeas.

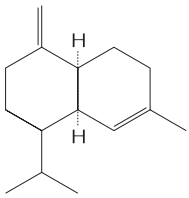


Figura 7.15. Estructura del (-)-γ-cadineno, feromona de *Ophrys*.

El néctar es otro factor a tener en cuenta en la polinización. En las angiospermas, el papel del néctar es el de atraer a los polinizadores mediante una adecuada mezcla

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de azúcares que proporcionan un sabor dulce (glucosa y fructosa y sus derivados di- y oligosacarídicos sacarosa, rafinosa, trehalosa y melibiosa). Los néctares poseen también mezclas de aminoácidos, muy importantes para la nutrición de los polinizadores, lípidos (diglicéridos de acetato, β-acetoxiesteárico) e incluso toxinas de tipo diterpenoide (acetilandromenol) o alcaloides (de ahí la toxicidad de ciertas mieles para los humanos). Las plantas poseen nectarios extraflorales, no útiles para la polinización pero sí para atraer colonias de insectos (hormigas) y proveer una defensa contra los herbívoros.

Por lo que respecta al polen, su alto contenido en proteínas (16-30%), azúcares (1-22%) y lípidos (3-11%), más vitaminas, carotenoides y flavonoides, lo hacen un excelente nutriente para los polinizadores y, dada su abundancia, sin aparente conflicto con su función reproductiva.

7.3.2. Toxinas defensivas de las plantas

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra la depredación por parte de animales herbívoros consistentes en barreras físicas (espinas, cutículas, espículas, pelos urticantes, etc.) y bioquímicas (toxinas y sustancias repelentes). La mayoría de las especies vegetales son altamente tóxicas para aves, peces e insectos, aunque no para el hombre o los animales domésticos.

La toxicidad depende de la estructura química del compuesto, la dosis, la edad o estado de desarrollo del animal, la absorción y, sobre todo, los mecanismos de destoxificación que se enumeran en el Capítulo 17. La presencia de toxinas es manifestada a través de sabores amargos (cianuro) o de coloraciones de aviso, como el púrpura oscuro del fruto de *Atropa bella-donna*.

Las toxinas nitrogenadas incluyen aminoácidos no proteínicos (β-cianoalanina de *Vicia*), glicósidos cianogénicos (linamarina de *Lotus*), alcaloides (atropina de *Atropa bella-donna*), péptidos (viscotoxina de *Viscum*) y proteínas (fitohemaglutinina de *Phaseolus*) (Fig. 7.16).

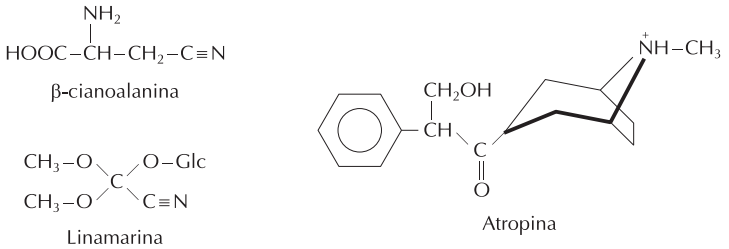


Figura 7.16. Toxinas nitrogenadas de las plantas. Glc (glicósido).

En el caso de los aminoácidos, la toxicidad se debe a su incorporación a proteínas, generando una proteína no útil, o a la inhibición de enzimas (como la L-DOPA, producida en semillas de *Mucuna*, que inhibe la tirosinasa de insectos).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los glicósidos cianogénicos no son tóxicos *per se*, sino mediante su degradación enzimática activada cuando la hoja es dañada y el sustrato se pone en contacto con la enzima. Así, en la limanarina, el enlace glucosídico se hidroliza por una hidrolasa y la cianhidrina resultante (R–C(OH)CN) libera una cetona y cianuro de forma espontánea. Aun así, el patógeno (en este caso el hongo *Stemphylium loti*, parásito de *Lotus corniculatus*) se defiende de la toxina induciendo la formamida hidroliasa, que produce formamida (véase Capítulo 12). Por su parte, los glucosinolatos deben su toxicidad a la liberación de isotiocianatos y tiocianatos ($R-N=C=S \longrightarrow R-S-C\equiv N$).

Las toxinas de plantas más conocidas son los alcaloides, como la atropina de *Atropa bella-donna*, cuyo nombre hace mención a su letalidad y a su capacidad cosmética en la cultura grecorromana. La atropina es un inhibidor de los receptores muscarínicos de la acetilcolina e interfiere fuertemente con la actividad del sistema nervioso colinérgico.

Entre las proteínas tóxicas se encuentran la abrina (*Abrus precatorius*) y la ricina (*Ricinus communis*), letales en dosis inferiores a 1 mg. Las semillas de leguminosas producen proteínas inhibidoras de la tripsina y fitohemaglutininas.

Las plantas también producen toxinas no nitrogenadas de tipo hidrocarbonado como la ouabaína y la digitoxigenina, esteroides cardiotónicos de *Akokhantera ouabaio* y *Digitalis purpurea*, el ácido monofluoroacético de *Dichapetalum cymosum*, sustrato suicida de la aconitasa del ciclo de Krebs, furocumarinas fototóxicas como la xantotoxina de *Pastinaca sativa* o el psoraleno y aflatoxinas, en este caso del hongo *Aspergillus flavus* (capítulo 17).

Las aflatoxinas son un caso de adaptación defensiva producida por la simbiosis entre una planta superior (semillas de cacahuetes) y un hongo: la planta alberga en sus tejidos un hongo o bacteria productoras de toxinas letales para los potenciales herbívoros.

Los esteroides cardiotónicos bloquean la ATP-asa de Na^+/K^+ inhibiendo la desfosforilación de la forma E2. La consiguiente disminución del gradiente de Na^+ aumenta indirectamente el Ca^{2+} citosólico al disminuir el intercambio Ca^{2+}_{IN}/Na^+_{EX}. El resultado es el aumento de la contractilidad del músculo cardiaco, base del tratamiento tradicional de la hidropesía (enfermedad cardiaca congestiva) mediante digitalina del que el médico inglés William Whitering realizó el primer estudio científico en 1785.

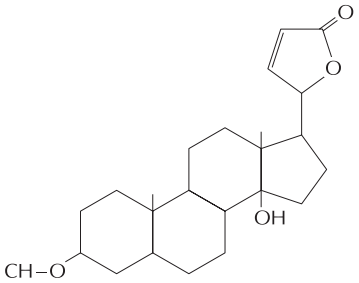


Figura 7.17. Digitoxigenina, glicósido tóxico de *Digitalis*. CH (monosacárido).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los glicósidos cianogénicos son otro tipo importante de toxinas defensivas vegetales, como la amigdalina de las almendras amargas (*Prunus amygdalus*) o las más comunes producidas por los tréboles, linamarina y lotaustralina. La liberación de HCN a partir de estos glicósidos requiere una actividad enzimática glicosidasa específica que actúa cuando la hoja es desgarrada por el herbívoro y se ponen en contacto la enzima y el sustrato.

En *Trifolium repens* la proporción de variedades cianogénicas aumenta de forma espectacular desde los países europeos nórdicos a los mediterráneos: en los climas fríos la producción de cianuro puede ser letal para la planta durante un eventual proceso de congelación de tejidos que puede liberar el veneno y ponerlo en contacto con la glucosidasa. En climas cálidos no es frecuente la congelación y disminuye este peligro, por lo que aumenta la frecuencia de variedades cianogénicas en las latitudes mediterráneas. Por otra parte, la frecuencia de variedades cianogénicas aumenta hacia el oeste, probablemente porque en Rusia los predadores de plantas cianogénicas hibernan y en primavera las plantas han desarrollado suficiente biomasa para soportar la predación y no necesitan mecanismos defensivos.

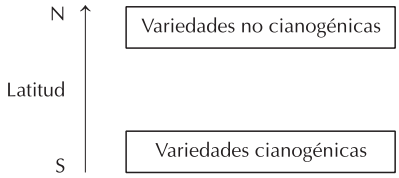


Figura 7.18. Distribución latitudinal de variedades cianogénicas de *T. repens*.

La ingestión de HCN puede ser letal si la cantidad de tóxico producido por la planta es grande, como sucede con la leguminosa *Holocalyx glaziovii*, cuya producción de renuevos jóvenes cargados de HCN coincide con la escasez de gramíneas. Otro factor en la protección cianogénica es la edad del tejido: las hojas jóvenes de *Sorghum* son rechazadas por la *Locusta migratoria* debido al cianógeno dhurrina.

La adaptación defensiva de la *Acacia* centroamericana merece una especial atención: las especies cianogénicas son sólo las que no pueden establecer simbiosis con hormigas del género *Pseudomyrmex*, atraídas por el néctar, que disuaden a los herbívoros del ataque al árbol.

La producción de toxinas vegetales ha producido frecuentes episodios de coevolución entre plantas, insectos y aves. Algunas plantas (especies de *Asclepias*, *Nerium oleander*) producen glicósidos cardiotónicos (calotropina, oleandrina), de sabor amargo, que son almacenados por la mariposa monarca (*Danaus plexippus*). Al ser comida por las aves (*Cyanocitta cristata bonia*), la intoxicación por el glicósido causa vómitos, lo que hace que en lo sucesivo el ave asocie la coloración del insecto con un sabor desagradable. Otros casos implican toxinas alcaloides como las pirrolizidinas, cuyos productos de degradación son hepatotóxicos, pero en los lepidópteros son precursores de feromonas sexuales masculinas (danaidal). La mariposa monarca adquiere de las plantas una segunda toxina de tipo cardenólido que protege las larvas del parasi-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tismo de las moscas. Incluso si la planta no produce glicósidos tóxicos, algunos coleópteros pueden llegar a sintetizarlos para su propia defensa.

La producción de toxinas vegetales y la inducción de mecanismos de defensa por parte de los animales constituye un claro ejemplo de coevolución, una auténtica competición entre los DNA de ambos organismos para sobrevivir, a la manera en que perfeccionan sus mecanismos de ataque y huida un guepardo y una gacela. En este caso se trata de una adaptación más sutil, de tipo metabólico, en la que la planta perfecciona su toxicidad y el animal retoca sus mecanismos biotransformantes de las toxinas. En ocasiones, ambos procesos están basados en enzimas de la misma familia bioquímica, los CYP (véase capítulo 17). De nuevo el motor es el principio acción-reacción: la presión del herbívoro al desarrollar el mecanismo de defensa contra una toxina induce la producción de un segundo metabolito tóxico, etc.

De acuerdo con esta teoría, la evolución de las plantas ha debido ocurrir de forma paralela a la evolución de las rutas del metabolismo secundario, lo que se confirma plenamente al superponer los patrones evolutivos de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de tres grupos de toxinas y de las especies vegetales. Las ramas evolutivas metabólicas de las toxinas nitrogenadas (basadas en aminoácidos), fenólicas (basadas en el shikimato) y terpenoides (basadas en el mevalonato) se superponen con las ramas evolutivas vegetales, comenzando con las plantas sin semillas (*Pterophyta*) y siguiendo con las gimnospermas, las angiospermas leñosas y las angiospermas herbáceas. Dentro de una familia se puede producir una especialización: las Crucíferas pueden producir un tipo de tóxico (isotiocianatos, Fig. 7.19) o varios (isotiocianatos y cardenólidos). En cambio, otras familias, como las leguminosas, diversifican sus tóxicos (isoflavonas, aminoácidos no proteicos, alcaloides, cianógenos).

$$CH_2{=}CH{-}CH_2{-}C\begin{matrix}\diagup S{-}Glc \\ \diagdown NO{-}SO_3^-\end{matrix} \longrightarrow CH_2{=}CH{-}CH_2{-}N{=}C{=}S + Glucosa + SO_4^{2-}$$

Figura 7.19. La mirosinasa transforma la sinigrina (izquierda) en isotiocianato de alilo, un repelente de insectos, tóxico, de las Crucíferas.

En el caso de las Umbelíferas, la coevolución ha dado lugar al perfeccionamiento de la capacidad tóxica mediante diversificaciones de la ruta de las cumarinas: la umbeliferona da lugar al psoraleno y al isopsoraleno. Por su parte, los insectos han desarrollado métodos para evitar la fototoxicidad y rutas biodegradativas basadas en la oxidación del psoraleno por el citocromo P450 (capítulo 17).

En Australia, las poblaciones de canguros se han adaptado a la presencia de fluoroacetato en plantas de los géneros *Gastrolobium* y *Oxylobium*. Esta toxina se transforma en las mitocondrias animales en fluorocitrato, fuerte inhibidor competitivo de la aconitasa y del transportador de citrato, lo que bloquea fatalmente el ciclo de Krebs. En las hojas de estas plantas, el fluorocitrato se acumula hasta 3 g kg^{-1} de peso fresco, una cantidad letal para los herbívoros. La rata canguro del Oeste de Australia está adaptada a la toxina, pero no así la del Sudeste, lo que indica una migración de este animal desde el Este, donde se originó, hacia el Oeste. Por el contrario, el cangu-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

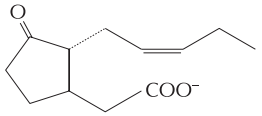
ro gris es tolerante en todo el continente, lo que indica una migración en sentido opuesto.

Para aumentar el efecto disuasorio, las plantas concentran las toxinas en la superficie (terpenoides y fenoles en los tricomas). Así, *Solanum berthaultii* posee un doble mecanismo defensivo; un tipo de tricomas produce farneseno, feromona de alarma de los áfidos, y otro tipo produce un sustrato fenólico asociado a una fenolasa-peroxidasa: el producto de la reacción enzimática inmoviliza al insecto, que muere de hambre.

Otro tipo de defensa frente a los herbívoros consiste en la síntesis de ceras y látex. Más de 12.000 especies de plantas producen látex, una mezcla particulada gomosa con toxinas de tipo terpenoide como los ésteres de forbol, sustancias irritantes promotoras de tumores producidas por las euforbiáceas (*Croton tiglium*).

La variación de la cantidad de toxina con el tiempo y el espacio (diferentes partes de la planta) es otro factor de adaptación defensiva. *Coffea arabica* produce sus alcaloides purínicos (cafeína) en toda la planta, excepto en las semillas durante el tiempo en que están protegidas por el endocarpo. Una vez desaparece éste, la concentración de cafeína aumenta un 100%. En las hojas, la concentración de cafeína es muy alta durante el desarrollo (4% del peso seco) y disminuye drásticamente durante la senescencia foliar. Por último, en el fruto la cantidad de cafeína aumenta de nuevo (2% del peso seco) para disminuir 10 veces una vez se desarrolla el endocarpo.

Las respuestas directas al ataque de los herbívoros suponen un considerable ahorro energético, ya que evitan la síntesis y almacenamiento de las toxinas. Estos mecanismos defensivos están basados en la síntesis de hormonas juveniles (véase sección 7.3.3), de fitoalexinas o de inhibidores de proteasas del insecto. En el caso de las Solanáceas atacadas por escarabajos, el sistema vascular libera un factor que induce la síntesis de inhibidores de proteasas (PI) hasta alcanzar un valor del 2% de la proteína soluble. Esta respuesta también se produce mediante daño físico a la planta y se denomina respuesta defensiva sistémica a heridas. Se desencadena a través de dos moléculas reguladoras: el etileno, el ácido jasmónico, el volátil metil-jasmonato y la sistemina, que inducen la síntesis de los inhibidores de proteasas y de otras proteínas de respuesta (Fig. 7.20).



$CH_2=CH_2$

Figura 7.20. Reguladores de la respuesta defensiva sistémica a heridas: jasmonato (izquierda) y etileno (derecha).

La síntesis de PI y proteínas de resistencia se induce localmente por oligogalacturónidos liberados por la pared celular y de manera sistémica mediante un polipéptido de 19 aminoácidos (sistemina) que actúa a concentraciones 10^6 veces menores que los poligalacturónidos:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Daño/ataque ⟶ sistemina ⟶ [jasmonato ⟷ etileno] ⟶ DNA

La acción coordinada jasmonato/etileno sobre genes diana induce la síntesis de inhibidores de proteasas y demás proteínas de respuesta.

La respuesta de los animales a la inducción de mecanismos de defensa en las plantas se basa en mecanismos bioquímicos de inactivación de las toxinas y su eventual almacenamiento o excreción, o bien en mecanismos selectivos de especies no tóxicas. En el caso de la predación de *Cannabis sativa* por la mariposa *Arctia caja*, tiene lugar una selección positiva hacia la variedad mejicana (que produce Δ^1-tetrahidrocannabinol, una sustancia psicoactiva volátil) frente a la variedad turca (que produce cannabidiol, un principio inactivo). Parece como si la especie mejicana produjera una suerte de adicción del insecto, que a la larga le resulta letal.

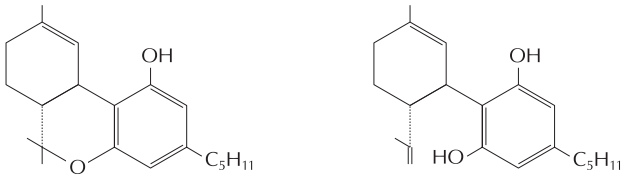


Figura 7.21. Principios activos del *Cannabis*. Tetrahidrocannabibol (izquierda) y cannabidiol (derecha).

Por lo general, la resistencia del insecto a las toxinas vegetales se basa en mecanismos bioquímicos de biotransformación, en los que la sustancia extraña se metaboliza y finalmente se excreta, como sucede con la nicotina de la planta del tabaco, que se metaboliza a nornicotina en *Musca domestica*.

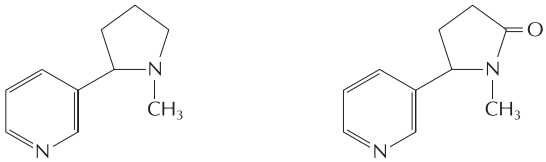


Figura 7.22. Estructura de la nicotina (izquierda) y la nornicotina (derecha).

Las rutas de biotransformación emplean una familia de enzimas denominadas citocromos P450/CYP), que se describen en el capítulo 17. Estas enzimas son inducibles: la ingestión del monoterpeno carvona aumenta hasta un 134% la concentración del CYP responsable de su biotransformación.

7.3.3. Interacciones hormonales entre plantas y animales

Aunque en principio parece impensable una interacción planta-animal basada en mecanismos hormonales que son completamente diferentes, las presiones evolutivas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de los procesos reproductivos (polinización) y de defensa han conducido a la aparición de este tipo de interacciones, consistentes en la interferencia de los mecanismos de señalización hormonal en los herbívoros por parte de análogos de hormonas y feromonas animales de origen vegetal.

La interacción hormonal plantas-animales conlleva un proceso de acción-reacción (producción de una hormona-eliminación de la misma), basado en la evolución de rutas metabólicas biosintéticas-biodegradativas que se estudian con detalle en el capítulo 17.

Entre las hormonas producidas por las plantas están los esteroides sexuales, estrógenos (*Phoenix dactylifera*, *Punica granatum*, *Phaseolus vulgaris*) y andrógenos (*Pynus sylvestris*).

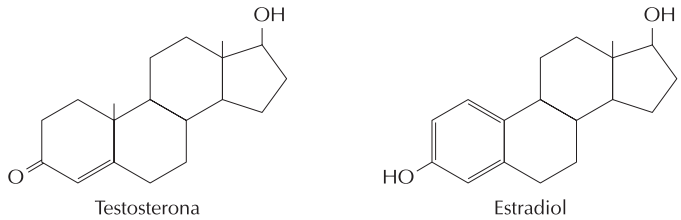


Figura 7.23. Hormonas sexuales animales.

Los compuestos esteroides producidos por las plantas son activos en los organismos animales. Así, el mirestrol de *Pueraria mirifica*, análogo de la estrona, se ha utilizado como abortivo en el Sudeste Asiático, y el pastoreo prolongado en praderas de *Trifolium subterraneum* produce infertlidad en el ganado ovino, en este caso debido a una mezcla de los isoflavonoides genisteína y formomonetina. Por otra parte, el isoflavonoide sintético dietilestilbestrol es un potente estrógeno con actividad anticonceptiva (Fig. 7.24).

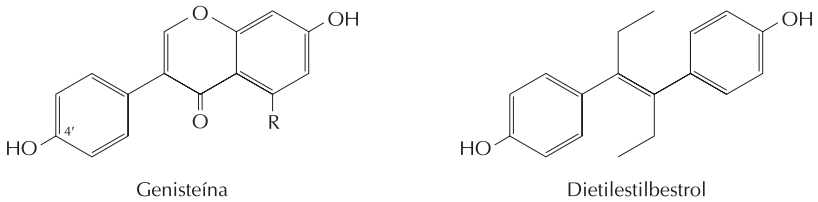


Figura 7.24. Isoflavonoides estrogénicos.

Algunas isoflavonas del trébol se degradan en el rumen produciendo genisteína y equol, un estrógeno muy activo. Las isoflavonas desempeñan un papel clave en el control que ejercen los pastos de leguminosas en algunas poblaciones de aves: en años lluviosos las plantas crecen muy bien y producen pequeñas cantidades de isoflavonas, mientras que en años secos, la mayor producción de isoflavonas interfiere en la producción de huevos y disminuye el tamaño de la población predadora.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El desarrollo de los insectos requiere las hormonas juvenil y de muda para progresar a lo largo de las fases de larva, pupa e imago. Ambas hormonas deben estar en la cantidad justa en el tiempo oportuno, sobre todo la hormona de muda, identificada como el esteroide ecdisona en 1954.

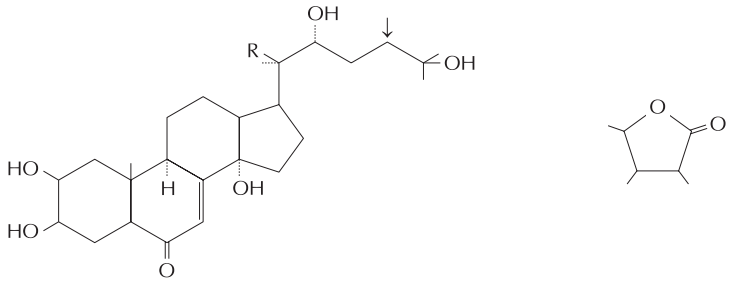


Figura 7.25. Estructura de la ecdisona α (R=H) ó β (R=OH). La cicasterona posee una cadena lateral que forma un anillo de furano (derecha, situación de la flecha).

Las plantas como *Taxus baccata* contienen hasta 1 mg de β-ecdisona por mg de hoja (para obtener esta misma cantidad se necesitaría 500 kg de tejido de insecto), lo que llevó de forma inmediata al desarrollo de una biotecnología de insecticidas naturales. Se conoce un gran número de fitoecdisonas, como la cicasterona de *Cycas*, cuya actividad biológica y vida media es superior a las hormonas de insectos (Fig. 7.25).

El papel fisiológico de las fitoecdisonas es doble: control de las poblaciones de insectos y mecanismo de defensa contra la predación no necesariamente letal, sino de desajuste de la reproducción y metamorfosis. La coadaptación puede llegar a situaciones extremas, como la del cactus del desierto de Sonora (USA) *Lophocerus schotii* y *Drosophila pachea*: la planta produce un esterol (sitosterol) necesario para la síntesis de la hormona del insecto y dos alcaloides (lofocereina y pilocereina) que repele a otras especies de *Drosophila*.

El desarrollo inicial de la larva requiere las hormonas juveniles, compuestos de tipo terpenoide como la juvabiona, descubiertas de manera totalmente accidental (*serendipity*) a raíz de utilizar un tipo u otro de papel de filtro en experimentos de desarrollo de insectos realizados en la Universidad de Harvard con *Pyrrocoris apteris*: el desarrollo se bloqueaba al utilizar cierto tipo de papel obtenido de *Abies balsamea*, cuya pulpa es rica en juvabiona (Fig. 7.26).

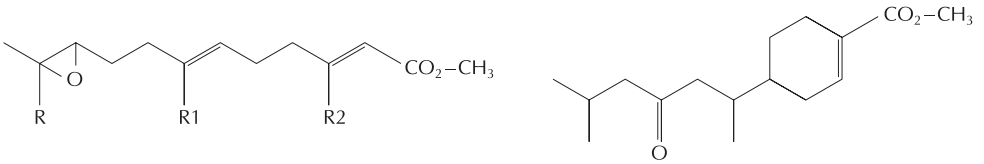


Figura 7.26. Estructura de las hormonas juveniles de insectos (JH0 R, R1 y R2=CH_2-CH_3, izquierda) y un análogo de plantas (juvabiona, derecha).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las hormonas juveniles de insectos (HJ) producidas por las plantas, además de bloquear la metamorfosis, tienen efectos secundarios letales, por lo que constituyen un mecanismo de defensa muy eficaz contra la predación. Además, las plantas sintetizan anti-HJ (cromenos), que se transforman en derivados epoxi en las glándulas del insecto y adelantan la metamorfosis en el tiempo, determinando infertilidad en las hembras. Este es un excelente campo de investigación para el diseño de bioinsecticidas.

Por lo que respecta a las feromonas, existe un caso perfectamente estudiado de interacción planta-insecto, la que se produce entre *Pinus ponderosa* y sus parásitos *Ips paracofussus* y *Dendroctonus brevicornis*. El pino produce terpenos volátiles (mirceno, pineno) que, en su forma original o sus derivados *in vivo*, atraen a las hembras, que, a su vez, atraen a los machos mediante una mezcla de feromonas (mirceno, *exo*-brevicomina y frontalina) hasta conseguir una *ratio* hembras/machos adecuada para la reproducción. Cuando la población alcanza un tamaño adecuado para la explotación del alimento disponible, las hembras expelen (E)-verbenol, que repele a las nuevas hembras que se están aproximando, y los machos producen verbenona, que repele a machos competidores. Este microcosmos se complica por la intervención de bacterias endógenas del parásito (*I. paraconfusus*), que oxidan el pineno a verbenona, o bien hongos en el caso de *D. brevicornis*, que oxidan el verbenol a verbenona (Fig. 7.27).

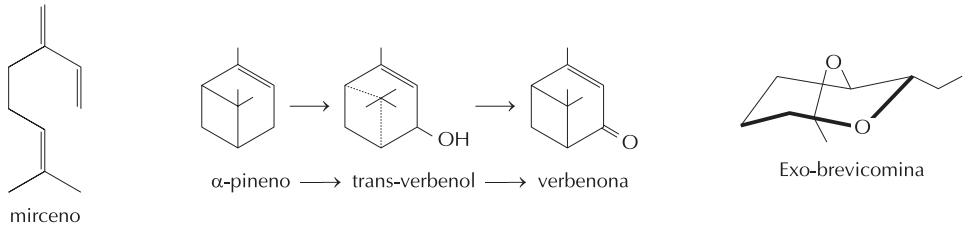


Figura 7.27. Feromonas de plantas (izquierda) y de insectos (derecha).

7.3.4. Interacciones tróficas entre plantas y animales

Existe una gran diversidad de especies de angiospermas (250.000) y de insectos (1-2 millones), así como de metabolitos secundarios de las plantas (más de 30.000). El triángulo planta-insecto-metabolito podría explicar la coevolución planta-insecto sobre una base trófica, que implica la selección de las plantas por insectos y la existencia de mecanismos de defensa-contradefensa vistos en el apartado anterior.

La hipótesis anterior está basada en las siguientes observaciones. A pesar de la abundancia y la voracidad de los fitófagos, las plantas superiores dominan claramente la biosfera, muchos herbívoros son mono- u oligofitófagos (ingieren sólo ciertas especies de plantas pertenecientes al mismo género o familia, que poseen un metabolismo secundario similar aunque no compartan la misma morfología), la mayoría de metabolitos secundarios son altamente tóxicos y sus sabores están basados en estructuras

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

químicas muy distintas (sabor amargo de los alcaloides, terpenos, saponinas, esteroides, flavonoides). Por último, los metabolitos secundarios se acumulan en cantidades suficientes para producir un efecto atrayente o disuasorio en el predador.

Así, en el caso de *Bombix mori* existen varios tipos de factores que determinan la preferencia por la morera (*Morus nigra* y *Morus alba*): atrayentes químicos (aceites esenciales monoterpénicos), flavonoides (morina), nutrientes (sacarosa, inositol) y coadyuvantes (celulosa). La simple sustitución del azúcar en el derivado glicosilado del flavonoide isoquercitrina (glucosa por ramnosa) produce un efecto repelente y no atrayente (Fig. 7.28).

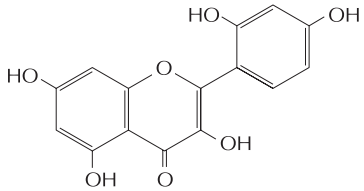


Figura 7.28. Estructura de la morina, flavonoide de *Morus*, atrayente de *Bombix mori*.

Otros metabolitos atrayentes son los glucosinolatos (Crucíferas), fenilpropanoides aromáticos (zanahoria), terpenoides (Labiadas). El terpenoide nepetalactona atrae tanto a insectos como mamíferos (*Felis domestica*).

En ocasiones, los metabolitos secundarios atraen para la puesta de huevos, donde se da también una cierta especificidad, posiblemente basada en antagonismo atrayente/tóxico: *Cheiranthus allionii* atrae insectos mediante glucosinolatos, pero produce cardenólidos de tipo estrofaxantidina, muy tóxicos para las larvas jóvenes.

Gran número de metabolitos secundarios son repelentes para los herbívoros, como los taninos de *Quercus robur* sobre la mariposa *Opheroptera brumata*, el terpenoide gossypol de *Gossypium barbadense* sobre el gusano *Heliothis zea*, los alcaloides esteroideos de *Solanum demissum* sobre el escarabajo *Leptinotarsa decemlineata*, etc.

Además de los insectos, los moluscos podrían constituir una plaga para las plantas si no existieran mecanismos de defensa basados en los metabolitos secundarios repelentes como los glicósidos cianogénicos, aceites esenciales, ésteres del ácido cafeico, polifenoles y sesquiterpenoides (algas marinas).

La selección de plantas por los animales con fines alimenticios se debe a factores tróficos, de sabor y de olor. Los humanos poseen alrededor de 10^6 neuronas olfativas concentradas en una región de unos 5 cm^2 de la parte superior de la nariz,conectadas directamente con el bulbo olfativo cerebral. En cada neurona se expresa un gen que codifica un tipo de receptor olfatorio del tipo serpentina acoplado a una proteína G_{OLF} que transmite la señal olfatoria vía adenilato ciclasa (AC):

$$\text{Olor} \longrightarrow \text{Receptor} \longrightarrow G_{OLF} \longrightarrow \text{AC} \longrightarrow \text{AMPc} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{Canal catiónico} \longrightarrow \Delta\psi$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La AC produce AMP cíclico (AMPc) y éste activa un canal catiónico que deja pasar iones Ca^{2+} y otros cationes. El flujo de cationes despolariza la membrana de la neurona ($\Delta\psi$) y se inicia un potencial de acción que se transmite al bulbo olfatorio y se interpreta como un olor. Cada sustancia olorosa activa un cierto número de receptores y cada receptor se activa por más de una sustancia olorosa pero cada una de ellas activa una combinación única de receptores.

Aunque el genoma humano contiene entre 500 y 750 genes que codifican receptores de olores, la mayoría han sufrido mutaciones y no son funcionales (pseudogenes). Por el contrario, en la rata, casi todos los genes olfatorios son funcionales, lo que responde a la necesidad de un buen olfato para la supervivencia de los roedores. En los primates, los genes que codifican los receptores de olores se han ido perdiendo a lo largo del árbol evolutivo entre los monos más primitivos (que conservan el 93%), hasta los Póngidos (50%) y los humanos (30%).

Las sustancias olorosas se unen a los receptores de olores en una región situada entre las hélices 3 y 5, por la parte extracelular. Estas sustancias son compuestos orgánicos volátiles (benzaldehído, metilbutano-1-tiol, geraniol, etc.) (Fig. 7.29).

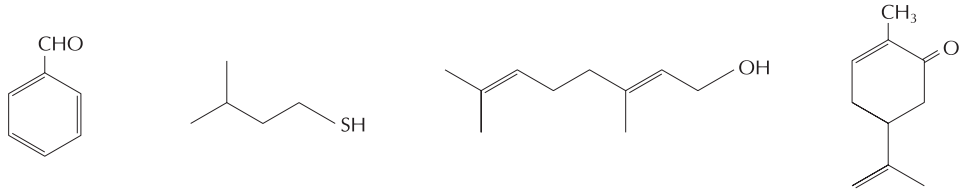


Figura 7.29. Compuestos olorosos. De izquierda a derecha: benzaldehído (almendras); metilbutano-1-tiol (mofetas); geraniol (rosas); β-carbona (menta).

Por lo que respecta a los sabores existen 4 muy diferenciados, salado (Na^+), dulce ($C_6H_{12}O_6$), "umami" (glutamato) y ácido (H^+). El sabor dulce se detecta por una familia de receptores serpentina acoplados a una proteína G (gutsducina). El sabor "umami" se debe a un tipo especial de receptor de glutamato. El sabor salado se capta gracias a células con conductos iónicos para Na^+, y el sabor ácido, al flujo de H^+ o a las interacciones de éste con conductos iónicos que modifican el potencial de membrana. El quinto sabor, amargo, se debe a un gran número de sustancias químicas, la mayoría de origen vegetal, detectables mediante otra gran familia de receptores serpentina acoplados a la proteína G gutsducina. En este caso, cada neurona expresa un gran número de receptores del sabor amargo y, al contrario que en la percepción de olores, la identidad de la sustancia gustativa se pierde en la transmisión nerviosa al cerebro (Fig. 7.30).

Entre la sustancias producidas por las plantas, los azúcares y ácidos orgánicos son atrayentes para los animales domésticos, mientras que los taninos, cumarinas, alcaloides y glicósidos cianogénicos son disuasorios. En cambio, las isoflavonas no son repelentes a pesar de sus interferencias con la acción hormonal. Esta sería la tónica en el caso de los animales salvajes, aunque probablemente están mejor adaptados que los

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

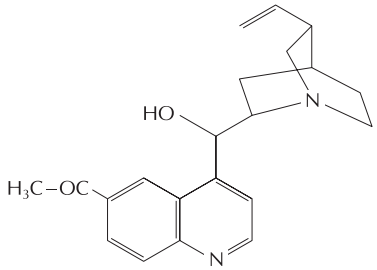


Figura 7.30. Estructura de la quinina, una sustancia amarga.

domésticos a las toxinas vegetales, como se ha demostrado para la ingestión de glicósidos cardiotónicos (*Nerium oleander*) o saponinas (*Phytolacca dodecandra*).

7.4. Interacciones entre plantas

La lucha por la supervivencia de los genes propios y su predominancia sobre los genomas competidores es una constante de los organismos vivos y naturalmente también se da entre las plantas. Esta lucha está basada en interacciones bioquímicas que se resumen en el concepto de alelopatía, o conjunto de interacciones bioquímicas entre plantas superiores. Las sustancias implicadas son toxinas alelopáticas y son metabolitos secundarios, posiblemente originados en mecanismos de defensa anti-herbívoros, pero que al aparecer en exudados de las plantas, interaccionan con el crecimiento de especies competidoras.

Los efectos alelopáticos son conocidos desde hace dos milenios, habiendo sido ya descritos por Plinio en el caso de los nogales (*Juglans regia*). Estas plantas arbóreas producen toxinas para los pinos, Solanáceas (tomate), cereales y otras herbáceas (alfalfa). La toxina se produce por las partes aéreas y las raíces, ya que el crecimiento se inhibe justo hasta el límite de éstas y consiste en un glicósido inactivo cuya hidrólisis produce la sustancia activa, una 5-hidroxinaftoquinona (juglona), que inhibe el crecimiento a concentraciones inferiores a 1 mM en el suelo (Fig. 7.31).

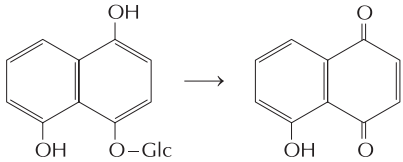


Figura 7.31. Estructura de la juglona, toxina alelopática del nogal (derecha).

Las plantas desérticas viven en un ambiente donde la competición por la escasa agua es vital para la supervivencia. Por tanto han desarrollado mecanismos alelopáticos basados en la producción de metoxibenzaldehídos o ácido cinámico. En el caso

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de los climas secos o subdesérticos, las plantas también muestran alelopatías, en esta caso debidas a terpenos volátiles (pineno, alcanfor).

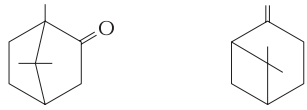


Figura 7.32. Toxinas alelopáticas del chaparral. Alcanfor (izquierda); β-pineno (derecha).

En el chaparral se produce una sucesión ecológica cada 25 años en la que el fuego destruye la vegetación y se consumen los terpenoides. Una vez cesa el fuego, se produce la germinación de semillas de plantas herbáceas y varios años después crecen arbustos que producen terpenoides, reapareciendo la alelopatía y el patrón de distribución de plantas hacia la segunda década.

Otras sustancias alelopáticas de climas secos son compuestos fenólicos solubles en agua, que pueden llegar al suelo como consecuencia del lavado que producen las nieblas costeras. Entre estas toxinas están la hidroquinona, los ácidos hidroxibenzoicos (salicilato, protocatecuato, vanillato) y los hidroxicinamatos (Fig. 7.33).

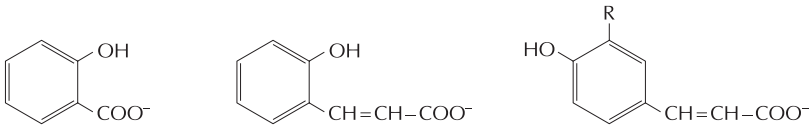


Figura 7.33. Toxinas alelopáticas solubles. Salicilato (izquierda); o-cumarato (centro); p-hidroxi-cinamato (R=H), ferulato (R=O–CH_3) (derecha).

Es evidente que las toxinas alelopáticas tienen un indudable interés biotecnológico en sustitución de los agentes químicos con actividad herbicida. Por lo que respecta a las plantas parásitas (*Viscum*, *Cuscuta*, *Orobanche*, *Striga*), la interacción parásito-huésped está basada en la producción de estimulantes de la germinación, como el estrigol, que actúan a concentraciones micromolares, y de inductores de la formación de haustorios (xenognisina), en un proceso paralelo al que se produce en la infección *Rhizobium*-leguminosa (capítulo 6), donde los agentes inductores son flavonas.

7.5. Interacciones entre plantas y patógenos

Entre las 100.000 especies conocidas de hongos, unas 2.000 son patógenos de plantas. Entre ellas, las especies de *Pythium* y *Botrytis* infectan a más de un millar de especies de plantas superiores, mientras que otros hongos producen toxinas selectivas (HC) contra unas cuantas especies. En cuanto a las bacterias fitopatógenas, la mayoría son Gram negativas de los géneros *Pseudomonas*, *Xhantomonas* y *Erwinia*, que causan daños mediante la secreción de toxinas exopolisacarídicas (EPS). Un tercer agente

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

patógeno, los virus DNA y RNA, infectan gran número de plantas, muchas de ellas de gran importancia económica. En cuarto lugar, algunos animales (nematodos) son patógenos de las plantas a las que primero inyectan sustancias que interfieren la maquinaria bioquímica celular a la que modifican y de la que extraen nutrientes mediante un tubo alimenticio (Fig. 7.34).

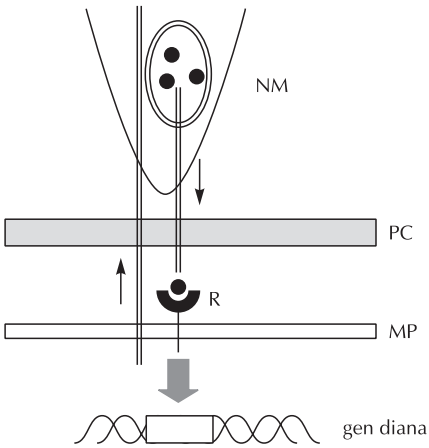


Figura 7.34. Infección de una planta por nematodos. PC (pared celular); MP (membrana plasmática); R (Receptor); NM (nematodo). Las flechas indican la inyección de señalizadores bioquímicos (círculos negros) y la absorción de nutrientes. El señalizador se fija a un Receptor (R) y se modifica la expresión génica de la célula parasitada (gen diana).

Las interacciones planta-patógeno tienen una base genética: la resistencia se produce cuando la planta posee un gen de resistencia (*r*) y el patógeno un gen de avirulencia (*avr*). Se han aislado unos 30 genes *avr* a partir de plantas infectadas con especies de *Pseudomonas* y *Xhantomonas*. Las proteínas Avr son solubles e hidrofílicas y desencadenan dos tipos de señales: una basada en siringólidos producidos por enzimas codificadas por el gen *avrD* (*Pseudomonas syringae*) en plantas que posean el correspondiente gen de resistencia (*rpg4*) y otra basada en la propia proteína Avr.

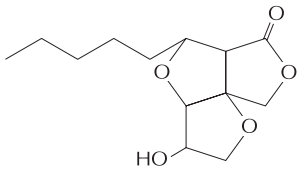


Figura 7.35. Siringólido producido por el patógeno *Pseudomonas syringae* var. *Glycinea*.

En el caso de patógenos productores de toxinas, la resistencia procede de un mecanismo enzimático destoxificante.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los genes de resistencia se han aislado a partir de angiospermas y producen resistencia contra varios patógenos no relacionados taxonómicamente. Las correspondientes proteínas de resistencia poseen dominios repetidos ricos en leucina (LRR), propios de proteínas transductoras de señales, excepto la proteína Pto, que es una serina/treonina kinasa citosólica (S/TK). El resto poseen dominios de unión a nucleótidos y dominios TIR (Toll/Interleukin Resistance de insectos o mamíferos) o dominios LZ (cremallera de leucinas) y son proteínas citosólicas, o bien son proteínas transmembranales con el dominio LRR en el exterior con o sin dominio S/TK citosólico. Algunas proteínas de plantas transductoras de señales poseen la estructura LRR_{EX}-S/TK_{CIT}, como las proteínas Erecta o Clavata1 de *Arabidopsis*, que controlan la floración. Otras proteínas de tipo LRR (Prf) controlan la respuesta a insecticidas que, como el fention provocan muerte celular. La presencia del dominio TIR en plantas, insectos y mamíferos sugiere un origen común de los mecanismos de inmunidad antipatogénica.

Una proteína de resistencia completamente diferente es la codificada por el gen *mlo* de cebada, cuyo producto de 60 kDa posee 7 hélices transmembranales y podría ser un receptor acoplado a proteínas G.

El mecanismo de acción de las proteínas de resistencia en plantas puede ser variado. La Pto kinasa del tomate confiere resistencia a las estirpes de *Pseudomonas* que expresen la proteína AvrPto, inyectada en el citoplasma de la célula vegetal. La Pto interacciona con AvrPto y activa por fosforilación una serie de factores de transcripción (Pti) que modifican la expresión de genes de resistencia. Por su parte, las proteínas LRR podrían inducir la expresión de genes de resistencia mediante su unión por el dominio LRR extracelular a los factores Avr-9 fúngicos, que activaría la serina/treonina kinasa intracelular.

Las reacciones defensivas planta-patógeno implican, además de los genes de resistencia, otras armas de naturaleza bioquímica como canales iónicos, fosforilación de proteínas, activación de enzimas y generación de metabolitos primarios y secundarios entre los que se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ROS). La NADPH-oxidasa de la membrana plasmática produce radical superóxido O_2^- y la superóxido dismutasa produce H_2O_2, compuesto oxidante que se sitúa en el centro de una respuesta bioquímica combinada al patógeno:

a) Ataque oxidativo al patógeno, *per se* o, en presencia de Fe^{2+}, a través del radical hidroxilo (OH^-).

b) Reforzamiento de la pared celular por enlaces cruzados entre glicoproteínas y/o por síntesis de lignina.

c) Síntesis de salicilato/benzoato y jasmonato/etileno, mediadores químicos de los mecanismos de defensa.

d) Síntesis de óxido nítrico (NO), que actúa sinergísticamente con las ROS en la defensa.

Otro mecanismo defensivo está basado en la liberación de oligogalacturonatos a partir de la pared celular por las poligalacturonasas del patógeno fúngico. Los oligo-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

galacturonatos se unen a receptores de la membrana plasmática de la célula huésped que activan genes que codifican la síntesis de moléculas defensivas como las fitoalexinas, o enzimas antifúngicas (glucanasa y quitinasa). Las fitoalexinas son un grupo complejo de sustancias lipofílicas, de baja masa molecular, con actividad antimicrobiana, como la camalexina de *Arabidopsis* o el resveratrol de las uvas.

Los patógenos y parásitos de plantas podrían ser controlados mediante ingeniería genética, bien por introducción de genes de resistencia acoplados a la expresión de los correspondientes *avr*. Otra estrategia sería la hiperexpresión de genes defensivos (*prf* del tomate) o el silenciamiento de genes de la planta necesarios para la patogénesis (1 → 3-β glucanasa inducida por el virus del mosaico del tabaco). Una tercera aproximación consiste en la introducción en las plantas de genes que codifiquen toxinas bacterianas (*Bacillus thuringiensis*) que, ingeridas en este caso por el parásito provocarían su muerte al ser perforadas las membranas de las células intestinales. Una alternativa la constituye el uso de virus transgénicos inocuos portadores de toxinas de arácnidos (escorpión), que se esparcen en las hojas y liberan su carga letal al ser ingeridos junto con el alimento vegetal.

7.6. Interacciones entre microorganismos

7.6.1. Sintrofia

Para que los procesos biodegradativos no se detengan se necesita mantener un estado suficientemente oxidado de las coenzimas rédox.

En aerobiosis, el O_2 es un sumidero de e^- muy eficaz y la forma oxidada de las coenzimas rédox se regenera con facilidad, pero en anaerobiosis este proceso se dificulta porque los aceptores de e^- (piruvato, acetalhehído, nitrato, sulfato) poseen E^o menos positivos que el O_2. En estas condiciones, la reducción de H^+ a H_2 actúa como una válvula de escape del exceso de poder reductor, produciéndose un balance medioambiental entre la producción y el consumo de H_2 por las hidrogenasas de producción y reciclado de H_2 (Fig. 7.36; véase capítulo 4).

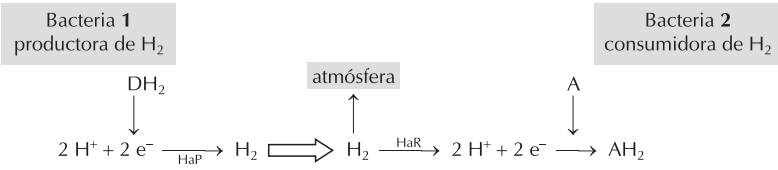


Figura 7.36. Transferencia interespecífica de H_2 mediante hidrogenasas de producción (HaP) y de reciclado (HaR).

La transferencia interespecífica de H_2 tiene lugar en hábitats naturales anaeróbicos, como el rumen, el citoplasma de ciertos protozoos y los sedimentos, porque las hidrogenasas suelen ser sensibles al O_2:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Bacteria A:

$$\text{Azúcar} \longrightarrow 2\ \text{Etanol} + 2\ CO_2\ (\text{fermentación } 1^{\text{aria}}) \qquad \Delta G^{o\prime} = -230\ \text{kJ}$$

Bacteria B:

$$2\ \text{Etanol} + 2\ H_2O \longrightarrow 2\ \text{Acetato} + 4\ H_2\ (\text{fermentación } 2^{\text{aria}}) \qquad \Delta G^{o\prime} = +19{,}2\ \text{kJ}$$

Bacteria C:

$$4\ H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O\ (\text{sintrofia}) \qquad \Delta G^{o\prime} = -131\ \text{kJ}$$

Reacción global:

$$2\ \text{Etanol} + CO_2 \longrightarrow 2\ \text{acetato} + CH_4 \qquad \Delta G^{o\prime} = -111{,}8\ \text{kJ}$$

Mecanismo bioquímico de la sintrofia

La bacteria B produce NADH en la oxidación de etanol a acetato y posteriormente produce H_2 a partir de NADH mediante la hidrogenasa citosólica:

$$NADH + H^+ \longrightarrow NAD^+ + H_2 \qquad \Delta G^{o\prime} = +35\ \text{kJ}$$

Este proceso no tiene lugar *in vivo*, de forma espontánea, a menos que la pH_2 se mantenga suficientemente baja. El cambio de energía libre estándar a pH 7 ($\Delta G^{o\prime}$) de la reacción de reducción de H^+ con NADH como reductor se hace negativo a $pH_2 < 10^{-4}$ atm. (Fig. 7.37).

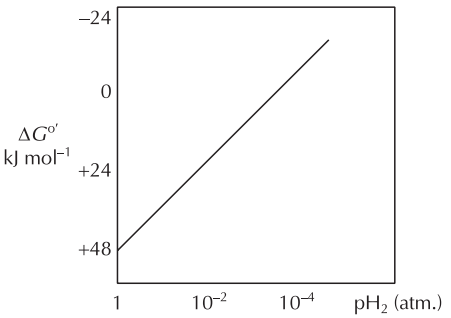


Figura 7.37. Efecto de la pH_2 sobre el $\Delta G^{o\prime}$ de la reacción de la NADH-hidrogenasa.

Sintrofia intracelular

Algunos protozoos ciliados parásitos (*Trichomonas*) poseen hidrogenosomas, orgánulos subcelulares que metabolizan piruvato anaeróbicamente a acetato, CO_2 y H_2. El proceso se desplaza hacia la formación de H_2 porque el citoplasma del protozoo contiene endosimbiontes metanogénicos, eficaces consumidores de H_2 (Fig. 7.38).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

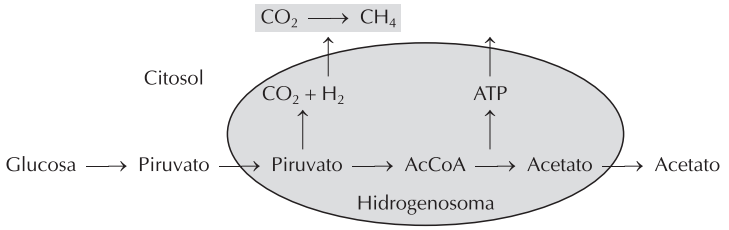


Figura 7.38. Rutas catabólicas y transferencia de H_2 en el hidrogenosoma.

Por último, en los sedimentos, las bacterias anaeróbicas reductoras de SO_4^{2-} (SR) captan el H_2 producido endergónicamente con gran avidez y generan S^{2-} siempre que el aporte de materia orgánica sea suficiente para el suministro de H_2. Además, los reductores de sulfato pueden utilizar el poder reductor suministrado por los metanotrofos anaerobios (capítulo 5).

Otra fuente de poder reductor en estos ambientes de estricta anaerobiosis es el fosfito (HPO_3^-), producido a partir de la descomposición de fosfatos orgánicos (véanse capítulos 3 y 6).

La cadena alimenticia anaeróbica

Consiste en la transferencia de nutrientes en una comunidad de microorganismos, de tal forma que los productos catabólicos de unos son utilizados como fuente de C y/o energía por los otros.

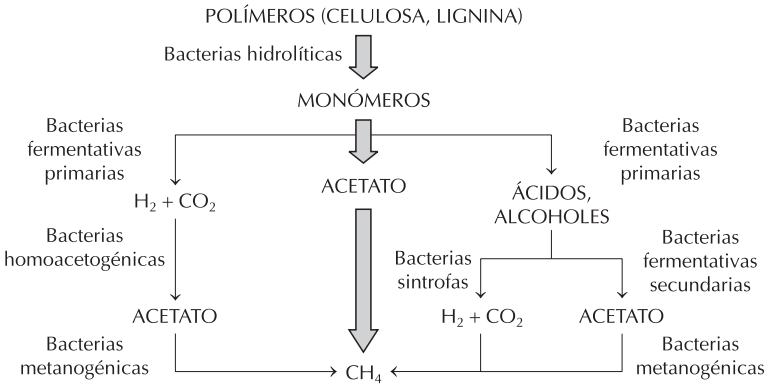


Figura 7.39. Jerarquización de la cadena alimenticia anaeróbica.

El paradigma natural de la cadena alimenticia anaeróbica es el rumen, donde la cadena empieza en los nutrientes de la dieta vegetal y acaba en la producción de metano y CO_2 (capítulo 5).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

7.6.2. Señalización intercelular en las bacterias

Las bacterias poseen mecanismos de comunicación intercelular que las capacitan para un comportamiento multicelular, tal como se ha demostrado en las mixobacterias, los cocos Gram positivos y los vibrios luminiscentes marinos.

El término "detección de quórum" (*quorum sensing, QS*) se refiere a los mecanismos moleculares que utilizan feromonas bacterianas de tipo autoinductor para detectar la densidad poblacional y promover respuestas al aumento de la misma.

Uno de los procesos de QS mejor conocidos a nivel molecular es la bioluminiscencia de *Photobacterium fisheri* (antes *Vibrio fisheri*) que está bajo control de los genes *lux*. Esta bacteria es un endosimbionte de moluscos como *Euprymna scolopes* o peces como *Monocentris japonica*, en cuyo órgano luminiscente especializado se producen densidades de 10^{10}-10^{11} células ml^{-1} (la densidad de *V. fisheri* en el medio marino es miles de millones de veces menor). Al parecer, la luminiscencia produce falsas imágenes que protege a los hospedadores de la predación.

La organización génica de la región *lux* en dos unidades transcripcionales se muestra en la figura 7.40. Los genes *lux* codifican las siguientes proteínas: LuxR, activador transcripcional autoinductor del operón lux; LuxI, sintetasa del mensajero autoinductor; LuxCDE, sintetasa del sustrato de la luciferasa; LuxAB, subunidades de la luciferasa.

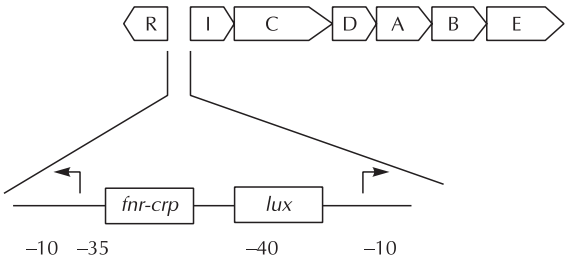


Figura 7.40. Estructura génica de la región *lux* de *P. fisheri*. fnr-crp: cajas reguladoras del tipo *fnr* y *crp*; *lux*: caja reguladora del operón *lux*. Los números se refieren a la posición de las bases del DNA antes del origen de la transcripción a derecha (*lux ICDABEG*) e izquierda (*luxR*); *crp* es una secuencia de unión para el factor de transcripción CRP, regulado por AMPc; *fnr* es una secuencia para la unión del factor de transcripción FNR (Capítulo 4).

El mecanismo molecular de QS por el sistema *lux* de *P. fisheri* se presenta en la figura 7.41. Lux I es una enzima que sintetiza el autoinductor HSL (3-oxo-C6-homoserínlactona) a partir de S-adenosilmetionina y acil-ACP. Cuando la HSL alcanza una concentración suficiente, activa el sistema de luminiscencia uniéndose a la proteína Lux R de la membrana plasmática, promueve su polimerización y su unión al DNA en la zona *lux*. La inducción de los genes de la luciferasa y de la enzima que sintetiza el sustrato aldehídico de ésta es el paso clave en la producción de luz:

$$R-CHO + \text{luciferasa}-FMNH_2 + O_2 \longrightarrow R-COO^- + H_2O + h\nu$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

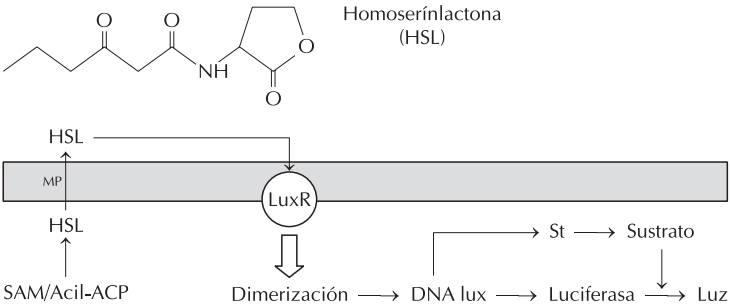


Figura 7.41. Mecanismo molecular de QS en *P. fisheri*. SAM (S-adenosilmetionina); Acil-ACP (ácido graso unido a una proteína portadora); St (sintetasa); HSL (3-oxo-C6-homoserínlactona, arriba).

Por su parte, la concentración de luxR se controla por diversos factores como el choque térmico, la represión catabólica (CRP, Fig. 7.40) y el mismo LuxR, que activa o reprime su síntesis según su concentración.

En el caso de *Vibrio harveyi*, el autoinductor AI-2 contiene borato y se une a la proteína LuxP, que transmite la señal a través de la kinasa sensora LuxQ.

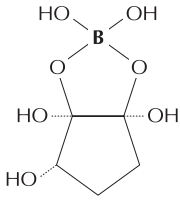


Figura 7.42. Estructura del autoinductor AI-2 de *V. harveyi*.

Otros tipos de QS están relacionados con la virulencia bacteriana, como en el caso la exotoxina citolisina de *Enterobacter faecalis*, autoinductor proteínico cuya síntesis implica un sistema de dos componentes.

Bibliografía

Buchanan, Gruissem, W., R., Jones, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2002). "Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron". *Nature*., 415, 545-549.

Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds.) (1999). *Cell-cell signalling in Bacteria*. ASM Press.

Guerrero, R., Pedrós-Alió, C. (1993). *Trends in Microbial Ecology*. Sixth Interntl. Symp. Microbial Ecol. Spanish Society for Microbiology.

Harborne, J. B. (1988) *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press Ltd, 3ª edición.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

GONZÁLEZ, J. E., MARKETON, M. M. (2003). "Quorum-sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 574-592.

PURVES, W. K., SADAVA, D., ORIANS, G. H., HELLER, H. C. (2001). *Life. The Science of Biology*. W. H. Freeman.

VAN DER BIEZEN, E. A., JONES, J. D. G. (1998). "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept". *Trends Biochem. Sci.*, 23, 454-456.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 8
TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA

Glosario
8.1. Introducción
8.2. Introducción a la cinética enzimática
8.3. Obtención y producción de enzimas
8.4. Inmovilización de enzimas
8.5. Aplicaciones de la tecnología enzimática
8.5.1. Analíticas
8.5.2. Clínicas
8.5.3. Industriales
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Absorbencia: Parámetro adimensional que indica la cantidad de luz absorbida por una solución a una longitud de onda determinada.

Alosterismo: Proceso de regulación de la actividad enzimática que implica la unión de una molécula reguladora o efector, que puede ser positivo o negativo, en un sitio diferente del sitio activo.

Apoenzima: Parte proteica de una enzima, desprovista de su cofactor.

Biorreactores: Conjunto de depósitos e instalaciones donde se realizan las reacciones enzimáticas para las transformaciones de sustancias, generalmente con fines industriales.

Biosensores: Elementos o dispositivos analíticos que permiten la detección y cuantificación de sustancias de interés mediante la conversión de una respuesta biológica, generalmente una reacción enzimática, en una señal eléctrica cuantificable.

Capacidad tampón: Propiedad de una mezcla de un ácido y su base conjugada para mantener relativamente constante el pH de una disolución.

Coenzima: Molécula orgánica pequeña que se une a una enzima y es esencial para su actividad. Generalmente derivan de vitaminas.

Cofactor: Molécula no proteína, ya sea orgánica o inorgánica, que se une a una enzima y es esencial para su actividad.

Constante de asociación (o de afinidad): Parámetro que indica la tendencia a unirse entre sí dos compuestos formando un complejo. Equivale a la concentración del complejo dividido por el producto de las concentraciones de cada uno de los compuestos.

Constante catalítica: Parámetro que define la velocidad de una reacción enzimática.

Constante de Michaelis-Menten: Parámetro que refleja la afinidad de una enzima por su sustrato y que se define como la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima.

Cooperatividad: Efecto por el que un cambio que tiene lugar en una parte o subunidad de una enzima se transfiere a otra parte o subunidad de la misma.

Desnaturalización: Proceso por el que se pierde la conformación nativa de una proteína o enzima y que conlleva a la inactivación de la misma.

Dominio: Parte de una proteína con una estructura y una función definidas.

Energía de activación: Energía necesaria para llevar al estado de transición en una reacción química a un mol de una sustancia a una temperatura dada.

Enzima: Macromolécula, generalmente de naturaleza proteica, que cataliza una reacción específica.

Especificidad: Capacidad de las enzimas para catalizar una reacción química determinada y actuar únicamente sobre uno o varios sustratos específicos.

Estado de transición: Estado de mayor energía que debe alcanzarse en un sustrato o molécula reaccionante para que tenga lugar su transformación en el producto de la reacción.

Extremófilo: Organismo que vive en ambientes con situaciones extremas de temperatura, salinidad, pH, etc., que hacen imposible el desarrollo de la mayoría de los seres vivos.

Fermentación: Proceso por el que tiene lugar la obtención de energía metabólica mediante la degradación de nutrientes sin cambio neto en el estado de oxidación de los productos respecto a los sustratos, y que generalmente transcurre en anaerobiosis.

Fuerza iónica: Parámetro que refleja la concentración total de iones en una solución y la carga estequiométrica de cada uno de ellos.

Grupo prostético: Cofactor de naturaleza no proteica unido covalentemente a la enzima.

Holoenzima: Enzima completa y funcional formada por una parte proteica o apoproteína y una molécula no proteica o cofactor.

Inactivación: Proceso, generalmente irreversible, que conlleva la pérdida de la actividad enzimática debido a la desnaturalización de la proteína o a factores inespecíficos.

Inhibición: Proceso por el que se pierde la actividad de una enzima y que generalmente se produce por la unión reversible o irreversible de un compuesto inhibidor.

Inhibidor: Sustancia que se une a una enzima, ya sea de forma reversible o irreversible, impidiendo o disminuyendo la actividad de la misma.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Inhibidor acompetitivo (o incompetitivo): Sustancia que se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato inhibiendo la actividad enzimática. Disminuye tanto la K_M de la enzima por el sustrato como la V_{max}.

Inhibidor competitivo: Sustancia análoga al sustrato que se une reversiblemente al sitio activo de la enzima inhibiendo su actividad. Aumenta la K_M de la enzima por el sustrato sin afectar a la V_{max}.

Inhibidor no competitivo: Sustancia que se une reversiblemente a la enzima o al complejo enzima-sustrato inhibiendo la actividad enzimática. Si es un inhibidor no competitivo puro, disminuye la V_{max} sin afectar a la K_M de la enzima por el sustrato.

Inhibidor suicida o irreversible: Sustancia que se une irreversiblemente a una enzima provocando la pérdida de su actividad enzimática.

Inmovilización: Proceso por el que se retiene o fija una enzima en un soporte insoluble para evitar la pérdida de la misma por dilución.

Isoenzimas: Diferentes formas de una misma enzima que catalizan una misma reacción.

Ligando: Molécula pequeña que se une a una proteína o enzima.

Liposomas: Estructuras formadas por una membrana lipídica que envuelve una o varias proteínas solubles.

Número de recambio: Número de moléculas de sustrato que se transforman en producto por molécula de enzima y por unidad de tiempo (segundo) en una reacción enzimática. También se denomina actividad molar de la enzima.

Producto: Sustancia que se forma en una reacción enzimática a partir de un sustrato o reactivo.

Punto isoeléctrico: Valor de pH al cual la carga neta de una molécula es cero.

Saturación: Proceso enzimático que transcurre a velocidad máxima y que no depende de la concentración de sustrato porque toda la cantidad de enzima existente se encuentra en forma del complejo enzima-sustrato.

Sitio activo: Sitio de una enzima donde se une el sustrato y se produce su transformación en el producto de la reacción.

Subunidad: Cada una de las cadenas polipeptídicas que pueden formar parte de una proteína.

Sustrato: Reactivo o sustancia que se transforma en otra mediante una reacción enzimática.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

8.1. Introducción

La tecnología enzimática consiste en la obtención, manipulación y modificación de enzimas para su aplicación y utilización con fines industriales, clínicos o analíticos. Aunque el hombre se ha beneficiado de las enzimas en múltiples procesos fermentativos desde tiempos muy antiguos, como la fabricación de pan, queso, productos lácteos y bebidas alcohólicas como vino y cerveza, el comienzo de la tecnología enzimática puede situarse en 1913, cuando el químico alemán Otto Röhm patentó el primer detergente que contenía enzimas digestivas pancreáticas. Sin embargo, hasta la década de 1960 no se utilizaron a gran escala las enzimas en los procesos industriales. En los últimos años, las aplicaciones industriales de estos catalizadores biológicos han experimentado un enorme desarrollo y han convertido a la tecnología enzimática no sólo en la solución de muchos problemas sanitarios y medioambientales del mundo industrializado, sino también en un magnífico negocio. Como muestra de este hecho, baste sólo mencionar que en 1999 el mercado mundial de enzimas superó los 1.500 millones de Euros, o que una única empresa, Novozymes, la división comercial de Novo Nordisk A/S (Copenhague, Dinamarca) destinada exclusivamente a la obtención y comercialización de enzimas y actualmente el mayor productor mundial de enzimas industriales, tuvo un volumen de ventas superior a los 710 millones de Euros en el año 2001.

El éxito de la tecnología enzimática se debe a las propias características que definen a las enzimas:

a) Son catalizadores biológicos, es decir, proteínas producidas por los seres vivos que aceleran las reacciones químicas y no se consumen durante el proceso.
b) Son altamente eficaces y específicas, ya que poseen gran poder catalítico y un elevado rendimiento, no forman subproductos indeseados y tienen la capacidad de reconocer a su sustrato, incluso entre sus isómeros.
c) Funcionan en condiciones suaves, a presión atmosférica, temperatura ambiente y pH neutro.
d) Actúan tanto dentro como fuera de las células que las producen, por lo que pueden utilizarse *in vitro* para fines analíticos, sanitarios o industriales.
e) Están sometidas a regulación, por lo que los procesos enzimáticos se pueden controlar fácilmente.

Por todas estas razones, se puede afirmar que las enzimas forman parte de un medio ambiente sostenible, ya que son sustancias naturales biodegradables, su utilización no requiere equipos resistentes a presión, calor o corrosión, ahorrando dinero y energía, pueden sustituir o reducir la utilización de sustancias químicas contaminantes en distintos tipos de industrias y se producen ecológicamente a partir de organismos vivos, generalmente microorganismos que se cultivan en fermentadores con materias primas renovables y cuya biomasa puede utilizarse posteriormente como fertilizantes o para la producción de energía. Además, las modernas técnicas de Biología Molecular permiten mejorar los procesos de producción y desarrollar nuevas enzimas y nuevos campos de aplicación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM), las enzimas se clasifican en seis grupos en función del tipo de reacción que catalizan, y en prácticamente todos ellos existen enzimas que son utilizadas actualmente en procesos industriales (Tabla 8.1). Con diferencia, las enzimas más utilizadas en la industria son las hidrolasas, mientras que en el otro extremo se encuentran las ligasas, que no son empleadas en ningún proceso industrial, aunque también poseen grandes posibilidades biotecnológicas y se utilizan en laboratorios de investigación con diferentes propósitos, como es el caso de la DNA ligasa que se utiliza en la clonación de genes y la tecnología del DNA. Los productos enzimáticos producidos por las diferentes empresas biotecnológicas están protegidos por patentes que cubren a las propias enzimas, a los procesos de producción y a sus aplicaciones.

Tabla 8.1. Clasificación de las enzimas y ejemplos de enzimas utilizadas en procesos industriales.

Clase de enzima	Tipo de reacción catalizada	Tipos de enzimas representativas	Enzimas industriales representativas
1. Oxidorreductasas	Transferencia de electrones, iones hidruro o átomos de hidrógeno $A + BH_2 \rightleftarrows AH_2 + B$	Deshidrogenasas Oxidasas Reductasas Peroxidasas	Catalasas Peroxidasas Glucosa oxidasas
2. Transferasas	Transferencia de grupos orgánicos funcionales $AX + C \rightleftarrows A + CX$	Metiltransferasas Aciltransferasas Aminotransferasas Fosfotransferasas	Fructosiltransferasas Glucosiltransferasas
3. Hidrolasas	Hidrólisis (reacciones de rotura de enlaces con incorporación de agua) $AX + H_2O \rightleftarrows AH + XOH$	Esterasas Peptidasas Fosfatasas Glucosidasas	Amilasas Celulasas Lipasas Pectinasas Proteasas
4. Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos. Rotura de enlaces sin incorporación de agua $XY + C{=}C \rightleftarrows CX{-}CY$ $XY \rightleftarrows X + Y$	Descarboxilasas Aldolasas Desaminasas Sintasas	Pectato liasas α-acetolactato descarboxilasa
5. Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas para formar isómeros (reorganizaciones moleculares) $A \rightleftarrows B$	Isomerasas Racemasas Epimerasas Mutasas	Glucosa isomerasa
6. Ligasas	Formación de enlaces en reacciones de condensación acopladas a la rotura del ATP u otra fuente energética $X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	Ligasas Sintetasas Carboxilasas	No utilizadas actualmente en procesos industriales

8.2. Introducción a la cinética enzimática

Las enzimas son proteínas que actúan como verdaderos catalizadores, acelerando la velocidad de las reacciones específicas para cada una de ellas. Estas reacciones no tendrían lugar, o transcurrirían muy lentamente, en ausencia de enzima. Algunas enzimas requieren para su actividad la presencia de un cofactor de naturaleza no proteica,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que puede ser inorgánico (por ejemplo, iones metálicos como el Ni^{2+} de la ureasa o el Zn^{2+} de la alcohol deshidrogenasa) o compuestos orgánicos denominados coenzimas, que suelen ser productos derivados de vitaminas hidrosolubles (por ejemplo, la riboflavina o vitamina B_2 es precursora de los flavonucleótidos FAD y FMN presentes en muchas enzimas que median reacciones de transferencia de electrones, mientras que de la vitamina B_6 o piridoxina deriva el fosfato de piridoxal, la coenzima necesaria para las reacciones de transferencia de grupos amino catalizadas por las aminotransferasas). Cuando estos cofactores se encuentran unidos covalentemente a las proteínas se denominan grupos prostéticos.

Existen dos formas de aumentar la velocidad de una reacción química: incrementar la temperatura para favorecer la movilidad de las moléculas y aumentar la proporción de éstas con suficiente energía interna para alcanzar el denominado estado de transición a partir del cual sería favorable la transformación del reactivo o sustrato, o añadir un catalizador que disminuya la energía de activación, que es la cantidad de energía requerida para llevar un mol de una sustancia a una temperatura dada al estado de transición. Esta última es la estrategia seguida por las enzimas, que actúan en las células a una temperatura constante. Como catalizadores biológicos, las enzimas no desaparecen durante el transcurso de las reacciones que aceleran, y no afectan ni a la constante de equilibrio ni a los parámetros termodinámicos, como el cambio de energía libre de la reacción. Es decir, una enzima aumenta la velocidad de un proceso porque permite que el equilibrio químico se alcance más rápidamente al disminuir la energía de activación, pero sin alterar dicho equilibrio.

En general, las enzimas suelen presentar una gran especificidad, pudiendo reconocer a su sustrato incluso entre sus isómeros geométricos u ópticos, gracias a que poseen en su estructura tridimensional o conformación nativa un sitio o centro activo para la unión del sustrato merced a la interacción específica entre los grupos funcionales de éste y los grupos de la enzima implicados en la unión y en la catálisis. Así, la unión de la enzima (E) a su sustrato (S) origina un complejo enzima-sustrato (ES) que facilita la formación del producto (P) de la reacción:

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

En un proceso bioquímico, la enzima se une a uno o más sustratos, que quedan en la posición y orientación adecuadas en el sitio activo para establecer las interacciones necesarias con los restos de aminoácidos de la enzima que participan en la catálisis, lo que permite alcanzar el estado de transición en el complejo ES. De hecho, el sitio activo de la enzima es complementario al estado de transición más que al propio sustrato, de tal forma que las interacciones óptimas entre S y E sólo pueden establecerse tras la activación del sustrato para dar lugar al estado de transición (Fig. 8.1).

Las enzimas presentan el fenómeno denominado saturación por el sustrato, que consiste en que la velocidad de la reacción aumenta en función de la concentración de sustrato sólo cuando ésta es relativamente baja, pero la velocidad se hace independiente de la concentración de sustrato cuando éste se encuentra en concentraciones elevadas, siendo entonces la reacción de orden cero (Fig. 8.2).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

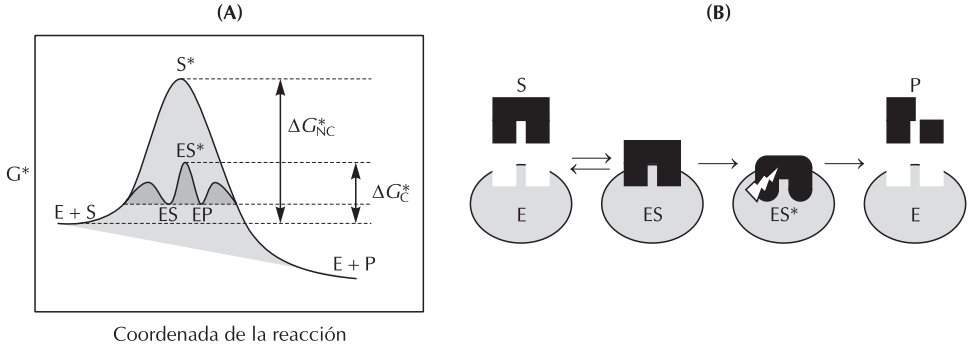


Figura 8.1. Mecanismo de la acción enzimática. (A) Efecto del catalizador sobre la energía de activación (G*) NC (no catalizada); C (catalizada). (B) Interacción enzima sustrato.

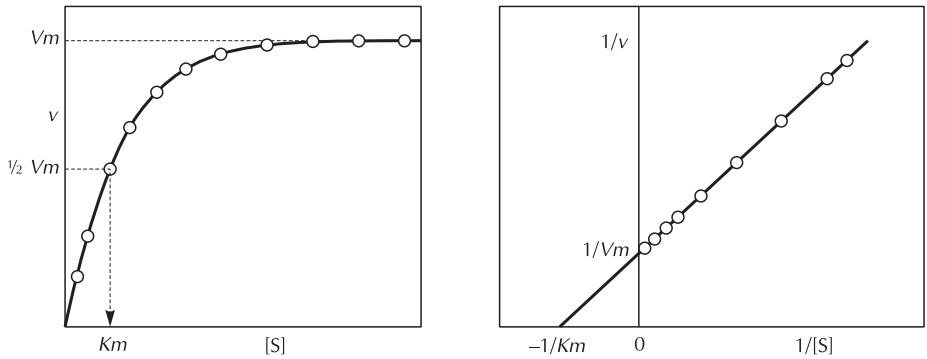


Figura 8.2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.

En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron una ecuación matemática que explicaba el comportamiento de saturación. Para ello, propusieron que lo fundamental en la catálisis enzimática es la formación rápida y reversible del complejo enzima-sustrato ES, que después se destruye mucho más lentamente para dar el producto y la enzima libre. A concentración de sustrato elevada, toda la enzima está como complejo ES y la etapa limitante es la formación del producto, por lo que la velocidad del proceso global es insensible a incrementos en la concentración de sustrato, dependiendo sólo de la cantidad de ES:

$$\mathrm{E + S} \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow[\text{lento}]{K_2} \mathrm{E + P}$$

Por lo tanto, la velocidad global del proceso catalítico será:

$$v = \frac{d[\mathrm{P}]}{\mathrm{dt}} = k_2\,[\mathrm{ES}] = k_{cat}\,[\mathrm{ES}]$$

siendo $k_2 = k_{\mathrm{cat}}$ la denominada constante catalítica. A partir de estas consideraciones, y asumiendo la denominada hipótesis del estado estacionario, una generalización

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

propuesta en 1925 por G. E. Briggs y J. B. S. Haldane que afirma que la concentración de ES alcanza rápidamente un valor que permanece constante con el tiempo porque dicho complejo se forma a la misma velocidad que se destruye, es decir, que en el estado estacionario $d[ES]/dt = 0$, se obtiene la denominada ecuación de Michaelis-Menten que expresa la relación existente entre la velocidad inicial del proceso (v_0) a una concentración de sustrato determinada con dicha [S] y con la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción enzimática:

$$v_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

La K_m o constante de Michaelis-Menten de la enzima para su sustrato se puede definir como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la máxima (Fig. 8.2). La K_m se mide en unidades de concentración y varía ampliamente con la enzima, con la naturaleza del sustrato y con las condiciones de pH y temperatura. La K_m se puede considerar como una medida de la afinidad de una enzima por su sustrato, ya que si la constante es baja se requiere poca cantidad de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima y por ello la afinidad de la enzima por su sustrato es elevada, y viceversa. Por lo tanto, si una enzima tiene un valor pequeño de K_m consigue una gran eficacia catalítica a bajas concentraciones de sustrato. Sin embargo, la verdadera eficacia se mide no sólo por la K_m sino por la relación V_{max}/K_m, ya que cuanto mayor es esta relación, mayor será la eficacia catalítica de la enzima. Cuando toda la enzima se encuentra en forma de complejo ES, la velocidad de la reacción será la máxima ($V_{max} = k_{cat}$ [E]). Por ello, la razón k_{cat}/K_m es también una medida de la eficacia catalítica de la enzima. Por otra parte, el significado de la constante catalítica k_{cat} es equivalente al denominado número de recambio o actividad molar (o molecular) de la enzima, que se puede definir como el número de moles (o moléculas) de sustrato que se transforman en producto por unidad de tiempo y por mol (o molécula) de enzima, como se deduce de la expresión $k_{cat} = V_{max}/[E]$. Cuando se ensaya o determina una actividad enzimática *in vitro* se debe hacer en condiciones de velocidad máxima, y por ello a una concentración de sustrato al menos 10 veces superior a la K_m, lo que equivale a más del 91% de la velocidad máxima.

La ecuación de Michaelis-Menten corresponde a la hipérbola rectangular que se obtiene cuando se representa la velocidad inicial de la reacción frente a la concentración de sustrato, y que define el comportamiento de saturación descrito anteriormente. Esta ecuación se puede transformar en la ecuación de una recta, lo que permite calcular fácilmente los valores experimentales de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}. Existen tres transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten conocidas como transformaciones de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Wolf, aunque la más utilizada es la de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos, ya que relaciona el inverso de la velocidad con el inverso de la concentración de sustrato según la ecuación lineal:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m}{V_{max}}\,\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Representando en el eje de ordenadas $1/v_0$ y en el eje de abscisas 1/[S] se obtiene una recta cuya pendiente es el cociente K_m/V_{max}. Extrapolando la recta hasta los ejes, el punto de corte en ordenadas es $1/V_{max}$ y el punto de intersección en el eje de abscisas en $-1/K_m$ (Fig. 8.2).

La enzimas pueden perder su actividad por diversas causas. Se suele denominar inactivación a la pérdida de la actividad enzimática por desnaturalización de la proteína o por el efecto de factores inespecíficos, como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc., e inhibición a la disminución de la velocidad ocasionada por la unión a la enzima de una sustancia específica, que se denomina inhibidor (I). Aunque existen inhibidores que se unen a las enzimas de forma irreversible, la inhibición suele ser reversible y desaparece cuando la enzima se separa del inhibidor. Existen tres tipos de inhibición reversible: competitiva, no competitiva y acompetitiva o incompetitiva (Fig. 8.3).

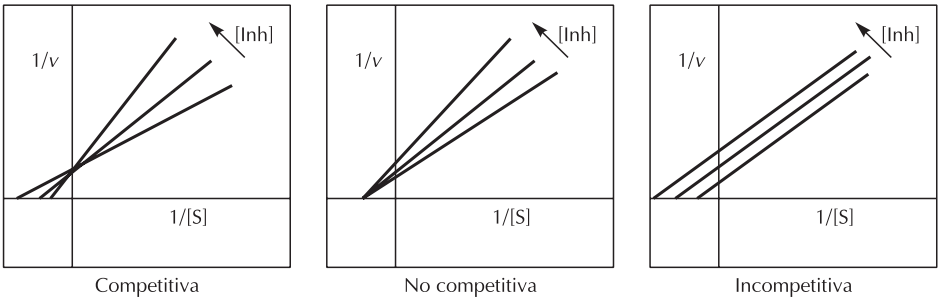


Figura 8.3. Tipos de inhibición enzimática.

En la inhibición competitiva, el inhibidor es un análogo estructural del sustrato que se une al mismo sitio activo, por lo que se produce una competencia entre I y S por dicho sitio activo y la inhibición se puede contrarrestar añadiendo más sustrato. La presencia de un inhibidor competitivo no modifica la V_{max} (ni la constante catalítica k_{cat} o el número de recambio de la enzima), pero sí se afecta a la K_m de la enzima para su sustrato, que aumenta en presencia del inhibidor.

En la inhibición no competitiva, el inhibidor no es un análogo del sustrato y se une a la enzima en un sitio diferente del sitio activo, por lo que puede unirse tanto a la enzima libre E, para formar el complejo EI, como a la enzima unida al sustrato, para formar el complejo ESI. Se trata de un tipo de inhibición más compleja, que no revierte al añadir más sustrato y que disminuye la V_{max} de la reacción, es decir, afecta a la k_{cat} de la enzima, pero puede o no modificar la K_m de la enzima para su sustrato según difieran o no en afinidad por el inhibidor la enzima libre E y el complejo ES. Así, en la inhibición no competitiva pura, E y ES tienen la misma afinidad por el inhibidor I y la K_m de la enzima por su sustrato no se afecta por la presencia del inhibidor, pero en la inhibición no competitiva mixta E y ES no presentan la misma afinidad por I y la K_m de la enzima para el sustrato aumenta (si E tiene más afinidad por I que ES) o disminuye (si E tiene menos afinidad por I que ES).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la inhibición acompetitiva o incompetitiva, el inhibidor se une a la enzima en un sitio diferente del sitio activo para el sustrato pero requiere la presencia del sustrato para ejercer la inhibición, ya que sólo se une al complejo enzima-sustrato ES y no a la enzima libre E, es decir, no se forma el complejo EI sino sólo el ESI. Los inhibidores incompetitivos disminuyen tanto la V_{max} como la K_m de la enzima para su sustrato.

Estos tres tipos de inhibición se pueden distinguir fácilmente mediante las representaciones de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos, ya que para distintas concentraciones de inhibidor se obtienen rectas convergentes que se cortan en el eje de ordenadas en el caso de la inhibición competitiva; rectas convergentes que se cortan en el eje de abscisas en la inhibición no competitiva pura (en el caso de inhibición no competitiva mixta las rectas se cortan por encima o por debajo del eje de abscisas, pero siempre a la izquierda del eje de ordenadas), o rectas paralelas en la inhibición incompetitiva (Fig. 8.3).

Por otra parte, la actividad enzimática se afecta también por factores ambientales como la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio. La mayoría de las enzimas presentan una temperatura óptima que coincide con la temperatura habitual de la célula, entre 25 y 35 °C, y un pH óptimo cercano a la neutralidad, entre 6 y 8, aunque las enzimas de los organismos termófilos pueden presentar temperaturas óptimas superiores a los 70 °C y algunas enzimas muestran un pH óptimo muy ácido o alcalino.

8.3. Obtención y producción de enzimas

La aplicación de la tecnología enzimática implica la adición de ciertas enzimas durante los procesos industriales, para lo que hay que disponer del material enzimático correspondiente en estado relativamente puro. Para la obtención de enzimas a gran escala, es de gran importancia seleccionar el organismo adecuado (bacteria, hongo, planta, animal, etc.) y el órgano, tejido o tipo celular apropiado que sea capaz de sintetizar una gran cantidad de la enzima deseada. Normalmente se utilizan microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), ya que son una fuente apropiada de la mayoría de las enzimas industriales y son fáciles de manipular y de cultivar en grandes fermentadores industriales. De hecho, la mayoría de las enzimas industriales se obtienen actualmente de especies de *Bacillus*, un tipo de bacteria Gram positiva, y *Aspergillus*, un hongo filamentoso, mientras que sólo un 8% de las enzimas industriales son de origen animal y un 4% proceden de plantas. En ocasiones es de gran interés la obtención de enzimas a partir de organismos extremófilos, en particular los termófilos, que crecen a temperaturas superiores a los 70 °C, y los halófilos, que requieren más de 0,5 M de sal para su crecimiento, porque sus enzimas son mucho más resistentes a la desnaturalización en dichas condiciones extremas de temperatura o salinidad elevadas.

Generalmente, los organismos sintetizan sus enzimas en pequeñas cantidades, por lo que en muchas ocasiones se recurre a utilizar como material de partida organismos mutantes seleccionados por su capacidad de producir en gran cantidad (superproducir) la enzima deseada. Tradicionalmente se han empleado las técnicas de mutación

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

con radiaciones o mutágenos químicos y posterior selección de las estirpes más productoras, pero la eficiencia de estas técnicas es limitada ya que las mutaciones se producen al azar. Las modernas técnicas de clonación y manipulación genética (ver capítulo 9) han permitido un avance espectacular en este campo, y actualmente no sólo es posible incrementar la producción de la enzima deseada mediante la hiperexpresión del gen que la codifica, sino que también es posible modificar la enzima mediante mutagénesis dirigida para aumentar su estabilidad o su actividad, variar su especificidad de sustrato o disminuir su dependencia de cofactores (Fig. 8.4).

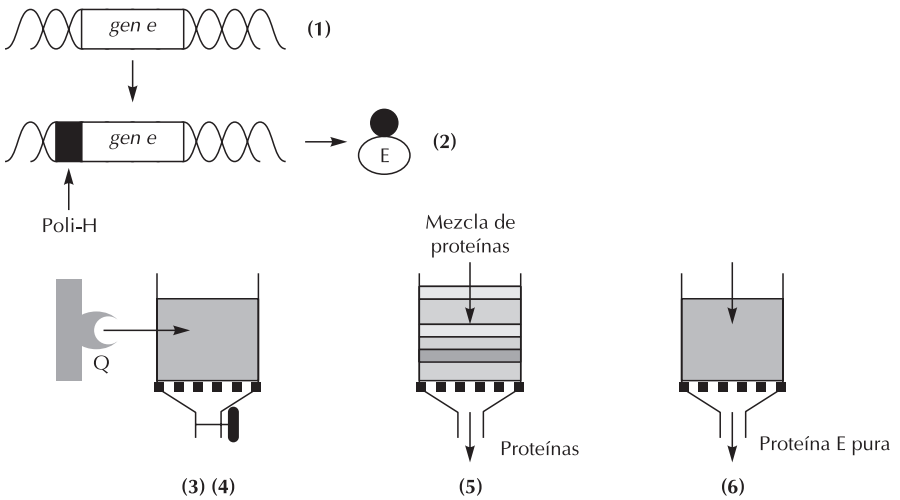


Figura 8.4. Purificación de enzimas mediante manipulación génica y cromatografía de afinidad. (1) Se aisla y se modifica el gen de la proteína E, que se pretende purificar (p.e., mediante una secuencia de poli-His). (2) Se expresa el gen recombinante en una bacteria apropiada. (3) Se prepara un soporte gelificado con un grupo químico (Q) que se una a la proteína recombinante ER. (4) Se cultiva la bacteria recombinante de forma que se exprese la proteína ER. (5) Se aplica un extracto acelular de la bacteria a la columna: la proteína recombinante se une al gel y las demás no. (6) Se aplica una solución que contenga un compuesto químico o ion que desplace a la proteína del gel.

A partir de un cultivo de un microorganismo se puede obtener la enzima deseada por los métodos tradicionales de purificación de proteínas, aunque la producción a gran escala a veces conlleva ciertos problemas adicionales. En general, la producción industrial de enzimas requiere tres pasos: la fermentación o cultivo a gran escala del microorganismo productor de la enzima deseada, la recuperación del producto mediante la extracción y purificación de la enzima, y la formulación o preparación del producto enzimático en polvo, granulados o disoluciones.

El proceso de cultivo del microorganismo tiene lugar en grandes tanques denominados fermentadores, con volúmenes de hasta 1.000 m^3, y generalmente aeróbicos, con sistemas de aireación para mantener una concentración de oxígeno adecuada para el crecimiento del organismo. Los medios de cultivo utilizados suelen contener sales inorgánicas y materias primas renovables, a veces procedentes de residuos de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

las industrias azucareras y alimentarias, como melazas, almidón, granos de soja, productos solubles de destilerías, etc. Dado que las empresas productoras buscan el máximo rendimiento y los menores costes de producción, generalmente se busca que la enzima sea sintetizada constitutivamente por el microorganismo y, a ser posible, que sea segregada al medio extracelular, ya que la purificación de las enzimas extracelulares es mucho más fácil que el aislamiento de las enzimas intracelulares y no se requieren métodos de lisis o ruptura de los microorganismos. La purificación de la enzima requiere técnicas y tratamientos bioquímicos y suele realizarse en varios pasos combinando la centrifugación y ultracentrifugación, la precipitación de las proteínas con sales o calor, la separación en columnas mediante cromatografías de exclusión molecular, de intercambio iónico o de afinidad, o la separación en geles de electroforesis. Lo ideal es poder purificar la enzima con un alto rendimiento empleando el menor número de pasos posibles. Una vez purificada, la enzima debe ser concentrada y preparada para mantener su actividad durante el almacenamiento y hasta su uso final. La formulación del producto debe favorecer la estabilidad y la actividad de la enzima, evitando la agregación y la desnaturalización de la proteína. Para ello se pueden añadir aditivos o se procede a la modificación covalente o la inmovilización de la enzima. En general, las proteínas se estabilizan aumentando ligeramente la fuerza iónica del medio, por lo que se suele añadir sulfato amónico u otras sales estabilizantes. También es frecuente el uso de polialcoholes de bajo peso molecular, como glicerol, sorbitol o manitol, para estabilizar las enzimas, evitar el crecimiento de microbios contaminantes y proteger de la desnaturalización a temperaturas inferiores a 0 °C, de agentes protectores de los grupos tiólicos, como el ditioeritritol (DTE), o de agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), para evitar la inactivación de la enzima por metales pesados. En algunos casos, la degradación proteolítica de la enzima se puede evitar mediante adición de inhibidores de proteasas y en ocasiones se recurre a la modificación química de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos, como la derivatización de los restos de lisina, para aumentar la estabilidad. Las enzimas suelen ser más estables desecadas que en disolución, por lo que también se recurre a la liofilización o a la preparación de granulados.

La modificación de las enzimas existentes también se puede intentar para la fabricación de enzimas artificiales que realicen alguna función nueva que antes no era posible, como, por ejemplo, degradar un sustrato no reconocido por la enzima original mediante la modificación de algún resto del centro activo de la enzima, o que mejoren los procesos que antes realizaban al aumentar la estabilidad enzimática, la afinidad por el sustrato, etc. Para ello se pueden utilizar métodos químicos pero, como ya se ha mencionado, actualmente son de mucha mayor importancia las técnicas de clonación y mutagénesis dirigida de los genes que codifican dichas enzimas, lo que permite la inserción, deleción o sustitución de los aminoácidos deseados en la proteína (ver capítulo 9).

8.4. Inmovilización de enzimas

Como la obtención de las enzimas puede ser cara y a veces difícil, para evitar pérdidas innecesarias del material enzimático se recurre a la inmovilización de las enzi-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

mas en soportes sólidos que permitan su reutilización en los procesos industriales. Esto es posible gracias a que las enzimas son catalizadores y, por lo tanto, no se consumen durante los procesos en los que son utilizadas. La inmovilización consiste en fijar o atrapar la enzima en un material insoluble (gel, membrana, perlas de vidrio, etc.) de forma que no pierda la actividad y permita su recuperación. En otras palabras, se trata de usar un sistema de dos fases fácilmente separables, una que contenga la enzima y se pueda reutilizar o utilizar de forma continua, y otra que contenga al producto. La inmovilización puede realizarse por métodos físicos, como la adsorción de la enzima sobre un soporte insoluble, la retención o atrapado de la enzima en un gel poroso (agarosa, alginato, sílice, etc.) o el confinamiento de la enzima en una membrana que permita el paso del sustrato y evite la pérdida de la enzima, o químicos, mediante la formación de enlaces covalentes entre la enzima y una matriz activada o copolimerizando las moléculas de enzima y soporte. En el proceso de inmovilización es necesario que no se pierda la actividad enzimática, por lo que antes de usar el sistema hay que hacer estudios de estabilidad, concentraciones de sustrato, pH y temperatura óptimos, etc. En la figura 8.5 se muestran los principales métodos de inmovilización de enzimas.

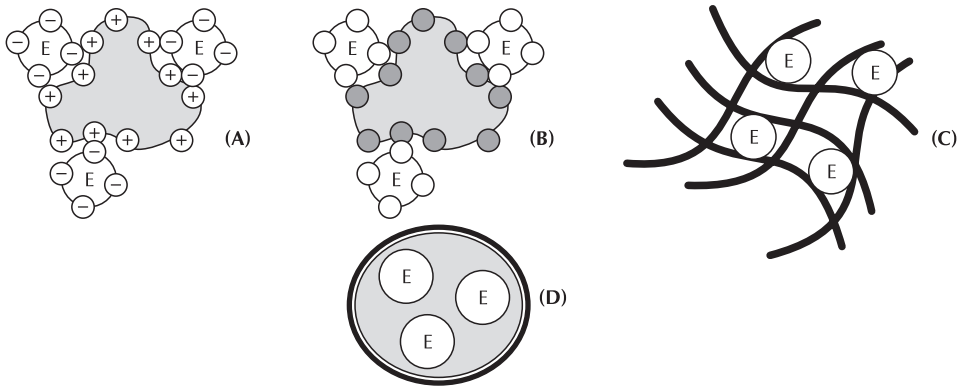


Figura 8.5. Métodos de inmovilización de enzimas. A: adsorción a soporte poroso o sólido; B: unión covalente a soporte poroso o sólido; C: atrapamiento en matriz porosa polimérica; D: confinamiento en membrana semipermeable.

La adsorción no covalente de la enzima en un soporte insoluble es un método rápido y simple de gran aplicabilidad que permite cargar una elevada cantidad de enzima (hasta un gramo de enzima por gramo de matriz), aunque este proceso puede ser reversible y se puede perder una cierta cantidad de enzima. La adsorción se logra simplemente mezclando e incubando durante algún tiempo la enzima con la matriz adsorbente, a pH y fuerza iónica determinados, y lavando posteriormente los restos de enzima libre. Este proceso suele ser debido a una combinación de interacciones hidrofóbicas y salinas y las matrices más empleadas son geles de intercambio iónico (DEAE-Sephadex y CM-Sephadex como intercambiadores aniónico y catiónico, respectivamente), carbón poroso, arcilla, resinas aromáticas poliméricas y perlas de vidrio.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La retención de la enzima en geles o fibras es particularmente útil en procesos que implican sustratos y productos pequeños, dadas las dificultades que tienen las moléculas de masa molecular elevada para difundir por el gel y alcanzar los sitios catalíticos de las moléculas de enzima atrapadas. Con este método también se puede retener hasta un gramo de enzima por gramo de fibra o gel. La retención de la enzima en las fibras puede ser sólo un encajonamiento puramente físico, pero a veces también implica uniones covalentes. Por ejemplo, si los restos de lisina son derivatizados con cloruro de acriloilo ($CH_2=CH-CO-Cl$) se forman acriloilamidas que pueden polimerizar y entrecruzarse con la acrilamida ($CH_2=CH-CO-NH_2$) y la bisacrilamida ($NH_2-CO-CH=CH-CH=CH-CO-NH_2$) para formar un gel. También son muy utilizadas las fibras de acetato de celulosa, la agarosa y el alginato cálcico. Cuando se atrapan microorganismos o células intactas, los geles utilizados principalmente son los de alginato cálcico.

El confinamiento en membrana de las enzimas consiste en colocar la enzima en un lado de una membrana semipermeable mientras que el sustrato, y el producto formado, están presentes en el otro lado. Este confinamiento puede lograrse con distintos tipos de membranas comerciales que presentan una elevada relación superficie/volumen contenido y que son permeables a sustancias de menor tamaño que las enzimas confinadas. Dentro de este tipo de inmovilización también se pueden incluir las enzimas encerradas en liposomas, que son membranas lipídicas formadas alrededor de enzimas solubles. La formación de estos liposomas se logra añadiendo fosfolípidos a la disolución con la preparación enzimática.

La inmovilización de enzimas por unión covalente a matrices insolubles es una técnica muy utilizada, aunque es relativamente cara y sólo permite retener una pequeña cantidad de enzima, del orden de 0,02 a 0,2 gramos de enzima por gramo de matriz. La ventaja de este método es que no se producen pérdidas de enzima durante el proceso ya que la unión entre la enzima y la matriz es muy fuerte. Para los enlaces covalentes se utilizan las cadenas laterales de diversos restos de aminoácidos, siendo los restos de lisina los más utilizados debido a que éstos abundan en la superficie externa de las proteínas, son bastante reactivos y no suelen estar implicados en los sitios catalíticos de las enzimas. En este tipo de inmovilización se suelen usar matrices de Sefarosa, un tipo de agarosa, activadas por bromuro de cianógeno, que reacciona con los grupos hidroxilos del polisacárido para formar un imidocarbonato cíclico muy reactivo con los grupos aminos, como los presentes en los restos de lisina. La activación también se puede lograr con carbodiimidas o con glutaraldehído. En el caso de la inmovilización por enlaces covalentes, es muy importante que no se pierda la actividad enzimática como consecuencia de la unión covalente de la enzima a la matriz, y que el sitio activo de la enzima quede intacto. Esto se puede lograr procediendo a la inmovilización de la enzima en presencia de concentraciones saturantes de sustrato, del producto o de un inhibidor competitivo, lo que evita la formación de enlaces covalentes entre la matriz y los restos implicados en el sitio activo y reduce la uniones en conformaciones no productivas.

En la tabla 8.2 se presenta una comparación de estos cuatro métodos de inmovilización de enzimas y se indican sus ventajas e inconvenientes.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 8.2. Comparación de los principales métodos de inmovilización de enzimas.

Características	Adsorción	Retención	Confinamiento en membrana	Unión covalente
Preparación	Sencilla	Difícil	Sencilla	Difícil
Coste	Bajo	Moderado	Alto	Alto
Intensidad de la unión	Variable	Débil	Fuerte	Fuerte
Pérdida de enzima	Sí	Sí	No	No
Aplicabilidad	Amplia	Amplia	Muy amplia	Selectiva
Efecto de la matriz	Sí	Sí	Sí	No
Barrera de difusión	No	Sí	Sí	No
Protección microbiana	No	Sí	Sí	No
Problemática principal	Pérdidas de enzima	Poca difusión de moléculas grandes	Alto coste	Alto coste y baja carga enzimática

Muchos procesos de producción de sustancias de interés alimentario, clínico o industrial o de biodegradación de contaminantes y depuración de residuos utilizan enzimas específicas, ya sean libres o inmovilizadas, en los denominados reactores enzimáticos, que son los depósitos y las instalaciones donde se realizan las transformaciones deseadas mediante reacciones catalizadas enzimáticamente. Existen distintos tipos de reactores cuya utilidad depende de los procesos considerados, los costes de instalación y funcionamiento, el tipo de enzima utilizada y su forma de presentación (libre o inmovilizada por cualquiera de los métodos descritos anteriormente), y factores ambientales como pH, temperatura, aporte de oxígeno, etc. (Fig. 8.6). Los reactores de flujo discontinuo (batch reactors) consisten en uno o varios tanques en serie

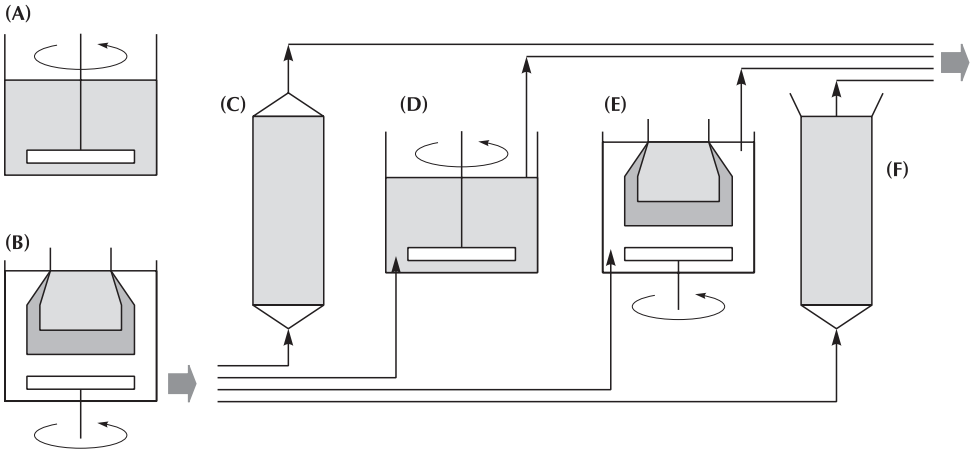


Figura 8.6. Tipos de reactores enzimáticos. A (reactor de flujo discontinuo con enzima libre), B (reactor de flujo discontinuo con enzima confinada), C-F (reactores de flujo continuo).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que contienen la enzima y el sustrato y se mantienen en funcionamiento, generalmente con agitación continua, hasta que se completa la transformación, por lo que el producto es recuperado tras un tiempo determinado. Estos reactores se suelen utilizar con enzimas libres, aunque también se utilizan reactores de flujo discontinuo con enzimas confinadas en membranas, y generalmente presentan mayores costes de funcionamiento que los denominados reactores de flujo continuo (continuous flow reactors), en los que existe un suministro constante de sustrato y una salida continua del producto formado. Los reactores de flujo continuo suelen utilizarse con enzimas inmovilizadas, que pueden estar empaquetadas en una fase sólida (packed bed flow reactor) o mantenerse en un estado fluido (fluidised bed flow reactor) y son empleados en procesos a gran escala, ya que son más productivos y económicos en su funcionamiento, las pérdidas de enzima son menores, la producción es continua y no hay necesidad de vaciarlos y rellenarlos periódicamente. Por el contrario, los reactores de flujo discontinuo suelen utilizarse a escala de laboratorio o piloto. Todos estos tipos de reactores pueden contener dispositivos de agitación o de enfriado o calentamiento para aumentar la eficiencia de los procesos enzimáticos que tienen lugar en ellos.

8.5. Aplicaciones de la tecnología enzimática

8.5.1. Aplicaciones analíticas

Las enzimas pueden emplearse como reactivos analíticos para la determinación cualitativa y cuantitativa de muchas sustancias biológicas. Las dos características exigibles a un buen reactivo analítico son la selectividad y la sensibilidad. Los análisis enzimáticos, como por ejemplo la cuantificación enzimática de glucosa en sangre o en alimentos, o la identificación y cuantificación de contaminantes específicos, suelen ser altamente específicos, eficaces y fiables, dadas las características de las enzimas y pueden realizarse incluso cuando las sustancias a determinar se encuentran en concentraciones muy bajas o en mezclas complejas. Las enzimas son también elementos esenciales de muchos biosensores y herramientas analíticas muy importantes en procesos de seguimiento y cuantificación de contaminantes u otras sustancias de interés. Los biosensores son dispositivos analíticos que convierten una respuesta biológica, como la transformación enzimática de S en P, en una señal eléctrica cuantificable (Fig. 8.7).

La determinación enzimática de un metabolito puede realizarse por dos métodos diferentes: el método cinético y el método de equilibrio. El método cinético se basa en seguir el progreso de la reacción determinando en cada momento la velocidad de la misma, la cual depende de la concentración de sustrato cuando ésta no es saturante. Este método es válido para enzimas que poseen una K_m elevada, aunque ésta se puede incrementar utilizando un inhibidor competitivo. En el método cinético, la reacción debe ser de orden cero o de primer orden. La cinética de orden cero implica que la velocidad del proceso es independiente de la [S], por lo que sólo sirve para determinar la concentración de sustancias que afectan a la reacción, como por ejemplo activadores o inhibidores del proceso, viendo como varía la velocidad en función de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

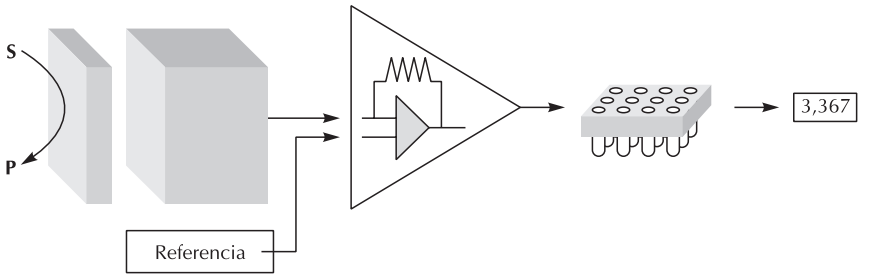


Figura 8.7. Representación esquemática de un biosensor. El analito (S) se hace reaccionar mediante una enzima inmovilizada para dar un producto P, detectado por un transductor que lo transforma en una señal eléctrica que se amplifica, procesa y aparece de forma digital.

la concentración de éstos, pero no permite cuantificar la concentración de los sustratos. La cinética de primer orden permite cuantificar la cantidad de sustrato determinando la velocidad de la reacción, que sí depende de la [S] cuando ésta no es saturante. Para ello es necesario disponer de un calibrado previo que relacione la [S] con la velocidad de la reacción. El método de equilibrio, también conocido como método de cambio total o punto final, consiste en medir la concentración del sustrato o del producto de la reacción enzimática cuando ésta alcanza el equilibrio. Este método es el más simple y el más ampliamente utilizado en los análisis enzimáticos.

En los ensayos simples, la enzima actúa sobre el sustrato S específicamente, aún cuando éste se encuentre en una mezcla compleja, para transformarlo en el producto P, por lo que lo único que se necesita es una técnica que permita la distinción entre S y P. Generalmente se utilizan técnicas espectrofotométricas cuando S absorbe la luz de una longitud de onda determinada y P no (o viceversa), lo que permite cuantificar la desaparición del sustrato o la aparición del producto midiendo el cambio de absorbancia a dicha longitud de onda. Como la ley de Lambert-Beer relaciona la absorbancia con la concentración ($A = \varepsilon\, c\, l$, siendo A la absorbancia, ε el coeficiente de extinción molar propio de cada sustancia, c la concentración y l el paso de luz o distancia que atraviesa la luz por la disolución, generalmente 1 cm que es el diámetro de la cubeta), conocida la variación de la absorbancia podemos calcular fácilmente la concentración de S o de P. Así, el elevado coeficiente de extinción molar de las formas reducidas de los dinucleótidos de piridina (NADH y NADPH) a 340 nm ($\varepsilon_{340} = 6{,}22 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$) y la ausencia de absorción a dicha longitud de onda de las formas oxidadas (NAD^+ y $NADP^+$) permite determinar fácilmente los sustratos o productos de muchas reacciones rédox. Sin embargo, en mucho casos los sustratos o productos de la reacción no absorben directamente la luz de una determinada longitud de onda y se tiene que realizar una reacción indicadora, es decir, una transformación química en presencia de reactivos específicos que produzcan un compuesto coloreado que permita la determinación espetrofotométrica del sustrato o del producto de la reacción.

Cuando los ensayos simples no se pueden emplear porque S y P no son fácilmente distinguibles por técnicas fisicoquímicas, se recurre a ensayos acoplados utilizando

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

una segunda enzima, o incluso varias enzimas adicionales, que vayan transformando los productos formados en otras sustancias que pueden ser fácilmente identificables. Las enzimas necesarias para que se transforme el sustrato que se desea cuantificar en un producto que pueda determinarse son las enzimas auxiliares, y la enzima utilizada en la reacción que permite la cuantificación se denomina enzima indicadora. En estos casos hay que tener en cuenta la estequiometría de las reacciones implicadas y las condiciones óptimas de ensayo para cada enzima. Así, para la determinación de la glucosa podemos utilizar la reacción catalizada por la enzima hexoquinasa (enzima auxiliar), que produce glucosa-6-fosfato, sustancia que en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (enzima indicadora) se convierte en 6-fosfogluconato paralelamente a la reducción de $NADP^+$ (que no absorbe la luz de 340 nm) a NADPH (que absorbe a 340 nm). Como la estequiometría del proceso es 1:1, por cada molécula de glucosa se forma una molécula de NADPH, cuya identificación y cuantificación es posible midiendo la variación de la absorbancia a 340 nm.

$$\text{glucosa} \xrightarrow[\text{ATP} \quad \text{ADP}]{\text{hexoquinasa}} \text{glucosa-6-P} \xrightarrow[\text{NADP}^+ \quad \text{NADPH}]{\text{glucosa-6-P deshidrogenasa}} \text{6-fosfogluconato}$$

Las enzimas marcadas con anticuerpos son también una herramienta muy importante para la identificación y cuantificación de antígenos, que desencadenan respuestas inmunes, o de haptenos, sustancias de masa molecular baja que pueden unirse a los anticuerpos aunque no provoquen una respuesta inmune. Actualmente existe una amplia variedad de técnicas de enzimoinmunoensayo, aunque las dos más utilizadas son las conocidas como ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), en la que se requiere la separación de fases dado que el anticuerpo (o el antígeno) se une a una fase sólida, y EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique), que no precisa de separación de fases. El análisis enzimático es un método analítico muy utilizado actualmente en la investigación, en laboratorios de control de calidad, en los análisis de contaminación, en análisis clínicos y en distintos tipos de industrias, principalmente de alimentación, farmacéutica y de cosméticos.

8.5.2. Aplicaciones clínicas

La utilización de las enzimas en medicina incluye tres aspectos diferentes. En primer lugar se pueden usar las enzimas como reactivos para determinar sustancias de interés médico (glucosa, colesterol, ácido úrico, urea, etc.) en la sangre, orina y otros fluidos corporales. En este caso se habla de bioquímica analítica clínica, o simplemente bioquímica clínica, y se trata básicamente de la aplicación de los métodos analíticos considerados en el apartado anterior para la valoración de sustancias de interés clínico utilizando las enzimas adecuadas.

En segundo lugar, se pueden emplear las enzimas como marcadores del estado celular, es decir, se pueden realizar determinaciones de las actividades enzimáticas en plasma, suero, orina, líquido amniótico, biopsias y otras muestras biológicas para rea-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

lizar un diagnóstico clínico, ya que cada enzima tiene una actividad normal que puede aumentar o disminuir en ciertos estados patológicos. La actividad normal es un intervalo más que un único valor, ya que existe una cierta variación individual (según sexo, edad, raza, población, etc.) y ambiental (tipos de dieta, etc.), pero cambios por encima o por debajo de este intervalo pueden indicar no sólo la existencia de un estado patológico sino incluso sugerir donde se localiza el daño tisular. En especial, muchas enzimas intracelulares que normalmente no se detectan en el plasma o en el suero pueden aparecer en dichos fluidos en ciertas condiciones patológicas debido a los daños en los tejidos de donde proceden. Así, por traumatismos, infecciones, patologías o por la propia muerte celular, se producen alteraciones en las células o las membranas celulares y las enzimas pueden liberarse a la circulación sanguínea, o bien, puede incrementar la síntesis de la enzima hasta niveles anormales, lo que también se traducen en una mayor presencia de la enzima en la sangre. Sin embargo, para realizar un diagnóstico adecuado se deben utilizar varias determinaciones enzimáticas. A veces las enzimas puede presentar variantes ligeramente diferentes, denominadas isoformas o isoenzimas, en los distintos tejidos, por lo que la aparición de un tipo concreto de isoenzima revela el tejido dañado. Una de las enzimas utilizadas como marcadores o indicadores de alteraciones patológicas es la lactato deshidrogenasa, que posee isoformas diferentes en músculo (tetrámero M4) y en corazón (tetrámero H4). Estas isoenzimas difieren en movilidad electroforética, resistencia al calor, inhibición por oxalato, etc. y por ello se pueden distinguir fácilmente. La presencia de la isoforma H4 en sangre es indicativa de un infarto de miocardio o de daño en el músculo cardíaco, mientras que un exceso de la isoforma M4 puede indicar una distrofia muscular. En la tabla 8.3 se muestran algunas enzimas utilizadas en el diagnóstico de ciertas de enfermedades.

Tabla 8.3. Algunas enzimas utilizadas en el diagnóstico de enfermedades.

Enzima	Alteración
α-amilasa	Elevada en pancreatitis aguda y en insuficiencia renal. Disminuida en fibrosis quística.
Creatina quinasa	Elevada en infarto de miocardio (isoforma MB) y en patologías musculares (isoforma MM).
Lactato deshidrogenasa	Elevada en enfermedades musculares, cardíacas, renales y hepáticas.
Aminotransferasas (transaminasas)	Elevadas en patologías hepáticas (hepatitis, cirrosis, etc.)
γ-glutamil transferasa	Elevada en enfermedades hepáticas y biliares.
Fosfatasa alcalina	Elevada en patologías hepáticas.
Fosfatasa ácida	Elevada en cáncer de próstata.
Acetilcolinesterasa	Disminuida en enfermedades hepáticas y en infarto de miocardio.
Enzima convertidora de angiotensina	Elevada en cáncer de pulmón.

En tercer lugar, las enzimas pueden utilizarse en medicina como posibles agentes terapéuticos. El uso de enzimas pancreáticas para el tratamiento de trastornos digestivos ya se realizaba desde el siglo XIX. La terapia enzimática presenta un mayor éxito en aplicaciones extracelulares, como en el uso tópico, en la eliminación de sustancias tóxicas (ácido úrico, cianuro, etc.) de la circulación sanguínea y el tratamiento de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

desórdenes sanguíneos graves, como la destrucción de coágulos en casos de infarto o trombosis, en el tratamiento de leucemias y de ciertos tipos de cánceres, y en el tratamiento de los denominados errores congénitos del metabolismo, permitiendo establecer diagnósticos prenatales y sugerir terapias nutricionales, enzimáticas o incluso génicas. Un error congénito es la perdida de una actividad enzimática como consecuencia de una mutación, lo que puede conducir a una grave alteración patológica y en muchos casos a retrasos mentales o incluso a la muerte. Estas mutaciones se transmiten a la descendencia, pudiendo ser dominantes (se manifiesta cuando hay un solo alelo mutado) o recesivas (los síntomas aparecen sólo cuando ambos alelos se encuentran mutados) y autosómicas (genes localizados en cromosomas normales) o ligadas al sexo (genes de los cromosomas X o Y). La ausencia de algunas enzimas del metabolismo de nucleótidos y aminoácidos producen graves errores congénitos, como el síndrome de Lesch-Nyham, causado por la ausencia de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), la inmunodeficiencia combinada severa ("niños burbuja"), por defecto de la adenosina desaminasa, la fenilcetonuria, por ausencia de la fenilalanina hidroxilasa, o la enfermedad de Pombe, por déficit congénito de la α-glucosidasa lisosomal que cataliza la degradación del glucógeno. Un primer indicio para el diagnóstico de una enfermedad metabólica es el aumento en sangre u orina de la cantidad del sustrato de la enzima afectada, y el diagnóstico se puede confirmar por la ausencia de la actividad enzimática en una biopsia del tejido correspondiente. Este diagnóstico puede también ser prenatal, por ejemplo mediante amniocentesis, lo que es de gran importancia para detectar a tiempo la enfermedad y proceder a la interrupción del embarazo o a un tratamiento adecuado. La mayoría de los tratamientos para las enfermedades producidas por estas mutaciones son de tipo nutricional, para evitar la ingestión de las sustancias que dan lugar a los productos que se acumulan por la deficiencia enzimática, y que normalmente son tóxicos a concentraciones elevadas y son los responsables de los daños que caracterizan a esa patología. Así, una dieta especial sin fenilalanina evita los daños cerebrales y el retraso mental producido por la fenilcetonuria. El suministro de la enzima confinada en liposomas o unida a productos que la estabilicen o que reconozcan las células donde debe actuar, se ha intentado también como terapia con más o menos éxito para paliar las deficiencias en algunas enzimas por estos errores congénitos del metabolismo. Así, en la terapia enzimática de la enfermedad de Pombe se ha unido la α-glucosidasa con manosa-6-fosfato para que sea reconocida por los receptores de este azúcar en la membrana lisosomal. Por último, la terapia génica, que implica la clonación del gen que codifica la enzima no mutada y su introducción en el organismo afectado por la enfermedad, puede ser la línea futura de tratamiento de estas enfermedades, sobre todo en las causadas por la mutación de un gen simple (monocistrónicas), como es el caso de la inmunodeficiencia combinada severa.

Además de los intentos de tratamiento de las enfermedades metabólicas mediante el suministro de las enzimas correspondientes, también se han tratado ciertas patologías no derivadas de errores congénitos utilizando las enzimas como fármacos. Así, la uroquinasa se ha empleado para el tratamiento de enfermos con embolia pulmonar, porque induce una cascada que conduce a la destrucción de los coágulos de fibrina; las enzimas asparraginasa, glutaminasa y arginasa se han empleado en el trata-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

miento de ciertos cánceres para provocar una deficiencia en los compuestos nitrogenados en las células tumorales, impidiéndose así la proliferación de dichas células; y la ureasa y la glutamato deshidrogenasa (normalmente inmovilizadas en un soporte sólido) se emplean para eliminar la urea y el amonio, respectivamente, en tratamientos de hemodiálisis. Otras enzimas se pueden utilizar para paliar intoxicaciones o envenenamientos o como antibióticos o antivirales. En la tabla 8.4 se indican algunas de las enzimas utilizadas en el tratamiento de enfermedades.

Tabla 8.4. Principales enzimas utilizadas como fármacos en medicina.

Enzima	Número EC	Reacción catalizada	Utilidad clínica
Asparraginasa	EC 3.5.1.1	L-Asn + $H_2O \longrightarrow$ L-Asp + NH_4^+	Leucemia y otros tumores
Glutaminasa	EC 3.5.1.2	L-Gln + $H_2O \longrightarrow$ L-Glu + NH_4^+	Leucemia y otros tumores
Arginasa	EC 3.5.3.1	L-Arg + $H_2O \longrightarrow$ L-Orn + Urea	Leucemia y otros tumores
Tripsina	EC 3.4.21.4	Hidrólisis de proteínas	Inflamaciones, reabsorción de edemas
Colagenasa	EC 3.4.24.3	Hidrólisis del colágeno	Úlceras dérmicas, reabsorción de edemas
Hialuronidasa	EC 3.2.1.35	Hidrólisis del hialuronato	Infartos de miocardio y ataques cardiovasculares
Estreptoquinasa	EC 3.4.22.10	Plasminógeno → Plasmina	Disolución de coágulos sanguíneos en infartos y trombosis
Uroquinasa	EC 3.4.21.31	Plasminógeno → Plasmina	Disolución de coágulos sanguíneos en infartos y trombosis
Uricasa (urato oxidasa)	EC 1.7.2.3	Urato + $O_2 \longrightarrow$ Alantoína	Gota, eliminación de ácido úrico en hemodiálisis
Ureasa	EC 3.5.1.5	Urea + 2 $H_2O \longrightarrow CO_2$ + 2 NH_4^+	Eliminación de urea en hemodiálisis
Glutamato deshidrogenasa	EC 1.4.1.2	2-oxoglutarato + NH_4^+ + NAD(P)H $\longrightarrow$ L-Glu + $NAD(P)^+$	Eliminación de amonio en hemodiálisis
Rodanasa (tiosulfato sulfotransferasa)	EC 2.8.1.1	$S_2O_3^{2-} + CN^- \longrightarrow SO_3^{2-} + SCN^-$	Envenenamiento por cianuro
β-Lactamasa	EC 3.5.2.6	Hidrólisis de la penicilina	Alergia a las penicilinas
Ribonucleasa	EC 3.1.26.4	Hidrólisis del RNA	Antiviral
Lisozima	EC 3.2.1.17	Hidrólisis de la pared bacteriana	Antibiótico

Sin embargo, el uso terapéutico de las enzimas está limitado por una serie de dificultades, entre las que cabe citar:

a) La naturaleza proteica de las enzimas impide su administración oral, ya que serían rápidamente degradadas por el aparato digestivo como el resto de las proteínas de la dieta, por lo que suelen administrarse por vía endovenosa o limitarse a uso tópico.

b) Al ser proteínas exógenas, las enzimas pueden desencadenar una respuesta alérgica en el paciente, por lo que el tratamiento debe ser corto. A veces se modifican las enzimas con polietilenglicol para disminuir su capacidad antigénica.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

c) La introducción de la enzima en el tipo celular específico donde debe realizar su función es bastante complicado, aunque se pueden unir covalentemente a la enzima residuos de carbohidratos o anticuerpos monoclonales específicos que dirijan la enzima a su lugar de actuación correcto.

d) La vida media de las enzimas suele ser muy corta, por lo que el tiempo de actuación del fármaco es muy limitado. Sin embargo, se puede aumentar este tiempo mediante la modificación covalente de las enzimas o su confinamiento en liposomas o microesferas sintéticas.

e) La formulación y preparación de la enzima debe evitar la presencia de toxinas, pirógenos u otros agentes tóxicos, por lo que la enzima debe tener un alto grado de pureza y debe ser preferentemente de origen humano. Las enzimas que presentan una K_m para el sustrato baja y una V_{max} elevada son las más eficaces, ya que se precisaría menos cantidad de enzima para el tratamiento. El preparado enzimático suele estar liofilizado o disuelto en tampones o sueros de uso clínico, por lo que no es posible la adición de las sustancias estabilizantes utilizadas para la conservación de las enzimas industriales.

f) El coste de los tratamientos enzimáticos suele ser elevado por todas las razones anteriores.

8.5.3. Aplicaciones industriales

Las aplicaciones industriales de las enzimas son el principal objetivo de la tecnología enzimática, ya que las enzimas tienen un amplísimo uso industrial, utilizándose incluso desde tiempos muy antiguos en procesos fermentativos para fabricación de vino, cerveza, derivados lácteos, pan, etc. Además, las enzimas son marcadores de la eficacia de muchos procesos industriales. Por ejemplo, para ver si el proceso de pasteurización de la leche ha sido correcto, se determina la actividad fosfatasa alcalina antes y después del tratamiento. Las enzimas pueden utilizarse también como indicadores de la contaminación (por ejemplo, la leche contaminada por bacterias posee reductasas que no están presentes en la leche pura) o de la caducidad de un producto, ya que muchas actividades enzimáticas aumentan o disminuyen con el tiempo o con las alteraciones de los productos.

La mayoría de los procesos fermentativos industriales requieren la adición de las enzimas, o de ciertos productos que suministran las enzimas en cuestión, para optimizar el rendimiento del proceso, evitar el uso de sustancias químicas contaminantes, disminuir los costes de materiales y ahorrar agua y energía. La utilización industrial de las enzimas cubre tres áreas de aplicaciones principales: enzimas técnicas, enzimas para alimentación humana y enzimas para alimentación animal. En el primer tipo se incluyen las enzimas utilizadas en detergentes, industrias textiles, industrias papeleras, alcoholeras y tenerías, que constituyeron el 63% del total de la producción mundial de enzimas en 1999. Las enzimas utilizadas en alimentación humana se emplean principalmente en las industrias productoras de pan y productos de confitería, zumos, aceites, vino, cerveza y bebidas alcohólicas, con un total del 31% del mercado

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

mundial en 1999. Finalmente, en la fabricación de piensos para animales se utilizó el 6% de las enzimas producidas por las empresas biotecnológicas en 1999.

En las industrias papeleras, las enzimas sustituyen a los derivados clorados como agentes blanqueantes, minimizan el uso de agentes oxidantes, mejoran la calidad del papel, eliminan los restos de resinas y reducen los costes por paradas de producción debidas a las manchas de resinas; en la industria textil reducen el consumo de agua y de agentes químicos, y permiten intensificar los colores de los tejidos; en la producción de detergentes biológicos domésticos o industriales se añaden enzimas que facilitan la eliminación de las manchas, disminuyen el consumo de agua y de energía al actuar a baja temperatura, y evitan el uso de agentes blanqueantes con cloro y fosfatos; en las industrias del cuero y la piel se emplean enzimas que eliminan los restos de carne, pelos, sangre y grasa de la piel; en la fabricación de piensos la presencia de enzimas adecuadas ayuda a mejorar la degradación de los componentes del alimento, aumentando el rendimiento nutritivo del pienso y reduciendo la producción de desechos, ya que los animales no suelen digerir completamente el alimento ingerido; en la obtención específica de L-aminoácidos se emplean métodos enzimáticos que evitan la formación de mezclas racémicas; en viticultura y en industrias de frutas y zumos las enzimas se utilizan para mejorar el rendimiento de la extracción del zumo y durante el procesado del corcho para evitar la aparición de su sabor en el vino (acorchado); en la fabricación de cerveza las enzimas permiten un ahorro económico y de material y facilitan el control de la fermentación y la obtención de distintos tipos de cerveza para necesidades específicas; en la producción de alcohol para bebidas (ginebra, vodka) y para uso como combustible (adición a gasolinas para regular el octanaje) la utilización de enzimas facilita el almacenamiento de los productos y el control del proceso de destilación, aumentando el rendimiento y disminuyendo los costes del proceso, sobre todo cuando se emplea un pH bajo y una temperatura elevada; en la fabricación del pan se añade amilasa para facilitar la degradación del almidón y proteasas para degradar las proteínas de la harina y hacer la masa más fina y uniforme; en la industria farmacéutica se emplean tratamientos enzimáticos para la modificación de antibióticos, etc. En la tabla 8.5 se relacionan algunas de la principales enzimas comerciales utilizadas en distintos procesos industriales.

Tabla 8.5. Principales enzimas industriales y campos de aplicación.

Industria	Enzima	Nombre comercial	Utilidad
Industria textil	Amilasas	Aquazym® Termamyl™	Eliminar el almidón usado para reforzar los hilos durante la urdimbre (desencolado). Reducir el uso de ácidos, bases y agentes oxidantes.
	Celulasas	Cellusoft® Denimax™	Eliminar microfibrillas para suavizar el tacto. Intensificar el color (bio-polishing). Sustituir el lavado a la piedra de prendas vaqueras (biostoning).
	Catalasas	Terminox™	Convertir el H_2O_2 en agua y oxígeno tras el blanqueado antes del teñido. Reducir el lavado (ahorro de agua). Evitar el uso de agentes reductores.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 8.5. Principales enzimas industriales y campos de aplicación. (Continuación).

Industria	Enzima	Nombre comercial	Utilidad
Lavanderías e industrias de detergentes	Proteasas	Alcalase® Savinase® Durazym®	Eliminar manchas proteicas (sangre, huevo, sudor, etc.), incluso a pH alcalino y baja temperatura.
	Lipasas	Lipolase®	Eliminar manchas de aceites y grasas.
	Amilasas	Termamyl®	Eliminar restos de comida con almidón (puré, pastas, chocolate, etc.).
	Celulasas	Celluzyme®	Eliminar microfibrillas para restaurar las fibras de algodón. Proporcionar tacto suave e intensificar el color.
Tenerías e industrias del cuero y la piel	Enzimas proteolíticas	Pyrase® Aquaderm® NUE™	Facilitar el ablandado (rendido) del cuero en sustitución de excrementos de animales. Facilitar la reabsorción de agua, reduciendo el remojo. Realizar el depilado enzimático, eliminando el uso de sulfuro de sodio y de cal.
	Lipasas	Greasex®	Hidrolizar las grasas (desengrase), ahorrando disolventes y tensioactivos.
Industria papelera	Hemicelulasas Celulasas Oxidorreductasas	Pulpzyme®	Reforzar el blanqueo del papel (bleach-boosting).
	Celulasas alcalinas	Novozym® 342	Eliminar la tinta del papel antes del reciclado.
	Endocelulasas Carbohidrasas		Eliminar agua de la pasta y ahorrar energía en la maceración de la pasta.
	Amilasas	Termamyl® Aquazym®	Modificar el almidón para el estucado.
	Lipasas	Resinase®	Eliminar restos de savia y depósitos de resina en la pasta papelera y en las máquinas.
Industrias de alimentos y piensos	Endoproteasas Exopeptidasas	Flavourzyme® Novozym® Protamex™ Neutrase®	Aumentar el contenido de aminoácidos. Reforzar el sabor de sopas, caldos y platos preparados. Producir proteínas vegetales y animales hidrolizadas para la alimentación animal y la fabricación de gelatinas.
	Carbohidrasas Proteasas	Viscozyme® Celluclast® Bio-Feed®	Mejorar la asimilación y digestión de los alimentos para animales degradando los polisacáridos no almidonosos (fibra) y las proteínas.
	Fitasa	Phytase Novo®	Facilitar la liberación de fósforo por degradación del ácido fítico de origen vegetal.
Industrias de aceites y grasas	Enzimas pectolíticas	Olivex™	Aumentar el rendimiento de extracción de aceite de oliva. Facilitar la separación del aceite durante el prensado.
	Lipasas	Lipozyme® IM Novozym 398	Hidrolizar triglicéridos y ésteres. Fabricación de grasas “a medida” con reacciones de interesterificación. Síntesis de ésteres para producción de sabores y aromas y para uso como tensioactivos y en cosmética.
	Fosfolipasas	Lecitase®	Desengomado de aceites. Producción de lisolecitina (emulsionantes) a partir de subproductos del refinado de aceites de semilla.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 8.5. Principales enzimas industriales y campos de aplicación. (Continuación).

Industria	Enzima	Nombre comercial	Utilidad
Industrias de zumos y viticultura	Enzimas pectolíticas	Pectinex® Ultrazym® Vinozym® Citrozym™ Vinoflow™ Peelzyme™	Eliminar las pectinas (aglutinantes de las paredes celulares que abundan en las frutas verdes y que se degradan al madurar), disminuyendo la viscosidad y mejorando la filtración, la clarificación y el rendimiento de extracción, así como el color y sabor. Pelado enzimático de cítricos mejorando la textura del gajo y eliminando el uso de hidróxido de sodio.
	Amilasas Amiloglucosidasas (AMG)	Fungamyl®	Degradar y eliminar el almidón de los zumos facilitando la extracción.
	Glucosidasas	Novoferm® 12	Hidrolizar los terpenilglicósidos del mosto y reforzar el aroma.
	β-Glucanasas	Glucanex®	Elaborar vino a partir de uvas botritizadas, hidrolizando los betaglucanos producidos por el hongo *Botrytis* que dificultan la filtración.
Industria cervecera	α-Amilasas Gluconasas Proteasas Amiloglucosidasas (AMG) Amilasas termoestables	Ceremix® Cereflo® Neutrase® Ultraflo™ Termamyl	Sustituir la malta por cebada. Elaboración de cerveza hasta con un 100% de cereales no malteados. Licuefacción de granos crudos. Producción de cerveza de bajo contenido en calorías (menos dextranos y azúcares).
	β-Glucanasas Pentosanasas	Cereflo® Viscozyme® Ultraflo™	Eliminar betaglucanos y pentosanos que dificultan la filtración.
	Proteasas Enzimas disgregantes de proteínas	Neutrase®	Controlar la cantidad de nitrógeno. Mejorar el crecimiento de la levadura y la fermentación.
	α-Acetolactato descarboxilasa	Maturex®	Transformar el acetolactato en acetoína (sin formar diacetilo, de sabor desagradable). Reducir el tiempo de maduración de la cerveza.
Industrias alcoholeras	α-Amilasas Amiloglucosidasa	Fungamyl® Termamyl® Liquozyme™ Spirizyme®	Facilitar la licuefacción del almidón, degradándolo completamente hasta azúcares fermentables, como la dextrosa.
	Proteasas Enzimas disgregantes de proteínas	Neutrase®	Controlar la cantidad de nitrógeno. Mejorar el crecimiento de la levadura y la fermentación.
	Isomerasas	Invertase™	Procesado de azúcares. Obtención de licores dulces ricos en fructosa.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 8.5. Principales enzimas industriales y campos de aplicación. (Continuación).

Industria	Enzima	Nombre comercial	Utilidad
Industrias panaderas	α-Amilasas β-Amilasas	Fungamyl® Novamyl®	Convertir almidón en dextrinas y éstas en maltosa como complemento de la harina. Utilizar masas congeladas. Mejorar la masa evitando o retrasando el endurecimiento.
	Amiloglucosidasas (AMG)		Mejorar el color de la corteza aumentando la cantidad de glucosa.
	Pentosanasa	Pentopan™	Mejorar el volumen y textura de la masa eliminando pentosanos que impiden el desarrollo del gluten.
	Proteasas	Glutenase™	Debilitar el gluten en la fabricación de galletas y crackers, evitando el uso de agentes reductores como el bisulfito sódico.
Industrias almidoneras y azucareras	α-Amilasas β-Amilasas Amiloglucosidasa (AMG)	Fungamyl® Termamyl® Liquozyme™ Dextrozyme®	Facilitar la licuefacción del almidón. Obtener jarabes para bebidas refrescantes, confitería, helados, salsas, conservas, etc. Sacarificación del almidón, degradándolo completamente hasta azúcares fermentables. Mejorar la extracción de azúcar de la caña o la remolacha.
	Isomerasas	Sweetzyme® Invertase™	Obtener jarabes mas dulces al convertir la glucosa en fructosa.

Bibliografía

Brisou, J. F. (1995). *Biofilms. Methods for enzymatic release of microorganisms*. CRC Press.

Chaplin, M. y Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. Cambridge University Press.

Núñez de Castro, I. (2001). *Enzimología*. Editorial Pirámide.

Godfrey, T. y West, S. (1996). *Industrial Enzymology*, 2nd ed. Stockton Press-Macmillan Press, Nueva York-Londres.

http://www.novozymes.com

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 9

TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MANIPULACIÓN DEL DNA

Glosario
9.1. Introducción
9.2. La información genética y el genoma
9.3. Enzimas utilizadas en la manipulación del DNA
9.4. Fundamentos de la clonación del DNA
9.5. Técnicas de transferencia e hibridación de ácidos nucleicos
9.6. Técnicas de análisis transcripcional y de expresión de genes clonados
9.6.1. Extensión del cebador
9.6.2. Experimentos de huella por digestión con nucleasa
9.6.3. Desplazamiento de la movilidad electroforética
9.6.4. Sistema de dos híbridos
9.6.5. Fusiones de genes reporteros
9.6.6. Fusiones de colas de histidinas
9.7. Amplificación del DNA y del RNA por PCR y RT-PCR
9.8. Mutagénesis dirigida o *in vitro*
9.9. Secuenciación del DNA y análisis de las secuencias
9.9.1. Método químico
9.9.2. Método enzimático
9.9.3. Secuenciación automática
9.10. Genómica y proteómica
9.10.1. Matrices de DNA
9.10.2. Electroforesis bidimensional
9.10.3. Metagenómica
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Cebador: Oligonucleótido que hibrida con una cadena molde de DNA y aporta el extremo 3′-OH necesario para que la DNA polimerasa sintetice la cadena complementaria.

Clon: 1. Conjunto de células genéticamente idénticas que derivan de una célula inicial. **2.** Fragmento de DNA que ha sido introducido en un vector y replicado para dar múltiples copias.

Colonia: Clon visible de células, generalmente bacterianas.

Competencia: Estado en el que una célula puede captar o recibir una molécula de ácido nucleico exógeno.

Cósmido: Vector de clonación que posee el sitio *cos* del fago lambda para permitir el empaquetamiento dentro de la cápsida de fragmentos de DNA de gran tamaño (hasta 50 kb).

Cromosoma: Molécula de DNA, con sus proteínas asociadas, que contiene un conjunto de genes.

Cromosoma artificial: Vector de clonación de fragmentos muy grandes de DNA que posee los componentes necesarios para su replicación y mantenimiento en una célula hospedadora.

Deleción: Pérdida de un fragmento de la secuencia de DNA, que puede ser desde una sola base a genes completos.

DNA ligasa: Enzima que permite la unión covalente de fragmentos de DNA.

DNA polimerasa: Enzima que cataliza la síntesis de la cadena de DNA complementaria a la cadena molde. Requiere un cebador y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato.

DNasa: Nucleasa que hidroliza moléculas de DNA.

Electroforesis: Técnica que permite separar las moléculas por su migración diferencial en un campo eléctrico.

Endonucleasas de restricción: Enzimas que catalizan la rotura del DNA en secuencias específicas.

Expresión génica: Conjunto de procesos que permiten la transcripción y la traducción de la información genética, para sintetizar una proteína a partir del gen que la codifica.

Fago: Virus bacteriano. Bacteriófago.

Fásmido: Vector que contiene el origen de replicación de un fago.

Fenotipo: Conjunto de características observables en un organismo determinadas por el genotipo y el medio ambiente.

Fusión génica: Unión de fragmentos de DNA correspondientes a genes diferentes para formar un gen híbrido o quimérico.

Fusión traduccional: Fusión de genes realizada en la fase de lectura adecuada para formar una proteína híbrida o quimérica.

Fusión transcripcional: Fusión de genes realizada en la región transcrita, pero no necesariamente codificante, lo que permite expresar un gen bajo el control del promotor de otro gen.

Gen: Segmento de DNA que se transcribe a un producto funcional (generalmente una proteína) y las regiones reguladoras adyacentes.

Genoma: Conjunto de la información genética de un organismo. Incluye la totalidad de los genes y las secuencias no codificantes.

Genoteca: Conjunto de fragmentos de DNA clonados que representa el genoma completo de una célula en el total de los clones que la constituyen.

Genotipo: Constitución o composición de genes de un organismo.

Hibridación: Asociación de cadenas de ácidos nucleicos complementarias para formar un ácido nucleico bicatenario o dúplex.

Inserción: Introducción de una nueva secuencia en un ácido nucleico determinado, desde una única base a genes completos.

Kilobase: Unidad de longitud de secuencia de ácido nucleico que equivale a 1.000 nucleótidos. Se representa por kb.

Mapa cromosómico: Representación gráfica de la localización de los genes en un cromosoma, generalmente basado en las frecuencias de recombinación.

Mapa físico de restricción: Representación gráfica de la localización de los sitios reconocidos por las enzimas de restricción.

Marco o fase de lectura: Cada una de las tres posibles formas de traducir una secuencia de RNAm en conjuntos de tres nucleótidos leídos como codones.

Metagenómica: Análisis genómico de organismos no cultivables.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Monocistrónico: Transcrito o molécula de RNAm que contiene la información correspondiente a un único gen.
Motivo: Secuencia corta y definida de un DNA o una proteína.
Mutación: Proceso fortuito o provocado que produce una alteración en la secuencia del material genético.
Mutágeno: Agente que provoca una mutación.
Mutagénesis: Proceso por el que se generan las mutaciones.
Mutante: Célula u organismo portador de una mutación.
Nucleasa: Enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos nucleicos.
Oligonucleótido: Secuencia corta de un ácido nucleico, generalmente de menos de 100 bases.
Organismo transgénico: Organismo cuyo genoma se ha modificado mediante la introducción de un nuevo gen.
Placa de lisis: Cerco o claro formado en una colonia bacteriana como consecuencia de la lisis provocada por la infección con un fago.
Plásmido: Molécula extracromosómica de DNA que se replica de forma autónoma y contiene genes no esenciales para la célula.
Policistrónico: Transcrito o molécula de RNAm que contiene la información correspondiente a varios genes que se transcriben conjuntamente formando una unidad transcripcional.
Promotor: Secuencia de DNA necesaria para iniciar la transcripción, generalmente situada en la región 5′ no traducida del gen. Es el sitio de unión de la RNA polimerasa.
Restricción: Mecanismo por el que una célula degrada el DNA extraño.
RNasa: Nucleasa que hidroliza moléculas de RNA.
Sonda: Secuencia definida de DNA que puede utilizarse para reconocer mediante hibridación a otras moléculas de DNA o RNA complementarias a su secuencia.
Traducción: Proceso de descodificación de la información genética por el que el RNAm da lugar a una proteína.
Transcripción: Proceso por el que la secuencia de DNA de un gen da lugar a un RNAm.
Transcripción inversa: Proceso por el que una secuencia de RNA se copia en una molécula de DNA. Se conoce también como retrotranscripción.
Transcrito: Molécula de RNAm resultante de la transcripción de un gen o conjunto de genes.
Transformación: Modificación del genoma de una célula por la introducción de un DNA exógeno.
Vector: Molécula de ácido nucleico en la que se puede insertar fragmentos de DNA para introducirlo y mantenerlo en una célula hospedadora.
Vector de expresión: Vector que posee los elementos o secuencias necesarias para la expresión de los genes clonados, por lo que permite la síntesis de las proteínas que codifican dichos genes en la célula hospedadora.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

9.1. Introducción

El término "biotecnología" fue acuñado en 1917 por el ingeniero húngaro Karl Ereky para referirse a "todas las líneas de trabajo por las que se generan productos a partir de materiales no procesados mediante la ayuda de seres vivos o material biológico". Durante varias décadas, la biotecnología se centró principalmente en dos aspectos, la aplicación de los conocimientos biológicos a las fermentaciones industriales y a la adaptación entre hombre y máquina, lo que actualmente se denomina ergonómica. El desarrollo de la biotecnología en todos los campos de aplicación actuales ha sido básicamente una consecuencia de la utilización de las modernas técnicas de manipulación de la información genética, lo que está produciendo una revolución biotecnológica de consecuencias y límites totalmente impensables hace sólo unas décadas. A principios de 1970 surgieron las primeras técnicas para la manipulación de los ácidos nucleicos y la construcción de nuevas moléculas de DNA con secuencias procedentes de distintos orígenes biológicos. Esta tecnología del DNA recombinado se desarrolló en muy poco tiempo y pronto se pusieron a punto otras técnicas que permitieron la determinación rápida y precisa de las secuencias de los fragmentos de DNA, la identificación de secuencias de DNA y RNA por hibridación, la introducción de mutaciones o cambios específicos en dichas secuencias y la obtención de grandes cantidades de los fragmentos de DNA deseados mediante amplificación de los mismos por la reacción en cadena de la polimerasa. El espectacular desarrollo de estas técnicas de ingeniería del material genético y de otras nuevas metodologías y aplicaciones articuladas alrededor de lo que actualmente se denomina genómica y proteómica, ha permitido la identificación, amplificación, clonación, secuenciación, mutagénesis y expresión de multitud de genes, así como el desciframiento de las secuencias completas de los genomas de muchos organismos, entre los que se incluyen más de 100 bacterias y arqueobacterias y una amplia variedad de organismos eucarióticos modelos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la planta *Arabidopsis thaliana*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*, entre otros. La anotación completa del genoma humano se publicó en el año 2001 tanto por el consorcio público como por la iniciativa privada del Dr. Craig Venter y la empresa Celera Genomics. Todas estas investigaciones han transformado radicalmente nuestra visión de la biología y sus aplicaciones en la denominada era post-genómica. De las aproximaciones reduccionistas tradicionales se ha pasado en la actualidad a un enfoque integrador en el que ya no estamos interesados en el funcionamiento de un gen o una proteína específica sino que se busca la información completa sobre el entramado global de interacciones moleculares y celulares en los organismos estudiando el comportamiento sinérgico de todos sus genes y proteínas. La aplicación de estas técnicas de biología molecular al campo de la biotecnología ha dado lugar a la denominada Biotecnología Molecular, una disciplina en la que se integran diferentes áreas científicas y basada en la capacidad de manipular la información genética de los organismos de interés biotecnológico, ya sea introduciendo nuevos genes o alterando los ya existentes en el genoma del organismo, para generar una amplia gama de productos comerciales (Fig. 9.1).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

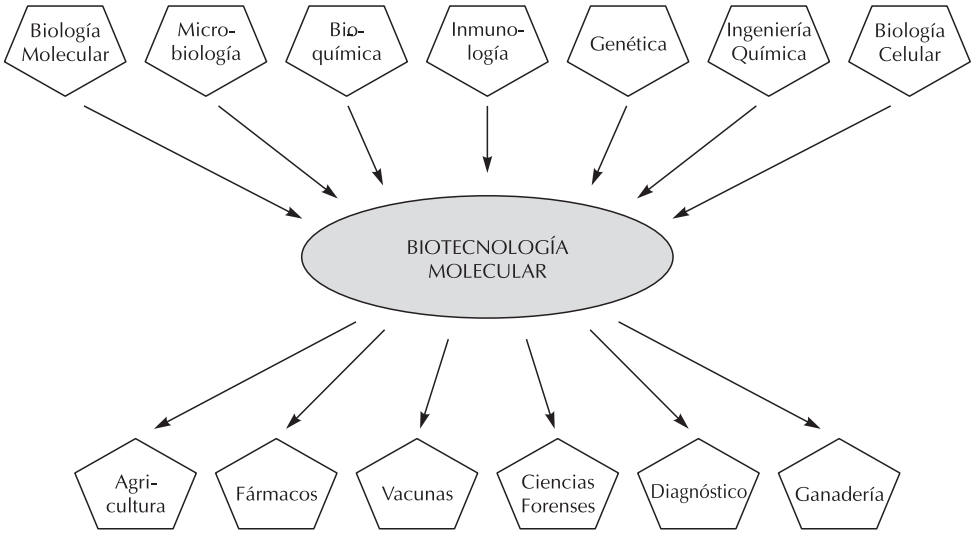


Figura 9.1. Interdisciplinariedad de la Biotecnología Molecular.

Los principales campos de aplicación donde la biotecnología molecular está produciendo notables beneficios a la humanidad son el diagnóstico, prevención y tratamiento de múltiples y variadas enfermedades, el incremento de los rendimientos y la productividad de los cultivos y granjas animales, el desarrollo de microorganismos capaces de producir diversas sustancias de interés industrial, alimentario o clínico, y la eliminación de contaminantes y sustancias xenobióticas tóxicas presentes en el medio ambiente. Las múltiples aplicaciones de estas nuevas tecnologías no escapan al interés de las grandes multinacionales del campo de la biotecnología, y en especial en la biomedicina para el diagnóstico precoz de enfermedades, el diseño de nuevos fármacos y vacunas, el desarrollo de medicinas personalizadas, etc. Esto incluso se refleja en los propios nombres, como Genetech, Biogen, Genes, Amgen, etc., de muchas de las más de 2.500 grandes empresas biotecnológicas existentes a nivel mundial o de las correspondientes divisiones comerciales de muchas otras multinacionales. Para ilustrar la importancia económica de este tipo de industrias, baste sólo decir que en Estados Unidos las actividades de la biotecnología molecular generan unas ganancias de más de 25 mil millones de dólares y emplean a más de 175.000 personas.

En este capítulo se pretende dar una visión global de las principales metodologías existentes en la actualidad para la manipulación del DNA, explicándose los fundamentos, objetivos y aplicaciones de dichas técnicas, pero sin proceder a una exposición detallada del desarrollo experimental de las mismas. Para esto último, existen excelentes libros donde se presentan minuciosamente las diversas técnicas de biología molecular y los métodos y protocolos experimentales para llevarlas a cabo, así como el material y las enzimas y reactivos necesarios para su realización (véase la bibliografía al final de este capítulo).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

9.2. La información genética y el genoma

En todos los seres vivos, la información genética está almacenada en los ácidos nucleicos, y específicamente en el ácido desoxirribonucleico (DNA), con la excepción de algunos virus que utilizan ácido ribonucleico (RNA). Esta información se transmite a las células descendientes mediante el proceso denominado replicación, y se expresa para dar lugar a las proteínas celulares mediante los procesos conocidos como transcripción (síntesis de RNA a partir de DNA) y traducción (síntesis de proteínas a partir del RNA). Francis Crick introdujo el concepto de "Dogma Central de la Biología Molecular" para describir este flujo de la información genética en los organismos, incluso antes de que se conocieran los mecanismos moleculares por los que ocurren (Fig. 9.2).

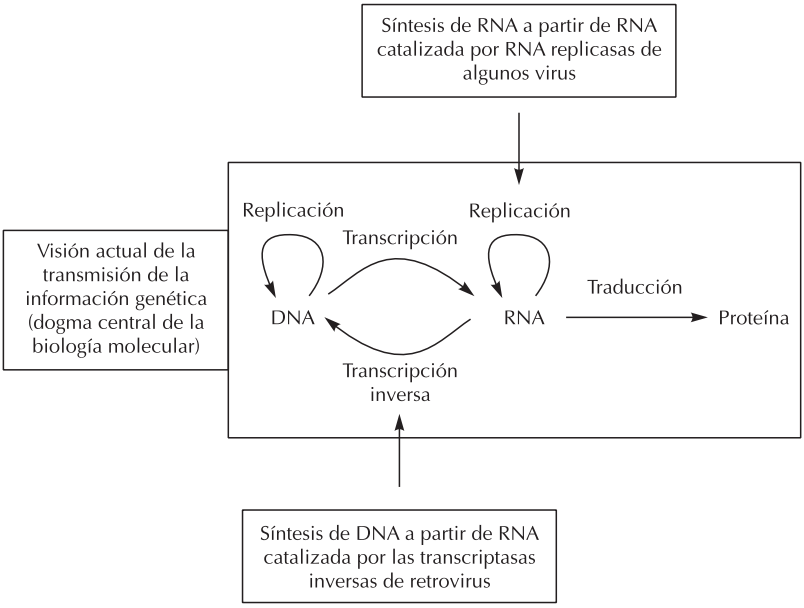


Figura 9.2. Visión actual de la transmisión de la información genética ("dogma central de la biología molecular").

Conceptualmente, el genoma puede ser considerado como el conjunto de todo el material genético de un organismo. En los virus, el genoma es pequeño (de 10^3 a 10^5 bases) y puede estar formado por RNA o DNA, ya sean de cadena sencilla o doble y circulares o lineales. Este genoma se encuentra "desnudo", es decir, sin asociarse a proteínas específicas, y se empaqueta en una cápsida o envuelta proteica. Los organismos procariotas (dominios *Bacteria* y *Archaea*) carecen de núcleo, orgánulos intracelulares o cualquier otro tipo de compartimentación interna, por lo que contienen un genoma constituido por un único cromosoma de DNA bicatenario circular, aunque en algunas bacterias puede ser lineal o pueden existir varios cromosomas diferentes, condensado con algunas proteínas básicas no histónicas formando el denominado nucleoide, que se localiza en el citoplasma y generalmente se ancla a la membrana

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

plasmática. Además, es frecuente encontrar otras pequeñas moléculas de DNA circular denominadas plásmidos, que se replican de forma autónoma y pueden aparecer en un número variable de copias. Estos elementos se consideran extracromosómicos porque no poseen genes esenciales para la viabilidad del organismo, pero suelen contener genes que confieren resistencia a diferentes antibióticos y a ciertos compuestos tóxicos. El tamaño del genoma de los organismos procarióticos, incluyendo cromosomas y plásmidos, suele oscilar entre 1 y 10 Mb (1 Mb = 10^3 kb = 10^6 pb o pares de bases). Así, el genoma de la bacteria patógena *Micoplasma genitalis* es uno de los más pequeños, con $0{,}58 \times 10^6$ pb (470 genes), mientras que el genoma de *Escherichia coli* contiene $4{,}6 \times 10^6$ pb (4.288 genes). Estos organismos procarióticos son haploides porque contienen una única copia del cromosoma (o de los cromosomas cuando hay varios). Sin embargo, pueden existir varias copias del mismo plásmido y algunos genes cromosómicos también pueden aparecer duplicados, por lo que se habla en estos casos de meroploidía. En el dominio *Eukarya*, que incluye a los organismos eucarióticos cuyas células poseen una gran compartimentación interna, incluyendo el núcleo y diversos tipos de orgánulos intracelulares como las mitocondrias y los cloroplastos de las células vegetales, el genoma es diploide porque existen dos copias de cada cromosoma (en el hombre, 22 pares de cromosomas autosómicos más los cromosomas sexuales XX o XY). Cada cromosoma está formado por una molécula de DNA lineal asociada a proteínas básicas denominadas histonas y a otras proteínas no histónicas, con un grado de empaquetamiento variable según el ciclo celular o la expresión de los genes. Los cromosomas aparecen altamente condensados durante la división nuclear (mitosis), y poseen un centrómero (donde se conectan las cromátidas hermanas y el huso mitótico) y secuencias repetidas en los extremos, denominadas telómeros. Durante la interfase, el material genético aparece disperso por el núcleo con un grado de condensación mucho menor (cromatina), que es compatible con la expresión de los genes necesarios para la síntesis de las proteínas implicadas en el metabolismo celular. En los organismos eucarióticos, además de este genoma nuclear, existe el denominado genoma de los orgánulos (cloroplastos y mitocondrias), constituido por una pequeña molécula de DNA circular, semejante al cromosoma bacteriano, en cada uno de dichos orgánulos. El tamaño de los genomas eucarióticos oscila entre 10^7 y 10^{12} pb, pero no existe correlación entre la cantidad de material genético y la complejidad del organismo, lo que se conoce como paradoja del valor C. Así, el genoma humano incluye unas $3{,}5 \times 10^9$ pb (unos 40.000 genes) mientras que muchos peces, anfibios y plantas poseen tamaños de genoma superiores. Esto refleja el hecho de que una gran parte del genoma en eucariotas no es codificante porque no da lugar a un producto génico (RNA o proteína funcional), y contiene gran cantidad de secuencias repetitivas, así como intrones (secuencias no codificantes intercaladas en los genes que se transcriben pero luego se eliminan y no aparecen en el RNA mensajero maduro que se traduce a proteínas), en número y longitud variable según el organismo.

9.3. Enzimas utilizadas en la manipulación del DNA

En muchas de las técnicas de biología molecular se requiere la modificación del DNA mediante una serie de enzimas que están disponibles comercialmente, entre las

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que se incluyen una gran variedad de endonucleasas de restricción, DNA ligasas, polimerasas, etc. En la tabla 9.1 se relacionan algunas de las principales enzimas utilizadas en las distintas técnicas de biología molecular que se explicarán en este capítulo.

Tabla 9.1. Enzimas utilizadas en Biología Molecular.

Enzima	Características y aplicaciones
Endonucleasas de restricción	Cortar el DNA en secuencias específicas
DNA ligasa (*E. coli*)	Requiere NAD^+. Formación de enlace fosfodiester en mellas y extremos cohesivos
DNA ligasa (fago T4)	Requiere ATP. Formación de enlace fosfodiester en mellas, extremos cohesivos, extremos romos e híbridos DNA-RNA
DNA polimerasa I (holoenzima de *E. coli*)	Desplazamiento de mella (nick translation). Síntesis de la segunda cadena de cDNA
Polimerasa Klenow (fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*)	Relleno de extremos 3′ generados con enzimas de restricción. Marcado de extremos 3′ con [^{32}P]dNTPs (end-labeling). Síntesis de la segunda cadena de cDNA. Secuenciación del DNA por el método enzimático. Amplificación del DNA por PCR. Mutagénesis *in vitro*, para la extensión de los oligonucleótidos con la mutación
T4 DNA polimerasa (fago T4)	Similar a la polimerasa Klenow pero con mayor actividad exonucleasa 3′ → 5′
T7 DNA polimerasa (fago T7)	Muy progresiva y alta actividad exonucleasa 3′ → 5′. Secuenciación por método enzimático. Sequenase™ es una versión modificada con baja actividad exonucleasa 3′ → 5′ Sequenase 2.0 es una versión modificada sin actividad exonucleasa 3′ → 5′
Taq DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*)	Termoestable, con temperatura óptima entre 75 y 80 °C. Secuenciación del DNA. Amplificación del DNA mediante PCR
Transferasa terminal (prelinfocitos)	Añade dNTPs al extremo 3′–OH del DNA sin copiar un molde. Adición de colas homopoliméricas a vectores y al cDNA para clonación. Marcado de los extremos 3′ del DNA con [^{32}P]dNTPs
Transcriptasa inversa	Transcripción del mRNA para la síntesis de cDNA. Secuenciación. Extensión de cebadores (primer extension). Marcado de los extremos 5′ del DNA. La enzima del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) posee alta actividad RNasa, 42 °C, pH 8,3. La enzima del virus de la leucemia Moloney (Mo-MLV) tiene baja actividad RNasa, 37 °C, pH 7,6
RNA polimerasas (Fagos SP6, T7 y T3)	Síntesis de RNA para hibridación. Expresión de genes en bacterias y levaduras (clonados en vectores de expresión con los promotores adecuados)
Nucleasa Bal31 (*Alteromonas espejiana*)	Actividades exonucleasa 3′ y 5′. Digestión del DNA de doble cadena. Modificación de extremos del DNA. Generación de mutantes por deleción. Análisis de estructuras secundarias y sitios de restricción en el DNA
Nucleasa S1 (*Aspergillus oryzae*)	Digestión del DNA de cadena sencilla (ssDNA) o del RNA. Generación de mutantes por deleción. Análisis de estructuras secundarias y estructuras DNA-RNA. Modificación de extremos salientes del DNA para generar extremos romos. Apertura del bucle generado en la síntesis de cDNA. Identificación del extremo 5′ de los transcritos de RNA
Ribonucleasa A (páncreas bovino) y ribonucleasa T1 (*Aspergillus oryzae*)	Eliminar las regiones de RNA que no hibridan en las uniones DNA-RNA

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 9.1. Enzimas utilizadas en Biología Molecular. (Continuación).

Enzima	Características y aplicaciones
Desoxirribonucleasa I (DNasaI de páncreas bovino)	Digestión del DNA de cadena sencilla (ssDNA) o cadena doble (dsDNA), en posiciones adyacentes a nucleótidos de pirimidina. Con Mn^{2+} crea extremos romos. Introducción de mellas en experimentos de desplazamiento de mellas (nick translation). Mutagénesis *in vitro*. Análisis de secuencias de unión DNA-proteína y experimentos de huella (footprinting)
Exonucleasa III (*E. coli*)	Elimina nucleótidos de los extremos 3′ del DNA. Creación de extremos 5′ salientes. Generación de deleciones para mutagénesis *in vitro* y secuenciación del DNA
Exonucleasa λ (fago λ)	Elimina nucleótidos de los extremos 5′ del DNA. Creación de extremos 3′ salientes. Generación de deleciones para mutagénesis *in vitro* y secuenciación del DNA
Fosfatasas alcalinas (*E. coli*, intestino de cordero, etc.)	Eliminar el grupo fosfato de los extremos 5′ del DNA. Prevenir religado de vectores. Marcado del extremo 5′ del DNA con ^{32}P
Polinucleótido quinasa (fago T4)	Introducir ^{32}P en el extremo 5′ del DNA o RNA con $\gamma[^{32}P]ATP$. Fosforilación de los adaptadores ("linkers") sintéticos antes del ligamiento
RNA ligasa (fago T4)	Unión covalente de los extremos 5′–P y 3′–OH del DNA de cadena sencilla o RNA. Síntesis de oligonucleótidos
Topoisomerasas	Introducir o eliminar superenrollamientos en el DNA

9.4. Fundamentos de la clonación del DNA

Un clon es una población de organismos idénticos procedentes de un mismo organismo parental. En biología molecular, se utiliza el término clon para designar tanto a una colección de moléculas de DNA idénticas a una molécula original como a un conjunto de células portadoras de la misma información genética y derivadas de una célula original con dicha información. La clonación de un gen requiere la construcción de una molécula de DNA recombinado mediante la introducción del gen de interés en un vector que permita su expresión en un organismo receptor, que generalmente es la bacteria *Escherichia coli*. Los vectores más utilizados son plásmidos, pequeñas moléculas de DNA circular que suelen contener genes de resistencia a antibióticos y varios sitios de corte para determinadas endonucleasas de restricción y que pueden replicarse en la bacteria receptora de forma autónoma e independiente del DNA cromosómico debido a la presencia de un origen de replicación (*ori*). Existen comercialmente multitud de plásmidos artificiales con diferentes marcadores selectivos y múltiples sitios de clonación para fragmentos de DNA obtenidos con diferentes enzimas de restricción. En algunos plásmidos, estos sitios de clonación se localizan en el gen *lacZ* de la β-galactosidasa, que al inactivarse por la inserción del DNA permite la selección de las colonias en medios con un sustrato cromogénico artificial de la enzima (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido o X-gal), ya que las colonias sin actividad son de color blanco mientras que las colonias que poseen la enzima transforman dicho sustrato en un producto de color azul.

Básicamente, para la clonación molecular de un gen o fragmento de DNA se necesita:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

a) aislar el DNA del organismo con el que se va a trabajar,
b) cortar dicho DNA con determinadas endonucleasas de restricción,
c) separar los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida o mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad,
d) identificar y aislar el gen o fragmento de DNA de interés,
e) insertar dicho gen o fragmento de DNA en el vector de clonación más apropiado (generalmente un plásmido) para formar la molécula de DNA recombinado portadora de la información genética deseada,
f) introducir dicho DNA recombinado en la estirpe receptora adecuada (generalmente *E. coli*) mediante el proceso denominado transformación, y
g) cultivar y seleccionar las bacterias transformadas con el plásmido recombinante mediante la resistencia a los antibióticos adecuados u otros métodos de selección (Fig. 9.3).

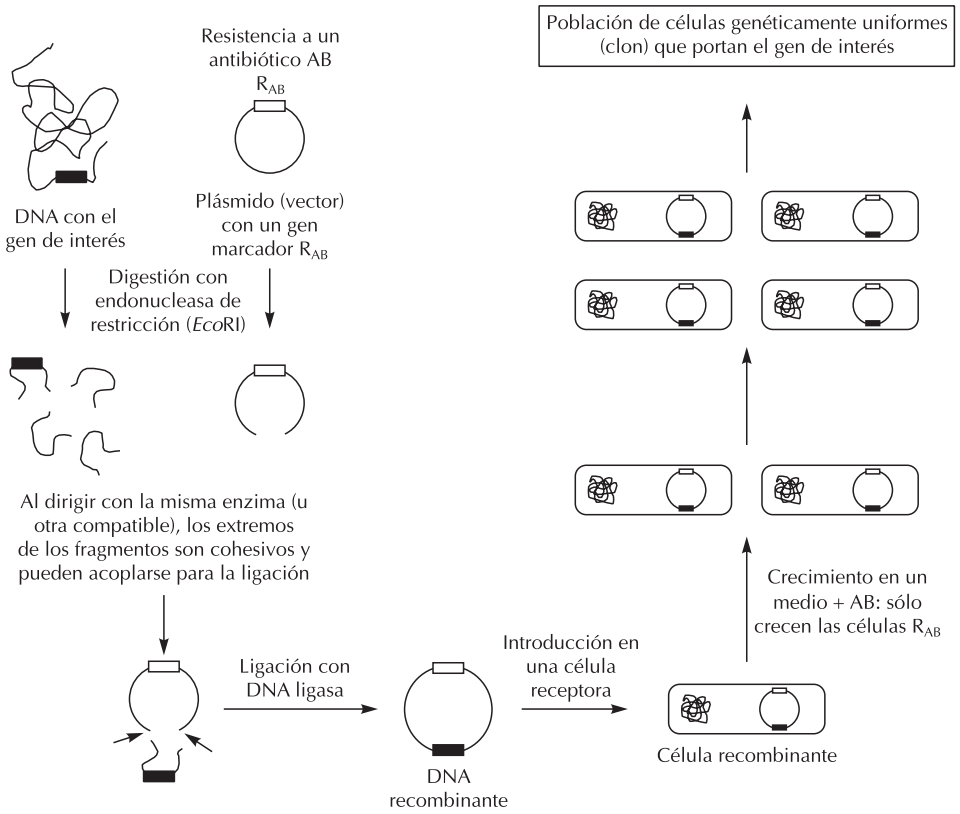


Figura 9.3. Pasos básicos de un experimento de clonación.

Para la construcción de las moléculas de DNA recombinado se requieren enzimas de restricción y DNA ligasas. Aunque existen diversos tipos de endonucleasas de res-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tricción, las más utilizadas en biología molecular son la de tipo II, que se caracterizan porque reconocen y cortan determinadas secuencias de DNA, generalmente de 4 ó 6 pares de bases. Estas secuencias suelen ser autocomplementarias o palindrómicas, ya que se leen igual de derecha a izquierda en una cadena y de izquierda a derecha en la otra. Según los puntos de corte en ambas cadenas, existen enzimas que cortan la secuencia dejando extremos salientes o cohesivos, ya sean hacia 5′ o 3′, y otras que cortan al mismo nivel produciendo extremos romos (Fig. 9.4A). Como cada enzima reconoce y corta siempre la misma secuencia y de la misma forma, todos los fragmentos de DNA obtenidos tienen los mismo extremos, independientemente del tipo u origen del DNA. Por ello, se pueden crear moléculas de DNA recombinado uniendo fragmentos de DNA de distintos orígenes mediante los extremos cohesivos (y en determinadas condiciones también los romos) generados al cortar con la misma enzima (Fig. 9.4B).

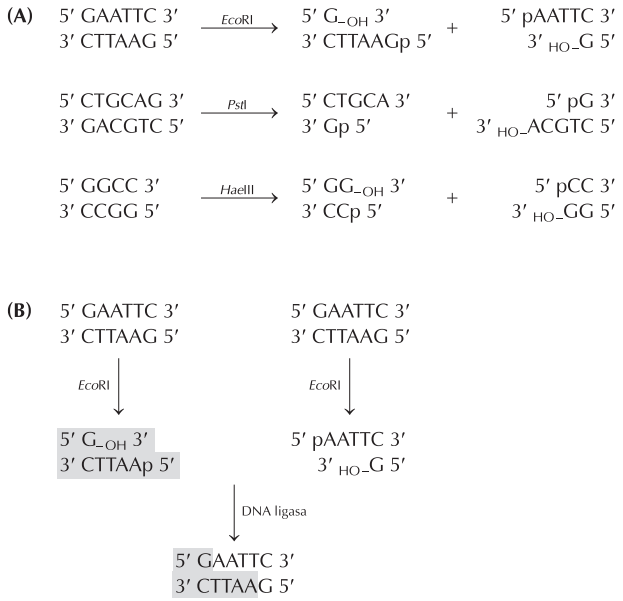


Figura 9.4. Secuencias de DNA reconocidas y cortadas por las endonucleasas de restricción. Las enzimas de tipo II cortan generalmente secuencias de 4 ó 6 pb dejando extremos cohesivos 5′, extremos cohesivos 3′ o extremos romos (A). Dos fragmentos de DNA de diferente origen pero cortados por la misma enzima pueden unirse para formar una molécula de DNA recombinado (B).

Algunas enzimas, como *Bam*HI y *Bgl*II (o *Xho*I y *Sal*I), son compatibles para la clonación porque aunque reconocen secuencias diferentes, generan los mismos extremos cohesivos (Fig. 9.5A). También existen diferentes enzimas, aisladas de diferentes organismos, que reconocen la misma secuencia, aunque pueden ser compatibles para la clonación si la cortan de la misma forma (como *Hin*dIII y *Hsu*I), o incompatibles si la cortan de forma diferente (como *Xma*I y *Sma*I). A estas enzimas que actúan sobre la misma secuencia se les denomina isosquizómeros (Fig. 9.5B).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

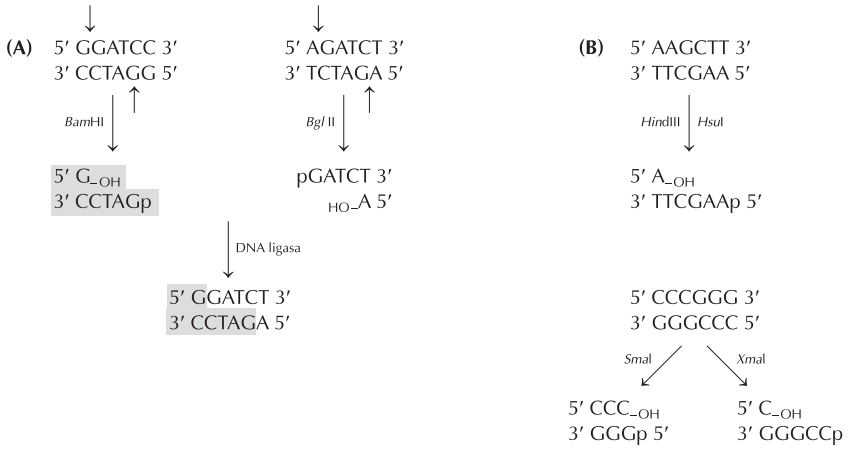


Figura 9.5. Enzimas de restricción compatibles e isosquizómeros. En algunos casos, los fragmentos de DNA cortados con dos enzimas de restricción diferentes pueden unirse porque poseen los mismos extremos, aunque la secuencia resultante en el DNA recombinado no se puede cortar con ninguna de las dos enzimas (A). Por otra parte, una misma secuencia puede ser reconocida y cortada por diferentes enzimas, denominadas isosquizómeros (B).

La unión covalente de los fragmentos de DNA generados por las endonucleasas de restricción se realiza mediante las DNA ligasas. Se suelen utilizar dos tipos de DNA ligasas: la del fago T4, que utiliza ATP para la activación del extremo 5′-P con un grupo AMP como paso previo a la unión de dicho extremo con el extremo 3′-OH del nucleótido anterior, y la de *E. coli*, que utiliza NAD^+ como cofactor para dicho proceso de activación con AMP del grupo 5′-P. Sin embargo, mientras que la ligasa de *E. coli* sólo puede sellar una mella o unir fragmentos de DNA con extremos cohesivos, la ligasa de T4 puede además unir fragmentos con extremos romos o incluso unir una secuencia de RNA a otra de DNA (Fig. 9.6).

La utilización de plásmidos como vectores de clonación tiene como limitación práctica el tamaño de la construcción, ya que los plásmidos recombinantes con insertos grandes, de más de 15 kb, no se replican eficientemente y su frecuencia de transformación es también menor. Normalmente, la transformación se realiza manteniendo las células en una solución de cloruro cálcico a 0 °C para hacerlas competentes a la incorporación del DNA e incubándolas posteriormente con el DNA recombinado en dichas condiciones. Los plásmidos recombinantes también se pueden introducir en las células mediante la aplicación de pulsos de alto voltaje en un proceso conocido como electroporación. Sin embargo, para clonar fragmentos de DNA de mayor tamaño se utilizan los cósmidos, que son plásmidos portadores de unas secuencias de 14 pb denominadas *cos* que permiten incorporar fragmentos de DNA de tamaño comprendido entre 36 y 51 kb, que son eficazmente empaquetados en la cabeza del fago lambda e introducidos en las células receptoras de *E. coli* mediante transfección. Para propagar fragmentos de DNA aún mayores, se puede recurrir a la construcción de cromosomas artificiales. Los cromosomas bacterianos artificiales (BAC) son plásmidos que admiten grandes fragmentos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

DNA-ligasa de *E. coli*

Mecanismo

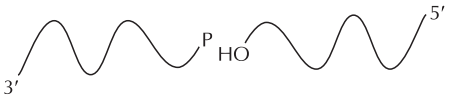
$$\text{Enz} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{Enz-AMP} + \text{NMN}$$

$$\text{Enz-AMP} + \text{P-5'-DNA} \longrightarrow \text{Enz} + \text{AMP-P-5'-DNA}$$

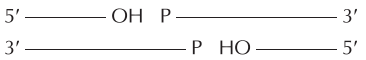
$$\text{DNA 3'-OH} + \text{AMP-P-5'-DNA} \longrightarrow \text{DNA 3'-O-P-5'-DNA}$$

Función

Repara mellas en la misma cadena de DNA:



Une extremos cohesivos en dos cadenas de DNA



DNA-ligasa de *T4*

Mecanismo

$$\text{Enz} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Enz-AMP} + \text{PPi}$$

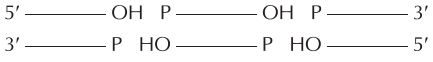
$$\text{Enz-AMP} + \text{P-5'-DNA} \longrightarrow \text{Enz} + \text{AMP-P-5'-DNA}$$

$$\text{DNA 3'-OH} + \text{AMP-P-5'-DNA} \longrightarrow \text{DNA 3'-O-P-5'-DNA}$$

Función

Repara mellas y une extremos cohesivos en el DNA

Une extremos romos en dos cadenas de DNA



Une DNA y RNA

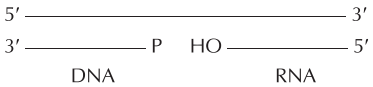


Figura 9.6. Tipos de reacciones que catalizan las DNA ligasas. La enzima de *E. coli*, que requiere NAD^+, sólo puede llevar a cabo las dos primeras reacciones, para sellar mellas y unir extremos cohesivos, mientras que la DNA ligasa del fago T4, que es dependiente de ATP, puede realizar las cuatro reacciones, pudiendo unir los extremos romos e incluso RNA y DNA.

de DNA, de varios cientos de kb, y que poseen al menos un marcador seleccionable (generalmente un gen de resistencia a un antibiótico y el gen *lacZ* de la β-galactosidasa), un origen de replicación (*ori*) muy estable y secuencias *par* que garantizan la distribución uniforme de los plásmidos entre las dos células hijas tras la división celular y permiten mantener al menos una copia del plásmido por célula. Estos cromosomas artificiales de bacterias se introducen mediante electroporación en estirpes bacterianas alteradas en la pared celular, lo que facilita la incorporación de estas grandes moléculas de DNA recombinante. También son muy utilizados los cromosomas artificiales de levadura (YAC), que incluyen además del DNA de gran tamaño (desde 100.000 pb hasta varios millones de pb), un centrómero para la unión del cromosoma al huso mitótico durante la mitosis, telómeros en los extremos del cromosoma, marcadores seleccionables y orígenes de replicación, conocidos en levadura como secuencias de replicación autónoma (ARS), lo que permiten que el DNA pueda ser eficazmente replicado y propagado en las células de levadura. Un problema adicional para trabajar con grandes fragmentos de DNA es que la electroforesis normal en geles de agarosa no separa bien dichos fragmentos,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

por los que se tiene que utilizar una variante de la técnica, denominada electroforesis de campo pulsante.

En muchas ocasiones se recurre a clonar todos los genes de un organismo y seleccionar posteriormente entre todos los clones resultantes el portador del gen de interés. Este es el fundamento de la construcción de librerías génicas o genotecas, que son un conjunto de fragmentos de DNA clonados, que en su totalidad representan al genoma completo del organismo. Para ello, se aísla el DNA total del organismo y se digiere, generalmente mediante digestiones parciales con enzimas de restricción que cortan secuencias de 4 pb, para obtener una población de fragmentos de DNA de un tamaño adecuado y que solapan entre sí. Finalmente, estos fragmentos de DNA se clonan en un vector apropiado, generalmente un plásmido o un cósmido. A esta estrategia se le denomina clonación indiscriminada (shotgun cloning). Para que un fragmento determinado de DNA aparezca representado con una cierta probabilidad, la genoteca debe contener un número mínimo de clones que se puede calcular mediante la expresión:

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

en donde N es el número de clones, P la probabilidad y f la relación entre el tamaño medio de los fragmentos y el tamaño del genoma del organismo. Así, para construir una genoteca de fragmentos de unas 10 kb del genoma de la bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus*, de unas 3.600 kb ($f = 10/3600 = 0{,}00278$), con una probabilidad del 99,9% de encontrar un fragmento determinado, el número mínimo de clones necesarios es:

$$N = \frac{\ln (1 - 0{,}999)}{\ln (1 - 0{,}00278)} = 2.483$$

El escrutinio o la búsqueda del clon deseado entre los múltiples clones de la genoteca se puede realizar mediante la denominada técnica de hibridación en colonia o placa de lisis. Esta técnica es una modificación de la transferencia e hibridación del DNA que se describe en el apartado siguiente.

9.5. Técnicas de transferencia e hibridación de ácidos nucleicos

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos permiten la identificación de secuencias específicas de DNA o RNA, lo que facilita la identificación y el aislamiento de genes, el escrutinio de genotecas, la determinación del grado de parentesco evolutivo entre especies, la detección de los transcritos de un gen y la cuantificación de la expresión génica, o incluso la identificación de mutaciones en determinados genes, lo que permite la detección precoz de ciertas enfermedades. Existen múltiples variedades de técnicas de hibridación según el material identificado y su procedencia, el tipo de transferencia utilizada, la sonda y el marcado empleado, etc. El método clásico detecta hibridación DNA-DNA y fue desarrollado por M. E. Southern en 1975, por lo que se conoce como hibridación Southern (Southern blots). Este método se basa en la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

complementariedad entre el fragmento de DNA buscado y una secuencia total o parcialmente complementaria, denominada sonda, que se marca con radiactividad u otro tipo de marcado. Se aísla el DNA de un determinado origen, se fragmenta mediante digestión con enzimas de restricción, se separan los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa, se transfieren a un filtro de nitrocelulosa y se someten a un tratamiento de desnaturalización del DNA y a hibridación con una sonda específica del gen buscado. La sonda puede ser homóloga, cuando se trata de un fragmento del gen de ese mismo organismo, o heteróloga, si procede de otro organismo, o bien puede ser un oligonucleótido sintético de 20-50 pb (si se conoce parte de la secuencia de la proteína que codifica). Esta sonda se marca con radiactividad o fluorescencia y se desnaturaliza, y si es complementaria a algún fragmento de DNA presente en el filtro se producirá el alineamiento y reasociación de dicho fragmento con la sonda, lo que permite visualizar el fragmento buscado mediante el marcaje de la sonda a la que se une (Fig. 9.7).

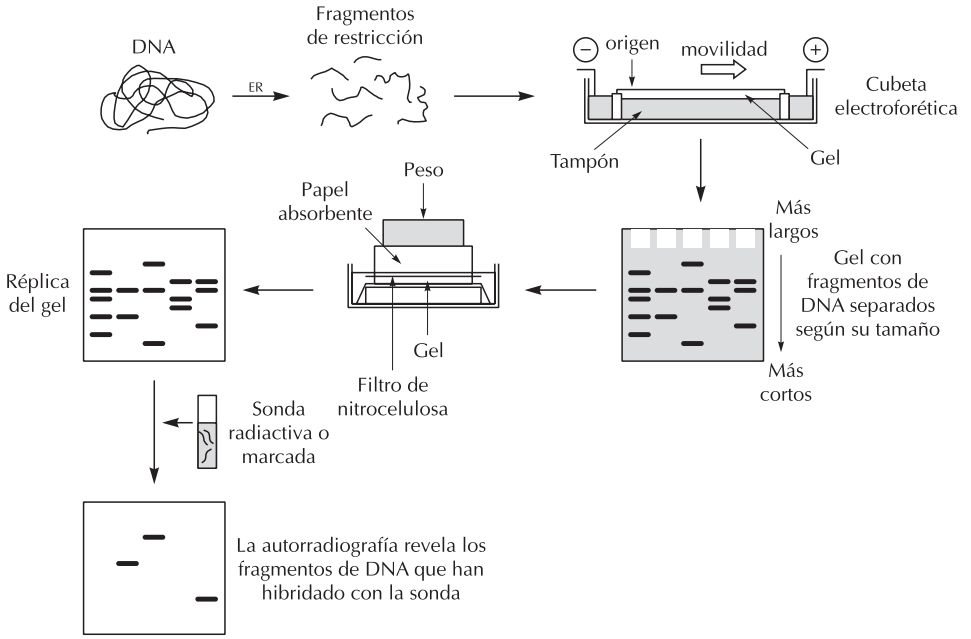


Figura 9.7. Hibridación de ácidos nucleicos (Southern blot).

Para el escrutinio de genotecas se suele utilizar la técnica denominada hibridación en colonia o placa de lisis, que básicamente consiste en el crecimiento en placas de Petri de las colonias bacterianas (si la genoteca se realiza en plásmidos) o las placas o halos de lisis del fago (si la genoteca está basada en cósmidos, ya que cada fago recombinante forma una calva o zona más clara en la colonia bacteriana debido a la lisis de las células), que se transfieren a un filtro de nitrocelulosa y se someten a un tratamiento de desnaturalización del DNA y a hibridación con una sonda específica del gen buscado. La sonda puede ser un fragmento del gen de ese mismo

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

organismo (si se conoce al menos una parte de su secuencia) o de otro organismo, o un oligonucleótido sintético de 20-50 pb (si se conoce parte de la secuencia de la proteína que codifica). Esta sonda se marca con radiactividad o fluorescencia y se desnaturaliza, y si es complementaria al DNA de la colonia o placa de lisis se produce la reasociación o hibridación con dicho DNA, de forma que el marcado de la sonda permite la identificación de las colonias o halos de lisis correspondientes. Finalmente, el clon identificado se aísla de una réplica de los cultivos sobre otra placa de Petri (Fig. 9.8).

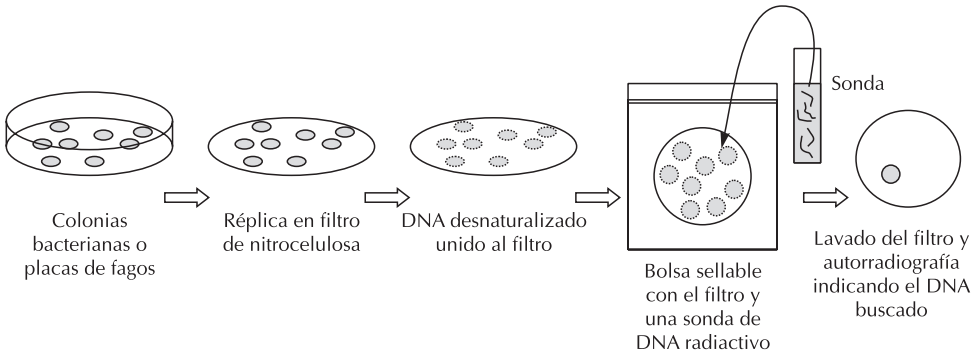


Figura 9.8. Escrutinio de una genoteca mediante la técnica de hibridación en colonias.

Existen distintas técnicas basadas en la transferencia de DNA, RNA o proteínas (Fig. 9.9). La variante denominada hibridación Northern (Northern blots) permite analizar y cuantificar la expresión de un gen determinado porque detecta la presencia, el tamaño y la cantidad de un RNA mensajero específico. Básicamente es una hibridación similar a la explicada anteriormente entre fragmentos de DNA y una sonda de DNA específica, pero utilizando los transcritos de mRNA correspondientes. Es decir, se produce hibridación RNA-DNA en lugar de DNA-DNA. En primer lugar se extrae el RNA total de las células que se encuentran en una condiciones determinadas, se separa por electroforesis y se transfiere a una membrana de nylon o de nitrocelulosa, donde se fija el RNA y se hibrida con la sonda específica marcada, como en la hibridación Southern. Durante todo el proceso hay que tomar las debidas precauciones para evitar la degradación del RNA por ribonucleasas. La visualización de las bandas, según el tipo de marcaje de la sonda, permite conocer el tamaño y la cantidad del transcrito correspondiente al gen utilizado como sonda.

Para la identificación de proteínas en una mezcla compleja se utiliza una técnica inmunológica denominada transferencia Western (Western blots). Aunque en este caso no se trata de hibridación entre ácidos nucleicos sino de análisis inmunológico de proteínas, la técnica es en su realización muy similar a las anteriores. Las proteínas se separan por electroforesis en SDS y se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) donde se realiza la detección de la proteína de interés mediante anticuerpos primarios específicos, obtenidos por ejemplo en ratón, y con anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo) unidos a peroxidasa u otro marcador que posibi-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

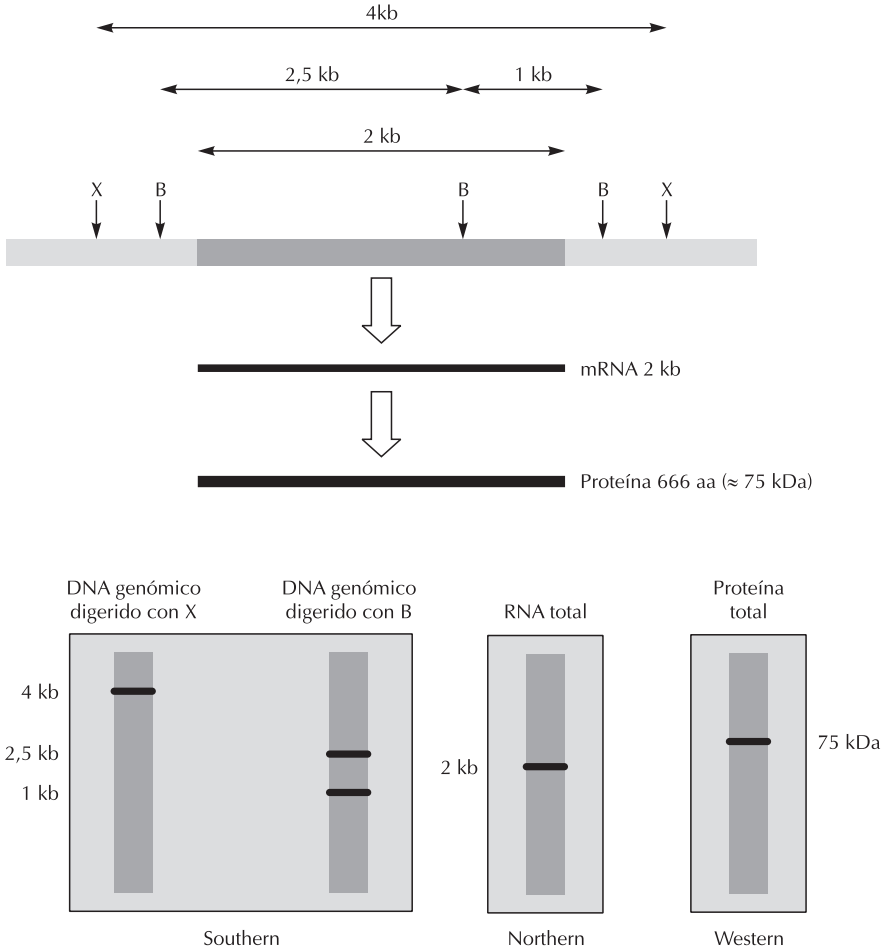


Figura 9.9. Técnicas de transferencia e hibridación.

lite la detección. De esta forma se puede identificar y cuantificar la proteína buscada. Finalmente, en la transferencia denominada Southwestern (Southwestern blots), se pueden identificar proteínas que se unen específicamente al DNA separando las proteínas en electroforesis en SDS y transfiriéndolas a una membrana de nitrocelulosa donde se realiza la identificación utilizando una sonda de DNA marcada, de forma que si la proteína buscada se une al DNA añadido, puede ser identificada por el marcaje de la sonda.

Recientemente también se han desarrollado técnicas que permiten la realización de hibridación *in situ* en cromosomas, células y tejidos. En estos casos, se realiza una hibridación en soporte sólido aplicando la sonda sobre muestras en su localización natural y preparadas para microscopía, por lo que se requieren abor-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

dajes metodológicos similares a los de las técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas.

9.6. Técnicas de análisis transcripcional y de expresión de genes clonados

La expresión de uno o varios genes a partir de un promotor da lugar a un transcrito. Los transcritos pueden ser monocistrónicos, cuando se corresponden a un único gen, o policistrónicos, cuando varios genes se cotranscriben en una unidad u operón de forma que un mismo transcrito incluye la información correspondiente a varios genes, lo que es relativamente frecuente en el caso de bacterias. A veces, un gen puede presentar varios sitios de inicio de la transcripción, lo que permite regular la expresión génica en respuesta a factores reguladores diferentes. En general, las regiones promotoras poseen secuencias de unión para las proteínas de la maquinaria general de transcripción y para diferentes proteínas activadoras o represoras que controlan la cantidad de transcrito producido. La identificación de las proteínas que se unen al DNA y el conocimiento de las secuencias específicas de unión de estas proteínas reguladoras al DNA suele ser imprescindible para conocer los mecanismos reguladores de la expresión de los genes. Por otra parte, una situación muy frecuente es conocer la secuencia de los genes de interés, pero el simple análisis de la secuencia no permite sacar conclusiones sobre el tipo de promotor y la regulación de su expresión. En la actualidad existen diversas técnicas, como la de extensión del cebador (primer extension), que permiten identificar la región promotora de un gen y determinar el sitio de inicio de la transcripción, así como otras que se utilizan para identificar la existencia de interacción DNA-proteína y los sitios donde tiene lugar dicha interacción, como los experimentos de huella por digestión con nucleasa (DNaseI footprinting) y las técnicas de retraso o desplazamiento de la movilidad electroforética (electrophoretic mobility shift and supershift assays). Las interacciones proteína-proteína son esenciales para el correcto desarrollo de la expresión génica y también existen métodos que permiten la identificación de las proteínas que interaccionan con una proteína determinada, como los denominados sistemas de dos híbridos (two-hybrid systems). Una de las técnicas más importantes para el estudio de la expresión de un gen de interés es la fusión de genes reporteros o informadores (reporter gene fusions), que permiten una determinación rápida y fácil de la actividad de un promotor. Finalmente, el objetivo de la mayoría de las clonaciones génicas en biotecnología es la expresión del gen clonado para la obtención de una gran cantidad de la proteína que codifica. En la mayoría de los casos se trata de una expresión heteróloga, es decir, de producir una proteína de interés procedente de un organismo (por ejemplo, una hormona humana como la insulina) mediante la clonación del gen que la codifica y su expresión en un organismo diferente, generalmente la bacteria *Escherichia coli*. En los últimos años se han desarrollado múltiples vectores de expresión que permiten obtener altos rendimientos en la obtención de proteínas funcionales en diversos organismos o sistemas modelo, muchos de los cuales implican la fusión de la proteína de interés a secuencias marcadoras específicas (tags) que permiten su identificación mediante análisis inmunológico y facilitan su purificación por cromatografía de afinidad. A continuación se presenta una visión más detallada de todas estas técnicas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

9.6.1. Extensión del cebador

Aunque existen varios métodos para determinar el sitio de inicio de la transcripción de un gen, la técnica de extensión del cebador es quizás la más utilizada. Consiste en aislar el mRNA de las células, incluyendo todos los transcritos presentes, y utilizar un oligonucleótido cebador (primer) marcado radiactivamente en su extremo 5′ que sea complementario a una región codificante próxima al promotor, es decir, cercana al extremo 5′ del transcrito de interés. A continuación se extiende el cebador mediante una transcriptasa inversa en presencia de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato hasta que se alcanza el extremo 5′ del transcrito, lo que produce un cDNA de un tamaño determinado (la distancia exacta entre el extremo 3′ del cebador y el extremo 5′ del transcrito). A veces no se marca el cebador sino que se utilizan nucleótidos radiactivos o con otro tipo de marcaje que se incorporan durante la reacción de extensión. Para determinar el tamaño del fragmento producido en la reacción de extensión, lo que nos indicará el sitio de inicio de la transcripción, se coloca una muestra de dicha reacción en una electroforesis en gel de poliacrilamida junto a las reacciones de secuenciación llevadas a cabo con el mismo cebador (Fig. 9.10).

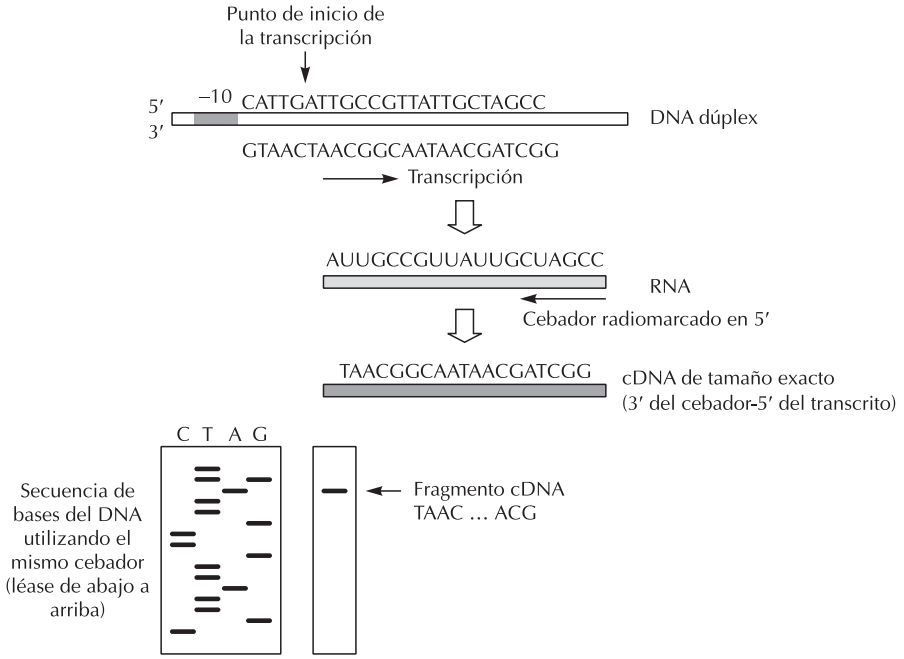


Figura 9.10. Determinación del sitio de inicio de la transcripción mediante extensión del cebador.

9.6.2. Experimento de huella por digestión con nucleasa

Para identificar las secuencias del DNA donde se unen determinadas proteínas se realizan experimentos de huella por digestión con DNasaI. La técnica se basa en el he-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cho de que al unirse la proteína al DNA protege de la digestión con la nucleasa la secuencia de unión, que es digerida como el resto del DNA en el control donde no se produce la unión de la proteína (Fig. 9.11). El DNA se marca radiactivamente en el extremo 5′ y una parte se une a la proteína de interés mientras que otra parte se mantiene en ausencia de la proteína. Ambas muestras se tratan con la enzima DNasaI y los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida. En ausencia de proteína aparecen fragmentos de todos los tamaños, pero la muestra tratada con la proteína de interés carece de las bandas correspondientes a la región de unión de la proteína que quedó protegida de la degradación. De esta forma se identifica el tamaño y la secuencia de la región del DNA que está en contacto con la proteína.

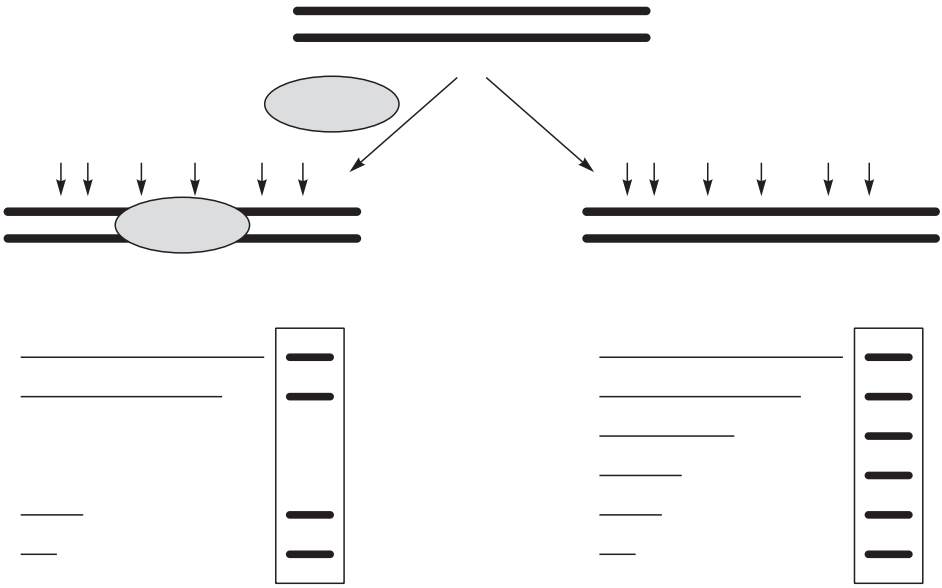


Figura 9.11. Identificación de proteínas de unión al DNA mediante experimento de huella por digestión con DNasaI.

9.6.3. Desplazamiento de la movilidad electroforética

La identificación de proteínas que se unen al DNA también puede realizarse mediante el desplazamiento de la movilidad electroforética del fragmento de DNA unido a la proteína. Al someter a electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida un fragmento de DNA, la movilidad del fragmento es menor si está unido a una proteína debido al mayor tamaño del complejo DNA-proteína que del DNA libre (mobility shift). Si se dispone de un anticuerpo frente a la proteína de unión al DNA, al incorporarlo en la mezcla de reacción producirá un complejo ternario anticuerpo-proteína-DNA de mayor tamaño, que presentará una movilidad electroforética aún menor que la del complejo DNA-proteína (supershift). De esta forma se puede identificar cual es la proteína que se une a una secuencia de DNA determinada (Fig. 9.12).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

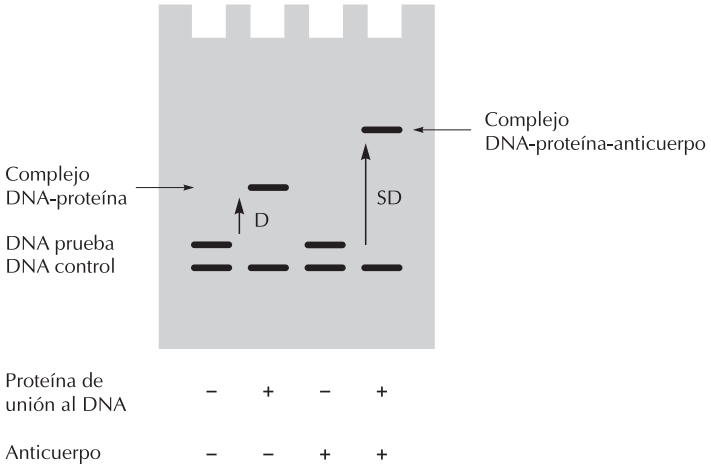


Figura 9.12. Identificación de proteínas de unión al DNA mediante desplazamiento de la movilidad electroforética. D (desplazamiento), SD (superdesplazamiento).

9.6.4. Sistemas de dos híbridos

Para demostrar que dos proteínas determinadas interaccionan entre sí, se utilizan los denominados sistemas de dos híbridos de levadura o de bacterias. En el sistema de levaduras, se fusionan los genes que codifican las posibles proteínas que interaccionan con las secuencias correspondientes a los dominios de unión al DNA y de activación, respectivamente, del activador transcripcional GAL4 de levaduras. Ambos componentes deben interaccionar para inducir la expresión de la fusión *GAL1-lacZ*. El gen *lacZ* codifica la β-galactosidasa, que se puede determinar fácilmente por la aparición de color azul en presencia del sustrato cromogénico X-gal, aunque también pueden realizarse fusiones con otros genes informadores. Si las dos proteínas interaccionan entre sí, se producirá la unión de los dos dominios del activador GAL4 y se detectará la actividad del producto del gen informador (actividad β-galactosidasa), pero si las dos proteínas estudiadas no pueden interaccionar, no se producirá la expresión de la fusión génica y no se observará la actividad β-galactosidasa (Fig. 9.13). También es posible utilizar un sistema similar de origen bacteriano basado en la fusión de los dominios N-terminal y C-terminal de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* a las proteínas de interes. En este caso, si las proteínas interaccionan entre sí se reconstituye la actividad adenilato ciclasa que permite la síntesis de AMP cíclico en un mutante *cya*$^-$ de *E. coli*, lo que permite la expresión del gen *lacZ*.

9.6.5. Fusión de genes reporteros

Una técnica muy poderosa y de fácil utilización para el análisis de la expresión génica es la fusión a los promotores de los genes cuya expresión se quiere caracterizar de ciertos genes denominados informadores, testigos o reporteros, que codifican proteínas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

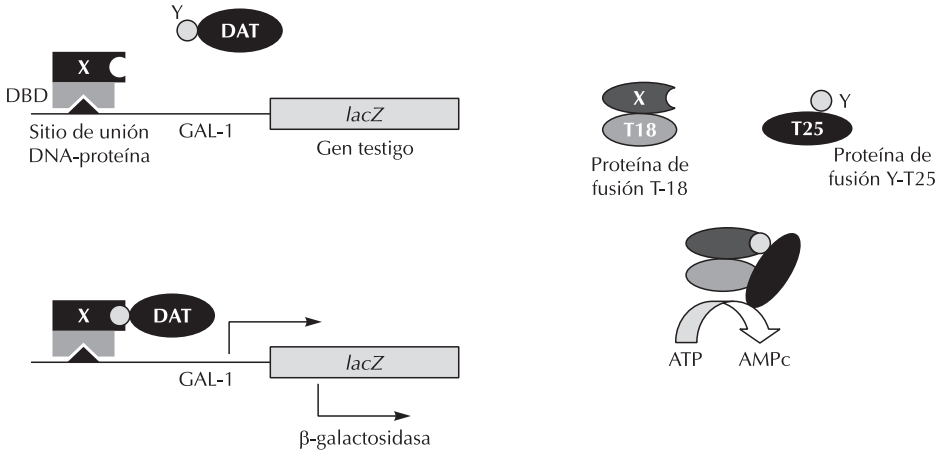


Figura 9.13. Detección de interacciones proteína-proteína mediante sistemas de dos híbridos. Izquierda: La interacción entre las proteínas de fusión X-DBD (Dominio de unión al DNA) e Y-DAT (Dominio de activación transcripcional) del factor GAL4 activa la transcripción de la fusión *Gal1-lacZ* y se sintetiza β-galactosidasa. Derecha: La interacción entre las proteínas de fusión X-T18 e Y-T25 pone en contacto las porciones T18 y T25 de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* que se activa y cataliza la síntesis de AMPc.

que se pueden determinar fácil y rápidamente, como el gen *lacZ* de la β-galactosidasa, los genes *lux* o *luc* de las luciferasas de bacterias o de luciérnaga, respectivamente, o el gen *gpf* de la proteína de fluorescencia verde. Así, al colocar por ejemplo el gen informador *lacZ* sin su promotor bajo el control del promotor del gen a caracterizar, se observará actividad β-galactosidasa en respuesta a aquellos factores que estimulen la expresión del gen que se está estudiando y no se detectará actividad en las condiciones en las que dicho gen este reprimido. En las denominadas fusiones transcripcionales, el gen reportero (*lacZ*) carece de su promotor pero posee intacta toda su restante información, incluyendo en el transcrito correspondiente la secuencia de unión al ribosoma y el triplete de inicio de la traducción, por lo que la proteína (β-galactosidasa) formada realmente no es una proteína de fusión sino la propia proteína nativa codificada por el gen reportero que se expresa bajo el control del promotor del gen de interés. En las fusiones traduccionales, el gen reportero se inserta en el gen de interés sin su promotor, sin su secuencia de unión de ribosoma y sin su triplete de inicio, por lo que se origina una proteína de fusión, como la β-galactosidasa con un extremo N-terminal variable según el gen donde se inserte. En este caso, la fusión debe realizarse en la fase de lectura correcta para producir la proteína de fusión, y cualquier factor que controle la expresión del gen de interés, ya sea a nivel transcripcional o traduccional, también controlará la aparición de la actividad β-galactosidasa (Fig. 9.14).

9.6.6. Fusión de colas de histidinas

Para comprobar que un gen clonado se expresa correctamente o para obtener una gran cantidad de proteína pura con fines clínicos, industriales o alimentarios, es ne-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

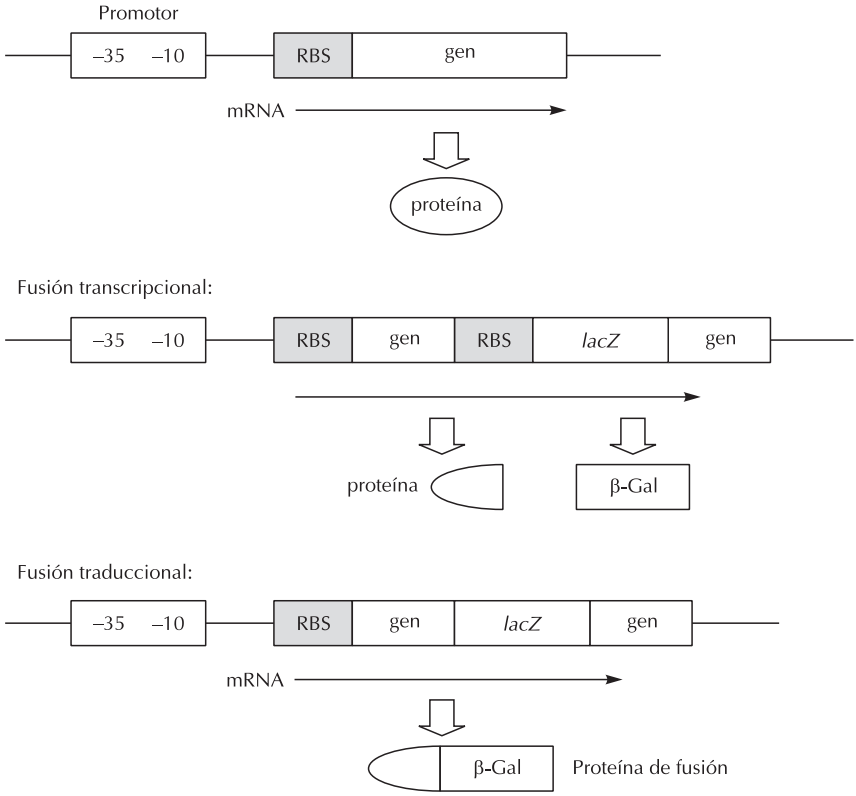


Figura 9.14. Construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de genes informadores. RBS (sitio de unión del ribosoma).

cesario introducir el gen de interés en un organismo modelo y analizar su expresión heteróloga. Generalmente el gen se clona en un vector de expresión adecuado, que lleva toda la información necesaria para la correcta expresión del gen insertado, y se introduce en la bacteria *E. coli*. Sin embargo, cuando se trabaja con genes eucarióticos que codifican proteínas que sufren modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones o acilaciones que no son realizadas normalmente en proteínas bacterianas, puede ser necesaria la utilización de otros sistemas de expresión en levaduras, células de insecto o células de mamífero para lograr la formación de una proteína funcional con actividad biológica. En los últimos años se han desarrollado todo un conjunto de vectores y sistemas que permiten la expresión de genes fusionados a secuencias marcadoras que posibilitan por un lado la identificación y cuantificación de la proteína formada, y, por otro, su purificación mediante cromatografía de afinidad. Una de las secuencias marcadoras más utilizadas es la denominada His-tag, ya que introduce seis restos de histidinas consecutivos, bien en el extremo N-terminal, bien en el extremo C-terminal de la proteína. Los vectores de expresión están diseñados para que al insertar el gen de interés en el sitio de clonación múltiple, y en la fase de lectura adecuada, la secuencia del vector que codifica la cola de polihistidinas quede

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

fusionada al extremo 5′ del gen de interés (lo que daría lugar a una proteína marcada en el extremo N-terminal), o al extremo 3′ del gen (proteína marcada en el extremo C-terminal), y generalmente la expresión del gen está controlada por un promotor regulable, como el promotor *lac* para inducir la expresión por isopropil tiogalactósido (IPTG). Al introducir la construcción en la estirpe adecuada de *E. coli* e inducir la expresión del gen por IPTG se produce una gran cantidad de la proteína marcada con la cola de polihistidina, lo que facilita su identificación mediante análisis inmunológico (Western blots) con anticuerpos antihistidinas y su purificación mediante cromatografía de afinidad en geles de agarosa con níquel-ácido nitrilo triacético, que retienen específicamente a las proteínas con histidinas porque estos restos quedan unidos al níquel. La proteína de interés se eluye finalmente con un gradiente de imidazol (Fig. 9.15).

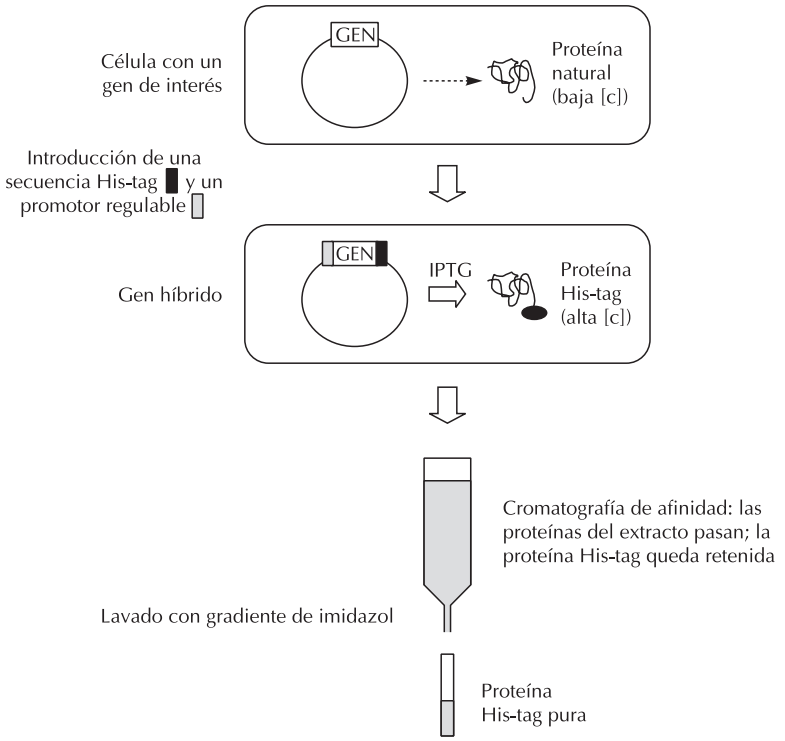


Figura 9.15. Producción y purificación de proteínas mediante colas de polihistidinas (His-tag).

9.7. Amplificación del DNA y del RNA por PCR y RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite obtener en gran cantidad un fragmento específico de DNA. Los requerimientos básicos son el DNA molde que hay que amplificar, una pareja de cebadores, normalmente oligonucleótidos de 18-30 pares de bases complementarios a los extremos 3′ de la región de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

DNA que se quiere amplificar, y una DNA polimerasa termoestable, como la DNA polimerasa *Taq* aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, con una mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato. El proceso requiere la repetición de una serie de ciclos (entre 20 y 40), de unos 2-5 min de duración, consistentes en tres etapas: desnaturalización, hibridación y elongación o replicación. La mezcla de reacción se calienta (95 °C) durante 30-120 s para disociar o desnaturalizar las cadenas del DNA, a continuación se enfría por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos y del DNA molde (entre 40 y 65 °C) para que se produzca la hibridación y los cebadores y se alineen con cada una de las cadenas de DNA, y finalmente se calienta de nuevo a la temperatura óptima de la DNA polimerasa (72 °C) para copiar las cadenas. Los aparatos denominados termocicladores permiten la automatización de este proceso de calentamiento/enfriamiento, que se repite un determinado número de ciclos (de 20 a 40) hasta obtener la cantidad de DNA deseada. Estos fragmentos amplificados de DNA suelen tener un tamaño comprendido entre 0,1 y 3 kb y pueden ser clonados para su estudio posterior. Como al copiar un fragmento bicatenario de DNA aparecen dos fragmentos idénticos, en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA y por ello se produce un proceso exponencial donde tras n ciclos se producirán 2^n copias. Así, con 30 ciclos de amplificación se pueden obtener $2^{30} = 10^9$ copias del DNA (Fig. 9.16).

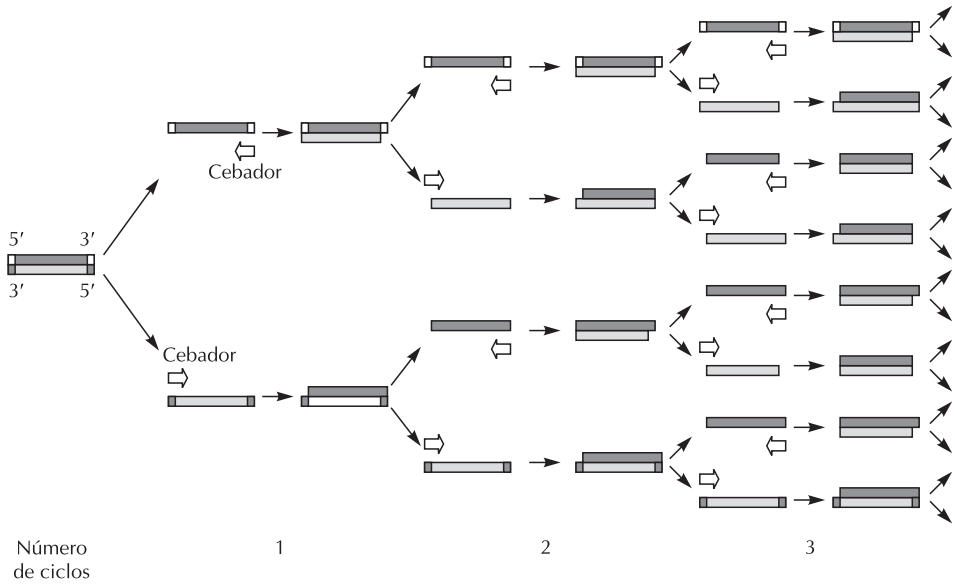


Figura 9.16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La enorme capacidad de amplificación de esta técnica permite obtener cualquier cantidad deseada de DNA a partir de muestras poco concentradas, lo que ha posibilitado las pruebas forenses por análisis de DNA a partir por ejemplo de un simple pelo, el diagnóstico de enfermedades debidas a anormalidades genéticas a partir de mues-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tras con muy pocas células, o incluso el estudio y secuenciación del DNA de especies extinguidas o fósiles. Además, la técnica de PCR puede ser utilizada para introducir mutaciones concretas en las secuencias de DNA, por lo que también es de gran utilidad en los procesos de mutagénesis dirigida que se comentarán más adelante.

En los últimos años han surgido diversas modificaciones derivadas de la PCR tradicional para mejorar su rendimiento, buscar nuevas aplicaciones o amplificar moléculas de RNA en lugar de DNA. Así, la PCR larga (L-PCR) logra amplificar fragmentos de 40 kb utilizando una mezcla de las DNA polimerasas *Taq*, que carece de actividad correctora pero es muy eficaz en la elongación, y *Pfu*, que posee la actividad correctora que evita la introducción de errores en la elongación de las cadenas. La PCR anidada se utiliza para aumentar tanto la especificidad de la amplificación como el factor de amplificación. Consiste en realizar una segunda reacción de PCR utilizando dos nuevos cebadores que hibridan con regiones internas del fragmento previamente amplificado en la primera reacción de PCR. La PCR con adaptadores permite amplificar una secuencia desconocida de DNA al unir a los fragmentos obtenidos al digerir el DNA con una enzima de restricción unos oligonucleótidos sintéticos (adaptadores) y utilizar para la reacción de PCR los cebadores correspondientes a dichas secuencias. La PCR asimétrica permite obtener copias de cadena sencilla del DNA al añadir diferentes cantidades de los cebadores para que, al agotarse el que se añade a menor concentración tras varios ciclos de amplificación, sólo pueda amplificarse una de las cadenas con el cebador más abundante. La PCR inversa se utiliza para clonar regiones desconocidas de DNA adyacentes a secuencias conocidas. Tras cortar con una enzima de restricción el DNA a ambos lados de la región que se pretende amplificar, se circulariza el fragmento obtenido y se realiza la reacción de PCR con los cebadores que hibridan con los extremos 5′ de las secuencias conocidas, lo que permite obtener fragmentos de DNA lineales del tamaño comprendido entre ambos cebadores. Finalmente, la RT-PCR o PCR con transcriptasa inversa, es una adaptación de la técnica de PCR a la amplificación de moléculas de RNA, generalmente RNA mensajero, para la síntesis del correspondiente cDNA. Por lo tanto, el molde utilizado es RNA pero el producto final obtenido es DNA. Esta técnica también se puede adaptar para cuantificar la expresión de un determinado gen (PCR múltiple cuantitativa en tiempo real) ya que el número de ciclos necesarios para obtener una determinada cantidad de producto amplificado depende de la cantidad de moléculas de RNAm presentes inicialmente.

9.8. Mutagénesis dirigida o *in vitro*

En la actualidad se han desarrollado diferentes técnicas que permiten alterar específicamente las secuencias deseadas en el DNA de los genes clonados para obtener mutaciones que pueden dar lugar a proteínas modificadas para sus aplicaciones terapéuticas o industriales. Entre los objetivos de los procesos de mutagénesis dirigida están la creación o eliminación de sitios de corte en el DNA para enzimas de restricción, la modificación de secuencias promotoras para afectar la regulación o el control de la expresión génica, la realización de estudios de la relación estructura-función de las proteínas, y sobre todo, el diseño de nuevas proteínas mediante la modificación

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de proteínas con fines industriales, terapéuticos o alimenticios. Así, se pueden realizar mutaciones específicas que cambian algunos aminoácidos de las proteínas para lograr cambiar la afinidad de las enzimas por sus sustratos o adquirir la capacidad de utilización de nuevos sustratos, aumentar la tolerancia a la temperatura, la salinidad o la degradación proteolítica de las proteínas, o modificar la regulación de sus actividades biológicas. Las principales técnicas de mutagénesis se basan en la utilización de oligonucleótidos sintéticos que incorporan en su secuencia los cambios o mutaciones específicos deseados, aunque según el objetivo pretendido, también se pueden realizar mutagénesis aleatorias en los fragmentos de DNA. La mutagénesis dirigida utilizando oligonucleótidos con mutaciones definidas se puede efectuar en genes clonados en plásmidos, generalmente asociando la mutación a un cambio en la resistencia a antibióticos codificada por el plásmido (Fig. 9.17).

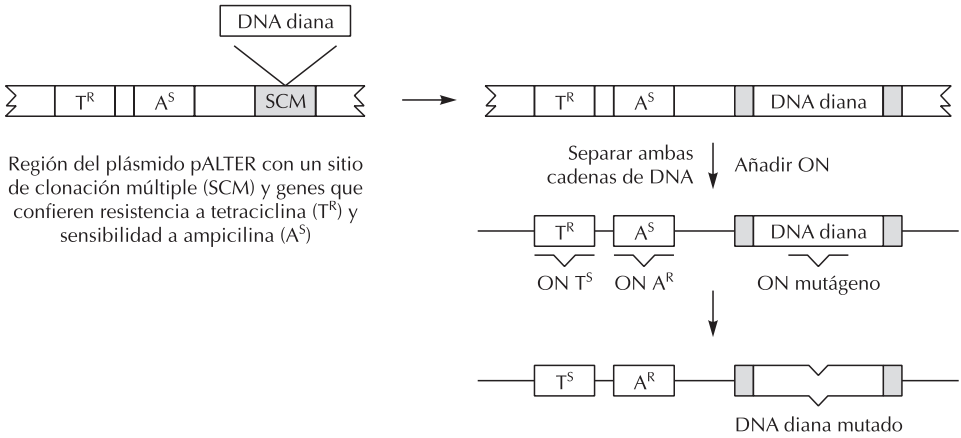


Figura 9.17. Mutagénesis dirigida de un gen clonado en un plásmido con oligonucleótidos. ON (oligonucleótido).

También es posible la utilización de cebadores con mutaciones en reacciones de amplificación por PCR, lo que permite el enriquecimiento en el gen mutante por el propio proceso de amplificación (Fig. 9.18).

La PCR también permite la realización de mutagénesis aleatoria de las bases de una determinada secuencia génica al explotar el hecho de que la *Taq* DNA polimerasa carece de actividad correctora y se puede incrementar la probabilidad de incorporación de nucleótidos incorrectos en presencia de Mn^{2+} y variando la concentración relativa de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) en la mezcla de reacción.

9.9. Secuenciación del DNA y análisis de las secuencias

El entendimiento de la estructura y función de una proteína viene determinado por la secuencia del gen que la codifica. La determinación de la secuencia o secuenciación de un gen permite innumerables aplicaciones, como establecer estrategias de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

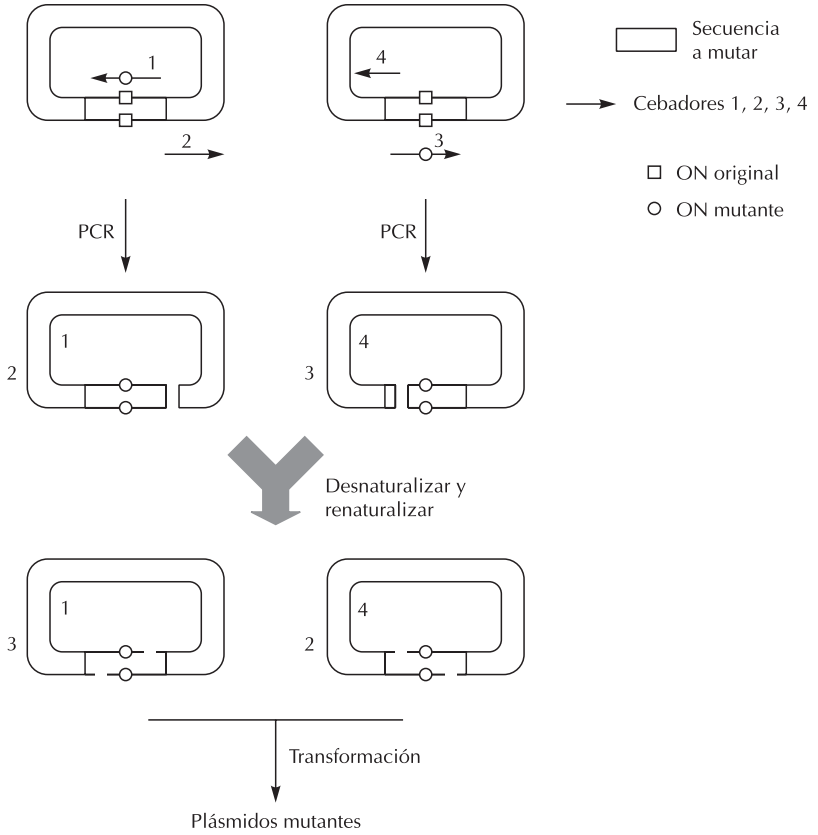


Figura 9.18. Mutagénesis dirigida con oligonucleótidos mediante PCR. ON (oligonucleótidos).

clonación, mutagénesis dirigida, PCR, etc., realizar mapas físicos de restricción detallados, identificar genes y conocer la organización génica, determinar las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las proteínas codificadas por los genes secuenciados, así como sus propiedades (masa molecular, punto isoeléctrico, etc.) y su posible localización subcelular, establecer relaciones filogenéticas entre organismos y caracterizar el flujo de genes entre poblaciones, realizar diagnóstico de enfermedades, o caracterizar las rutas metabólicas presentes en los organismos para diseñar posibles usos biotecnológicos de las mismas, entre otras muchas aplicaciones. Por todo ello, en la segunda mitad del siglo XX se planteó la posibilidad de secuenciar el genoma humano completo, así como los genomas de varios organismos modelo incluyendo bacterias (*Escherichia coli* entre muchas otras), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), gusanos nematodos (*Caenorhabditis elegans*), insectos como la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), y vertebrados como el ratón o el chimpancé. La realización de todos estos proyectos ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación del DNA y a su automatización, así como a la puesta a punto de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

importantes herramientas bioinformáticas para el ensamblado, análisis y comparación de las múltiples secuencias obtenidas, y ha llevado a una revolución en nuestros conocimientos científicos y sus posibles aplicaciones, que se ha dado en llamar la era post-genómica. A continuación se resumen los fundamentos básicos de los métodos de secuenciación del DNA, en particular del método enzimático de Sanger, y se comentan algunos aspectos relativos al análisis de las secuencias obtenidas.

9.9.1. Método químico

La secuenciación del DNA puede realizarse por dos protocolos experimentales diferentes, ambos desarrollados y publicados en el año 1977: el denominado método químico de Alan Maxam y Walter Gilbert y el método enzimático o de terminación de la cadena por didesoxinucleótido de Fred Sanger. Ambos métodos comparten el hecho de obtener una población de fragmentos de DNA de todos los tamaños posibles, que deben estar marcados (inicialmente mediante radiactividad) para su detección, y el método de separación de los mismos, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida que puede diferenciar los fragmentos cuyos tamaños difieren en una sola base. En el método químico, se parte generalmente de DNA de doble cadena, que se marca en el extremo 5′ con ^{32}P. A continuación se induce la hidrólisis selectiva del DNA mediante la modificación química de las bases y la fragmentación final de dichas bases modificadas. Se realizan cuatro reacciones diferentes para modificar específicamente las bases, una tratando con dimetilsulfato para las G, otra con ácido fórmico para las bases púricas (A + G), otra con hidracina para las bases pirimidínicas (T + C) y la última con hidracina y NaCl para las C, y todas ellas se tratan con piperidina para romper las bases modificadas. Los fragmentos obtenidos en estas cuatro reacciones para G, A + G, T + C y C se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida y las bandas correspondientes a cada fragmento se visualizan por autorradiografía, leyéndose la secuencia de 5′ a 3′ de abajo hacia arriba, es decir, de menor a mayor tamaño de los fragmentos. Cuando sólo aparece una banda en la calle de la reacción A + G se trata de una A en la secuencia, cuando aparecen dos bandas del mismo tamaño en las calles de las reacciones G y A + G se trata de una G en la secuencia, cuando aparecen bandas en las calles T + C y C se trata de una C y si sólo aparece la banda en la calle de la reacción T + C se trata de una T (Fig. 9.19).

9.9.2. Método enzimático

En el método enzimático, se parte de DNA de cadena sencilla (DNA desnaturalizado o clonado en vectores derivados del fago M13) y de un cebador que hibrida con el extremo 3′ de la región que se quiere secuenciar y que aporta el extremo 3′-OH necesario para la elongación de la cadena mediante una DNA polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), con al menos uno de ellos marcado radiactivamente. Se realizan también cuatro reacciones de síntesis de la cadena, cada una de ellas con un didesoxirribonucleósido diferente (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP), que actúan como inhibidores de la elongación ya

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

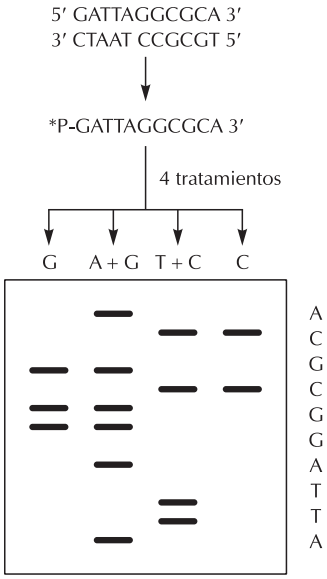


Figura 9.19. Secuenciación del DNA por el método químico de Maxam-Gilbert. La lectura de la secuencia se hace de abajo arriba.

que carecen del extremo 3′-OH necesario para la continuidad del proceso de síntesis del DNA. Por ello, si se incorpora el dNTP la síntesis progresa normalmente pero si la DNA polimerasa introduce el correspondiente ddNTP se detiene la elongación de la cadena y termina el proceso de síntesis. De esta forma se obtiene en cada reacción un conjunto de todos los fragmentos posibles que acaban en A, C, G o T, respectivamente. La separación de dichos fragmentos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida permite leer de abajo hacia arriba la secuencia de 5′ a 3′ de la cadena complementaria a la que servía de molde en el DNA de partida.

9.9.3. Secuenciación automática

El método enzimático permite la automatización del proceso y actualmente los aparatos de secuenciación o secuenciadores automáticos utilizan marcajes por fluorescencia que permiten la detección de los fragmentos mediante un detector de láser. Además, la utilización de fluoróforos diferentes en cada ddNTP permite realizar el proceso en una única reacción, y en algunos aparatos los fragmentos obtenidos pueden separarse en un capilar (Fig. 9.20).

La secuenciación automática del DNA ha permitido la determinación de la secuencia de los genomas completos de una gran variedad de organismos modelo, incluyendo el genoma humano. Actualmente, para la secuenciación completa de un genoma se suele utilizar la estrategia denominada “shot-gun” que consiste en romper de forma aleatoria todo el genoma del organismo en pequeños fragmentos que se

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

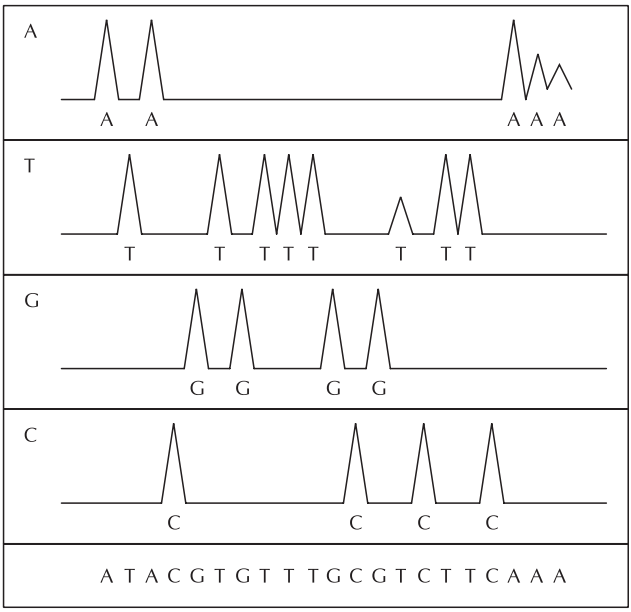


Figura 9.20. Secuenciación automática del DNA por el método del 2′-3′-didesoxinucleótido. Los fragmentos se detectan mediante 4 marcadores fluorescentes (uno para cada base).

clonan para obtener una genoteca y se secuencian los dos extremos de todos los fragmentos o clones obtenidos. Las secuencias obtenidas se ensamblan y se procede a la identificación o anotación de las regiones codificantes (genes) mediante programas informáticos adecuados. Gran parte de la información obtenida es redundante, pero esta técnica permite obtener en poco tiempo toda la información genética del organismo. Los procesos de ensamblado de los fragmentos y de comparación de las secuencias han sido posible gracias al desarrollo de la bioinformática y de sus múltiples herramientas. Hoy día existen bases de datos para secuencias de nucleótidos (GenBank, EMBL) y de proteínas (PirProtein, SwissProt) y múltiples programas de comparación y análisis de secuencias, entre los que destacan los denominados FASTA y BLAST, a los que se puede acceder a través de diferentes direcciones de internet, principalmente las del European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk) y las de los National Institutes of Health americanos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

9.10. Genómica y proteómica

El conocimiento de cómo una célula coordina *todas* sus actividades y procesos bioquímicos es esencial para comprender el funcionamiento de un ser vivo. La bioquímica tradicional ha utilizado aproximaciones reduccionistas, aislando los diferentes componentes moleculares y estudiando el funcionamiento individualizado de genes o proteínas. Sin embargo, el conocimiento de la información genética completa de un organismo hace posible la utilización de técnicas que permiten un enfoque

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

integrador ya que proporcionan una información completa sobre el entramado global de interacciones moleculares y celulares en los organismos. Esto está transformando radicalmente las investigaciones biológicas, ya que en lugar de abordar el estudio de procesos concretos se pretende determinar el comportamiento sinérgico de todos los procesos celulares. Estas técnicas de análisis funcional de los genomas (genómica funcional) pueden enfocarse hacia tres grandes corrientes tecnológicas y experimentales: la resolución sistemática de las estructuras de las proteínas que realizan las funciones celulares, la identificación de las interacciones entre proteínas y entre DNA y proteínas, y el análisis de la expresión global de todos los genes en unas determinadas condiciones ambientales o en diferentes estados celulares.

Reflejo de esta situación es la terminología "-oma" tan frecuentemente utilizada en la actualidad. Si el genoma se define como la secuencia genética completa de un organismo, incluyendo tanto la totalidad de sus genes como las secuencias no codificantes, el transcriptoma sería el conjunto de transcritos o RNA mensajeros presentes en una célula como resultado de la expresión de los genes requeridos en un momento y en unas condiciones determinadas, y el proteoma sería el conjunto de las proteína presentes en la células en ese momento y en esas condiciones concretas. Es decir, el genoma es la dotación genética completa, y por lo tanto es constante y estable salvo mutaciones, mientras que transcriptoma y proteoma son las dotaciones de transcritos o de proteínas, respectivamente, y son muy variables y dinámicos para permitir la adaptación del organismo a situaciones concretas.

9.10.1. Matrices de DNA

Entre las técnicas genómicas más utilizadas están las matrices de DNA ("DNA arrays"), que permiten analizar la expresión génica a nivel del genoma completo y comparar dicha expresión en células sometidas a diferentes tratamientos o condiciones. La idea básica es fijar mediante un proceso robotizado una secuencia de DNA específica de cada gen de un organismo en un soporte sólido para obtener un microchip de DNA, de forma que cada punto del chip corresponde a un gen determinado. Se extrae el RNA de células en una situación o condiciones determinadas y se convierte en cDNA mediante la trascriptasa inversa en presencia de un dNTP con un fluoróforo, de forma que cada molécula de cDNA queda marcada. También se extrae el RNA de células expuestas a otras condiciones diferentes o en otra situación y se realiza la síntesis del cDNA introduciendo otro marcador fluorescente diferente. Por ejemplo, se puede marcar el cDNA obtenido a partir de células normales con un fluoróforo verde y el cDNA sintetizado a partir de células tumorales con color rojo. Se realiza entonces la hibridación del microchip con dichas sondas marcadas y se compara la imagen obtenida por el detector de láser para ver la expresión diferencial de cada gen del genoma en ambas situaciones. Si un gen se expresa en una única condición (p.e., células tumorales), el correspondiente punto aparecerá del color de su fluoróforo (rojo), ya que sólo el RNA extraído de dichas células contiene el transcrito complementario a la secuencia de dicho gen fijada en el microchip. Por la misma razón, si otro gen diferente sólo se expresa en la otra situación (p.e., células

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

normales), el color que aparece es el correspondiente al otro marcador fluorescente (verde) y si la expresión de otros genes es similar en ambas situaciones aparecerán con un color intermedio (de amarillo a naranja), cuya tonalidad variará en función del grado de diferencia de expresión (Fig. 9.21).

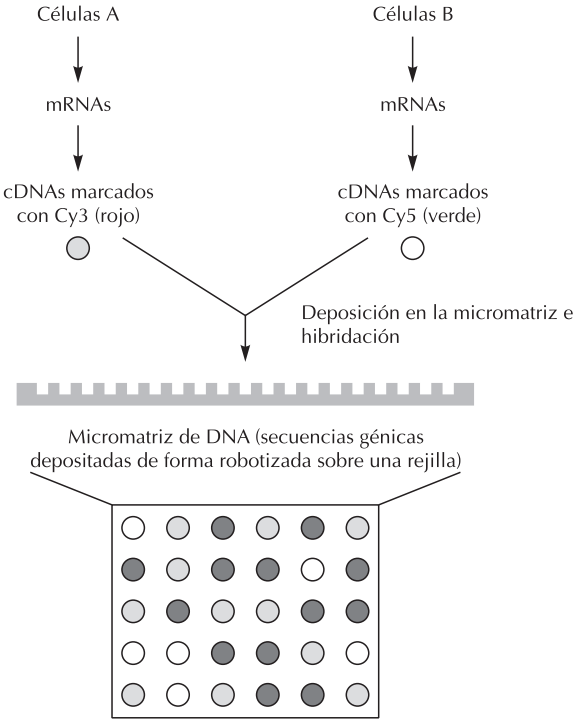


Figura 9.21. Análisis de la expresión génica global mediante micromatrices de DNA (chips de DNA). Cy3 y Cy5 son fluoróforos rojo y verde, respectivamente. El color rojo indica que un determinado gen (localizado en la micromatriz por su posición) se expresa más en las células A que en las B. Un color verde representa una mayor inducción en las células B. Un color amarillo-naranja señala que el gen se expresa en ambos tipos celulares. Un ordenador calcula el porcentaje de expresión diferencial de cada gen.

Con esta técnica es posible analizar los efectos globales sobre la expresión génica de cualquier condición ambiental, situación de estrés, patología, etc. También es posible determinar la predisposición a padecer ciertas enfermedades, como el cáncer, ya que la expresión de ciertos genes relacionados con el desarrollo tumoral indica que esas células podrían estar en fase de transformación.

9.10.2. Electroforesis bidimensional

Entre las técnicas de análisis del proteoma o conjunto de proteínas que están presentes en una célula en un momento determinado, destaca la electroforesis bidimen-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

sional (2D). Se obtiene un extracto de las células, en el que suelen estar presentes más de 1.000 proteínas diferentes, y se realiza una primera separación de dichas proteínas en función de sus puntos isoeléctricos (pI), mediante el denominado enfoque isoeléctrico. Para ello se aplica la muestra en un gel de electroforesis con un gradiente de pH (por ejemplo, entre 4 y 7) y cada proteína se desplaza según su carga eléctrica. Como la carga depende del pH, cuando una proteína llega en el gradiente a la zona de pH correspondiente a su pI, en la que su carga neta es cero, cesa en su desplazamiento por el gel. De esta forma, las proteínas con diferentes pI se separan en una primera dimensión quedando las proteínas más acídicas (con cargas negativas y pI más bajos) en la zona del polo positivo (en la izquierda del gel) y las proteínas básicas (con cargas positivas y pI más elevado) en la zona del polo negativo (a la derecha del gel). A continuación se realiza la separación de las proteínas en una segunda dimensión en función de su tamaño en un gel de electroforesis desnaturalizante en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), de forma que las proteínas de mayor tamaño se desplazan menos por su mayor rozamiento, quedando en la parte superior del gel, y las más pequeñas presentan mayor movilidad y aparecen en la parte inferior del gel. Se procede a la tinción de las proteínas con plata o colorantes y se obtiene un gel en el que cada una de las proteínas celulares queda identificada por un punto que corresponde a unas coordenadas determinadas de masa molecular y pI (Fig. 9.22).

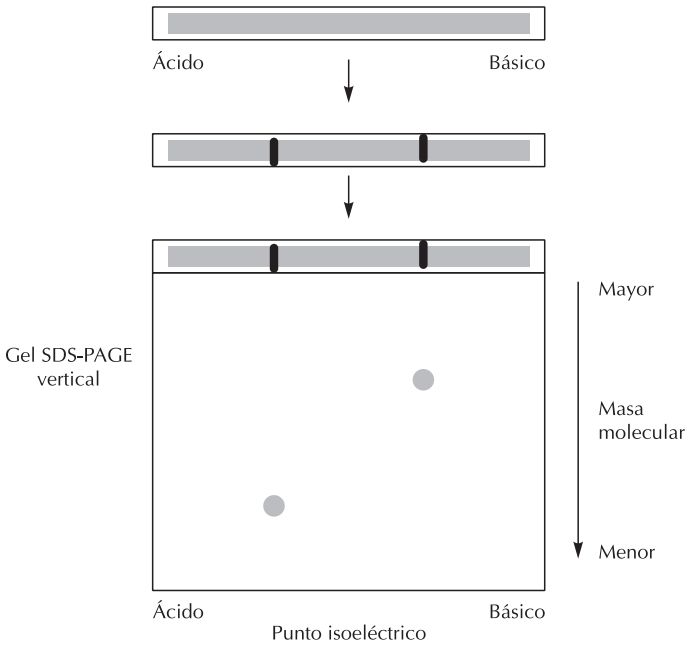


Figura 9.22. Análisis de la expresión de proteínas mediante electroforesis bidimensional. SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

Las proteínas pueden ser aisladas del gel a partir de las manchas correspondientes y se puede abordar la identificación de la proteína correspondiente mediante espec-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

trometría de masas y determinación de la secuencia de su extremo N-terminal, que se compara con las secuencias depositadas en los bancos de datos. La comparación de los geles obtenidos utilizando extractos celulares en condiciones diferentes permite determinar que proteínas están presentes o ausentes en una situación determinada respecto a una situación control (Figs. 9.23 y 9.24).

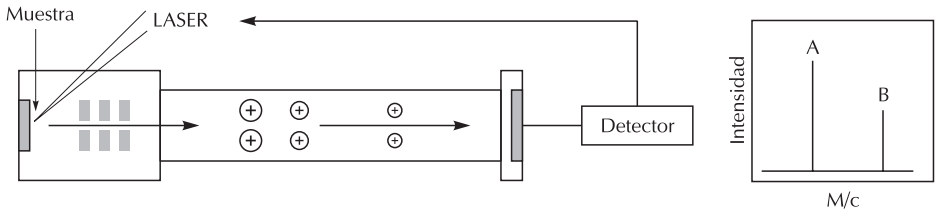
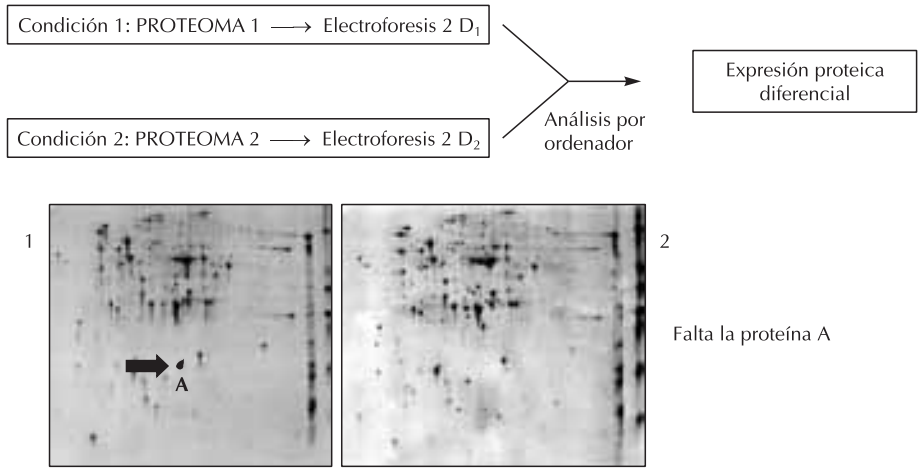


Figura 9.23. Análisis de proteínas mediante espectrometría de masas asistida por láser (MALDI-TOF). Una pequeña muestra de proteína (pmol o fmol) se adsorbe en una matriz y se ioniza mediante un haz de láser ("Matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI"). Los iones se aceleran en el tubo de vuelo y su llegada es captada por un detector. El pulso de láser mide el tiempo de vuelo ("Time of flight, TOF"). Cada proteína tiene un recorrido característico por su relación carga/masa que proporciona su masa molecular exacta. A la derecha, espectro de masas de dos proteínas A y B. M/c (Masa/carga).



Análisis del proteoma:

1. Extracción de la proteína A del gel
2. Tratamiento con tripsina
3. Análisis de los péptidos por MALDI-TOF ⟶ Identificación de la proteína A (Banco de datos)
4. Microsecuenciación de los péptidos por ESI/MS/MS (ElectroSpray Ionization/Mass Spectrometry)
5. Búsqueda comparativa de secuencias en los Bancos de Datos (Bioinformática)

Figura 9.24. Análisis del proteoma mediante electroforesis 2D y espectrometría de masas MALDI. Cada proteína posee un espectro MALDI-TOF característico (semejante a una huella dactilar).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

9.10.3. Metagenómica

Dadas las dificultades que entraña el aislamiento y cultivo de la mayoría de los microorganismos que proliferan en ambientes naturales se ha desarrollado una rama de la genómica, la metagenómica, que consiste en la aplicación de tecnologías de secuenciación e identificación de genes y proteínas a microorganismos no cultivados. La metagenómica está ya proporcionando resultados muy prometedores en cuanto al estudio de fenómenos de simbiosis, competición y comunicación entre microorganismos y, sobre todo, en el papel de éstos en la catálisis de los ciclos biogeoquímicos (biominería), y de los procesos de biodegradación de compuestos xenobióticos. Por lo que respecta a la biotecnología ambiental, la aplicación de estas tecnologías presenta indudables ventajas en cuanto a la identificación de nuevos antibióticos naturales y al análisis de nuevas funciones génicas relacionadas con el papel de los microorganismos en la modificación del medio ambiente. Además, la metagenómica va a ser decisiva en el estudio de ecosistemas microbianos complejos como la cavidad bucal, el tubo digestivo, las rizosferas de plantas, los bentos (mar de los sargazos), los ecosistemas propios de ambientes extremos (humeros submarinos) y las simbiosis (líquenes).

Bibliografía

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed. John Wiley & Sons, New York.

CAMPBELL, A. M., y HEYER, L. J. (2002). *Discovering Genomics, Proteomics, and Bioinformatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

GLICK, B. R. y PASTERNAK, J. J. (2003). *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. ASM Press, Washington.

HANDELSMAN, J. (2004). "Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms". *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 669-685.

MICKLOS, D. A. y FREYER, G. A. (2003). *DNA Science. A First Course*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

NEWTON, C. R. y GRAHAM, A. (1997). *PCR*. 2nd ed. Bios. Sci. Publ. Springer-Verlag.

SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

WINNACKER, E. L. (1987). *From Genes to Clones. Introduction to Gene Technology*. VCH, Weinheim.

WU, R., GROSSMAN, L. y MOLDAVE, K. (1989). *Recombinant DNA Methodology*. Academic Press.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 10
CONTAMINACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA

Glosario
10.1. Introducción a la contaminación química y biológica
10.2. Residuos
10.2.1. Generación de residuos tóxicos
10.2.2. Clasificación
10.3. Compuestos xenobióticos
10.3.1. Clasificación de los interferidores hormonales
Organoclorados recalcitrantes
Plaguicidas
Alquilfenoles
Bisfenol A
Ftalatos
10.3.2. Actuación y efectos de los interferidores hormonales
10.4. Biodegradación
10.4.1. Biorremediación
Tipos de biorremediación
Modelización de los reactores
10.5. Biocorrosión y biodeterioro
10.5.1. Definición y tratamientos
10.5.2. Métodos de identificación y control de la biocorrosión
Identificación de la biocorrosión
Prevención y control
10.6. Contaminación biológica
10.6.1. Resistencia a antibióticos
10.6.2. Plantas transgénicas
Técnicas de transformación de plantas
Etapas de la construcción de una planta transgénica
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Biorremediación: Tratamiento de compuestos tóxicos para su eliminación.
Biorreactor: Recipiente de contención donde se realizan procesos de biorremediación.
Biopelícula (biofilm): Superficie inorgánica a la cual se adhieren microorganismos formando capas.
Compuesto xenobiótico: Sustancia que presenta estructura diferente a los compuestos naturales y es generada principalmente como consecuencia de actividades industriales.
EPA: Agencia de Protección medioambiental de Estados Unidos.
Interferidor hormonal: Compuesto xenobiótico que afecta a los sistemas hormonal y nervioso.
Mineralización: Degradación de un compuesto hasta CO_2 y CH_4 (anaerobiosis) o CO_2 (aerobiosis).
ppm: partes por millón.
Recalcitrancia: Resistencia a la degradación.
Residuo: Objeto inmóvil sin uso conocido y que está permanentemente descartado.
Transgén: Gen exógeno que proviene de otro organismo.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

10.1. Introducción a la contaminación química y biológica

La contaminación se define como un desequilibrio entre la entrada (producción) y la salida (descomposición) de los ecosistemas como consecuencia de una perturbación en el transporte (horizontal) de una materia que no ha sido asimilada por la evolución (ver Capítulo 1).

En la época romana, muchas de las personas acaudaladas morían de saturnismo (ingestión de plomo) y, en parte, el declive del Imperio Romano pudo deberse a la psicosis que originaba en los emperadores romanos estas muertes. Sin embargo, los problemas de la contaminación surgen con la Revolución Industrial. De modo gradual se fueron generando residuos inorgánicos, tales como el plomo y el mercurio, y en el siglo XX comenzó a generarse gran cantidad de productos orgánicos sintéticos. Al principio, las políticas gubernamentales no prestaban interés por estos residuos, y casi no se tomaron medidas porque se confiaba en la capacidad del medio ambiente para asimilarlos, o, simplemente, se desconocían sus efectos devastadores.

Con el desarrollo de la Química, la Epidemiología y la Toxicología, se empezó a comprender los efectos, a corto y largo plazos y a escalas individual y ecosistémica, de los compuestos tóxicos. Sirvan los ejemplos siguientes:

1) DDT (diclorodifeniltricloroetano). En 1962 se hizo pública la presencia de este plaguicida en calamares del fondo marino, en pingüinos de la Antártida y en tejidos grasos del hombre. En aves acuáticas, los efectos del DDT se asociaron con infertilidad y en el caso del hombre se asoció con el incremento de la aparición de cánceres.
2) Mercurio. En estado líquido se utilizaba para curar resfriados, ya que no se conocían sus efectos colaterales negativos. Las sales de mercurio se emplearon en la industria textil de los Países Bajos para hacer sombreros (locura del sombrero). El mercurio inorgánico es metilado en los sedimentos y después es ingerido por crustáceos, pasando a la cadena alimenticia hasta llegar a los humanos. El metilmercurio produce parálisis y pérdidas sensoriales.
3) PCB (policlorobifenilos). Su uso como insecticidas fue extensivo durante los años 60 y 70. Además, se utilizaron en la industria de los refrigerantes, de plastificantes, y en la producción de papel sin carbono. Los efectos sobre la población son un aumento en abortos y defectos de nacimiento.

A partir de los años 60 se empezó a tener conciencia colectiva del problema de los contaminantes. La mitad del presupuesto gastado por los Estados Unidos destinado a asuntos medioambientales ha sido a partir de los años 90 para la gestión de residuos sólidos (Fig. 10.1).

10.2. Residuos

La EPA (Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos) define “residuo” como un objeto inmóvil sin uso conocido y que está permanentemente descartado.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

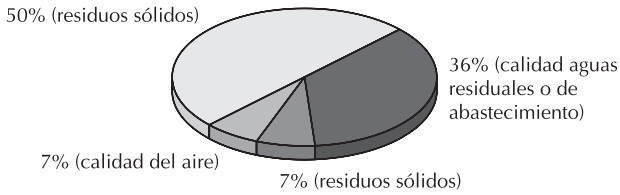


Figura 10.1. Partición del presupuesto destinado a temas ambientales en los Estados Unidos.

Aunque esta definición hace referencia sólo a residuos sólidos, también se pueden encontrar residuos líquidos que son altamente tóxicos. Además, hay residuos líquidos que son almacenados y posteriormente exportados que se convierten en residuos sólidos.

Otra definición más completa realizada por el Programa Medioambiental de las Naciones Unidas define los residuos tóxicos como sólidos, lodos, líquidos, o gases envasados que no son radiactivos o infecciosos y que debido a su actividad química, tóxica, explosiva o corrosiva son fuente de peligro para la salud o para el medio ambiente, de modo individual o en contacto con otros residuos.

Por lo tanto, para que un residuo sea catalogado de peligroso o tóxico debe tener alguna de las siguientes características:

a) Corrosión. Residuos altamente ácidos o alcalinos.
b) Inflamabilidad. Residuos de fácil combustión que ofrecen riesgo de incendio.
c) Reactividad. Residuos dañinos por reacciones súbitas (explosivos).
d) Toxicidad. Residuos capaces de desprender concentraciones importantes de sustancias específicas en el agua.

10.2.1. Generación de residuos tóxicos

Los residuos tóxicos tienen su origen en una amplia gama de actividades industriales, agrícolas, comerciales o domésticas (Fig. 10.2).

a) Los residuos industriales.

   Son de origen muy diverso y comprenden: materias primas ya agotadas, material procesado sin uso alguno, material proveniente de lodos procesados (tratamientos de aguas residuales, recuperación de otros residuos tóxicos, etc.) y productos químicos comerciales.

b) Los generados en pequeñas cantidades.

   En este grupo se encuentran los servicios de limpieza en seco, mantenimiento de automóviles, laboratorios fotográficos y laboratorios de análisis.

c) Residuos tóxicos generados en el ámbito doméstico.

   Este grupo comprende productos relacionados con pinturas, productos de limpieza, plaguicidas y compuestos químicos utilizados para el automóvil.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

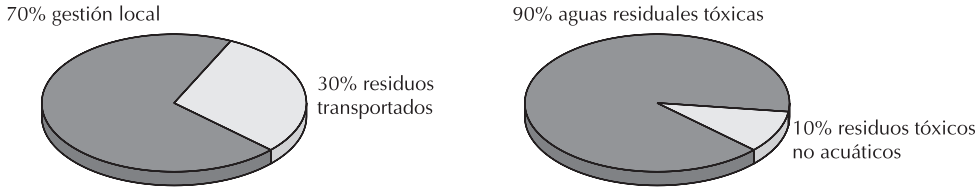


Figura 10.2. Residuos generados en Estados Unidos por año.

10.2.2. Clasificaciones

a) Clasificación según la EPA.
   1) Residuos de procedencia específica ("K"): generados en procesos concretos de ciertas actividades industriales (industria de plaguicidas, industria del hierro y acero, tratamiento de aguas residuales con pentaclorofenol, anilinas, etc.
   2) Residuos de procedencia inespecífica ("F"): generados en la fabricación de compuestos de uso habitual que posteriormente sufren otras modificaciones (disolventes halogenados en procesos de desengrasado y electroplastia; hidrocarburos alifáticos clorados en limpieza de reactores).
   3) Residuos relacionados con productos químicos concretos de índole comercial ("P" y "U"). Estos residuos son considerados tóxicos cuando son descartados en su forma pura, o bien, son eliminados en contenedores y vertidos.

b) Clasificación general.
   1) Según su forma o fase de distribución (sólidos, líquidos, etc.).
   2) Residuos orgánicos o inorgánicos.
   3) Según su categoría química (disolventes, metales, etc.).
   4) Según los componentes peligrosos que afecten a su tratamiento.

10.3. Compuestos xenobióticos

Los compuestos orgánicos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) Compuestos biogénicos o naturales, que son sintetizados por los seres vivos y son biodegradables.
b) Compuestos xenobióticos, que son sintetizados por el hombre, en su mayoría proceden de actividades industriales, y tienen estructuras diferentes a los naturales. Por lo tanto, la toxicidad de los compuestos xenobióticos radica en su gran persistencia en el medio ambiente, la mayoría son compuestos cancerígenos y, además, pueden actuar como interferidores hormonales (véase Capítulo 17).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

10.3.1. Clasificación de los interferidores hormonales

Organoclorados recalcitrantes

Las dioxinas se producen principalmente en el blanqueo del papel con cloro, producción e incineración de PVC y síntesis de algunos compuestos organoclorados (fenoxiacéticos clorados).

Los policlorobifenilos se empezaron a comercializar en 1929 y se usaron en transformadores eléctricos, cosméticos, barnices, tintas y retardantes del fuego. La producción se prohibió en muchos países pero el problema persiste en lo acumulado en transformadores.

Plaguicidas

- Herbicidas. Entre ellos se encuentran los compuestos fenoxiacéticos clorados y la atrazina.
- Insecticidas. El DDT se comenzó a producir en 1938 y se usó a gran escala en todo el mundo. Se dejó de usar en los países desarrollados en 1972 pero se continua produciendo en USA para su exportación y en los países en vías de desarrollo.
- Fungicidas. El pentaclorofenol se usa para preservar fibras textiles y madera.

Alquilfenoles

Se utilizan como detergentes, surfactantes portadores de plaguicidas, ingredientes de cosméticos, ingredientes activos de espermicidas (nonil-9), antioxidantes y estabilizadores de plásticos (PVC y poliestireno), ingredientes de pinturas de látex y emulsificantes de grasas y lubricantes.

Bisfenol A

Es el monómero para la síntesis de resinas epoxi o plásticos de policarbonato. El monómero puede estar presente por una polimerización incompleta o porque se rompa el polímero al calentar. También se emplea en los empastes dentales.

Ftalatos

Se emplean en la fabricación de plásticos para aumentar su flexibilidad y en la fabricación de pinturas, tintas y adhesivos. Su producción actual es del orden de 4 millones de Tm/año. Algunos de ellos actúan como interferidores hormonales:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El dietilhexil ftalato (DEHP). Constituye el 90% del total y se emplea como aditivo de PVC usado en objetos tan variados como prendas de lluvia, botas de agua, juguetes de niños, tapones de cerveza, guantes de goma, bolsas de sangre, etc.

El butilbenzil ftalato (BBP). Se emplea como plastificante en productos como cuero sintético, baldosas, repelentes, etc.

El dietil ftalato (DEP). Se utiliza como plastificante de las películas de acetato de celulosa, cepillos de dientes y juguetes.

10.3.2. Actuación y efectos de los interferidores hormonales

Los compuestos xenobióticos alteran el funcionamiento de los sistemas hormonal y nervioso de varias formas:

a) Emulando la acción hormonal. Así los compuestos xenoestrógenos (nonil fenoles) emulan la acción del estradiol.
b) Estimulando la síntesis de receptores hormonales y potenciando la acción de las hormonas naturales y sintéticas.
c) Bloqueando la acción hormonal. En algunos casos, las dioxinas presentan un efecto antiestrogénico, mientras que el DDE (producto de descomposición del DDT) y la vincocilina (un fungicida) son antiandrogénicos al competir con la testosterona.
d) Favoreciendo la degradación de hormonas. Las dioxinas y los policlorobifenilos provocan una disminución de hormonas masculinas, y de la insulina, tiroxina y progesterona.
e) Favoreciendo la eliminación de las enzimas que degradan las hormonas.
f) Destruyendo las hormonas directamente.

Los efectos que provocan los interferidores hormonales pueden ser diversos:

a) Reproducción. Los embriones son especialmente sensibles a las hormonas. Hijos e hijas de madres que tomaron DES (dietilestilbestrol) tienen problemas de fertilidad. Los policlorobifenilos disminuyen la concentración de progesterona al favorecer su destrucción en el hígado, además se han relacionado con la disminución de movilidad y del número de espermatozoides en el hombre.
b) Sistema inmune. Delfines muertos por infecciones tienen concentraciones de policlorobifenilos dos-tres veces superiores.
c) Carcinogénesis. Algunos compuestos xenobióticos son cancerígenos, pero además, los xeno-estrógenos (DDT, policlorobifenilos, dioxinas y atracina, entre otros) promueven la proliferación de algunos tumores. En ratas se ha demostrado que los estrógenos inducen cáncer de próstata. La incidencia de cáncer de próstata ha aumentado un 126% entre 1973 y 1991 en los hombres de Norteamérica.
d) Comportamiento. Resultan especialmente sensibles los embriones. Experimentos con embriones de monos expuestos a policlorobifenilos ponen de manifies-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

to efectos negativos sobre la coordinación motora y disminución en la capacidad de aprender.

10.4. Biodegradación

Los compuestos orgánicos son inestables y los microorganismos pueden obtener como productos finales CO_2 y CH_4, en anaerobiosis y CO_2 en aerobiosis, además de H_2O y NH_3. La mineralización de un compuesto orgánico es la degradación total del mismo, es decir cuando se generan los productos finales descritos anteriormente. Por el contrario, un compuesto es recalcitrante cuando no se transforma en absoluto. Por otro lado, se da cometabolismo cuando el microorganismo modifica la estructura del compuesto pero no obtiene energía del proceso ni incorpora ninguna parte de la molécula original. Hay algunos microorganismos que pueden obtener energía a partir del compuesto, aunque ninguno de ellos pueda degradarlo independientemente, este fenómeno se denomina metabolización por un consorcio (sintrofia). A veces la presencia de un compuesto fácilmente asimilable aumenta la degradación del compuesto xenobiótico. Otras veces, la presencia de un segundo sustrato impide la utilización del compuesto. Que ocurra una cosa u otra depende del microorganismo, del compuesto a degradar y de las condiciones ambientales, este fenómeno se denomina utilización de un segundo sustrato o cosustrato.

10.4.1. Biorremediación

Se refiere a cualquier método que usa microorganismos para reciclar materiales orgánicos y separar iones inorgánicos. Los microorganismos deben estar presentes en suficiente cantidad y diversidad.

Para que ocurra este proceso en condiciones óptimas se requiere que la concentración de oxígeno residual sea 1 ppm o superior (procesos aeróbicos), que estén presentes los nutrientes inorgánicos esenciales, y que los microorganismos y el sustrato estén en contacto.

La biorremediación presenta ventajas sobre otras técnicas alternativas para eliminar compuestos contaminantes como son los tratamientos físico-químicos, ya que es un proceso natural para destruir contaminantes orgánicos, los productos formados son generalmente inocuos, la relación coste/efectividad es menor comparada con otras tecnologías y puede ser ejecutada *in situ*.

Tipos de biorremediación

A) Biorremediación *in situ.*

Se refiere al tratamiento de compuestos tóxicos en el lugar donde se ha producido la contaminación. A su vez hay dos tipos de técnicas de biorremediación *in situ*:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– Bioaumento o biomagnificación. Adición de microorganismos naturales o manipulados genéticamente al medio.
– Bioestimulación. Modificación del medio para reforzar el crecimiento de los microorganismos. Normalmente se adicionan nutrientes, oxígeno, etc.

B) Biorremediación *ex situ* (biorreactores).

El tratamiento de residuos tóxicos se realiza en biorreactores. Los biorreactores vía suspensión se utilizan para la biorrecuperación de terrenos contaminados. El terreno a descontaminar se introduce en un recipiente de contención con suficiente agua para permitir una mezcla continua. Normalmente se optimiza la biorrecuperación añadiendo nutrientes (orgánicos o inorgánicos), controlando el pH y la temperatura.

Los reactores utilizados en el proceso vía suspensión pueden ser construidos dependiendo del tamaño de los materiales seleccionados. Los tamaños de los biorreactores comerciales oscilan desde 3 m de altura y 15 m de diámetro hasta 4,4 m de altura y 7,6 m de diámetro. Los suelos o lodos contaminados se introducen dentro del reactor, se añaden los nutrientes, el agua y los cultivos microbianos. Se mezcla y se airea la suspensión hasta que las transformaciones de los compuestos seleccionados alcanzan un estado satisfactorio. Posteriormente, se para el mezclado y la aireación y se deja a los sólidos separase del fluido por sedimentación (suelos) o por flotación (fangos). Los sólidos son retirados y, si procede, devueltos a su lugar de origen y los líquidos, o bien se dejan evaporar o bien se reutilizan en un nuevo tratamiento.

Modelización de los reactores

A) Suministro de oxígeno.

Aunque hay compuestos que pueden actuar como aceptores terminales de electrones alternativos al O_2 (NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, etc.), la mayoría de los procesos degradativos se llevan a cabo en condiciones aeróbicas. El oxígeno se puede suministrar mediante diversos sistemas como se muestra en la figura 10.3:

– Aireación difusa. El oxígeno se suministra haciendo pasar el aire a través de unos dispositivos porosos (dispositivos de cerámica) que suelen estar colocados en el fondo del tanque.
– Turbina difusora. Son sistemas combinados de aireación mecánica y difusa, en los que el aire es introducido bajo una turbina de alambres planos situada en la parte baja del reactor. En este caso, el aire se fracciona en pequeñas burbujas lo que origina unas buenas características de mezclado y transferencia.
– Aireación superficial. Está originado por una turbina situada en la parte superficial del reactor. Cuando dicha turbina gira, el agua es arrastrada hacia arriba en pequeñas gotas. Estas gotas proporcionan una buena superficie de transferencia del oxígeno y la turbulencia general resultante proporciona un buen mezclado.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

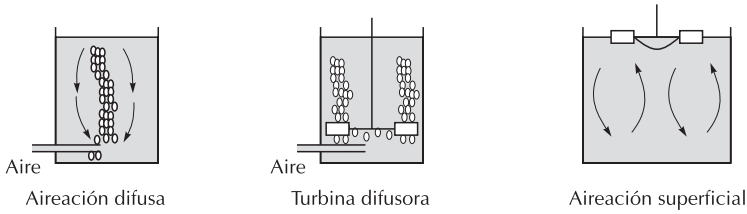


Figura 10.3. Mecanismos para la aireación de un biorreactor.

B) Proceso de mezclado.

La función del mezclado es producir una buena homogenización de todo el fluido. Se pretende evitar gradientes de concentración y temperatura dentro del reactor y minimizar los procesos de toxicidad para los microorganismos.

C) Necesidades de nutrientes.

La degradación de compuestos complejos, como los que normalmente se encuentran en suelos contaminados, da a menudo como resultado rendimientos celulares sorprendentemente bajos, y por lo tanto, hay pocas necesidades de nutrientes. De todas formas es difícil predecir las cantidades de nitrógeno, fósforo y otros elementos necesarios y normalmente se suministran en exceso y en forma de sales que suelen ser más solubles.

D) Pretratamiento.

Es un proceso muy frecuente en los procesos de descontaminación de suelos, ya que los contaminantes son generalmente hidrofóbicos y están unidos a la capa más fina del suelo que tiene una mayor relación superficie/volumen. Por lo tanto, piedras, arenas y gravas están por lo general limpias y deben ser separadas del terreno a tratar. Además, este tipo de material suele ser el más pesado que se acumularía en el fondo del reactor, y entorpecería mantener la suspensión. Adicionalmente, hay otros deshechos que no forman parte del suelo (madera, plásticos, etc.) que también son retirados. Hay dos tipos de técnicas:

– Separación por tamaños.

  El terreno es cribado y separado según el tamaño de las partículas. Así, los materiales ligeros (madera, plásticos, etc.) son separados de los materiales pesados del suelo (grava y arena) y éstos, a su vez, son separados de las partículas finas (limos, arcillas y humus).

– Lavado del terreno.
  El objetivo es separar las partículas finas altamente contaminadas de las partículas gruesas menos contaminadas. Este método suele ser bastante caro y sólo está aconsejado en el tratamiento de suelos arenosos y de grano grueso.

E) Inoculación microbiana.

Hay varios parámetros a considerar, tales como el desarrollo de la población microbiana adecuada, el suministro de una concentración adecuada de microorganismos y el control de la toxicidad.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– Desarrollo de una población microbiana adecuada.

  Cada especie bacteriana tiene una capacidad limitada de degradación, es posible que una misma especie pueda oxidar el carbono de los compuestos contaminantes hasta CO_2, pero otras veces los compuestos orgánicos complejos pueden volver a la fase líquida en el caso de que no pueda romperse un enlace concreto y otros organismos se encargan de asimilar estos metabolitos intermedios. Puede ocurrir que la fracción no degradada por un primer cultivo sea tóxica para las bacterias iniciadoras de la degradación, y, si no hay un cultivo secundario que consuma estos restos, la toxicidad se irá acumulando hasta que se pare el sistema.

Las etapas para el desarrollo de un cultivo microbiano utilizado en biorrecuperación son:

– Selección de las fuentes de microorganismos.
– Crecimiento de los cultivos bacterianos en laboratorio.
– Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos.
– Determinación de los límites de toxicidad.
– Crecimiento de cultivos a alta concentración.

F) Parámetros de funcionamiento y control del proceso.

i) Concentración de sólidos.

  En la mayoría de casos la concentración de sólidos ocupa de un 10% hasta un 40%. Lo que se pretende es que dichos sólidos no decanten para que el proceso sea más corto. Además, cuanto mayor es la concentración de sólidos, mayor es la concentración de compuestos a degradar que pueden ser tóxicos para los microorganismos. Otro problema ocasionado por el aumento de sólidos es la reducida tasa de transferencia de oxígeno.

ii) Aireación y demanda de oxígeno.

  La mayoría de los procesos degradativos ocurren en condiciones aeróbicas; por este motivo, en los sistemas de biorrecuperación se utilizan mezcladores que ayudan a distribuir el oxígeno disuelto.

iii) Temperatura y pH.

iv) Surfactantes y otros aditivos.

  Los surfactantes se emplean a veces para ayudar a la desorción y solubilización de los compuestos a degradar con el objetivo de mejorar su biodegradación. Los surfactantes actúan como emulsionantes que hacen que compuestos más hidrófobos pasen a la fase líquida. En algunos casos se añaden oxidantes que hacen que los compuestos sean más fácilmente degradables.

G) Inconvenientes de la biorremediación *ex situ*.

i) Microorganismo adecuado.

  Resulta muy difícil encontrar bacterias que degraden todos y cada uno de los contaminantes. La capacidad que presentan los microorganismos para degradar los compuestos xenobióticos se debe a que son análogos a com-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

puestos naturales, y a que hay compuestos naturales de igual naturaleza a los compuestos xenobióticos pero que no han sido descubiertos como tales.

ii) Diferencias laboratorio-campo.

Las condiciones del laboratorio son muy diferentes a las del ambiente natural (terrenos arcillosos que están altamente empaquetados y el agua y el oxígeno penetran muy despacio). Además, las condiciones medioambientales pueden ser fluctuantes.

iii) Interacciones.

– Interacción de exigencias.

Las bacterias que llevan a cabo la degradación conjunta de un compuesto no tienen los mismos requisitos de crecimiento. Así, en la degradación de policlorobifenilos éstos son desclorados por organismos anaerobios estrictos y el esqueleto carbonado resultante es degradado por organismos aeróbicos.

– Interacción entre los productos de degradación.

Las bacterias que degradan un compuesto en una primera fase, pueden generar un producto que es tóxico para otras. Así, en la degradación de policlorobifenilos se forman clorocatecoles que pueden ser transfomados a protoanemonina, un antibiótico que puede destruir a otras bacterias.

10.5. Biocorrosión y biodeterioro

10.5.1. Definición y tratamientos

Los microorganismos pueden modificar la estructura química de los materiales. Las bacterias que oxidan minerales, fijan CO_2 y son autótrofas (quimiolitotrofos). Este tipo de reacciones requieren, además de oxígeno, un metal divalente y azufre elemental o en forma reducida. El producto es un metal oxidado y ácido sulfúrico. Por lo tanto, estas bacterias tienen que ser acidófilas (pH 2), además de mostrar tolerancia al metal, que se solubiliza a este valor de pH, ya que los iones metálicos son solubles y tóxicos para la vida microbiana. Los microrganismos en ausencia de oxígeno usan sulfato, nitrato o fosfato. En el caso del sulfato, el agente responsable del deterioro es el H_2S, y el anión sulfato es el compuesto inorgánico usado como aceptor final de electrones.

Los procesos de biocorrosión y biodeterioro dependen de la propiedad microbiana de sintetizar mucopolisacáridos, compuestos orgánicos necesarios para que los microorganismos se adhieran a las superficies. Estos mucopolisacáridos facilitan las reacciones de óxido-reducción entre el metal y los minerales del agua (fenómenos electroquímicos), lo que implica que a mayor secreción de aquéllos, los minerales en circulación se retienen en ese lugar, y, a su vez, se atrapa un mayor número y variedad de microorganismos (formación de un biofilm o biopelícula). En esta biopelícula coexisten quimiolitotrofos, heterótrofos aerobios y anaerobios. Previamente a la colonización

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

microbiana de una superficie metálica quedan atrapadas moléculas en la interfase metal-disolución. Este proceso de adsorción espontánea modifica la sensibilidad y distribución de las cargas eléctricas en la superficie metálica, produciéndose un ambiente adecuado para la actividad microbiana. La adsorción posterior de células tiene lugar en esta interfase. Las células inician la colonización irregular de la superficie metálica, y establecen zonas localizadas heterogéneas, donde existen áreas que actúan como ánodos o cátodos sobre la superficie de metal. Este fenómeno permite la solubilización de minerales que atraen a otros tipos de microorganismos. Esta localización no uniforme induce celdas de aireación diferencial, mientras que debajo de esas zonas los microorganismos se encuentran en anaerobiosis. Por lo tanto, se encuentra una zona anódica que favorece la disolución de la aleación y, simultáneamente, la mayor concentración de oxígeno causa una zona de reacción catódica que acelera la incorporación de iones a la interfase. Como consecuencia de la biocorrosión se encuentran picaduras que crecen en área y profundidad. La distribución no homogénea de una biopelícula sobre superficies metálicas determina la resistencia a la corrosión. La coexistencia de especies aeróbicas y anaeróbicas sobre la superficie permite que bacterias capaces de reducir los compuestos férricos (insolubles) a ferrosos (solubles) causen la disolución de capas del hierro formados por óxidos e hidróxidos férricos. De esta forma, se facilita el acceso a la superficie metálica de los sulfatos y otros productos corrosivos generados por las bacterias sulfatorreductoras anaeróbicas.

En el pasado se usaron detergentes aniónicos y catiónicos, metales pesados, arseniatos y cromatos, como inhibidores de la corrosión. Actualmente no se usan por motivos de protección ambiental y en el control del biodeterioro se utiliza cloro y/o pentaclorofenol y sales cuaternarias de amonio. Ya que estos métodos no son tan efectivos como los anteriores, actualmente se están desarrollando biocidas que sean más eficaces. Generalmente los tratamientos químicos no contemplan las interacciones entre los depósitos biológicos e inorgánicos, ni la compatibilidad entre un tratamiento inhibidor de corrosión y un biocida de aplicación simultánea. El registro del sistema debe incluir métodos que permitan medir el proceso de la biocorrosión y el biodeterioro. El método más utilizado en el control del biodeterioro es por cloración periódica o continua del agua de alimentación, para destruir los microorganismos de la biopelícula y solubilizar parcialmente los mucopolisacáridos. A veces estas técnicas no se utilizan por problemas de incompatibilidad química y ambiental. Además, se ha comprobado que la cloración solamente alcanza los estratos más superficiales. Por lo tanto, en los últimos años se ha centrado la atención en el uso de biocidas alternativos de mejor compatibilidad con el ambiente (ozono). La calidad de un biocida depende de su perduración, actuación rápida y su capacidad de proteger los metales. A veces incluso se requiere que sean desincrustantes, para evitar la acumulación de nutrientes que atraigan a los causantes de la biocorrosión.

La relación entre biocorrosión y biodeterioro depende de diversos factores:

a) El metabolismo microbiano de la biopelícula.
b) La concentración de productos metabólicos liberados.
c) El tipo de compuestos químicos reducidos por los microorganismos adheridos a los mucopolisacáridos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

d) La capacidad quelante de la biopelícula, para atrapar selectivamente iones que influyen en la actividad biológica del consorcio.
e) Cambios en la conductividad eléctrica de la zona involucrada. Este fenómeno reduce la efectividad de los biocidas, porque baja su concentración crítica.

10.5.2. Métodos de identificación y control de la biocorrosión

Identificación de la biocorrosión

Para identificar la biocorrosión se realizan inspecciones microscópicas de las muestras. Así, los cambios en la superficie del metal se atribuyen a la presencia de microorganismos (depósitos blandos y/o mucilaginosos, tubérculos o excrecencias del metal, pequeños orificios con cavidades formadas por debajo de la superficie, etc.). El aspecto de los depósitos puede indicar cuales son los microorganismos participantes (Tabla 10.1).

Tabla 10.1. Aspecto de los depósitos sobre la superficie del metal.

Aspecto	Microorganismo
Fibroso	Hongos filamentosos
Negro	Bacterias reductoras de sulfato
Naranja	Bacterias oxidantes de hierro
Amarillo	Bacterias oxidantes del azufre
Viscoso	Bacterias formadoras de limo

No obstante, se requiere un análisis microbiológico exhaustivo, ya que es fundamental identificar los microorganismos para confirmar que la causa tiene origen biológico y poder realizar un tratamiento adecuado. El análisis microbiológico consta de dos partes:

a) Determinación de microorganismos mediante métodos ópticos e inmunológicos.
b) Detección, enumeración e identificación de los microorganismos. Hay tres métodos de detección de la biocorrosión:
   – Conteo directo total de células viables, activas y latentes (incluyendo las células muertas).
   – Células viables (que se reproducen). Se determina el crecimiento de las células en medios de cultivos generales y/o selectivos.
   – La actividad celular (que no necesariamente es su cultivo artificial).

Prevención y control

Hay que mantener limpio el sistema. Los problemas más frecuentes en una planta industrial ocurren en los sistemas de enfriamiento (recirculación abierta o cerrada), las

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

líneas de inyección de agua, los tanques de almacenamiento, los sistemas de tratamiento de aguas negras, los sistemas de filtración, las tuberías de uso diverso, las membranas de ósmosis reversa, el sistema de distribución de agua potable, etc. En la mayoría de los sistemas industriales los depósitos causantes del biodeterioro están relacionados con diversos tipos de ensuciamiento abiótico. Para su prevención y control se debe considerar no sólo la actividad y el crecimiento microbianos, sino también las condiciones fisicoquímicas de la interfase metal-disolución y las relaciones químicas en el fluido circundante. La eliminación de microorganismos es difícil en suelos o sistemas abiertos, mientras que en tanques o sistemas cerrados, la eliminación es más sencilla. Así, se pueden utilizar agentes bacteriostáticos y bactericidas que destruyan o inhiban el crecimiento, o modificar las propiedades biológicas: aireación para inhibir las bacterias anaeróbicas, pH de crecimiento no adecuado, eliminación de azufre para bacterias oxidadoras del mismo, cambios en la concentración de oxígeno, uso de condiciones alcalinas en aleaciones de hierro y acero mediante la aplicación de carbonato de calcio o cal y uso de protectores como las camisas de polietileno que impiden la humedad. Las cubiertas protectoras también pueden ser naturales, como las detectadas en piezas arqueológicas del tipo fino y compacta, llamada vivianita, o fosfato ferroso básico que inhibe anódicamente el proceso de la biocorrosión, etc.

10.6. Contaminación biológica

10.6.1. Resistencia a antibióticos

La primera plaga (peste bubónica) que hay registrada en la bibliografía ocurrió en el año 1300 y afectó a un tercio de la población de Europa. Un gran avance se obtuvo cuando se descubrió la penicilina en los años 50 del siglo pasado. Actualmente, se usan otros antibióticos básicos, como la estreptomicina, la gentamicina y el cloramfenicol. Sin embargo, cada vez se dan más casos de enfermedades que son más difíciles o incluso imposibles de tratar, y causan la muerte. Un estudio realizado en Estados Unidos entre los años 1980 y 1992 refleja que más del 58% de las muertes causadas por enfermedades infecciosas se debe al problema de la resistencia a antibióticos.

Cada vez que un paciente enfermo consume un antibiótico, éste destruye a la mayoría de las bacterias, pero algunas pueden sobrevivir adquiriendo genes de resistencia de otras bacterias. Estos gérmenes pueden multiplicarse muy rápidamente creándose así estirpes resistentes a la droga. Este proceso provoca que los tratamientos requeridos para eliminar ciertas enfermedades infecciosas sean cada vez más lentos y costosos. En la tabla 10.2 se muestra algunos de los microorganismos resistentes más comunes.

La mayoría de las enfermedades infecciosas están causadas por agentes virales. Los antibióticos solamente son efectivos en los casos en que las infecciones estén causadas por bacterias. Sin embargo, el mayor problema de resistencia a antibióticos radica en el uso que se hace de los mismos para tratar animales y cultivos que posteriormente son de consumo humano. Más del 40% de los 25 millones de kilogramos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 10.2. Microorganismos resistentes a antibióticos.

Microorganismo	Resistencia	Enfermedad
Staphylococcus aureus	vancomicina	infecciones de piel y heridas
Enterococcus	antibióticos básicos	infecciones del tracto urinario y válvulas del corazón
Streptococcus pneumoniae	penicilinas	neumonía, meningitis, infecciones de oído
Neisseria gonorrhea	antibióticos básicos	gonorrea
Salmonella y Escherichia coli	antibióticos básicos	intoxicaciones alimenticias

de antibióticos producidos en los Estados Unidos se han empleado en tratamientos a pacientes y el resto en granjas y cultivos. En cuanto al uso de antibióticos en animales, el 20% se usan para tratar animales enfermos y el resto para prevenir enfermedades, promover el crecimiento y evitar enfermedades de las cosechas. Por lo tanto, se han detectado bacterias pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Enterococcus* y *E. coli* que se han transmitido de animales a humanos.

Los mecanismos por los cuales una bacteria se hace resistente a un antibiótico son desconocidos en detalle, aunque hay descritos varios procesos implicados. La mayoría de los microorganismos (*Streptomyces)* que son productores de antibióticos tienen genes de resistencia a éstos y dichos genes pueden ser transferidos de diferentes formas:

a) Transformación.

   En determinadas condiciones una célula se puede hacer competente, es decir, receptiva para la adquisición de DNA exógeno del medio. La enfermedad de transmisión sexual llamada gonorrea se ha hecho resistente a la penicilina por este mecanismo.

b) Transfección.

   Es un caso particular de transferencia del DNA (procedente de virus).

c) Conjugación.

   Para ello se requiere el contacto físico entre dos microorganismos. Además, se necesitan en el organismo donador la presencia de genes *tra*, encargados de la formación de los pelos sexuales ("pillis") por donde se transmite el DNA y de producir cambios en la pared celular, etc., y genes *mob*, que suelen encontrarse en el DNA a transferir y son requeridos para la movilización del mismo. En este proceso se suele intercambiar DNA plasmídico. La enfermedad causada por *Shigella diarrhea* se transmite a través de la transferencia por conjugación de un plásmido pequeño.

Existen genes de resistencia a antibióticos que presentan en sus extremos unas secuencias que codifican integrasas, enzimas que tienen la capacidad de separar esos genes de resistencia del resto del genoma y convertirlos en material genético funcional y, por lo tanto, transferible y replicable en el nuevo microorganismo. Por otro lado, hay que considerar la capacidad que presenta un microorganismo para mutar de forma espontánea. Este fenómeno puede ocurrir cuando una bacteria está sometida a una presión selectiva, es decir, hay presencia de agentes en el medio

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

externo que son tóxicos tales como antibióticos, insecticidas, pesticidas, agentes virales, etc.

10.6.2. Plantas transgénicas

La tecnología de manipulación genética existente hace posible introducir DNA exógeno en el genoma de una planta, convirtiéndola en una planta transgénica o modificada genéticamente. El gen exógeno que proviene de otro organismo se denomina transgén (véase Capítulo 18).

Técnicas de transformación de plantas

Un paso crucial en la obtención de una planta transgénica es la transferencia del DNA exógeno a la misma mediante diversas técnicas de transformación:

a) Método químico (uso del cloruro cálcico).

   A veces es más cómodo realizar la clonación de los genes que se van a introducir en la planta en vectores que tienen un origen de replicación reconocido por *E. coli*. En estos casos es necesario introducir estas construcciones de DNA en *E. coli* mediante transformación. Para ello, se utiliza una solución fría de cloruro cálcico que provoca que las células se vuelvan competentes, es decir preparadas para aceptar DNA del medio externo. Posteriormente, para que aumente la eficiencia de transformación se realiza un choque térmico a 37-42 °C durante 1-2 min. Los transformantes se seleccionan en placas de medio sólido en presencia del marcador seleccionable que porta el plásmido, normalmente resistencia a un antibiótico. En algunos casos la eficiencia de la transformación se aumenta mediante el uso de otros compuestos tales como rubidio, hexaaminocobalto y DMSO. En la mayoría de los casos se usan los plásmidos Ti binarios de *Agrobacterium tumefaciens.*

b) Métodos mecánicos.

   – Agitación mecánica.

     Se incuban las células y el DNA a transformar en una disolución conteniendo un agente físico (perlas de vidrio, acículas de cloruro de silicio, etc.) para alterar los protoplastos y que el DNA pueda entrar en su interior.

   – Método balístico.

     Las partículas de oro o tungsteno de un tamaño muy pequeño (alrededor de 1 μm) se impregnan con una disolución conteniendo el DNA y se montan en unos cartuchos que posteriormente se disparan sobre las células vegetales a transformar mediante un sistema de aceleración impulsado por la detonación de pólvora o la apertura de una válvula con helio a presión.

   – Microinyección.

     Se inyecta en una célula una solución conteniendo el DNA mediante una punta de un microcapilar de vidrio (0,2-1 μm). Normalmente, se utiliza

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

una solución colorante (fluoresceína o rodamina) como marcador del proceso.

– Sonicación.

  Se utiliza para transformar organismos que son resistentes a la transformación. Así, la sonicación provoca una cavitación, formación de microburbujas, que a su vez genera presiones elevadas que dañan a las células permitiendo la entrada del DNA.

– Contención del DNA en liposomas.

  Son vesículas que están formadas por lípidos catiónicos y en cuyo interior queda atrapado el material genético. Esta técnica no es muy frecuente para transformar células vegetales.

c) Método físico (electroporación).

Es uno de los métodos más usados para la transformación de protoplastos en plantas. Consiste en la generación de poros microscópicos en la membrana mediante pulsos de un campo eléctrico. Para optimizar este proceso hay que tener en cuenta unos parámetros del pulso (amplitud, número, duración, intervalos, etc.) y el tamaño de la cubeta.

d) Método biológico.

Consiste en la infección de la planta por *Agrobacterium tumefaciens*. Este es el método más utilizado aunque está restringido a plantas dicotiledóneas.

Etapas de la construcción de una planta transgénica

a) Elaboración de la construcción del DNA utilizado en la transformación.

Para que un gen se exprese tiene que estar sometido al control de una región promotora. Este promotor determina dónde, cuándo, cuánto y en qué condiciones este gen se va a expresar. Normalmente, para expresar un gen en plantas se utilizan promotores constitutivos, tales como, el 35S del virus del mosaico de la coliflor, que se usa para cualquier tipo de planta, o los de la ubiquitina y actina para plantas monocotiledóneas. La fuerza del promotor se puede incrementar utilizando secuencias potenciadoras (*enhancers*) o bien alterando la propia secuencia de la región promotora. A veces interesa que un gen se exprese en un solo tejido por lo que se pueden usar promotores de genes que sean expresados exclusivamente en dicho tejido. Por otro lado, a veces se requiere la expresión de un gen de forma temporal, para lo que se usan promotores inducibles en respuesta a señales externas, a las cuales normalmente la planta es insensible como la mayoría de las proteínas de plantas se sintetizan en el citosol, cuando se quiere expresar una proteína en un determinado orgánulo se requiere la expresión de una proteína de fusión que contenga la secuencia señal específica de transporte para ese orgánulo. En general, para garantizar una buena expresión de un transgén hay que tener en cuenta una serie de características importantes que se muestran en al tabla 10.3.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 10.3. Parámetros principales para la expresión de un transgén.

Parámetro	Características
Intrones	A veces la presencia de un determinado intrón provoca un aumento de la expresión del gen 1.000 veces.
Terminadores de la transcripción	Situados en el extremo 3′.
Potenciadores	Situados en el extremo 3′.
Señales de poliadenilación	A veces hay que eliminar algunas de estas señales ya que pueden resultar en un inadecuado procesamiento del RNAm.
Secuencias líderes no codificantes	Situadas en el extremo 5′.
Uso de codones	Recomendable si el transgén no presenta el mismo uso de codón que la planta. Hay que cambiar uso de codones sin alterar la secuencia de aminoácidos.
Entorno de la secuencia óptimo	Controlar zonas próximas a los sitios de inicio de la transcripción y traducción, eliminando falsos codones de inicio de la traducción.
Zonas inespecíficas de glicosilación	Eliminar secuencias que determinen glicosilaciones o anclaje de lípidos no deseados.

b) RNA antisentido y silenciamiento génico.

A veces interesa eliminar o disminuir la expresión de un determinado gen en una planta transgénica. Para ello, conocida la secuencia del gen se puede introducir su DNAc en dirección reversa y bajo el control de un promotor fuerte de tal forma que la planta sintetiza un RNA complementario al de partida, uniéndose las dos moléculas de RNA. Al RNA complementario se le denomina RNA antisentido. El RNA bicatenario es inestable y es rápidamente degradado por las ribonucleasas. Sin embargo, estos RNA bicatenarios nunca han sido detectados en tejidos vegetales, ni en muchos casos cantidades apreciables de los RNAs antisentido. Además, se han originado RNAs antisentido expresados a partir de promotores débiles y a veces estas construcciones han tenido incluso más éxito. Por lo tanto, hay otros factores desconocidos que pueden estar influyendo en este proceso. Así, hay que considerar la interacción DNA-RNA que originaría metilaciones e inhibición de la transcripción, o a la generación de una señal que se transmitiera amplificando la información de la presencia de estructuras extrañas.

El silenciamiento génico se descubrió cuando se observó que algunos transformantes obtenidos con una determinada construcción no expresaban el transgén, a pesar de comprobarse que una o varias copias se habían integrado en el genoma, mientras que otros transformantes sí lo expresaban. Así, se pueden eliminar o disminuir determinados genes de función no deseada o generar plantas resistentes a patógenos. El silenciamiento génico puede ser de dos tipos, transcripcional o post-transcripcional. A veces puede ocurrir que se silencia tanto el transgén en cuestión como genes homólogos de la planta; este fenómeno se conoce como supresión, aunque se puede utilizar como sinónimo de silenciamiento postranscripcional. El silenciamiento transcripcional se caracteriza por la ausencia de RNAm del gen silenciado, mientras que en el post-transcripcional ocurre síntesis de RNA pero no se exporta al citoplasma. En general el silenciamiento transcripcional está relacionado con homología en la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

región promotora entre las distintas copias del transgén, mientras que el post-transcripcional afecta tanto a transgenes como a genes endógenos que tengan homología en la región codificante.

En los últimos años se ha descubierto un sistema de silenciamiento génico a base de pequeñas secuencias de RNA que o bien degradan el mRNA de forma específica, o bloquean su transcripción (RNA interferente). Este proceso se está utilizando ya en biotecnología animal para tratar enfermedades como la hepatitis.

Bibliografía

AHMED, N., QURESHI, F. M., KHAN, O. Y. (2001). *Industrial and environmental Biotecnology*. Horizon Press.

CABALLERO, J. L., VALPUESTA, V., BLANCO, J. M. (eds.) (2001). *Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y aplicaciones*. Publicaciones CajaSur, Córdoba.

http://www.pmac.net/theos.htm.

http://www.monografias.com/trabajos15/biocorrosion/biocorrosion.shtml.

http://whyfiles.org/038badbugs/mechanism.html.

LA GREGA, M. D., BUCKINGHAM, P. L., EVANS, J. C. (1996). *Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. McGraw Hill, Inc.

PITTER, P., CHUDOBA, J. (1990). *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*. CRC Press.

RUSSEL BOULDING, J. (1994). *Description and sampling of contaminated soils. A Field guide*. Lewis Publishers.

SEOÁNEZ CALVO, M. (1999). *El Gran Diccionario del Medio ambiente y la contaminación*. Ediciones Mundi-Prensa.

WAINWRIGHT, M. (1999). *An introduction to environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publishers.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 11

BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Glosario
11.1. Interés de los extremófilos
11.2. Bases bioquímicas de las adaptaciones a medios extremos
11.2.1. Temperatura
Psicrófilos y psicrotolerantes
Mesófilos
Termófilos e hipertermófilos
11.2.2. pH
Acidófilos
Alcalófilos
11.2.3. Salinidad
11.2.4. Presión
11.2.5. Humedad
11.2.6. Toxicidad
11.2.7. Radioactividad
11.3. Astrobiología
11.4. Biotecnología de extremófilos
11.4.1. Esterasas y lipasas
11.4.2. Glicosidasas y enzimas implicadas en la química de azúcares
11.4.3. Proteasas y peptidasas
11.4.4. DNA polimerasas
11.4.5. Otras enzimas con interés biotecnológico
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Acidófilo: Organismo que crece a pH bajo.
Alcalófilo: Organismo que crece a pH alto.
Astrobiología: Ciencia que estudia el origen, evolución, distribución y destino de la vida en el Universo.
Barófilo: Organismo que crece en condiciones de alta presión.
Biocatálisis: Utilización de microorganismos en una transformación química específica.
DNA polimerasa: Enzima que sintetiza una nueva cadena de DNA usando otra como molde.
Extremoenzima: Enzima aislada de extremófilos.
Extremófilo: Organismo que crece de manera óptima en condiciones físicas extremas.
Halófilo: Organismo que requiere alta concentración de sal para crecer.
Hipertermófilo: Organismo cuya temperatura óptima de crecimiento es de 80 ºC o superior.
pH: Logaritmo cambiado de signo de la concentración de iones hidrógeno en una disolución.
Porina: Proteína que forman canales en la membrana por los que difunden moléculas orgánicas.
Psicrófilo: Organismo cuya temperatura óptima de crecimiento es de 15 ºC o menor.
Quimioorganotrofo: Microorganismo que obtiene energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos.
Radiófilo: Organismo capaz de tolerar altas dosis de radiactividad.
Termófilo: Organismo cuya temperatura óptima de crecimiento es de 45-80 ºC.
Toxitolerante: Organismo que tolera concentraciones elevadas de sustancias tóxicas.
Soluto compatible: Soluto acumulado en el citoplasma que no inhibe los procesos bioquímicos celulares.
Xerófilo: Organismo que puede sobrevivir en condiciones de alta desecación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

11.1. Interés de los extremófilos

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que la vida, por definición, sólo podía existir en un número muy limitado de ambientes. Sin embargo, se han encontrado organismos en lugares considerados inhabitables por el hombre y en los que aquéllos son perfectamente capaces de adaptarse. El término extremófilo se utiliza para designar un organismo que crece de manera óptima bajo condiciones extremas de temperatura, presión, salinidad y pH pero que no puede crecer en condiciones normales. Este término también incluye al que puede tolerar altos niveles de radiación o compuestos tóxicos.

Es bastante frecuente que estos organismos vivan en biotopos que combinan dos o más factores extremos, por ejemplo, altas temperaturas y condiciones ácidas, o temperatura baja y alta presión. Bajo la denominación de extremófilos se incluyen diferentes taxones de procariotas (*Bacteria* y *Archaea*) y eucariotas. Entre los procariotas destacan las arqueobacterias como los microorganismos más abundantes en estos ambientes extremos.

El interés general de este "original" grupo de organismos ha aumentado desde que se aislaron los primeros en ambientes que anteriormente habían sido considerados imposibles para la vida. Algunas de estas formas son conocidas desde hace más de 40 años, pero su estudio se ha intensificado en los últimos tiempos impulsado por el reconocimiento de que sus equipos biológicos de supervivencia pueden ser potencialmente útiles para una variada serie de aplicaciones industriales.

Los extremófilos presentan un interés biológico diversificado. En primer lugar, son taxones nuevos que en el momento de descubrirse completaron el conocimiento filogenético de los seres vivos y también han enriquecido los debates relativos al origen y los límites de la vida. Además, sus biomoléculas son resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que ha conducido a intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos básicos de resistencia, así como para desarrollar aplicaciones industriales. De interés particular son las enzimas que ayudan a los extremófilos a funcionar en las circunstancias extremas de su entorno.

11.2. Bases bioquímicas de las adaptaciones a los medios extremos

11.2.1. Temperatura

A medida que la temperatura ambiente aumenta, la velocidad a la que se desarrollan las reacciones enzimáticas crece de forma proporcional, lo que implica un desarrollo más rápido del microorganismo. Esto sucede hasta llegar a una temperatura máxima por encima de la cual determinados componentes de la célula comienza a degradarse de forma irreversible (desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, etc.), el crecimiento cesa y sobreviene la muerte celular. Por el contrario, a medida que la temperatura baja, la velocidad de las reacciones enzimáticas disminuye, y por tanto, el crecimiento celular se hace cada vez más lento hasta que cesa completa-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

mente al llegar a una temperatura mínima. Entre ambos extremos, en los que desaparece el gradiente de protones y el transporte de nutrientes, se da una temperatura óptima en la que, para cada organismo, las reacciones enzimáticas tienen lugar a la mayor velocidad posible y el crecimiento celular tiene lugar de la forma más rápida. En este punto, si el resto de las condiciones ambientales son las adecuadas se encuentra el punto ideal del desarrollo del microorganismo.

Los valores de temperatura máxima, mínima y óptima son específicos para cada organismo y pueden variar según las circunstancias. A estas temperaturas se las conoce como temperaturas cardinales, siendo característico que la temperatura óptima esté más cerca de la máxima que de la mínima. Se sabe, hasta ahora, que el intervalo de temperaturas en el que pueden vivir los organismos abarca desde un poco por debajo de los 0 ºC hasta unos 105 ºC.

Los organismos eucariotas no crecen normalmente por encima de los 60 ºC. Algunas plantas toleran 45-50 ºC, y las algas y hongos, 55-60 ºC. Las eubacterias hipertermófilas toleran 70-90 ºC. Algunas cianobacterias y bacterias fotosintéticas anoxigénicas crecen bien a 70-75 ºC. Sólo algunas eubacterias como *Thermotoga maritima* (temperatura óptima 80 ºC) *Thermus termophylus* y *Aquifex pyrophilus* (temperatura óptima 85 ºC) son capaces de crecer a temperaturas características de las arqueas hipertermófilas. Los organismos termófilos e hipertermófilos conocidos hasta ahora son todos procariotas pertenecientes a los dominios *Archaea* (arqueobacterias) y *Bacteria* (eubacterias).

En relación con la temperatura óptima podemos distinguir cuatro grupos de organismos (Fig. 11.1).

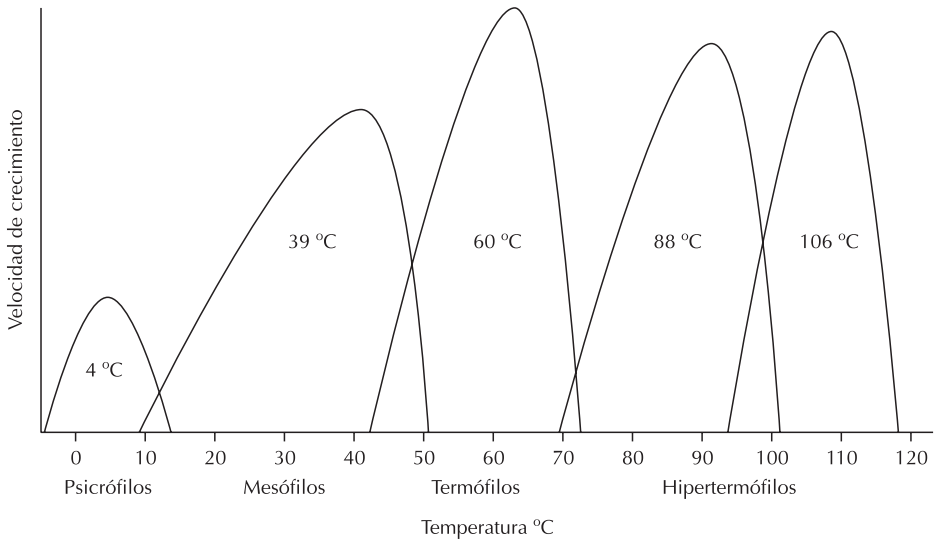


Figura 11.1. Clasificación de organismos en función de la temperatura.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– Psicrófilos: Temperatura de crecimiento oscila desde poco menos de 0 ºC hasta 15 ºC.
  Ej. *Flavobacterium sp* cuya temperatura óptima es de 13 ºC.
– Mesófilos: Temperatura de crecimiento varía entre 10 y 55 ºC.
  Ej. *Escherichia coli* cuya temperatura óptima es de 37 ºC.
– Termófilos: Se consideran termófilos aquellos organismos que crecen a temperaturas mayores de 45 ºC hasta un máximo de 80 ºC.
  Ej. *Bacilllus stearothermophilus* que presenta una temperatura óptima de 60 ºC.
– Hipertermófilos: Cuando su temperatura de crecimiento está por encima de los 80 ºC. El máximo crecimiento de cultivos puros se ha determinado entre 110 y 113 ºC.
  Ej. *Pyrodictium brockii* que presenta una temperatura óptima de 105 ºC.

El límite de temperatura en el que se pueden encontrar organismos no se conoce todavía, aunque se cree que por encima de 150 ºC ninguna forma de vida podría evitar la ruptura de los enlaces químicos que forman el ADN y otras moléculas esenciales.

Psicrófilos y psicrotolerantes

El agua es el disolvente primordial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra. Esto establece un límite para el crecimiento de los organismos muy poco por debajo de los 0 ºC.

Un psicrófilo puede definirse como un organismo que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 15 ºC o inferior, una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 20 ºC y una temperatura mínima de crecimiento de 0 ºC o más baja. Los organismos pertenecientes a este grupo crecen a temperaturas por debajo de los 5 ºC, aunque su rango de temperaturas no mortales puede ir desde los 20 ºC hasta menos de 0 ºC.

Los organismos que crecen a 0 ºC pero tienen temperaturas óptimas de 20-40 ºC se denominan psicrotolerantes.

El agua pura se congela a 0 ºC y el agua de mar a –2,5 ºC; pero la congelación no es un proceso homogéneo e incluso a temperaturas más bajas existen depósitos microscópicos de agua no congelada. En muchos materiales congelados existen pequeñas zonas microscópicas con agua líquida donde los microorganismos pueden metabolizar y crecer. Aunque la congelación evita el crecimiento microbiano, no causa necesariamente la muerte celular.

Los psicrófilos ocupan ambientes fríos que son, actualmente, más comunes y extensos que los calientes. Los océanos, que representan más de la mitad de la superficie terrestre, mantienen una temperatura media de 5 ºC, más baja en sus profundidades. Las grandes extensiones polares, Ártico y Antártico, permanecen congelados la mayor parte del tiempo o se descongelan algunas semanas al año. Estos ambientes fríos no son estériles y se encuentran microorganismos vivos creciendo a cualquier

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

temperatura baja en la que exista agua líquida. Existen zonas intercontinentales que, aunque en verano alcancen temperaturas de 40 ºC, pueden llegar en invierno a –20 ºC. Estos ambientes son menos adecuados para los psicrófilos que las zonas polares y los ocupan psicrotolerantes. Las variaciones de temperatura, pH y salinidad del medioambiente en el que se encuentran estos organismos son de decisiva importancia para su crecimiento.

Los psicrófilos se localizan en regiones permanentemente frías, como en las regiones polares, y mueren si se exponen a temperatura ambiente normal. Algunos de los psicrófilos mejor estudiados son algas que crecen bajo el hielo de las masas polares, como *Chlamydomonas nivalis,* que es una alga microscópica que aparece frecuentemente en grandes cantidades en zonas de nieve, dándole un color verde o rojo según se encuentre en estado vegetativo o esté esporulando (las esporas son de color rojo).

También se conocen bacterias psicrófilas quimioorganotrofas, muchas de las cuales viven en el Antártico. Algunas presentan la temperatura más baja de crecimiento de todos los microorganismos conocidos. Un representante es la bacteria *Polaromonas vacuolata*, con una temperatura óptima de crecimiento de 4 ºC e incapaz de sobrevivir a temperaturas superiores a 12 ºC.

Los microorganismos psicrotolerantes presentan una distribución más amplia que los psicrófilos ya que pueden vivir a 0 ºC pero su temperatura óptima está situada entre 20-40 ºC. Éstos se pueden aislar de suelos y aguas en climas templados, así como de carnes, leche y productos derivados, vegetales y fruta almacenada bajo refrigeración.

Psicrófilos y psicrotolerantes deben de presentar modificaciones que le permitan desarrollarse a baja temperatura:

Se ha descrito que presentan, principalmente, una modificación sustancial de los ácidos grasos de la membrana para mantener la fluidez de la misma. También se ha puesto de manifiesto que las membranas de los psicrófilos presentan un mayor contenido en ácidos grasos no saturados, lo que facilita el estado semifluido de las membranas a baja temperatura. Los lípidos de algunas bacterias psicrófilas contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con muchos dobles enlaces.

Los psicrófilos producen enzimas que funcionan de manera óptima en frío y que con frecuencia se desnaturalizan o inactivan incluso a temperaturas muy moderadas. Las bases moleculares que le permiten tolerar estas condiciones no se conocen muy bien, pero se sabe que las enzimas activas en frío poseen mayor cantidad de hélice-α y menor cantidad de hoja-β que las inactivas en frío. Las enzimas de los psicrófilos presentan mayor cantidad de aminoácidos polares y menos hidrófobos que las enzimas presentes en los mesófilos y termófilos.

Mesófilos

En este rango se estaría hablando de los limites de “normalidad”. En este grupo se incluyen, por lo tanto, la mayoría de los seres vivos y, por descontado, las bacterias, incluidas todos los patógenos de los mamíferos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Su temperatura óptima se sitúa entre 20 ºC y 45 ºC. Algunos de sus representantes muestran un crecimiento lento a temperaturas bajas, sobre todo los microorganismos del suelo que, muy a menudo, deben sobrevivir a temperaturas extremas para su estándar.

Termófilos e hipertermófilos

Los microorganismos cuya temperatura óptima está por encima de 45 ºC se denominan termófilos y aquellos cuya temperatura óptima esta por encima de 80 ºC, hipertermófilos.

Aunque hay zonas en la naturaleza en las que se puede alcanzar temperaturas muy elevadas, como en suelos expuestos a la luz solar y materiales en fermentación, las temperaturas extremas suelen estar asociadas generalmente a fenómenos volcánicos. Existen fuentes termales que presentan temperaturas próximas a las de ebullición del agua, fumarolas volcánicas que presentan temperaturas de hasta 200 ºC y fuentes hidrotermales submarinas que alcanzan los 150-500 ºC. Es fácil encontrar microorganismos termófilos en ambientes artificiales de altas temperaturas, como puede ser un calentador doméstico de agua, o en plantas industriales que desechen agua caliente. Hasta ahora se han aislado más de 50 especies de hipertermófilos. El más resistente al calor se ha aislado en las paredes de fumarolas hidrotermales submarinas: *Pyrolobus fumari,* que crece a una temperatura óptima de 106 ºC y máxima de hasta 113 ºC y deja de crecer a temperaturas por debajo de 90 ºC.

Se conocen desde hace tiempo termófilos que viven a temperaturas de 60 ºC, pero los verdaderos hipertermófilos se describieron hace unos cuarenta años. A finales de 1960 se identificó el primer extremófilo capaz de crecer a una temperatura mayor de 70 ºC, la bacteria *Thermus aquaticus*, cuya DNA polimerasa haría posible después el uso extendido de una tecnología revolucionaria (PCR, Polymerase Chain Reaction). Aproximadamente en esta misma época se describieron las primeras arqueobacterias hipertermófilas, como *Sulfolobus acidocaldarius,* que crece a temperaturas de hasta 85 ºC.

Estos organismos suelen crecer muy rápidamente y se han encontrado todo tipo de morfologías y de tipos fisiológicos. Hay especies tanto aerobias como anaerobias. Sus enzimas son de gran interés, no sólo en el aspecto biológico sino también por sus prometedoras ventajas en la industria y la biotecnología. Otro hipertermófilo que vive en chimeneas del fondo del mar, la arqueobacteria productora de metano *Methanopyrus sp,* atrae mucho la atención de los investigadores ya que está muy cercana a la raíz del árbol de la vida y se espera que el análisis de su genes ayude a aclarar cómo sobrevivían las células más primitivas.

El Parque Nacional de Yellowstone, en Wyoming (USA), ha sido desde hace años el lugar predilecto de muchos investigadores para desarrollar trabajos sobre organismos termófilos. A partir de la información obtenida se ha llegado a la conclusión de que, en general, los microorganismos procarióticos son capaces de crecer a temperaturas superiores a los de eucarióticos, los más termófilos incluyen especies del dominio

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Archaea; además los organismos quimiotrofos son capaces de crecer a temperaturas más elevadas que los fotótrofos.

Los estudios ecológicos de estos microorganismos han puesto de manifiesto que presentan velocidades de crecimiento notablemente rápidas y los estudios evolutivos, basados en la secuenciación del RNA ribosómico, han revelado que existe una gran diversidad evolutiva entre los termófilos.

En lo que respecta a las adaptaciones moleculares de la termofilia cabe destacar que las enzimas y otras proteínas son mucho más estables que las de los organismos mesófilos y el funcionamiento es óptimo a temperaturas extremas. En muchos casos se ha observado que las enzimas termoestables difieren a veces muy poco con respecto a las normales y se ha descrito la sustitución de un aminoácido que es crítico para el plegamiento y que, probablemente, le confiere mayor termoestabilidad. Esta también se debe a un aumento del número de enlaces iónicos y al denso empaquetamiento del interior altamente hidrofóbico de las proteínas lo que hace que resistan la desnaturalización. Además, los hipertermófilos producen ciertos solutos, como el glicerol fosfato que ayuda a estabilizar las proteínas evitando su degradación térmica. Las enzimas y otros componentes, y las membranas celulares de los termófilos e hipertermófilos han de ser estables. Los termófilos presentan lípidos ricos en ácidos grasos saturados que permiten que las membranas permanezcan funcionales y estables a elevadas temperaturas. Los hipertermófilos, en general, presentan en sus membranas carbohidratos de tipo C40 formado de unidades isoprenoides de cinco átomos de carbono que se unen por enlace éter al glicerol-fosfato.

11.2.2. pH

La acidez o alcalinidad de una disolución se expresa por su pH en una escala en la que la neutralidad corresponde a pH 7 (Fig. 11.2). Los valores por debajo de pH 7 son ácidos y por encima, básicos o alcalinos. Independientemente del valor del pH del entorno en el que viva un organismo (pH extracelular), el pH del interior de las células ha de estar siempre cerca de la neutralidad para que no se produzca la destrucción de macromoléculas lábiles. Las células mantienen un pH interior constante sin importar el pH externo.

Cada organismo tiene un intervalo muy definido de pH dentro del cual es posible el crecimiento (pH óptimo). La mayoría de los organismos crecen en un valor de pH entre 5 y 9, sólo unas cuantas especies pueden crecer por encima de 10 o por debajo de 2. Hasta ahora se conocen muy pocos organismos capaces de vivir en medios con pH cercano a 0.

Se pueden distinguir tres grupos de organismos en función del pH de crecimiento:

- Acidófilos: crecen a valores de pH entre 1 y 5
- Neutrófilos: crecen a valores de pH entre 6 y 8
- Alcalófilos: crecen a valores de pH entre 9 y 11

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

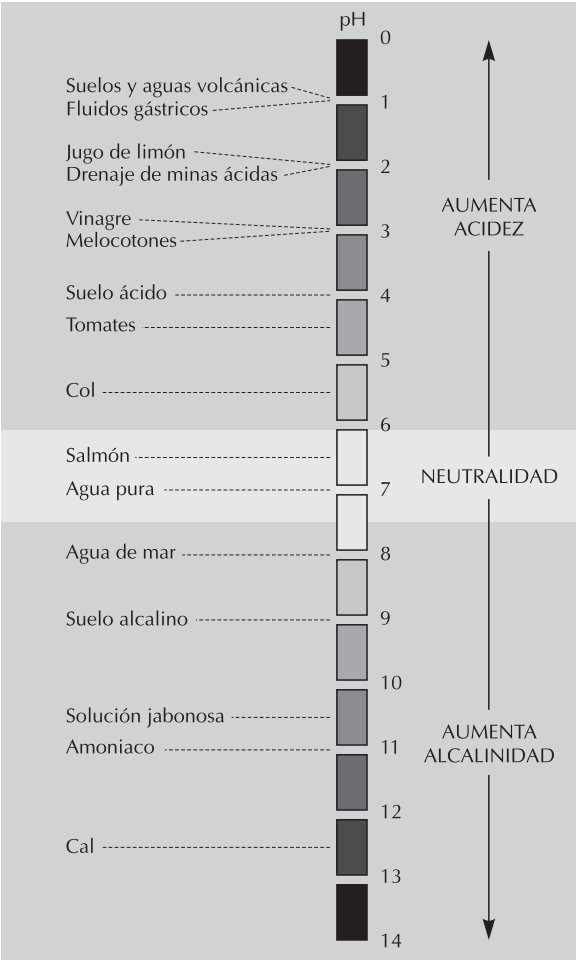


Figura 11.2. Escala de pH.

Acidófilos

Se consideran acidófilos los que crecen en medios con pH menor a 5. Existen bacterias acidófilas estrictas que son incapaces de crecer a pH neutro. Los ambientes ácidos pueden ser el resultado natural de actividades geoquímicas, como la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas y los residuos extraídos de las minas de carbón. También es posible que se creen ambientes ácidos debido a la propia actividad o metabolismo de otros organismos.

En general los hongos toleran mucho mejor que las bacterias los pH ácidos. Muchos tienen su punto óptimo de crecimiento a pH 5, pero sin embargo, muy pocos crecen a pH 2. Existen bacterias y arqueobacterias acidófilas que son incapaces de desarrollarse a pH neutro. Cabe destacar las bacterias del género *Thiobacillus* y las arqueobacterias de los géneros *Thermoplasma*, *Sulfolobus* y *Ferroplasma.*

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Una característica muy importante de estos microorganismos acidófilos es la estabilidad de la membrana citoplasmática a pH ácido; se conoce que ésta se lisa en condiciones de pH neutro. Los acidófilos deben mantener un potencial de protones a través de la membrana celular que les permita mantener el pH interno, aproximadamente 6,5, teniendo en cuenta que el pH externo puede ser de 2. Probablemente usan la entrada de iones potasio a costa de ATP para tener invertido el potencial químico. Las moléculas que proporcionan esta capacidad deben poder operar en condiciones de acidez extrema. De hecho, las extremoenzimas que pueden trabajar a un pH por debajo de 1 se han aislado de la pared celular y de la membrana de algunos acidófilos.

El procariota más acidófilo, que también es termófilo, *Picrophilus oshimae,* crece a un pH de 0,7. A un pH mayor de 4 las células se lisan, lo que sugiere que para que la membrana citoplasmática sea estable deben existir elevadas concentraciones de iones hidrógeno.

Alcalófilos

Se consideran alcalófilos los organismos que crecen de manera óptima en ambientes con un pH por encima de 9, a veces entre 10 y 12, pero que no pueden crecer o lo hacen muy lentamente a pH neutro. Estos organismos se encuadran en dos grupos fisiológicos: alcalófilos y haloalcalófilos (que requieren un pH mayor de 9 y una concentración de sales mayor del 33%).

Los organismos alcalófilos se pueden aislar de ambientes neutros mientras que los haloalcalófilos se encuentran principalmente en ambientes ricos en carbonato sódico y en los llamados lagos sódicos (Rift Valley, Africa). Los procariotas alcalófilos mejor estudiados son bacterias aeróbicas no marinas pertenecientes, muchas de ellas, al género *Bacillus.* La mayoría de los haloalcalófilos pertenecen al dominio *Archaea*. Caben destacar las arqueobacterias pertenecientes a los géneros *Natronobacterium* y *Natronomonas*. En estos ambientes hipersalinos también se han aislado metanógenos y algunas cianobacterias.

La mayoría de los alcalófilos presentan un crecimiento óptimo a pH 10 y el pH intracelular se mantiene cercano a la neutralidad. Una de las características claves de los alcalófilos está ligada a la superficie celular, que discrimina y mantiene el interior celular a pH neutro. Se ha descrito en la pared celular de alcalófilos la existencia de polímeros ácidos, como los ácidos galacturónico, glucónico, glutámico y aspártico, cuyas cargas negativas funcionan como una matriz que reduce el pH en la superficie celular.

Además, se encuentran en situación opuesta a los acidófilos, ya que constantemente deben bombear protones al interior celular para mantener el pH bajo en relación al pH externo. Estos organismos utilizan un sistema antitransportador de Na^+/H^+ para mantener el pH interior bajo. Se usan los protones generados por las actividades respiratorias para bombear Na^+ fuera de la célula. A cambio se usa el gradiente de Na^+ para transporte y movilidad y para generar una fuerza motriz de protones responsable de la síntesis respiratoria de ATP.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

11.2.3. Salinidad

Los organismos que toleran altas concentraciones de sal se denominan halófilos y se pueden clasificar en función del requerimiento salino que necesitan para su crecimiento:

- Halófilos discretos: requieren 1-6% NaCl
- Halófilos moderados: requieren 6-15% NaCl
- Halófilos extremos: requieren 15-30% NaCl

En general se consideran como halófilos los organismos que viven en ambientes en los que el contenido de sal sea, al menos, del 8%, aunque este límite depende de los autores. En numerosas ocasiones, en lugar de utilizar el porcentaje de salinidad de la disolución, se utiliza el concepto de actividad del agua (a_w), que se define como el cociente entre la presión de vapor del medio (p) y la presión de vapor del agua a la misma temperatura (p_0). La mayor parte de las bacterias crecen óptimamente a una actividad de agua de 0,99 y dejan de hacerlo a 0,90.

Se puede encontrar a los halófilos en lagos naturales salados y salinas creadas por el hombre, en los que se ve muy favorecido el proceso de evaporación. También se han encontrado en hábitats salinos artificiales como las superficies de los alimentos en salazón. Muchos de los ambientes salinos son, además, extremadamente alcalinos. Los organismos pertenecientes a este grupo son, generalmente, quimioorganotrofos, aerobios obligados y requieren para su crecimiento iones sodio.

Entre los organismos halófilos destacan algas marinas, cianobacterias marinas y de agua dulce, bacterias fotótrofas anoxigénicas y arqueobacterias halófilas extremas, como *Halobacterium.* Puesto que estos organismos están adaptados a crecer en ambientes salinos, la mayoría de ellos no crecen cuando la concentración salina es baja.

Los halófilos deben ser capaces de evitar su desecación que podría causarse por la diferencia de salinidad entre el medio externo y el citoplasma. Para evitar la deshidratación, los organismos pueden incrementar la concentración interna de solutos, bien por un bombeo de iones inorgánicos hacia el exterior y/o sintetizando o concentrando algún soluto orgánico. Se ha descrito que los halófilos pueden albergar grandes cantidades de soluto en el interior citoplasmático compatible con el metabolismo celular (solutos compatibles).

Entre los organismos halófilos eucariotas cabe destacar el alga *Dunaniella salina,* que vive en lagos salados. Esta sintetiza altas concentraciones (7 M) de glicerol como soluto compatible para mantener el equilibrio osmótico.

En general, la estrategia de la mayoría de los microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* es acumular sal en el citoplasma, lo que requiere enzimas y estructuras celulares adaptadas a las sales.

Halobacterium halobium se adapta a la concentración de sales y escasez de oxígeno sintetizando una proteína de membrana, llamada bacteriorrodopsina (Fig. 11.3). Esta proteína es capaz de reaccionar ante la luz generando un gradiente de protones

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

transmembranal que permite la síntesis de ATP; además la bomba de protones funciona lanzando sodio al exterior e importando iones potasio que se acumulan como soluto compatible.

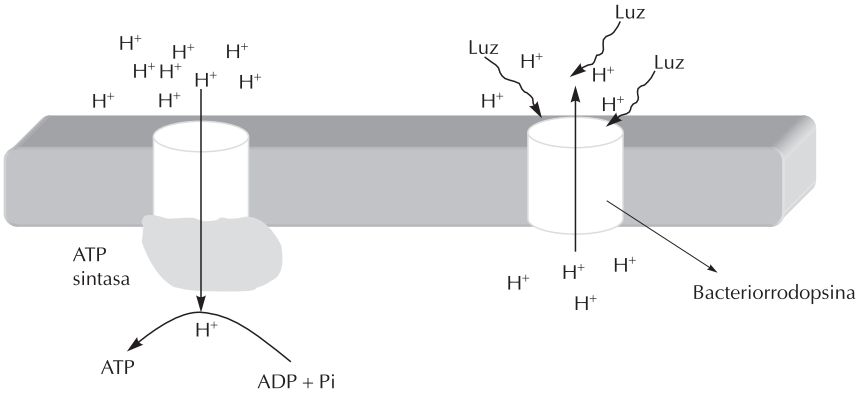


Figura 11.3. La bacteriorrodopsina de la bacteria *Halobacterium halobium* bombea protones al exterior y la ATP sintasa fabrica ATP al disipar el gradiente de pH.

Halobacterium salinarum concentra cloruro potásico en su interior para evitar la deshidratación. Su crecimiento óptimo se produce a 50 ºC, pH 7,2 y concentraciones de NaCl de 3,5-4,3 M. Además, posee bacteriorrodopsina en su membrana.

En la membrana de *Halobacterium salinarum* hay otras rodopsinas como la halorrodopsina que, impulsada por la luz, bombea iones cloruro hacia el interior para contrarrestar el potasio, y dos rodopsinas sensoras que afectan al movimiento flagelar que impulsa la bacteria hacia la luz para llevar a cabo la síntesis de ATP.

11.2.4. Presión

En las zonas marinas, la presión aumenta 1 atmósfera (atm) por cada 10 m de profundidad; esto significa que un organismo que viva a 5.000 m deberá de soportar presiones de 500 atm, además, las zonas profundas son más frías y hay menor disponibilidad de nutrientes. Así, los organismos que habitan las profundidades marinas deben estar adaptados a tres condiciones extremas: bajas temperaturas, altas presiones y cantidades muy pequeñas de nutrientes. Dependiendo de la profundidad a la que se han aislado, se pueden clasificar en los dos grupos siguientes:

– Barotolerantes: sólo aguantan las altas presiones
– Barófilos: precisan altas presiones para vivir.

Se han encontrado organismos barotolerantes a profundidades de alrededor de 3.000 m (300 atm de presión). Estos presentan tasas metabólicas más elevadas si se cultivan a 1 atm que si lo hacen a 300 atm, pero la velocidad de crecimiento suele ser la misma a ambas presiones.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Bajo el término barófilos se pueden agrupar organismos capaces de crecer a presiones por encima de las 500 atm, incluso a presiones de 1.000 atm. Estos organismos se localizan en zonas muy profundas (entre 4.000 y 6.000 m). La tasa de crecimiento es muy lenta y son muy difíciles de cultivar en el laboratorio. Aunque los barófilos crecen mejor bajo presión, conservan la capacidad de crecer a 1 atm.

Los ambientes donde se pueden encontrar este tipo de organismos son las zonas profundas del mar con una alta presión y una temperatura baja (menos de 10 ºC).

De muestras muy profundas se han aislado los denominados barófilos estrictos. En marzo de 1996 un submarino tocó el fondo de la Fosa de las Marianas y tomó una muestra de sedimento a una profundidad de 10.898 metros de la que se aislaron dos estirpes bacterianas pertenecientes a los géneros *Shewallena* y *Moritella,* respectivamente. Las condiciones de presión óptimas para el crecimiento de estas estirpes fueron 700 y 800 atm y se encontró que no crecían en medios con presiones menores a 500 atm.

Se conoce que el aumento de presión afecta a la capacidad de unión de las enzimas a sus sustratos, por lo que los organismos adaptados a vivir en condiciones de alta presión deberían presentar un plegamiento en sus enzimas que impida este efecto.

Por otro lado, la membrana también se afecta debido al aumento de presión y se ha observado que la pared celular de los barófilos presenta una composición proteica diferente. Se ha descrito la existencia de porinas específicas (OmpH) presentes en la membrana de organismos que crecen a altas presiones pero que no lo están cuando crecen a presiones de 1 atm. Esta expresión diferencial de proteínas reguladas por la presión presentan un gran interés desde el punto de vista biotecnológico.

También se ha descrito en la membrana citoplasmática de organismos barófilos la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Parece que tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la fluidez de la membrana en estas condiciones de bajas temperaturas y altas presiones.

11.2.5. Humedad

La pérdida de pequeñas fracciones del agua intracelular puede ser letal para muchas células. Sin embargo, existen organismos que pueden sobrevivir a una desecación extrema incluso durante periodos largos de tiempo. A estos organismos se les denomina xerófilos.

De la misma forma que ocurre en los organismos halófilos, estos organismos crecen en condiciones de baja actividad de agua. En estas condiciones sólo se puede obtener agua del ambiente incrementando la concentración interna de solutos. Se ha descrito que los organismos en estas condiciones acumulan disacáridos, como la sacarosa, que protegen a las membranas y a las proteínas de la desecación. Cuando se retira el agua de la capa de fosfolípidos de la membrana, el disacárido actúa de forma que mantiene las membranas desecadas en un estado físico similar al de las membranas hidratadas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los organismos capaces de sobrevivir en condiciones de máxima sequedad van desde colonias de bacterias (estas bacterias colorean las rocas de los desiertos, por lo que también se conoce como barniz del desierto) hasta colonias simbióticas de algas con hongos (líquenes). Estos líquenes pueden soportar condiciones de extrema sequedad aunque no son tan resistentes como las bacterias. Tienen un papel muy importante en la formación de suelos ya que son los primeros en colonizar las rocas, atacando la superficie de las mismas.

11.2.6. Toxicidad

Los organismos que toleran altas concentraciones de agentes tóxicos, se agrupan bajo el término de toxitolerantes. La tolerancia a agentes tóxicos, como disolventes orgánicos o antibióticos, se ha descrito desde hace tiempo, considerándose las bacterias como las más tolerantes.

Pseudomonas putida DOT-T1 tolera concentraciones del 90% de tolueno en el medio; además, utiliza este disolvente orgánico como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Las adaptaciones de los microorganismos a estas condiciones incluyen la existencia de sistemas de eliminación activa del tóxico que reducen la acumulación de los mismos en las membranas. Estos sistemas eliminan el tóxico mediante energía protón motriz. Así, la célula puede mantener una concentración baja del compuesto tóxico en la membrana mientras esté disponible un suministro suficiente de energía.

11.2.7. Radioactividad

Los organismos capaces de tolerar dosis elevadas de radioactividad se denominan radiófilos.

Como representante de este grupo destaca *Deinococcus radiodurans*, que sobrevive a exposiciones letales de radiación gamma. Este microorganismo sobrevive gracias a su alta concentración de RecA, una proteína que repara los daños del DNA. La reconstrucción del genoma de *Deinococcus* se da a sólo pocas horas de haber ocurrido la exposición y en veinticuatro horas es capaz de reconstruir por entero la integridad y estructura de su cromosoma.

11.3. Astrobiología

La astrobiología, también llamada cosmobiología, tiene como tarea específica el estudio del origen, evolución, distribución y destino de la vida en el Universo, estableciendo así la conexión entre el fenómeno de la vida en la Tierra y una concepción más amplia de la vida como fenómeno universal.

Si bien el tratamiento científico de la posibilidad de vida extraterrestre puede remontarse a la década de los años 70 del siglo pasado, no es hasta 1998, con la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

creación del Instituto de Astrobiología de la NASA (NAI), cuando se alcanzan los niveles exigibles de rigor que permiten a la Astrobiología constituirse como disciplina científica con capacidad para desarrollar e impulsar proyectos y misiones de investigación.

Se conoce, a través de estudio de los fósiles más viejos de la tierra, que la aparición de la vida en nuestro planeta aconteció antes de lo previamente estimado. Se ha podido comprobar que la vida es un fenómeno muy resistente a situaciones catastróficas y a condiciones medioambientales límite, como es el caso de los extremófilos. Estos microorganismos, como hemos visto, viven y se desarrollan en ambientes considerados, hasta hace poco, inviables para la vida, y el número de los descubiertos aumenta a medida que se perfeccionan las técnicas para su detección.

Referente a los estudios llevados a cabo para la búsqueda de vida en Marte cabe destacar los que se han realizado en los manantiales de Yellowstone (USA). Parece que en Marte la actividad volcánica ha interactuado con el agua de la misma forma que ha sucedido en la Tierra. Los manantiales termales son oasis minerales para distintas formas de vida y los depósitos preservan los fósiles que pudieran posibilitar el descubrimiento de vida en otros planetas. Estudiando los cambios del registro fósil, se puede formar una imagen de la historia de la vida y del clima de la Tierra. Comparando estos registros fósiles con las rocas encontradas en Marte se podría hallar una prueba definitiva de vida pasada en ese planeta. Las misiones de exploración de Marte podrán poner de manifiesto la existencia de condiciones favorables para al existencia de vida.

Paralelamente, en Rio Tinto (Huelva, España) los astrobiólogos están llevando a cabo estudios con objeto de desarrollar técnicas para perforar la superficie de Marte en búsqueda de signos de vida. Se reconoce que el área del Río Tinto es un modelo importante de la búsqueda de vida en agua líquida bajo la superficie de Marte. El Río Tinto recibe su nombre por su color, debido al hierro y otros metales disueltos en sus aguas de marcado carácter ácido. Es considerado un ecosistema extremadamente ácido, presenta un pH que va desde 1,5 a 3,1, y una elevada concentración de metales pesados en disolución (hierro, cobre y zinc). Las condiciones extremas del río se deben a la actividad metabólica de microorganismos quimioautótrofos que oxidan hierro y azufre. Estas condiciones tan extremas son consideradas muy similares a las existentes en Marte, por lo que el resultado de las perforaciones podrá extrapolarse a los estudios llevados a cabo en el planeta rojo ya que se prevé la existencia de agua líquida en el subsuelo marciano.

11.4. Biotecnología de extremófilos

Existe un enorme interés acerca de las proteínas estructurales y las enzimas metabólicas que son responsables de las propiedades inusuales de los microorganismos extremófilos. Pueden ser de mucha utilidad en biocatalisis (síntesis de polímeros, productos farmacéuticos, agroquímicos, etc.), ya que este tipo de procesos, en muchas circunstancias, son inespecíficos y generan productos secundarios.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En algunas ocasiones, el uso de enzimas de organismos mesófilos ha solucionado el problema, pero en otros casos está limitado porque los procesos se tienen que llevar a cabo en condiciones en las que estas enzimas no son activas. En este sentido, el uso de enzimas derivadas de extremófilos abre la posibilidad de su uso en procesos en los que no se pueden usar las tradicionales.

En la última década se han aislado un gran número de microorganismos extremófilos. Los procesos metabólicos y sus funciones biológicas específicas se deben a enzimas y proteínas que funcionan en condiciones extremas. Estas biomoléculas muestran características únicas, como una termoestabilidad elevada o resistencia a agentes desnaturalizantes tales como detergentes, disolventes orgánicos y pH extremos. Por ello podrían ser utilizadas como modelo para el diseño y construcción de proteínas con nuevas propiedades que son de interés en aplicaciones industriales.

En la tabla 11.1 se muestra una posible aplicación de las enzimas de extremófilos. La mayor parte del trabajo se ha llevado a cabo en termófilos e hipertermófilos.

Tabla 11.1. Aplicaciones industriales de enzimas aisladas de extremófilos.

Organismo	Producto	Aplicación
Hipertermófilos > 80 °C	Amilasas	Fructosa, y sacarosa para aditivos
	Xilanasas	Blanqueamiento de papel
	Proteasas	Aminoácidos para producción de queratinas, alimentos y detergentes
	DNA-polimerasas	Ingeniería genética
Psicrófilos 0-15 °C	Proteasas neutras	Producción de lácteos
	Proteasas Amilasas	Detergentes
	Lipasas Ácidos grasos poliinsaturados	Fármacos
Acidófilos 0 < pH < 4	Oxidación de azufre	Desulfurización del carbón
Alcalófilos pH > 9	Proteasas Amilasas	Detergentes
	Lipasas Ciclodextrinas	Estabilización de sustancias volátiles
	Caroteno	Colorantes para alimentos
Halófilos > 9% NaCl	Antibióticos Glicerol	Fármacos
	Solutos compatibles	Fármacos. Estabilizadores de enzimas
	Membranas	Surfactantes para fármacos
Barófilos > 500 atm	Microorganismo completo	Formación de geles y gránulos de almidón
Toxitolerantes	Microorganismo completo	Biorremediación

Las enzimas de psicrófilos, producidas por microorganismos adaptados al frío, presentan una gran eficiencia catalítica que ofrece un potencial en la industria biotecnológica, por ejemplo en alimentación y fabricación de detergentes.

También presentan gran interés las enzimas halofílicas ya que son estables en presencia de concentraciones muy elevadas de sales y sirven como modelo en biocatalisis.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Los ácidofilos presentan características muy extremas que hacen que sus enzimas se puedan utilizar en diferentes procesos. Las aplicaciones de las enzimas ácido-tolerantes van desde su uso como biocatalizadores en síntesis de compuestos en disoluciones ácidas hasta el procesamiento de minerales. También se ha descrito su uso como aditivos en piensos para animales (pueden funcionar muy bien en su estómago).

Los alcalófilos, por su parte, han tenido un gran impacto en la aplicación industrial ya que sus proteasas alcalinas y celulasas se están utilizando en el desarrollo de detergentes biológicos. Para trabajar eficazmente, los detergentes deben actuar frente a manchas de comida y otras fuentes de grasa.

Los organismos pertenecientes al grupo de barófilos también presentan mucho interés y la investigación se ha centrado en la identificación de operones que estén regulados por presión, aunque en los últimos años se están estudiando las posibilidades de usar las enzimas de estos microorganismos en procesos concretos en los que haya implicadas altas presiones.

En el campo del tratamiento biológico de la contaminación presentan gran interés los organismos capaces de adaptarse a concentraciones tóxicas de disolventes, metales o radiactividad en el medio. Como se ha referido anteriormente, la bacteria *Deinococcus radiodurans* tolera altas dosis de radiación. La potencialidad de esta bacteria para descontaminar desechos radiactivos, por ejemplo uranio, la convierten en una alternativa biotecnológica muy poderosa y efectiva en el tratamiento biológico.

Las enzimas pertenecientes a organismos termófilos, enzimas termofílicas, han sido las más estudiadas y utilizadas en la industria. Estas enzimas presentan gran interés ya que son muy resistentes a proteasas, detergentes y agentes caotrópicos.

La tabla 11.2 muestra las enzimas más interesantes desde el punto de vista de su utilización en biotransformaciones industriales que son activas o estables en condiciones extremas. A pesar de la cantidad de enzimas caracterizadas, es muy pequeño el número de extremoenzimas que tienen uso industrial. A continuación se revisan las más utilizadas.

11.4.1. Esterasas y lipasas

Estas enzimas se utilizan en la industria química debido a que se pueden usar en biocatálisis para la producción de compuestos puros. Se han aislado muchos tipos de esterasas y lipasas termófilicas. Las enzimas termófilicas tienen un gran potencial en este tipo de aplicaciones específicas que requieren temperaturas altas u otras condiciones especiales.

Se han descrito esterasas aisladas de *Pyrococcus furiosus* que presentan una actividad óptima a 100 °C. También existen estirpes psicrófilas que presentan lipasas adaptadas al frío y que se utilizan en procesos biotecnológicos llevados a cabo a bajas temperaturas. Como ejemplo cabe destacar la lipasa de *Pseudomonas* sp. B11, que se utiliza para sintetizar potenciadores del sabor como el butil-caprilato.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 11.2. Extremoenzimas relevantes en biocatalisis.

Enzima	Organismo	Estabilidad/Actividad
Esterasa hipertermófila	*Pyrococcus furiosus*	Temperatura óptima 100 °C Estable 50 min. a 126 °C
Esterasa termófila	*Bacillus lincheniformis*	Temperatura óptima 45 °C Estable 1 h. a 64 °C
Esterasa termófila	*Archaeglobus fulgidus*	Activa a 70 °C
Lipasa termófila	*Bacillus stearothermophilus*	Temperatura óptima 68 °C Estable 30 min. a 55 °C
Lipasa termófila	*Bacillus thermocatenulatus*	Temperatura óptima 60-70 °C
Pululanasa hipertermófila	*Thermococcus aggregaris*	Temperatura óptima 95 °C Estable 2,5 h. a 100 °C
Pululanasa termófila	*Bacillus acidopullulyticus*	55% activa después de 30 min. a 60 °C/pH 5.5
α-amilasa acidofila y termófila	*Alicyclobacillus acidocaldarius*	Actividad óptima a 75 °C y pH 3
β-galactosidasa halófila	*Haloferax alicantei*	Activa solo a 4 M NaCl
Fructosa aldolasa halófila	*Haloarcula vallismortis*	Actividad óptima a 2,5 M KCl
Fructosa aldolasa hipertermófila	*Thermus aquaticus*	Activa y estable a 90 °C durante más de 2 h.
Frutosa aldolasa hipertermófila	*Staphylococcus aureus*	Estable a 97 °C durante 1,6 h. Temperatura óptima 37 °C
Proteasa psicrófila	*Bacillus* TA39	Óptima a baja temperatura
Proteasa halófila	*Halobacterium halobium*	Máxima actividad a 4 M NaCl
Nitrilo amidasa-hidratasa termófila	*Bacillus sp*	Temperatura óptima a 65 °C
Nitrilo hidratasa termófila	*Bacillus palidus*	Termoestable hasta 55 °C
Alcohol deshidrogenasa hipertermófila	*Pyrococcus furiosus*	Estable 160 h. a 85 °C y 7 h. a 95 °C
Glutamato deshidrogenasa barófila	*Pyrococcus furiosus*	36 veces más estable a 105 °C y 750 atmósferas
Fosfatasa psicrófila	*Shewanella sp.*	Óptima a baja temperatura
Alanina racemasa psicrófila	*Bacillus psychrosaccharolyticus*	Óptima a baja temperatura (0 °C)

11.4.2. Glicosidasas y enzimas implicadas en la química de azúcares

A partir del almidón, mediante la acción de amilasas, glucoamilasas y pululanasas, se puede obtener glucosa, que puede convertirse en fructosa por acción de la glucosa isomerasa. La acción de estas enzimas, desde el punto de vista industrial, lleva a la obtención de un edulcorante rico en fructosa a partir del maíz, trigo o almidón de patata. En la industria alimentaria este proceso es muy importante, sobre todo en la producción de bebidas no alcohólicas.

El proceso de hidrólisis de almidón para la obtención de glucosa y fructosa se tiene que desarrollar en varias etapas que implican la utilización de distintos pHs en el proceso, que varían de 4,5 a 8,5, y distintas temperaturas, que van desde 55 °C a 105 °C. Al final del proceso se generan concentraciones muy elevadas de sales que hay que eliminar mediante intercambio iónico que encarece el procedimiento. En los últimos años se están utilizando en este proceso enzimas extremófilas tales como

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

amilasas y pululanasas hipertermófilas o acidófilas. Éstas mejoran la bioconversión del almidón y se evita la generación de las grandes cantidades de sales.

Recientemente se ha expresado en *E. coli* una α-amilasa proveniente de la arqueobacteria *Thermococcus hydrotermalis,* caracterizada por presentar gran estabilidad en condiciones de desnaturalización química y térmica. Se han utilizado glicosidasas con actividad pululanasa procedentes de hipertermófilos que degradan almidón, amilasa y amilopeptina formando maltotriosa y maltosa; la termoestabilidad de estas enzimas puede usarse para mejorar el proceso de hidrólisis del almidón.

Se han identificado glicosidasas halofilícas que presentan actividad frente a numerosos sustratos y que se caracterizan por permanecer activas en presencia de concentraciones muy elevadas de sales, como por ejemplo, β-galactosidasa de *Haloferax alicantei*.

11.4.3. Proteasas y peptidasas

Las proteasas están implicadas en la conversión de proteínas en aminoácidos y péptidos. Las enzimas microbianas producidas en mayores cantidades, desde el punto de vista industrial, son las proteasas que se utilizan como aditivos en los detergentes para lavar la ropa.

La mayoría de los detergentes actuales contienen enzimas, principalmente proteasas, pero también amilasas, lipasas, reductasas y otras. Muchas de estas enzimas se aíslan de bacterias alcalófilas y se usan como aditivos en detergentes, ya que estas proteasas se caracterizan por ser resistentes a la desnaturalización por detergentes en condiciones alcalinas. En los últimos años se ha generado interés en el uso de proteasas que provienen de psicrófilos para desarrollar detergentes que laven en frío.

Otras proteasas con actividad queratinolítica y elastiolítica se utilizan en la industria del cuero. La proteasa extracelular purificada de *Halobacterium halobium* se utiliza en la síntesis de polipéptidos que contienen glicina y presenta la ventaja de que es muy estable incluso en presencia de disolventes orgánicos.

11.4.4. DNA polimerasas

Las DNA polimerasas son enzimas clave en la replicación del material celular presente en los seres vivos. Catalizan, en presencia de iones magnesio, la síntesis de DNA en la dirección 5′-3′.

Uno de los avances más importantes en los últimos 15 años ha sido el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica utilizaba originariamente el fragmento Klenow de la DNA polimerasa purificada de *E. coli* pero, debido a las altas temperaturas necesarias en el proceso para desnaturalizar el DNA, había que reponerla en cada ciclo. El problema se ha resuelto utilizando una DNA polimerasa purificada de un extremófilo hipertermófilo, *Thermus aquaticus*, conocida como *Taq* polimerasa. Esta enzima es estable a 95 °C y, por lo tanto, es efectiva incluso en la etapa

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de desnaturalización de la PCR. Además, el uso de la Taq incrementa la especificidad de la reacción ya que el DNA se copia a 72 °C (no a 37 °C como con Klenow) por lo que se evita la hibridación inespecífica de los iniciadores con el DNA.

La *Taq* polimerasa presenta el problema de no poseer función correctora (actividad exonucleasa 3'-5') y, como consecuencia, comete más errores en la replicación que la de *E. coli*, que sí posee esta actividad. La DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus*, denominada *Pfu* polimerasa, es más termoestable que la *Taq* y presenta esta actividad correctora (DNA polimerasa de alta fidelidad).

En la tabla 11.3 se muestran distintas DNA polimerasas, su origen y su utilización en algunas técnicas como PCR, PCR de alta fidelidad, obtención de DNA a partir de RNA mediante transcriptasa inversa (RT-PCR) y secuenciación de DNA.

Tabla 11.3. Aplicaciones de las DNA termoestables. ND, no se ha determinado.

Polimerasa	Organismo	Aplicación			
		PCR	PCR alta fidelidad	RT-PCR	Secuenciación
DNA Polimerasas bacterianas					
Taq Pol I	*Thermus aquaticus*	+	–	+	+
Tth pol	*Thermus thermophilus*	+	–	+	+
Tfi pol	*Thermus filiformis*	+	ND	+	ND
Tfl pol	*Thermus flavus*	+	ND	–	+
Tca pol	*Thermus caldophilus* GK24	+	–	+	ND
BstI pol	*Bacillus stearothermophilus*	+	–	–	+
Tma pol	*Thermotoga maritima*	+	+	ND	+
DNA Polimerasas de arqueobacterias					
Pwo pol	*Pyrococcus woesei*	+	+	–	–
Pfu pol	*Pyrococcus furiosus*	+	+	–	–
Vent pol	*Thermococcus litoralis*	+	+	–	–
KOD1 pol	*Pyrococcus sp.* KOD1	+	+	–	–

La técnica de la PCR también se utiliza para cuantificar la expresión génica mediante el uso de transcriptasas inversas que utilizan el RNA como molde para convertirlo en DNA complementario. Al inicio se utilizaban transcriptasas derivadas de virus, pero presentaban el problema de que las reacciones se llevaban a cabo a temperaturas bajas y se formaban estructuras secundarias en el RNA. En los últimos años se utilizan DNA polimerasas termoestables que utilizan RNA como molde en presencia de iones manganeso: es el caso de la de *Thermus thermophilus.* Estas polimerasas termoestables se han utilizado en secuenciación, y su utilización ha mejorado mucho esta técnica.

11.4.5. Otras enzimas con interés biotecnológico

En este grupo destacan enzimas como las glucosas isomerasas, ya referidas anteriormente, que catalizan la isomerización de D-glucosa y D-xilosa en D-fructosa y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

D-xilulosa, respectivamente. Estas enzimas presentan un gran interés en la industria alimentaria ya que se utilizan en la obtención de jarabes ricos en fructosa. El carácter termófilico de estas enzimas mejora el proceso.

Enzimas como la alcohol deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de alcoholes secundarios, presentan gran interés en biotecnología. Existen enzimas de mesófilos que llevan a cabo este proceso pero las termofílicas presentan muchas características de gran interés industrial.

Otras extremoenzimas incluyen nitrilasas, racemasas y glutamato deshidrogenasas. Estas enzimas se están aislando de extremófilos y su aplicación en biotecnología es muy interesante.

Bibliografía

DERMIRJIAN, D. C., MORIS-VARAS, F., CASSIDY, C. (2001): "Enzymes from extremophiles". *Current Opinion in Chemical Biology*. 144-151.

GONZALEZ-TORIL, E., LLOBET-BROSSA, E., CASAMAYOR, E. O., AMANN, R., AMILS, R. (2003): "Microbial ecology of an extreme acidic enviroment, the Tinto River". *Applied and Enviromental Microbiology*. 4853-4865.

HORIKOSKI, K. (1999). "Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 735-750.

htpp://www.astroseti.org. (Instituto de Astrobiología de la NASA).

JAENICKE, R. and BÖHN, G. (1998). *The stability of proteins in extreme enviroments. Current Opinion in Structural Biology*. 738-748.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2003). *10ª Ed. Brock Biología de los microorganismos*. 10ª Ed. Pearson Education.

NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KÄHLER, M., ANTRANIKIAN, G. (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application". *Applied Microbiology Biotecnology*. 711-729.

RAMOS, J. L., DUQUE, E., GALLEGOS, M. T., GODOY, P., RAMOS-GONZÁLEZ, M. I., ROJAS, A., TERAN, W. and SEGURA, A. (2002). "Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria". *Annual Review Microbiology*. 56: 743-768.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 12

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES I

Glosario
12.1. Celulosa y ligninas
12.1.1. Degradación de celulosa
12.1.2. Rumen
12.1.3. Degradación de lignina
12.2. Biodegradación de cianuro, cianato y sus derivados, CO y metilaminas
12.2.1. Cianuro
12.2.2. Cianato
12.2.3. CO y metilaminas
CO
Oxidación de metilaminas
Tetrametilaminas
Trimetilaminas
Dimetilaminas
Metilaminas
12.3. Biotecnologías correctoras de la contaminación: biosensores y biorreactores
12.3.1. Biosensores
Clasificación de los biosensores
Usos y aplicaciones de los biosensores
12.3.2. Biorreactores
12.4. Plásticos biodegradables
12.4.1. Derivados de azúcares
12.4.2. Poliésteres
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Aeróbico: Metabolismo, célula u organismo que vive en presencia de oxígeno.
Autótrofo: Organismo que utiliza CO_2 como única fuente de carbono.
Anaeróbico: Metabolismo, célula o organismo que vive en ausencia de oxígeno.
Biodisponibilidad: Disponibilidad biológica de algún compuesto.
Carboxidotrófico: Organismo que crece autotróficamente utilizando el CO_2 generado por la oxidación del CO.
Celulosa: Polisacárido lineal formado por restos de glucosa unidos mediante enlaces β–1,4.
Cianogenésis: Producción de cianuro, en muchos casos como mecanismo de defensa.
Cianotrofo: Organismo que utiliza cianuro como fuente de nitrógeno.
Cohesina: Proteína que presenta la capacidad de unirse a otras proteínas.
Compuestos húmicos: Mezclas complejas de materia orgánica del suelo.
Compuestos xenobióticos: Productos sintéticos que no aparecen de forma natural.
Detoxificación: Tratamiento que elimina la toxicidad.
Epitopo: Porción de un antígeno que es reconocida por una inmunoglobulina o un receptor de célula T.
Fermentativo: Catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve como donador y aceptor de electrones.
Gram-positiva: Célula procariótica cuya pared está formada por peptidoglicano y que carece de membrana externa.
Gram-negativa: Célula procariótica que presenta una membrana externa compuesta por lipolisacáridos, lipoproteínas y otras macromoléculas.
Hemicelulosa: Cualquiera de los diversos polisacáridos que se encuentran en la pared celular de las plantas superiores. El grado de polimerización es menor que el de la celulosa y las cadenas no forman regiones cristalinas.
Heterótrofo: Organismo que requiere uno o mas compuestos orgánicos como fuente de carbono.
Lignina: Polímero vegetal estructural de naturaleza aromática y que se encuentra fundamentalmente en plantas superiores.
MDa: Megadalton.
Material biocompatible: Sustancia compatible con sistemas vivos.
Metilotrofo: Organismo que oxida compuestos orgánicos que no contienen enlaces carbono-carbono.
Metanotrofo: Organismo capaz de oxidar metano.
Polímero: Cadena larga de unidades monoméricas, cuyo número exacto no está definido.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

12.1. Celulosa y ligninas

12.1.1. Degradación de celulosa

Una parte importante del ciclo del carbono, realizada por microorganismos, es la degradación de los polímeros de las plantas. Es un proceso crítico ya que la principal entrada de carbono orgánico en los suelos es a través de las plantas y los microorganismos son los que transforman sus polímeros estructurales. Como consecuencia de esta actividad microbiana se forman compuestos húmicos que se convierten en compuestos orgánicos más sencillos y accesibles para otras poblaciones.

Entre los polímeros degradados por los microorganismos del suelo se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la quitina. La celulosa es un polisacárido lineal formado por restos de glucosa unidos mediante enlaces β–1,4. Estas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre sí por medio de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático.

La celulosa es uno de los materiales más utilizados por el hombre y se comercializa en una gran variedad de presentaciones, siendo el papel una de las más conocidas. Las plantas sintetizan al año billones de toneladas de celulosa, lo que constituye una de las reservas de energía renovable más abundante en la naturaleza. Se han llevado a cabo muchos esfuerzos para utilizar este polisacárido como materia prima en la obtención de glucosa, mediante hidrólisis, que utilizada en la industria de las fermentaciones, permitiría obtener una gran gama de productos como el etanol de uso como combustible. Los procesos desarrollados hasta la fecha para aprovechar este compuesto natural no tienen la rentabilidad necesaria para explotarlos comercialmente. Sin embargo las enzimas producidas por hongos y bacterias para degradar la celulosa (celulasas) sí han encontrado utilidad en la industria de detergentes, papelera, textil y alimenticia.

Existe un gran número de microorganismos celulolíticos, principalmente hongos y bacterias. Entre las bacterias cabe destacar los *Actinomycetales*, aeróbicos, y los anaeróbicos *Clostridiales*.

Entre los hongos, la degradación de celulosa está extendida a lo largo de todo este grupo taxonómico, desde los más primitivos *Chytridomycetes* hasta los más avanzados *Basidiomycetes.* Los hongos se han conocido siempre por ser agentes importantes en la degradación de materia orgánica en general y de sustratos celulósicos, en particular.

En bacterias se pueden hacer tres grupos fisiológicos:

a) Anaeróbicos fermentativos: Son tanto Gram-positivos (*Clostridium, Ruminococcus*) como Gram-negativos (*Acetivibrio)*.

b) Bacterias aeróbicas Gram-positivas; *Cellulomonas* y *Thermobifida*.

c) Bacterias aeróbicas deslizantes. Pertenecientes a los grupos *Cytophaga* y *Sporocytophaga,* están ampliamente distribuidos en suelos y aguas. Degradan la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

celulosa formando colonias diseminadas y no producen enzimas solubles sino que las celulasas permanecen unidas a las células.

Entre las bacterias existen diferencias en la estrategia de degradación de celulosa según se trate de los grupos aeróbicos o anaeróbicos. Con algunas excepciones, los anaeróbicos degradan celulosa a través de un complejo enzimático celulósico (celulosomas); como ejemplo destaca los bien caracterizados policelulosomas de *Clostridium thermocellum.* Los grupos aeróbicos, incluyendo los hongos, degradan la celulosa a través de la excreción de celulasas extracelulares.

En general, para la hidrólisis y el metabolismo de la celulosa los microorganismos producen celulasas extracelulares, bien libres o asociadas a la célula. Los componentes de estos sistemas celulósicos pueden clasificarse según su acción catalítica y se pueden encontrar tres tipos de actividades enzimáticas:

a) Endoglucanasas o 1,4-β-D-glucán-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4.). Actúan en las porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen los enlaces β-1,4 glucosídicos generando oligosacáridos de distintas longitudes.
b) Exoglucanasas que incluyen 1,4-β-D-glucán-glucanohidrolasas (celodextrinasas EC 3.2.1.74) y 1,4-β-D-glucán-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas EC 3.2.1.91). Actúan en los extremos reductores y no reductores de la celulosa liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasa).
c) β-glucosidasas o β-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21). Hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa.

Estos tres sistemas actúan de forma cooperativa en la degradación de celulosa. Las celulasas se distinguen de otras glucósido-hidrolasas por la acción de hidrólisis de las uniones β-1,4-glucosídicas.

Los microorganismos utilizan diferentes mecanismos para llevar a cabo de manera efectiva la hidrólisis de la celulosa. Los hongos celulolíticos tienen la capacidad de penetrar en los residuos celulósicos y excretan las celulasas en sitios internos de las partículas celulósicas. En estos sistemas, las enzimas no forman complejos y son denominados sistemas no agregativos. Por el contrario, las bacterias anaeróbicas carecen de la capacidad de penetrar en este material y presentan sistemas agregativos.

a) No agregativos: Estos sistemas están compuestos por tres tipos de enzimas:
   i) β-1,4-endoglucanasas
   ii) celobiohidrolasas y
   iii) β-glucosidasas.

   Las celulasas de hongos son las que se han estudiado con mayor intensidad en los últimos años. Como ejemplo cabe destacar el sistema de *Trichoderma viride,* que posee dos exoglucanasas, cinco endoglucanasas y dos β-glucosidasas. La existencia de dos exoglucanasas en este hongo se debe a la preferencia de una u otra por extremos reductores o no reductores de la celulosa. No está claro la necesidad de poseer cinco endoglucanasas, pero en muchos casos se explica debido a la heterogeneidad que presenta la celulosa. En el caso de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

bacterias las mejor estudiadas pertenecen a los géneros *Cellulomonas* y *Thermobifida. Cellulomonas* produce seis endoglucanasas y una exoglucanasa.

b) Agregativos: Los microorganismos que forman complejos celulósicos (celulosomas) se encuentran, en general, en ambientes anaerobios donde existen formando consorcios con otros microorganismos celulolíticos o no. En bacterias anaerobias pertenecientes a los géneros *Clostridium, Acetivibrio, Bacteroides* y *Ruminococcus,* las enzimas que participan en la degradación de la celulosa y hemicelulosa se encuentran localizadas en la superficie formando estos complejos multienzimáticos extracelulares denominados celulosomas. Estos son los mayores complejos que se encuentran en la naturaleza. Existen desde los policelulosomas de 100 MDa, hasta celulosomas individuales que presentan una masa molecular de 65 MDa a 2 MDa. El celulosoma de *Clostridium thermocellum* se ha estudiado con detalle. Se conoce que consiste en una proteína no catalítica (CipA) que es multimodular y que incluye nueve cohesinas, cuatro módulos hidrofílicos y proteínas de unión a carbohidratos. A las cohesinas de la proteína CipA se unen hasta 22 módulos catalíticos: nueve presentan actividad endoglucanasa, cuatro exoglucanasa, cinco hemicelulasa y una quitinasa.

En los suelos bien aireados, la celulosa se degrada y utiliza por microorganismos aerobios (hongos, mixobacterias y otras eubacterias). En el rumen, bajo condiciones anaeróbicas, las bacterias y algunos hongos anaeróbicos del grupo *Chytridiomycetes* atacan a la celulosa. Los hongos tienen más éxito que las bacterias en el proceso de degradación en los suelos ácidos o en la madera. El sistema más eficiente de degradación de la celulosa es el rumen, donde más del 90% de la celulosa se metaboliza por parte de la población microbiana.

12.1.2. Rumen

Los microorganismos que viven en el tracto digestivo de los animales herbívoros (rumen) desempeñan un papel fundamental en la degradación de polímeros vegetales (celulosa, hemicelulosa), que transforman en compuestos asimilables por el animal.

El rumen proporciona un ambiente apropiado, con un suministro de alimentos, para el crecimiento y reproducción de microorganismos. Los herbívoros consumen compuestos vegetales ricos en celulosa, y como no producen celulasas, dependen de las poblaciones microbianas asociadas para la degradación de la celulosa. El rumen alberga poblaciones de bacterias que constituyen la mitad de la biomasa contenida en él y son responsables de la actividad metabólica. Los hongos constituyen hasta el 8% de la biomasa intrarruminal y contribuyen a la digestión de forrajes de baja calidad. Por último, los protozoos (entre un 20-40%) forman gran proporción de biomasa pero su contribución es pequeña, en comparación a la de bacterias, debido a su menor actividad metabólica. El rumen proporciona un ambiente estable y relativamente uniforme de características anaeróbicas, con un pH de 5,5 a 7,0 (debido al tamponamiento de la saliva) y una temperatura entre 30 y 40 ^{o}C.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La digestión que tiene lugar en el rumen es únicamente microbiana, ya que en el mismo no se producen enzimas. En el interior del rumen, las poblaciones microbianas convierten los materiales vegetales en ácidos grasos de bajo peso molecular, dióxido de carbono y metano. Los ácidos grasos de bajo peso molecular, especialmente el acetato y el propionato, satisfacen las necesidades nutritivas del animal y los dos últimos se eliminan como productos residuales (Fig. 12.1).

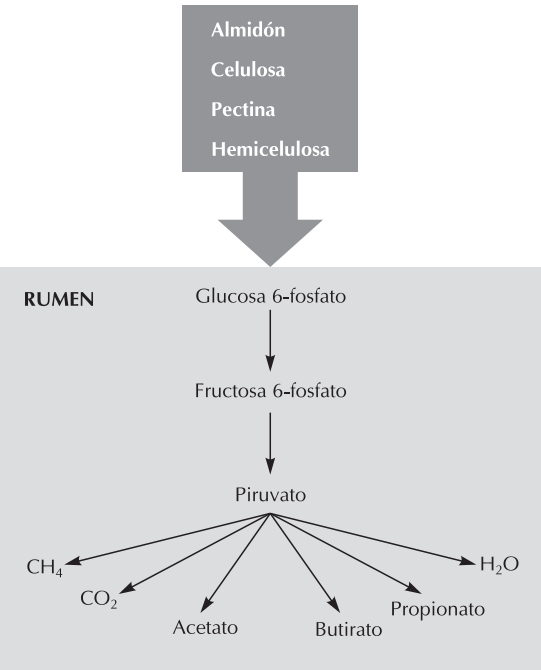


Figura 12.1. Esquema de la fermentación que se produce en el rumen.

La degradación de la celulosa la inician los microorganismos celulolíticos que representan entre el 1 y el 5% de la flora ruminal. La mayoría de los microorganismos de esta flora no son celulolíticos, aunque en conjunto pueden degradar un gran número de polímeros de alto peso molecular.

La composición bacteriana del rumen depende de la dieta y de la principal fuente de carbono (celulosa, almidón o pectina) El rumen es un ecosistema muy constante y cambios bruscos podrían llevar a la muerte del animal. Los aspectos bioquímicos se comentan en el capítulo 5.

12.1.3. Degradación de lignina

La degradación de lignina ocupa una posición central en el ciclo del carbono ya que la mayor parte del carbono renovable consta de lignina o de compuestos asocia-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

dos a ella, como celulosas y hemicelulosas. La degradación de lignina está implicada en la destrucción de la madera y tiene un papel muy importante en la patogénesis de las plantas. La lignina es un polímero vegetal estructural casi tan abundante en las plantas superiores como la celulosa y las hemicelulosas. Su estructura y su resistencia a la degradación son exclusivas.

En la madera y en estructuras lignificadas, como tallos de gramíneas, la lignina esta intrínsecamente asociada a la celulosa y a las hemicelulosas, añadiendo fuerza estructural y protegiendo a los polisacáridos mediante una barrera resistente a la degradación. La lignina presenta una estructura aromática y consta de subunidades de fenilpropano, unidas mediante enlaces carbono-carbono o éter, que no se conocen muy bien y forman una estructura tridimensional muy compleja. En general se sabe poco de la estructura química de la lignina. El aislamiento de lignina natural es muy difícil y para los trabajos de investigación se utilizan, generalmente, modelos de lignina sintética.

Los hongos de la podredumbre marrón son los primeros que atacan a la madera intacta y más tarde los de la podredumbre blanca. Ambos pertenecen al grupo de los Basidiomicetos. Los hongos de la podredumbre marrón atacan los componentes celulósicos y hemicelulósicos de la madera mediante un mecanismo que aún no esta muy claro. Mientras que los de la podredumbre blanca son los únicos que degradan la lignina, dejando un residuo celulósico suave y fibroso. La degradación de la lignina por los hongos de la podredumbre blanca se ha estudiado a fondo para su aplicación en biotecnología, en el blanqueado y el tratamiento de residuos procedentes de la fabricación de papel y de compuestos xenobióticos.

Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo muy heterogéneo. La mayoría de los trabajos de investigación se han llevado a cabo con *Phanerochaete chrysosporium*, como representante de este grupo de hongos. La degradación de la lignina es un proceso de oxidación complejo, indirecto y al azar. Los hongos producen agentes oxidantes que rompen los enlaces entre las diferentes subunidades y causan la despolimerización gradual de la molécula. Esto produce gran variedad de fenoles, ácidos aromáticos y alcoholes aromáticos. Algunos se mineralizan a CO_2 y H_2O, pero los intermediarios fenólicos pueden dar lugar a compuestos húmicos. Esta repolimerización es una reacción oxidativa espontánea, pero también se ha visto que está catalizada por polifenoloxidasas, peroxidasas y lacasas bacterianas que lo emplean como mecanismo de detoxificación de intermediarios fenólicos.

En lo que se refiere a los sistemas de enzimas ligninolíticos se conoce que el sustrato, que es un polímero muy heterogéneo, necesita que lo ataquen enzimas extracelulares u otros agentes. La lignina no contiene enlaces hidrolizables, por lo que las enzimas implicadas en la degradación deben de ser oxidativas. Por otro lado, la lignina es estéreo-irregular lo que implica que los ataques enzimáticos no son específicos comparados con otros polímeros naturales.

Las enzimas ligninolíticas implicadas en la degradación son las siguientes:

– Lignina peroxidasas (ligninasas, EC 1.11.1.14)

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– Manganeso peroxidasas (MnPs, peroxidasas dependientes de Mn, EC 1.11.1.13)
– Lacasas (bencenodiol oxidoreductasa, EC 1.10.3.2)

También existen otras enzimas accesorias que participan en la degradación y que implica la producción de peróxido de hidrógeno:

– Glioxal-oxidasa
– Arilalcohol oxidasa

En la tabla 12.1 se muestran las enzimas de la degradación de la lignina, los sustratos o cofactores y el efecto producido.

Tabla 12.1. Enzimas implicadas en la degradación de la lignina.

Actividad enzimática	Sustrato o cofactor	Efecto de la reacción
Lignina peroxidasa, LiP	H_2O_2, alcohol veratrílico	Oxidación del anillo aromático
Manganeso peroxidasa, MnP	H_2O_2, Mn, ácidos orgánicos, lípidos insaturados	Oxidación de Mn(II) a Mn(III), oxidación de compuestos fenólicos
Lacasa, Lacc	O_2, mediadores (ej, hidroxibenzotriazol)	Oxidación de fenoles, otras reacciones en presencia de mediadores
Glioxal oxidasa, GLOX	Glioxal, metil glioxal	Oxidación del glioxal a ácido glioxílico, producción de H_2O_2
Arilalcohol oxidasa	Alcoholes aromáticos	Oxidación de alcoholes a aldehídos, producción de H_2O_2
Enzimas productoras de H_2O_2	Numerosos compuestos orgánicos	O_2 reducido a H_2O_2

Las lignina peroxidasas (LiP) y las manganeso peroxidasas (MnP) son glicoproteínas que requieren peróxido de hidrógeno como oxidante. Las LiP oxidan subestructuras no fenólicas de la lignina eliminando un electrón y generando radicales catiónicos que son atacados enzimáticamente. Las MnP oxidan Mn(II) a Mn(III) que, a su vez, oxida el anillo fenólico a radicales fenoxi. Parece ser que estas últimas enzimas son más abundantes que las LiP. Las MnP tienen un papel muy importante en la despolimerización de la lignina y la clorolignina, y median los pasos iniciales de la degradación de lignina de alto peso molecular.

La lacasa, una oxidasa que contiene cobre, utiliza oxígeno molecular como oxidante y oxida compuestos fenólicos hasta radicales fenoxi. También se ha descrito que oxida compuestos no fenólicos bajo determinadas condiciones.

12.2. Biodegradación de cianuro, cianato y sus derivados, CO y metilaminas

12.2.1. Cianuro

El cianuro tiene un origen natural. Se conoce su presencia en algunas plantas, como la yuca, las almendras o las pepitas de limón, aunque también lo producen algunas bacterias, algas y hongos (Tabla 12.2). Las plantas son la mayor fuente de pro-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ducción de cianuro (cianogénesis) en la naturaleza, que en la mayoría de los casos está implicada en procesos defensivos u ofensivos.

Tabla 12.2. Fuentes de producción de cianuro.

NATURALES	**Bacterias** *Chromobacterium violaceum* *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas chloraphis* *Pseudomonas fluorecens*
	Algas *Chlorella vulgaris* *Nostoc muscorum* *Plectonema boryanum* *Anacystis nidulans*
	Hongos *Marasmius oreades* *Stemphyllium loti* *Gioeocercospora sorghii*
	Plantas Almendras Manzanas Yuca
ARTIFICIALES	Industrias productoras de fibras sintéticas Limpieza de metales Baños electrolíticos (industria joyera) Recuperación de metales preciosos Industria farmacéutica Industria de fabricación de pinturas Humos del quemado de plásticos (poliuretano)

El cianuro también tiene un origen antropogénico ya que este compuesto se utiliza en numerosos procesos industriales. Las actividades mineras y metalúrgicas y otras, como son las de joyería y bisutería, son una fuente importante de residuos con grandes cantidades de cianuro (Tabla 12.2).

El cianuro se presenta en la naturaleza en una gran variedad de especies, incluyendo ácido cianhídrico (que es un gas) y sus sales (NaCN y KCN), complejos poco estables como el cianuro de níquel y muy estables como el ferrocianuro. La toxicidad de estos compuestos depende de su biodisponibilidad y de la constante de disociación de los complejos. Por ejemplo, el ferro y ferricianuro son excepcionalmente estables y poco tóxicos comparados con las formas libres de cianuro (Fig. 12.2).

Con respecto a la toxicidad, el cianuro es un potente inhibidor del crecimiento celular, afectando a procesos tales como la respiración, el metabolismo del nitrógeno y el del fosfato. Su efecto inhibidor se conoce desde 1920, cuando Warburg y Keilin demostraron que se une al hierro de la citocromo *c* oxidasa, bloqueando el sistema respiratorio. Se ha demostrado que este complejo enzimático se inhibe completamente en presencia de una concentración de cianuro 33 nM. El cianuro también inhibe la actividad de algunas metaloproteínas, uniéndose a sus cofactores como, por ejemplo, al grupo hemo de la hemoglobina. El cianuro es tóxico para animales y una gran

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$CN^- + H_2O \rightleftharpoons CNH + OH^-$$

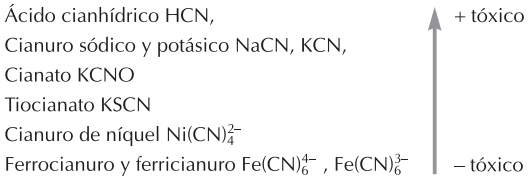


Figura 12.2. Formas del cianuro en la naturaleza.

variedad de hongos, bacterias y algas. Así, algunas estirpes de *Pseudomonas* no sobreviven en presencia de concentraciones superiores a 1 μg de cianuro ml^{-1} mientras que en humanos la dosis letal se encuentra entre 0,5 y 3,5 mg kg^{-1}.

De acuerdo con la normativa vigente, los residuos que contienen este compuesto son calificados como tóxicos y peligrosos y, por tanto, queda regulada su gestión de manera especial. Los residuos que lo contienen no pueden ser vertidos al medio sin que se sometan a tratamientos destinados a reducir su contenido por debajo del límite permitido (0,1 mg l^{-1} en agua potable). Además de cianuro libre, los residuos industriales suelen contener metales pesados. Por ejemplo, en la industria minera los residuos contienen grandes cantidades de hierro, níquel, cobre y zinc con los que el cianuro libre forma complejos de estabilidad y toxicidad variables.

En la actualidad, los residuos cianurados se eliminan mediante cloración alcalina, ozonización, precipitación y electrólisis. Estos métodos son costosos, además de que en muchos casos no depuran totalmente. En la tabla 12.3 se presentan los distintos tratamientos y sus inconvenientes.

Tabla 12.3. Tratamientos fisicoquímicos del cianuro y sus complejos.

Tratamiento	Inconveniente
Cloración	No elimina ferrocianuros
Electrólisis	No es útil para concentraciones bajas
Precipitación	Genera residuos como ferrocianuro férrico
Ozonización	No es válido para cianuro de cobalto

El tratamiento biológico de residuos cianurados tiene la ventaja, respecto a los tratamientos fisicoquímicos, de que es mas barato, más seguro, permite el tratamiento conjunto de cianuro libre y complejado, y se autorregula frente a cambios en la composición.

Por ser un compuesto natural, el cianuro es biodegradable. A pesar de que el cianuro es un inhibidor metabólico, se han aislado organismos capaces de utilizarlo como fuente de nitrógeno. Por este motivo, para la eliminación de cianuro se pueden emplear desde lodos activados hasta enzimas puras, dependiendo de la complejidad y variabilidad del efluente a tratar. Las características químicas del cianuro

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

hacen que sea una mala fuente de carbono para organismos heterótrofos, pero una excelente fuente de nitrógeno en potencia, siempre y cuando la bacteria lo pueda tolerar y asimilar.

Todos los organismos cianogénicos y algunos no cianogénicos, han desarrollado mecanismos de resistencia frente a este tóxico, basados principalmente en la síntesis de una oxidasa alternativa insensible a cianuro y la inducción de un potente sistema de adquisición de metales. Entre estos organismos resistentes, algunas bacterias y hongos han adquirido además una ruta degradativa de cianuro, confiriéndoles la capacidad de poder utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno y/o carbono. Aunque se han descrito varias rutas de degradación de cianuro, todas tienen en común la conversión de éste a amonio como producto final.

Las diferentes rutas para la degradación de cianuro por parte de bacterias y hongos se resumen en la tabla 12.4.

Tabla 12.4. Rutas de la degradación de cianuro.

Enzimas	Origen microbiano
Cianuro monoxigenasa $HCN + O_2 + H^+ + NADPH \longrightarrow HOCN + NADP^+ + H_2O$	*Pseudomonas sp.*
Cianasa $HOCN + H_2O \longrightarrow CO_2 + NH_3$	*Escherichia coli, Rhodococcus rhodochrous*
Cianuro dioxigenasa $HCN + O_2 + H^+ + NADPH \longrightarrow CO_2 + NH_3 + NADP^+$	*Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas cereus, Bacillus pumillus*
Cianuro hidratasa $HCN + H_2O \longrightarrow HCONH_2$	Hongos patógenos
Nitrilo hidratasa $R-CN + H_2O \longrightarrow RCONH_2$	*Pseudomonas, Corynebacterium, Brevibacterium*
Cianidasa $HCN + 2H_2O \longrightarrow HCO_2H + NH_3$	*Alcaligenes xylosooxidans*
Nitrilasa $R-CN + 2H_2O \longrightarrow RCO_2H + NH_3$	*Klebsiella, Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia*
Rodanasa $HCN + S^2O_3^{2-} \longrightarrow SO_3^{2-} + HSCN$	*Thiobacillus denitrificans, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus*
Cianoalanina sintetasa $CyS + HCN \longrightarrow \beta\text{-cianoalanina} + HS^-$	*Bacillus megaterium*

Todos ellos pueden resultar igualmente eficientes *in vivo*, pero *in vitro* resulta especialmente interesante la cianidasa, ya que no necesita cofactores y produce directamente amoniaco y ácido fórmico, utilizando cianuro y agua como únicos sustratos.

Sin embargo, no existe ningún método que permita el tratamiento biológico simultáneo del cianuro libre y sus complejos a pH alcalino (superior a 9). Ello es clave ya que evitaría que el cianuro pase a la atmósfera en forma de ácido cianhídrico, lo cual resulta contraproducente. La utilización de microorganismos alcalófilos y cianotrofos, o de las enzimas procedentes de ellos, permitirá trabajar a un pH que minimizara el peligroso escape del cianuro a la atmósfera, como se trata de hacer en el

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

proyecto de investigación en curso por los autores de este texto de biotecnología ambiental.

12.2.2. Cianato

El cianato puede aparecer de forma natural en algunos tejidos animales como resultado de la descomposición no enzimática del carbamil-fosfato y en el medio ambiente como resultado de la disociación de la urea y la fotooxidación del cianuro.

El cianato es un intermediario de la oxidación del cianuro producido como consecuencia de actividades industriales, convirtiéndose éste en amonio y en complejos amonio-metálicos que son tóxicos. Este compuesto también se utiliza como herbicida.

El cianato es tóxico ya que reacciona con los grupos nucleofílicos de las proteínas. Se ha descrito que el cianato inhibe específicamente a la carbamil-fosfato sintetasa y, por lo tanto, afecta a la síntesis de arginina.

Se han descrito microorganismos capaces de tolerar cianato y de usarlo como fuente de nitrógeno debido a la capacidad de inducir la enzima cianasa. La cianasa (cianato hidratasa EC 4.2.1.104) cataliza la reacción entre el cianato y bicarbonato para producir amonio y dióxido de carbono. Esta actividad enzimática inducible la presentan diferentes especies de bacterias, cianobacterias y plantas.

$$CNO^- + 3\ H^+ + HCO_3^- \longrightarrow 2\ CO_2 + NH_4^+$$

La cianasa se ha estudiado en detalle en *Escherichia coli* y en *Pseudomonas spp*. En *E. coli* se conoce que los genes implicados en la degradación de cianato están agrupados en un operón denominado *cyn*. Formando parte de este operón se encuentran, en este orden, tres genes *cynT*, *cynS* y *cynR* que codifican, respectivamente, la anhidrasa carbónica que regenera el bicarbonato consumido por la cianasa, la cianasa y un activador transcripcional del operón. El gen *cynR* pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LysR. Se ha descrito que se transcribe en dirección opuesta al resto de los genes del operón y que codifica una proteína de regulación positiva que controla el operón *cyn* y su propia síntesis. Con respecto a la regulación de la degradación se requiere cianato y la presencia de la proteína CynR. En *Pseudomonas spp* la organización génica es muy similar a la encontrada en *E. coli*.

12.2.3. CO y metilaminas

Monóxido de carbono (CO)

Los microorganismos también intervienen en el ciclo del monóxido de carbono, tanto de manera indirecta como directa. La fuente más importante de CO es la oxidación fotoquímica del metano y de otros hidrocarburos en la atmósfera. También se forman cantidades traza de CO durante la respiración animal y microbiana. Aunque

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

se genera mucho CO, la cantidad de este compuesto no ha aumentado significativamente, posiblemente debido a la proliferación de microorganismos que viven a expensas de CO.

Las cianobacterias y las algas hacen de los océanos productores netos de CO; además el hombre también contribuye al aporte de CO mediante la quema de biomasa y combustibles fósiles. El aumento en la concentración de CO produce efectos indeseables ya que este compuesto es muy tóxico para los humanos. Además, es tóxico para los microorganismos debido a su afinidad por los citocromos.

Existen diferentes géneros de bacterias que utilizan CO como fuente de carbono y energía. Se incluyen bacterias aeróbicas y anaeróbicas y destacan las especies de *Pseudomonas, Streptomyces, Bacillus, Nocardia, Mycobacterium* y *Clostridium.*

Existen bacterias carboxidotróficas que crecen autotróficamente utilizando las reacciones del ciclo de Calvin para fijar el CO_2 generado por la oxidación del CO. Bacterias como *Pseudomonas carboxidoflava* y *P. carboxydohydrogena* pueden utilizar el CO como fuente de carbono y de energía aunque el crecimiento es lento. La enzima implicada en el proceso es la monóxido de carbono óxido reductasa que cataliza la reacción (véase Capítulo 5):

$$CO + H_2O \longrightarrow CO_2 + H_2$$

En presencia de oxígeno, el H_2 producido se oxida a H_2O produciendo energía para la fijación del CO_2. Las carboxidobacterias utilizan preferentemente gas hidrógeno por lo que, si éste está presente, lo utilizan antes que el CO.

Algunos metanógenos pueden reducir anaeróbicamente el CO hasta CH_4 mediante H_2:

$$CO + 3\ H_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O$$

Y el CO puede ser reducido a acetato por acetógenos como *Clostridium thermoaceticum*:

$$2\ CO + 2\ H_2 \longrightarrow CH_3COOH$$

También se han descrito géneros de hongos y algas verdes que oxidan CO hasta CO_2.

Oxidación de metilaminas

Los compuestos de este tipo, desde el punto de vista bioquímico, comparten una característica clave y es que no contienen enlaces carbono-carbono. Los organismos que utilizan compuestos de un átomo de carbono se denominan metilotrofos. Muchos, pero no todos, son metanotrofos. Por este motivo los metanotrofos presentan la peculiaridad de crecer en compuestos monocarbonados muy oxidados y metano (Capítulo 5).

Existen muchos microorganismos capaces de crecer u oxidar estos compuestos que, generalmente, son degradados mediante reacciones de N-demetilación que producen formaldehído y amonio:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

a) Tetrametilaminas

Los microorganismos degradan el cloruro de tetrametilamonio a través de la formación de trimetilaminas. La reacción inicial está catalizada por una monoxigenasa que no posee grupo hemo y es dependiente de NADH. En esta reacción se forman oxidotrimetilamina y formaldehído.

b) Trimetilaminas

Los microorganismos que crecen en trimetilamina poseen una monoxigenasa inducible que oxida el sustrato hasta trimetilamina-*N*-oxido y éste mediante una enzima denominada trimetilamina-*N*-oxido aldolasa la convierte en dimetilamina y formaldehído (Fig 12.3).

$$(CH_3)_3N + O_2 + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow (CH_3)_3NO + H_2O + NAD(P)^+$$

$$\downarrow$$

$$(CH_3)_2NH + HCHO$$

Figura 12.3. Ruta de degradación de trimetilaminas.

Existen otras especies que llevan a cabo la degradación mediante una ruta directa que utiliza la enzima trimetilamina deshidrogenasa y que da lugar a dimetilamina y formaldehído.

c) Dimetilaminas

Los microorganismos que llevan a cabo la degradación de dimetilaminas poseen una enzima amino monoxigenasa que contiene citocromo P_{420} que cataliza la degradación de dimetilaminas a metilamina y formaldehído.

$$(CH_3)_2N + O_2 + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow CH_3NH_2 + HCHO + NAD(P)^+ + H_2O$$

Se conoce que esta enzima, junto a las que participan en la degradación de trimetilaminas y metilaminas, están asociadas en la membrana bacteriana y de manera secuencial oxidan todos estos tipos de compuestos hasta formaldehído.

d) Metilaminas

En el género *Pseudomonas* se ha descrito la existencia de una amina deshidrogenasa que cataliza la oxidación de metilamina para producir formaldehído y amonio.

12.3. Biotecnologías correctoras de la contaminación: biosensores y biorreactores

12.3.1. Biosensores

Un biosensor es una herramienta o sistema analítico compuesto por un material biológico inmovilizado (una enzima, anticuerpo, célula entera, orgánulo o combina-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ciones de los mismos, microorganismos o DNA), en íntimo contacto con un sistema transductor (electroquímico, óptico, eléctrico) adecuado que convierte la señal bioquímica en una señal eléctrica cuantificable.

En función de su estructura, un sensor puede definirse como un dispositivo analítico que consta de dos partes (Fig. 12.4):

– La zona de reconocimiento que está en contacto directo con la muestra y directamente asociada con un transductor.
– Transductor que convierte la señal de reconocimiento en una señal primaria, susceptible de ser amplificada y medida.

Los biosensores presentan la ventaja, desde el punto de vista analítico, de la automatización del proceso y de la miniaturización, que permite la monitorización *in situ*.

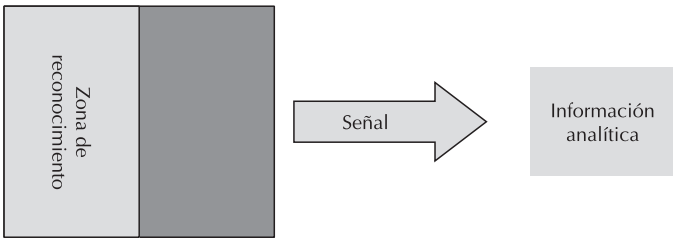


Figura 12.4. Mecanismos implicados en un sensor.

Clasificación de los biosensores

Existe una gran variedad de biosensores en cuanto a sus tipos, modos de operación, aplicaciones, etc.

a) Naturaleza del parámetro que se desea medir: existen biosensores de tipo químico o bioquímico.
b) Intervención en el proceso (bio)químico.
c) Forma de inmovilización y especie inmovilizada: transitoria (muestra, producto de la reacción) o permanente (reactivo, catalizador).
d) Tipo de transductor: óptico, eléctrico, térmico, acústico, etc.
e) Funcionamiento: reversible o irreversible (desechable).
f) Forma externa: tipo sonda, plano, de flujo.
g) Modos de operación: discontinuo o continuo.

En la figura 12.5 se muestra una clasificación de los biosensores según su forma externa:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

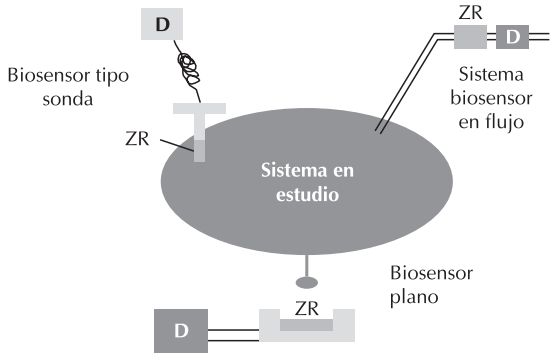


Figura 12.5. Clasificación de los biosensores según su forma externa. (ZR: zona de reconocimiento; D: detector).

Usos y aplicaciones de los biosensores

Los biosensores pueden ser utilizados ampliamente en el análisis clínico, terapéutica, veterinaria, agricultura, control de procesos industriales y de la contaminación. En la tabla 12.5. Se muestran posibles aplicaciones de los biosensores en la industria alimentaria.

Tabla 12.5. Aplicaciones de los biosensores en la industria alimentaria.

Analitos	Aplicaciones/Ejemplos
Microorganismos y toxinas	*Salmonella typhimurium* *Campylobacter jejuni* Enterotoxina *Staphylococcus aureus A*
Parámetros bioquímicos	Glucosa y fructosa en zumos de frutas Etanol y metanol en bebidas alcohólicas Glutamato en condimentos Ácidos grasos esenciales en aceites
Contaminantes	Antibióticos y hormonas Plaguicidas, compuestos organofosforados y carbamatos
Parámetros de evaluación de la frescura de alimentos	Hipoxantina e inoxina en pescados Putrescina y cadaverina en carnes

De manera habitual se pueden encontrar biosensores en los laboratorios de bioquímica clínica para determinar glucosa, ácido láctico, etc. Un ejemplo, el control de glucosa sanguínea en los diabéticos. La tasa de glucosa en sangre de un diabético insulino-dependiente tiene que determinarse dos o tres veces al día y es vital para la salud del paciente que tal control se realice con precisión.

La introducción de biosensores en veterinaria, agricultura y alimentación ha repercutido en áreas como en el control de la fertilidad y de las enfermedades infecciosas, las industrias lácticas (proteínas, grasa, anticuerpos, hormonas, vitaminas, etc.).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La aplicación de biosensores tiene un interés especial en el tratamiento biológico de zonas contaminadas (biorremediación).

En el control de aguas se utilizan biosensores fabricados con células enteras y se han usado para combatir el creciente número de contaminantes encontrados en las aguas superficiales y, por tanto, en las aguas de bebida. Actualmente aparecen tantos materiales no deseados en las aguas superficiales que el análisis de una única sustancia es insuficiente y se requiere un biosensor de amplio espectro.

Se han utilizado biosensores de flujo con enzimas inmovilizadas para la detección de tóxicos. Sirva de ejemplo el biosensor de flujo para la detección de cianato en aguas. El método está basado en la inmovilización de un catalizador biológico, en este caso la cianasa, en vidrio de poro controlado por el que pasa un flujo con la mezcla a determinar. El amonio formado en la reacción enzimática se mide mediante espectrofotometría. En la figura 12.6 se muestra un esquema del biosensor de cianato.

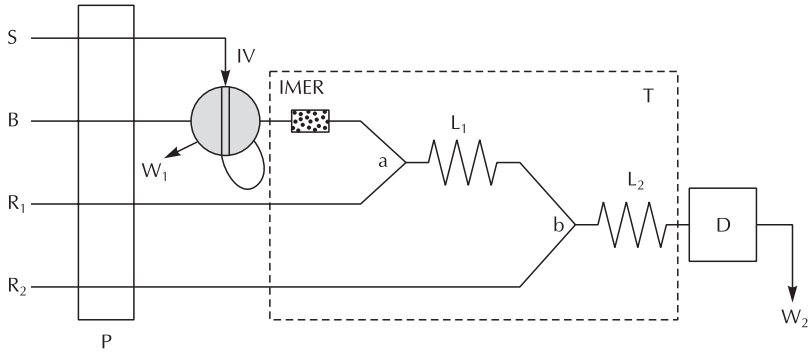


Figura 12.6. Esquema del biosensor de cianato. IV, válvula de inyección, T, termostato; L_1 y L_2, reactores; IMER, reactor con la cianasa inmovilizada; D, detector; W_1 y W_2, salidas de residuos; S, muestra problema; B, tampón; P, bomba peristáltica y R_1 y R_2, reactivos.

También se han diseñado biosensores con bacterias recombinantes que responden a contaminantes ambientales. La clave de la utilización de bacterias como elementos biosensores estriba en que la expresión de los sistemas de destoxificación está regulada. Es decir, que los genes que determinan las proteínas implicadas se transcriben, exclusivamente, cuando el compuesto a destoxificar está presente en el medio.

El esquema general de este tipo de biosensores emplea la tecnología denominada de fusiones génicas o de genes informadores. En estos casos, el promotor (elemento genético que regula la transcripción de los genes correspondientes), que está programado de forma natural para dirigir la expresión de los genes de destoxificación, puede ser manipulado para que exprese, en su lugar, un producto con una actividad cuantificable. Esta actividad puede ser enzimática (por ejemplo, β-galactosidasa o β-glucuronidasa), o algún fenotipo detectable fácilmente mediante procedimientos ópticos (emisión de luz o de fluorescencia) o inmunológicos (reacción con anticuerpos monoclonales). La presencia o ausencia de un cierto contaminante en el medio se traduce, finalmente, en una propiedad física que puede ser medida.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La gran ventaja del uso de bacterias enteras como componentes biológicos de los biosensores es que, aparte de indicar la presencia del compuesto en muestras directas y a muy bajo precio, proporciona una medida directa de su biodisponibilidad, es decir, de su efecto sobre un sistema vivo. Es una tecnología emergente de la que ya existen varias aplicaciones.

Se han diseñado biosensores para la detección de naftaleno en suelos contaminados. La proteína reguladora denominada NahR es capaz de reconocer a un intermediario de la ruta de degradación y activar al promotor Pnah para la transcripción de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta metabólica. El biosensor diseñado acopla el promotor Pnah a unos genes denominados *lux* (de la bacteria luminiscente *Vibrio fisheri*) cuyo producto (la luciferasa) provoca la emisión de luz visible. Mediante la utilización de esta bacteria como sistema sensor, la presencia de naftaleno en el medio se traduce en una emisión de luz.

De la misma forma se pueden detectar otros hidrocarburos, desde las mezclas BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) a metales pesados, típicamente, el mercurio.

Asimismo, se ha descrito el empleo de informadores de superficie, consistentes en una proteína bacteriana de membrana externa en la que se ha insertado un epitopo heterólogo que se presenta al exterior de las células en una conformación reconocible por un anticuerpo monoclonal específico. Con este último sistema, la presencia de un contaminante en el medio se traduce en una señal inmunológica. Otros sistemas implican la detección de genes/enzimas destoxificadoras (CYP) como bioindicadores de contaminación.

12.3.2. Biorreactores

Se han desarrollado una gran variedad de tecnologías encaminadas a tratar contaminantes "trasladando" la zona contaminada a otro lugar. El proceso de tratamiento de contaminantes esta relacionado, en muchos casos, con el uso de un biorreactor. Los biorreactores se han diseñado para el tratamiento de líquidos, sólidos y gases contaminantes y peligrosos y su uso es especialmente interesante ya que presentan un bajo costo comparado con otros métodos. La mayoría de los biorreactores se utilizan en la producción microbiana de antibióticos, disolventes, aminoácidos y otros productos de fermentación y sólo algunos se han empleado en la eliminación de contaminantes. Además se han diseñado para operar en condiciones de aerobiosis y sólo unos pocos funcionan en anaerobiosis (en casos de contaminantes muy específicos).

Dependiendo del contaminante, o zona contaminada, existen distintos tratamientos en el reactor. En muchos casos el tratamiento biológico de contaminantes se lleva a cabo en continuo, es decir el líquido o la suspensión contaminada entra en el biorreactor y el líquido tratado se elimina de manera continua. En algunos casos, los tratamientos se realizan en discontinuo; este tipo de tratamientos son útiles para suelos, sólidos y, en algunos casos, para procesos que requieren mucho tiempo de tratamiento.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En estos últimos sólo se tratan volúmenes pequeños en comparación con los que operan en continuo.

En algunos casos los biorreactores se pueden inocular con una única especie o con una mezcla de microorganismos que funcionen bajo condiciones controladas. Algunos ejemplos de tratamientos biológicos con bioreactores son los siguientes.

a) Biorreactor para el tratamiento de suelos contaminados con TNT en condiciones anaeróbicas.

   Para tratar estos suelos se utilizó un reactor de 75.000 L que se rellenó con 23 m^3 de suelo contaminado. Para hacer el sistema anaerobio se añadió almidón y las bacterias del suelo eliminaron todo el oxígeno disuelto. Al final se consiguió eliminar gran cantidad de TNT de estos suelos.

b) Biorreactores para tratar zonas contaminadas con cianuro.

   En la mina de oro de Homestake, en Dakota del Sur, USA, además de cianuro libre o cianuro disociable por ácidos débiles, el residuo minero contiene tiocianato, complejos de hierro y cobre, y otros componentes minoritarios. El tratamiento es completamente aeróbico y se divide en dos fases, una primera en la que el cianuro es convertido en amonio, y una segunda en la que bacterias nitrificantes convierten el amonio en nitrato. El diseño de la planta permite el tratamiento de unos veinte millones de litros diarios, y un 60% del flujo se puede descargar directamente en una piscifactoría de truchas, ya que el cianuro y los complejos metálicos se pueden reducir hasta en un 98% mediante éste tratamiento.

12.4. Plásticos biodegradables

Los polímeros biodegradables pueden clasificarse en cuatro categorías principales:

a) Polímeros naturales: celulosa, almidón y proteínas.
b) Polímeros naturales modificados: acetato de celulosa o los polialcanoatos.
c) Materiales compuestos que combinan partículas biodegradables (almidón o celulosa) con polímeros sintéticos (mezclas de almidón y poliestireno o almidón y policaprolactona).
d) Polímeros sintéticos: poliésteres, poliesteramidas y poliuretanos (derivados del petróleo).

En general, los polímeros sintéticos ofrecen mayores ventajas sobre los materiales naturales porque pueden ser diseñados según las propiedades requeridas. La biodegradabilidad de los plásticos depende de la estructura química del material y de la constitución del producto final. Los polímeros biodegradables pueden basarse en resinas naturales o sintéticas. Los plásticos naturales biodegradables están basados en moléculas renovables como el almidón.

Con respecto a la constitución química, los materiales biodegradables de mayor uso pueden clasificarse en tres categorías: derivados de azúcares, poliésteres y alcohol polivinílico.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

12.4.1. Derivados de azúcares

a) Polímeros derivados del almidón.

El almidón es un polímero lineal formado por unidades de glucosa unidas por uniones glucosídicas α(1-4). La longitud de las cadenas de almidón varía dependiendo de la planta pero, en general, oscila entre 500 y 2.000 unidades de glucosa. Es un material termoplástico de carácter fuertemente hidrofílico, de bajo coste y de alta disponibilidad, que puede utilizarse como aditivo biodegradable o material de sustitución en plásticos tradicionales. Los polímeros derivados de almidón contienen entre un 10 y un 90% del compuesto y las materias primas para la fabricación de los mismos provienen de cultivos como el maíz, trigo o patatas. Cuanta mayor sea la cantidad de almidón en el polímero, más fácil es la degradación del mismo. La degradación de este tipo de plásticos se realiza a través de ataques enzimáticos de los enlaces glucosídicos.

Entre los plásticos biodegradables basados en almidón y comercializados actualmente se pueden citar los siguientes: polietileno de baja densidad (ECOSTAR®), polietileno y poliésteres (ECOLAN®), derivados de bajo peso molecular del petróleo (NOVON®), un polímero soluble en agua y plastificante (BIOFIOL®).

b) Derivados de la celulosa.

La celulosa es el polímero natural más abundante por lo que este polisacárido y sus derivados se han investigado intensamente como material biodegradable potencial. A pesar que la celulosa natural no se degrada con facilidad, puede convertirse en un material biodegradable mediante modificaciones químicas que alteren su estructura altamente ordenada. Como ejemplo cabe destacar el acetato de celulosa, que se caracteriza por una elevada resistencia a la tensión y la celulosa oxidada.

12.4.2. Poliésteres

Los poliésteres constituyen el grupo de polímeros más extensamente estudiados en cuanto a la degradación enzimática. Los poliésteres alifáticos, con una cadena flexible, son más fácilmente degradados en sistemas biológicos que los aromáticos. El poliéster juega un papel importante como plástico biodegradable debido a la posibilidad de hidrolizar los enlaces éster. Existen muchos tipos que se agrupan como se muestra en la figura 12.7.

a) Los poliésteres aromáticos, tales como el PET, presentan unas buenas características plásticas pero una gran resistencia al ataque microbiano. Los poliésteres alifáticos son biodegradables pero, en general, carecen de propiedades mecánicas aceptables que, en muchos casos, son indispensables para su utilidad.

b) Los poliésteres alifáticos sintéticos basados en dioles y diácidos son biodegradables. El interés por este tipo de polímeros está aumentando desde la presen-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

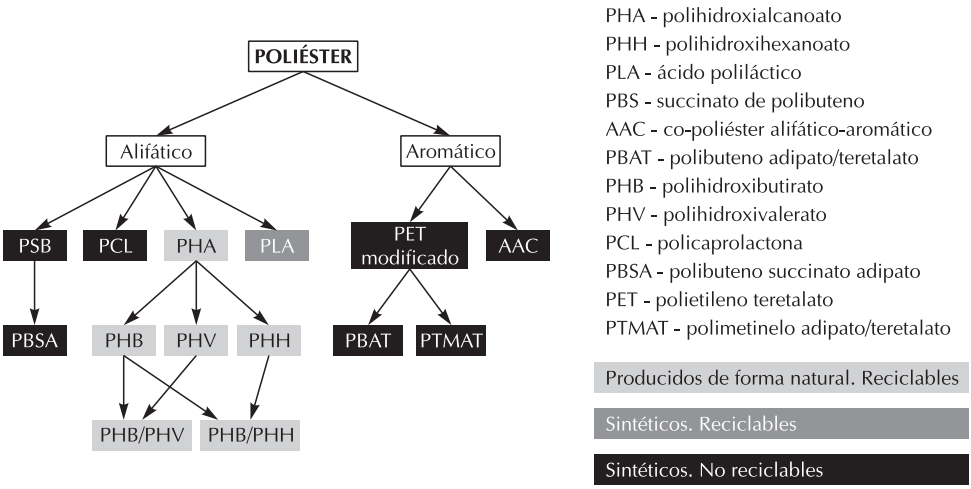


Figura 12.7. Poliésteres biodegradables.

tación del polímero BIONOLLE® que se sintetiza mediante un reacción de policondensación de etilénglicol, 1,4-butanodiol y ácidos dicarboxílicos como el succínico y el adípico. Debido a las facilidades de procesado y a las buenas propiedades que presenta el polímero, se fabrica como fibra textil y como plástico. Entre sus aplicaciones destacan bolsas de basura, envases para cosméticos, alimentos y espumas.

c) Poliésteres alifáticos producidos de forma natural.

Polihidroxialcanoatos (PHA) Son ésteres de 3-hidroxiácidos que presentan propiedades de plásticos biodegradables y de polímeros elásticos. Algunas bacterias poseen la capacidad de sintetizarlos como gránulos de reserva de carbono. Dos miembros de esta familia son el polihidroxibutirato (PHB) y el polihidroxivalerato (PHV). La ruta de síntesis de polihidroxibutírico (PHB) de la bacteria *Ralstonia eutropha* se ha clonado en otras bacterias y en plantas.

El polímero comercial más utilizado consiste en un copolímero PHB/PHV patentado por Monsanto como Biopol™ y que se usa en dispositivos quirúrgicos. Jugando con los precursores suministrados se pueden lograr copolímeros con distintas propiedades plásticas y elásticas: PHA de longitud de cadena media, con monómeros C6 a C16, y distintos grupos funcionales, lo que permite modificar la estructura y propiedades físicas del polímero. Incluso se ha logrado que las fibras del algodón acumulen una pequeña cantidad de PHB, suficiente para que la fibra textil mejore sus propiedades de aislamiento. Aunque el coste actual de obtención de los PHA es más de 10 veces superior al de los petroplásticos, se espera que las mejoras en su fabricación y la tendencia a utilizar materiales biodegradables y renovables logren que dentro de algunos decenios puedan ir sustituyéndolos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

d) Poliésteres alifáticos sintéticos biodegradables.

- Polihidroxibutirato-polihidroxihexanoato (PHBH). Es uno de los plásticos más novedosos. Deriva de fuentes de carbono tales como sacarosa, ácidos grasos o melazas a través de fermentación. Estos polímeros alifáticos-alifáticos son completamente biodegradables. Se comercializan bajo el nombre de Nodax™.
- Ácido poliláctico (PLA). Es un poliéster alifático lineal que se obtiene mediante polimerización por apertura del anillo del dímero cíclico del ácido láctico. El polímero derivado del monómero natural, L-láctico, tiene unas propiedades que lo hacen muy adecuado para aplicaciones que tiene que soportar una carga, como suturas y fijaciones ortopédicas. Se comercializa bajo distintos nombres: Lacea, Lucty, NatureWOrks.
- Policaprolactona (PLC). Es un polímero sintético alifático que se obtiene mediante la polimerización por apertura del anillo de la caprolactona. Es un material biocompatible y se utiliza como sutura biodegradable. Debido a que la PLC tiene un intervalo de degradación muy elevado, del orden de dos años, se han obtenido copolímeros con D,L-láctico para aumentar la velocidad de absorción.
- Ácido poliglicólico (PGA). Es el poliéster alifático lineal más simple. Fue utilizado para desarrollar la primera sutura sintética y se comercializó como DEXON®. Mediante un proceso de dimerización del ácido glicólico se sintetiza el monómero, el cual produce un material de alto peso molecular. Se utiliza como material trenzado para suturas.

Bibliografía

Alexander, M. (1999). 2th Ed. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic press. California.

Gibson D. T. (1984). *Microbial Degradation of organic compounds*. Marcel Dekker. New York.

htpp// www.deh.gov.au/industry/waste/biodegradable

Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, J. L., Castillo, F., Blasco, R. (2005). "Bacterial degradation of Cyanide and its metal complexes under alkaline conditions". *Applied and Enviromental Microbiology*. 940-947.

Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Fernández-Romero, J. M. y Luque de Castro, M. D. (2003). "Flow injection spectophotometria determination of cyanati in bioremediation processes using immobilised incudible cyanase". *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 337: 1071-1078.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology". *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 506-577.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., (2003). 10ª Ed. *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson Education.

Rodríguez-Ortega, M. J., Grosvik, B. E., Rodríguez-Ariza, A., Goksoys, A., López-Barea, J. (2003). "Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four environmental pollutants". *Proteomics*. 3: 1535-1543.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 13
BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES II

Glosario
13.1. Petróleo y derivados
13.1.1. Introducción
13.1.2. Origen y composición del petróleo
13.1.3. Bases bioquímicas y genéticas de la degradación de petróleo
Bases bioquímicas
Bases genéticas
13.1.4. Ecotoxicología
Toxicidad acuática de los hidrocarburos
Toxicidad terrestre
13.2. Residuos procedentes de la producción de aceite de oliva
13.2.1. Introducción
13.2.2. Sistemas de producción de aceite
13.2.3. Composición de alpechín y alperujo
13.2.4. Tratamiento y usos de alpechín y alperujo
13.3. Tratamiento biológico de catástrofes naturales. Corrección *in situ* de vertidos de crudo
13.3.1. Contaminación
Medio hídrico y atmosférico
Contaminación terrestre
13.3.2. Degradación natural
13.3.3. Bioestimulación *in situ*
13.3.4. Otros tratamientos
Tratamiento convencional
Tratamiento en fase lechada
13.3.5. Eliminación de azufre y nitrógeno orgánico
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Alpechín: Fase acuosa residual obtenida en la producción de aceite de oliva.
Alperujo: Mezcla viscosa formada por alpechín y orujo.
Asfalto: Fracciones más pesadas del petróleo.
Bioestimulación: Proceso de biorremediación que consiste en proveer las condiciones adecuadas a los organismos autóctonos para acelerar el proceso biodegradativo. Suele consistir en la adición de nutrientes para equilibrar el medio (una fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, etc., fácilmente asimilables) y en el control de variables físico-químicas claves, como la humedad, la concentración de oxígeno (u otros oxidantes) o la temperatura.
Biomagnificación: Parte de la biorremediación que consiste en la aceleración del proceso mediante la adición de microorganismos especialmente cualificados para la degradación de un determinado contaminante químico.
Biorremediación: Tecnología que emplea seres vivos, fundamentalmente microorganismos ya sean autóctonos o inoculados, para el tratamiento de residuos o áreas contaminadas con ellos. A su vez, la contaminación puede ser tratada en el mismo sitio donde se produce (*in situ*), o en un lugar distinto al que se transporta para su tratamiento en condiciones más controladas (*ex situ*).
Biosurfactante: Surfactante de origen biológico. Surfactante proviene del inglés y significa detergente, por lo que se puede emplear la palabra biodetergente en lugar de biosurfactante, si bien está más introducida esta última en el lenguaje técnico.
DBO: Demanda biológica de oxígeno.
DQO: Demanda química de oxígeno.
Fitorremediación: Tecnología que forma parte de la biorremediación basada en la utilización de plantas para el tratamiento de una zona contaminada. Las plantas pueden ejercer un efecto positivo directo sobre la contaminación, como, por ejemplo, acumulando metales pesados, o indirecto, al favorecer la actividad de los microorganismos de la rizosfera que son los que degradan el contaminante.
Gas natural: Mezcla de metano y etano.
Hidrocarburo: Sustancia química compuesta exclusivamente de carbono e hidrógeno.
Orujo: Fase sólida residual obtenida en la producción de aceite de oliva.
Petróleo: Mezcla compleja de hidrocarburos naturales.
Queroseno: Precursor del petróleo.
TPH: Contenido total de los hidrocarburos de un petróleo.
Vadosa, zona: Se refiere a la parte del suelo por encima de la capa freática que no se encuentra saturada de agua.

Hundimiento del Prestige el 19-11-02
Fuente: Ecologistas en acción.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

13.1. Petróleo y derivados

13.1.1. Introducción

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos. A pesar de que la biodegradación de la mayoría de los componentes del petróleo se trata por separado en diferentes capítulos de este libro, parece conveniente tratar la biodegradación de la mezcla en un capítulo aparte, tanto por la frecuencia con que producen vertidos de petróleo, como por la peculiaridad de la mezcla que hace necesario un tratamiento especial como se justifica a continuación.

Alrededor de 1.500 millones de toneladas de crudo son trasportadas anualmente en buques de carga. Accidentes y operaciones de carga y descarga provocan que acaben en el mar entre 1,7 y 8,8 millones de toneladas. Las grandes catástrofes, como la del Exxon Valdez o la del Prestige, son afortunadamente poco frecuentes y, sin duda, las que más llaman la atención de los medios de comunicación y de la opinión pública. Sin embargo, es en las operaciones de carga-descarga y limpieza de los tanques cuando se producen innumerables derrames más o menos intencionados que son cuantitativamente más importantes que las grandes catástrofes.

Aunque existen excepciones, en general cabe decir que un residuo es tanto más difícil de tratar cuanto mayor sea la complejidad de su composición. Ello se debe a que no existen microorganismos naturales pluripotenciales capaces de degradar todos los componentes del petróleo, sino que determinadas especies sólo pueden atacar a una fracción del mismo, por lo que se necesita del concurso de muchas estirpes de microorganismos que deben coincidir en espacio y tiempo.

13.1.2. Origen y composición del petróleo

El petróleo es un fluido natural mezcla de hidrocarburos y otros componentes minoritarios que se forma bajo la superficie terrestre como consecuencia de la descomposición de organismos marinos y, en menor medida, de organismos terrestres que han sido arrastrados al mar. Estos restos se mezclan con arenas finas y limos y se depositan en cuencas marinas tranquilas. A medida que van acumulándose depósitos adicionales, la presión sobre los situados más abajo se multiplica por varios miles y la temperatura aumenta varios cientos de grados. El cieno y la arena se litifican y se transforman en esquistos y areniscas, los carbonatos precipitados y los restos de caparazones se convierten en caliza y los tejidos blandos de los organismos muertos se convierten en petróleo y gas natural. En este proceso se pueden distinguir tres etapas: diagénesis, catagénesis y metagénesis. La primera ocurre hasta una temperatura de 50-60 ºC, produciéndose queroseno que es el precursor del petróleo. Dependiendo fundamentalmente de la temperatura, el queroseno evoluciona hacia petróleo o gas natural en las fases de catagéneis o metagénesis, respectivamente. Un vez formado el petróleo, fluye hacia arriba a través de la superficie terrestre al ser su densidad menor que las arenas y las rocas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Con frecuencia el petróleo se queda atrapado entre una capa impermeable, formando un depósito en el que los fluidos se segregan dependiendo de su densidad. Así, el petróleo se suele encontrar por debajo de una atmósfera de gas y flotando en el agua.

El gas natural está compuesto por metano y etano. El metano es el más ligero de todos los hidrocarburos y es bastante estable en ambientes anaeróbicos. Es producido por un grupo de bacterias llamadas metanogénicas y forma los depósitos de gas natural. Este compuesto puede ser eliminado por bacterias metanotróficas.

En cuanto a su composición, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos, naftalénicos y parafínicos. La proporción varía según su origen. Existen muchas clasificaciones del petróleo, la mayoría enfocadas a su valor comercial. Aquí se clasificará por su composición química, propiedad que, a la postre, está relacionada con su valor comercial. No obstante, a lo largo del capítulo se harán referencias a otras definiciones.

En la tabla 13.1 se resume la clasificación química de los hidrocarburos petrolíferos.

Tabla 13.1. Clasificación química de los hidrocarburos.

1.	Alifáticos: Estructuras lineales, ramificadas o cíclicas con diversos tipos de enlaces.
1.1.	Alcanos o parafinas: Hidrocarburos saturados. Cadena lineal (como el n-octano). Cadena ramificada (como el isobutano).
1.2.	Cicloalcanos o naftenos (como el ciclohexano).
1.3.	Alquenos u olefinas: tienen dobles enlaces en su estructura (como el buteno).
1.4.	Alquinos: tienen triples enlaces en su estructura (como el butino).
2.	Aromáticos: Estructuras cíclicas con dobles enlaces conjugados.
2.1.	Monocíclicos. Un solo anillo que puede estar sustituido con cadenas laterales (como el tolueno) o no (benceno).
2.2.	Policíclicos o naftenoaromáticos. Cuando están constituidos por dos (naftaleno) o más (fenantreno, pireno, etc.) anillos aromáticos condensados. Pueden estar sustituidos y formar heterociclos, dando lugar a numerosas especies químicas.

Si se tienen en cuenta todos los posibles isómeros y que las fracciones más pesadas del petróleo (asfalto) llegan a tener cadenas de más de 20 C, resulta obvio concluir que el petróleo es una mezcla muy compleja. Este hecho, como se verá más adelante, es clave a la hora de entender su biodegradación.

Además de hidrocarburos, el petróleo contiene azufre, nitrógeno, metales pesados y otra serie de constituyentes en menor proporción. Desde un punto de vista técnico es muy importante el contenido total de hidrocarburos de un petróleo (TPH), ya que es una medida de la calidad del petróleo, si bien es un parámetro que también resulta útil para predecir su biodegradabilidad y seguir la eficacia con que se está produciendo la biodegradación del mismo. Un petróleo es de mejor calidad cuanto mayor sea su TPH.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El petróleo se procesa normalmente antes de su uso mediante técnicas de destilación y modificación dando lugar a derivados con distinta composición. Esto origina una nueva clasificación de los componentes del petróleo diferente a la química, aunque, evidentemente, una y otra están relacionadas.

Los componentes que no son hidrocarburos presentes en el petróleo tienen una gran influencia en su valor comercial y biodegradabilidad, por lo que a continuación se trata de la manera que afecta cada uno.

A) Azufre (< 0,5-5% en el petróleo crudo)

Está presente en forma de tioles, dibenzotiofenos, tiofenos o ácidos sulfónicos, azufre elemental y ácido sulfhídrico. La presencia de azufre en el petróleo es perjudicial, ya que su combustión produce lluvia ácida. El azufre inorgánico se puede retirar con relativa facilidad por métodos fisico-químicos, pero el orgánico es muy difícil, hasta el punto de hacer que no sea rentable utilizar un determinado petróleo. Desde la perspectiva de la biotecnología ambiental, es decir de la biodegradabilidad, existen datos que parecen contradictorios en cuanto al efecto que tiene el azufre orgánico. Por una parte existen bacterias capaces de utilizar el azufre orgánico del petróleo. Por otra, se sabe que cuando el petróleo se degrada, aumenta su contenido en azufre. Esto último es indicativo de que se están degradando preferentemente fracciones no azufradas, lo cual no contradice la utilización de parte del azufre por las bacterias ya que el contenido en azufre de los seres vivos es relativamente pequeño en comparación con el contenido en carbono y además, el hidrocarburo es utilizado por las bacterias como fuente de energía.

B) Compuestos nitrogenados (< 0,25-0,8% en el petróleo crudo)

El nitrógeno que se encuentran en el petróleo es de tipo orgánico y se localiza mayoritariamente en compuestos aromáticos tipo piridina y en heterociclos aromáticos como el indol. Estos compuestos son tóxicos debido al carácter mutagénico de algunos de sus congéneres. Además, su combustión produce óxidos de nitrógeno, que junto con los de azufre provoca lluvia ácida.

Entre los derivados del petróleo se encuentran las gasolinas. Dada la importancia del uso de los combustibles fósiles para el transporte, en los últimos años se ha puesto un gran interés en promover un cambio en la composición de las gasolinas para evitar algunos de los efectos negativos de las mismas sobre el medio ambiente y la salud humana. A este fin responden la reducción y posterior prohibición de los aditivos plomados, así como la limitación de los compuestos aromáticos y se han introducido nuevos aditivos oxigenados para adecuar el octanaje de las gasolinas. Gracias al empleo de estos aditivos se han bajado las emisiones de compuestos orgánicos volátiles, óxidos de nitrógeno y otros compuestos tóxicos. El más empleado de estos ha sido el metil tert-butil éter (MTBE), seguido por el etanol y otros de uso más limitado como el metanol, tert-butil alcohol (TBA), el pert-amil metil éter (TAME) o el diisopropil éter (DIPE). El MTBE tiene la ventaja de su bajo coste y su facil producción.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

13.1.3. Bases bioquímicas y genéticas de la degradación de petróleo

Bases bioquímicas

Por su composición, el petróleo resulta ser una excelente fuente de carbono y energía. Es decir, es un buen combustible para los microorganismos al igual que lo es para la industria. Lo que ahora se estudiará son las rutas bioquímicas por las que las bacterias lo utilizan.

La biodegradación de los hidrocarburos ocurre mayoritariamente en condiciones aeróbicas. La degradación anaeróbica, que es minoritaria aunque no despreciable, se pensó durante mucho tiempo que no era posible. Ello es debido a que la degradación anaeróbica es mucho más lenta que la aeróbica y tardó en describirse. Además, se supuso que si existía una degradación anaerobia no podrían formarse depósitos petrolíferos, ya que éstos habrían sido consumidos a lo largo de los periodos geológicos por acción bacteriana. Hasta finales del siglo XX no empezaron a describirse procesos de biodegradación anaerobios, con nitrato, sulfato y Fe(III) como oxidantes. Para explicar que las bolsas petrolíferas existentes no se hayan degradado a lo largo de tiempo existen varias teorías. Una es que el petróleo se genera a grandes temperaturas y por tanto se encuentra depositado en un medio prácticamente estéril (paleoesterilización). A ello se suma que para que el petróleo se degrade en condiciones anaeróbicas se necesitan oxidantes como el nitrato o el sulfato, que pueden ser limitantes dada la enorme masa de las bolsas de petróleo.

Sea su biodegradación anaeróbica o aeróbica, las bacterias necesitan un comburente para oxidar los hidrocarburos. Éste es el oxígeno en aerobiosis y nitrato, sulfato o Fe(III) en anaerobiosis (Fig. 13.1).

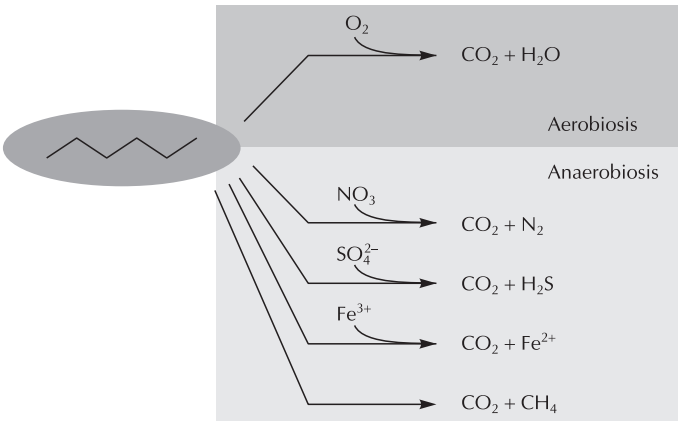


Figura 13.1. Algunas vías de degradación del petróleo.

Como los hidrocarburos son químicamente muy inertes es necesario un primer paso de activación que los hace más hidrofílicos y susceptibles de posteriores reacciones de degradación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

A) Hidrocarburos alifáticos

La degradación de hidrocarburos alifáticos saturados es un proceso que ocurre preferentemente en condiciones de aerobiosis. La ruta consiste en la oxidación del grupo metilo terminal hasta carboxilo, convirtiéndose así un compuesto hidrofóbico en un ácido graso que se puede asimilar por β-oxidación. La oxidación es secuencial, pasando de metilo a alcohol, aldehído, y finalmente ácido que queda activado en forma de acil-coenzima A (Fig. 13.2). El primer paso requiere oxígeno molecular y está catalizado por la alcano oxidasa. No siempre la oxidación inicial ocurre en un carbono terminal de la molécula. El producto final es acetil-CoA. Los microorganismos capaces de llevar a cabo estas reacciones son *Nocardia, Pseudomonas* y *Mycobacterium*.

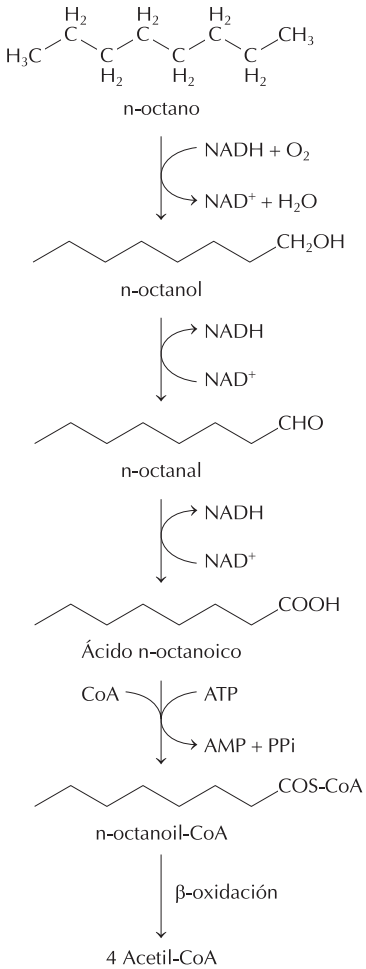


Figura 13.2. Esquema de la ruta de degradación aeróbica del n-octano.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La degradación anaeróbica de hidrocarburos saturados lineales requiere también un primer paso de activación. El oxidante que emplean las bacterias anaeróbicas para activar los hidrocarburos suele ser fumarato. Una vez activado el alcano, una serie de oxidaciones, deshidrataciones e hidrataciones permite a dichas bacterias utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono y de energía. Dicho proceso se esquematiza en la figura 13.3.

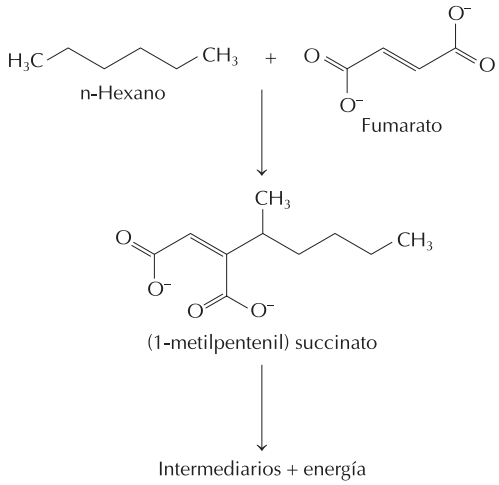


Figura 13.3. Esquema de la ruta de degradación anaeróbica del n-hexano.

B) Hidrocarburos aromáticos

La degradación de compuestos aromáticos naturales en condiciones aeróbicas se trata en otros temas de este libro y por tanto no se va a ver aquí. En este contexto concreto cabe destacar que los hidrocarburos aromáticos son uno de los componentes de petróleo que presenta mayor persistencia en el medio ambiente debido a su estabilidad. El petróleo contiene cantidades variables de hidrocarburos aromáticos simples, como el benceno o el tolueno, y policíclicos (PAH) que son los más tóxicos.

La degradación de muchos compuestos aromáticos transcurre a través de los intermediarios catecol y protocatecuato, que posteriormente son atacados por dioxigenasas. De esta forma se generan intermediarios del ciclo de Krebs tales como succinato, acetil-CoA y piruvato.

En condiciones anaeróbicas también se ha descrito la activación de aminoácidos aromáticos con fumarato, al igual que ocurre con los alifáticos.

Bases genéticas

En este apartado se comentarán brevemente los genes y operones que codifican las enzimas estudiadas anteriormente así como su regulación. Es de destacar que,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

como en otras rutas catabólicas, los genes responsables de la degradación de algunos componentes del petróleo se encuentran localizados en plásmidos. Desde un punto de vista histórico merece destacar dos hitos. El primero es que fueron los plásmidos catabólicos relacionados con la degradación de hidrocarburos los primeros que se descubrieron y dieron luz a la posibilidad de expansión horizontal de las rutas metabólicas (plásmidos SAL y OCT, en 1972-73, por el grupo del Dr. Chakrabarty). El segundo, muy importante para la Biotecnología, es que la expansión de rutas catabólicas relacionadas con la biodegradación de petróleo mediante plásmidos fue la base de la primera patente que se hizo de un ser vivo. Este acontecimiento va más allá de lo meramente anecdótico, ya que la batalla legal que ganó Chakrabarty en el Tribunal Supremo de los Estados Unidos en 1980 sentó un precedente que abrió las puertas de nuevas patentes y permitió en buena medida el desarrollo de una nueva industria, la Biotecnología.

La patente de Chakrabarty (asignada a General Electric, empresa para la que trabajaba) se basó en la construcción de una bacteria del género *Pseudomonas* en la que se introdujeron cuatro plásmidos, de los cuales al menos dos se mantienen establemente, y que codifican la degradación de varios componentes del petróleo. Todos los plásmidos eran naturales, y también la bacteria, pero el resultado es algo que no ocurre accidentalmente en la naturaleza y, por tanto se consideró que era susceptible de patentarse.

En la tabla 13.2 se muestran algunos plásmidos que codifican las enzimas responsables de la degradación de algún componente del petróleo.

Tabla 13.2. Plásmidos catabólicos relacionados con la biodegradación del petróleo en aerobiosis.

Plásmido	Compuestos químicos que metaboliza
OCT	*n*-alcanos C_8-C_{10}
DEC	*n*-alcanos C_9-C_{13}, *n*-alquenos $C_{10}-C_{13}$
TOL	Tolueno y xilenos
SAL	Salicilato (intermediario en la degradación de algunos PAH)
NAH	Naftaleno
CAM	Alcanfor
NIC	Nicotina, nicotinato

a) El plásmido TOL (pWWO) de *Pseudomonas* confiere a esta bacteria la capacidad de degradar toluenos y xilenos. Hay dos operones separados físicamente: el operón *upper* que es el responsable de la degradación de tolueno/xileno hasta benzoato/toluato y el operón *meta* que transforma estos compuestos en piruvato y acetaldehído a través de catecol. Como proteínas reguladoras actúan XylS y XylR.

b) El plásmido NAH7, que también se ha encontrado en otras estirpes de *Pseudomonas*, es capaz de degradar naftalenos. En este caso los genes se agrupan en dos operones independientes: la ruta *upper* se encarga de la degradación de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

naftaleno hasta salicilato y la ruta *lower* transforma el salicilato en piruvato y acetaldehído. Actúa de regulador NahR.

c) El plásmido OCT de *Pseudomonas oleovorans* degrada alcanos lineales (6-13 C) que van sufriendo una oxidación desde alcohol, aldehído y ácido pasando a formar parte del metabolismo de ácidos grasos. La proteína reguladora es AlkS, activador en presencia de alcanos.

13.1.4. Ecotoxicología

Se pretende comprender los efectos directos de una sustancia química sobre los organismos, así como la forma en que dicha sustancia interviene en el medio ambiente que rodea a dicho organismo. En los vertidos de petróleo la luz penetra menos y hay una disminución en los procesos de fotosíntesis, muerte de organismos como consecuencia de la toxicidad de algunos hidrocarburos y el traslado de hidrocarburos pesados a través de la cadena alimenticia por la acumulación en tejidos.

Toxicidad acuática de los hidrocarburos

La naturaleza hidrófoba de los PAH produce un efecto de asociación rápida en la materia particulada y los tejidos. Las concentraciones de PAH de alta toxicidad oscilan entre 0,2 y 10 mg ml^{-1}, siendo más tóxicos los de bajo peso molecular que son más solubles. Los productos de degradación de los PAH son más solubles y, por tanto, más tóxicos, se asocian a las proteínas y moléculas de DNA produciendo daños celulares y cáncer en última instancia.

Los hidrocarburos volátiles son capaces de destruir de forma inmediata a los organismos acuáticos, sobro todo a sus formas larvales.

Los componentes más pesados del petróleo afectan a organismos de las profundidades, tales como almejas, mejillones, ostras, etc.; y, como mínimo, los convierten en no aptos para el consumo humano.

En los últimos años se ha hablado también de la toxicidad del MTBE (metil tert-butil éter), que un aditivo antidetonante presente en las gasolinas. Se ha descrito por la EPA (agencia de protección del medio ambiente) como “cancerígeno potencial para humanos” y se conoce que en el tracto respiratorio y gastrointestinal se absorbe rápidamente.

Toxicidad terrestre

Resulta difícil determinar cuales son los efectos de estos contaminantes a largo plazo en organismos que presentan altas tasas de movilidad, fenómenos de depredación, etc.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

13.2. Residuos procedentes de la producción de aceite de oliva

13.2.1. Introducción

El alpechín es un residuo que se produce en las almazaras de aceite. El método clásico de producción de aceite a partir de aceitunas conduce a la obtención de tres fases. Una fase orgánica que es el aceite de oliva, una sólida que es el orujo y una acuosa que es el alpechín. El aceite se destina al consumo humano, el orujo es un excelente combustible y el alpechín es un problema desde el momento en que se produjo el primer litro de aceite. Este agua residual está constituida por el agua de vegetación de la aceituna a la que se le unen las aguas de lavado y procesado de las mismas. Además contiene tejidos blandos de la pulpa y aceite en forma de emulsión muy estable (alta concentración de sustancias orgánicas). Evidentemente el alpechín es un problema que sólo se padece en los países productores de aceite de oliva, y en especial en España, que es el máximo productor mundial. Hasta la década de los 60 del siglo XX el alpechín se vertía directamente a los cauces de los ríos, pero a partir de esa fecha se comenzó a instaurar el lagunamiento que evitaba la contaminación fluvial. Estas medidas fueron necesarias debido al aumento de la producción de aceite y a la concentración de almazaras en fábricas más grandes que provocaban contaminaciones locales muy elevadas en algunas cuencas fluviales. Hay que tener además en cuenta que las almazaras suelen funcionar entre noviembre y febrero, por lo que el vertido se acumula en muy poco tiempo. El lagunamiento aprovechaba la evaporación natural para concentrar el residuo pero con el tiempo se mostró como una técnica inadecuada ya que contamina las aguas subterráneas y produce malos olores por la descomposición de la materia orgánica. A partir de esta fecha comenzaron a realizarse trabajos buscando aplicaciones para eliminar el alpechín utilizándolo como fertilizante, en la producción de levaduras o como fuente de energía. Al ser la generación de alpechín un hecho local, no hay tanta variedad de grupos de investigación trabajando en el tema como en el caso de otros residuos.

13.2.2. Sistemas de producción de aceite

Es necesario tratar brevemente este tema porque dependiendo del tipo de almazara es el subproducto obtenido. Básicamente, hay tres tipos de extractoras, dos que trabajan con tres fases y la más moderna que trabaja en dos fases. En tres fases se puede trabajar en discontinuo (sistema tradicional con prensas) o en continuo, y en cualquier caso se obtiene, además de aceite, alpechín y orujo como subproductos. En las almazaras que trabajan en dos fases se obtiene aceite y una mezcla de orujo y alpechín que se denomina alperujo.

13.2.3. Composición de alpechín y alperujo

La composición del alpechín es muy variable dependiendo del tipo de proceso empleado en la extracción de aceite, de la variedad de aceituna y de la época de re-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

colección. Como referencia podemos tomar la siguiente composición estándar comparando el alpechín obtenido en una almazara clásica con el obtenido en una que opera en continuo. En la tabla 13.3 sólo se indican los componentes y características que se consideran más relevantes.

Tabla 13.3. Composición media del alpechín obtenido en una almazara de prensa y una continua.

	Clásica	Continua
pH	4,5-5	4,7-5,2
DBO (ppm)	100.000	40.0000
Azúcares totales (%)	5,00	1,00
Polifenoles (%)	1,00	0,50
Grasas (%)	0,10	1,00
P (ppm)	500	96
K (ppm)	3.000	1.2000

Como puede observarse en la tabla 13.3 el sistema continuo, al utilizar más agua, produce un alpechín más diluido aunque en mayor cantidad.

El sistema en dos fases produce alperujo (mezcla de orujo y alpechín) que es un fluido mucho más viscoso que el alpechín al contener todo lo que no es aceite en la aceituna más un poco de agua. El alperujo no se puede bombear fácilmente, como el alpechín, ni se puede amontonar como el orujo, por lo que su manejo es más costoso. Además, para su transporte se necesitan camiones bañera con rompeolas para evitar su derrame. A pesar de ello, el proceso de obtención de aceite en dos fases es más rentable para grandes volúmenes y como veremos más adelante el alperujo puede tener aplicaciones biotecnológicas muy interesantes. Su composición es variable, pero podemos tomar como referencia los datos de la tabla 13.4.

Tabla 13.4. Composición media del alperujo.

Humedad	600-700 kg/Tn
Lípidos (aceite)	20-30 kg/Tn
Azúcares	20-40 kg/Tn
Proteínas	6-13 kg/Tn
Ácidos orgánicos	3-8 kg/Tn
Polialcoholes	2-7 kg/Tn
Taninos y polifenoles	2-4 kg/Tn
Celulosas y hemicelulosas	105-247 kg/Tn
Lignina (hueso)	53-195 kg/Tn
Potasio	2-5 kg/Tn
Otras sales	8-16 kg/Tn

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

13.2.4. Tratamiento y usos de alpechín y alperujo

El alpechín tiene elevadas DQO y DBO, por lo que su vertido a los ríos acarrea graves problemas de contaminación al disminuir la cantidad de oxígeno disuelto, problema que se acentúa por la película de grasa que puede formar en la superficie del agua.

La solución primeramente propuesta fue el lagunaje y posterior utilización del residuo seco como abono. Consiste en almacenar los vertidos de alpechines en lagunas o depósitos de profundidad adecuada de tal forma que se facilite su evaporación por acción del viento. Hay que tener en cuenta que puede haber posibles filtraciones y a veces es necesario impermeabilizar la zona; a veces se realizan estudios hidrológicos que recomiendan construir la laguna sobre terrenos arcillosos. El resido seco sedimentado se compone de materia orgánica estabilizada, potasio (5%) y fósforo (1%); lo que lo hace apto para su utilización como abono.

El alpechín se puede utilizar directamente como fertilizante debido a su alto contenido en P, K, N y Mg. Además, debido a su contenido en materia orgánica puede mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo en relación con su capacidad de retención de agua y de sales minerales. Por el contrario presenta algunos problemas como un incremento de la salinidad del suelo, una disminución del pH y cierta capacidad herbicida debida a la presencia de polifenoles. Por ello, se recomienda utilizar el alpechín como abono de una forma muy controlada y en dosis nunca superiores a 30 m^3 por hectárea y año. Debido a su composición, el alpechín se puede emplear en la fabricación de fertilizantes mezclado con otros subproductos para obtener un abono más equilibrado. El más simple es el tratamiento con cal que elimina parte de la materia orgánica, rectifica el pH y se puede utilizar en la fertilización de suelos ácidos.

El alpechín se puede utilizar en la fabricación de piensos y como suplemento en la dieta forrajera de rumiantes.

Todas estas aplicaciones del alpechín no incluyen el uso de microorganismos, y lo que es más importante, no incluyen el alperujo que se perfila como el subproducto del futuro en la industria del aceite. Tanto el alpechín como el alperujo son susceptibles de ser usados por microorganismos. Sin embargo, y vistas las aplicaciones que puede tener el alpechín, se están buscando soluciones técnicamente viables y económicamente rentables. En la actualidad, se está prestando un gran interés a la biodegradación anaeróbica del alpechín, y sobre todo del alperujo, para la producción de metano.

A pesar de que el alperujo contiene una humedad muy elevada, existen en la actualidad plantas piloto que, utilizando sistemas de lecho fluidizado, generan energía eléctrica con alperujo como combustible. En esta tecnología es pionera la oleícola El Tejar.

En cuanto a la utilización de alperujo como sustrato para la producción de gas natural cabe decir que también existen plantas piloto en funcionamiento para poner a punto la tecnología, como la existente en Puente Génave (Jaén). Unas primeras estimaciones prevén la generación de alrededor de 100 m^3 de biogás por tonelada de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

alperujo. Se trata de un proceso tecnológicamente muy complejo en sí mismo que además requiere la manipulación de metanógenos. Estos microorganismos se pueden considerar como el último eslabón de un proceso sintrófico que conduce a la descomposición anaeróbica de la materia orgánica. Aunque se han hecho enormes avances en las últimas décadas se dista mucho de conocer el proceso en detalle y por tanto de poder manipularlo. Sin embargo, no sería de extrañar que la tecnología estuviese a punto antes de conocer el proceso a nivel molecular, como ha ocurrido en otras ocasiones. En cualquier caso, de prosperar la tecnología el alperujo dejaría de ser un residuo para convertirse en materia prima.

13.3. Tratamiento biológico de catastrofes naturales. Corrección *in situ* de vertidos de crudo

En este apartado se describirán en primer lugar las características particulares de los vertidos en el mar y en el suelo continental. A continuación se estudiarán las tecnologías que se pueden aplicar para disminuir su impacto ambiental.

Las primeras medidas son de contención y retirada física del petróleo. Ello se aplica tanto a vertidos en el mar como en tierra. Debido a las particularidades que cada tipo de vertido presenta, se estudiarán por separado.

13.3.1. Contaminación

Medio hídrico y atmosférico

Se estima que el mar recibe anualmente más de 10 millones de toneladas de petróleo y derivados. La mayoría se vierte en pequeñas cantidades como consecuencia de derrames en operaciones de carga y descarga de buques y en las operaciones de limpieza de los tanques. Sin embargo, las noticias que más llegan a la opinión pública son las relacionadas con una gran catástrofe, como el hundimiento de un petrolero. El mar Mediterráneo es uno de los que sufren más vertidos relacionados con derrames petrolíferos (cada año se vierten más de tres millones de toneladas).

En el mar se emplean boyas que impiden la dispersión horizontal del hidrocarburo y permiten su bombeo a buques cisterna. Una vez vertido el petróleo se produce una extensión paulatina por la superficie formando una capa delgada. A la vez, las partes volátiles se evaporan. Estos compuestos volátiles se incorporan a los movimientos de las masas de aire y son transportados a ciertas distancias; además dichos compuestos son oxidados por radicales hidroxilo o por el ozono. Los productos finales son dióxido de carbono y agua. Los hidrocarburos volatilizados pueden volver al mar junto con agua de lluvia. También pueden desprenderse del mar hidrocarburos en forma de aerosoles marinos. Hay componentes del petróleo que son solubles y pueden pasar a disolución. Por otra parte los hidrocarburos pueden ser ingeridos por peces directamente o bien pueden ser absorbidos por el fitoplacton marino pasando a la cadena trófica.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Aunque no es un tratamiento habitual, sobre todo si el crudo alcanza la costa, en ocasiones se ha quemado la mancha de petróleo sobre el mar utilizando NAPALM. Esta técnica evidentemente no entra dentro de la biotecnología y es demasiado drástica (Figs. 13.4, 13.5 y 13.6).

Figura 13.4. Zona de los trabajos de limpieza. http://www.le-cedre.fr/fr/prestige/z_photo.htm.

Figura 13.5. Confinamiento y recuperación de hidrocarburo después del accidente del Prestige. http://www.le-cedre.fr/fr/prestige/z_photo.htm.

Contaminación terrestre

En tierra se construyen barreras hídricas que impidan la expansión del hidrocarburo a través del acuífero. Lo primero es hacer un estudio geológico para determinar los flujos subterráneos de agua para poder ubicar la barrera hídrica. Esta consiste en la colocación de pozos de perforación (piezómetros) que situados en línea bombean el agua contaminada hacia la superficie. Allí se puede filtrar y retirar el hidrocarburo para devolver el agua al acuífero siempre que su análisis cumpla con la legislación (2.500 mg de hidrocarburos por kilogramo de suelo y 500 si es suelo agrícola). Los

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

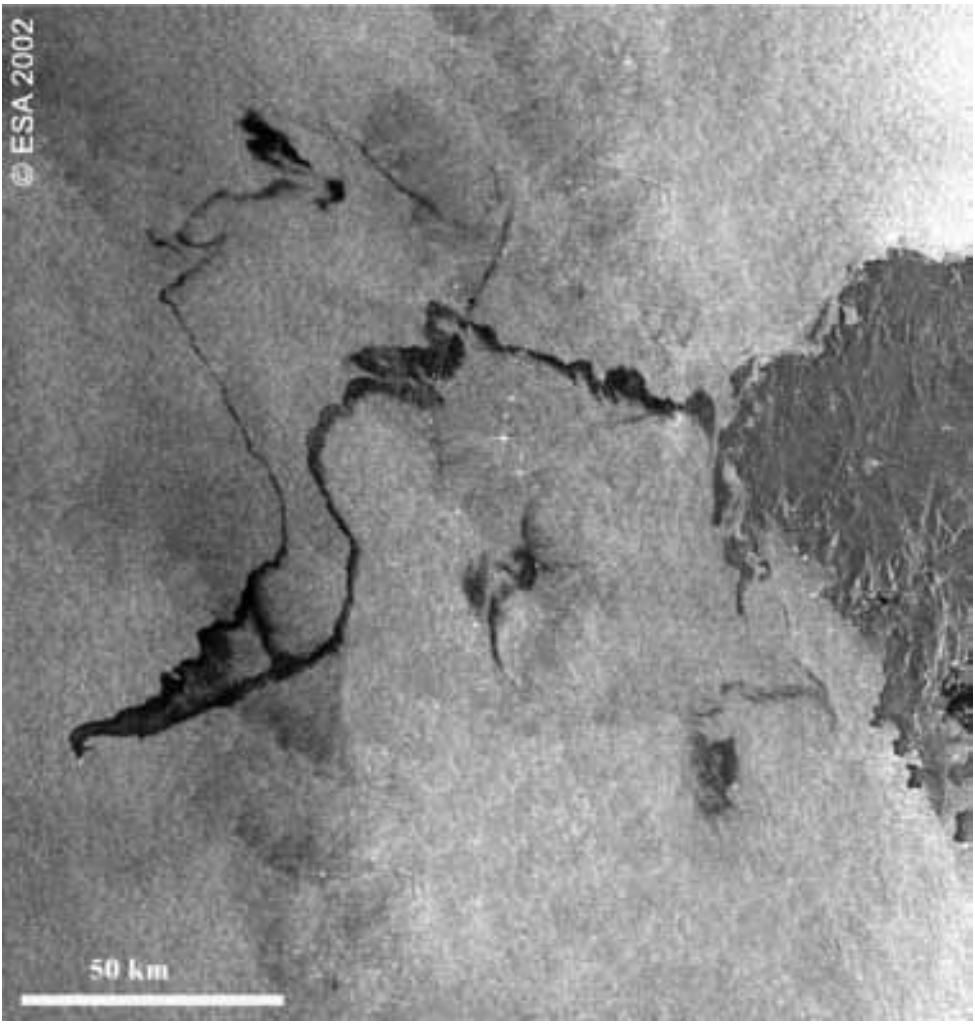


Figura 13.6. Foto tomada desde el satélite Envisat del ESA el 17 de noviembre y que muestra como la mancha procedente del Prestige alcanza las costas gallegas (tomada de http://www.esa.int/export/esaCP/ESAGFD7708D_index_0.html).

piezómetros se sitúan de manera que solapen sus zonas de influencia y se suele colocar otro detrás de la barrera para comprobar la eficacia del sistema.

La contaminación edáfica puede clasificarse en dos grupos: la endógena y la exógena. En el caso de la contaminación exógena, el suelo recibe una gran cantidad de residuos procedentes de actividades antropogénicas. El comportamiento físico-químico del petróleo en el suelo depende de: el tamaño del grano, la porosidad, la permeabilidad, el contenido de materia orgánica y de la capacidad de intercambio iónico del suelo. También depende de la composición química, propiedades físico-químicas (punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad en medio acuoso, coeficiente de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

difusión en el aire, etc.) del petróleo. Una vez situado el petróleo en las capas inferiores del suelo, se puede desplazar por tres mecanismos:

a) Difusión hacia las zonas de más baja concentración.
b) Advección hacia las zonas de menor presión de vapor.
c) Dispersión mecánica.

Debido a estos mecanismos, el petróleo puede volatilizarse y escapar a la atmósfera, adsorberse en los granos que forman los horizontes más superficiales del suelo o disolverse en el medio acuoso encerrado entre los poros.

En general, y comparado con el comportamiento de los vertidos en el mar, el petróleo derramado en el suelo tiende a desplazarse verticalmente hasta alcanzar la zona vadosa, mientras que en el mar tiende a expandirse horizontalmente. La penetración en el suelo evita la volatilización de las fracciones más ligeras del petróleo y se produce la adsorción de algunos hidrocarburos al humus. Ambos factores conducen a una mayor persistencia del petróleo en tierra que en mar.

La utilización en los últimos años de gasolinas sin plomo con aditivos oxigenados con el fin de reducir la contaminación ambiental se ha tornado en un problema ambiental ya que se pone en peligro la calidad de los recursos hídricos. Por su propia naturaleza fisicoquímica, el MTBE constituye una amenaza para la salubridad de las aguas subterráneas. Se trata de un compuesto orgánico volátil con elevada solubilidad en agua, fácil movilidad, difícil degradación en el subsuelo y propiedades organolépticas desagradables. El MTBE pasa al medio a través de fuentes de contaminación, definidas o difusas, relacionadas con la fabricación, transporte, almacenaje o uso de la gasolina. En la figura 13.7 se muestra el ciclo del MTBE en el medio. Allí donde ocurran concentraciones elevadas de MTBE en la atmósfera debido a fuentes locales

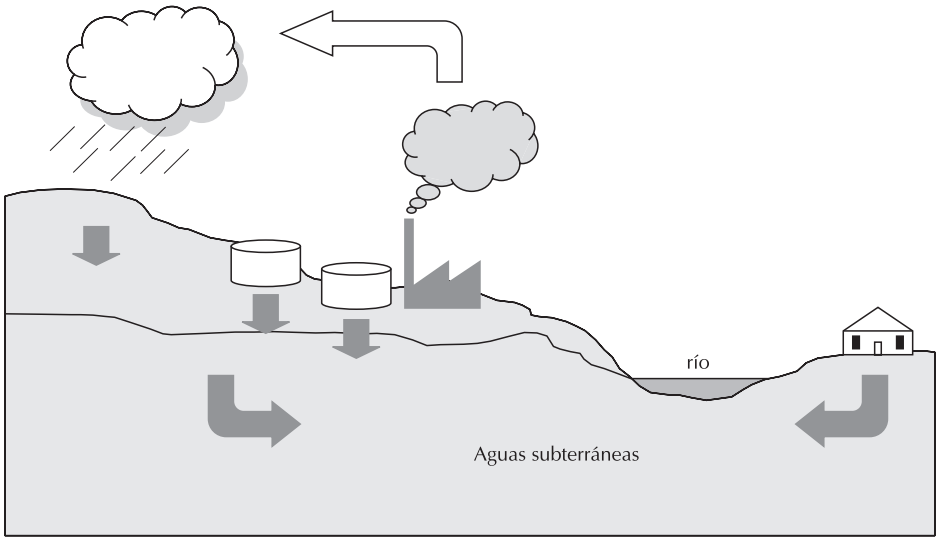


Figura 13.7. Ciclo del metil ter-butil éter (MTBE) en el medio.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

(autopistas, gasolineras, garajes o refinerías) se incrementará la concentración del éter en la precipitación. Luego, a través de la infiltración, llegará a las aguas subterráneas. Una vez allí persiste largo tiempo. Los éteres se caracterizan por no reaccionar ante un amplio rango de condiciones industriales y de laboratorio.

13.3.2. Degradación natural

Es de considerable importancia económica y ambiental, por ejemplo en su aplicación en la eliminación de las "mareas negras". Ya que el petróleo es rico en materia orgánica, los hidrocarburos que contiene son fácilmente atacados en condiciones aeróbicas, es decir en condiciones de aire y humedad.

Los principales organismos degradadores del petróleo son bacterias y levaduras y, en menor cuantía, hongos oxidantes de los hidrocarburos. Entre los organismos degradadores del petróleo destacan *Pseudomonas putida* y *oleovorans*, la levadura del género *Candida* y diversos géneros de hongos tales como *Aspergillus* y *Fusarium*.

En los grandes derrames, las fracciones de hidrocarburos volátiles se evaporan con rapidez, dejando los componentes alifáticos y aromáticos de cadena más larga para ser atacados por los microorganismos que oxidan parte del petróleo hasta dióxido de carbono. Experimentos con radioisótopos muestran que el 80% de hidrocarburos son oxidados entre 6 meses y un año desde el derrame. Los hidrocarburos de cadenas más ramificadas y los policíclicos permanecen por más tiempo.

Cuando ocurre un vertido de un hidrocarburo en medio acuoso se diferencian tres etapas:

a) Fase de expansión que tiene lugar tanto en superficie como en profundidad; en esta fase se produce una gran mortandad de organismos vivos.
b) Fase de estabilización de los contaminantes que puede durar entre 6 meses y un año dependiendo de la naturaleza de los contaminantes, de los ecosistemas y de las condiciones metereológicas.
c) Fase de reconstitución, que es la más larga, y que en climas templados puede durar más de 10 años.
d) El tiempo de duración de una mancha de petróleo dependerá de la proporción de componentes volátiles que tenga y de la temperatura del agua.

En el suelo continental la degradación natural de un vertido puede durar más de 20 años si no se toman medidas.

13.3.3. Bioestimulación *in situ*

Es el método más empleado cuando ocurren catástrofes por accidentes en el transporte de petróleo o de sus derivados, y, por tanto, al único que nos referiremos. Como ya hemos explicado, los hidrocarburos pueden constituir una excelente fuente de carbono para muchos microorganismos. De lo que se trata al aplicar esta tecno-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

logía de la bioestimulación es de equilibrar el carbono (hidrocarburo) con el resto de nutrientes y, si es posible, optimizar las condiciones ambientales. Se estima que una proporción razonable en peso C:N:P es 100:10:1, aunque ésta puede variar dependiendo del residuo. Comparado con la formulación de los medios de cultivo empleados en el laboratorio cabe reseñar que no es necesaria la adición de micronutrientes, ya que éstos suelen encontrarse en el suelo en las cantidades requeridas. Visto así, la bioestimulación no varía conceptualmente de las técnicas de abonado empleadas en agricultura. Cuando se aplica la bioestimulación suele ser necesario fertilizar el suelo que se quiere descontaminar varias veces sucesivas. Ello es así porque si la cantidad de hidrocarburo vertido es muy grande la adición de los fertilizantes necesarios de una sola vez podría resultar tóxica. Conviene resaltar que cuando se añade fertilizante, la segunda vez se observa un efecto más drástico en la biodegradación de hidrocarburos que tras la primera, al estar los microorganismos mejor adaptados a las nuevas condiciones y al haberse producido un enriquecimiento selectivo de las estirpes degradadoras. A continuación se detallan los aditivos que emplean en la bioestimulación.

- Nitrógeno y fósforo. Estos dos elementos, en relación con el carbono del petróleo, son la base para el diseño de un "medio de cultivo" que sirva de alimento a los microorganismos autóctonos. El nitrógeno se puede añadir en forma oxidada (nitrato) o reducida (amonio o urea). El nitrato, además de servir de fuente de nitrógeno para las bacterias, en las zonas poco aireadas puede ser el oxidante utilizado por las bacterias desnitrificantes para degradar hidrocarburos. Ambos factores hacen que su uso se prevea como muy adecuado. Sin embargo, antes de su uso hay que tener en cuenta otros dos factores. En primer lugar que si la zona está muy drenada, por ser muy solubles en agua la mayoría de sus sales, el nitrato puede desaparecer con rapidez y no sólo no tener efecto, sino que podría contaminar el acuífero todavía más. En segundo lugar hay que tener en cuenta que puede ocurrir justo lo contrario si el nitrato queda atrapado por interacciones iónicas al suelo.

- Carbono. Recientemente se ha propuesto la adición de fertilizantes orgánicos para estimular la degradación de hidrocarburos en el suelo. Parece en principio poco adecuado añadir más carbono a un ecosistema que se encuentra sobresaturado de carbono. No obstante, los datos experimentales que existen son escasos y no cabe descartar de antemano esta tecnología.

- Oligoelementos. No es necesario añadirlos al suelo.

- Agua. Despendiendo de las condiciones climatológicas puede ser necesario regar el suelo. Ello se puede hacer a la vez que se fertiliza disolviendo en agua los compuestos a aplicar.

- Surfactantes. El estado físico en que se encuentre el petróleo es de enorme importancia en su biodegradación. En los vertidos que se producen al mar, el petróleo tiende a expandirse sobre la superficie del agua formando una mancha. El oleaje lo bate con el agua formando una emulsión que favorece su degradación, cosa que ocurre en mucha menor medida en los vertidos del suelo. En

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cualquier caso, en la formación de la emulsión es clave la presencia de surfactantes (detergentes o humectantes) bien sean naturales o añadidos. Los detergentes naturales, o biosurfactantes, los producen la enorme mayoría de los microorganismos que degradan alguna fracción del petróleo. Ello es más importante cuanto más insoluble en agua sea el hidrocarburo, ya que el primer paso para la degradación es la biodisponibilidad.

La adición de dispersantes exógenos para el tratamiento de vertidos se viene utilizando desde hace mucho tiempo pero con resultados variados. En 1967 se emplearon más de 10.000 toneladas del detergente BP1002 (que contiene 12% de detergente no-iónico y 3% de estabilizante) para el tratamiento del vertido ocasionado por el hundimiento del petrolero Torrey Canyon en las costas Británicas. Debido a la toxicidad del detergente empleado, el resultado fue que se agravó el problema y hubo un incremento considerable en la mortalidad de la flora y fauna de la zona tratada. Además, las zonas tratadas con el dispersante tardaron en recuperarse del vertido el doble de tiempo que las zonas no tratadas. Sin embargo, en las aguas francesas se empleó arcilla natural que contenía ácido esteárico y se mostró mucho más eficaz que el dispersante artificial.

Desde entonces se han desarrollado dispersantes artificiales mucho menos tóxicos y eficaces, como el Corexit™ 9527 (desarrollado por la compañía Exxon) que se ha mostrado eficaz en varias ocasiones, como en el tratamiento del derrame del Exxon Valdez ocurrido en julio de 1989 (Fig. 13.8). Sin embargo, uno de los componentes conocidos del surfactante es 2-butoxietanol (del 10 al 40% en peso), compuesto que se sospecha que puede ser nocivo.

Figura 13.8. Tratamiento experimental con Corexit 9527 del derrame producido por el Exxon Valdez en las costas de Alaska.

El efecto de los dispersantes sobre la biodegradación depende de la composición del dispersante y del tipo de vertido, habiéndose encontrado efectos tanto positivos como negativos tras su uso.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Figura 13.9. Mancha emulsionada naturalmente entre Puerto de Corne y la Punta Rocundo después del accidente del Prestige. Tomado de http://www.le-cedre.fr/fr/prestige/z_photo.htm.

– Oxígeno. Aunque se ha descrito la biodegradación anaeróbica del petróleo, ésta es mucho más efectiva en condiciones aeróbicas. Por tanto, el oxígeno suele ser uno de los factores limitantes. Dependiendo del tipo de vertido y del lugar donde se produzca se emplearán diferentes métodos. Así, cuando el vertido se produce en el mar no es necesario suministrar oxígeno ya que propio oleaje airea la mancha y poco más se puede hacer que no sea recoger el hidrocarburo flotante. Sin embargo, cuando el vertido llega a la costa, y después de una limpieza superficial, se ha comprobado que el residuo desaparece más rápidamente si se labra la tierra, o la arena, al favorecer así su aireación.

  Por último, cuando el vertido se produce en el suelo continental la bioestimulación con oxígeno suele ser el último paso de una serie de procesos. Los primeros pasos, que no son biotecnológicos pero muy importantes, consisten en retirar la mayor parte de hidrocarburo posible de los acuíferos. El agua subterránea se puede bombear hacia la superficie y tratar de forma externa retirando el hidrocarburo. Los contaminantes que quedan atrapados en el suelo, que son los hidrocarburos de cadena más larga, se eliminan mediante la re-inyección de agua rica en nutrientes y de oxígeno. El oxígeno se puede administrar mediante un procedimiento denominado *bioventing* (Fig. 13.10). La técnica consiste básicamente en la perforación del suelo con la ayuda de barrenas que permitan la introducción de un tubo perforado en sus laterales. En la parte superior se conecta una bomba aspiradora que genera una presión negativa en el suelo y fuerza así la creación de una corriente de aire que fluye a través del suelo. Además de oxigenar el suelo, el análisis del contenido en hidrocarburos y CO_2 del aire que sale por la bomba permite monitorizar el progreso del tratamiento. Para el análisis del contenido de hidrocarburos es necesario tomar muestras que se analizan por cromatografía de gases, pero el contenido CO_2/O_2 del aire que se aspira se puede monitorizar de forma continua por espectroscopia infrarroja. Esta técnica se ha empleado con éxito en muchas ocasiones. En España se usó por primera vez en 1997 para la descontaminación del suelo próximo a las vías del tren a la altura de El Higuerón (Córdoba). La

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

zona había sufrido un vertido de gasóleo al descarrilar el tren que lo transportaba y no era posible retirar el suelo para tratarlo "ex situ" porque ello habría supuesto interrumpir la línea del AVE durante mucho tiempo. Al éxito de la técnica en la recuperación de la zona hay que sumar que las tareas no impidieron que los trenes siguieran circulando con normalidad.

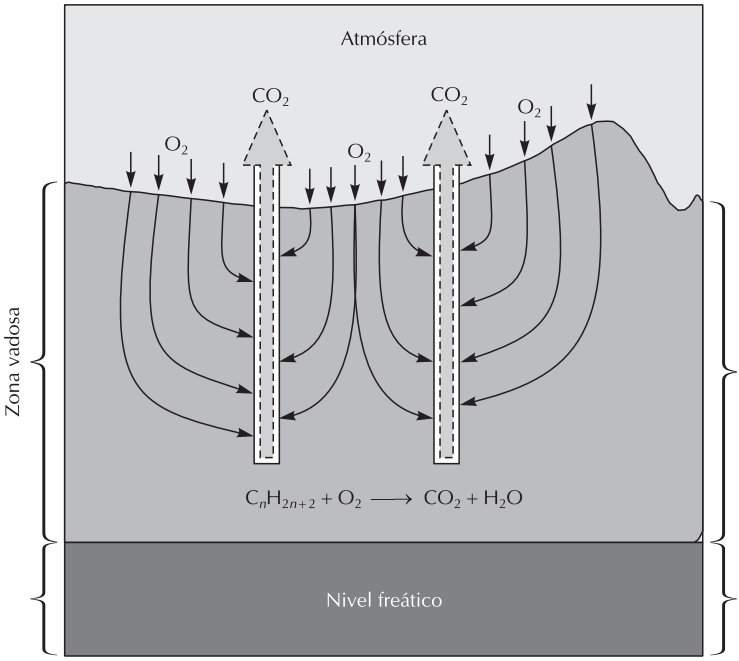


Figura 13.10. Esquema del "bioventing". Esta tecnología sólo se puede aplicar a la zona vadosa. Consiste en introducir unas agujas perforadas en el suelo y aspirar con una bomba (las dos flechas verticales discontinuas del esquema) forzando así una corriente de aire desde la superficie (flechas verticales continuas). La aireación del suelo permite que las bacterias autóctonas degraden el hidrocarburo vertido en el suelo.

13.3.3. Otros tratamientos

Tratamiento convencional

Se ha desarrollado para descontaminar la fase líquida, es decir, aguas subterráneas contaminadas, residuales, etc. El método consiste en pasar el residuo peligroso a través de un reactor que contiene la biomasa, ya sea en suspensión o fijada. Este reactor puede funcionar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. El oxígeno se añade por difusores o mediante aireación superficial. El residuo líquido tiene una etapa de pretratamiento que tiene varias fases:

a) Homogenización. Modula las sobrecargas hidráulicas y cargas variables de los compuestos orgánicos en sistemas de flujo continuo.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) Tratamiento químico. Es para precipitar metales tóxicos, aunque también se pueden añadir emulsionantes en esta fase.

c) Separación física. Sedimentación de los metales precipitados y eliminación de la materia flotante.

d) Acondicionamiento. Se suministran nutrientes y se ajusta el pH.

Biomasa en suspensión

En este caso el reactor se encuentra en continua agitación favoreciendo el contacto entre sustrato y biomasa. En este proceso el efluente arrastra la biomasa en suspensión desde el reactor biológico hasta el siguiente tanque donde se produce la sedimentación. Parte de la biomasa sedimentada se devuelve al biorreactor.

Biomasa fijada

Se basa en la capacidad que presentan algunos organismos para unirse a medios inertes (película adherida). En este caso la pérdida de biomasa es mucho menor.

Tratamiento en fase lechada

Se utiliza sobre todo para la descontaminación de fangos, aunque también puede ser utilizada para descontaminar suelos. Este sistema es similar al tratamiento convencional biológico con masa en suspensión, excepto que la biomasa no se recircula y que los sólidos suspendidos son inertes. Los pasos son:

a) Mezcla/aireación.

b) Desorción.

c) Biodegradación.

El caudal en el tratamiento en fase lechada puede ser continuo o discontinuo.

13.2.5. Eliminación de azufre y nitrógeno orgánico

Algunos tipos de petróleo contienen azufre y nitrógeno orgánico debido al origen biológico del mismo. Este petróleo no se puede usar directamente porque su combustión produciría lluvia ácida.

La eliminación del azufre orgánico es un proceso técnicamente complejo y caro, por lo que se han propuesto métodos biológicos que permitan su eliminación. Dichos métodos se basan en la utilización de microorganismos, fundamentalmente bacterias, que de una forma selectiva asimilen el azufre orgánico del petróleo.

Hay tres procesos descritos:

a) Desulfuración de dibenzotiofeno por un consorcio de *Brevibacterium* y *Alcaligenes*; el producto final tendría una estructura parecida al bifenilo.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) Generación de un intermediario más soluble. Esta ruta está codificada por un plásmido que se ha encontrado en dos estirpes de *Pseudomonas.*

c) Eliminación del azufre a partir del ácido naftalensulfónico. El grupo funcional se solubiliza como sulfito y la estructura que queda es del tipo 1,2-dihidroxinaftaleno, que es degradado a través de la ruta NAH. Descrito en *Pseudomonas*.

En la actualidad se están revisando las bases moleculares y bioquímicas de la degradación de componentes orgánicos nitrogenados por microorganismos y el más estudiado es un operón de *Pseudomonas* que degrada carbazol. Aunque estas tecnologías no se están aplicando todavía, sin duda tienen un gran potencial que pasa por el estudio molecular de los procesos de eliminación de azufre y nitrógeno orgánico.

Bibliografía

CHAKRABARTY, A. M. (1976). "Plasmids in *Pseudomonas*". *Ann. Rev. Gen.*, 10: 7-30.

GARCÍA-ORTIZ, A., FRÍAS, L. (1995). *El empleo de alpechín y orujos húmedos*. Publicación de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

INOUYE, S. (1998). "Plasmids". In: *Pseudomonas*. Ed. Thomas C. Montie.

LEAHY, J. G., and COLWEL, R. R. (1990). "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment". *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315.

ROSELL, M., LACORTE, S. y BARCELÓ, D. (2003). "Contaminación de acuíferos por gasolina". I*nvestigación y Ciencia*, 323: 6-13.

SOLANAS, A. M., SABATÉ, J. y VIÑAS, M. (2003). "Combatió el fuel del Prestige". *Mundo Científico*, 243: 32-39.

VALLEJO, B., IZQUIERDO, A., BLASCO, R., PÉREZ DEL CAMPO, P. and LUQUE DE CASTRO, M. D. (2001). "Bioremediation of an area contaminated by a fuel spill". *J. Environ. Monit.*, 3: 274-280.

VAN HAMME, J. D., SINGH, A. and WARD, O. P. (2003). "Recent advances in petroleum microbiology". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 503-549.

WIDDEL, F. and RABUS, R. (2001). "Aanaerobic biodegradation of saturated aromatic hydrocarbons". *Curr. Op. Biotech.*, 12: 259-276.

WIDDEL, F. y RABUS, R. (2001). "Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons". *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 259-276.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 14

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES III

Glosario
14.1. Introducción
14.1.1. Biotransformación con cosustratos
14.1.2. Cometabolismo
14.1.3. Sintrofia
14.1.4. Factores físicos y ambientales que limitan la biodegradación
14.2. Biodegradación aeróbica de compuestos aromáticos naturales. El plásmido TOL
14.2.1. Dioxigenasas
14.2.2. Monooxigenasas
14.2.3. Rotura en *orto* del anillo aromático. Ruta del 3-oxoadipato
14.2.4. Rotura en *meta* del anillo aromático. Ruta del plásmido TOL y su regulación. Metabolismo de alquilbencenos
14.2.5. Otras rutas degradativas del tolueno
14.3. Biotecnología de los plásmidos catabólicos
Expansión de rutas catabólicas
14.3.2. Biotransformación de metabolitos
14.3.3. Biocontención. Contención biológica y contención génica
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Aromático: Compuesto químico que contiene el anillo del benceno con o sin substituciones.
Biocontención: Tecnología basada en el DNA recombinado que trata de evitar la dispersión de organismos o plásmidos cuyos genes se han manipulado de forma artificial.
Biorremediación: Biotecnología diseñada para corregir o evitar los efectos de la contaminación química sobre el medio ambiente.
Catecol: *o*-dihidroxibenceno.
Clonación: Obtención de múltiples copias idénticas de un gen, célula u organismo vivo.
Cometabolismo: Proceso en el que un compuesto es degradado por un organismo sin obtener energía o sustratos para el crecimiento.
Condiciones rédox: Estado del medio que viene determinado por su capacidad oxidante o reductora, dependiente a su vez del potencial rédox.
Cosustrato: Compuesto químico natural que induce el proceso biodegradativo de un compuesto xenobiótico.
Desacoplante: Compuesto químico que disipa el gradiente de H^+ a través de la membrana fosfolipoproteica e impide la síntesis de ATP.
Dioxigenasas: Enzimas que insertan los dos átomos del O_2 en un sustrato.
Evolución convergente: Proceso evolutivo por el que aparecen estructuras que desarrollan la misma función pero con diferente base génica (aletas de peces y de mamíferos acuáticos).
Factor σ: Proteína necesaria para que la RNA polimerasa se una a un promotor específico.
Gen asesino: Gen que codifica una función letal (por ejemplo, una proteína que forme poros en la membrana plasmática celular).
GMO (en castellano OGM): Organismo cuyos genes se han manipulado de forma artificial.
Inducción: Proceso por el que un gen inactivo o con una actividad basal pasa a ser transcrito intensamente.
Meta (*m*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituidos del benceno en las posiciones 1 y 3.
Monooxigenasas: Enzimas que insertan un átomo del O_2 en un sustrato y el otro átomo lo reducen a H_2O.
Operón: Agrupación génica que se transcribe como una unidad bajo el control de proteínas reguladoras que reconocen secuencias génicas específicas (operadores).
Orto (*o*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituidos del benceno en las posiciones 1 y 2. En el anillo aromático, sustitución del H en dos carbonos contiguos.
Oxidante: Especie química que acepta electrones de un donador.
Para (*p*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituídos del benceno en las posiciones 1 y 4.
Plásmido catabólico: DNA circular de doble hebra que codifica una ruta degradativa de un compuesto químico.
Potencial rédox: Tendencia de un sistema a dar o aceptar electrones. Se expresa en voltios.
Promotor: Secuencia de bases en el DNA a la que se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.
Reductor: Especie química que cede electrones a un aceptor.
Represión: Proceso por el que se inhibe la transcripción de un gen inducible.
Sintrofia: Situación nutricional que se da en un consorcio de organismos que actúan de forma secuencial en la degradación de un compuesto sin que ninguno por separado sea capaz de degradarlo completamente.
Transcripción: Síntesis de RNA a partir de un molde de DNA mediante la enzima RNA polimerasa.
Xenobiótico: Compuesto químico producido de forma artificial como consecuencia de un proceso industrial.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

14.1. Introducción

La biorremediación es un proceso biotecnológico que aprovecha la capacidad catalítica de los seres vivos (enzimas) para aumentar la velocidad de degradación de un contaminante. En la biosfera existen más de 10 millones de compuestos naturales, todos ellos biodegradables. Sin embargo, existen limitaciones que hacen que el proceso sea lento en determinadas condiciones. La tecnología de biorremediación consiste en el estudio de los factores limitantes de la biodegradación y la actuación sobre ellos para acelerar el proceso. En la tabla 14.1 se resumen algunos de estos factores limitantes de la biodegradación de un contaminante y figuran una serie de conceptos que aparecen con frecuencia en los textos especializados pero que muchas veces se confunden, por lo que a continuación se definirán de forma adecuada mediante ejemplos concretos.

Tabla 14.1. Factores que pueden limitar la biodegradación.

Limitaciones de la biodegradación y posibles soluciones			
Limitación		**Solución**	**Ejemplo**
Microbiológica	No hay población degradadora en ese sitio.	Inoculación. Sintrofia.	Degradación de fenantreno. Degradación anaeróbica de alpechín.
	La densidad es baja.	Enriquecimiento selectivo *in situ*. Biomagnificación.	Degradación de pireno.
Química	Biodisponibilidad.	Cambio de estado.	Uso de surfactantes.
	Falta de nutrientes.	Adición de cosustrato, bioestimulación.	Adición de benzoato a bacterias que degradan PCBs.
	Falta de inducción.	Adición de análogo.	Añadir BP a PCB.
Ambiental	Condiciones extremas.	Alteración.	Humedecer el suelo.
	Falta de donadores de e^-.	Adición.	Estimulación de la degradación de 2,4,5-T por alcohol.

PCB: policlorobifenilos; BP: bifenilos.

14.1.1. Biotransformación con cosustratos

Se trata de añadir al sitio contaminado un compuesto, normalmente natural, que permita la inducción de las enzimas necesarias para la degradación del contaminante así como el mantenimiento de una masa celular suficiente. Un ejemplo claro es la adición de metano a un sitio contaminado con tricloroetileno (TCE). El TCE es sustrato de la metano monooxigenasa, pero el metabolismo posterior de éste no es suficiente para el mantenimiento de las bacterias que lo transforman. Por tanto, la adición de metano permite un incremento de la cantidad de metanotrofos que también metabolizan el TCE (Fig. 14.1).

Los epóxidos son muy inestables y forman productos que son buenos substratos para bacterias heterotrofas. Esta estrategia ha sido usada con éxito para la degradación de TCE y es un ejemplo de la utilización de compuestos naturales para la estimulación de la degradación de un contaminante xenobiótico.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

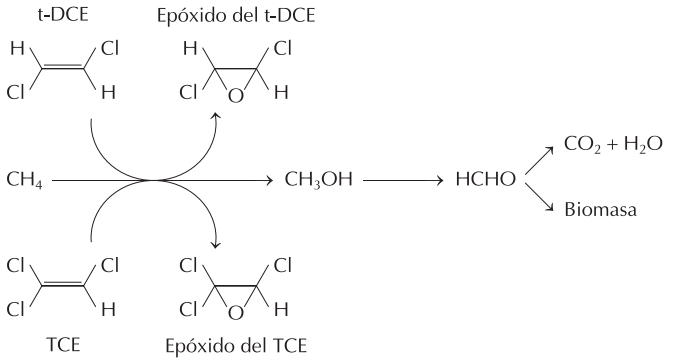


Figura 14.1. Degradación del TCE como cosustrato por bacterias metanotrofas.

Este proceso hay que distinguirlo claramente de la bioestimulación, que se discute en detalle en el tema dedicado al petróleo. La diferencia estriba en que en el caso del cosustrato se emplea un análogo del contaminante para inducir a la flora natural a su degradación, mientras que en la bioestimulación se emplean nutrientes que limitan la degradación del contaminante, como fósforo o nitrógeno.

14.1.2. Cometabolismo

Al contrario que en el caso del cosustrato, el compuesto que se cometaboliza no sirve ni como fuente de energía ni como sustrato del crecimiento al microorganismo en cuestión. El compuesto es biotransformado merced a reacciones inespecíficas del metabolismo y, por tanto, es necesario formular un medio completo que sustente el crecimiento celular.

Un ejemplo claro es la transformación de compuestos nitroaromáticos en aminoaromáticos (Fig. 14.2; véase capítulo 16).

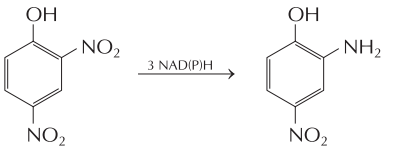


Figura 14.2. Transformación cometabólica del 2,4-dinitrofenol en 2-amino-4-nitrofenol.

Que el proceso no rinda energía o materia no quiere decir que resulte indiferente. En el caso que nos ocupa, la bacteria puede crecer fijando dinitrógeno, ya que el 2,4-dinitrofenol es un desacoplante energético y, al eliminarlo del medio, el organismo puede utilizar sus fuentes naturales de energía para crecer.

Sin embargo, los procesos cometabólicos pueden producir efectos colaterales. De hecho, los compuestos aminoaromáticos derivados de la reducción cometabólica de los nitroaromáticos suelen ser cancerígenos (véanse capítulos 16 y 17).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

14.1.3. Sintrofia

Se denomina sintrofia a una situación nutricional que se da en un consorcio de microorganismos que actúan secuencialmente en la degradación de un compuesto sin que ninguno por separado sea capaz de degradarlo de forma completa (véanse capítulos 4 y 7). El consorcio prolifera como consecuencia de la actividad sobre dicho compuesto. La necesidad del proceso sintrófico puede ser termodinámica o metabólica. En el primer caso cada especie tiene la información necesaria, pero uno de los procesos es termodinámicamente desfavorable y ha de estar acoplado al otro, como ocurre en la fermentación de etanol a metano (Fig. 14.3).

$$2\ CH_3{-}CH_2OH + 2\ H_2O \longrightarrow 4\ \mathbf{H_2} + 2\ CH_3COOH \qquad \Delta G = 19{,}36\ \text{kJ}$$

$$4\ \mathbf{H_4} + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O \qquad \Delta G = -130{,}69\ \text{kJ}$$

$$2\ CH_3{-}CH_2OH + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ CH_3COOH \qquad \Delta G = -111{,}33\ \text{kJ}$$

Figura 14.3. Sintrofia termodinámica.

Por el contrario, en la degradación del herbicida atrazina, la sintrofia es de tipo metabólico: se basa en procesos que son termodinámicamente favorables por separado, pero ninguna bacteria posee la información para la mineralización del contaminante (Fig. 14.4).

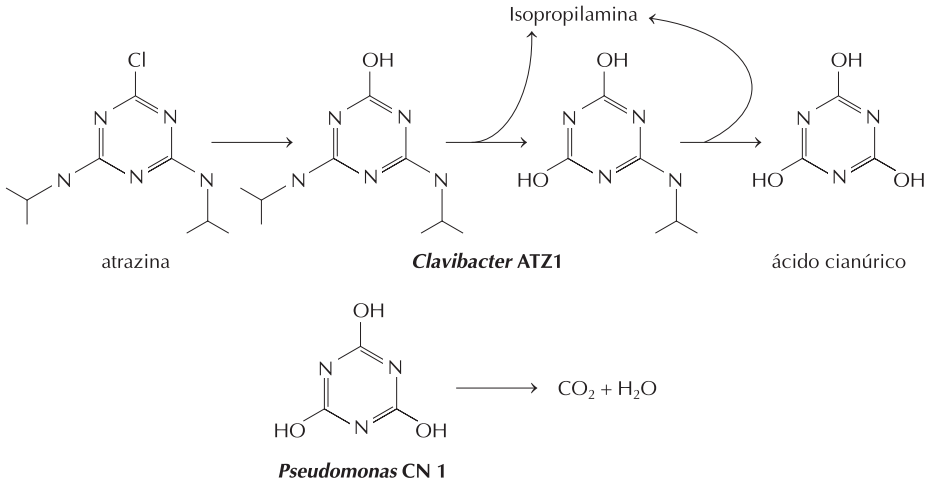


Figura 14.4. Sintrofia metabólica.

14.1.4. Factores físicos y ambientales que limitan la biodegradación

Para que se produzca la biodegradación de un determinado compuesto hay que tener en cuenta una serie de factores ambientales entre los que cabe destacar pH, temperatura, concentración, condiciones rédox y biodisponibilidad.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– pH. La mayoría de los microorganismos sólo crecen a pH comprendidos entre 5,5 y 8, siendo el óptimo entre 6,5 y 7,5. Los que se escapan de este rango hay que considerarlos como extremófilos. Si el pH no es el adecuado habrá que modificarlo para que comience la biodegradación.

– Temperatura. Las reacciones están catalizadas por proteínas y la velocidad de catálisis queda cuantificada por la relación de Arrhenius:

$$K = Ae^{-E/RT}$$

Donde A es una constante y E es la energía de activación.

Para la mayoría de la reacciones catalizadas por enzimas se puede asumir que la velocidad se dobla por cada incremento de 10 °C. Por encima de una determinada temperatura las enzimas se inactivan irreversiblemente, y por debajo de 10 °C las reacciones suelen ser lentas.

– Concentración. La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas suele variar de forma hiperbólica en relación al sustrato. Sin embargo, muchos compuestos xenobióticos resultan tóxicos a altas concentraciones, por lo que la relación de la velocidad específica de crecimiento con la concentración suele presentar la forma:

$$\mu_{max} = \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

– Condiciones rédox. Dependiendo de las condiciones rédox, proliferará un microorganismo u otro, y ello determina si un determinado compuesto se degradará o no. Algunos compuestos sólo se degradan en condiciones aeróbicas (dioxígeno como aceptor de electrones u oxidante), otros requieren condiciones muy reductoras (ellos suelen ser los aceptores de electrones en tales condiciones) y otros se degradan tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. El diseño de una estrategia para la biorremediación de un lugar concreto ha de contar con estos conocimientos y debe considerar su manipulación para conseguir el éxito.

14.2. Biodegradación aeróbica de compuestos aromáticos naturales. El plásmido TOL

El anillo aromático es muy estable y requiere una activación previa por parte del O_2 para formar derivados dihidroxilados (catecol) en los que se facilita la rotura posterior del anillo. La formación de catecol es catalizada tanto por dioxigenasas como por monoxigenasas.

14.2.1. Dioxigenasas

Son enzimas con amplia especificidad de sustrato que introducen los dos átomos de la molécula de dioxígeno en el anillo aromático. Se forma un derivado dihidroxilado

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

(*cis*-diol) que recupera la aromaticidad en una reacción catalizada por una dihidrodiol reductasa. Se necesita poder reductor en la primera reacción, pero se recupera en la segunda (Fig. 14.5).

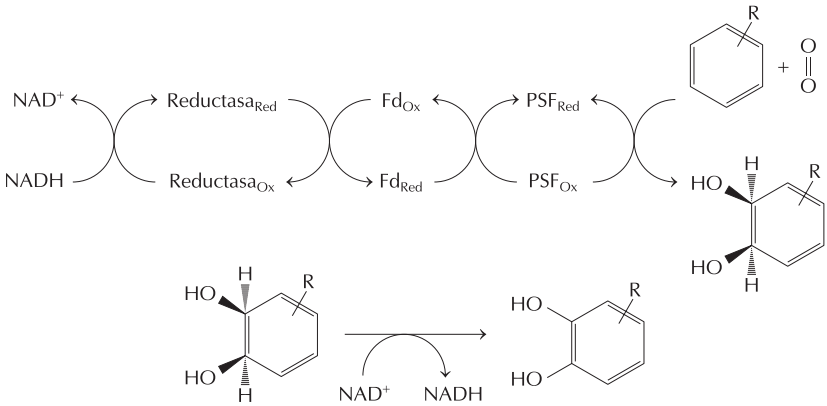


Figura 14.5. Esquema de las reacciones catalizadas por dioxigenasas y dihidrodiolreductasas.

14.2.2. Monoxigenasas

Son enzimas que introducen un solo grupo –OH en la molécula, reduciendo el otro átomo de oxígeno del O_2 a agua. Por tanto necesitan un equivalente de poder reductor (Fig. 14.6).

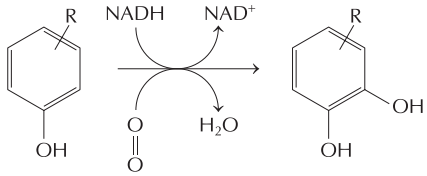


Figura 14.6. Esquema de la reacción catalizada por una monooxigenasa.

El metabolismo de los compuestos aromáticos naturales en condiciones aeróbicas converge en productos utilizables por las denominadas rutas metabólicas centrales, fundamentalmente la ruta del 3-oxoadipato y el ciclo de Krebs, donde se oxidan a CO_2 y generan energía utilizable por el organismo.

Esta convergencia metabólica actúa a manera de embudo por donde se introduce toda una miríada de compuestos aromáticos naturales, derivados sobre todo del metabolismo secundario de las plantas, que sintetizan gran cantidad de metabolitos aromáticos con finalidad estructural (lignina), de atracción (pigmentos y aromas) y de repulsión (toxinas contra herbívoros) (véanse capítulos 7 y 18). Los productos finales de este embudo metabólico son catecol, gentisato o protocatecuato (Fig. 14.7).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

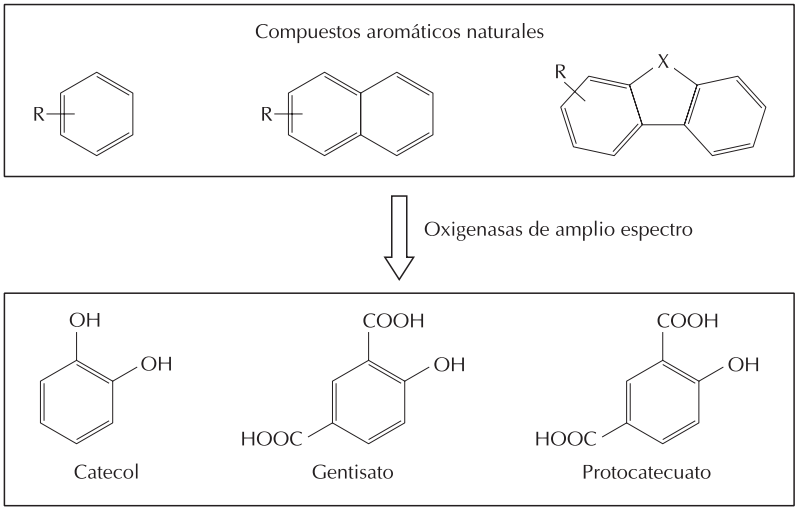


Figura 14.7. Convergencia de la degradación de compuestos aromáticos en derivados dihidroxilados.

Los derivados dihidroxilados se encuentran lo suficientemente activados como para sufrir una nueva oxidación que acaba con la aromaticidad del compuesto. Se han descrito varias rutas, pero aquí describiremos las más extendidas entre los microorganismos y las más estudiadas, que son la ruta de 3-oxoadipato y la codificada en el plásmido TOL. A la primera se le denomina también *orto* por atacar el oxígeno entre los dos carbonos activados y a la segunda *meta*, porque el ataque se produce en una posición adyacente.

14.2.3. Rotura en *orto* del anillo aromático. Ruta del 3-oxoadipato

En bacterias se trata de una ruta con dos ramas que convergen en la formación de 3-oxoadipato tanto a partir de catecol como de protocatecuato (Fig. 14.8).

Los genes de esta ruta se encuentran en el cromosoma y la organización génica y regulación de la ruta depende de cada estirpe microbiana. En general los genes para la degradación de catecol (*cat*) y de protocatequina (*pca*) se encuentran agrupados pero sin un orden fijo. Aunque agrupados, las dioxigenasas no se encuentran, por lo general, en el mismo operón que el resto de los genes. Además, se observa un agrupamiento con genes que codifican proteínas que alimentan la ruta, como la benzoato dioxigenasa-dihidrodiol-deshidrogenasa (*ben*) con *cat* y 4-hidroxibenzoato dioxigenasa (*pob*) con *pca*.

La regulación de la ruta también depende de la especie, se ejerce a varios niveles y suele ser positiva. Por ejemplo, la proteína CatR al unirse al *cis,cis*-muconato promueve la expresión de los genes *catBC* y *catA* en *Pseudomonas putida*. Sin embargo, en *A. calcoaceticus,* CatM, (homólogo a CatR), promueve la expresión de todos los genes necesarios para la degradación de catecol. En *A. tumefaciens*, PcaQ (homólogo

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

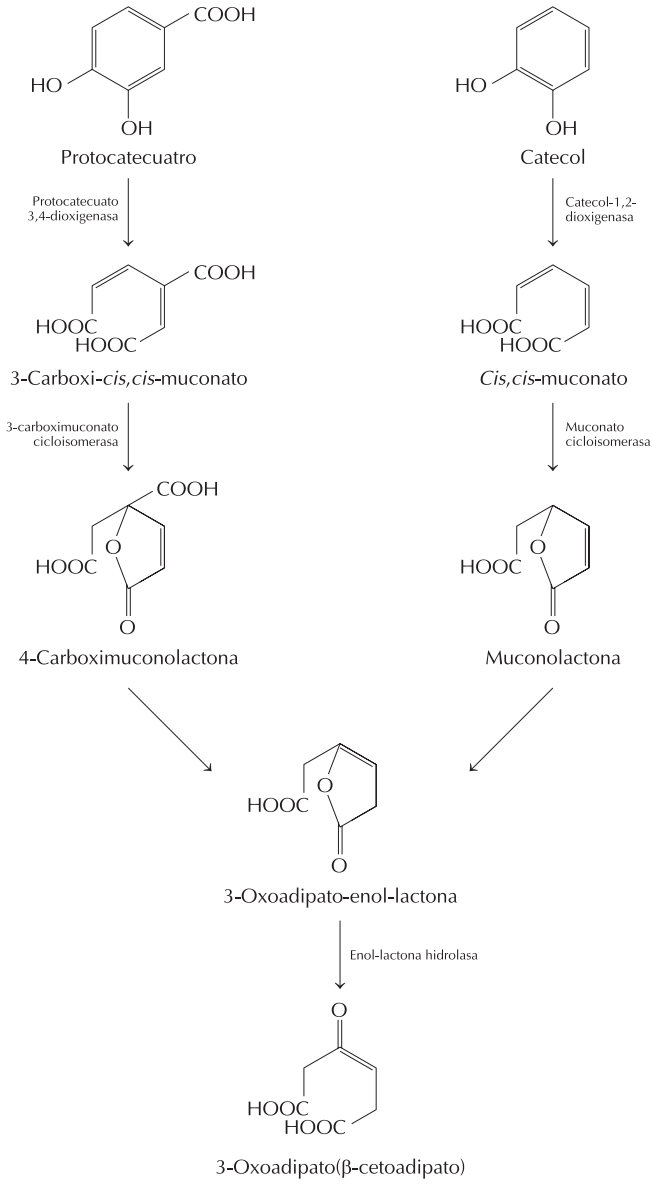


Figura 14.8. Ruta del 3-oxoadipato en bacterias.

a los anteriores) promueve la expresión de los genes necesarios para la conversión de protocatecuato en 3-oxoadipato en respuesta a la presencia de 3-carboxi-*cis,cis*-muconato. La rama del protocatecuato en *P. putida* se expresa en respuesta al 3-oxoadipato. Para ello, la proteína PcaR activa la expresión de al menos cuatro operones (*pcaBDE, pcaF, pcaIJ, pcaK*), pero no de *pcaHG* cuya proteína reguladora se desconoce.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

A este nivel de regulación hay que sumar el que existe entre ramas. Así, la expresión de *pcaK* (transporte de 4-hidroxibenzoato) se reprime por benzoato, que también reprime la expresión de los dos primeros genes de la ruta del protocatecuato. El resultado de esta regulación es que *P. putida* consume sólo benzoato aunque disponga de benzoato y 4-hidroxibenzoato simultáneamente.

En hongos el proceso es bioquímicamente muy parecido, pero cuando se estudia con mayor profundidad se observan diferencias significativas (Fig. 14.9).

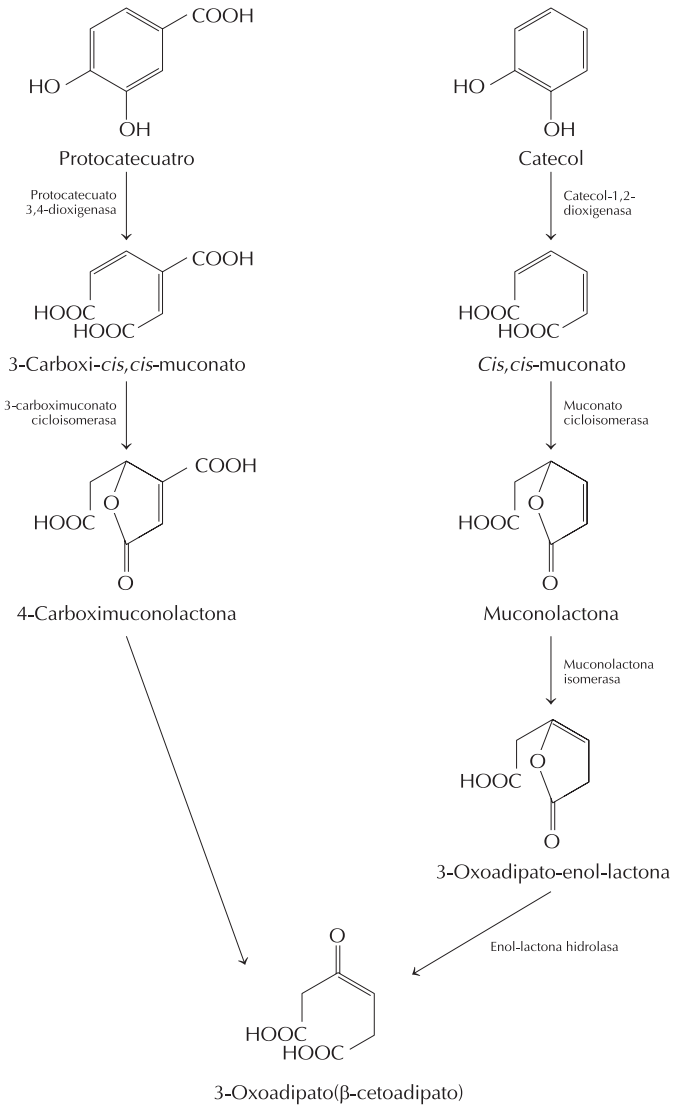


Figura 14.9. Ruta del 3-oxoadipato en hongos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La rama del catecol es similar a la descrita en bacterias, sin embargo, se trata de una evolución convergente ya que los genes no muestran homología alguna y los mecanismos de las reacciones son completamente distintos.

Las cicloisomerasas de ambas ramas de la ruta de hongos catalizan la adición en *sin* al doble enlace, igual que la muconato cicloisomerasa de *P. putida*. Sin embargo, la 3-carboximuconato cicloisomerasa bacteriana cataliza la adición en *trans*.

La rama del catecol de hongos acepta derivados metilados, mientras que la bacteriana produce metabolitos finales. Ello se debe a la orientación inversa de cicloisomerización catalizada por las respectivas cicloisomerasas (Fig. 14.10).

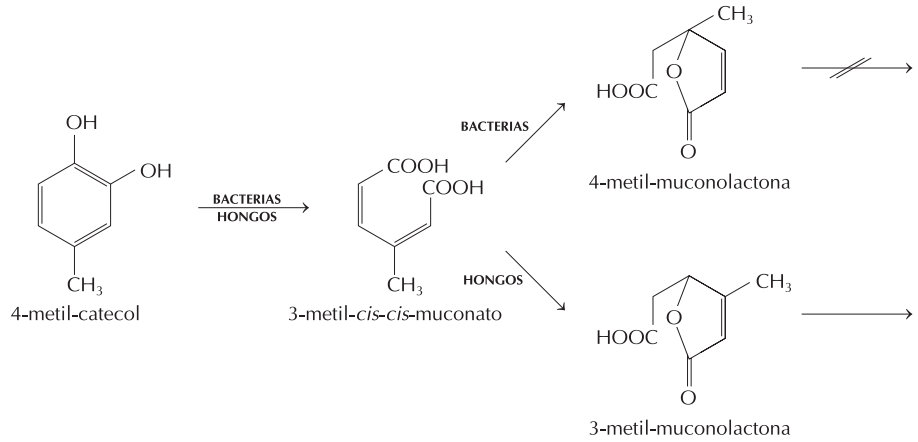


Figura 14.10. Metabolismo de metilcatecoles en bacterias y hongos.

La rama del protocatecuato de hongos cataliza al menos dos reacciones distintas de la rama homóloga bacteriana. La primera es la formación de 3-carboximuconolactona (en vez de 4-) y la segunda la conversión directa de este metabolito en 3-oxoadipato.

14.2.4. Rotura en meta del anillo aromático. Ruta del plásmido TOL y su regulación. Metabolismo de alquilbencenos

El plásmido TOL (originariamente pWW0) es con diferencia el mejor estudiado de todos los plásmidos catabólicos. Los plásmidos asociados a la degradación de tolueno encontrados hasta la fecha (denominados *xyl*) son variados en cuanto a su tamaño y organización génica, pero prácticamente todos codifican la misma ruta catabólica.

El tolueno es un compuesto natural presente, por ejemplo, en la fracción volátil del petróleo. Por tanto, no es de extrañar que existan en la naturaleza gran cantidad de bacterias capaces de degradarlo. La mayoría de las bacterias capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono y energía en condiciones aeróbicas lo hacen oxidán-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

dolo a benzoato, que posteriormente es degradado vía catecol. Sin embargo, el catecol no es oxidado en *orto*, sino en *meta* (Fig. 14.11).

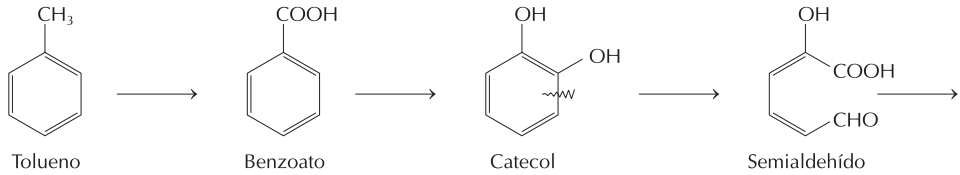


Figura 14.11. Esquema general de la degradación de tolueno hasta su rotura en *meta*. Algunas flechas suponen más de una reacción enzimática.

Las bacterias capaces de mineralizar tolueno suelen también degradar por la misma ruta metil-toluenos o xilenos, y otros alquilbencenos. La ruta completa se encuentra catalizada por entre 9 y 11 enzimas, algunas de ellas multiméricas.

La ruta se divide en dos segmentos, uno denominado ruta superior (u, de "upper") que conduce a la formación de benzoato (o alquilbenzoatos) y la inferior (m, de *meta*) que conduce a la completa mineralización de estos últimos.

En la figura 14.12 se ilustran las reacciones de ambos segmentos que conducen a la degradación de tolueno a derivados fácilmente oxidables por las rutas metabólicas centrales (piruvato y aldehídos).

La rotura en meta de catecol o metilcatecoles, catalizada por la enzima XylE, produce un semialdehído de color amarillo. Esta reacción se ha empleado para la clonación de los genes *xyl* de diferentes bacterias, y en general para la clonación de operones que suponen la rotura en *meta* del anillo aromático. El ensayo consiste en rociar con un spray que contiene catecol las colonias con fragmentos clonados. Las colonias que contengan el gen que codifican la rotura en *meta* del catecol se vuelven amarillas. La sencillez del ensayo ha permitido la utilización de *xylE* como gen marcador en procesos de clonación de otros genes. A partir del semialdehído existe una bifurcación en la ruta. Que el compuesto se degrade a través de la ruta oxidativa o de la hidrolítica depende de los sustituyentes, tal y como se esquematiza en la figura 14.12.

El soporte génico de toda esta ruta está contenido en un plásmido autotransmisible (TOL), lo que permite la transferencia horizontal de la información a otras bacterias. Este proceso ocurre con una frecuencia muy alta entre bacterias del mismo género (hasta una de cada diez bacterias receptoras adquiere el plásmido) pero la frecuencia baja mucho con enterobacterias (aproximadamente una de cada millón). Se ha demostrado la existencia de plásmidos catabólicos en bacterias que degradan salicilato, naftaleno, alcanfor y octano.

Además, una misma bacteria puede tener el plásmido TOL (degradación de catecoles por la ruta meta) y, a la vez, en el cromosoma, la información necesaria para degradar catecol (benzoato) por la ruta *orto*.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

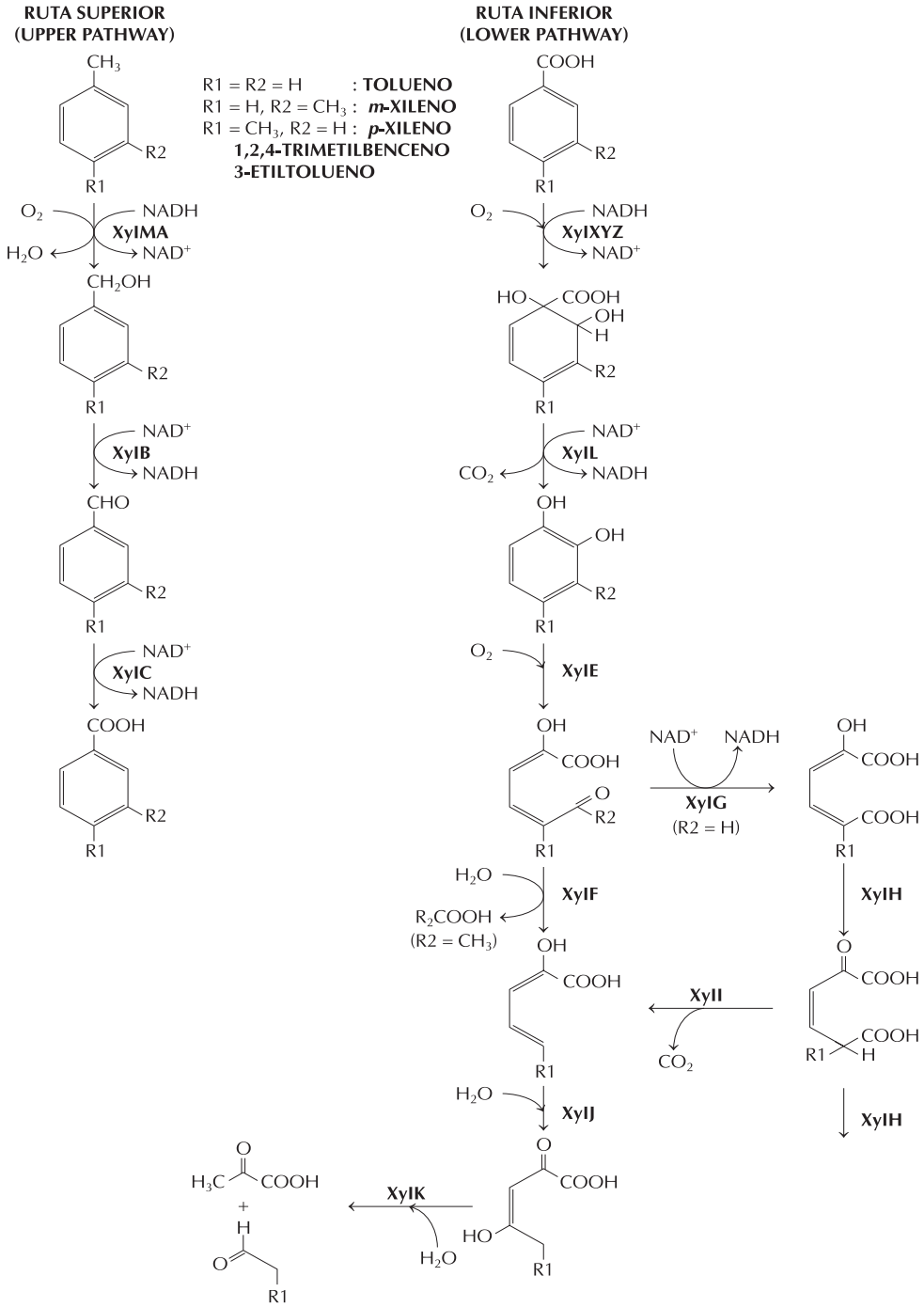


Figura 14.12. Ruta metabólica para la degradación de tolueno. Junto con las flechas se indican las enzimas que catalizan cada reacción.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El plásmido TOL tiene un tamaño relativamente elevado (aproximadamente 117 kb) y contiene toda la información necesaria para degradar alquilbencenos y benzoatos. Cada tramo está regulado y el esquema general de la regulación aceptado actualmente es el que se muestra en la figura 14.13. La información para la degradación controlada de tolueno se encuentra codificada en 4 unidades transcripcionales, dos que contienen los dos grupos de genes catabólicos (*u* y *m*) y dos con los genes reguladores *xylS* y *xylR*. En ausencia de compuestos aromáticos, el gen *xylS* se transcribe con baja intensidad a nivel del promotor *Ps2* y se produce la proteína XylS, que es inactiva, con lo que los genes de los operones *u* y *m* no se transcriben. En presencia de benzoato, el complejo XylS-benzoato activa al promotor *Pm* y se expresan los genes del operón *m*, permitiendo a la bacteria asimilar benzoato/metilbenzoatos. En presencia de tolueno/xilenos, el complejo XylR-tolueno se une al promotor *Ps1*, que promueve la producción de gran cantidad de proteína XylS (que activa al promotor *Pm* en ausencia de benzoato). El complejo XylR-tolueno se une también al promotor *Pu*, con lo que se expresa el operón *u*. La expresión coordinada de los dos operones catabólicos permite la oxidación completa de tolueno/xilenos hasta intermediarios que se oxidarán posteriormente a CO_2 en el ciclo de Krebs. Por último, la proteína XylR se une al promotor *Pr* y reprime su propia síntesis.

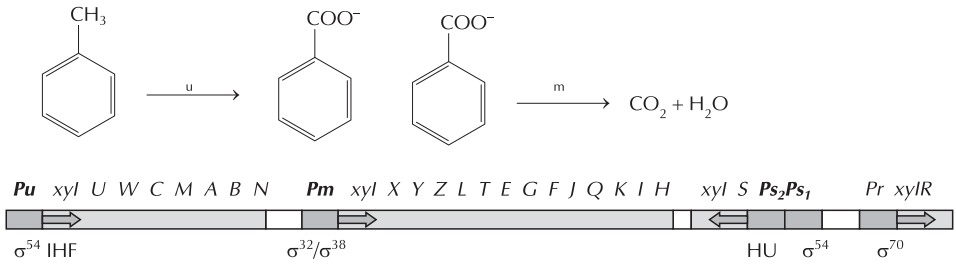


Figura 14.13. Esquema que muestra la regulación de la expresión de los genes necesarios para la degradación de tolueno. *Pu* (promotor del operón *u*, que codifica las enzimas de la ruta tolueno ⟶ benzoato); *Pm* (promotor del operón *m*, que codifica las enzimas de la ruta benzoato ⟶ $CO_2 + H_2O$); *Ps1* y *Ps2* (promotores del gen *xylS*); Pr (promotor del gen *xylR*); las flechas indican el sentido de la transcripción. IHF y HU (proteínas auxiliares que promueven estructuras secundarias en el DNA que facilitan la transcripción); σ (subunidad de la RNA polimerasa que permite la unión de ésta a un promotor específico).

Este sofisticado proceso de control permite un considerable ahorro energético: sólo se expresan, cuando es necesario, los genes requeridos para la degradación bien de benzoatos o de tolueno.

14.2.5. Otras rutas degradativas de tolueno

Además de la ruta codificada por TOL, se han descrito otras dos rutas, ambas codificadas por genes del comosoma; la primera es la denominada ruta TOD, y la segunda sólo se ha encontrado en una cepa bacteriana (*Pseudomonas mendociona*).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El esquema de ambas rutas comparadas con la codificada por el plásmido TOL se presenta en la figura 14.14.

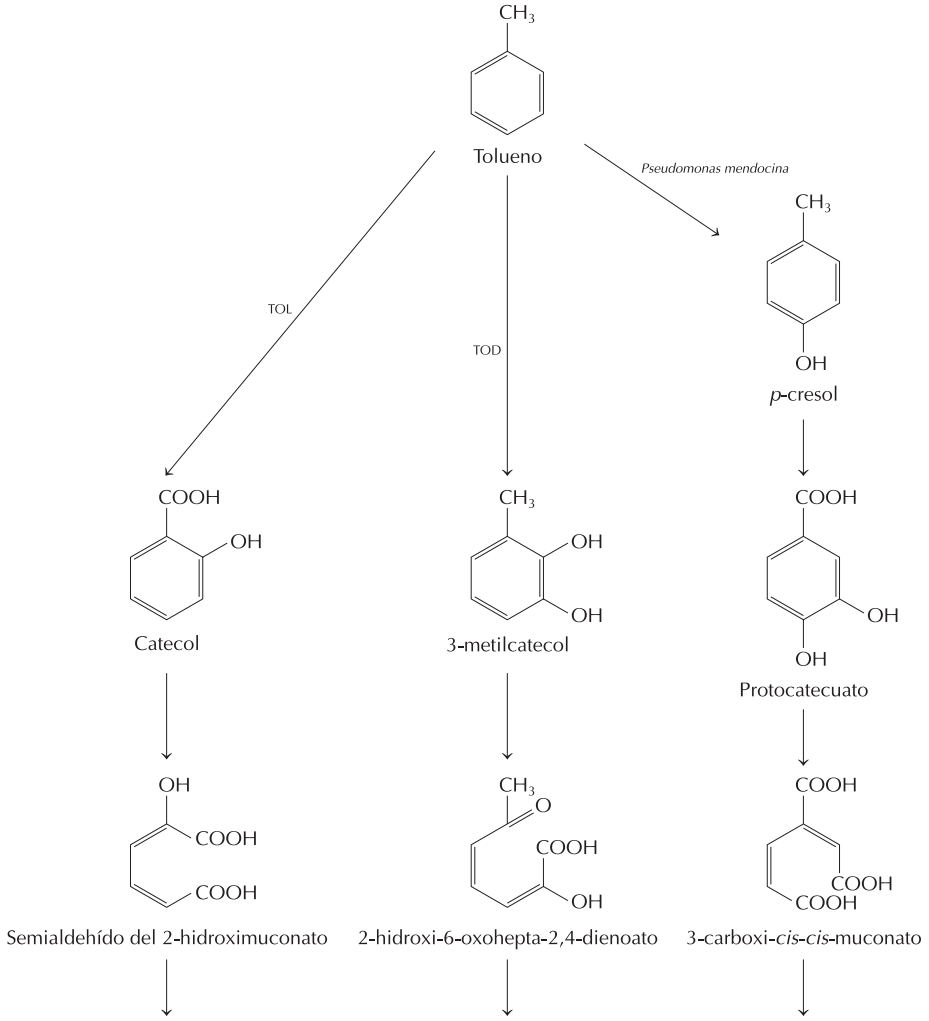


Figura 14.14. Otras rutas degradativas del tolueno.

14.3. Biotecnología del plásmido TOL

14.3.1. Expansión de rutas catabólicas

Tanto la bioquímica como la genética del plásmido TOL se conocen muy bien, y ello hace que segmentos de la ruta, o el plámido entero, se hayan empleado en la construcción de otras rutas. En la figura 14.15 se esquematizan algunos ejemplos:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

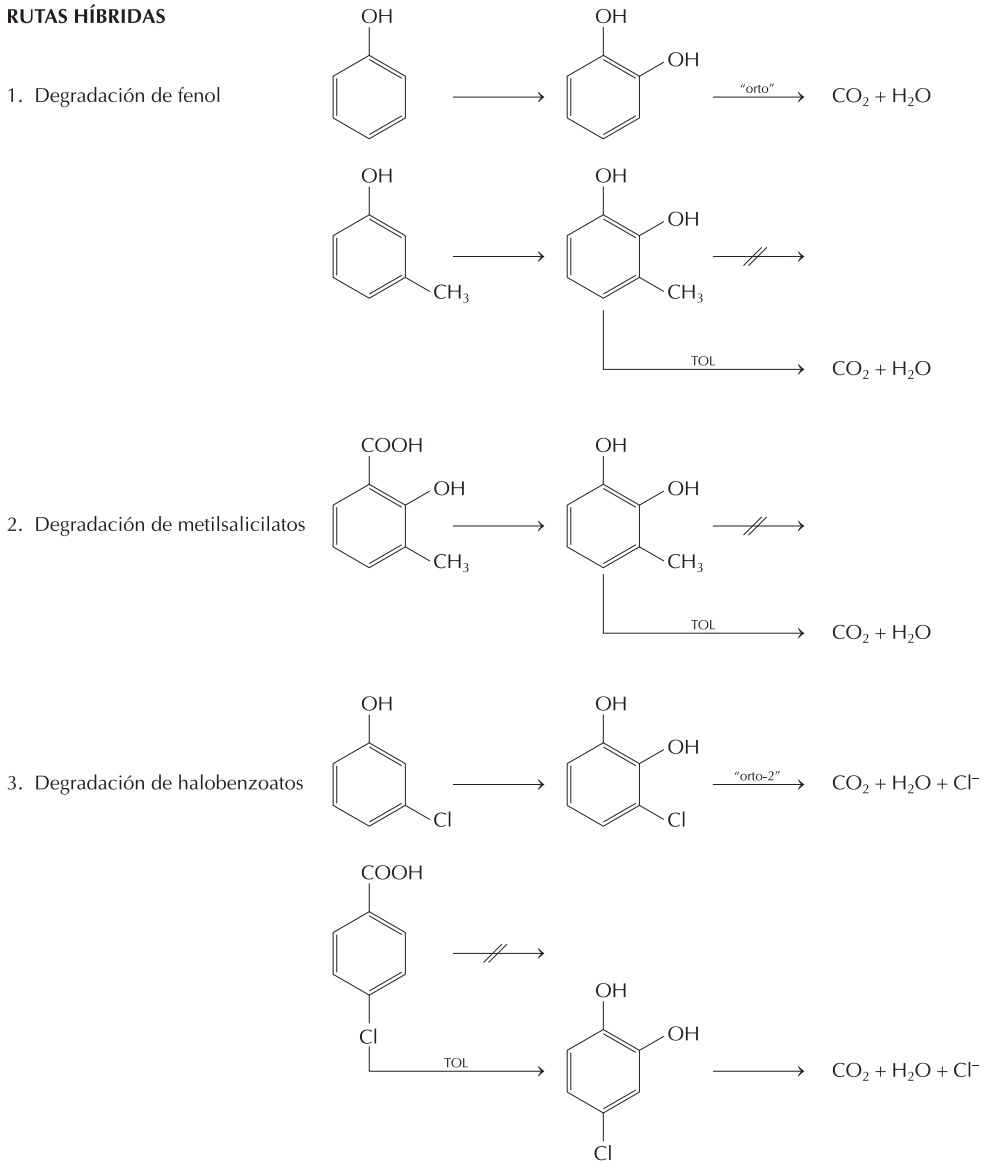


Figura 14.15. Esquema de la expansión de rutas catabólicas mediante la introducción de TOL en una estirpe bacteriana.

14.3.2. Biotransformación de metabolitos

Son muchas las aplicaciones de enzimas en la biotransformación de compuestos químicos con interés industrial. Aquí se mostrarán algunas de las enzimas relacionadas con el metabolismo de compuestos aromáticos naturales.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Una de las primeras aplicaciones se descubrió de forma casual durante el proceso de clonación de los genes implicados en la degradación de naftaleno. La clonación de uno de los fragmentos del plásmido *nah* y su expresión en *E. coli* condujo a la formación de colonias azules. Un estudio más detallado del proceso demostró que el fragmento contenía los genes que codifican la primera dioxigenasa de la ruta y que catalizan la transformación de naftaleno en el correspondiente dihidrodiol en presencia de oxígeno. La enzima también cataliza de manera fortuita la transformación de indol (procedente del triptófano que contiene el medio de cultivo) en índigo, un colorante azul empleado con profusión en la industria textil. Es decir, el índigo se forma por la acción consecutiva de la triptofanasa (presente en *E. coli*) y de la naftaleno dioxigenasa (clonada del plásmido *nah*). Con posterioridad se demostró que la misma reacción puede ser catalizada por las proteínas xylMA que, como se ha descrito más arriba, se encuentran codificadas en el plásmido TOL (Fig. 14.16).

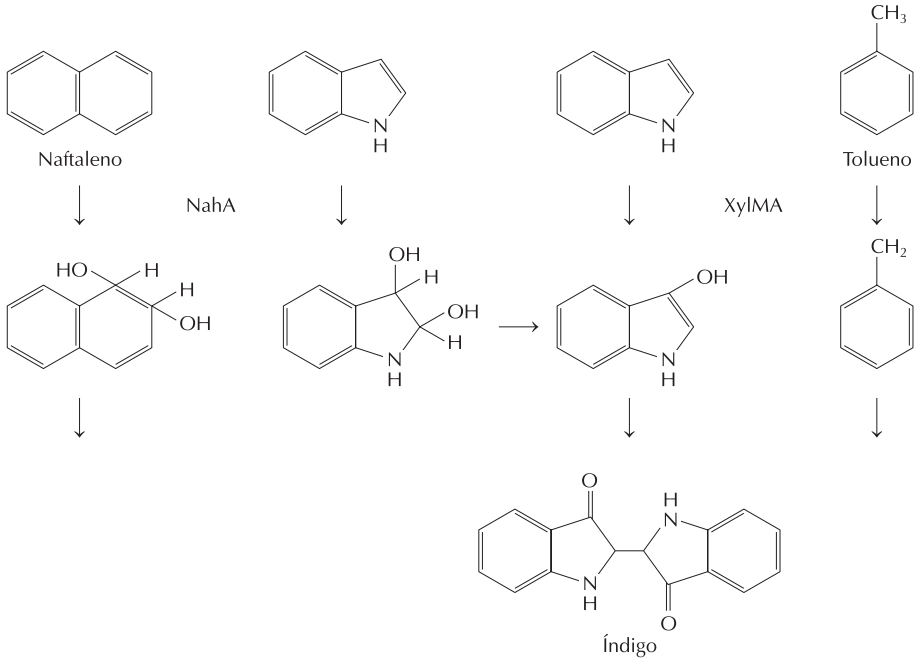


Figura 14.16. Formación de índigo a partir de indol por enzimas relacionadas con la degradación de naftaleno y tolueno. En cada caso se indica la reacción que cada enzima cataliza en su ruta natural.

Los ácidos picolínicos sustituidos tienen una enorme aplicación en la síntesis de polímeros industriales. Su síntesis química es a veces muy complicada y transcurre con bajos rendimientos por lo que se han planteado alternativas de tipo enzimático, y ello ha dado lugar a varias patentes. Entre los casos descritos cabe destacar uno en el que se escrutaron 139 estirpes bacterianas que degradan tolueno, de entre las que

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

seleccionó una que cataliza muy eficazmente la transformación de difenilacetileno en ácido 6-fenilacetilen-picolínico (Fig. 14.17). La reacción está catalizada por tres enzimas que actúan consecutivamente en la degradación de tolueno, la toluato dioxigenasa (1), dihidrodiol deshidrogenasa (2) y dioxigenasa (3) que conducen a la formación del correspondiente semialdehído. El último paso del proceso (4) es químico y consiste en la adición de amonio para que se produzca la condensación que rinde el derivado final del ácido picolínico.

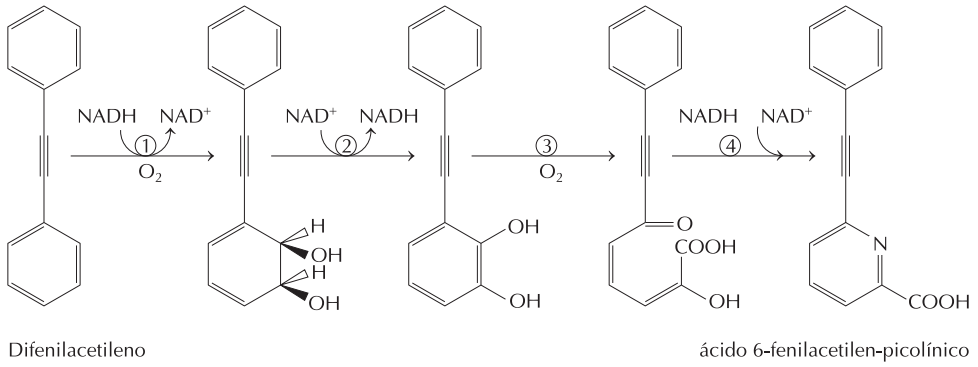


Figura 14.17. Formación de derivados del ácido picolínico catalizado por enzimas de la degradación del tolueno.

14.3.3. Biocontención

La construcción de plásmidos e incluso estirpes bacterianas especialmente dotados para la biodegradación y la necesidad de controlar su proliferación en el medio ambiente natural ha propiciado el desarrollo de tecnologías denominadas de biocontención.

Contención biológica

Como contención biológica se entiende el proceso que impide que una bacteria que ha sido modificada genéticamente para la degradación de un contaminante, perviva después de terminar su trabajo, es decir, una vez que el contaminante ha sido completamente degradado. El diseño de tales bacterias se planteó para evitar reticencias en el uso de GMO (organismos manipulados génicamente). Para su construcción se emplearon algunos de los genes reguladores del plásmido TOL y otros del operón de la lactosa, ya que ambos se conocen en detalle. El circuito se basa en la expresión controlada de un gen asesino. La expresión del gen asesino, en este caso es *gef*, depende del promotor *Ptac*, que es un híbrido regulado como el promotor de la lactosa pero con la fuerza del promotor del triptófano. A su vez, la expresión del gen *lacI* se encuentra bajo el control del promotor de la ruta inferior del TOL, y por tanto, la proteína LacI sólo se produce si hay 3-metilbenzoato (o algún compuesto análogo). En

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tales condiciones no se expresa el gen asesino y la bacteria sobrevive (Fig. 14.18, arriba). Cuando falte el contaminante (en este caso, 3-metilbenzoato) la bacteria morirá por la expresión del gen *gef* (Fig. 14.18, abajo).

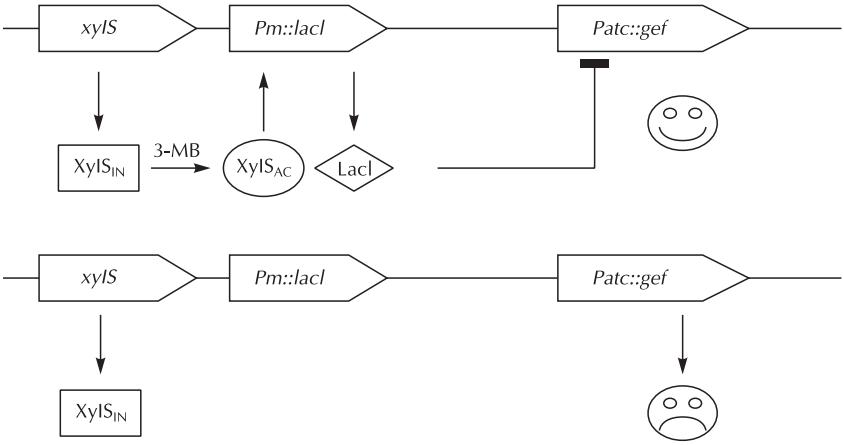


Figura 14.18. Circuito regulador para la contención biológica de organismos modificados génicamente. La proteína LacI (rombo, arriba) reprime la función asesina *gef*.

Además de ésta, se han descrito innumerables aplicaciones de los genes reguladores presentes en TOL, como la construcción de biosensores de contaminación. Las construcciones pueden tener los genes presentes tanto en plásmidos como establemente integrados en el cromosoma mediante el uso de transposones. La descripción de tales sistemas se escapa del alcance de este libro, pero en la bibliografía se pueden encontrar referencias al respecto.

Contención génica

La dispersión de genes o plásmidos manipulados se puede evitar mediante tecnologías que asocian una función catabólica y una función letal en el mismo plásmido. En la bacteria parental, el cromosoma codifica una proteína que anula la función letal. Si el plásmido se trasfiere a un aceptor, al carecer éste de inmunidad, muere al desarrollarse la función letal (Fig. 14.19).

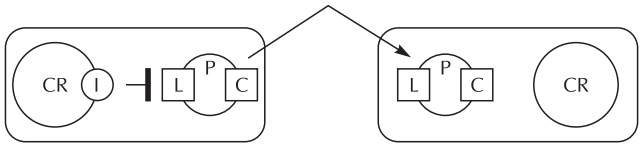


Figura 14.19. Contención génica. CR (cromosoma); L (gen letal); C (genes catabólicos); I (gen de inmunidad); P (plásmido catabólico).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Bibliografía

De Lorenzo, V., Herrero, M., Sánchez, J. M., Timmis, K. N. (1998). "Mini-transposons in microbial ecology and environmental biotechnology". *FEMS Microbiol. Ecol.*, 27: 211-224.

Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., Gibson, D. T. (1983). "Expression of naphthalene oxidation genes in Escherichia coli results in the biosynthesis of indigo". *Science*, 222: 167-169.

Haro, M.-A., de Lorenzo, V. (2001). "Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene". *J. Biotechnol*, 85: 103-113.

Ramos, J. L., Marqués, S., Timmis, K. N. (1997). "Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators". *Annu. Rev. Rev. Microbiol.*, 51: 341-372.

Spain, J. C., Nishino, S. F., Witholt, B., Tan, L. S., Duetz, W. A. (2003). "Production of 6-phenylacetylene picolinic acid from diphenylacetylene by a toluene-degrading acinetobacter strain". *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4037-4042.

Timmis, K. N., Steffan, R. J., Untermann, R. (1994). "Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes". *Ann. Rev. Microbiol.*, 48: 525-557.

Wackett, L. P., Hershberger, C. D. (2001). *Biocatalysis and biodegradation.* ASM Press.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 15

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS I

Glosario
15.1. Introducción
15.2. Biodegradación de dioxinas y dibenzofuranos
15.2.1. Origen y toxicidad
15.2.2. Biodegradación de dioxinas y furanos clorados
15.2.3. Influencia de los cloros en la biodegradabilidad. Deshalorespiración
15.3. Biodegradación de los policlorobifenilos (PCB)
15.3.1. Composición, origen y toxicidad de los PCB
15.3.2. Formas de eliminación de los PCB
Incineración
Biodegradación
15.3.3. Aceleración de la evolución. Transconjugantes y bacterias manipuladas genéticamente para la degradación de PCB
15.4. Las bacterias como ingenieros metabólicos: evolución natural de las rutas catabólicas
15.4.1. Evolución de las rutas metabólicas por reclutamiento de enzimas
15.4.2. Biodegradación del pentaclorofenol
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Biodegradación: Degradación de un compuesto químico por un organismo vivo.
Biorremediación: Biotecnología diseñada para corregir o evitar los efectos de la contaminación química sobre el medio ambiente.
Capacidad dieléctrica: Capacidad separadora de cargas eléctricas.
Catecol: *o*-dihidroxibenceno.
Conjugación: Proceso por el que DNA de una bacteria donadora se transfiere a otra aceptora mediante contacto físico de ambas.
Desfoliante: Agente químico artificial que hace caer las hojas de los árboles.
Dibenzofuranos: Compuestos formados por dos grupos clorofenilo unidos por un grupo furano.
Dioxigenasa: Enzima que inserta los dos átomos del O_2 en un sustrato.
Dioxinas: Compuestos formados por dos grupos clorofenilo unidos por dos enlaces –O–.
Estequiométrico: Relación entre las masas de un sustrato utilizado en una reacción y del producto aparecido en la misma.
Electrofílico: Reactivo o grupo químico que actúa como aceptor de un par de electrones de un átomo de carbono.
Estirpe (cepa): Dentro de una especie, variedad que presenta propiedades características.
Flavínica: Referente al nucleótido de flavina (FAD o FMN).
Glutation: Tripéptido γ-glutamil-cisteinil-glicina.
Hidrolasa: Enzima que rompe un enlace con el concurso del H_2O.
Meta (*m*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituídos del benceno en las posiciones 1 y 3.
Monooxigenasa: Enzima que inserta uno de los átomos del O_2 en un sustrato y el otro átomo lo reduce a H_2O.
Orto (*o*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituídos del benceno en las posiciones 1 y 2.
Paso limitante: En una reacción o ruta metabólica, etapa que limita la velocidad del proceso global.
PCB: Policlorobifenilos. Compuestos bifenílicos policlorados.
Para (*p*): Prefijo que se antepone al nombre de los derivados disustituídos del benceno en las posiciones 1 y 4.
Plásmido: Elemento genético bajo la forma de una molécula circular de DNA separado del cromosoma bacteriano.
Plásmido TOL: Plásmido que contiene la información necesaria para la degradación *meta* del tolueno.
Recalcitrancia: Condición de un compuesto xenobióticos, especialmente resistente a degradación físico-química o biológica.
Ruta orto: Ruta metabólica en la que se rompe un enlace C–C en la posición *orto* de un anillo aromático.
Xenohormonas: Compuestos xenobióticos que poseen actividad hormonal en los animales.
Superdepredadores: Organismos que se encuentran en la cúspide de la cadena trófica en un hábitat determinado.
Transconjugante: Bacteria a la que se ha transferido DNA foráneo por conjugación.
Transposón: DNA dotado de gran capacidad para "saltar" de un sitio a otro del genoma.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

15.1. Introducción

Además de los compuestos naturales susceptibles de biodegradación, la industria sintetiza miles de compuestos químicos, denominados xenobióticos, que poseen una gran capacidad de contaminación ambiental dado que, al contrario que los compuestos naturales, presentan una mayor o menor resistencia a la biodegradación (recalcitrancia). Entre los compuestos xenobióticos, los más importantes desde el punto de vista cuantitativo son los derivados aromáticos clorados y nitrados, base de las industrias de fabricación de explosivos, colorantes, herbicidas, plaguicidas, disolventes, aislantes y todo tipo de productos manufacturados de gran interés industrial. No obstante, algunos compuestos clorados y nitrados son de origen natural, y por esto no de extrañar que existan rutas biodegradativas más o menos elaboradas para este tipo de compuestos xenobióticos.

La biodegradación de compuestos aromáticos clorados ha recibido gran atención por parte de la comunidad científica debido a su especial toxicidad. Ello se debe a que, además de sus efectos directos deletéreos sobre las estructuras biológicas (membranas), algunos de ellos actúan como hormonas (xenohormonas) (Fig. 15.1). Este hecho ha provocado que los compuestos aromáticos clorados se hallen en el ojo del huracán de la lucha contra la contaminación química. Así, los policlorobifenilos (PCB) se han relacionado con problemas de infertilidad, con el desarrollo de algunos tipos de tumores y con un desarrollo inadecuado del sistema nervioso central.

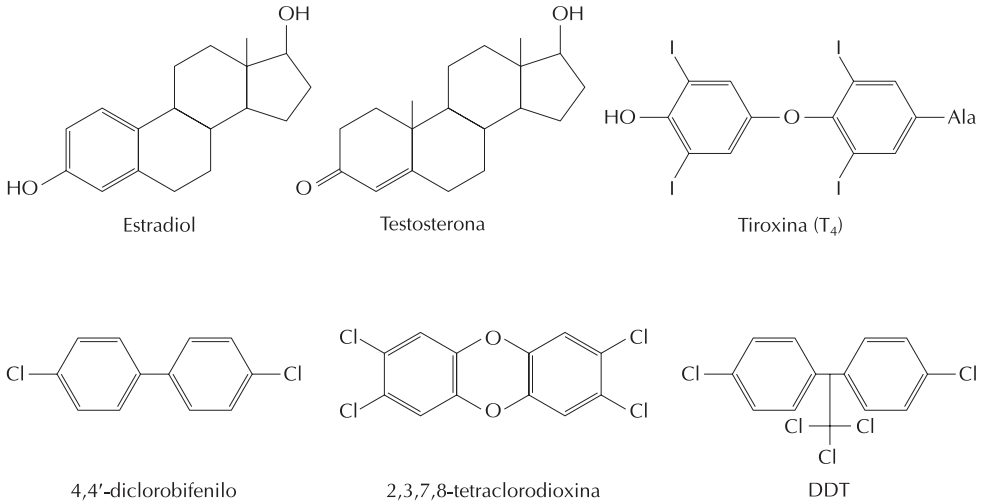


Figura 15.1. Semejanza estructural de algunas hormonas animales con compuestos xenobióticos clorados.

Como puede observarse en la figura 15.1, los PCB y las dioxinas y furanos clorados tienen cierta semejanza con algunas hormonas como el estradiol, pero en la mayoría de los caso no se conoce exactamente a qué nivel actúan.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Como pauta general, y como se señalaba en el capítulo 14, cabe destacar que las rutas degradativas aeróbicas de todos estos compuestos formen un embudo metabólico que converge en los clorocatecoles (Fig. 15.2).

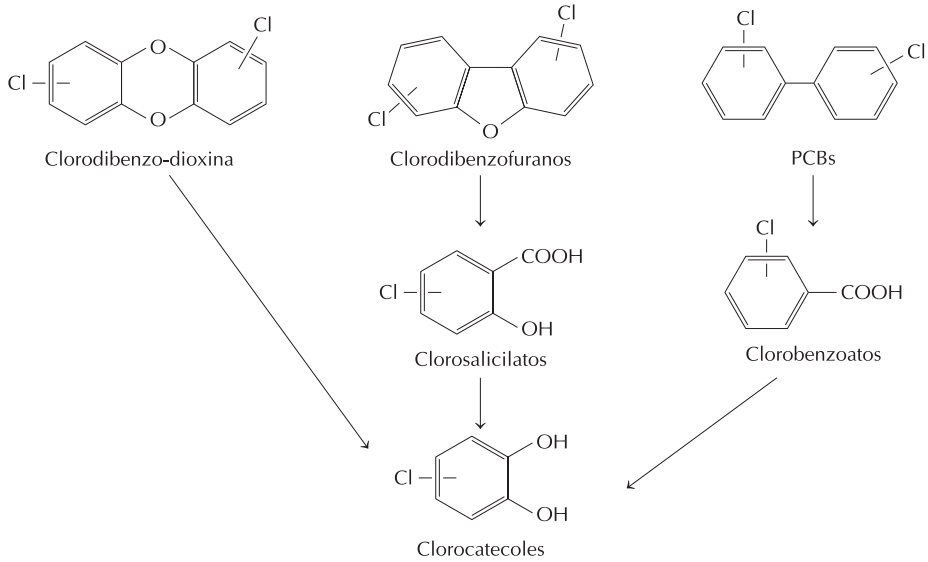


Figura 15.2. Esquema representando la convergencia en clorocatecoles de las rutas de degradación de dioxinas cloradas, clorodibenzofuranos y policlorobifenilos (PCB). La posición de los cloros es arbitraria.

Este tipo de compuestos existe normalmente en forma de mezclas, y eso es lo que se quiere resaltar en la figura 15.2 al no adjudicar una posición concreta a los cloros. La dioxina (sin cloros) es una molécula que apenas se encuentra en la naturaleza, mientras que el dibenzofurano y el bifenilo son compuestos naturales. Ello hace que las dioxinas cloradas sean doblemente xenobióticas, por su estructura y por contener cloro, mientras que los clorodibenzofuranos y clorobifenilos lo son sólo por tener cloro.

Otra diferencia que cabe destacar es que mientras que los PCB se produjeron intencionadamente en grandes cantidades por sus aplicaciones industriales (véase más adelante), tanto dioxinas como dibenzofuranos clorados se generan accidentalmente. Como cuantitativamente son más importantes, los PCB se tratarán en último lugar junto con la degradación de clorocatecoles, mientras que la degradación de dioxinas y dibenzifuranos clorados a clorocatecoles se tratará de manera conjunta.

15.2. Biodegradación de dioxinas y dibenzofuranos

15.2.1. Origen y toxicidad

El origen de estos compuestos es variado y aunque las dioxinas se forman en pequeñas cantidades en los volcanes, los incendios forestales y en algunos procesos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

biológicos, se suelen considerar compuestos xenobióticos porque su origen fundamental es antropogénico. La mayor cantidad de dioxinas cloradas vertidas en un solo punto ocurrió en Seveso (Italia) en 1976, tras el accidente de una planta productora del herbicida 2,4,5-triclorofenoxiacético. La toxicidad depende de la posición de los cloros, siendo las posiciones laterales las que más toxicidad confieren. Así, la 2,3,7,8-tetraclorodioxina es la molécula más tóxica que existe sobre la biosfera. Otra fuente importante de dioxinas cloradas son las incineradoras, existiendo riesgo de su producción siempre que se manejen compuestos orgánicos que contengan cloro. Es por ello que existe una legislación muy restrictiva al respecto en toda la CE. Las dioxinas cloradas se co-generan en procesos de síntesis química de compuestos aromáticos clorados. El caso más llamativo fue la contaminación con dioxinas de los herbicidas 2,4-D y 2,4,5-T (ácidos dicloro y triclorofenoxiacético, respectivamente) que se emplearon con profusión en el pasado. De hecho, éste es el conocido gas naranja empleado por el ejército de los Estados Unidos como agente desfoliante en la guerra de Vietnam. A esta contaminación con dioxinas se atribuyen enfermedades tanto en los que lo usaron como en los que lo padecieron. Por último, se sabe que se pueden formar dioxinas cloradas en el proceso de blanqueado de la pulpa de papel con cloro.

15.2.2. Biodegradación de dioxinas y furanos clorados

Las dioxinas y furanos clorados son muy recalcitrantes a la biodegradación y debido a su hidrofobicidad se acumulan en la cadena trófica. La primera bacteria capaz de usar dioxina como fuente de carbono se describió hace relativamente poco tiempo (*Sphingomonas* sp. RW1, en 1992), y ello es indicativo de que hay pocas bacterias capaces de degradar esta molécula. En la figura 15.3 se muestra un esquema de la ruta degradativa de las dioxinas.

La ruta comienza con el ataque del oxígeno molecular a la posición angular de la molécula catalizado por una dioxigenasa (1 en el esquema de la Fig. 15.3). Es de destacar que los genes de las dos subunidades terminales de la dioxigenasa no se encuentran agrupados en un operón con los genes de las dos subunidades que le transfieren los electrones. Además, el resto de los genes necesarios para la transformación de la molécula en catecol tampoco se encuentran agrupados. Estos hechos se han relacionado con una mayor versatilidad metabólica de la bacteria, pero también son indicativos de que se trata de una ruta metabólica poco evolucionada y, por tanto, sugiere que se trata de un grupo de moléculas relativamente recientes en la biosfera. El paso 2 está catalizado por una dioxigenasa que rompe en “meta” el anillo más oxidado para rendir un intermediario que es sustrato de una hidrolasa (paso 3). En ambos casos se genera un metabolito de 5 ó 6 átomos de carbono que es fácilmente asimilado por la bacteria. En el caso de la dioxina la hidrólisis rinde además catecol, mientras que en el caso del dibenzofurano se forma salicilato. Éste último se puede degradar tanto vía gentisato como a través de catecol (reacciones marcadas en el esquema de la figura 15.3 con el número 4). Aunque no se indica en el esquema por motivos de simplicidad, las dos reacciones necesitan oxígeno molecular y en las dos se forma un derivado dihidroxilado susceptible de seguir oxidándose como veremos más adelante.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

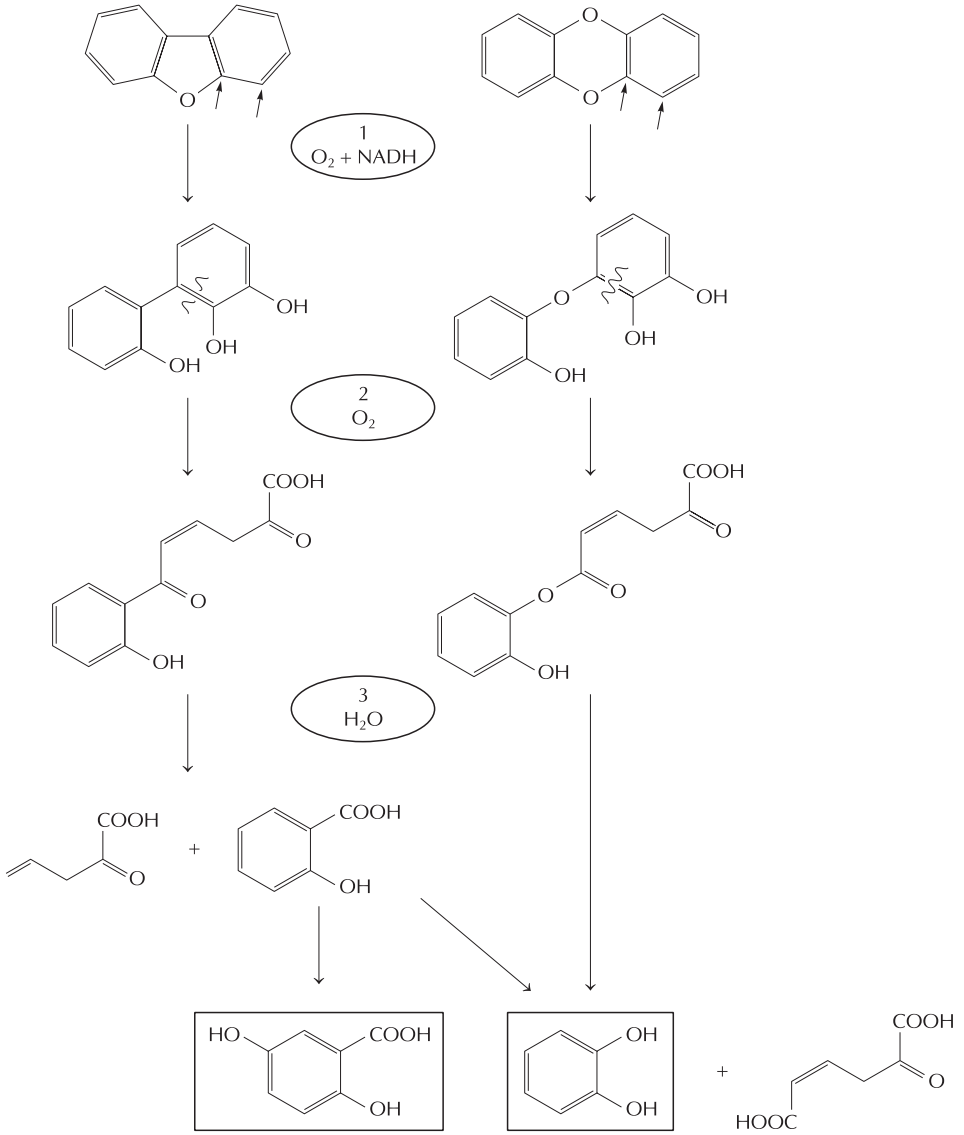


Figura 15.3. Conversión de dioxina y dibenzofurano en derivados dihidroxilados por *Sphingomonas* sp. RW1.

15.2.3. Influencia de los cloros en la biodegradabilidad. Deshalorrespiración

La presencia de cloros en la molécula la hace más recalcitrante, hasta el punto que no sea degradable en aerobiosis. Los estudios en anaerobiosis son escasos, pero desde hace tiempo se sabe que existen microorganismos que catalizan la eliminación de cloro en anaerobiosis. Muy recientemente se han aislado bacterias que utilizan

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

compuestos orgánicos clorados como oxidantes y por tanto se trata de un proceso respiratorio que se ha denominado "deshalorrespiración". Este proceso podría ser el primer paso de un proceso biotecnológico para la biodegradación de dioxinas muy cloradas, siendo el segundo la degradación aeróbica que es mucho más rápida.

Para moléculas poco cloradas existe cierta preferencia de la primera dioxigenasa por el anillo no clorado o menos clorado, por lo que se generan con preferencia clorocatecoles y clorosalicilatos. A continuación se estudia en detalle la degradación de PCB y de los productos comunes de todas las rutas, los clorocatecoles.

15.3. Biodegradación de los policlorobifenilos (PCB)

15.3.1. Composición, origen y toxicidad de los PCB

Los bifenilos policlorados son compuestos químicos de síntesis con la estructura genérica que se representa en la figura 15.4.

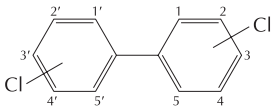


Figura 15.4. Estructura general de los PCB.

Hay 5 posibles posiciones de sustitución de cloro en cada anillo aromático del bifenilo, y por tanto, existen teóricamente 209 posibles congéneres. Los PCB se introdujeron en el mercado en 1929 y rápidamente alcanzaron gran aceptación debido a su uso en la fabricación de cosméticos, barnices, papel de calco sin carbón, material ignífugo y como aceite en los transformadores eléctricos. En todos los casos se trata de mezclas de compuestos, si bien para cada aplicación se emplea una mezcla no definida de congéneres que varía fundamentalmente en el porcentaje de cloro y se comercializaron bajo nombres como Aroclor, Clophen, Fenclor o Kanechlor. La razón principal de la síntesis a gran escala de PCB se debe a su uso en los transformadores eléctricos. Para este fin, los PCB resultan ideales debido a su estabilidad a altas temperaturas y su capacidad dieléctrica.

A pesar de los indudables beneficios de los PCB para la sociedad, con el paso del tiempo se han ido acumulando pruebas de su inconveniencia. La primera es su persistencia en el medio ambiente. La recalcitrancia de los PCB en la biosfera es una consecuencia directa de su composición. Se sintetizaron precisamente para perdurar, y además se trata de mezclas de compuestos xenobióticos altamente clorados. La segunda es su bioacumulación. Los PCB son poco solubles en agua y muy solubles en la grasa. Si a ello unimos que se degradan muy lentamente, el resultado final es que se van acumulando a lo largo de la cadena trófica. Así, se ha encontrado en la gaviota argéntea del lago Ontario una concentración de PCB 25 millones de veces superior a la detectada en el agua. También se han encontrado concentraciones muy elevadas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de PCB en la grasa de ballenas, focas, pingüinos, etc. Ello demuestra claramente que la contaminación viaja a través de la cadena alimenticia y se acumula en los superpredadores.

Todo lo anteriormente dicho no pasaría de ser preocupante si los PCB no fuesen tóxicos. La exposición a PCB provoca cuadros de toxicidad aguda que afectan principalmente al sistema nervioso central, riñón e hígado aunque sin duda el efecto más llamativo es su interferencia con el sistema endocrino, tal y como se indicó al principio del capítulo. Por lo anteriormente expuesto, la fabricación de PCB está prohibida en la mayoría de los países desarrollados. En la CE no solo está prohibida su fabricación, sino que los PCB inventariados deben ser eliminados antes del año 2010.

15.3.2. Formas de eliminación de los PCB

Incineración

Los PCB pueden ser incinerados, pero en instalaciones especialmente equipadas para que la temperatura sea de 1.200 ºC y con un tiempo de residencia de, al menos, 2 segundos. Ello hace que la eliminación de los PCB de los transformadores en desuso sea un proceso relativamente costoso. Hay que añadir que en España no existen instalaciones autorizadas. Cuando la contaminación se encuentra en el suelo, la incineración resulta inviable y hay que recurrir a procesos de inmovilización o de biodegradación.

Biodegradación

Se han descrito gran variedad de microorganismos capaces de degradar PCB. Sin embargo, no se sabe de ningún proceso que concluya con su mineralización total. Entre los microorganismos han recibido especial interés las bacterias, ya que degradan una gran variedad de congéneres y son susceptibles de ser manipuladas genéticamente con mayor facilidad que los eucariotas. También se han descrito hongos que transforman PCB.

A) Biodegradación de PCB por bacterias. Pasos limitantes

Las contaminaciones accidentales del medio ambiente con PCB han permitido detectar la presencia de microorganismos, fundamentalmente bacterias, capaces de biodegradarlos. La estrategia común para el aislamiento de bacterias capaces de degradar PCB consiste en el enriquecimiento bacteriano a partir de suelos contaminados usando bifenilo, un sustrato natural análogo no tóxico, como única fuente de carbono y energía. Ello ha permitido el aislamiento de gran variedad de bacterias capaces de degradar PCB. Hay que adelantar que, hasta el momento, no se ha encontrado ninguna bacteria capaz de mineralizar todos los PCB. Para entender donde se encuentran los pasos limitantes que impiden su mineralización véase primero la ruta metabólica por la que las bacterias degradan el bifenilo (Fig. 15.5). El bifenilo es un compuesto

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

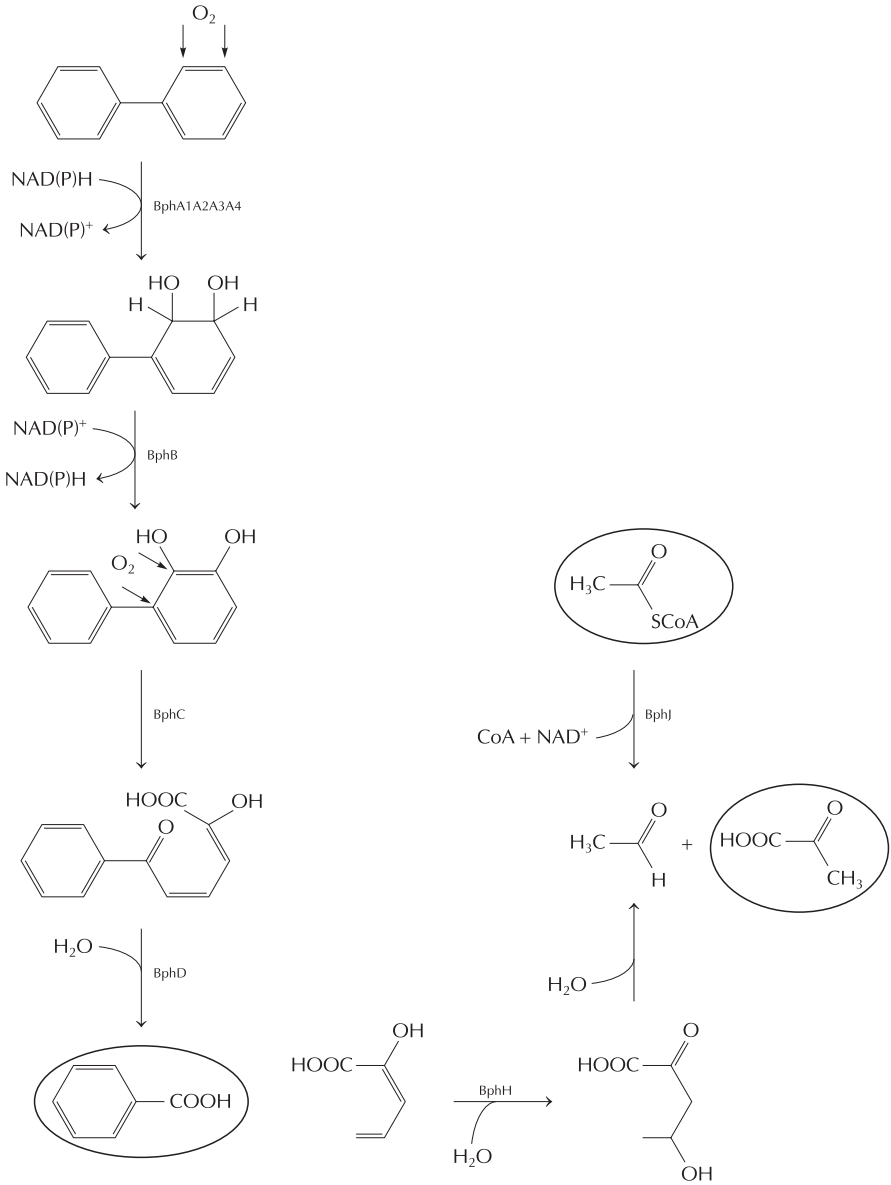


Figura 15.5. Esquema general de la ruta degradativa de bifenilo por bacterias. Junto con las flechas se indican las proteínas que catalizan el proceso.

natural fácilmente degradado por diversas bacterias en condiciones aeróbicas. Con ligeras modificaciones, todas las bacterias estudiadas hasta la fecha degradan el bifenilo siguiendo una estrategia común, que se puede dividir en dos procesos:

1) oxidación de bifenilo hasta benzoato con la producción de un derivado de 5 átomos de carbono que se transforma en acetaldehído y piruvato y

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

2) oxidación del benzoato hasta piruvato y acetaldehído. Por analogía con la ruta degradativa de tolueno, a la primera serie de reacciones se la denomina ruta superior y a la segunda, ruta inferior.

Dicha separación no es sólo convencional, ya que ambas rutas se suelen encontrar en dos unidades transcripcionales diferentes. Las mismas enzimas responsables de la degradación del bifenilo son las que atacan a los PCB, pero existen varios pasos limitantes. El primero es el grado de cloración. Cuantos más cloros tenga el anillo aromático, más difícil se hace el ataque electrofílico del oxígeno que, además, está desfavorecido por impedimentos estéricos. La solución de este problema puede ser, al igual que en el caso de las dioxinas policloradas, en un tratamiento microbiológico del residuo en condiciones anaeróbicas. Dicho tratamiento se ha mostrado muy eficaz en la descloración de PCB, con el único inconveniente de que es muy lento. Una solución alternativa sería diseñar un pretratamiento químico reductivo. En cualquier caso, una vez reducido el contenido en cloro, el residuo podría tratarse en condiciones aeróbicas con las bacterias adecuadas para su completa destrucción.

Como se ha dicho anteriormente, las bacterias degradan PCB usando las mismas enzimas que catalizan la degradación de bifenilo. Por tanto, según el esquema de la figura 15.5, la degradación de PCB por bacterias conduce a la formación de clorobenzoatos y un derivado clorado de 5C. De la degradación de este último se sabe muy poco, pero por el contrario, se tiene constancia de que la mayoría de las bacterias que degradan PCB no degradan clorobenzoatos. Hay casos descritos en los que se produce descloración en la ruta superior. Así, la reacción catalizada por la bifenilo dioxigenasa de *Pseudomonas* sp. LB400 elimina el cloro en la posición 2- del algunos PCB (Fig. 15.6).

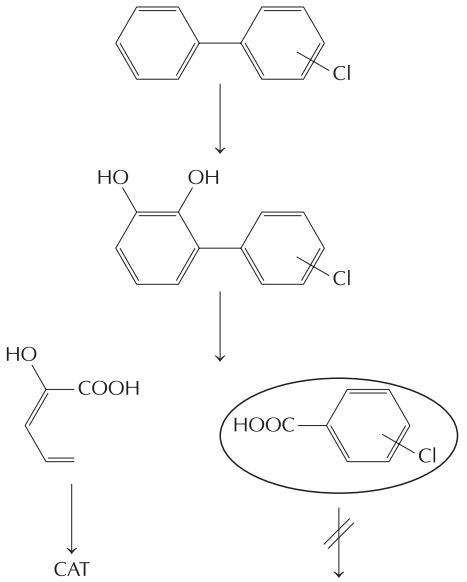


Figura 15.6. Degradación de 2,4′-diclorobifenilo por *Pseudomonas* sp. LB400.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El ataque oxidativo catalizado por la bifenilo dioxigenasa (BphA, una enzima tetramérica) se dirige a la posición 1,2- del anillo aromático. La especificidad de sustrato de esta enzima depende fundamentalmente de las proteínas sulfoférricas BphA1A2, que son los componentes terminales en la transferencia de electrones. Se ha demostrado que se pueden crear proteínas híbridas combinando subunidades de proteínas bacterianas que tienen especificidades de sustrato complementarias, como es el caso de *Pseudomonas* sp. LB400, que muestra preferencia por los PCB sustituidos en la posición 2, y *Rhodococcus globerulus* P6, que ataca a los PCBs sustituidos en la posición 4.

Sin embargo, lo habitual en el resto de las bacterias es que catalizen el ataque del oxígeno al anillo no clorado, o menos clorado, con la consiguiente formación de clorobenzoatos (Fig. 15.7).

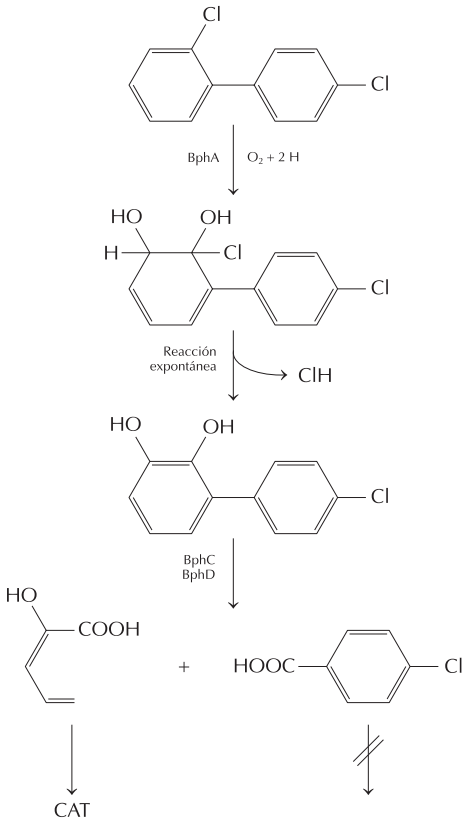


Figura 15.7. Ruta general de degradación de PCB por bacterias, con acumulación de clorobenzoatos. CAT (Ciclo de Krebs).

Puesto que el fragmento de 5C puede servir como fuente de carbono y energía para el crecimiento, lo normal es que la bacteria crezca en medio líquido y acumule cantidades estequiométricas del correspondiente clorobenzoato a partir de PCB. Por

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

otra parte, se conocen desde hace tiempo bacterias capaces de degradar clorobenzoatos. Éstos son fundamentalmente compuestos xenobióticos, aunque en la naturaleza se han encontrato algunos compuestos aromáticos clorados. Probablemente esta es la razón de que existan tales bacterias.

La ruta de degradación de clorobenzoatos comienza con una benzoato dioxigenasa que transforma el clorobenzoato en clorocatecol. Estas enzimas en ocasiones presentan una especificidad de sustrato relativamente estrecha. Por ejemplo, la benzoato dioxigenasa de *Pseudomonas* sp. B13 ataca al benzoato y al 3-clorobenzoato, pero no al 4-clorobenzoato. Sin embargo, tanto el 4-clorocatecol (que es el producto del 4-clorobenzoato) como el 3-clorocatecol (producto del 3-clorobenzoato) son sustratos productivos para esta bacteria. Es decir, existe un paso limitante en la benzoato dioxigenasa. Por otra parte, existen bacterias que poseen benzoato dioxigenasas con amplia especifidad de sustrato pero que no son capaces de degradar los correspondientes clorocatecoles. Claramente existe una complementariedad entre las bacterias con una benzoato dioxigenasa con amplia especificidad de sustrato y las bacterias que degradan clorocatecoles. Una de las benzoato dioxigenasas que poseen amplia especificidad de sustrato está codificada en el plásmido TOL, y por lo tanto se puede transferir por conjugación natural. Mediante la conjugación entre *Pseudomonas* sp. B13 (bacteria que degrada clorocatecoles, pero no puede transformar el 4-clorobenzoato en 4-clorocatecol) y *Pseudomonas putida* conteniendo el plásmido TOL (no degrada cloroaromáticos, pero transforma 4-clorobenzoato en 4-clorocatecol) se aisló una bacteria (B13) que había adquirido parte del plásmido TOL. Esta nueva bacteria adquiere la capacidad de degradar 4-clorobenzoato al tener una benzoato dioxigenasa que proviene del plásmido TOL y toda la información necesaria para degradar 4-clorocatecol.

La ruta para la degradación de clorocatecoles es básicamente la misma que para la de la degradación de catecol. Se trata de una ruta *orto* cuyas enzimas están "especializadas" en la degradación de derivados clorados. Además, comparada con la clásica ruta del 3-oxoadipato, son necesarias dos enzimas adicionales (Fig. 15.8).

En resumen, existen bacterias que degradan los PCB hasta clorobenzoatos, otras que transforman los clorobenzoatos en clorocatecoles, y, por último, otras que pueden mineralizar los clorocatecoles. La solución del problema parece, pues, simple: se trataría de co-inocular con los tres tipos de bacterias los lugares contaminados con PCB (Fig. 15.9).

B) De los xenobióticos a los antibióticos

Al realizar los experimentos de co-inoculación y resultar fallidos se llegó a la conclusión de que las bacterias del suelo debían producir un metabolito tóxico a partir del 4-clorobenzoato que "envenena" todo el sistema. Se ha demostrado que dicho metabolito es la protoanemonina, un antibiótico de origen vegetal que se produce por una serie de reacciones catalizadas por las enzimas de la ruta del 3-oxoadipato (Fig. 15.10). La formación de este antibiótico es probablemente la razón por la que la degradación de PCB en el suelo no se acelera con la inoculación de bacterias que

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

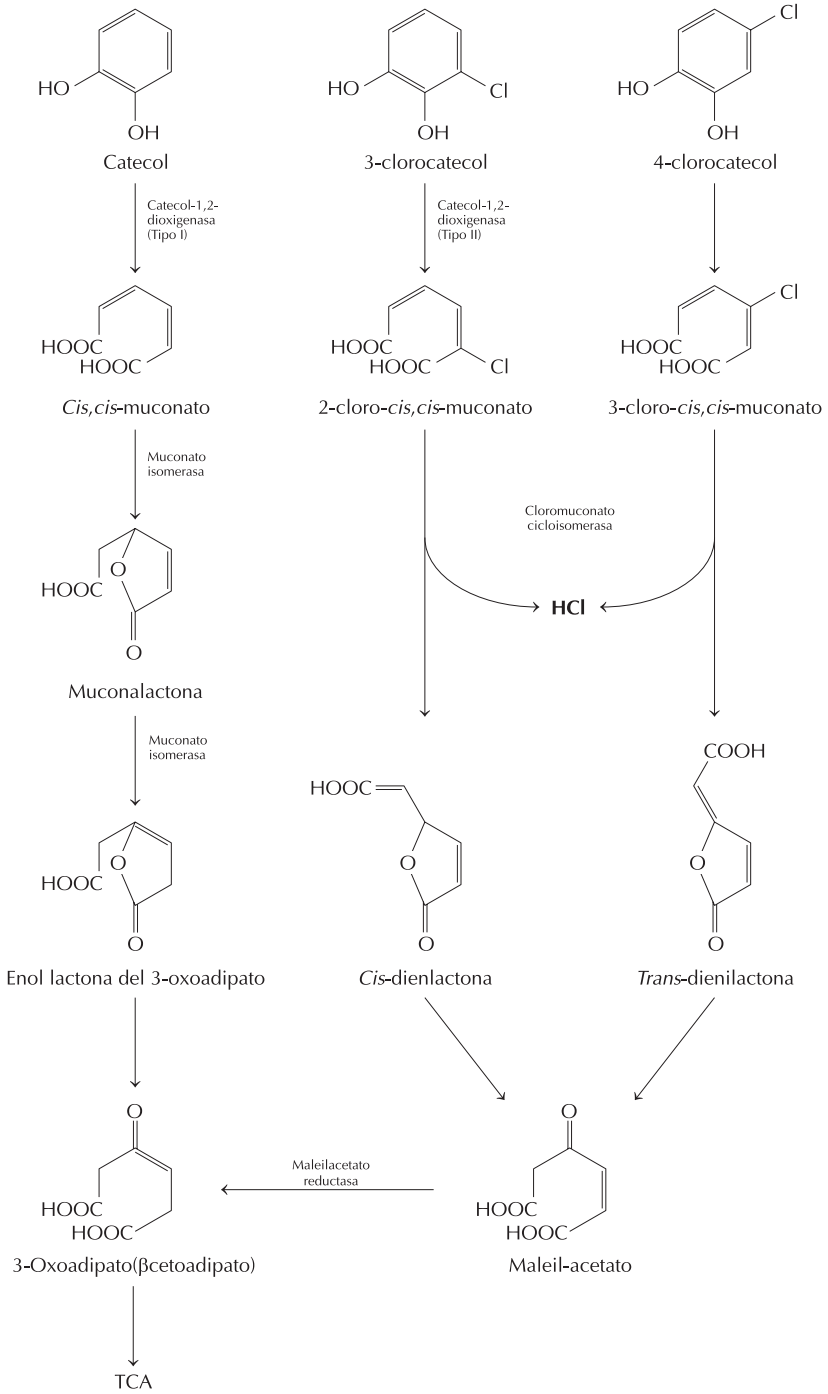


Figura 15.8. Comparación de las rutas para la degradación de catecol y clorocatecoles y convergencia en 3-oxoadipato. TCA: Ciclo de Krebs.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

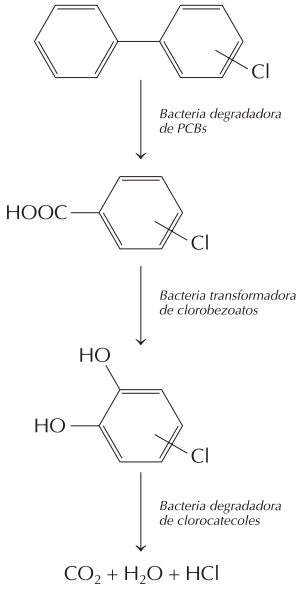


Figura 15.9. Biodegradación de PCB mediante la co-inoculación de tres tipos de bacterias.

degradan PCB. Este es un ejemplo claro de que las rutas metabólicas son algo más que la suma de las reacciones.

La formación de metabolitos tóxicos a partir de compuestos xenobióticos es habitual y conduce a la necesidad de acelerar la evolución bacteriana para poderlos eliminar. La formación de protoanemonina no es el único ejemplo ya que se conoce desde hace tiempo que la principal incompatibilidad entre la degradación de PCB y la de clorocatecoles es que el bifenilo y el benzoato derivado de su metabolismo se degradan por una ruta *meta*, mientras que los clorocatecoles solo lo hacen por una ruta *orto*. La rotura en *meta* de los clorocatecoles conduce a la formación de haluros de acilo, compuestos muy reactivos que son sustratos suicidas de la enzima que los produce (Fig. 15.11). Por el contrario, la rotura en *orto* de metilcatecoles conduce a la acumulación de metil-muconolactonas que no pueden ser degradadas por las enzimas de ruta del 3-oxoadipato (Fig. 15.11).

La razón de las incompatibilidades entre rutas es, fundamentalmente, que se trata de compuestos que han aparecido hace muy poco tiempo (50 años en el caso de los PCBs) y las bacterias, a pesar de su enorme versatilidad y adaptabilidad, no han tenido tiempo de evolucionar. Sin embargo, se conocen las enzimas y los genes necesarios para la degradación de los PCB, pero se encuentran en bacterias diferentes. Como ya se ha visto anteriormente, no basta con la co-inoculación de tales bacterias para biorremediar un suelo contaminado con PCB, ya que hay que contar también con las bacterias autóctonas que pueden formar metabolitos tóxicos. Por tanto, se hace necesario la construcción en el laboratorio de nuevas bacterias que eviten la formación de metabolitos terminales (*dead-end*) o tóxicos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

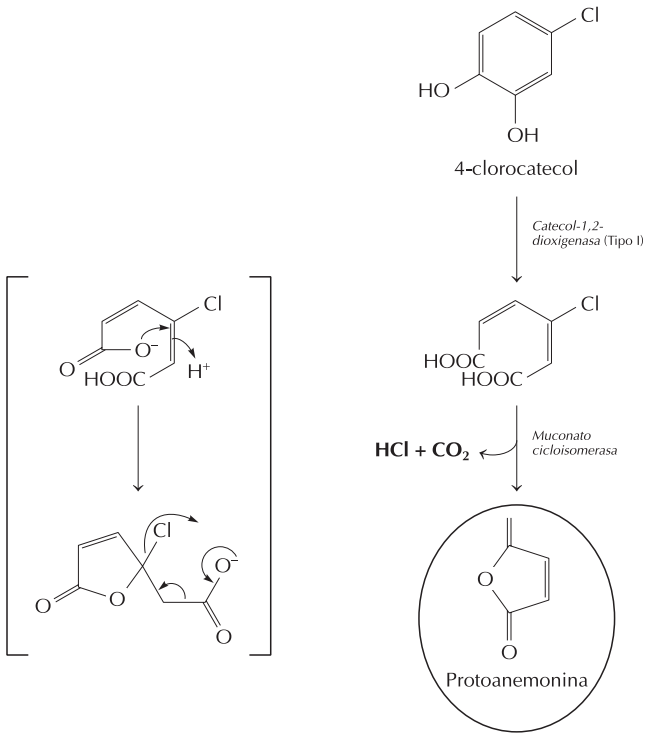


Figura 15.10. Mecanismo de formación de protoanemonina a partir de 4-clorocatecol, catalizado por enzimas de la ruta del 3-oxoadipato. Entre corchetes se ilustra el posible mecanismo de la reacción.

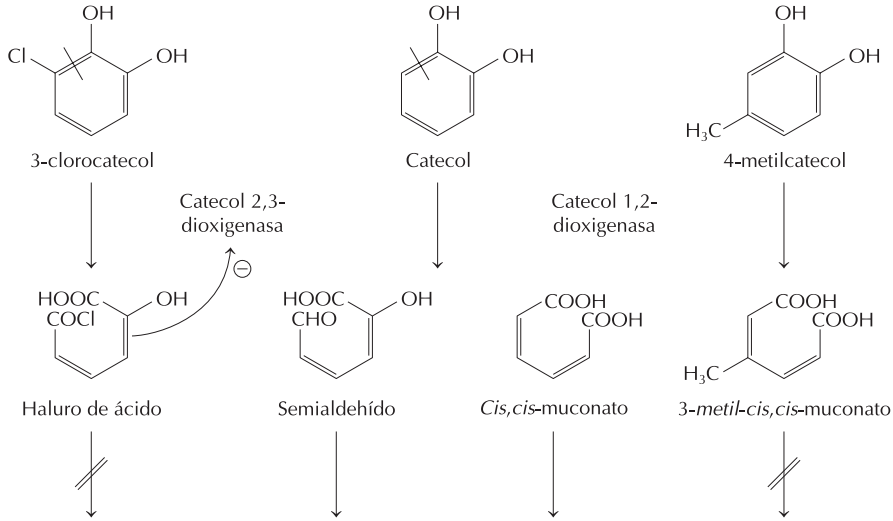


Figura 15.11. Incompatibilidad para la degradaciónd de cloro- y metil-catecoles simultáneamente.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

15.3.3. Aceleración de la evolución. Transconjugantes y bacterias manipuladas genéticamente para la degradación de PCB

Muchas rutas catabólicas se encuentran codificadas en plásmidos. La transferencia de éstos a bacterias (conjugación) permite a la célula receptora utilizar un nuevo compuesto para su crecimiento. Esta transferencia horizontal es una forma de evolución muy rápida y se ha empleado para construir intencionadamente bacterias que degraden congéneres de PCB que no eran degradados por las bacterias parentales. En la figura 15.12 se ilustra un caso concreto, la construcción de una cepa que mineraliza 3-clorobifenilo como consecuencia del intercambio genético entre una bacteria que degrada 3-clorobenzoato (*Pseudomonas* sp. B13) y otra que degrada PCB (*Pseudomonas* sp. BN10).

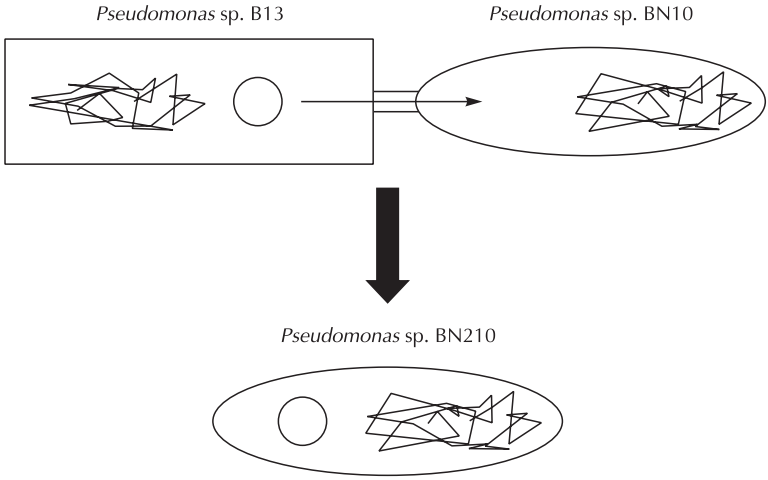


Figura 15.12. Esquema del proceso de conjugación que permite la selección de bacterias que degradan nuevos congéneres de PCB.

Como en estas bacterias ambas rutas catabólicas se encuentran codificadas en plásmidos, se consiguieron transconjugantes en las dos direcciones, si bien en la figura 15.12 sólo se muestra la transferencia del plásmido desde la estirpe B13 a la estirpe BN10 para dar lugar a la nueva estirpe BN210. Esta bacteria es capaz de mineralizar 3-clorobifenilo y transformar una gran variedad de congéneres del Aroclor 1221 (una mezcla comercial de PCB).

La transferencia de plásmidos no es el único mecanismo que permite la evolución bacteriana. Se han descrito mutaciones puntuales que aumentan la especificidad de sustrato de una proteína, la incorporación de DNA por transformación, la inserción de transposones en una determinada región del genoma, etc.

Como no todas las enzimas necesarias para la mineralización completa de PCB se encuentran codificadas en plásmidos, se hace necesaria la búsqueda de soluciones complementarias. Siguiendo con técnicas naturales, se han diseñado soportes de arcilla

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

que permiten el contacto íntimo entre bacterias que por separado poseen segmentos de la ruta que permitiría la mineralización de los PCB. La presión selectiva con PCB ha concluido con el aislamiento de bacterias que poseen capacidades nuevas. El inconveniente de esta aproximación es que, además de ser un proceso relativamente lento, no ha permitido aislar ninguna bacteria con el suficiente potencial.

La ingeniería genética posibilita el diseño racional de rutas metabólicas usando como módulos segmentos de rutas naturales conocidas. Para el caso concreto de la degradación de PCB, son necesarios tres segmentos:

1. Enzimas para la degradación de PCB hasta benzoatos. Dichas enzimas se encuentran en microorganismos aislados de suelos contaminados con PCB.
2. Enzimas para la transformación de clorobenzoatos en clorocatecoles o de 2-clorobenzoato en catecol. Los genes que codifican dichas enzimas no sólo se encuentran en bacterias que degradan clorobenzoatos, sino que pueden provenir de operones como el presente en el plásmido TOL, que posee una toluato dioxigenasa con amplia especificidad de sustrato.
3. Enzimas que catalizen la degradación completa de clorocatecoles. Como alternativa de estos genes también se pueden usar los que codifican la degradación de 4-clorobenzoato.

La aplicación estas ideas ha permitido la construcción de bacterias capaces de mineralizar una amplia gama de congéneres de PCB (Fig. 15.13) y abre una puerta de esperanza a la solución definitiva del problema de la contaminación del medio ambiente con este tipo de residuos industriales.

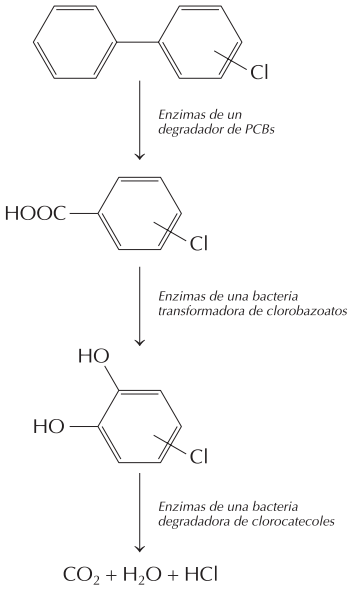


Figura 15.13. Esquema una ruta híbrida que permita la mineralización de PCB.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El uso de bacterias modificadas genéticamente, y organismos en general, genera una gran polémica. Por ello, se han construido circuitos genéticos que impiden la proliferación de la bacteria una vez que ha desaparecido la contaminación (contención biológica) y transferencia horizontal de plásmidos que contengan quimeras (contención génica). Como dichos sistemas se han construido utilizando los elementos reguladores del plásmido TOL, se puede encontrar una descripción más detallada dentro de éste libro en el capítulo 14.

15.4. Las bacterias como ingenieros metabólicos: evolución natural de las rutas catabólicas

15.4.1. Evolución de rutas metabólicas por reclutamiento de enzimas

Las rutas metabólicas naturales han evolucionado a lo largo de millones años mediante mecanismos diversos, entre los que se incluye el reclutamiento de enzimas preexistentes, que, mediante mutaciones al azar, han ido perfeccionando su capacidad catalítica hacia nuevos sustratos. Para mejorar la eficacia del proceso, a lo largo de períodos de tiempo han aparecido mecanismos de control basados en la modificación de la expresión génica y en la interacción entre metabolitos y proteínas. La degradación de tolueno es un claro ejemplo de un proceso catabólico bien evolucionado, dotado de alta eficacia catalítica y un sofisticado sistema de control (véase capítulo 14).

Por el contrario, los compuestos xenobióticos llevan poco tiempo en contacto con los seres vivos (dos centenares de años a lo sumo) y no ha habido tiempo material para la evolución de las rutas catabólicas correspondientes. Sin embargo, la versatilidad de las bacterias les ha permitido sobrevivir a la presencia de compuestos tóxicos gracias al cometabolismo (véase capítulo 14) y a la construcción de un tipo de ruta degradativa poco eficaz desde el punto de vista catalítico o regulador, pero muy efectiva a la hora de eliminar compuestos tóxicos. Un ejemplo de estas rutas improvisadas es la del pentaclorofenol.

14.4.2. Biodegradación del pentaclorofenol

El pentaclorofenol (PCP) es un plaguicida xenobiótico usado desde 1936 que se degrada por la bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* mediante una ruta catabólica construida a base de reclutar una enzima de una ruta preexistente totalmente ajena y de alterar la especificidad de enzimas degradadoras de clorofenoles naturales.

La ruta del PCP se presenta en la figura 15.14 y consiste en la eliminación de los cloros combinando un proceso oxidativo con la deshalogenación reductiva.

El estudio a nivel molecular de las tres primeras enzimas de la ruta ha revelado que la monooxigenasa es una enzima flavínica común entre los microorganismos del suelo para degradar clorofenoles naturales. Esta enzima es muy inespecífica ya que reeemplaza H, $-NO_2$, $-NH_2$, $-CN-$ y halógenos por grupos OH.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

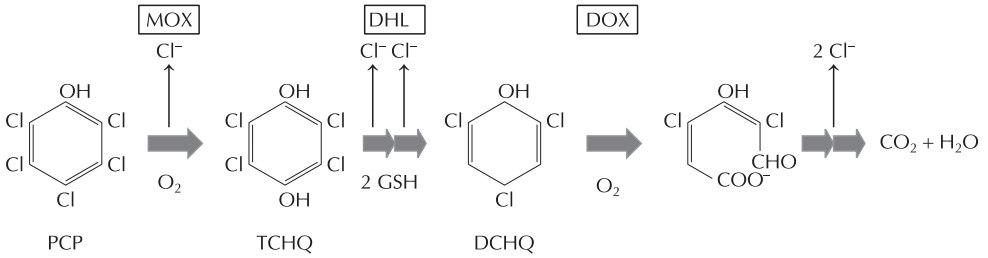


Figura 15.14. Ruta degradativa del pentaclorofenol (PCP). MOX (monooxigenasa); DHL (deshalogenasa); DOX (dioxigenasa); TCHQ (triclorohidroquinona); DCHQ (diclorohidroquinona).

Por su parte, la deshalogenasa que cataliza la descloración reductiva pertenece a la familia Z de las glutation transferasas (GST, enzimas muy importantes en la eliminación de tóxicos en los animales, veáse Capítulo 17) y parece haber evolucionado a partir de la maleilacetoacetato isomerasa, una enzima del catabolismo de la fenilalanina, otro compuesto aromático natural. Esta enzima cataliza la isomerización, dependiente de glutation, del doble enlace del maleilacetoacetato, que se transforma en fumarilacetoacetato. El alineamiento de secuencias de las enzimas GST de la clase Z tanto de humanos como de plantas revela bastante identidad en restos de aminoácidos clave para la catálisis con la deshalogenasa de *S. chlorophenolica*.

Por último, la dioxigenasa que cataliza la ruptura del anillo de la DCHQ podría pertenecer a rutas degradativas de diclorofenoles producidos por hongos e insectos (2,6-diclorofenol).

En resumen, la ruta del PCP de *S. chlorophenolica*, que lleva actuando sólo algunas décadas, parece haber emergido a partir del reclutamiento de oxigenasas preexistentes del metabolismo de clorofenoles naturales y de una isomerasa del catabolismo de aminoácidos, cuya actividad se ha adaptado a la deshalogenación reductiva.

Este estudio revela que las bacterias son verdaderos ingenieros metabólicos y que la actuación humana modificando sus potencialidades catabólicas únicamente acelera un proceso natural. El riesgo de los GMO no está por tanto en ellos mismos (ya que la naturaleza los produce continuamente), sino en su uso precipitado e indiscriminado sin una evaluación previa de las consecuencias de su dispersión.

Bibliografía

Blasco, R., Mallavarapu, M., Wittich, R. M., Timmis, K.-N. and Pieper, D. (1997). "Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms". *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 427-434.

Bunge, M., Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W.-G, Andreesen, J. R., Görisch, H., and Lechner, U. (2003). "Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium". *Nature*, 421: 357-360.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

COPLEY, S. D. (2000). "Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach". *TIBS*, 24, 261-265.

HOLLINGER, C., WOHLFARTH, G., DIEKERT, G. (1999). "Reductive dechlorination in the energy metabolism of anerobic bacteria". *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 383-398.

MOKROSS, H., SCHMIDT, E. and REINEKE, W. (1990). "Degradation of 3-Chlorobiphenyl by in Vivo Constructed Hybrid Pseudomonads". *FEMS Microbiol. Lett.*, 71: 179-186.

REINEKE, W., and KNACKMUSS, H.-J. (1979). "Construction of haloaromatics utilising bacteria". *Nature*, 277: 385-386.

ROJO, F., PIEPER, D. H., ENGESSER, K.-H., KNACKMUSS, H.-J. and TIMMIS, K. N. (1987). "Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics". *Science*, 238: 1395-1398.

WITTICH, R.-M., WILKES, H., SINNWEL, V., FRANCKE, W., FORTNAGEL, P. (1992). "Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. RW1". *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1005-1010.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 16

BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS II

Glosario
16.1. Los compuestos nitroaromáticos
16.2. Transformaciones bioquímicas de los compuestos nitroaromáticos
16.2.1. Rutas aeróbicas oxidativas del anillo aromático
Monooxigenasas
Dioxigenasas
16.2.2. Rutas aeróbicas reductivas del anillo aromático
Reducción del grupo nitroaromático. Nitrorreductasas
Reducción del anillo nitroaromático. Hidruro transferasas
16.2.3. Rutas anaeróbicas
Cometabolismo del 2,4-dinitrofenol en bacterias fototrofas
16.3. Metabolismo del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)
16.3.1. Catabolismo del TNT
Catabolismo aeróbico
Catabolismo anaeróbico
16.3.2. Degradación del TNT en el suelo
16.3.3. Reducción enzimática de nitrotoluenos
16.3.4. Asimilación anaeróbica de nitrotoluenos
16.4. Metabolismo de hidrocarburos nitroaromáticos policíclicos
16.5. Biotecnología de los compuestos nitroaromáticos
16.5.1. Biotecnologías terapéuticas
Terapias antibacterianas
Terapias anticancerosas
16.5.2. Biorremediación de nitroaromáticos
Tratamientos *ex situ* (biorreactores)
Expansión vertical de rutas catabólicas
Tratamientos *in situ*. Biodegradación de TNT en suelos
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Apoptosis: Proceso de autodestrucción celular programada que se desencadena por señales externas o internas (daños en el DNA) a la célula.

Balance C/N: Relación entre compuestos carbonados y nitrogenados (se toma normalmente la relación entre las concentraciones de 2-oxoglutarato y glutamina).

Biorremediación: Proceso de eliminación de un compuesto contaminante mediante biotecnología.

Cometabolismo: Biodegradación de un compuesto de la que no se extrae energía pero que permite el crecimiento en otro sustrato.

Compostaje: Proceso biológico aeróbico por el que los microorganismos actúan sobre una materia orgánica fácilmente degradable.

Electrofílico: Grupo en el que un átomo muy electronegativo tiende a aceptar un par de electrones.

Fotosistema: Conjunto de pigmentos fotosintéticos que transforma la energía luminosa en energía electrónica.

Inducible: Proteína cuya concentración en la célula varía según las condiciones ambientales.

Meta: Carbono del anillo aromático situado en posición 3 en relación al carbono al que está unido un grupo funcional determinado.

Nitroareno: Compuesto nitroaromático.

Nitrogenasa: Enzima bacteriana que cataliza la reducción de N_2 a NH_3.

Nucleofílico: grupo en el que un átomo poco electronegativo tiende a ceder un par de electrones.

Orto: Carbono del anillo aromático situado en posición 2 en relación al carbono del anillo al que está unido un grupo funcional determinado.

Para: Carbono del anillo aromático situado en posición 4 en relación al carbono del anillo al que está unico un grupo funcional determinado.

Resonancia: Propiedad de una molécula por la que su distribución electrónica no corresponde a una estructura concreta sino a un híbrido entre dos o más de éstas.

Recalcitrancia: Resistencia de un compuesto químico a la degradación biótica o abiótica.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

16.1. Los compuestos nitroaromáticos

Como se ha visto en los capítulos 12-15, gran parte de los compuestos xenobióticos poseen el anillo aromático, que les confiere una gran estabilidad sobre todo si poseen sustituyentes que extraen carga electrónica del anillo.

Este es el caso de los compuestos nitroaromáticos, que en una inmensa mayoría tienen un origen humano derivado de las industrias de explosivos (TNT, ácido pícrico), colorantes, plaguicidas (paration), disolventes, herbicidas (dinoseb) y fármacos. La alta estabilidad de estos compuestos les hace especialmente persistentes en el medio ambiente, donde pueden permanecer prácticamente inalterados durante siglos.

Los compuestos nitroaromáticos y sus productos de condensación se pueden adsorber a la superficie de las fases inorgánica y orgánica (humus) del suelo, bien mediante enlaces débiles (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas) o por enlaces covalentes. Posiblemente, este sumidero haya contribuído a paliar la contaminación ambiental por nitroderivados, pero el consumo humano de estos complejos organo-nitrados puede resultar muy peligroso por la alta toxicidad de los nitroaromáticos (el 2,4-dinitrofenol es un desacoplante y los nitrotoluenos causan anemia y hepatitis) o la mutagenicidad de sus derivados aminoaromáticos, como el 2-nitro-4-aminofenol y la 5-nitro-*o*-toluidina, que son carcinogénicos. Algunos compuestos nitroaromáticos no son tóxicos *per se*, sino sus productos de biotransformación (véase Capítulo 17).

El grupo nitro posee la configuración del nitrato y, como éste, posee formas resonantes (Fig. 16.1).

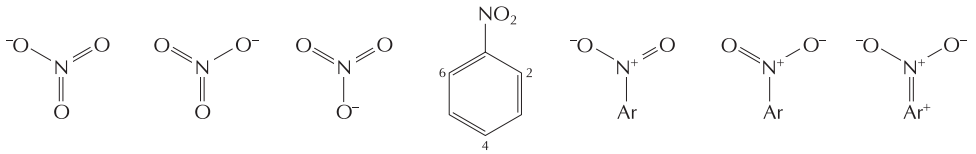


Figura 16.1. Formas resonantes del nitrato (izquierda). Estructura del anillo aromático del nitrobenceno, $C_6H_5-NO_2$ (centro) y de las formas resonantes del grupo nitroaromático (derecha). La carga (+) en el anillo (Ar^+) estaría localizada en los C 2-6 o 4.

La carga positiva sobre los N del grupo $-NO_2$ extrae carga electrónica del anillo aromático, que resulta cargado positivamente, tanto más cuanto mayor sea el número de grupos nitro. La carga positiva del anillo nitroaromático queda además influenciada por la presencia de sustituyentes como el $-CH_3$ (nitrotoluenos), $-OH$ (nitrofenoles), $-COO^-$ (nitrobenzoatos), $-NH_2$ (aminoaromáticos), que pueden aumentar aún más la carga positiva del anillo (halógeno, $C\equiv N$, SO_3H, $N=N-R_2$, COO^-), o a disminuirla ($-CH_3$, $-NH_2$, $-OH$). Por ejemplo, el grupo $-COO^-$ disminuye la carga (–) del anillo en 0,06 unidades.

La presencia de grupos nitro estabiliza a los compuestos nitroaromáticos con relación al ataque electrofílico del dioxígeno, principal agente ambiental activo en

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

los procesos de demolición de compuestos aromáticos naturales o xenobióticos. En su lugar, los seres vivos han desarrollado estrategias de ataque reductivo, bien sobre el propio anillo (derivados Meisenheimer) o sobre los grupos $-NO_2$ (derivados aminoaromáticos), mucho más susceptibles al ataque electrofílico convencional por oxigenasas.

Dado que los compuestos nitroaromáticos son muy resistentes a la degradación tanto por agentes bióticos como abióticos, la eliminación de los excedentes (por ejemplo de explosivos) por incineración es muy costosa y se imponen técnicas de biorremediación *in situ* (mediante inoculación con bacterias autótrofas) o *ex situ* (mediante biorreactores).

16.2. Transformaciones bioquímicas de los compuestos nitroaromáticos

La presencia de N grupos nitros dificulta el ataque oxidativo y favorece el reductivo (Fig. 16.2).

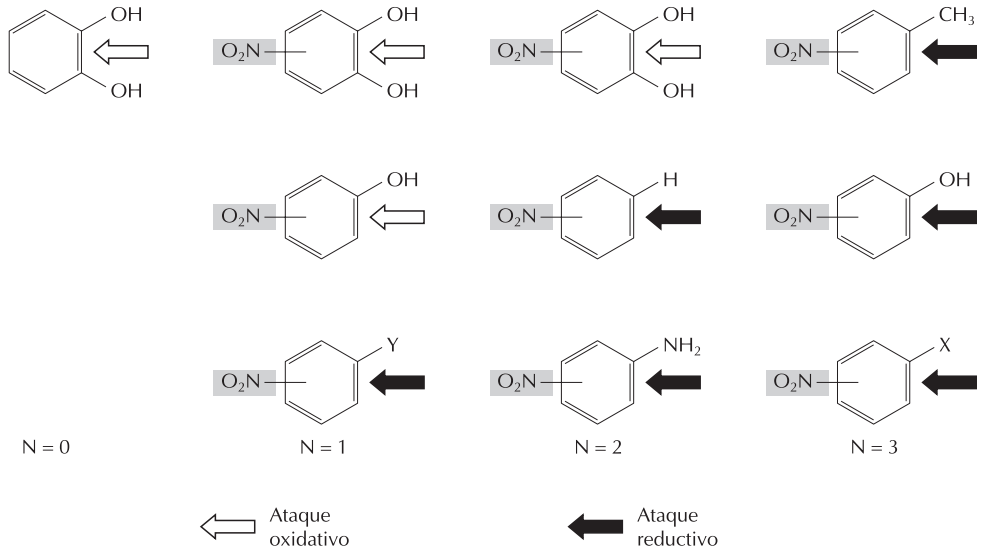


Figura 16.2. La susceptibilidad al ataque reductivo aumenta con el nº de grupos nitro (N), dependiendo del resto de sustituyentes. Cuando N = 3, el ataque es normalmente reductivo (Y: –NHOH, $-CH_3$, –COO; X: cualquier sustituyente $^-$).

Los microrganismos llevan a cabo el ataque oxidativo mediante oxigenasas, que insertan átomos de oxígeno en el anillo, y el reductivo mediante reductasas que transfieren iones hidruros H^- bien al anillo nitroaromático o a los grupos nitro. El ataque oxidativo siempre se lleva a cabo en aerobiosis, mientras que el reductivo puede tener lugar en aerobiosis y anaerobiosis.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

16.2.1. Rutas aeróbicas oxidativas del anillo aromático

Monooxigenasas

Liberan el grupo nitrofenólico directamente como nitrito (Fig. 16.3) o insertan un grupo –OH previamente a la liberación de nitrito (Fig. 16.4).

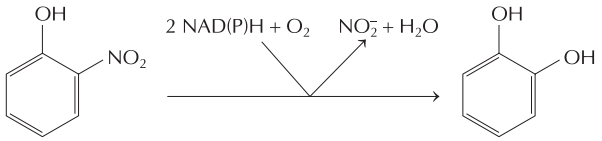


Figura 16.3. Oxidación del *o*-nitrofenol a catecol.

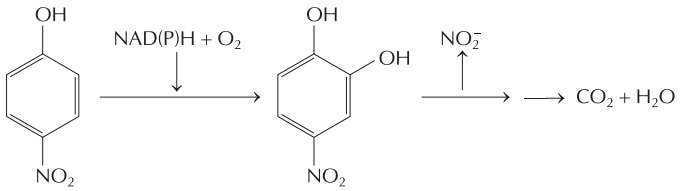


Figura 16.4. Oxidación del *p*-nitrofenol a nitrocatecol y posterior oxidación de éste.

Como se ha visto anteriormente (Capítulo 14) el catecol es un intermediario en la degradación del anillo aromático de origen biológico y se mineraliza a CO_2 y H_2O mediante ruptura *orto* o *meta*.

Dioxigenasas

Producen nitrito a partir de grupos nitrotolueno (Fig. 16.5).

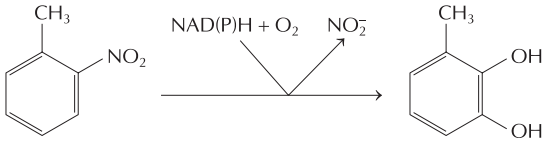


Figura 16.5. Oxidación del *o*-nitrotolueno a metilcatecol.

El *p*-nitrofenol es muy abundante en la naturaleza como resultado de la degradación del plaguicida paratión, muy utilizado en el pasado, y de la síntesis de explosivos. Algunas estirpes de *Flavobacterium* y *Pseudomonas diminuta* poseen paratión hidrolasa y pueden biodegradar este compuesto xenobiótico vía nitrocatecol.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

El nitrito producido en la oxidación del anillo nitroaromático puede ser incorporado al material celular en las bacterias asimiladoras de nitrato (Capítulo 6) mediante su reducción a amonio por la nitrito reductasa:

$$NO_2^- + H^+ + 6\ H \longrightarrow NH_3 + 2\ H_2O$$

16.2.2. Rutas aeróbicas reductivas del anillo aromático

Los sustratos de estas rutas son normalmente polinitroaromáticos, estables frente al ataque del O_2, pero susceptibles de ataques nucleofílicos por parte de iones H^- tanto al grupo $-NO_2$ como al anillo.

Reducción del grupo nitroaromático: nitrorreductasas

La nitrorreductasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas entre las bacterias y los eucariotas, que normalmente utilizan NAD(P)H como dador de electrones. Dada la baja densidad electrónica del anillo nitroaromático existen numerosas enzimas con actividad nitrorreductasa inespecífica, incluso en los cloroplastos.

Las nitrorreductasas bacterianas son de dos tipos:

a) Nitrorreductasas de tipo I, insensibles al O_2, que reducen el grupo NO_2 en etapas sucesivas de 3 pares de e^- formándose los intermediarios nitroso e hidroxilamino (Fig. 16.6).

$$Ar-NO_2 \xrightarrow{2\,e^-} Ar-N=O \xrightarrow{2\,e^-} Ar-HNOH \xrightarrow{2\,e^-} Ar-NH_2$$

Figura 16.6. Reducción secuencial del grupo $-NO_2$. Ar (Anillo aromático).

b) Nitrorreductasas de tipo II: catalizan la transferencia de 1 e^- al grupo nitro con producción de un radical libre aniónico, que reacciona con el O_2 dando $Ar-NO_2$ y anión superóxido O_2^-.

Algunas enzimas bacterianas poseen actividad nitrorreductasa, como la hidrogenasa y la piruvato: ferredoxina óxidorreductasa (PFOR, véase capítulo 4) de *Desulfovibrio*, que reducen el 4,6-diamino-2-nitrotolueno a 2,4,6-triaminotolueno. Por su parte, la CO-deshidrogenasa de la misma bacteria lo reduce sólo parcialmente a 2,4-diamino-2-hidroxilaminotolueno.

La nitrorreductasa de las bacterias entéricas se ha relacionado con el cáncer de colon por la producción de aminas aromáticas mutagénicas a partir de nitrofenoles contaminantes de los alimentos.

Las bacterias entéricas reducen entre otros los nitrofuranos (bactericidas usados desde hace 50 años) a aminofuranos, siendo las estirpes mutantes carentes de nitrorreductasa especialmente resistentes a la mutagénesis por aminoarenos ($Ar-NH_2$).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La reducción del grupo $Ar-NO_2$ a $Ar-NH_2$ restaura en parte la densidad electrónica del anillo y lo desestabiliza propiciando la liberación de amonio y el ataque de las oxigenasas (Fig. 16.7).

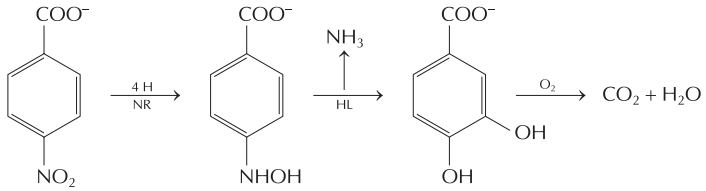


Figura 16.7. Mineralización del 4-nitrobenzoato. Enzimas: NR (nitrorreductasa); HL (hidroxilamino liasa).

En otras ocasiones, el grupo hidroxilamino sufre una reordenación a aminofenol (Fig. 16.8).

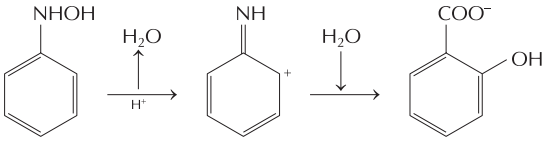


Figura 16.8. Mecanismo del reordenamiento Bamberger.

Los derivados aminoaromáticos se pueden mineralizar por varias vías que implican al catecol o a compuestos aminoalifáticos (Fig. 16.9).

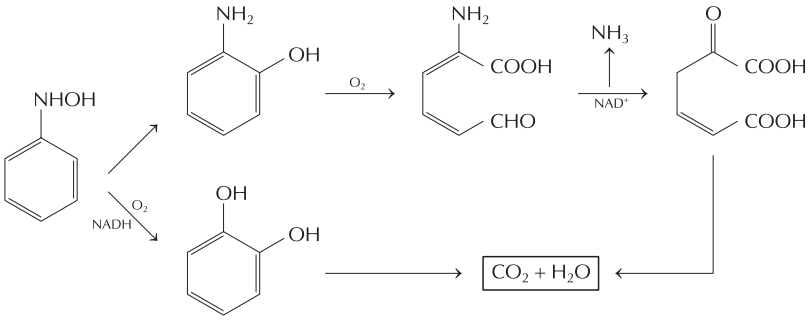


Figura 16.9. Mineralización de derivados hidroxilamino.

Reducción del anillo: hidruro transferasas

El anillo nitroaromático polinitrado (trinitrotolueno, ácido pícrico, dinitrofenol) puede sufrir una degradación reductiva mediante la transferencia de iones hidruro (H^-) a regiones del anillo que poseen densidad de carga positiva (especialmente en la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

posición *orto* (2) y *para* (4) respecto al grupo nitro), debido a la capacidad de éste para retirar e^- π del anillo (Fig. 16.1). Por esta razón, el 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol son más ácidos que el 3-nitrofenol. En la figura 16.10 se muestran las diferentes especies resonantes del trinitrotolueno que, como se observa, es muy susceptible al ataque reductivo mediante un agente nucleofílico (H^-) a las posiciones *m* y *p*.

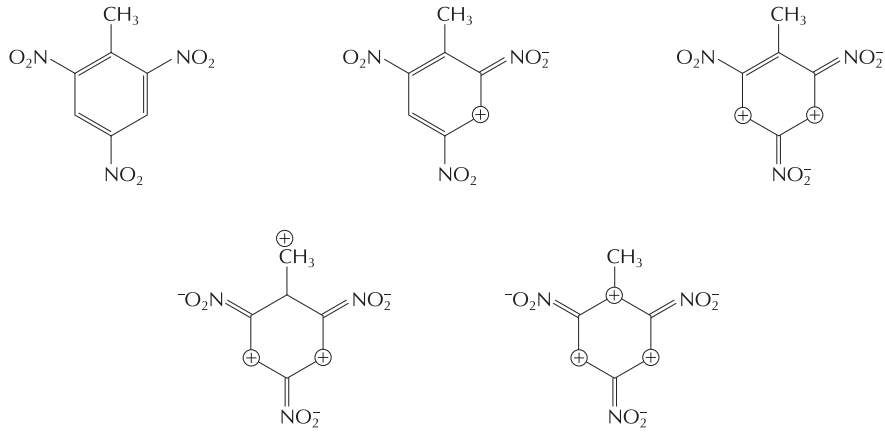


Figura 16.10. Formas resonantes del explosivo trinitrotolueno (TNT).

Las bacterias Gram positivas del género *Rhodococcus* mineralizan los polinitrofenoles (ácido pícrico, 2,4-dinitrofenol) a través de intermediarios como los derivados no aromáticos reducidos del anillo (complejos Meisenheimer) y derivados nitroalifáticos. En *Rhodococcus* sp RB1, la ruta del 2,4-dinitrofenol tiene dos fases:

1. Transferencia de hidruros y formación de derivados hidruro-Meisenheimer (HM): el grupo –OH no atrae e^- del anillo aromático, pero sí los grupos $-NO_2$ y aparecen cargas δ^+ en *meta (m)* (Fig. 16.11).

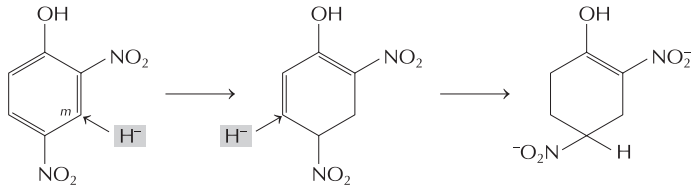


Figura 16.11. Transferencia de 2 H^- al 2,4-dinitrofenol por parte de NAD(P)H-reductasas y formación de 2 derivados HM consecutivos.

   En la ruta del ácido pícrico se han identificado los genes de las reductasas I y II, que utilizan F420 como cofactor rédox, un gen que codifica la tautomerasa del HM y un gen regulador.

2. Liberación de NO_2^- y degradación del anillo (Fig. 16.12).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

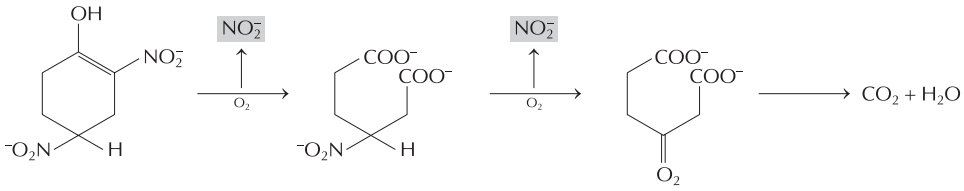


Figura 16.12. Ataque del O_2 y oxidación del 3-nitroadipato (centro). Una posibilidad alternativa es la producción de dinitrohexanoato $-OOC-CH_2-CH_2-CHNO_2-CH_2-CH_2NO_2$ como intermediario.

16.2.3. Rutas anaeróbicas

Los microorganismos anaerobios metabolizan el anillo nitroaromático reduciendo los grupos $-NO_2$ a $-NH_2$ mediante nitrorreductasas que actúan de forma secuencial (a través de intermediarios nitroso e hidroxilamino) o directa (transferencia de 6 e^- y formación del producto $Ar-NH_2$). Este proceso transcurre a bajas concentraciones de O_2, como la reducción de TNT a triaminotolueno, que requiere condiciones de estricta anaerobiosis ($E < -0{,}2$ V).

Cometabolismo del 2,4-dinitrofenol en bacterias fototróficas

Rhodobacter capsulatus es una bacteria que fija N_2 en luz y anaerobiosis, proceso que consume gran cantidad de energía, muy sensible a los desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol. En presencia de este compuesto xenobiótico, *R capsulatus* induce una nitrorreductasa que reduce el grupo 2-nitro a 2-amino formando el derivado 2-amino-4-nitrofenol que ya no es desacoplante, pero sí genotóxico. Para evitar daños al DNA, la bacteria bombea al medio el 2-amino-4-nitrofenol, con una cinética de producción equimolecular con la del consumo del 2,4-dinitrofenol.

Una vez que la mayor parte del 2,4-dinitrofenol se ha reducido a 2-amino-4-nitrofenol, la bacteria reanuda el crecimiento por fijación del N_2 presente en el medio.

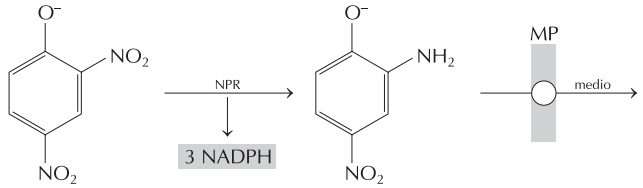


Figura 16.13. Fotorreducción del 2,4-dinitrofenol. NPR (nitrorreductasa); MP (membrana plasmática).

La nitrorreductasa es una NADPH-flavoproteína de 27 kDa, inducible por 2,4-dinitrofenol y ácido pícrico, y que se inactiva por luz azul en ausencia del reductor o del sustrato.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Este proceso es un caso claro de cometabolismo pero que presenta conexiones con el metabolismo del N_2, aunque la nitrorreductasa no pertenece al sistema enzimático de la nitrogenasa, enzima que cataliza la fijación de N_2 (Capítulo 6). El consumo de nitrofenoles y la fijación de N_2 se bloquean en presencia de amonio, una fuente de nitrógeno reducido que disminuye el balance C/N intracelular, pero este control está ausente en los mutantes de *R capsulatus* afectados en los genes que controlan la fijación de N_2 y que obedecen al balance C/N.

Por su parte, las mutaciones que afectan a genes implicados en la transferencia de e^- a la nitrogenasa (que codifican el complejo Rnf de la membrana celular), dificultan la fotorreducción del 2,4-dinitrofenol, por lo que resulta evidente la conexión del cometabolismo del dinitrofenol con la fijación del N_2 (Fig. 16.14).

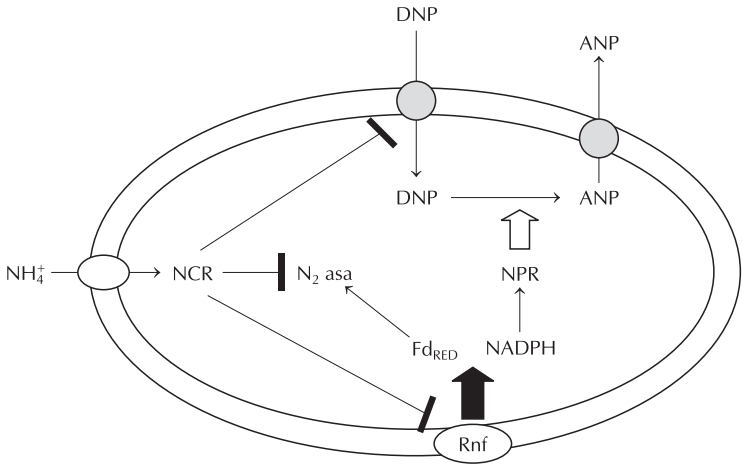


Figura 16.14. Relaciones entre el cometabolismo del dinitrofenol y la fijación de nitrógeno a través del control por el balance C/N. NCR (sistema de represión por catabolito nitrogenado); DNP (2,4-dinitrofenol); ANP (2-amino-4-nitrofenol); N2asa (nitrogenasa); Fd_{RED} (ferredoxina reducida); NPR (2-nitrorreductasa).

La nitrorreductasa de *R capsulatus* puede utilizar diferentes sustratos, como el ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), al que reduce a ácido picrámico (2-amino-4,6-dinitrofenol), que posteriormente se degrada con liberación de nitrito (Fig. 16.15).

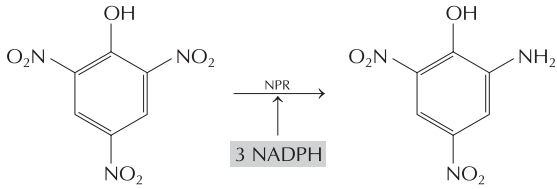


Figura 16.15. Fotorreducción de ácido pícrico (izquierda) a ácido picrámico (derecha). NPR (2-nitrorreductasa).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Rhodobacter capsulatus puede también utilizar mononitrofenoles como el *p*-nitrofenol en condiciones de fotosíntesis microaeróbica, produciendo nitrocatecol como intermediario.

16.3. Metabolismo del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

El TNT es el explosivo por excelencia, tanto de uso civil como militar, que genera en su fabricación residuos difíciles de eliminar y que por sí mismo constituye un problema medioambiental dado que su caducidad lo hace altamente peligroso. Además, su recalcitrancia lo hace muy persistente en áreas donde se dispersa TNT, como en los polígonos de tiro, maniobras militares o zonas en guerra (Europa, Vietnam, Oriente Medio).

La biodegradación de TNT y compuestos relacionados como el ácido pícrico puede utilizarse para el diseño de tecnologías de biorremediación *in situ* (para paliar la contaminación ambiental) y *ex situ* (para eliminar los excedentes mediante biorreactores).

16.3.1. Catabolismo del TNT

Como se ha dicho anteriormente, el TNT posee un anillo aromático altamente desactivado con relación al ataque de las oxigenasas y sólo puede ser objeto de ataques reductivos biológicos o abióticos.

- Catabolismo aeróbico, similar al propuesto para la mineralización de ácido pícrico y 2-Cl-4,6-dinitrofenol en células de *Rhodococcus erythropolis* (Fig. 16.16).
- Catabolismo anaeróbico, catalizado por nitrorreductasas que producen derivados parcial o totalmente reducidos (triaminotolueno) capaces de sufrir una oxidación posterior con liberación de NH_3 y ruptura del anillo.

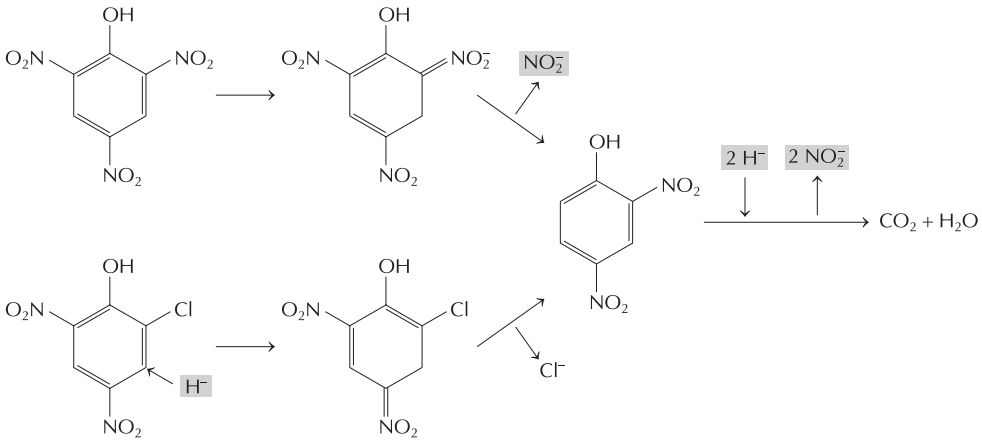


Figura 16.16. Mineralización de ácido pícrico y 2-Cl-dinitrofenol vía 2,4-dinitrofenol.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

También puede ocurrir una reducción abiótica, a partir de donadores de electrones orgánicos, azufrados o ferrosos.

Los grupos $-NO_2$ del TNT difieren por su capacidad atrayente de electrones y la reducción del primer grupo (normalmente en la posición 4) tiene lugar con mucha más facilidad que la del grupo 2-nitro y la del 6-nitro: el primer grupo $-NH_2$ formado disminuye la densidad de carga positiva del anillo al dejar de atraer ya los $e^-\pi$.

El potencial negativo de los grupos nitro del TNT en las posiciones 2, 4 y 6 se ordena como se indica en la figura 16.17.

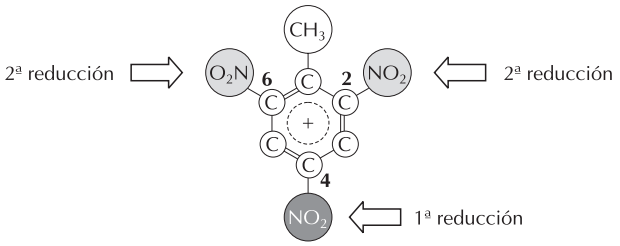


Figura 16.17. Potencial de los grupos $-NO_2$ del TNT (E4 > E2 = E6).

La reducción de los grupos nitro del TNT puede originar 38 productos parcialmente reducidos ($-NO$, $-NHOH$, 1 ó 2 $-NH_2$) y un producto totalmente reducido (3 $-NH_2$). Los derivados $-NO$ y $-NHOH$ se combinan entre sí, dando lugar a polimerizaciones del anillo de tipo azoxi:

$$R1-NO + R2-NHOH \longrightarrow R1-\overset{\overset{O^-}{|}}{\underset{+}{N}}=N-R2$$

La biodegradación del TNT podría llevarse a cabo tanto aeróbica como anaeróbicamente (Fig. 16.18).

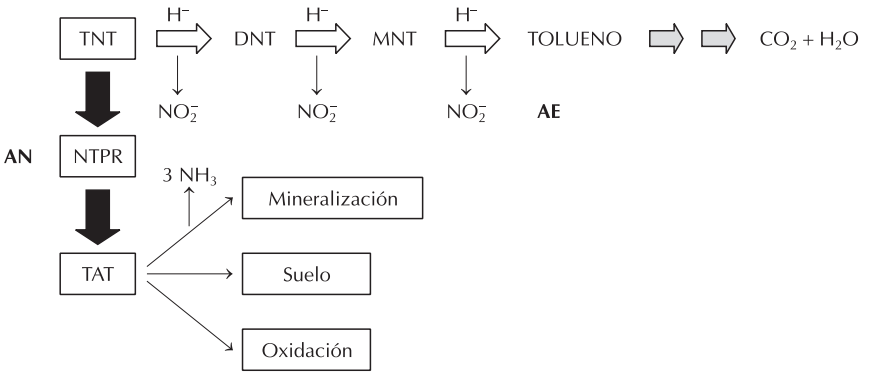


Figura 16.18. Biodegradación de TNT. DNT (dinitrotolueno); MNT (Mononitrotolueno); NTPR (nitrotoluenos parcialmente reducidos); TAT (triaminotolueno); AE (aeróbico); AN (anaeróbico).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

16.3.2. Degradación del TNT en el suelo

El TNT y sus derivados parcialmente reducidos se pueden reducir totalmente a triaminotolueno (TAT) en suelos muy anaeróbicos. Los microorganismos aeróbicos poseen una capacidad limitada para reducir los grupos $Ar-NO_2$ y solamente los anaerobios pueden generar TAT (Fig. 16.19).

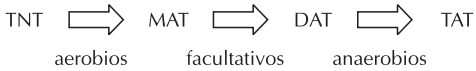


Figura 16.19. Reducción de los grupos nitros del TNT. MAT (monoaminotolueno); DAT (diaminotolueno); TAT (triaminotolueno).

El TAT se une con gran afinidad a las fases polianiónicas hidratadas del suelo (silicatos de aluminio y magnesio), intercalándose entre ellas a través de sus grupos $Ar-NH_3^+$ (Fig. 16.20).

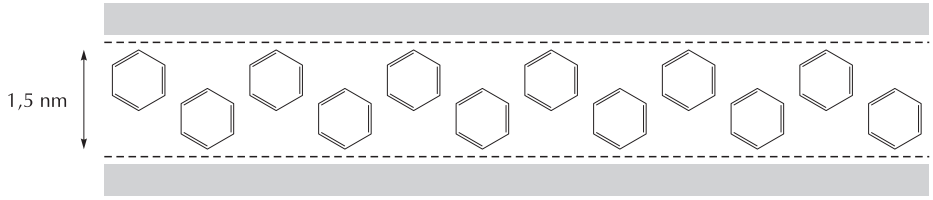


Figura 16.20. Inmovilización de TAT^+ entre bicapas polianiónicas del suelo.

Esta capacidad de fijación de TAT se incrementa si el suelo contiene una fase orgánica ácida (humus) capaz de atraer moléculas básicas, como el TAT, sobre todo teniendo en cuenta la capacidad polimerizante de éste en presencia de O_2, cuyo ataque se facilita por la alta densidad electrónica del anillo poliaminoaromático:

$$nTAT + nO_2 \longrightarrow nTAT^- + O_2^- \longrightarrow \text{poli-TAT}$$

O en presencia de compuestos fenólicos:

$$\text{Lignina} \longrightarrow \text{fenoles} \longrightarrow \text{fenol-TAT (enlaces C–C y C–O)}$$

Este proceso de humificación es aplicable, aunque es más lento, a los diaminotoluenos y las toluidinas procedentes de los dinitro- y mononitrotoluenos.

La biodegradación (mineralización) de los compuestos aminoaromáticos transcurre por desaminación reductiva, para lo cual el compuesto debe ser previamente activado reduciendo la densidad electrónica del anillo:

$$Ar-NH_2 \xrightarrow{CO_2} H_2N-Ar-COO^- \xrightarrow{ATP + CoA} H_2N-Ar-CO-S-CoA \xrightarrow{2\,H}$$
$$\longrightarrow NH_3 + Ar-CO-S-CoA \longrightarrow CO_2 + H_2O$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

16.3.3. Reducción enzimática de nitrotoluenos

Se desconoce la naturaleza de las enzimas reductoras de TNT aunque podrían estar implicadas la hidrogenasa y las ferredoxinas. La etapa limitante en la reducción de TNT a TAT es la reducción del 2,4-diamino-6-nitrotolueno, DANT (véase Fig. 16.21). En *Clostridium pasteurianum* y *C thermoaceticum* se transfieren 4 e^- a partir de CO ó H_2 y los 2 e^- restantes quizá por la sulfito reductasa:

$$\text{DANT} \xrightarrow{\text{CODH, Hasa}} \text{2-hidroxilamino-diaminotolueno} \xrightarrow{\text{SiR}} \text{TAT}$$

Figura 16.21. Enzimas implicadas en la reducción de aminotoluenos. DANT (2,4-diamino-6-nitrotolueno); CODH (CO deshidrogenasa); Hasa (hidrogenasa); SiR (sulfito reductasa).

16.3.4. Asimilación anaeróbica de nitrotoluenos

La estirpe JLR11 de *Pseudomonas* degrada TNT anaeróbicamente por una ruta que asimila el 85% del nitrógeno nitroaromático. La transferencia de electrones al TNT tiene lugar mediante una enzima de membrana y genera fuerza motriz de protones y ATP. La degradación anaeróbica del TNT tiene varias ramas, en una de las cuales el grupo metilo se oxida a –COOH, formándose 2-nitro-4-hidroxibenzoato y *p*-hidroxibenzoato (Fig. 16.22).

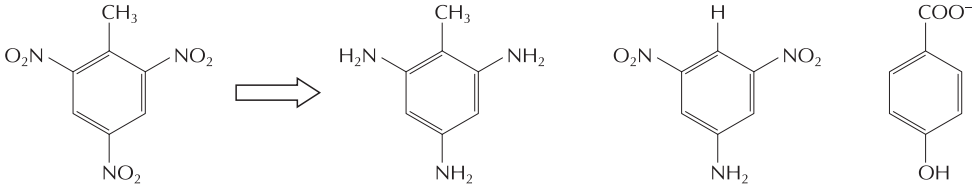


Figura 16.22. Metabolitos anaerobios del TNT en bacterias. El TAT se puede metabolizar a tolueno, *p*-cresol y metilfloroglucinol.

16.4. Metabolismo de hidrocarburos nitroaromáticos policíclicos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados (Nitro-PAHs) se producen al reaccionar los PAHs con óxidos de nitrógeno y por combustión incompleta de combustibles fósiles, estando presentes en el carbón, aceite pesado, humo de tabaco y tinta de fotocopiadoras (Fig. 16.23).

La biodegradación de los Nitro-PAH se lleva a cabo de forma similar a la de los nitroaromáticos monocíclicos, bien a través de nitrorreductasas bacterianas, de monooxigenasas que producen óxidos de nitroareno y derivados fenólicos y de dioxigenasas que producen dihidrodioles (véase capítulo 17) (Fig. 16.24).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

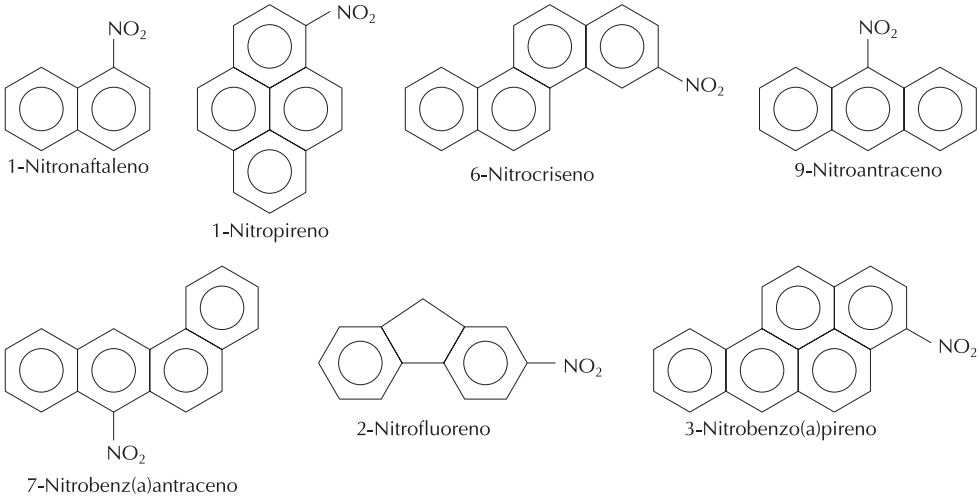


Figura 16.23. Hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados.

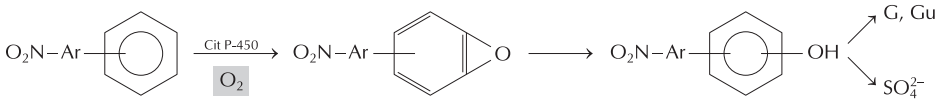


Figura 16.24. Degradación de Nitro-PAH por el hongo *Cunninghamella elegans*. Ar (anillo aromático); Cit P-450 (citocromo P-450); G (glucosa); GU (glucuronato).

16.5. Biotecnología de los compuestos nitroaromáticos

16.5.1. Biotecnologías terapéuticas

Terapias antibacterianas

La reducción de compuestos nitroaromáticos a aminas aromáticas mediante nitrorreductasas conlleva riesgos ambientales evidentes teniendo en cuenta que los $Ar-NH_2$ se transforman en agentes mutagénicos derivados de las hidroxilaminas y que las Ar–NHOH oxidan la hemoglobina a methemoglobina (HFe^{3+}) y atacan además a la propia globina. La actividad nitrorreductasa de las bacterias anaerobias es 500 veces mayor que la de las células eucarióticas, por lo que los nitroderivados son mucho más mutagénicos en las primeras y tienen un alto potencial para el tratamiento de infecciones parasitarias (nitrofuranos).

Terapias anticancerosas

En los eucariotas, los mutágenos derivados de las nitrorreductasas son cancerígenos al acumularse mutaciones en tejidos especialmente susceptibles, como el epitelio del colon.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

A pesar de este riesgo, las nitrorreductasas bacterianas se utilizan en la tecnología ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) para el tratamiento de tumores. Está basada en la reacción entre un antígeno específico de tumor (Ag–TUM) y su anticuerpo (Ac–TUM) al que va unida covalentemente una nitrorreductasa bacteriana (NR) (Fig. 16.25).

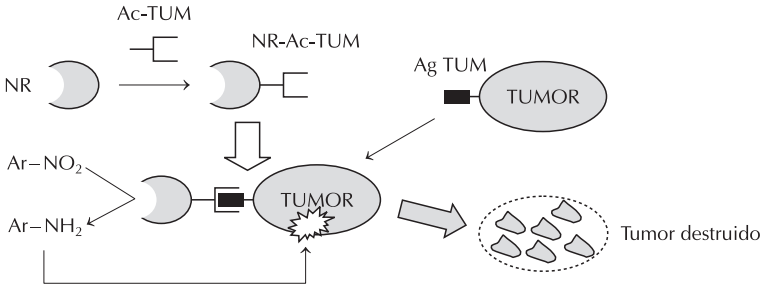


Figura 16.25. Destrucción selectiva de un tumor mediante tecnología ADEPT.

El tratamiento del tumor con un compuesto $Ar–NO_2$ produce una arilamina ($Ar–NH_2$) localizada en el tumor en el que desencadena una mutagénesis masiva y un proceso de autodestrucción por apoptosis.

16.5.2. Biorremediación de nitroaromáticos

Tratamientos *ex situ* (biorreactores)

El tratamiento biológico de compuestos nitroaromáticos en biorreactores tiene sentido en el caso de la eliminación de explosivos como el TNT y el ácido pícrico. La solubilidad del TNT en agua es relativamente alta (125 ppm a 25 °C), por lo que las fábricas de explosivos generan grandes volúmenes de aguas contaminadas (una sola factoría produce hasta 2,5 m^3 por día). Por otra parte, el lavado continuo del TNT a partir de terrenos contaminados por prácticas militares ha contaminado las aguas subterráneas con cantidades de este compuesto xenobiótico que oscilan entre 10 g por kilogramo de suelo y 100 ppm en las aguas.

La cantidad de TNT permitida por la EPA en el agua de bebida tiene como límite cantidades 1.000 veces menores que las citadas, por lo que se han diseñado diferentes técnicas para eliminar el TNT, como biorreactores con lodos activados, compostaje, etc., aunque el proceso de eliminación es muy complejo y se desconocen los productos finales y su toxicidad.

a) Biorreactores anaerobios.

   La estirpe JLR11 de *Pseudomonas*, aislada de una planta de tratamiento de aguas, se ha utilizado para eliminar anaeróbicamente TNT con glucosa como cosustrato. El sistema permitió la eliminación de 0,6 micromoles de TNT por día y mg de proteína celular, completando el tratamiento en un 99% a lo largo

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de 20 días. El sobrenadante del tratamiento contenía entre un 10 y un 15% de aminas aromáticas, formadas posiblemente como consecuencia de la respiración anaeróbica del TNT, y el 85% del N se incorporó a la biomasa celular (Patente Nacional P9700733). Las condiciones anaeróbicas impidieron la producción de derivados azoxinitrotolueno, que necesitan O_2 como sustrato (véase sección 16.3.1).

Otra estrategia consiste en utilizar consorcios de microorganismos para eliminar compuestos nitroaromáticos como el dinoseb (2-*sec*-butil-4,6-dinitrofenol) y el TNT o nitroalifáticos como la trimetilennitramina (RDX) y la 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX). En concreto, se ha utilizado un consorcio de bacterias anaerobias para limpiar completamente suelos contaminados con TNT, RDX y HMX a concentraciones de 12.000, 3.000 y 300 ppm, respectivamente. Los compuestos xenobióticos se transformaron en derivados mineralizables y no tóxicos y en los cocultivos se detectaron estirpes de *Clostridium*, que degradan el TNT por una ruta reductiva (Fig. 16.26).

$$\text{TNT} \longrightarrow \text{TAT} \longrightarrow \text{Tolueno} + 3\ NH_3 \text{ o Trihidroxitolueno} + 3\ NH_3$$

Figura 16.26. Biodegradación anaerobia de TNT.

b) Biorreactores aerobios.

Otro tipo de tratamientos están basados en hongos ligninolíticos del suelo, que utilizan las mismas enzimas para degradar contaminantes aromáticos que para la lignina, y de ahí su idoneidad para el tratamiento de suelos contaminados con mezclas complejas de compuestos xenobióticos. Además, el sistema ligninolítico no se induce por el contaminante aromático, sino por la carencia de otros nutrientes y por tanto sigue actuando aún después de haber disminuído la concentración del xenobiótico. Por último, el sistema degradativo es extracelular, por lo que puede actuar sobre compuestos xenobióticos tóxicos para otros microorganismos, contribuyendo a mantener el equilibrio de las comunidades microbianas en el suelo.

Dada la toxicidad del TNT en los hongos, basada en la producción de radicales aniónicos ($R-NO_2^{\bullet -}$) y especies reactivas del oxígeno, se debe aumentar en lo posible la masa micelial del biorreactor, que degrada el TNT mediante un proceso bifásico, rápido al principio (minutos) y más lento después (horas), hasta eliminar totalmente el contaminante con producción de intermediarios aminonitrados. La eliminación de grandes cantidades de TNT (de 0,1 a 1 g kg^{-1}) requiere entre dos semanas y 3 meses, con eliminación del 20% del TNT como CO_2.

La actividad peroxidasa del hongo puede producir a partir de TNT metabolitos reducidos (aminonitrotoluenos) y oxidados, degradándose estos últimos a CO_2 (Fig. 16.27).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

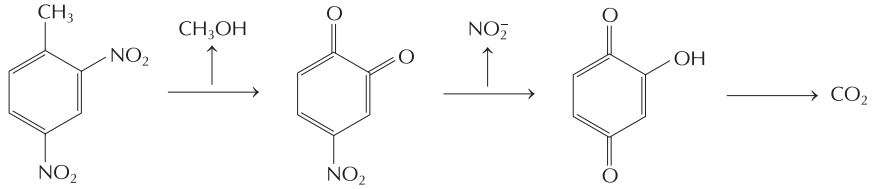


Figura 16.27. Biodegradación de 2,4-dinitrotolueno por el hongo *Phanerochaete chrisosporium*.

Expansión vertical de rutas catabólicas

Como se vio en el Capítulo 14, la expansión vertical de rutas catabólicas consiste en la construcción de una ruta catabólica que mineraliza completamente un compuesto xenobiótico a partir de una ruta incompleta preexistente mediante la transferencia de plásmidos modificados por ingeniería génica. Por su parte, una ruta catabólica se puede expandir horizontalmente ampliando el rango de especificidad de una enzima catabólica preexistente.

De esta forma se ha estudiado el catabolismo del 3- y 4-nitrotolueno utilizando la tolueno monooxigenasa del plásmido TOL de *Pseudomonas putida*, observándose que estos compuestos se oxidan a los correspondientes nitrobenzilalcoholes y nitrobenzoaldehídos con una efectividad relativamente alta. Además, el 2- y el 4-nitrotolueno son efectores que activan al regulador XylR (véase Capítulo 14).

Para la degradación del TNT se ha abordado una aproximación experimental consistente en la utilización de un organismo autóctono, capaz de degradar el TNT a tolueno, como recipiente de un plásmido capaz de degradar el tolueno (TOL), con lo que la bacteria recombinante podría utilizarse en biorreactores para degradar TNT (Fig. 16.28).

$$\text{TNR} \xrightarrow{3\,H^+} \text{Complejos Meisenheimer} \longrightarrow \text{tolueno} + 3\,NO_2^-$$

$$\text{Tolueno} \xrightarrow{\text{TOL}} CO_2 + H_2O$$

Figura 16.28. Mineralización de TNT mediante una estirpe híbrida de *Pseudomonas*.

No obstante, esta estrategia ha producido sólo resultados parcialmente esperanzadores ya que si bien la estirpe híbrida utiliza TNT como fuente de carbono y nitrógeno, se producen metabolitos finales indeseados como aminonitrotoluenos y derivados azoxi.

Tratamientos *in situ*. Biodegradación de TNT en suelos

Para evitar la incineración, única forma hasta la fecha de eliminar completamente los excedentes de TNT, se han planificado tratamientos biológicos basados en el compostaje, la biodegradación aeróbica mediante rutas ligninolíticas de hongos

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

(muy limitadas por el límite de toxicidad hacia el hongo, < 100 μM) y tecnologías de fangos activados, alguno de los cuales se ha revelado efectivo desde un punto de vista práctico.

La biomineralización del TNT se puede plantear mediante lavado previo del suelo seguido de un tratamiento secuencial anaerobio/aerobio, bien sobre TNT eliminado del suelo por lavado o sobre una suspensión de suelo contaminado. Estas tecnologías no evitan dos problemas: la formación aerobia de derivados azoxi y la fijación del TAT a la fase orgánica del suelo (Fig. 16.29).

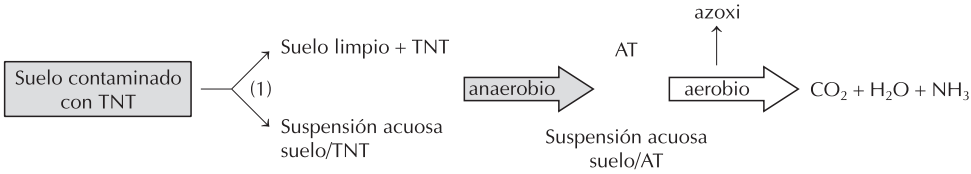


Figura 16.29. Biorremediación de suelos altamente contaminados con TNT. (1): lavado con alcohol. AT (aminonitrotoluenos, triaminotolueno).

Bibliografía

Blasco, R., Moore, E., Wray, V., Pieper, D., Timmis K., Castillo, F. (1999). "3-nitroadipate, a metabolic intermediate for mineralization of 2,4-dinitrophenol by a new strain of a *Rhodococcus* species". *J. Bacteriol.*, 181, 149-152.

Esteve-Núñez, A., Caballero, A., Ramos, J. L. (2001). "Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 335-352.

G. Heiss, G., Knackmuss, H. J. (2002). "Bioelimination of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization". *Curr. Op. Microbiol.*, 5, 282-287.

Hofmann, K. W., Knackmuss, H. J., Heiss, G. (2004). "Nitrite elimination and Hydrolytic ring cleavaje in 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) degradation". *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2854-2860.

Spain, J. (1995). "Biodegradation of nitroaromatic compounds". *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 523-555.

Spain, J. (ed.) (1995). *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Environmental Science Research*. Vol 48. Plenum Press.

Ye, J., Singh, A., Ward, O. P. (2004). "Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics". *World Journal of Microbiology and Biotecnology*, 20: 117-135.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 17
BIOTRANSFORMACIÓN

Glosario
17.1. Biodegradación en plantas y animales: biotransformación
17.2. Fase I: El sistema P450
17.2.1. Introducción
17.2.2. Evolución de los citocromos P450
17.2.3. Características moleculares de los citocromos P450
17.2.4. Mecanismo de reacción del citocromo P450
Ciclo catalítico del citocromo P450
Termodinámica de la reacción de hidroxilación
Cadenas de transporte de electrones en los citocromos P450
17.2.5. Reacciones catalizadas por los citocromos P450
17.2.6. Funciones fisiológicas de los citocromos P450
Metabolismo de compuestos endógenos
Metabolismo de compuestos exógenos
Control de las actividades P450 en los animales
Toxicidad de los citocromos P450
Inhibición de los citocromos P450
17.3. Fase II: conjugasas
17.4. Biotransformación y carcinogénesis
17.5. Biotransformación en plantas. El concepto de hígado verde
17.6. Interferidores hormonales
17.6.1. Plaguicidas e interferencia hormonal
Actividad estrogénica
Actividad antiandrogénica
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Biotransformación: Proceso por el que un compuesto xenobiótico es modificado químicamente y excretado por un organismo animal o almacenado por un organismo vegetal.

Eicosanoides: Grupo de compuestos derivados de ácidos grasos de 20 carbonos, que desempeñan funciones de control en tejidos animales.

Eón: Período de tiempo correspondiente a 10^9 años.

Explosión Cámbrica: Aparición y expansión de las modernas especies de animales y plantas.

Gen supresor de tumores: Gen cuya mutación supone una pérdida de función que contribuye a generar tumores.

Giberelinas: Hormonas vegetales del grupo de los diterpenos tetracíclicos que controlan el crecimiento y desarrollo.

Factor de transcripción: Proteína que se une al DNA y que regula la transcripción de determinados genes.

Fitoalexinas: Metabolitos secundarios de plantas que poseen actividad antimicrobiana (camalexina, resveratrol) así como propiedades farmacológicas.

Inducción enzimática: Proceso por el que el gen que codifica una enzima se activa y se expresa, aumentando la concentración y la actividad de ésta.

Microsomas: Partículas subcelulares membranosas obtenidas a partir del retículo endotelial hepático.

Nucleófilo: Reactivo químico ávido de cargas positivas.

Soret: Banda de absorción de los citocromos alrededor de los 420 nm.

Polimorfismo: Variantes que presenta un gen entre la población debido a diferencias de secuencias en el DNA.

Prostanoides: Véase eicosanoides.

Compuestos xenobióticos: Sustancias químicas producidas de forma abiótica.

Xenoestrógenos: Sustancias exógenas con actividad de hormonas femeninas (estrogénica).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

17.1. Biodegradación en plantas y animales: biotransformación

Los mecanismos bioquímicos de bioeliminación de tóxicos se cuentan con toda seguridad entre los más antiguos en la evolución de las rutas metabólicas ya que se encuentran en toda la escala biológica, desde las bacterias más primitivas hasta los seres humanos.

En los eucariotas superiores, plantas y animales, la biodegradación de compuestos potencialmente tóxicos (hormonas, neurotransmisores) o tóxicos de por sí, ya sean o no xenobióticos, está basada en una serie de rutas oxidativas, reductivas o hidrolíticas que modifican químicamente el compuesto y lo preparan para su posterior eliminación a través de diferentes vías secretoras o excretoras. Este doble proceso se denomina biotransformación y tiene lugar en el hígado, u órgano equivalente, en organismos animales (Fig. 17.1).

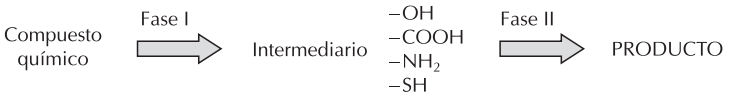


Figura 17.1. Biotransformación en animales.

Durante la Fase I, el compuesto parental, inocuo o tóxico, se modifica químicamente por hidroxilación, carboxilación, aminación o sulfuración. El intermediario resultante, usualmente tóxico, se conjuga durante la Fase II con grupos SO_4^{2-}, glucuronato, aminoacilo o metilo y se elimina por vía renal o intestinal.

El objetivo de ambas fases es disminuir la hidrofobicidad del producto, ya que su excreción depende de los transportadores catónicos o aniónicos de los túbulos renales. En este sentido, un compuesto xenobiótico cargado puede ser rápidamente excretado sin necesidad de la biotransformación, como sucede con el herbicida aniónico 2,4-diclorofenoxiacetato.

La biotransformación tiene diferentes efectos sobre los compuestos químicos:

a) Inactivación: un medicamento activo se desactiva durante la Fase I, se solubiliza durante la Fase II y se elimina. En este caso, la biotransformación es una fase clave del tratamiento al que limita en el tiempo.
b) Activación: un compuesto inactivo o poco activo (plaguicida, fármaco) se activa durante la Fase I y produce un efecto determinado, que cesa al eliminarse el metabolito activo durante la Fase II.
c) Continuación de efecto: un compuesto activo (heroína) se transforma en otro igualmente activo (morfina), o bien aumenta su actividad.
d) Intoxicación: un compuesto no tóxico se transforma en un metabolito tóxico. La toxicidad puede deberse a varias causas, como alterar la función de las proteínas (receptores, hemoglobina) o del DNA (mutágeno carcinogénico).

Algunos compuestos especialmente recalcitrantes a la biodegradación bacteriana en el medio ambiente (DDT) también lo son para los mecanismos de bio-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

transformación, que están basados en enzimas y rutas metabólicas similares. En este caso, el compuesto o sus derivados escapan de la Fase II, se acumulan en los tejidos animales lipofílicos y pasan a la cadena trófica donde su concentración puede aumentar en varios órdenes de magnitud. Así, en los peces se pueden acumular plaguicidas a lo largo de días (aldrina, lindano), meses (clordano) o años (DDT y DDE).

17.2. Fase I: El citocromo P450

17.2.1. Introducción

El citocromo P450 (CYP) es una monooxigenasa que cataliza muchas de las reacciones de biodegradación en bacterias y hongos y de biotransformación en plantas y todo tipo de animales, además de participar en numerosas rutas biosintéticas en animales y vegetales. Los CYP catalizan la Fase I de la biotransformación, estrechamente acoplados a las enzimas de la Fase II.

En realidad, se trata de una compleja serie de familias de citocromos atípicos porque el 5º ligando del Fe es un anión tiolato. Esto confiere a los CYP la propiedad de ceder densidad electrónica al O_2 originado especies reactivas del oxígeno (ROS) capaces de insertar un átomo de oxígeno en un sustrato apropiado.

Los CYP catalizan multitud de procesos como el metabolismo de ácidos grasos, prostanoides, esteroides, vitaminas D, ácidos biliares, alcaloides, terpenos, fitoalexinas, giberelinas, así como en la destoxificación de plaguicidas, fármacos, herbicidas, carcinógenos y xenobióticos en general y en la activación metabólica de carcinógenos y generación de ROS. Por esta razón, la investigación sobre los CYP abarca las áreas de la Microbiología, Farmacología, Toxicología, Bioquímica, Biotecnología, Ciencias Ambientales, Fisiología Animal y Vegetal y Química.

Hasta un total de 200.000 compuestos químicos pueden ser metabolizados por más de 120 familias de CYP, entre las que se han aislado y caracterizado más de 1.200 enzimas P450 diferentes. Las más importantes son los CYP 1-11 (animales), 51-66 (hongos), 71-100 (plantas) y 101-120 (bacterias). En una especie individual de mamífero puede haber unos 50 CYPs diferentes.

El citocromo P450 se descubrió en 1958 debido a la banda de absorción Soret atípica (a 450 nm) de su derivado CO-hemocromo, que le confiere un vivo color amarillo (Fig. 17.2).

En los animales, los CYP se encuentran en los microsomas hepáticos y en las mitocondrias. Los CYP microsomales son poco específicos y responsables de procesos de biotransformación mientras que los mitocondriales son más específicos y catalizan procesos biosintéticos. En el hígado constituyen un 1-2% del peso del hepatocito, pero también se expresan en otros tejidos como riñón, próstata, gónadas, mama, piel, cerebro, pulmones, páncreas y tubo digestivo. Al estar situados en una estructura membranal fluida se facilita la difusión de los sustratos lipídicos de los CYP.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

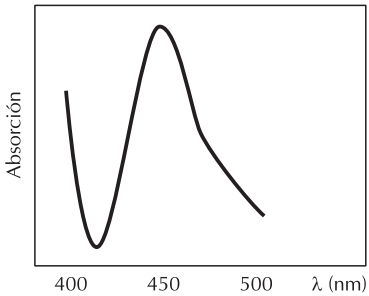


Figura 17.2. Espectro de absorción del complejo CO-citocromo P450.

17.2.2. Evolución de los citocromos P450

La superfamilia CYP se encuentra en todos los tipos celulares, a excepción de *E. coli* y grupos bacterianos considerados muy primitivos, y su árbol evolutivo coincide con el de las bacterias (incluidas las hipertermófilas), plantas, hongos y animales, por lo que debió debió aparecer hace más de 3 eones. La transformación de la atmósfera reductora en oxidante hace unos 2 eones aceleró la evolución de los organismos multicelulares gracias a la disposición de un sustrato, el O_2, capaz de impulsar gran cantidad de reacciones metabólicas y la evolución de los CYP desde un papel ancestral desintoxicante del O_2.

Con la aparición de los modernos organismos pluricelulares, hace 0,5 eones, y la colonización del medio terrestre a lo largo de Devónico, los CYP derivaron desde su función metabólica a la de biotransformación de compuestos químicos producidos por hongos y plantas (fitoalexinas, flavonoides, etc.), tóxicos para algunos organismos (sobre todo herbívoros). El sistema es tan eficaz que ha sobrevivido a las extinciones masivas que sobrevienen en la biosfera cada 0,145 eones debido a los ciclos de expansión y contracción de las placas tectónicas, como la extinción Pérmico-Triásica (formación de Pangea, 0,25 eones) y Cretácico-Terciario (0,065 eones).

La secuenciación de los genes *cyp* ha permitido elaborar dendrogramas evolutivos en los que se pueden distinguir las principales diversificaciones de la evolución biológica:

a) CYP eucariotas-procariotas (1,4 eones), ejemplificado en la comparación de los CYP bacteriano-mitocondrial y microsómico:

$$\text{Mitocondrias: NAD(P)H} \longrightarrow \text{FAD} \longrightarrow \text{FeS} \longrightarrow \text{CYP}$$

$$\text{Microsomas: NAD(P)H} \longrightarrow \text{FMN/FAD} \longrightarrow \text{CYP}$$

La evolución de los CYP ha impuesto la sustitución de la redoxina (FeS, $E^o \approx -0{,}3$ V) por la conexión directa FAD-CYP: los E^o de los CYP oscilan entre –0,4 V y +0,4 V debido a la versatilidad que introduce el ligando tiolato y el entorno del grupo hemo.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

b) CYP microsómico-mitocondrial (1 eón): separación plantas-animales y reproducción sexual (los CYP mitocondriales catalizan la síntesis de hormonas sexuales).

c) CYP esteroidogénico-biotransformante (0,5 eones): explosión Cámbrica con aparición de animales de gran peso.

Otros episodios marcan la especiación secuencial de los CYP, como la ocupación del medio terrestre (0,4 eones, 50% de la pO_2 actual), la radiación de aves y angiospermas que promueve la biotransformación de tóxicos vegetales (0,17 eones), la aparición de mamíferos placentarios cuyo ciclo se debe al metabolismo del estradiol (0,12 eones) y la radiación de especies de mamíferos incluidos los primates (0,1 eones, pO_2 actual).

Por otra parte, la evolución de los homínidos transcurre paralela a la diversificación de los CYP humanos de acuerdo con los cambios dietarios y socioculturales.

En definitiva, los CYP han evolucionado desde un papel desintoxicante de O_2 a un papel procesador de sustratos endógenos (esteroides, ácidos grasos, prostanoides y eicosanoides) (ciertos ácidos grasos han podido formar el molde para la construcción del superciclo esteroide) para pasar a sustentar la coevolución planta (CYP que sintetiza toxina)-animal (CYP que degrada esta toxina) y terminar con la bioeliminación de fármacos y xenobióticos a lo largo de los últimos 100 años.

17.2.3. Características moleculares de los citocromos P450

Los genes *cyp* se agrupan en familias (40% de similitud): de mamíferos (15 familias y 29 subfamilias), de insectos (7 familias), de moluscos (2 familias), de nemátodos (12 familias), de plantas (30 familias), de hongos (16 familias) y de bacterias (50 familias).

La nomenclatura CYP incluye la familia y la subfamilia (55% de similitud): la rata tiene las familias CYP2A, 2B, 2C, 2D y 2E, y la 2A las subfamilias 2A1, 2 A2 y 2A3. Los humanos poseen las mismas familias, pero diferentes subfamilias: la 2A posee las 2A6, 2A7 y 2A13.

17.2.4. Mecanismo de reacción del citocromo P450

Los CYP catalizan multitud de reacciones, entre las que la actividad monooxigenasa está muy bien caracterizada:

$$R-H + O_2 + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow R-OH + H_2O$$

El poder reductor lo suministra el NAD(P)H y se necesita para reducir un átomo de oxígeno [O] a H_2O. La transferencia electrónica no es directa y requiere siempre una flavoproteína y, opcionalmente, una proteína sulfoférrica (redoxina) o el citocromo b_5.

La transferencia de e^- al O_2 se realiza en dos etapas monoelectrónicas (Fig. 17.3).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

$$O_2 + H^+ + e^- \longrightarrow \overset{HSO}{HO_2\bullet} \longleftrightarrow \overset{SO}{O_2^-\bullet} + H^+ \qquad HO_2\bullet + H^* + e^- \longrightarrow \overset{PH}{H_2O_2} \longleftrightarrow \overset{PH}{HO_2^-} + H^+$$

Figura 17.3. Formación de especies reactivas del O_2 (ROS): HSO (radical hidrosuperóxido); SO (radical superóxido); PH (peróxido de hidrógeno); HP (hidroperóxido).

El O_2 es un ácido π deficitario de e^-, el superóxido es un potente nucleófilo y una base fuerte y el hidroperóxido, un nucleófilo potente pero débilmente básico.

El O_2 es una especie química poco reactiva que se inestabiliza al adquirir e^-: la longitud del enlace aumenta desde 1,2 Å (O_2) a 1,32 Å ($O_2\bullet$) y 1,49 Å, y la energía de enlace disminuye desde 497 a 276 y 146 kJ mol^{-1}, respectivamente. La distribución de los e^- π de antienlace no favorece la reactividad del O_2 a menos que reciba 1 e^- (Fig. 17.4).

$$O_2^{\uparrow\uparrow} \xrightarrow{e^-} O_2^{\uparrow\downarrow\uparrow} \quad \text{superóxido}$$

Figura 17.4. Configuración de los e^- π de antienlace del O_2 (izquierda)y del superóxido (derecha).

La etapa de oxigenación requiere la rotura del enlace HO–OH, muy debilitado por la transferencia electrónica, con formación del radical hidroxilo altamente reactivo:

$$H_2O_2 \longrightarrow 2\ HO\bullet \text{ (radical hidroxilo)}$$

Un radical HO• reacciona con el sustrato R–H y lo hidroxila:

$$HO\bullet + R{-}H \longrightarrow H\bullet + R{-}OH$$

El otro radical HO• se combina con H• y se produce agua:

$$H\bullet + HO\bullet \longrightarrow H_2O$$

Un segundo mecanismo de reacción implicaría una ruptura concertada del HO–OH y una posible transferencia de H^- por parte de R–H a uno de los radicales hidroxilo.

El ligando tiolato en el complejo Hemo–Fe^{2+}..... $^-$S–CYP transfiere carga (–) al O_2 de forma controlada para evitar la formación de ROS. En las hemoglobinas el hemo está unido por un ligando histidina y no tiolato, por lo que el O_2 se une de forma reversible y no se reduce.

La unión del sustrato R–H aumenta la eficacia catalítica modificando la estructura de la proteína, como sucede con la hidroxilación del alcanfor por *Pseudomonas putida* por CYP101 (Fig. 17.5).

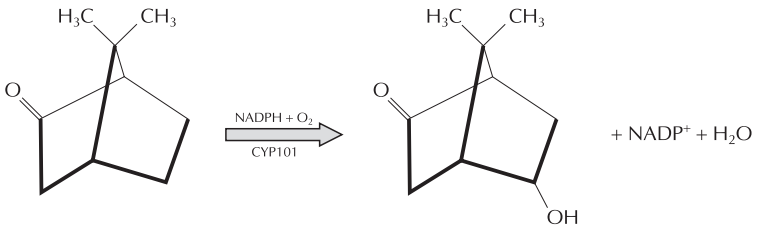


Figura 17.5. Hidroxilación del alcanfor a 5-*exo*-alcohol por CYP101.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En un complejo octaédrico de $Fe^{2+/3+}$ (hemo), la unión de un ligando hace que los 5 orbitales 3d se separen en dos grupos de diferentes energías (Δ). Los e^- tienden a estar en orbitales separados y con espín paralelo. Para aparearlos (↑↓) se requiere una energía (*P*) (Fig. 17.6).

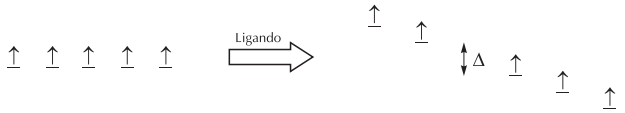


Figura 17.6. Separación de los orbitales 3d del Fe^{3+} en presencia de un ligando del hemo.

Si Δ < *P*, se forma un complejo de **alto espín** (la mayor parte de los e^- desapareados):

Los 5 orbitales se semillenan (cada uno con 1 e^-) en el Fe^{3+}. En el Fe^{2+}, el orbital de menor energía contiene el 6º e^- desapareado con el que ya había.

Si Δ > P, se forma un complejo de **bajo espín** (la mayor parte de los e^- apareados):

Los 5 e^- del Fe^{3+} ocupan los 3 orbitales de menor energía, llenando el 1º y el 2º y semillenando el 3º: ↑↓ ↑↓ ↑.

En el Fe^{2+}, los 6 e^- se aparean en los 3 orbitales de menor energía: ↑↓ ↑↓ ↑↓.

Ambos tipos de complejos se diferencian en la geometría: el $Fe^{2+/3+}$ de bajo espín tiene un diámetro de 1,91 Å y se intercala entre los 4 N hemínicos (2,02 Å). El $Fe^{2+/3+}$ de alto espín es mayor (2,06 Å) y no cabe en ese espacio: el Fe se eleva desde 0,3 Å a 0,7 Å sobre el plano (Fig. 17.7).

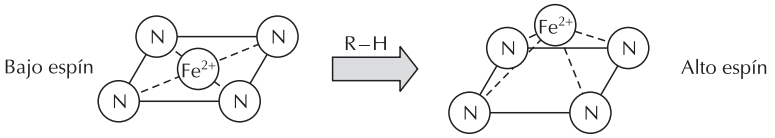


Figura 17.7. Cambio de espín del complejo hemínico en el CYP101. R-H (alcanfor).

La consecuencia de este cambio de geometría es clave para la reacción de hidroxilación: el potencial rédox (E^o) del Fe disminuye desde –0,303 V a –0,173 V, con lo que la transferencia de electrones desde la putidaredoxina (E^o = –0,24 V) se lleva a cabo de forma espontánea (ΔG^o = –12,5 kJ). Con el E^o original la reacción no sería espontánea (ΔG^o = +6 kJ).

Ciclo catalítico del citocromo P450

La figura 17.8 presenta el ciclo de reacción del CYP 101.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

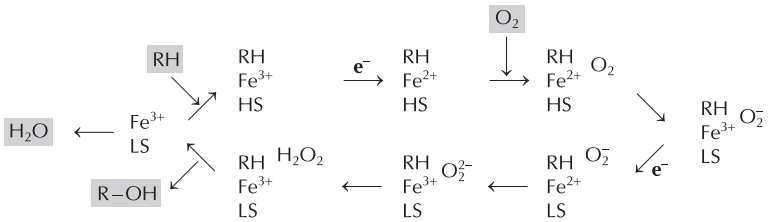


Figura 17.8. Mecanismo de reacción del CYP101. LS (bajo espín); HS (alto espín).

La constante de disociación del CYP101 por el O_2 es muy alta ($Kd = 0{,}6\ \mu$ M) debido a la gran afinidad entre el O_2 (deficiente de e^-) y el Fe^{2+} (rico en e^- y de alto espín), pero aún es mayor la afinidad del CYP–Fe^{2+} por el CO ($Kd = 0{,}1\ \mu$ M), lo que origina la banda de absorción de los CYP a 450 nm.

Termodinámica de la reacción de hidroxilación

La reacción de hidroxilación es espontánea:

$$\text{Ciclohexano} + O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow \text{Ciclohexanol} + H_2O \qquad \Delta G^o = -384{,}2\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Sin embargo, esta reacción es lenta para los CYP de mamíferos, debido a la alta energía de activación para la rotura del enlace C–H (418 kJ mol^{-1}). CYP disminuye este valor entre 50 y 80 kJ mol^{-1} gracias a la activación del O_2 mediante su reducción a H–O–O–H: la transferencia de e^- es ligeramente favorable porque el E^o del par $O_2/O_2^{-\bullet}$ es –0,16 V (frente a –0,17 V del Fe de bajo espín), y todavía más favorable la reducción a H_2O_2 ($E^o = +0{,}38$ V).

Cadenas de transporte de electrones en los citocromos P450

Los CYP reciben los e^- de una cadena de transportadores electrónicos que incluye siempre flavoproteínas y, a veces, proteínas sulfoférricas:

A) Mitocondrias.

La cadena de transporte e^- de CYP es independiente de la cadena respiratoria e incluye una flavoproteína de 50,7 kDa unida a la membrana mitocondrial interna, una proteína sulfoférrica 2 Fe2S de 12,5 kDa que forma un dímero débilmente unido a la membrana y el propio CYP. Los CYP bacterianos son similares, con excepción del CYP BM3 de *Bacillus megatherium* que carece de la proteína FeS (Fig. 17.9).

B) Retículo endoplásmico

Esta cadena de transporte es exclusivamente eucariota y carece de la proteína FeS. En este caso la flavoproteína CYP-reductasa posee 1 FMN y un FAD. Un donador de electrones alternativo para CYP es otro citocromo de la membrana

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

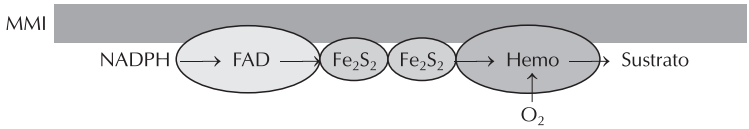


Figura 17.9. Cadena de transporte de electrones al CYP mitocondrial. MMI (membrana mitocondrial interna).

mitocondrial interna, el citocromo b_5, reducible por la propia CYP-reductasa o por la cit b_5 reductasa (Fig. 17.10).

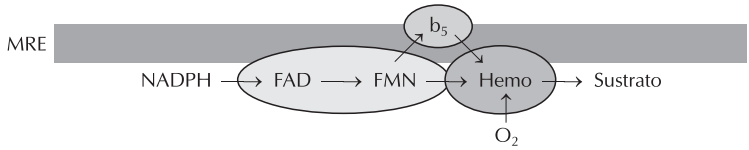


Figura 17.10. Cadena de transporte de electrones al CYP citosólico. MRE (membrana del retículo endoplásmico).

17.2.5. Reacciones catalizadas por los citocromos P450

La figura 17.11 muestra algunas reacciones catalizadas por los CYP.

17.2.6. Funciones fisiológicas de los citocromos P450

Metabolismo de compuestos endógenos

En organismos no animales, la principal función de los CYP es la metabolización de sustratos endógenos. En los animales, los CYP participan en la síntesis de hormonas esteroides y en el metabolismo de los eicosanoides, ácidos grasos y vitamina D pero principalmente catalizan la Fase I de la biotransformación. Estos CYP biotransformantes también atacan sustratos endógenos como el grupo hemo y las hormonas esteroides (testosterona).

A) Citocromos P450 de plantas

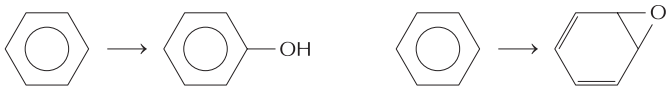
Participan en el metabolismo de fenilpropanoides (ligninas, pigmentos, moléculas de defensa), terpenoides (esteroides, hormonas, moléculas de defensa, aromas), ácidos grasos (cutina, suberina, moléculas de defensa) y otros sustratos (arginina, opioides, xenobióticos). Es interesante hacer notar el papel de los CYP de plantas en la síntesis de moléculas de defensa como los derivados de las cumarinas (psoraleno sintasa). El 8-metoxipsoraleno es una furocumarina producida por especies de *Heracleum* que irrita severamente la piel humana irradiada por luz UV. Los estilbenoides son más de 300 compuestos que poseen acción antifúngica y que se sintetizan como respuesta

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Hidroxilaciones alifáticas:

$$R-CH_2-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-CH_2-OH \quad \text{ó} \quad R-CHOH-CH_3$$

Hidroxilaciones y epoxidaciones aromáticas:



Epoxidaciones alifáticas:

$$R-CH=CH-R' \longrightarrow R-\overset{\diagup\,O\,\diagdown}{CH-CH}-R'$$

Eliminación de grupos alquilo:

$$R-CH_2-NH-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-NH-CH_2-OH \longrightarrow R-CH_2-NH_2 + HCHO$$
$$R-CH_2-O-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-O-CH_2-OH \longrightarrow R-CH_2-OH + HCHO$$
$$R-CH_2-S-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-S-CH_2-OH \longrightarrow R-CH_2-S^- + HCHO$$

Oxidaciones:

$$R-CH_2-NH_2 \longrightarrow R-CH_2-NH-OH$$
$$R-CH_2-NH-CH_3 \longrightarrow R-CH_2-NOH-CH_3$$
$$R-CH_2-S-CH_2-R' \longrightarrow R-CH_2-SO-CH_2-R'$$

Reducciones:

$$Ar-NO_2 \longrightarrow Ar-NH_2$$

Deshalogenaciones:

$$F_3C-CHBrCl \longrightarrow F_3C-COOH + HCl + HBr$$

Hidrólisis:

$$R-O-CO-CH_3 \longrightarrow R-OH + CH_3-COOH$$

Figura 17.11. Principales tipos de reacciones catalizadas por los CYP.

al ataque por insectos, como el *Pinus radiata* atacado por la avispa *Sarix*. El resveratrol es otro estilbenoide fitoalexínico presente en las uvas y cuya presencia en el vino da cuenta de su actividad antioxidante y antitumoral (Fig. 17.12).

El papel de los CYP como enzimas biosintéticas/biotransformantes se pone de manifiesto si se considera que muchos de estos compuestos de defensa de plantas se sintetizan por CYP de plantas y son biotransformados por CYP de animales, como el CYP6B1 de la mariposa *Papilio plyxenes* que defiende al insecto contra la toxicidad de la xhantotoxina (8-metoxipsoraleno). Los CYP de plantas también poseen un papel biotransformante (sección 17.4).

Los hongos y las levaduras también sintetizan cumarinas tóxicas (aflatoxina). El procoagulante warfarina es una cumarina sintética, potente raticida.

Otra muestra de la coevolución planta (toxina producida por CYP) –animal fitófago (CYP biotransformante) son ciertas flavonas y terpenoides producidos por CYP de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

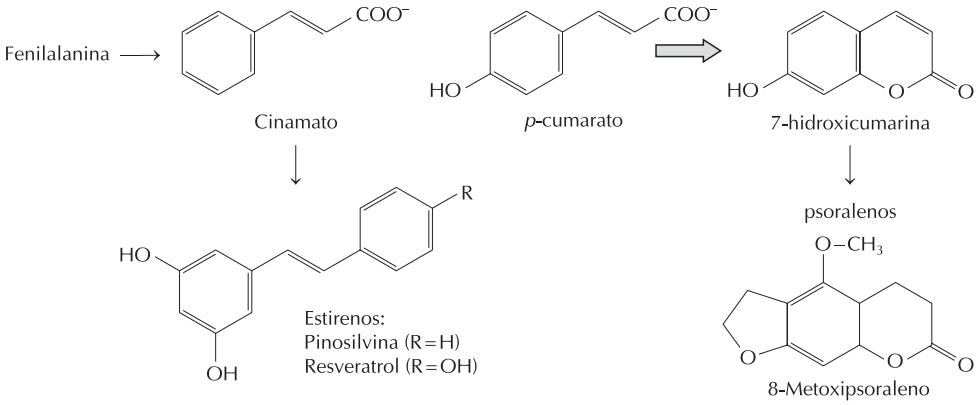


Figura 17.12. Rutas de síntesis de compuestos químicos de defensa de las plantas.

plantas. Algunas flavonas poseen una débil actividad estrogénica y otras son inhibidores de los CYP, por lo que podrían tener actividad antipredadora. La fitoecdisona es una fitoalexina terpenoide que altera el desarrollo de los insectos y el sesquiterpeno jubaviona posee actividad de hormona juvenil de insectos (véase capítulo 7).

Los CYP de plantas son también claves en el metabolismo de hormonas como las auxinas (la indol hidroxilasa es el CYP71C1) y las giberelinas (la kaureno hidroxilasa es el CYP 88).

B) Citocromos P450 de animales

En los mamíferos, una de las principales funciones de los CYP es la síntesis de hormonas esteroides derivadas del colesterol, terpenoide formado a partir del escualeno en una ruta común que en hongos conduce al ergosterol y en animales al colesterol.

Los CYP catalizan reacciones clave en la síntesis de hormonas esteroideas, como la ruptura de la cadena isoprenoide del colesterol (20-22 liasa o SCC) (Fig. 17.13).

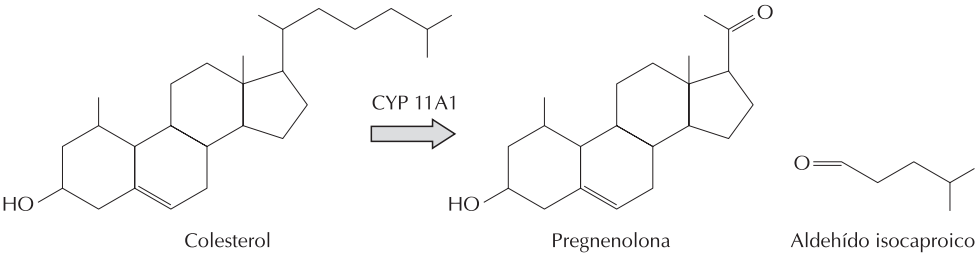


Figura 17.13. Actividad 20-22 liasa del CYP 11A1.

Otra reacción interesante catalizada por los CYP es la aromatización de la testosterona/androstendiona a estradiol/estrona (aromatasa) (Fig. 17.14).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

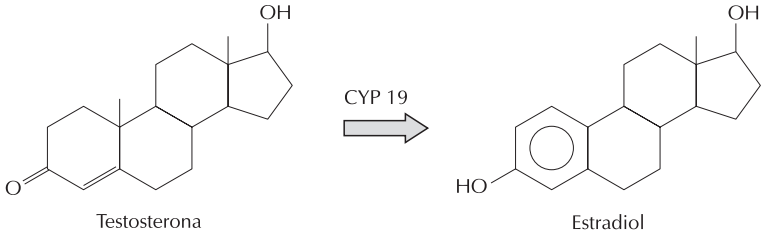


Figura 17.14. Actividad aromatasa de CYP 19.

En los mamíferos, los CYP se encuentran en diversos tejidos y pueden ser microsómicos o mitocondriales. En la conversión de previtamina D (calciol) en vitamina D (calcitriol) participa un CYP microsómico hepático (CYP 27) y otro CYP mitocondrial del riñón.

Metabolismo de compuestos exógenos

Los CYP oxidan compuestos lipofílicos de la dieta, fármacos, drogas y contaminantes ambientales de origen industrial. Dada su amplia especificidad, un CYP puede actuar sobre diversos sustratos y un sustrato puede ser modificado por varios CYP en diferentes puntos (Fig. 17.15).

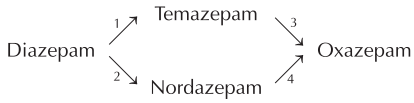


Figura 17.15. Metabolismo del ansiolítico diazepam. 1 y 4 (hidroxilación por CYP3A4); 2 y 3 (N-desmetilación por CYP2C19).

Por lo que se refiere a los fármacos, CYP3A4 metaboliza el 50%, CYP2D6 el 20%, CYP2C9 y CYP2C19 el 15% y CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 y otros CYP el 15% restante. Si un sustrato es modificable por varios CYP, los productos formados pueden variar entre diferentes individuos debido a los polimorfismos observados de los genes *cyp* entre la población.

Las diferentes familias y subfamilias de CYP se inducen en presencia de compuestos xenobióticos que pueden ser o no sustratos de las mismas. Así, CYP1A1, A2 y B1 se inducen por hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) y sus derivados nitrogenados así como por contaminantes ambientales (la tetracloro-dibenzo-p-dioxina es un potente inductor de CYP1A1). Estos inductores son sustratos para los CYP que inducen, excepto las dioxinas, muy estables frente al ataque oxidativo por la abundancia de Cl en el anillo (véase Capítulo 15). Esto se debe a que la capacidad de inducción depende de la interacción sustrato-proteína inductora del gen *cyp* y la catálisis enzimática depende de la interacción sustrato-CYP (véase más adelante).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Como ya se ha dicho con anterioridad, algunas reacciones catalizadas por los CYP en mamíferos pueden activar sustratos inocuos, desactivar sustratos activos o no modificar la actividad del sustrato (Figs. 17.16, 17.17, 17.18 y 17.19).

1. Inactivación.

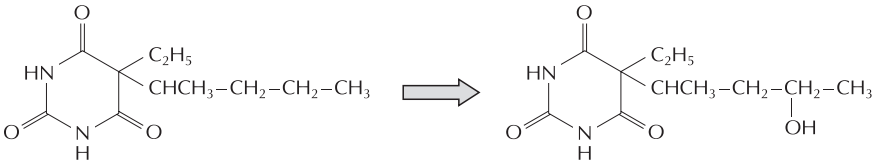


Figura 17.16. La hidroxilación alifática del ansiolítico pentobarbital inactiva a este fármaco posibilitando la transitoriedad de su acción farmacológica.

2. Activación.

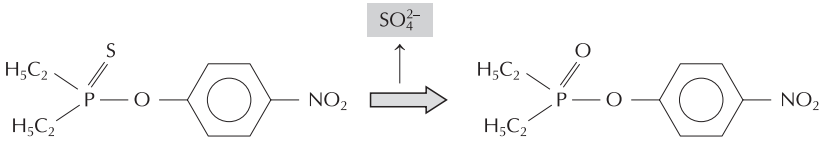


Figura 17.17. La S-oxidación del plaguicida paratión produce paraoxona, un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa de insectos.

3. Continuación de efecto.

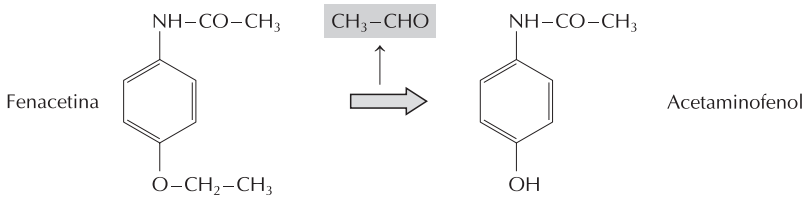


Figura 17.18. La *O*-desalquilación del analgésico fenacetina produce acetaminofenol, también analgésico, pero potencialmente tóxico si el grupo –OH se oxida a C=O: la NAPQI, *p*-benzoquinoneimina, reacciona con las proteínas celulares y es letal para el hígado (Fig. 17.24).

4. Intoxicación.

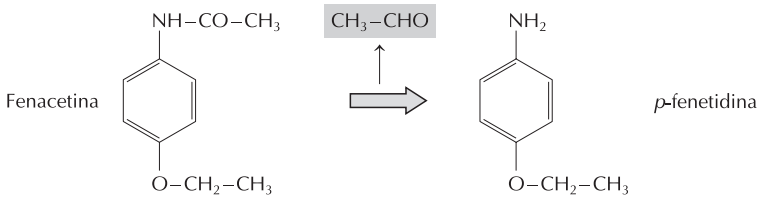


Figura 17.19. La *N*-desalquilación del analgésico fenacetina produce *p*-fenetidina, sin actividad analgésica pero tóxica (produce methemoglobinemia).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la tabla 17.1 se expone un listado de sustratos para las diferentes familias CYP de mamíferos.

Tabla 17.1. Sustratos preferentes de CYP de mamíferos.

CYP1A	CYP2B	CYP2C	CYP2D	CYP2E
Benzo(a)pireno	Cumarinas	Diazepam	Debrisoquina	Halotano
Dibenzoantraceno	Antipirina	Hexobarbital	Metoprolol	4-Nitrofenol
Cafeína	Benzfetamina	Natroxen	Bufuralol	Cl_4C
Teofilina	Cocaína	Ibuprofeno	Codeína	Paracetamol
Estradiol	Nicotina	Fenitoína	Propanolol	Anilina
Metilcolantreno	Fenobarbital	Tolbutamida	Amitriptilina	Piridina
Naftoflavona	Cloranfenicol	Warfarina	Chlorpromazina	Acetona
Fenacetina	DDT	Diclofenaco	Levopromazina	Etanol
Tacrina	Heptachlor	S-Mefenitoína	Yohimbina	Benceno
Paracetamol	Metoxichlor	R-Mefobarbital	Citalopram	Acetonitrilo

El alcohol (etanol) se puede oxidar a acetaldehído por una vía alternativa, la alcohol deshidrogenasa, que actúa en los casos en que la ingestión de alcohol es escasa. El CYP2E1 microsómico se induce cuando la ingestión es elevada. Posteriormente, la aldehído oxidasa oxida el acetaldehído a acetato y éste se oxida a CO_2 o se utiliza para la síntesis de grasa hepática. El CYP2E1 también oxida el acetaminofenol a NAPQI (Fig. 17.24).

Otras reacciones del metabolismo animal de xenobióticos y metabolitos secundarios de origen vegetal se exponen en el capítulo 7.

Control de las actividades P450 en los animales

Los diferentes CYP presentan variaciones muy significativas en cuanto a su concentración, oscilando entre 100 veces (CYP1A1) y 20 veces (CYP2E1) aunque la variación puede ser de hasta 1.000 veces en el caso de CYP2D6.

La concentración de los CYP depende de la expresión de los genes CYP, que está bajo el control de diferentes factores de transcripción. La expresión de los CYP1 depende de un receptor citosólico de hidrocarburos arílicos (AhR) y una proteína que activa su translocación al núcleo (ARNT).

El receptor AhR pertenece a la familia génica PAS de factores de transcripción nucleares y se une con una gran afinidad al xenobiótico TCCD (véase capítulo 15), un contaminante ambiental con actividad carcinogénica (Fig. 17.20).

La expresión de CYP2 requiere otro tipo de factor de transcripción, en este caso relacionado con la superfamilia del receptor de esteroides, como los receptores de androstanol y androstenol CAR (para la inducción de CYP2B) y de ácido retinoico RXR (para la inducción de CYP2C). En concreto, el receptor CAR une fenobarbital y forma un heterodímero con el receptor RXR que activa la transcripción del gen *cyp2B*.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

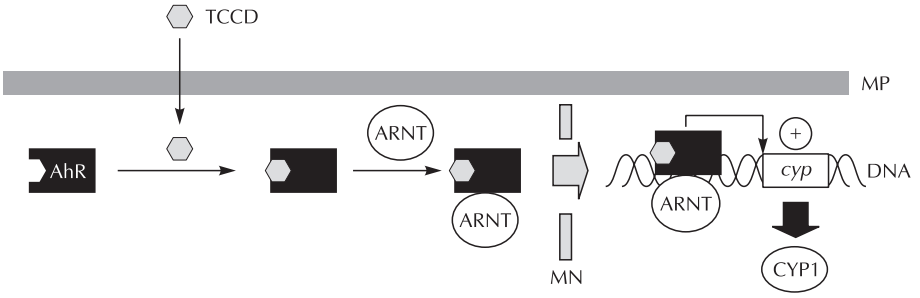


Figura 17.20. Inducción de CYP por TCCD mediante el factor de transcripción AhR. MP(membrana plasmática); MN (Membrana nuclear); *cyp* (gen que codifica CYPA1; CYP1 (proteína CYPA1); AhR (Receptor de hidrocarburos aromáticos); ARNT (translocador nuclear de AhR).

Por su parte, la expresión de CYP3A requiere el receptor PXR, que se une a esteroides de 21 carbonos como el 5α-pregnano-2,3-diona y cuyo correceptor es también RXR. El PXR se une a la carbamazepina (un fármaco anticonvulsivo), la rifampicina (un antituberculoso) y a ciertos compuestos químicos de herboristería (St. John's wort). El CYP3A4 es particularmente importante porque metaboliza el 50% de los fármacos de prescripción.

Otro receptor importante es el que activa la proliferación de peroxisomas (PPARα), cuyos ligandos naturales son ácidos grasos y eicosanoides (leucotrienos), pero que se une también a fármacos hipolipidémicos y ftalatos plastificantes. Este receptor forma heterodímeros con RXR e induce CYP4A en roedores, pero no en humanos.

El carácter inducible de los CYP influye en los tratamientos farmacológicos y puede tener consecuencias adversas si se generan metabolitos tóxicos. Así, el tratamiento con rifampicina induce el CYP3A4, que metaboliza el etinil estradiol e inutiliza este tratamiento anticonceptivo.

Toxicidad de los citocromos P450

Puede deberse a la formación de metabolitos tóxicos como la paraoxona (inhibidor de la acetil colinesterasa), NAPQI (genotóxico) o las especies reactivas del O_2 (intermediarios en el mecanismo de catálisis de los CYP). Estas últimas se producen especialmente por CYP2E y promueven enfermedades degenerativas, cáncer y envejecimiento.

La toxicidad de la inducción de los CYP se debe sobre todo a los efectos carcinogénicos mediados por los CYP1 y CYP2E. Los sustratos e inductores de CYP1 son los PAHs planos sin grupos sustituyentes (benzopireno) o con grupos –Cl y $-NO_2$, aunque en este caso se dificulta el ataque oxidativo. No obstante, se han detectado epóxidos nitroaromáticos en la degradación microbiana de los Nitro-PAHs cuyos derivados hidroxi se combinan con hexosas, glucuronato y sulfato (véase sección 17.3).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Inhibición de los citocromos P450

Los CYP se inhiben por agentes químicos que poseen constantes de inhibición muy pequeñas (< 1 μM) y que actúan a concentraciones muy bajas. Entre ellos están los ligandos del hierro hemínico CO, NO y CN^-, cuya capacidad como aceptores π es varias veces superior a la del O_2. Otros ligandos del hemo son compuestos orgánicos que poseen O ó N con pares de electrones sin compartir, como la quinolina, furano, benzimidazol, piridina, imidazol, pirazol, etc. Otros inhibidores interaccionan con el grupo hemo previa activación por el propio CYP (por ejemplo, el derivado nitroso de la orfenandrina). Por último, los iones metálicos como el Cd^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} ó Mn^{2+} pueden inhibir los CYP debido a la competición con el Fe^{2+} para unirse al hemo.

17.3. Fase II: conjugasas

Los metabolitos producidos por CYP se eliminan mediante su conjugación con un compuesto hidrofílico catalizada por enzimas microsómicas (Figs. 17.21, 17.22 y 17.23).

1. Glucuronización.

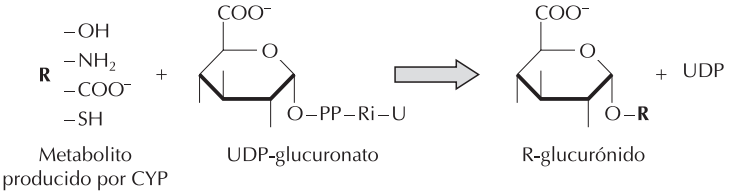


Figura 17.21. Conjugación de metabolitos de CYP con glucuronato. R (metabolito de la Fase I); PP (pirofosfato); Ri (ribosa); U (uracilo).

2. Sulfatación.

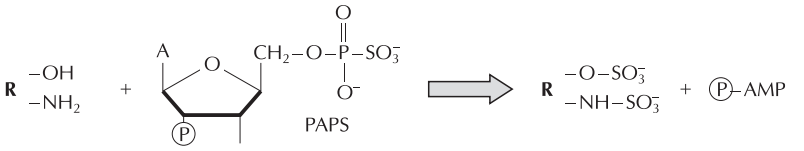


Figura 17.22. Conjugación de metabolitos de CYP con sulfato. R (metabolito de la Fase I); A (adenina); El donador de $-SO_3^{2-}$ es el P-adenosín-P-sulfato (PAPS).

3. Transpeptidación.

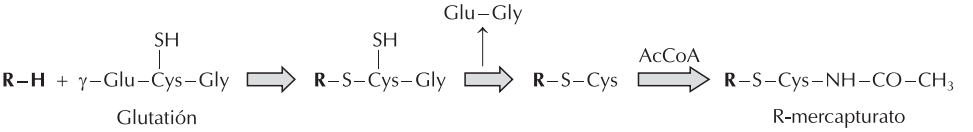


Figura 17.23. Conjugación con glutatión reducido. R (metabolito de la Fase I).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

La biotransformación de la fenacetina por O-desalquilación produce acetaminofenol, que se elimina vía glucurónido o sulfato. Como se vio anteriormente, CYP2E1 metaboliza el acetaminofenol a un derivado altamente reactivo, la *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina, que debe eliminarse mediante conjugación con glutatión reducido. Si la concentración de CYP2E1 aumenta como consecuencia de su inducción por etanol o si hay una deficiencia en glutatión, la NAPQI reacciona con las proteínas y causa un grave daño hepático (Fig. 17.24).

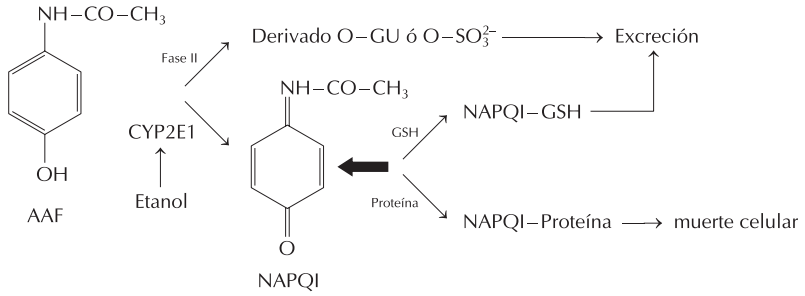


Figura 17.24. Toxicidad producida por el acetaminofenol en ausencia de la Fase II o por ingestión excesiva de alcohol. AAF (acetaminofenol); NAPQI (*N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina); GU (glucuronato); GSH (glutation reducido).

4. Otras reacciones de la Fase II (Fig. 17.25).

– Amidación: $R-COO^- \xrightarrow[ATP]{CoA-SH} R-CO-S-CoA \xrightarrow{Glicina} R-CO-NH-CH_2-COO^- + CoA-SH$

– Acetilación: $R-NH_2 \xrightarrow{Acetil\text{-}CoA} R-NH-CO-CH_3$

– Metilación: $R-SH \xrightarrow{SAM} R-S-CH_3$

Figura 17.25. Otras reacciones de la Fase II. La amidación la sufren metabolitos de la Fase I carboxilados (salicilato); La acetilación la sufren metabolitos aminados (sulfonamidas); La metilación la sufren metabolitos de tipo R–SH, R–OH y R–NH_2; el donador de grupos metilo es la S-adenosilmetionina (SAM).

17.4. Biotransformación y carcinogénesis

La actividad CYP hidroxilasa de hidrocarburos arílicos (aromáticos) genera epóxidos muy reactivos capaces de formar, mediante procesos no enzimáticos, derivados de las bases nitrogenadas del DNA. Estos derivados son muy voluminosos y generan mutaciones cuando el DNA se duplica, por lo que son potencialmente cancerígenos si se afectan genes clave en el control de la proliferación celular (oncogenes y genes supresores de tumores).

Así, el benzo(a)pireno, un contaminante procedente de la industria y de las combustiones, que no es tóxico *per se*, se transforma en un epóxido dihidrodiol por acción del CYP1A1 (Fig. 17.26).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

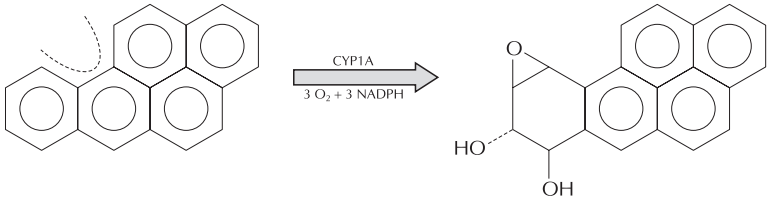


Figura 17.26. Formación de 7,8-dihidroxi-9,10-epóxido del benzo(a)pireno. El epóxido se forma preferentemente en la zona marcada por la curva discontinua.

Una vez formado el epóxido, puede ser atacado químicamente por nucleófilos potentes (R′–X**:**) o débiles (R″–X**:**) mediante mecanismos de sustitución nucleofílica del tipo S_N2 ó S_N1, respectivamente (Fig. 17.27).

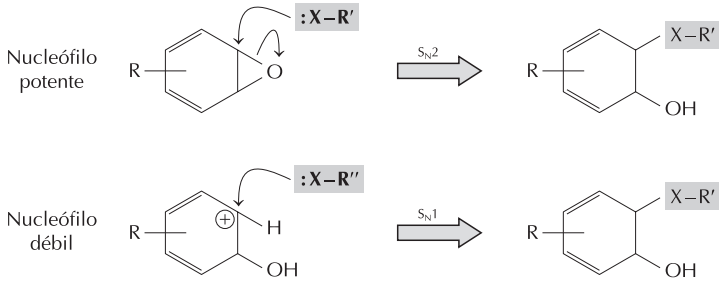


Figura 17.27. Formación de derivados mediante reacciones de los aril-epóxidos con nucleófilos (X–R′ y X–R″).

En las células, estos nucleófilos pueden ser los grupos $-NH_2$ o el N7 de las bases nitrogenadas del DNA. Uno de los carcinógenos hepáticos más potentes es el contaminante alimentario aflatoxina B1, producida por *Aspergillus flavus* (Fig. 17.28).

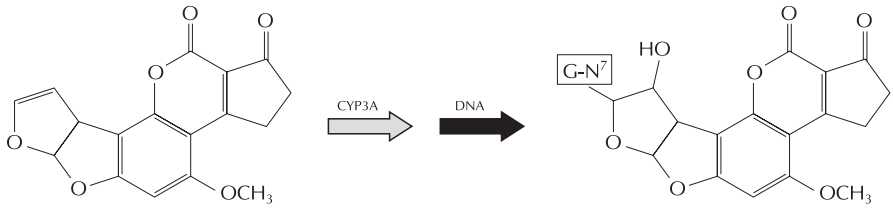


Figura 17.28. Formación del derivado carcinogénico de la aflatoxina B1. G–N^7 (N^7 de la guanina).

17.5. Biodegradación en plantas. El concepto de hígado verde

Dado el tamaño de la biomasa vegetal, es evidente la importancia de las plantas como sumidero de compuestos xenobióticos, sobre todo teniendo en cuenta que el me-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

tabolismo de estos compuestos en las plantas guarda un extraordinario parecido con el de los animales. Esto es hasta tal punto así que a partir de 1977 se ha desarrollado el concepto de "hígado verde" para referirse a este paralelismo metabólico biodegradativo.

En las plantas, el metabolismo de xenobióticos tiene lugar según las fases I y II de la biotransformación, con la diferencia de que los metabolitos resultantes se pueden almacenar en las vacuolas o incorporarse a la pared celular como componentes de la lignina. Así se degrada en las plantas un compuesto xenobiótico tóxico, el pentaclorofenol (Fig. 17.29), que por otra parte puede ser mineralizado por bacterias del suelo como *Sphingomonas chlorophenolica*. En este caso, la ruta catabólica es un mosaico de monooxigenasas y dioxigenasas de baja especificidad reclutadas a partir de rutas degradativas de clorofenoles naturales y aminoácidos aromáticos.

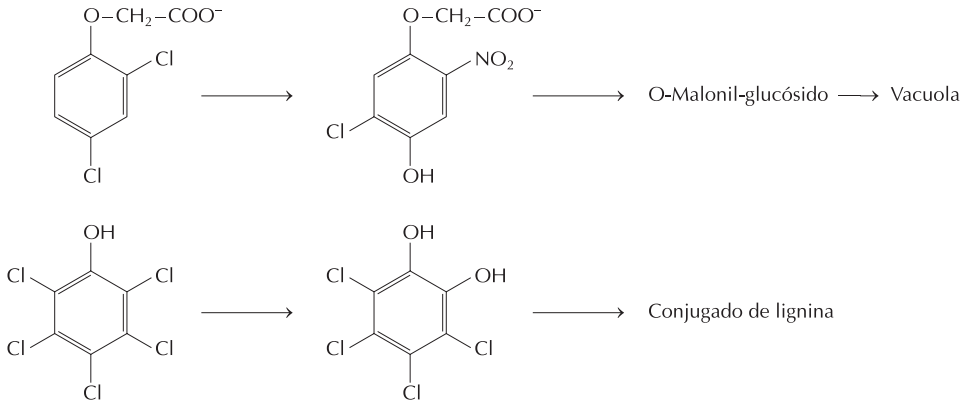


Figura 17.29. Biodegradación del herbicida 2,4-Diclorofenilacético y del biocida pentaclorofenol en las plantas.

En cuanto a las enzimas biodegradativas de las plantas hay que citar las peroxidasas, los CYP (véase la sección anterior), las glucosil transferasas y las Glutation-S-transferasas, muchas de las cuales están presentes en el hígado de mamíferos y, como en éste, están sometidas a procesos de inducción.

En concepto de hígado verde se confirma teniendo en cuenta algunas rutas de biotransformación en plantas. Así, el DDT se metaboliza mediante descloración del grupo lateral $R-C-Cl_3$ y su oxidación a grupo carboxilo, con posterior conjugación con el ácido glucurónico; el benzo(a)pireno se metaboliza mediante hidroxilación y conjugación del derivado hidroxilado o de sus isómeros quinónicos; el cinamato se degrada mediante una hidroxilasa micosómica tipo CYP y una glutatión-S-transferasa. Todas estas observaciones se apoyan además en datos moleculares de las isoenzimas metabólicas y los genes que las codifican, incluidos gran cantidad de genes *cyp*. Para completar la semejanza con los animales, gran número de metabolitos de la Fase I tienen efectos carcinogénicos en los tejidos vegetales.

Una diferencia fundamental y obvia entre la biotransformación en plantas y animales es el transporte, deposición y excreción de los metabolitos conjugados de la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Fase II. En las plantas, estos metabolitos se acumulan en la vacuola o el apoplasto (transporte intracelular) o en zonas alejadas mediante el transporte a través del floema o el xilema.

17.6. Interferidores hormonales

Numerosos compuestos exógenos que son sustratos para la biotransformación, ya sean o no compuestos xenobióticos, son tóxicos extremadamente potentes ya que actúan como ligandos de receptores hormonales a los que se unen a concentraciones muy pequeñas. Este fenómeno se llama interferencia hormonal y puede provocar desde alteraciones en el ciclo vital de los insectos (fitohormonas) a síndromes devastadores en los animales (TCCD).

La homeóstasis (constancia de los parámetros vitales) del organismo animal se mantiene gracias a una intrincada red que se establece entre los sistemas endocrino (que transporta mensajes químicos a través de la sangre), inmune (que controla la respuesta a las infecciones y determina la singularidad química del organismo) y nervioso (que transporta mensajes eléctricos a través de las neuronas). Estos tres sistemas son dianas para compuestos químicos exógenos que distorsionan sus mensajes generando situaciones patológicas. Otro tipo de mensajes químicos se debe a los morfógenos que controlan el desarrollo de los organismos, que también puede ser alterado por los sustratos de los procesos de biotransformación.

Los mecanismos de interferencia hormonal incluyen la unión a los receptores hormonales imitando la señal de una hormona, el bloqueo del receptor o la activación de enzimas de la Fase II que degradan las hormonas.

La cantidad de compuestos químicos con potencial interferidor de la acción hormonal es probablemente tan grande como la lista de productos de la industria química, sobre todo si se tiene en cuenta que se desconoce todavía el papel fisiológico de gran número de receptores "huérfanos". Entre los interferidores conocidos están los ftalatos, alquilfenoles, bisfenol A, policlorobifenilos (PCB) y dioxinas, retardantes ígneos bromados, parabenos, hidroxianisol, etc. Muchos de ellos poseen actividad xenoestrogénica, incluidos los fitoestrógenos producidos por las plantas como mecanismo de defensa, muy abundantes en la soja (véase Capítulo 7) (Fig. 17.30).

Para que un compuesto químico pueda actuar como interferidor hormonal se necesita que entre en el organismo por digestión, absorción o inhalación y que la sangre lo distribuya por el organismo. Si el compuesto es resistente a la Fase I (DDT, PCB, dioxinas), al ser normalmente lipofílico se acumula en el tejido adiposo, cuya grasa se moviliza en situaciones de estrés, liberando el compuesto a la sangre. Las hormonas endógenas, como los estrógenos, se unen a la albúmina o a proteínas específicas portadoras que limitan y controlan así su unión con los receptores, pero los xenoestrógenos no se unen con tanta afinidad a estas proteínas y los receptores quedan más expuestos, determinando acciones no fisiológicas. En este sentido, la placenta constituye una barrera que dificulta, pero que no anula, la accesibilidad de las xenohormonas al feto.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

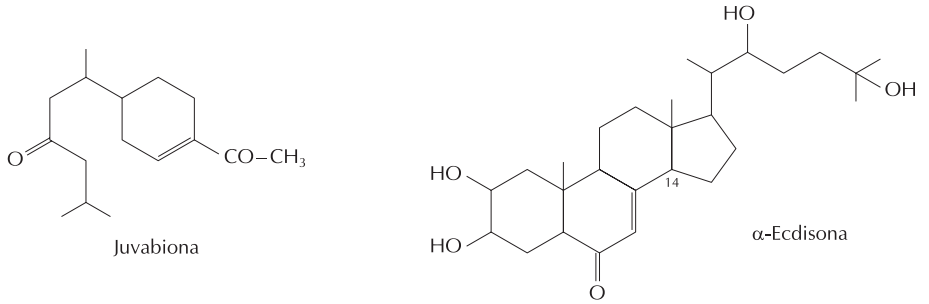


Figura 17.30. Fitohormonas de insectos. Los terpenoides Juvabiona y α-Ecdisona alteran la fase de desarrollo de los insectos. La ecdisona natural posee un grupo OH en el C^{14}.

17. 6.1. Plaguicidas e interferencia hormonal

El DDT no se utiliza ya en países desarrollados, pero sí en los países del Tercer Mundo para el control de las plagas de mosquitos. La forma comercial tiene varios isómeros, siendo el más abundante (75-80%), el *p, p'*-DDT (Fig. 17.31).

Figura 17.31. Estructuras del *p,p'*-DDT (izquierda) y *p, p'*-DDE (derecha).

En el organismo animal, el DDT se metaboliza a DDE y ambos se acumulan en la grasa corporal, aunque su concentración ha disminuido desde 15 mg kg^{-1} en 1955 a menos de 5 mg kg^{-1} en 1995 (USA).

Actividad estrogénica

El estrógeno se degrada en las hembras a través de la 16-α-hidroxiestrona (16OHE) y de la 2-hidroxiestrona (2OHE), siendo la primera vía más proclive al desarrollo de tumores mamarios porque la 16OHE posee actividad estrogénica, mientras que la 2OHE es un estrógeno muy débil. El balance 16OHE/2OHE disminuye con el ejercicio, al disminuir la grasa de la dieta y al ingerir productos vegetales (coles) como el indol-3-carbinol. La exposición de cultivos celulares mamarios a DDT, DDE, atrazina, lindano, chlordecona, etc., aumenta el balance 16OHE/2OHE, lo que incrementa el riesgo de cáncer. De hecho, la cantidad de DDT es más alta en tumores mamarios que en tejido mamario sano (especialmente en tumores que responden a hormonas).

Entre los xenoestrógenos se encuentran los plaguicidas *o, p'*-DDT, *p, p'*-DDT, dieldrina, chlordecona, endosulfan, methoxychlor y toxafeno, que actúan a con-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

centraciones 1-10 μM, los plásticos bisfenol A, nonilfenol, los fármacos estrogénicos anticonceptivos y de terapias de sustitución y otros agentes terapeúticos (cimetidina).

La interferencia hormonal se debe a la unión de la xenohormona al receptor de estrógenos, con efectos aditivos o sinergísticos para el caso de varios compuestos actuando simultáneamente, o bien a una acción antagonista, inhibiendo la acción estrogénica. Por otra parte, las xenohormonas pueden actuar inhibiendo enzimas biotransformantes del estrógeno, provocando su acción en tejidos no apropiados (testículos). Esto es particularmente grave en el período fetal, donde existen grandes cantidades de estrógenos naturales.

Otro mecanismo interferidor es la modificación del número de receptores o la interferencia con los sistemas inmune o nervioso, que interactúan con el sistema endocrino.

Por lo que respecta a su acción carcinogénica, el estradiol se metaboliza a 16-α-hidroxiestrona (carcinógeno) y 2-hidroxiestrona (inocuo). Al parecer, los xenoestrógenos cancerígenos aumentan la producción de 16-α-hidroxiprogesterona en el tejido mamario (Fig. 17.32).

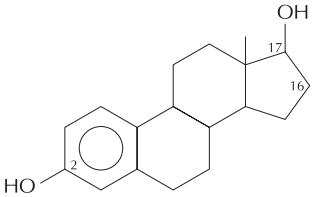


Figura 17.32. Estructura del estradiol. Sus metabolitos derivados poseen un grupo 17 ceto y sendos grupos –OH en los carbonos 2 y 16.

Actividad antiandrogénica

Otro metabolito persistente del DDT, el *p, p'*-DDE (Fig. 17.31), se une débilmente al receptor de estrógenos pero es un fuerte antagonista del receptor de andrógenos a concentraciones de 0,2 μM, impidiendo la acción androgénica en la rata embrionaria, puberal y adulta. Este mismo efecto lo lleva a cabo el estradiol, el estrógeno fisiológico. El *p, p'*-DDE atraviesa la placenta humana y puede alcanzar concentraciones que afectan la actividad transcripcional del receptor de andrógenos.

Bibliografía

BUCHANAN, R., GRUISSEM, W., JONES, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.

DEVLIN, T. M. (ed.) (2002). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correllations*. 5th ed. Wiley-Liss.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

HUTSON, D. H., ROBERTS, T. R. (eds.) (1990). *Environmental fate of pesticides*. Wiley & Sons.

LEWIS, D. F. V. (2001). *Cytochromes P450. Structure and Function*. Taylor & Francis.

SANDERMANN, H. Jr. (1994). "Higher plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept". *Pharmacogenetics*, 4, 225-241.

WALSH, C. (1979). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman & Co.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 18
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Glosario
18.1. La biotecnología como estrategia preventiva
18.2. Control biológico de plagas y enfermedades de las plantas cultivadas
18.2.1. Mecanismos de la lucha biológica contra plagas
Antagonismo
Competencia
Explotación
18.2.2. Control de malas hierbas
18.2.3. Resistencia a enfermedades
18.3. Fitorremediación de metales pesados, radionúclidos y contaminantes orgánicos
18.3.1. Fitorremediación
18.3.2. Fitoextracción de metales pesados
Tipos de fitoextracción
Biodisponibilidad, rizoextracción y acumulación
Mecanismos de acumulación y resistencia a metales
Volatilización de metales
Fitorremediación de compuestos xenobióticos orgánicos
18.3.3. Bioadsorción de metales pesados
18.3.4. Biorremediación de radionúclidos
18.4. Abonos artificiales y fijación biológica del nitrógeno
18.4.1. Bioquímica de la fijación biológica del nitrógeno
18.4.2. Abonos nitrogenados
18.4.3. Tecnologías alternativas para el abonado químico
18.4.4. Interacciones entre formas nitrogenadas en el suelo y la atmósfera
18.5. Miseria y esplendor de las plantas transgénicas
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Alelopático: Efecto que causa una planta sobre otra mediante metabolitos secundarios.
Bioadsorción: Unión de cationes metálicos a la superficie de una célula (adsorción).
Biocidas: Tóxicos de origen biológico.
Capacidad transformante: Propiedad de un organismo por la que transfiere su material genético a un huésped promoviendo en éste el desarrollo de tumores.
Complejación: Formación de complejos entre un donador de electrones y un catión metálico.
Diazotrofo: Microorganismo capaz de reducir N_2 a NH_3.
EDTA: Etilendiaminotetraacetato, un agente que forma complejos con los metales (quelación).
Fotosintato: Solución rica en azúcares que viaja desde las hojas a las raíces de las plantas.
Gt: Gigatonelada (10^9 Tn).
Ha: Hectárea (10.000 m^2).
Methemoglobinemia: Presencia de hemoglobina férrica (Fe^{3+}), que no une O_2, en la sangre.
Mh: Millones de habitantes.
Micotoxinas: Sustancias tóxicas producidas por hongos.
Promotor: Secuencia génica en el DNA que determina una unión más o menos fuerte de la enzima RNA polimerasa, que al catalizar la síntesis de RNA mensajero permite que un gen se exprese en forma de proteína.
Radionúclidos: Isótopos radiactivos utilizados o formados en la fisión nuclear.
Sideróforos: Compuestos químicos diversos que las bacterias liberan al medio donde se unen al Fe y lo transportan activamente al citoplasma bacteriano.
Sistemas de dos componentes: Estructura de control típica de bacterias en la que una proteína sensora detecta una señal, se autofosforila en un resto de histidina y transfiere el grupo ~P a un resto de aspartato de una segunda proteína reguladora de la respuesta.
Transgénicos: Organismos vivos que portan genes foráneos (transgenes).
Transportador ABC (ATP-Binding Casette): Familia de transportadores de membrana que poseen un componente extracelular, un canal de membrana y una ATP-asa citosólica asociada.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

18.1. La biotecnología como estrategia preventiva

La fabricación de plaguicidas químicos (herbicidas e insecticidas), compuestos fitosanitarios (antibióticos, bactericidas y antifúngicos) y abonos químicos artificiales ha sido la causa del progreso de la agricultura a lo largo del siglo XX y de la desaparición de las hambrunas que azotaban periódicamente al mundo occidental (recuérdese el "hambre de la patata" causada en Irlanda por el hongo *Phytophtora infestans*, y que causó una emigración masiva a Norteamérica). Sin embargo, esta segunda revolución verde ha llegado a su límite debido a los graves problemas de contaminación ambiental causada por el empleo masivo de productos fitosanitarios poco específicos, cuyo alto coste, además, los hace prohibitivos para los países del Tercer Mundo que necesitan nuevas prácticas agrícolas capaces de sustentar su exponencial ritmo de crecimiento poblacional sin riesgos ambientales.

La respuesta a este reto la tiene la manipulación génica y bioquímica de las plantas cultivables tradicionales (una minoría exigua) y de las plantas que, poseyendo potencialidad agroalimentaria, no han sido utilizadas aún con este fín. La denominada por el Profesor García Olmedo tercera revolución verde corresponde a las plantas transgénicas y su utilización con fines de control de plagas, fitorremediación y mejora bioquímica (optimización de la fotosíntesis y de la absorción y utilización de nutrientes limitantes para el crecimiento y la producción de frutos) constituye toda una estrategia preventiva para frenar el deterioro ambiental causado por el abuso de los plaguicidas y abonos químicos. Las plantas transgénicas constituyen ya hoy una realidad incontestable y el éxito de su aplicación para la resolución de problemas sanitarios, nutricionales e industriales las sitúa como una herramienta primordial de todo tipo de biotecnologías (Tabla 18.1).

Tabla 8.1. Biotecnologías basadas en plantas transgénicas.

Elaboración de productos vegetales: nutrientes (sacarosa, almidón), fibras (ácido adípico), detergentes (laurato), pigmentos (antocianinas), antibióticos (fitoalexinas) alcaloides (coniina*).
Elaboración de proteínas humanas: inmunoglobulinas, anticoagulantes, enzimas (glucocerebrosidasa).
Enriquecimiento nutricional de maíz, arroz y trigo: aumento del contenido en aminoácidos esenciales (lisina y metionina), lípidos, azúcares, vitaminas (vitamina A del arroz dorado, rico en β-caroteno) y minerales (Fe).
Extracción de sustancias contaminantes del medio (fitorremediación), especialmente compuestos xenobióticos orgánicos y metales pesados (Hg, Al, etc.).
Elaboración de vacunas humanas orales contra virus y bacterias o contra enfermedades autoinmunes (diabetes I).
Tratamiento de plagas mediante transgenes que codifican toxinas animales, bacterianas, fúngicas o de las propias plantas.
Optimización de la comercialización de frutos mediante manipulación de los genes reguladores del crecimiento y desarrollo.

* El alcaloide coniina, de *Conium maculatum* (cicuta) es un neurotóxico potente utilizado ya en la antigua Grecia como veneno (muerte de Sócrates).

Hasta ahora se han llevado cabo cerca de 5.000 pruebas de campo con plantas transgénicas de tomate, maíz, patata, soja, algodón, tabaco y plantas de frutos sucu-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

lentos y se han consolidado cultivos transgénicos de maíz, colza y algodón. A continuación, se exponen diferentes aplicaciones biotecnológicas de las plantas transgénicas, algunas ya probadas y otras en fase de desarrollo y experimentación.

18.2. Control biológico de plagas y enfermedades de las plantas cultivadas

La lucha contra las plagas (malas hierbas, insectos y patógenos) ha constituido desde siempre un objetivo prioritario de las prácticas agrícolas. Esta lucha se ha venido desarrollando de forma poco eficaz durante los 10.000 años que la especie humana lleva aplicando técnicas agrícolas, pero sufrió un considerable impulso a raíz de la llamada segunda revolución verde con el advenimiento de los abonos y plaguicidas químicos al final del siglo XIX. Ahora nos encontramos en los albores de la tercera revolución verde, que pretende el control de las plagas y la mejora de la productividad mediante la manipulación bioquímica o genética de las plantas con interés agrícola y la utilización de armas biológicas basadas en toxinas bacterianas, en metabolitos defensivos de las plantas o en las interacciones entre insectos parásitos y hospedadores (véase capítulo 7).

18.2.1. Mecanismos de la lucha biológica contra plagas

Antagonismo

El organismo diana se suprime mediante antibióticos, enzimas o toxinas (biocidas), producidos por microorganismos no agresivos para los cultivos, o por las propias plantas. Así, las bacterias del suelo pueden transformar clorocatecoles (productos de la degradación de compuestos xenobióticos cloroaromáticos) en un potente funguicida, la protoanemonina, que también es producido por las plantas (véase Capítulo 15).

Competencia

Se dificulta la supervivencia del organismo diana privándolo de nutrientes y otros recursos. Así, la inoculación de suelos con estirpes de *Pseudomonas* productoras de sideróforos limita la cantidad de hierro accesible y controla la proliferación de hongos patógenos como *Fusarium oxysporium*.

Explotación

El organismo diana se elimina mediante predación o parasitismo por parte de un microorganismo u organismo superior. Así se pueden controlar las plagas de orugas, nematodos o insectos parásitos de plantas mediante bacterias u hongos patógenos o insectos parásitos de insectos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

18.2.2. Control de malas hierbas

Las malas hierbas son plantas, normalmente herbáceas, que proliferan donde no es deseable, ya sea en el propio cultivo, en los cauces de agua o en áreas de pastoreo, por lo que también afectan a la ganadería. La disminución del rendimiento agrícola se debe a la competencia por el agua, la luz y los nutrientes, así como a la dificultad que entraña la recolección y el tratamiento post-cosecha de un campo de cultivo contaminado con malas hierbas.

Las malas hierbas son proliferativas y difíciles de erradicar, poseen mecanismos eficaces de reproducción y dispersión, generan reacciones alérgicas, poseen sabor desagradable y estructuras morfológicas repelentes (espinas), son resistentes a los herbicidas y poseen mecanismos alelopáticos de supervivencia.

La respuesta tradicional a esta plaga ha sido la eliminación física, muy costosa en la actualidad o, más recientemente, el tratamiento con herbicidas, cuya estructura está basada normalmente en el anillo aromático policlorado o nitrado, muy persistente en el medio natural y tóxico para los animales (Capítulos 15 y 16). Aunque los herbicidas de última generación (glifosato, sulfonilureas) son menos gravosos desde el punto de vista medioambiental, el futuro está en el desarrollo de bioherbicidas sobre la base de los avances en la ciencia de la Fitopatología, especialmente desde el punto de vista molecular.

Una primera aproximación para el control de malas hierbas la han constituido los insectos fitopredadores, como *Dactilopius ceylonicus*, utilizado para controlar la expansión de la chumbera americana *Opuntia vulgaris* en el subcontinente indio. En la actualidad existe medio centenar de especies de insectos con potencial herbicida, amén de gran cantidad de especies de hongos, bacterias y virus vegetales. Como complemento al tratamiento biológico, la industria química está refinando la producción de herbicidas basados en el profundo conocimiento del metabolismo de las plantas, que permite el diseño de tóxicos contra blancos bioquímicos apropiados (enzimas).

Un proceso de control biológico de plagas comienza con el estudio biológico (botánico, ecológico, bioquímico y genético) de la especie vegetal a erradicar, así como de sus competidores y parásitos naturales, conocidos o por descubrir. En este sentido se debe investigar en los lugares de origen de la plaga, como ha ocurrido en el caso de *Cyperus rotundus* (una de las peores plagas), la avena silvestre, el sorgo mediterráneo, la marihuana o incluso plantas acuáticas como el jacinto (Fig. 18.1).

Un ejemplo de proceso de biocontrol comercializado es el empleo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* para frenar los destrozos que causa la leguminosa *Aeschinomene virginica* en los arrozales. Los herbicidas tradicionales matan la plaga, pero también dañan al arroz o las cosechas vecinas (soja o algodón). El biocida es más lento y menos eficaz, pero afecta exclusivamente a la plaga, a la que elimina en un 99%. Otros biocidas fúngicos son la roya (*Puccinia chondrillina*) para el control de la planta mediterránea *Chondrilla juncea* (achicoria dulce) exportada a Australia.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

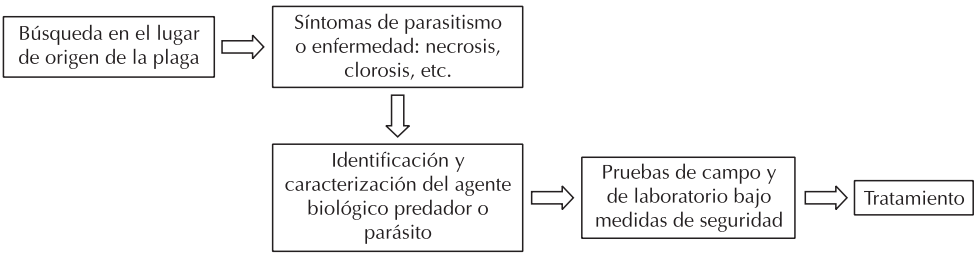


Figura 18.1. Desarrollo de un proceso de biocontrol de malas hierbas.

Naturalmente, este tipo de tratamiento conlleva riesgos de dispersión de patógenos en ambientes naturales, que se podrían paliar mediante la utilización, no del patógeno entero, sino de la fitotoxina que produce aquél, que puede ser en ocasiones bastante selectiva. Entre las micotoxinas investigadas están las triticonas de *Curvularia clavata* (inhibidores enzimáticos) o la maculotosina, letal para la *Centaurea maculosa*, una plaga que desplaza a las gramíneas y a otras plantas agrícolas. La maculotosina se produce a partir del hongo *Alternaria alternata* y tiene la ventaja de ser muy específica.

Las orugas constituyen otra fuente de tratamiento biológico de malas hierbas como el kudzu, sometido a la predación por orugas de la soja. Un parásito de la oruga, la avispa *Copidosoma truncatellum*, deposita sus huevos sobre la oruga, con lo que ejerce a su vez un control sobre la excesiva proliferación de las orugas y sus eventuales ataques a plantas cultivadas. Normalmente, aunque no en este caso, la avispa anula el ataque inmunitario de la oruga inyectando un adenovirus. Este tipo de asociación virus-insecto parásito-insecto hospedador/mala hierba es suficientemente sofisticado para presentar estructuras bioquímicas y genéticas que permitan el desarrollo de biotecnologías de control de plagas.

Si como parece se van a seguir fabricando herbicidas químicos, aunque altamente específicos para limitar los riesgos, una estrategia acompañante al tratamiento con un determinado herbicida sería la introducción de genes de resistencia al herbicida en la planta que se quiere proteger de las malas hierbas. Así, la introducción de genes que codifican enzimas para la producción de aminoácidos esenciales (ruta del shikimato), produciría resistencia a glifosato, y la introducción de genes que codifican aminoacetilasas produciría resistencia a fosfinotricina.

18.2.3. Resistencia a enfermedades

En el Capítulo 7 se presentan algunos mecanismos por los que las plantas detectan y resisten las infecciones parasitarias, sobre todo bacterianas o fúngicas. Algunas de estas infecciones afectan gravemente a plantas de gran importancia alimenticia como el arroz, cuya superficie cultivada ocupa 1,5 millones de kilómetros cuadrados con una producción anual de 0,6 Gt.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Las estirpes de la bacteria *Xhantomonas oryzae* colonizan rápidamente las plántulas de arroz, a las que marchitan y secan con rapidez, originando la pérdida total de la cosecha. El arroz posee una batería de genes de resistencia muy eficaces contra las infecciones bacterianas, pero sus diferentes variedades no poseen la dotación génica completa y son sensibles a la plaga. Como los procesos de mejora clásicos son laboriosos y lentos, la ingeniería genética se ha constituido en la herramienta más eficaz para obtener variedades de arroz resistentes a bacterias o que hayan mejorado su contenido en nutrientes (como la vitamina D).

A partir de una variedad de *Oryza longistaminata*, originaria de Malí, y a pesar de los inconvenientes que presenta el complejo genoma de las gramíneas, varias veces mayor que el genoma humano, se aisló el gen de resistencia *Xa21*. Este gen, transferido mediante un cañón de nanopartículas, confería resistencia a la marchitez causada por *X. oryzae*. La proteína Xa21 es una serina/treonina kinasa citosólica-LRR (dominio extracelular rico en leucinas) de la membrana plasmática de la célula vegetal. Este receptor transmite señales químicas tipo *avr* emitidas por el patógeno al interior celular modificando la expresión génica y originando el fenotipo resistente (véase Capítulo 7). No obstante, estas plantas transgénicas resultan sensibles a enfermedades víricas transmitidas por saltamontes, por lo que se está tratando de incorporarles mecanismos de resistencia.

Los virus patógenos de plantas son una diana adecuada para el enfoque molecular fitoterapéutico, basado en la transferencia de genes de la cápsida, así como de genes responsables de la diseminación intercelular del virus.

Por lo que se refiere a la resistencia a las plagas de insectos, de nuevo las plantas transgénicas representan una opción altamente favorable. La utilización masiva de plaguicidas químicos tradicionales tiene un coste muy elevado (9.000 millones de dólares al año), no es totalmente efectiva (se pierde la tercera parte de las cosechas por el ataque de los insectos) y, sobre todo, conlleva considerables riesgos de contaminación ambiental (Capítulos 15 y 16).

Una fuente clásica de biotoxinas es la bacteria *Bacillus thuringiensis* cuya diana es la oruga del taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*). La actividad insecticida radica en una proteína (δ-endotoxina) que interacciona con la membrana intestinal provocando la lisis de los enterocitos. Hoy se conocen un centenar de endotoxinas con capacidad insecticida, muy específicas e inocuas para la planta y se han llevado a cabo protocolos de transferencia de genes que codifican endotoxinas (como la CryA a, b y c) a plantas de interés agrícola como el tabaco atacado por el gusano *Manduca sexta* o el tomate atacado por *Helicoverpa zea*. La proteína biocida se produce en forma de protoxina y se activa por las proteasas intestinales del insecto, se une a las membranas de las células epiteliales de Goblet, que se lisan bloqueando la actividad intestinal de la oruga y provocando su muerte en horas. La toxina posee tres dominios, el D I (hélices que forman un poro en la membrana celular), el D II (hojas β que interaccionan específicamente con un receptor de la membrana) y el D III. La especificidad de las δ-endotoxinas se debe a tres factores: deben disolverse a pH > 9, que solamente se encuentra en el intestino de los lepidópteros, el "cóctel" de proteasas intestinales debe ser el adecuado para la acti-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

vación de la protoxina y, por último, la interacción toxina-receptor de membrana debe ser también adecuada.

En el caso del algodón, el ataque de los lepidópteros (*Heliotis virescens*) produce graves daños en las cosechas, con perjuicios de 200 millones de dólares en USA. Nuevamente los genes de las endotoxinas Cry1Ab y c, transferidos a la planta y bajo el control de promotores fuertes fueron las claves en la generación de variedades resistentes. La endotoxina Cry1Ab también es muy efectiva contra el taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y desde 1996 se dispone de maíz transgénico resistente. Por su parte, la endotoxina Cry3A es muy efectiva contra el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), una plaga devastadora contra una planta de gran interés agroalimentario.

Otras aproximaciones experimentales en el campo de los bioinsecticidas es la de los inhibidores de las proteasas intestinales de insectos y las lectinas, proteínas de leguminosas que se unen a glicoproteínas intestinales de los insectos con efectos letales.

Dentro de las posible novedades en la lucha contra los insectos fitófagos (orugas), ya se ha mencionado la utilización de avispas parásitas que depositan sus huevos en aquéllas. Normalmente, estas avispas evitan el ataque inmunitario de la oruga inyectando un poliadenovirus que neutraliza el sistema immune del hospedador. El parásito, además, retrasa la metamorfosis de la oruga desregulando la síntesis de hormonas juveniles (Capítulo 7). Por su parte, los productos volátiles de la planta (terpenos), atraen a la avispa, que sigue así el rastro de su presa dado que la producción de las sustancias atrayentes sigue una pauta temporal y se desencadena por el daño causado en la fitopredación (Capítulo 7). Este y otros sofisticados sistemas biológicos de defensa basados en depredadores de insectos, como la mariquita *Vedalia cardinalis*, son una base excelente para establecer biotecnologías de control de plagas de insectos, que ya han dado excelentes resultados en cultivos de invernadero. Un bioinsecticida de última generación consiste en un virus inocuo para las plantas que lleva incorporado el gen de la toxina del escorpión. Cuando una oruga ingiere una hoja que haya sido tratada con el virus, éste libera su carga letal y la oruga muere en pocos minutos.

Los avances en el conocimiento de las toxinas producidas por patógenos de plantas pueden conllevar el riesgo de su utilización en tiempos de guerra o en ataques terroristas que tratarían de dificultar así el suministro de alimentos a la población. En este sentido, también podrían utilizarse para aniquilar las plantaciones de coca o *Cannabis*, pero esta práctica es muy objetable por los daños colaterales que podría acarrear.

18.3. Fitorremediación de metales pesados, radionúclidos y contaminantes orgánicos

18.3.1. Fitorremediación

La fitorremediación consiste en la utilización de plantas para eliminar contaminantes orgánicos o inorgánicos (oxianiones, metales pesados) aprovechando la

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

capacidad de aquéllas para metabolizar o concentrar todo tipo de compuestos químicos. Esta técnica tiene algunas variantes:

a) Extracción y concentración de contaminantes en partes cosechables de la planta.
b) Degradación de contaminantes orgánicos (Capítulo 17).
c) Absorción de metales de los acuíferos.
d) Reducción de la disponibilidad de los contaminantes para otros organismos.
e) Volatilización de contaminantes y eliminación de contaminantes atmosféricos.

De todas estas variantes, la más importante es la fitorremediación de contaminantes metálicos (fitoextracción), para los que las plantas poseen una gran capacidad de concentración, constituyendo una alternativa viable a la limpieza de suelos, mucho más costosa (2 millones de E por Ha). Entre los metales más importantes desde el punto de vista de la contaminación ambiental están el Pb, Cd, As, Cr, Hg, Cu y Zn, con rangos de concentración que oscilan entre $0{,}1\text{-}1{,}8 \times 10^6$ µg kg^{-1} (Hg) hasta $10^3\text{-}7 \times 10^6$ µg kg^{-1} (Pb).

18.3.2. Fitoextracción de metales pesados

Tipos de fitoextracción

La fitoextracción de metales pesados se puede llevar a cabo mediante complejos metálicos auxiliares (fitoextracción inducida, FEI) o de forma continua (FEC). La FEI tiene lugar una vez las plantas han crecido, tras aplicar el agente quelante (EDTA) mientras que la FEC es simultánea al crecimiento de la planta extractora.

Mediante FEI, las plantas pueden extraer entre 0,2 y 0,5 Tn Ha^{-1} de Pb al año, lo que implica una duración de décadas para limpiar áreas fuertemente contaminadas. Una vez recolectadas, el peso y el volumen de las plantas se reduce por compostaje y se manejan como residuo peligroso o se recupera el metal si es factible económicamente.

Por su parte, la FEC utiliza plantas que acumulan más de un 1% del peso seco del tallo en forma de metales (Zn, Ni, Mn, Se). Esta capacidad se debe a factores fisiológicos, bioquímicos y genéticos responsables de la acumulación, translocación y resistencia a altas concentraciones de metales. La desventaja es que no abundan las plantas capaces de fitoextracción continua de los metales contaminantes más habituales (Pb, Cd, As, U). Entre las plantas tipo FEC están *Thlaspi caerulescens* y *Viola calaminaria*, que almacenan casi un 2% de Zn en sus hojas, cuando el contenido normal es mil veces menor. Otras son algunas especies de *Astragalus* (Se) y *Alyssum* (Ni).

Las plantas FEC se pueden someter a técnicas tradicionales de mejora pero parece más provechoso estudiar los aspectos moleculares de los mecanismos de resistencia, transporte, quelación, compartimentación y biotransformación para identificar y aislar los genes responsables, que se podrían transferir a plantas no acumuladoras de metales pero de mayor interés agroalimentario.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Biodisponibilidad, rizoextracción y acumulación

La accesibilidad de los oligoelementos metálicos para las plantas es clave desde el punto de vista nutricional, por lo que aquéllas han desarrollado mecanismos que aumentan la disponibilidad de los iones metálicos, por otra parte fuertemente adheridos a las partículas de suelo. Estos mecanismos consisten en la producción de fitosideróforos (ácidos mugénico y avénico), que se sintetizan, como en las bacterias, en respuesta a la deficiencia de Fe o Zn y que movilizan además otros metales como Cu y Mn.

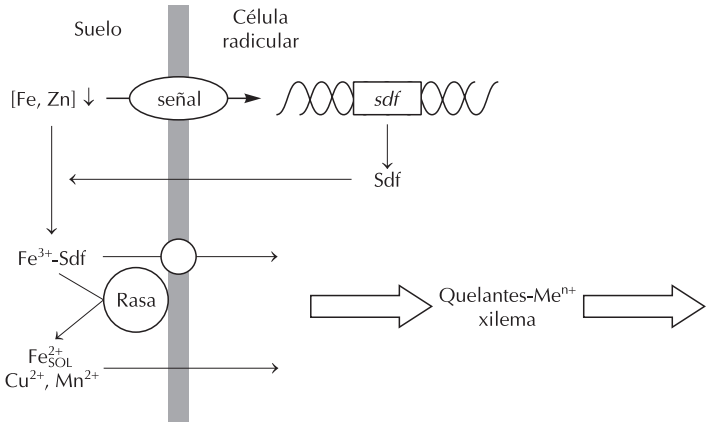


Figura 18.2. Rizoextracción y transporte de iones metálicos. ***sdf*** **(gen que codifica la síntesis de un sideróforo (Sdf); Rasa (quelato reductasa); SOL (forma soluble).**

A partir de *A. thaliana* se han clonado genes que codifican transportadores de membrana para Fe, Zn y Cu y que son activos también para el Pb y el Cd, lo que proporciona una base para diseñar biotecnologías rizoextractoras de metales mediante plantas transgénicas.

Una vez en la raíz, los iones metálicos se exportan al tallo vía xilema mediante procesos que exhiben cinéticas bifásicas saturantes, lo que sugiere la existencia de mecanismos de transporte. Para superar la capacidad de unión a cationes de las paredes celulares del xilema se utilizan diferentes mecanismos facilitadores a base de agentes quelantes como el citrato (Cd, Fe o Zn) o los aminoácidos asparagina (Cu) e histidina (Ni). Así, la espectroscopia de rayos X ha revelado la presencia de complejos de Cd^{2+} con ácidos orgánicos en el xilema de *Brassica juncea*, así como para el transporte de Ni y Zn en *T. caerulescens*. Otros agentes quelantes de cationes divalentes son la nicotinamida (Cu, Ni, Co, Zn, Fe y Mn) o incluso péptidos de baja masa molecular.

Mecanismos de acumulación y resistencia a metales

La capacidad para acumular metales se debe a las fitoquelatinas (FQ), polímeros de glutatión cuya síntesis se activa por exposición a iones metálicos. Así, el mutante

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cad2 de *Arabidopsis thaliana* es sensible al Cd^{2+} y está afectado en el gen de la γ-glutamilcisteína sintetasa. El Cd^{2+} activa además la γ-glutamilcisteinil dipeptidiltranspeptidasa (fitoquelatina sintetasa), cuyo gen está alterado en el mutante *cad1* de *Arabidopsis*. Las fitoquelatinas intervienen en el confinamiento vacuolar de los metales pesados mediante un transportador de tipo ABC de la membrana de la vacuola (Fig. 18.3). El Cd se acumula en forma de un complejo cristalino de alto peso molecular, que incluye al complejo Cd-fitoquelatina de transporte, Cd adicional y S^{2-}.

Las plantas poseen también metalotioneínas (MT), péptidos de baja masa molecular ricos en cisteína, capaces de unir metales, sobre todo Cu. Al contrario que las fitoquelatinas, que son péptidos sintetizados por enzimas, las MT están codificadas por genes y sometidas a procesos de inducción. Así, el Cu induce la MT2 de *Arabidopsis thaliana* cuya resistencia a metales está fuertemente correlacionada con la cantidad de mRNA MT2.

Los complejos FQ-metal se acumulan en las vacuolas (Cd, Zn) pero los tricomas también pueden hiperacumular Pb, Mn y Cd (Fig. 18.3).

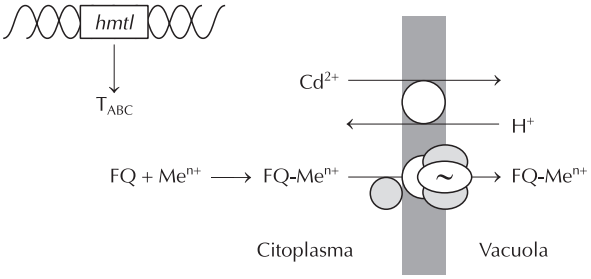


Figura 18.3. Transporte y acumulación de metales en la vacuola. FQ (fitoquelatina); *hmtl* (gen que codifica un transportador tipo ABC, T_{ABC}); el símbolo ~ indica consumo de ATP.

La toxicidad de los iones metálicos se puede reducir mediante reacciones enzimáticas de reducción o mediante su incorporación a compuestos orgánicos. La síntesis de aminoácidos no proteínicos que contienen Se (Se → Se-cisteína y Se-cistationina) evita el envenenamiento de proteínas por este metal y origina resistencia al mismo en *Astragalus bisculatus* (véase también Capítulo 7). Otros elementos que sufren biotransformación son el As (que se incorpora a dimetilarsenilribósidos), el Cr(VI) y el Hg^{2+}, cuya desintoxicación implica reacciones de reducción (Capítulo 6).

Los mecanismos de resistencia también pueden incluir procesos reparadores de la membrana plasmática o de resistencia de la misma ante daños causados por metales (Cu), como sugiere la prenilación de las MT de *A. thaliana.*

Volatilización de metales

En 1894, Hofmeister propuso que los animales eliminaban el Se a través de los pulmones en forma del compuesto volátil selenuro de dimetilo. De forma paralela, el

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

olor a *Alium* que desprenden algunas plantas que acumulan Se podría deberse a la volatilización de compuestos de este oligoelemento, como el selenuro de dimetilo emitido por *Astragalus racemosus*. No obstante, las bacterias de la rizosfera pueden jugar un papel importante en la metabolización de Se a derivados orgánicos volatilizables.

Las algas marinas también volatilizan As (dimetilarsenito) como parte de un mecanismo de resistencia contra este tóxico. Por lo que respecta al Hg, la introducción del gen que codifica la enzima que reduce Hg^{2+} a Hg^{0} (volátil) en *A. thaliana* ha transformado esta planta en un eficaz evaporador de mercurio.

La ventaja de la volatilización sobre la rizoextracción se debe a que no se necesita procesar la biomasa enriquecida en metales, pero el paso de éstos a la atmósfera conlleva riesgos ambientales más que evidentes.

Fitorremediación de compuestos xenobióticos orgánicos

Aunque son las bacterias los organismos que presentan una mayor potencialidad para utilizarlas en técnicas de biorremediación, las plantas presentan también una actividad biotransformante no desdeñable aplicable a la descontaminación de compuestos nitroaromáticos, bifenoles policlorados y cloroalifáticos (véase Capítulo 17).

Las plantas producen exudados que optimizan la capacidad biodegradativa de la rizosfera microbiana (fitorremediación *ex planta*). Estos exudados contienen fotosintato, fuentes de carbono y nitrógeno y moléculas facilitadoras de la actividad microbiana (catequinas y cumarinas). En segundo lugar, los compuestos xenobióticos orgánicos (XO) se absorben por las plantas a partir de las fases gaseosa, líquida o sólida del suelo y se transportan a diferentes tejidos donde se volatilizan, degradan o se transforman en derivados menos tóxicos (véase Capítulo 17). Así, la nitroglicerina se degrada a mono- y dinitrato de glicerilo, pero no es frecuente que tenga lugar una mineralización completa de los compuestos XO, como ocurre en las bacterias.

18.3.3. Bioadsorción de metales pesados

La materia viva posee una gran capacidad para adsorber y absorber metales pesados, tanto si son preciosos como tóxicos. La técnica de la bioadsorción utiliza este potencial para extraer metales de medios altamente contaminados, bien sea mediante biomasa viva (que es autorrenovable) o muerta (que es más ventajosa desde un punto de vista económico). La bioadsorción posee gran capacidad de concentración (miles de veces), no es un proceso metabólico, sino pasivo, y se debe distinguir de la bioacumulación tratada en el apartado anterior.

La bioadsorción es menos costosa y admite un amplio rango de condiciones (pH, temperatura, concentración) si se la compara con las técnicas de precipitación, intercambio iónico, absorción con carbón activado, diálisis u ósmosis inversa. El soporte instrumental de la bioadsorción es una columna semejante a las de intercambio iónico,

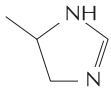
© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

pero en este caso se utiliza un material bioadsorbente, preferentemente regenerable mediante un tratamiento de desadsorción de metales (ácidos o sales metálicas).

Los mecanismos implicados en la bioadsorción incluyen procesos de intercambio iónico (la partícula bioadsorbente libera la misma carga que une mediante unión electrostática o complejación), adsorción (impulsada por afinidad química entre el absorbente y el metal) o microprecipitación (impulsada por la disminución de la solubilidad de las parejas formadas entre un anión producido por el metabolismo (sulfato, fosfato, oxalato) y el catión metálico.

La unión entre la biomasa y el metal se lleva a cabo mediante complejos de coordinación (metal unido a varios átomos de diferentes moléculas) o quelatos (metal unido a varios átomos de una misma molécula). Los metales alcalinotérreos y el Mn^{2+} se unen mediante enlaces iónicos, los iones Ag^{+}, Au^{+}, Hg^{2+} y Cu^{2+} forman enlaces covalentes y los metales de transición (Fe^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}) son intermedios. La tabla 18.2 presenta los diferentes grupos funcionales capaces de formar complejos metálicos. La mayor parte de los grupos útiles en bioadsorción son acídicos.

Tabla 18.2. Grupos complejantes de metales. Los pKa figuran entre paréntesis.

Hidroxilo	–OH (9-13)	Imino	=NH (11,6-12,6)
Carbonilo	=C=O	Amido	$-CO-NH_2$
Carboxilo	–COOH (1,7-4,7)	Fosfonato	$-PO_3H_2$ (0,9-2,1 / 6,1-6,8)
Tiol	–SH (8,3-10,8)	Fosfodiéster	–PO(OH)– (1,5)
Tioéster	=S	Imidazol (6)	
Sulfonato	$-SO_3H$ (1,3)		
Amino	$-NH_2$ (8-11) –N– (13)		

Los biomateriales utilizados en la adsorción de metales son bacterias, algas u hongos o bien pectinas (grupos –COOH), celulosa (grupos –OH) o turba (grupos –COOH y Ar–OH). La estructura de los tres tipos de organismos bioadsorbentes se muestra en la figura 18.4.

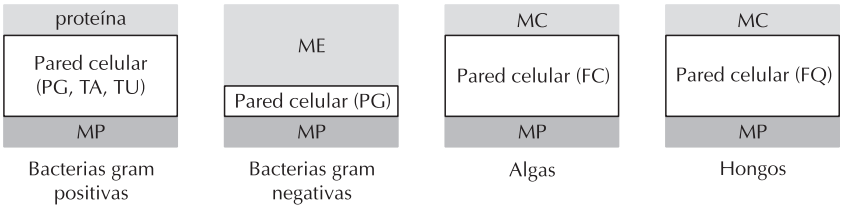


Figura 18.4. Cubiertas celulares de organismos adsorbentes de metales. MP (membrana plasmática); PG (péptidoglicano); TA (ácido teicoico); TU (ácido teicurónico); FC (fibras de celulosa); FQ (fibras de quitina); MC (mucílago: matriz de alginato o glucano); ME (membrana externa).

Los grupos químicos implicados en la bioadsorción por algas y hongos son los carboxilatos y sulfonatos de los heteropolisacáridos de la pared celular o las cubiertas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

externas. Así, el alginato se compone de ácidos manurónico y gulurónico (40% del peso seca de las algas pardas). En las bacterias (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Streptomyces*), las fuerzas de unión son de microprecipitación, de complejación y electrostáticas (los grupos fosfonato de los lipopolisacáridos y fosfolípidos generan una superficie cargada negativamente)

La eficiencia de la bioadsorción se mide en mg de metal unido por g de biomasa y depende de varios factores. Normalmente, la eficiencia aumenta con la concentración del metal hasta alcanzar una saturación, es máxima entre 5 y 40 ºC y puede soportar un amplio intervalo de acidez del medio. La influencia del pH se debe al efecto sobre la solubilidad del metal, la estructura del absorbente y el estado del grupo que liga el metal.

Otros tratamientos de biorremediación de metales aprovechan las actividades enzimáticas bacterianas para la transformación de una forma tóxica (Cr^{VI} en otra menos tóxica (Cr^{III}) o bien la inmovilización de metales (As, Cu, Co, Pb, Ni, Zn) en la superficie de redes cristalinas de óxidos insolubles de $Mn^{III/IV}$ formado por las bacterias a partir de Mn^{2+} soluble.

18.3.4. Biorremediación de radionúclidos

Los elementos radioactivos (radionúclidos) se liberan al medio como consecuencia de explosiones nucleares, accidentes de la industria nuclear (Chernobyl) y generación de residuos por la minería del Uranio (U, Se, Mo, Th, Ra, Po) y las centrales nucleares (U, Pu y otros elementos transuránidos).

Los residuos de la minería del uranio son efluentes ácidos enriquecidos en U, Se y Mo, que se pueden tratar para disminuir la acidez mediante bacterias acidófilas reductoras de SO_4H_2 (un ácido fuerte) a SH_2 (un ácido débil), como paso previo al procesos de bioabsorción de metales (véase apartado anterior). La actividad bacteriana produce además Ra^{2+} y Ba^{2+} (*Shewanella putrefaciens*). Otros contaminantes del efluente son el nitrato, el fosfato de tributilo, utilizado para separar U y Th, y el carbonato, que forma fuertes complejos con el U.

Los residuos de las reacciones de fisión son radioioduro, gases nobles, elementos del grupo de la tierras raras y transuránidos (isótopos del Pu, Am y Np). Los tratamientos con fosfato de tributilo y nitrato enriquecen el residuo en estas sales, que pueden ser eliminados mediante metabolismo bacteriano (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*).

Por último, los reactores deben ser descontaminados mediante tratamiento con agentes quelantes como el EDTA (etilendiaminotetracetato), DPTA (dietilendiaminopentaacetato) y NTA (nitriloacetato), que forman fuertes complejos con los actínidos e impiden su quelación por los ácidos húmicos del suelo. De éstos, el EDTA es el más usado por ser mejor quelante y ser más resistente a la biodegradación por bacterias del suelo.

Las bacterias pueden adsorber cationes de radionúclidos (bioabsorción), absorberlos en su interior (bioacumulación), formar derivados insolubles (biomineralización),

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

reducirlos e insolubilizarlos (biotransformación) y activar la formación de precipitados cristalinos (quimioabsorción).

En el apartado anterior se ha descrito la bioadsorción de cationes metálicos. Por lo que respecta al U, la biomasa del hongo *Rhizopus arrhizus* produce una fuerte adsorción del radionúclido (hasta un 20% del peso seco) mediante la formación de complejos de coordinación entre el ión UO_2^{2+} y los grupos amino de la quitina.

Los radionúclidos se pueden acumular en el citoplasma bacteriano (absorción) utilizando la H^+-ATPasa de la membrana plasmática, para lo que se necesitan células metabólicamente activas, porque el transporte de cationes consume energía. Dentro de las células, los radionúclidos se unen con gran afinidad a las metalotioneínas o bien pueden quedar retenidos entre las membranas celulares interna y externa (UO_2^{2+}).

Los microorganismos pueden catalizar la transformación de formas tóxicas de los metales a formas no solubles o volátiles ($Me^{n+} \rightarrow Me^0$), como sucede con el $Hg^{2+\rightarrow 0}$, $Au^{3+\rightarrow 0}$, $Cr^{VI\rightarrow III}$, $Se^{VI\rightarrow 0}$ y $V^{V\rightarrow III}$ y con los radionúclidos U^{VI}, Tc^{VII} y Np^{V}. Este proceso puede tener implicaciones energéticas si el metal actúa como aceptor de e^- en anaerobiosis. La destoxificación de los cationes metálicos puede ocurrir también por metilación, que acelera su volatilización (Hg, Cd, Pb, Se, Te). La biotransformación enzimática no requiere biomasa viva, sino enzimas aisladas y donadores de electrones como el H_2, acetato y formiato. Como fuente de enzimas se pueden utilizar bacterias del medio natural (poco efectivas hacia sustratos no naturales) o enzimas obtenidas por mutagénesis dirigida o PCR-DNA *shuffling* (véanse Capítulos 8 y 9).

Los cationes metálicos y radionúclidos pueden precipitar como carbonatos e hidróxidos formados en la superficie bacteriana alcalinizada por el influjo de H^+ o como sulfuros y fosfatos formados enzimáticamente (Fig. 18.5).

Figura 18.5. Precipitación de radionúclidos con sulfuros o fosfatos. RN (radionúclido); RS (bacteria reductora de sulfato); pPi (polifosfato).

La precipitación microbiana de un metal pesado puede actuar como núcleo para la subsiguiente deposición de más metal acelerando la formación de un cristal (quimioabsorción). La adición de Fe a un cultivo de bacterias reductoras de sulfato hace que se forme FeS unido a las células, que actúa de cebador para la absorción de otros metales, incluidos los radionúclidos. Otros cebadores pueden ser los fosfatos metálicos (el $LaPO_4$ inicia la deposición de fosfatos de actínidos). El fosfato ácido de uranilo ($HUO_2PO_4 \cdot n\,H_2O$) forma láminas iónicas separadas por moléculas de agua, todo ello trabado por puentes de hidrógeno. En esta red, los H^+ presentan una alta movilidad y se genera una gran capacidad de intercambio iónico.

La energía nuclear genera hasta 25.000 m^3 de residuos por día y 10^3 Tn de efluente por día. La biorremediación de metales tiene por tanto que aplicarse a estas escalas,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

lo que supone un desafío para el diseño de los correspondientes biorreactores, bien sea para extraer los radionúclidos o para inmovilizarlos.

Otra cuestión a tener en cuenta es la genotoxicidad de los radionúclidos (^{241}Pu), que solo puede ser contrarrestada con un sistema óptimo de reparación del DNA microbiano, como el de *Deinococcus radiodurans*. Esta bacteria puede ser utilizada como recipiente de genes biodegradativos para actuar en un ambiente altamente radioactivo.

Las primeras aproximaciones para la biorremediación de metales auguran costes sensiblemente inferiores a los tratamientos físico-químicos de los residuos, sobre todo con la introducción de organismos modificados génicamente (por ejemplo, con el gen *phoN*, que codifica una fosfatasa responsable de la formación biogénica del fosfato). La bioadsorción se puede aplicar a los actínidos (Am, Pu, Cm, Th, Np, U, Pa) utilizando hongos filamentosos o termófilos (*Talaromyces emersonii* acumula U hasta un 28% del peso seco), algas (*Chlorella*) o bacterias (*Mycobacterium*, *Acinetobacter*).

Por lo que respecta a los elementos no actínidos, el ^{137}Cs es muy abundante en los residuos nucleares y las bacterias poseen sistemas de transporte catiónico no específicos (*Kup* de *E. coli*) capaces de transportar Cs y Rb. También las cianobacterias y los hongos pueden incorporar Cs mediante sistemas de transporte de K^+ de baja afinidad. El ^{226}Ra ($t_{1/2}$ = 1.600 años) se adsorbe bien por la biomasa fúngica (*Rhizopus*), el Sr^{2+} forma complejos y precipitados insolubles mediante actividades microbianas (*Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*), el Y^{3+} es acumulable por *Citrobacter*. De otros elementos como Zr, Nb, Po, Tc, ^{106}Ru, ^{60}Co y ^{59}Ni se desconoce si pueden ser eliminados mediante técnicas de bioadsorción.

18.4. Abonos artificiales y fijación biológica del nitrógeno

El uso de abonos para mejorar el rendimiento de las cosechas es probablemente anterior al empleo de la escritura y la observación de que ciertas plantas podían producir esta mejora viene reflejado en escritos greco-romanos y aparece en el símbolo pictográfico chino para describir la soja. Hoy se sabe que estas plantas producen compuestos nitrogenados a partir de NH_3 sintetizado por bacterias que viven en nódulos radiculares (véase Capítulo 6).

$$N_2 + 3\ H_2 \longrightarrow 2\ NH_3 \qquad \Delta G = -46{,}1\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Aunque la reacción es exotérmica, su energía de activación es enorme porque hay que romper el triple enlace de la molécula de N_2. De hecho, a temperatura ambiente la reacción transcurre lentamente, mientras que a medida que aumenta la temperatura, transcurre pero en sentido contrario (la Keq disminuye desde 6×10^5 a 298 K, hasta 2,1 a 450 K y $4{,}4 \times 10^{-5}$ a 800 K.

La industria química fabrica NH_3 a partir de H_2 y N_2 mediante el proceso ideado por Karl Bosch en 1899 en la BASF y materializado por Fritz Haber, de la Universidad Técnica de Karlsruhe, utilizando alta presión (150-400 atm.), altas temperaturas (400-650 °C), catalizadores metálicos (Os y U), remoción continua del NH_3 formado y un sistema para evitar el deterioro de la cámara de reacción por las condiciones extremas

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

dentro de la misma. La primera fábrica se levantó en 1913 en Oppau (Alemania) y produjo 30.000 Tn de amoníaco al año, que pronto se duplicaron, alcanzándose las 10 Mt a lo largo de los años 20.

18.4.1. Bioquímica de la fijación biológica del nitrógeno

La fijación simbiótica del nitrógeno (FBN) fue descubierta por Martinus Beijerinck, Hermann Hellriegel y Hermann Wilforth en 1888. La capacidad para catalizar la reacción de fijación es exclusivamente bacteriana, pero está tan ampliamente distribuida entre las especies de los dominios *Eubacteria* y *Archaea* que los genes de la fijación (*nif*) han debido circular entre los microorganismos por transferencia horizontal de DNA. Por su parte, la asociación simbiótica plantas-bacterias se lleva a cabo sólo por algunas estirpes de cianobacterias, actinomicetos y α-proteobacterias.

La reacción de fijación biológica del N_2 es más compleja que la de Haber-Bosch porque la enzima que la cataliza, la nitrogenasa, posee una actividad adicional de reducción de H^+ y forma NH_4^+ y H_2. La reacción requiere además el impulso termodinámico del ATP:

$$N_2 + 2\ H^+ + 4\ H_2 + n\ \text{ATP} \longrightarrow 2\ NH_4^+ + H_2 + n\ \text{ADP} + n\ \text{Pi}$$

La FBN es muy sensible a la presión de O_2 y a la presencia de fuentes de nitrógeno fijado (NH_4^+, Gln, NO_3^-). Es un proceso codificado por un número variable de genes (20 genes *nif* en *Klebsiella pneumoniae* y un número considerablemente mayor en las bacterias fijadoras simbióticas) y está sometido a un estricto control mediante sistemas de dos componentes.

Un sistema similar a FixL/FixJ (Fig. 18.6) controla la expresión de los genes *nif* según el status nitrogenado de la bacteria. Cuando la ratio C/N es alta, la proteína NtrB lo detecta, se autofosforila y transfiere el grupo ~P a la proteína NtrC, que activa la expresión de *NifA*.

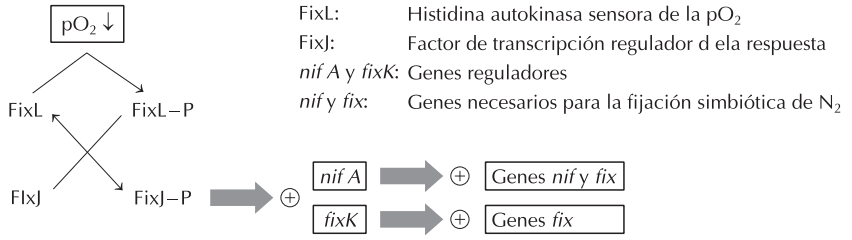


Figura 18.6. Control de la fijación simbiótica del N_2 por la presión de O_2 en las raíces. La expresión de la nitrogenasa a pO_2 bajas asegura la actividad enzimática.

Las bacterias simbióticas contienen además gran número de genes auxiliares (*nod* y *fix*), necesarios para establecer el contacto planta-bacteria y desarrollar los nódulos fijadores (Capítulo 6). Además, se necesitan genes de la planta que codifiquen funciones

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

complementarias, como las enzimas necesarias para exportar nutrientes nitrogenados desde las bacterias a la planta (Fig. 18.7).

Una enzima muy importante del bacteroide es la hidrogenasa de reciclado, codificada por los genes *hup*, que reutiliza el H_2 formado por la nitrogenasa canalizando los electrones del H_2 al metabolismo (Fig. 18.7). Otra proteína necesaria es la leghemoglobina, una hemoproteína que une O_2 con gran afinidad y que lo transporta a los bacteroides para facilitar su metabolismo respiratorio. La Km para el O_2 de la citocromo oxidasa del bacteroide (8 nM) es 6 veces inferior a la de los rizobios libres, lo que constituye un sumidero de O_2 que protege a la nitrogenasa de la inactivación.

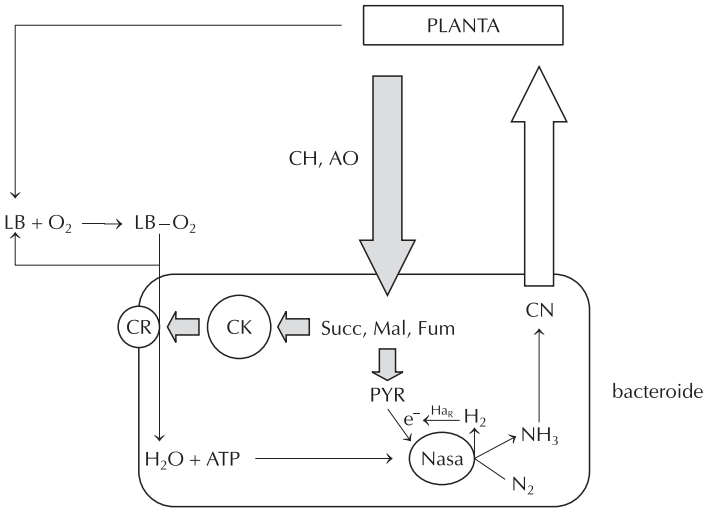


Figura 18.7. Bioquímica de la fijación simbiótica de N_2. CH (carbohidratos); AO (ácidos orgánicos); LB (leghemoglobina); CK (ciclo de Krebs); CR (cadena respiratoria); CN (compuestos nitrogenados: amidas o ureidos); PYR (piruvato); Ha_R (hidrogenasa de reciclado).

Una vez sintetizado, el NH_4^+ se incorpora a compuestos nitrogenados en las células nodulares de la planta, que los exportan a las partes aéreas. Los compuestos nitrogenados son amidas (Gln, Asn) sintetizadas en el citosol de plantas como guisante y alfalfa, o ureidos (alantoína, alantoato) sintetizadas en los plastidios por plantas como la soja. La síntesis y transporte de estos metabolitos nitrogenados mantiene la concentración de NH_4^+ suficientemente baja como para evitar la represión de la nitrogenasa por la vía NtrB/C.

La fijación simbiótica de nitrógeno también se lleva a cabo entre rizobios y no leguminosas (*Parasponia*), actinomicetos fijadores (*Frankia*) y plantas arbóreas (*Alnus, Myrica, Casuarina* y *Ceanothus*), *Azospirillum* y plantas cultivadas como el sorgo y cianobacterias (*Anabaena, Nostoc*) con todo tipo de plantas, desde dicotiledóneas (*Gunnera*), hasta pteridofitas (*Azolla*). En el caso de las cianobacterias filamentosas fijadoras de N_2, la nitrogenasa está protegida del O_2 en células especializadas o heterocistos, que carecen de fotosistema II, son impermeables al O_2 y reciben nutrientes energéticos de las células vecinas (vegetativas).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

18.4.2. Abonos nitrogenados

Los bioelementos más importantes desde el punto de vista cuantitativo son el C, el O, el H y el N (en menor proporción, el P y el S), los cuales, con excepción del N, son aportados sin límite a partir de enormes reservas en la biosfera (véanse Capítulos 4 y 5). El H_2O es un compuesto limitante según las zonas, dependiendo de las oscilaciones climáticas, pero su suministro no constituye un problema irresoluble dadas las tecnologías de almacenamiento y distribución disponibles. El suministro de otros bioelementos, como el P y el K no constituye un problema serio en la productividad agrícola.

El N se encuentra en grandes cantidades en la biosfera en forma de gas N_2 (10^3 Gt en la atmósfera y quizá un orden de magnitud más en las rocas), pero en esta forma es inaccesible para el metabolismo asimilador, que requiere compuestos nitrogenados del tipo NO_3^- o NH_4^+ (véase Capítulo 6). Por otra parte, el triple enlace $N \equiv N$ dificulta enormemente la reacción de disociación de la molécula diatómica N_2 aumentando la energía de activación de la reacción, lo que determina un alto requerimiento energético para llevarla a cabo, salvo en el caso de la fijación biológica del nitrógeno (véase apartado 18.4.1), que asimila cerca de 200 Mt de nitrógeno por año.

Por esta razón, las formas fijadas del N no abundan en la naturaleza, como el NH_3 (10 Gt), la urea (10 Mt), los aminoácidos (10 Gt) y las proteínas (1 Gt). La otra forma de N fijado, el NO_3^-, se asimila vía NH_3 a razón de 10 Gt por año, o se pierde en forma de gases nitrogenados a la atmósfera (véase Capítulo 6). La tabla 18.3 presenta los flujos de N en la Tierra.

Tabla 18.3. Flujos de nitrógeno.

	Mt N año^{-1}
Mineralización	3000
Fijación N_2	175
Abonado	85
Electricidad atmosférica	20
Actividades humanas	40

El aumento espectacular de la población humana durante el siglo XX (de 1.800 Mh a 5.500 Mh) se debe a una serie de mejoras introducidas en las prácticas agropecuarias, pero sobre todo a la disponibilidad de abono nitrogenado en forma de NH_3, sintetizado por la industria química (véase apartado anterior). Las figuras 18.8 y 18.9 muestran el paralelismo entre el aumento de la población y el consumo de fertilizantes nitrogenados.

Las prácticas agrícolas de abonado anteriores a la revolución industrial no pasaban del uso de residuos agropecuarios (heces, guano, estiércol, restos de otras cosechas) o de mezclar leguminosas o plantas acuáticas (*Azolla*) con otros cultivos. Estos tratamientos proporcionan unos 200 kg de N por Ha y se realizaban en la sociedad post-industrial en zonas del Sudeste asiático, Oriente próximo e incluso del norte de

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

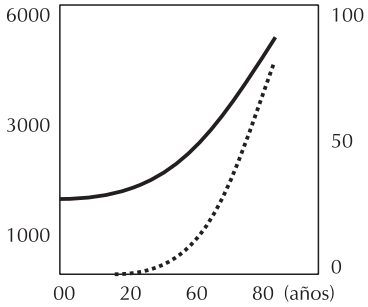


Figura 18.8. Evolución de la población humana y consumo de abonos nitrogenados a lo largo del siglo XX. Mh (curva continua, eje de la izquierda); Mt de Nitrógeno (curva de puntos, eje de la derecha).

Europa. De esta forma se consigue un rendimiento de 0,25 Tn de proteína vegetal por Ha, suficiente para mantener a unas 15 personas. Sin embargo, los factores adversos (plagas, clima inadecuado y, sobre todo, déficit de N) disminuían la media poblacional hasta 3 veces. Como el abono verde o natural no es abundante y las leguminosas no suministran alimento al mismo ritmo que los cereales, la productividad agrícola se estancó durante 150 años (Fig. 18.9). La crisis económica de finales de los años 20 y la Guerra Mundial impidieron la comercialización a escala mundial del método de Haber-Bosch hasta mediados del siglo XX, cuando ya se pudo incrementar significativamente la media de habitantes por Ha (Fig. 18.9). Hasta el último cuarto de siglo, los países desarrollados monopolizaron el uso del abono químico, pero a finales del siglo XX, el 60% del abono nitrogenado se utilizaba por los países en vías de desarrollo.

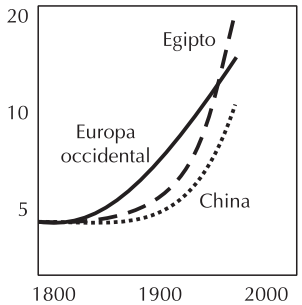


Figura 18.9. Evolución del número de habitantes por Ha cultivada a lo largo de los siglos XIX y XX.

En la actualidad, casi 200 Mt de nitrógeno se esparcen por las tierras cultivadas, de las que 150 Mt corresponden a abonos químicos. Del total de proteínas suministradas, más del 30% proceden del abonado químico y el resto tiene procedencia animal. Sin embargo, en los países occidentales, el abuso de fertilizantes nitrogenados químicos no se produce para suministrar proteínas a la dieta humana, sino a la fabri-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cación de piensos para disponer de proteína animal, ya que se necesitan 3 partes de proteína vegetal para proporcional una parte de proteína animal. Por el contrario, los países con alta densidad de población y escasa superficie de cultivo necesitan el abono sintético para satisfacer sus necesidades proteínicas.

La irrupción de grandes cantidades de N amoniacal en los suelos agrícolas tiene enormes repercusiones en el equilibrio del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, dadas las interconversiones que se dan en la naturaleza entre las formas reducidas del N (NH_4^+) y las formas oxidadas (NO_3^-, NO_2^-, NO, N_2O y N_2) (véase Capítulo 6). En particular, son preocupantes el aumento de nitratos en las aguas, que produce eutrofización e incrementa el riesgo de cáncer, y de óxidos de nitrógeno en la atmósfera. Así, el N_2O genera un efecto invernadero 200 veces mas intenso que el CO_2 y destruye la capa de ozono. Por su parte, el NO produce especies altamente reactivas, muy tóxicas para los seres vivos, como el peroxinitrito.

18.4.3. Tecnologías alternativas para el abonado químico

El conocimiento a nivel molecular de la fijación biológica del nitrógeno ha propiciado grandes avances tecnológicos, como la transferencia de genes *nif* entre dos especies bacterianas. Sin embargo, la complejidad del proceso simbiótico es tal que aun se está muy lejos de extenderlo a plantas de gran interés agrícola como el maíz, el trigo o el arroz.

Sin embargo, se pueden utilizar estos conocimientos para optimizar el abonado mejorando el cultivo de leguminosas. En este sentido, se han conseguido rendimientos de casi 1 Tn de N por Ha y año utilizando rizobios con alta capacidad fijadora de N_2. Estos rizobios poseen genes *hup* (responsables del reciclado del H_2, Fig. 18.7), genes independientes de flavonoides o poseen mecanismos más eficaces para el transporte de O_2 y la capacidad de supernodulación. Para una mayor efectividad, los rizobios a inocular deben poseer capacidad de competencia con otras bacterias del suelo. Los inóculos deben ser puros y suficientes (10^4 bacterias para semillas pequeñas (alfalfa) o 10^6 para semillas grandes (soja). También pueden ser aplicados al suelo, pero deben ser bastante mayores que los aplicados a las semillas.

Otro factor de mejora es la ingeniería genética de la planta para mejorar su resistencia a estreses, obtener simbiosis tolerantes a nitrato y optimizar la síntesis de compuestos nitrogenados exportables.

Los actinomicetos son otra fuente de bacterias simbióticas fijadoras en dicotiledóneas perennes (*Casuarina*, *Alnus*, *Myrica*, *Hippophae*, *Elaeagnus*) a las que aportan desde 2 a 300 kg de N por Ha y año. Esta simbiosis puede aplicarse para mejorar las prácticas forestales y enriquecer en nitrógeno los suelos de los bosques.

Algunas bacterias fijadoras de vida libre pueden suponer un nuevo y provechoso enfoque. Bacterias como *Azotobacter* pueden fijar gran cantidad de nitrógeno en asociaciones con herbáceas (asociación de la C4 brasileña *Paspalum notatum* con *Azotobacter paspali*). Otras, como *Beijerinckia* y *Derxia*, pueden fijar nitrógeno en ambientes

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

acídicos (trópicos). Algunas especies de *Azospirillum* y *Enterobacter* pueden aportar nitrógeno en la fitosfera (superficie foliar), o bien en la rizosfera.

Por su parte, las cianobacterias pueden fijar nitrógeno utilizando luz solar como fuente de energía. Ya se ha citado el caso de la simbiosis *Nostoc-Azolla*, la mayor productora de nitrógeno fijado por Ha (600 kg), pero existen otras que se pueden aplicar para la fertilización de los arrozales (*Gloeotrichia* y *Scitonema*) e incluso de trigales (*Nostoc*). Las asociaciones cianobacterianas también ocurren en dicotiledóneas herbáceas (*Gunnera*) hongos y diatomeas. Otros fototrofos fotosintéticos como *Rhodospirillum* pueden contribuir en ciertos ambientes anaeróbicos ricos en H_2S.

Por último, es de destacar un tipo de simbiosis que incluye hongos, ya sea en los líquenes (con algas o cianobacterias) o con plantas superiores formando micorrizas. En las plantas fijadoras hay una asociación tripartita bacteria fijadora-planta-hongo y en el resto, una simbiosis entre un hongo (*Rhizoctonia*) y diversas especies de plantas superiores formando micorrizas de orquídeas (12.000 a 30.000 especies), de arbustos mediterráneos (chaparral), de plantas ericáceas, ectomicorrizas (pinos, robles) y micorrizas arbusculares, capaces de interaccionar con todo tipo de plantas, como las herbáceas de pastos, casi todas las plantas agrícolas (incluídas las leguminosas) y algunas especies arbóreas.

Las micorrizas proporcionan nutrientes (N, P, Zn, C y S) y protegen de plagas (antibióticos) y del estrés hídrico y por metales pesados. Los nutrientes se transfieren a la planta mediante mecanismos diferentes, dependiendo del grupo de micorrizas. En las microrrizas arbusculares, el intercambio se realiza a través de la interfase entre los arbúsculos (entramado de hifas intracelulares) e invaginaciones de la membrana plasmática de la célula radicular. El nitrógeno se incorpora a los compuestos orgánicos de forma similar al descrito en las plantas fijadoras de N_2, cuyo rendimiento mejora sensiblemente por el volumen de nutrientes que aporta la gran capacidad absorbente de las micorrizas. En otros caso, las micorrizas disminuyen la eficiencia fijadora de N_2 (presencia de herbicidas o plaguicidas, que se absorben más rápidamente, competencia por el fotosintato en el caso de la micorriza *Glomus* y el diazotrofo *Azospirillum*).

18.4.4. Interacciones entre formas nitrogenadas en el suelo y la atmósfera

El NH_4^+ es un catión inmovilizado en las partículas de suelo que en suelos neutros y aireados se transforma en NO_3^-, un anión móvil, que puede ser lavado por el agua de lluvia o regadío (10-100 kg de N por Ha y año) e introducirse en las capas freáticas produciendo problemas sanitarios graves (methemoglobinemia y cáncer). Además, el NO_3^- se puede reducir a óxidos de nitrógeno gaseosos que se escapan a la atmósfera, donde contribuyen al efecto invernadero o a procesos oxidativos estratosféricos (véase Capítulo 6).

Estos procesos tienen una importancia obvia en el equilibrio del nitrógeno en el suelo y su disponibilidad para las plantas, por lo que inciden en el problema del abuso de abonado amoniacal o nítrico. Un factor adicional a considerar es que la desni-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

trificación y la nitrificación no son excluyentes, dado que recientemente se ha demostrado que existe un tipo de desnitrificación aerobia que se puede combinar con la nitrificación produciendo una pérdida de nitrógeno amoniacal (Fig. 18.10).

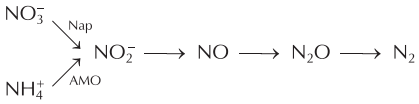


Figura 18.10. Acoplamiento entre la nitrificación y la desnitrificación aeróbica. Nap (nitrato reductasa periplásmica); AMO (amonio monooxigenasa).

El N_2O es un gas con un fuerte efecto invernadero por molécula, pero su contribución al calentamiento global es la tercera parte de la del CO_2 dada su escasa concentración en la atmósfera (0,3 µl por litro, frente a 1,7 µl del metano y 360 µl del CO_2) y su baja velocidad de aumento (0,75 nl por litro frente a 19 nl del metano y 1.750 nl del CO_2). El efecto del N_2O en la atmósfera es la generación de NO, un gas muy reactivo:

$$N_2O + h\nu \longrightarrow O^{\bullet} \qquad O^{\bullet} + N_2O \longrightarrow NO$$

En la atmósfera, el NO controla la producción de radical $HO^{\bullet}$, el principal oxidante del metano y de los óxidos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos. Además, el NO regula la fotoproducción de ozono y su oxidación a NO_2 acaba por generar HNO_3 (lluvia ácida) (véase Capítulo 6).

18.5. Miseria y esplendor de las plantas transgénicas

Como se ha dicho anteriormente, la necesidad de mejorar el rendimiento de las cosechas ha llevado a intentar acortar el tiempo para la obtención de variedades más productivas o mejores desde el punto de vista nutricional o de resistencia a plagas, obtenidas hasta ahora mediante prácticas de fitomejora.

El diseño de tecnologías capaces de transferir genes entre organismos diferentes ha permitido la obtención de variedades transgénicas que, en el caso de las plantas, están contribuyendo con creces a los objetivos de mejora rápida que se perseguían. Estas tecnologías están basadas en diversos soportes:

a) Plásmidos de bacterias fitopatógenas con capacidad transformante de células vegetales (plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*) (Fig. 18.11).

b) Procesos fisicoquímicos de transferencia directa de DNA (electroporación).

c) Mecanismos de bombardeo con nanopartículas de DNA.

d) Nuevas técnicas de silenciamiento o control de la expresión génica (RNA antisentido, RNAi, etc.).

La figura 18.12 presenta una técnica usual en la fabricación de plantas transgénicas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

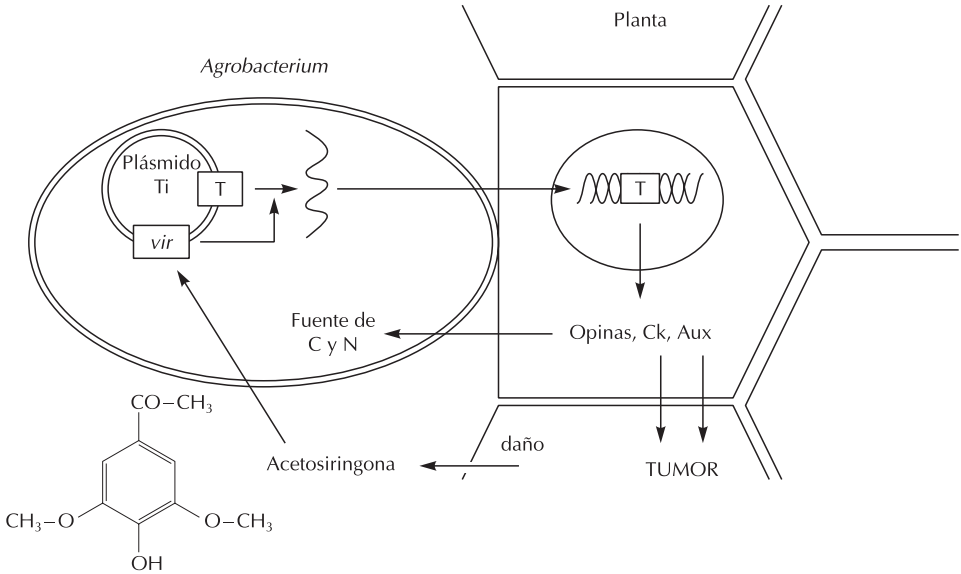


Figura 18.11. Infección y transferencia de DNA por *Agrobacterium*. Ck (citokininas); Aux (auxinas); T (DNA T); *vir* (genes de virulencia).

Los países occidentales y desarrollados no tienen otra opción que la de adoptar la biotecnología de plantas y animales transgénicos para optimizar los recursos agropecuarios. Su estilo de vida lo exige así y los países que no lo acepten tendrán que pagar un alto precio, y no sólo en divisas, para evitar el uso de alimentos transgénicos. Por su parte, los países en vías de desarrollo están prácticamente excluidos de la utilización de herbicidas y plaguicidas químicos de última generación debido a su altísimo coste (Roundup). Sin embargo, la tecnología del DNA recombinado aplicada a las plantas les podría ser más asequible desde un punto de vista económico, sobre todo en cuanto a la distribución de variedades resistentes a plagas. Ahora bien, tampoco está claro si el modelo agrícola occidental de monocultivo hiperproductor, basado en el abono masivo y en el tratamiento químico de las cosechas se debe trasvasar, tal

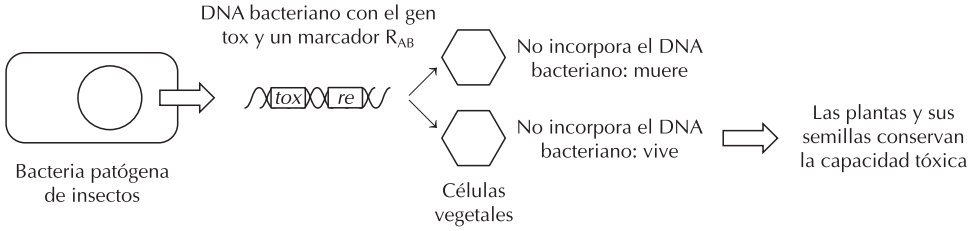


Figura 18.12. Fabricación de una planta transgénica. *tox* (gen que codifica una función letal para insectos; *re* (gen que codifica resistencia a un antibiótico, AB). Al cultivar las células vegetales en presencia del AB sólo sobreviven las que hayan incorporado el gen *re*, que va acompañado del gen *tox*.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

cual, al Tercer Mundo, donde se deben buscar soluciones mas satisfactorias desde un punto de vista ecológico y social.

En el año 2000, los países productores de cosechas transgénicas eran los Estados Unidos de Norteamérica (70%), Argentina (20%), Canadá (7%), China (1%) y otros (2%). Por su parte, la superficie total de cultivos transgénicos era de 45 MHa, de los que había 34 MHa en los países industrializados y 11 MHa en los países en vías de desarrollo. Los cultivos más comunes eran la colza, el algodón y el maíz resistentes a herbicidas, a insectos o a ambos.

La aplicación de los transgenes de interés agrícola conlleva el riego evidente de la dispersión de genes de resistencia a antibióticos (utilizados como marcadores moleculares, véase Capítulo 9), la aparición de especies de parásitos resistentes a los biocidas o el daño a insectos inocuos. No obstante, los estudios de campo no han encontrado, hasta ahora, indicios de tales efectos colaterales.

En este sentido, no hay que olvidar que la transferencia horizontal de material genético es un hecho probado y muy común entre microorganismos e incluso entre éstos y organismos superiores. La propia simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, tan beneficiosa para la agricultura, podría haber resultado de este tipo de intercambio génico (Capítulo 6). Por tanto, los organismos transgénicos no son extraños dentro de los procesos naturales, a los que por otra parte se viola continuamente, porque de otra forma la Humanidad no habría pasado de los remedios caseros o las prácticas de brujería contra las enfermedades.

La evolución es una carrera de armamentos entre presas y depredadores, especialmente aparente en las interacciones entre plantas, microorganismos y animales, que van perfeccionando sus genes de ataque y defensa mediante mutaciones al azar. La intervención humana introduce un factor acelerador en esta red génico-metabólica y por tanto no debe ser abusiva. Para evitarlo, como en el caso del abuso de los abonos sintéticos, se debe suministrar información para usar las nuevas armas de forma responsable. Se impone por tanto la continuación del esfuerzo investigador en este campo con el compromiso de sustituir los marcadores de resistencia por otros inocuos (por ejemplo, enzimas metabólicas) y de lograr combinaciones génicas que disminuyan la probabilidad de aparición de estirpes resistentes al tratamiento biológico. Todo esto, naturalmente, debe ir acompañado por un compromiso socio-político a escala internacional semejante al realizado con el Proyecto Genoma Humano para evitar la "rapiña génica" que las Compañías privadas tienden a ejercer para proteger sus patentes. No se pueden desdeñar los avances tecnológicos sobre una base falsa de pureza biológica, fundamentada normalmente en razonamientos demagógicos destinados a subyugar a públicos ignorantes. La tercera revolución verde está ahí y el futuro será de los países que hayan sabido aprovecharla, mejorando sus ventajas y aminorando sus riesgos.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Bibliografía

CASTILLO, F., CÁRDENAS, J. (1990). *Biología Molecular de la Fijación Biológica del Nitrógeno. Perspectivas Biotecnológicas*. Publicaciones Universidad de Córdoba.

GARCÍA OLMEDO, F. (1998). *La tercera revolución verde*. Ed. Debate.

SALT, D. E., SMITH, R. D. and RASKIN, I. (1998). "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 643-668.

LLOYD, J. R. (2003). "Microbial reduction of metals and radionuclides". *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 411-425.

LLOYD J. R., LOVLEY, D. R. (2001). "Microbial detoxification of metals and radionuclides". *Curr. Opinion Biotechnol.*, 12, 248-253.

LLOYD, J. R., MACASKIE, L. (2000) *Bioremediation of radionuclide-containing wastewaters. Environ. Microbe-metal interactions*. D. R. Lovley (ed.). ASM Press (2000).

PAUL, E. A., CLARK, F. E. (1996). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Inc.

SCHIEWER, S., VOLESKY, B. (2000). *Biosorption processes for heavy metal removal. Environ. Microbial-Metal Interactions*. Cap. 14, 329-361.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 19
TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Glosario
19.1. Emisión y transporte de contaminantes
19.1.1. Emisión
Emisiones atmosféricas
Vertidos acuáticos
Lixiviados de vertederos
19.1.2. Transporte
Transporte de sustancias líquidas
Transporte de sustancias gaseosas
19.2. Tratamiento de residuos urbanos (RU)
19.2.1. Introducción
19.2.2. Ámbito de aplicación
19.2.3. Situación actual de los RU en España
Composición de los RU
Reutilización
Reciclaje
Gestión de los RU
19.3. Tratamiento de aguas residuales
19.3.1. Generalidades
19.3.2. Tratamiento biológico aeróbico
19.3.3. Tratamiento biológico anaeróbico
19.3.4. Tratamientos terciarios
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Advección: Transporte de sustancias en corrientes acuáticas de flujo a una velocidad media lineal de filtración.
Agente flotante: Compuesto cuya densidad es inferior a la del agua.
Agente sumergidor: Compuesto cuya densidad es superior a la del agua.
Capacidad de campo: Mayor capacidad de un material para absorber agua.
DBO: Demanda bioquímica de oxígeno.
DCO: Demanda química de oxígeno.
Difusión: Transporte de sustancias debido al gradiente de concentración.
EPA: Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos.
Estela: Altura que alcanzan las emisiones gaseosas antes de curvarse y dispersarse.
Lixiviación: Filtración de líquidos a través de los distintos materiales del suelo.
RU: Residuos urbanos.
Volatilización: Proceso por el cual una sustancia química abandona la fase líquida para entrar en la fase gaseosa.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

19.1. Emisión y transporte de contaminantes

Para llevar a cabo una buena gestión de los residuos tóxicos es muy importante comprender de qué forma son liberados al medio ambiente. Hay tres parámetros a considerar: emisión, transporte y destino.

19.1.1. Emisión

Se produce en los tres estados de la materia: líquido, sólido o gaseoso.

- Emisiones líquidas:
  - Vertidos contaminados.
  - Descargas acuosas directas a las aguas superficiales.
  - Filtraciones hacia aguas subterráneas.
- Emisiones gaseosas:
  - Gases procedentes de la combustión.
  - Gases procedentes de la combustión incompleta de trazas de gases orgánicos.
- Emisiones sólidas (partículas):
  - Atmósfera: polvo de cenizas (metales pesados).
  - Aguas: sólidos suspendidos.

Los vertidos contaminantes pueden encontrarse o no bajo control: el objetivo del control es disminuir de algún modo los daños ocasionados al medio ambiente. Los vertidos no controlados pueden ser más o menos predecibles (gases de incineradoras), aunque otros son difícilmente determinables (escapes de tuberías o derrames de depósitos subterráneos).

Emisiones atmosféricas

Pueden ser de diversos tipos, como se muestra en la tabla 19.1.

Tabla 19.1. Tipos de emisiones atmosféricas.

Foco	Naturaleza
Puntuales	Chimenea de incinerador, ventilador de gases en un vertedero
Lineales	Polvo de pavimento, emisiones de automóviles
Zonales	Emisiones zonales de una charca
Volumétricas	Emisiones de un edificio con ventanas abiertas
Instantáneas	Emisiones procedentes de vertidos accidentales
Gaseosas	Compuestos orgánicos generados por volatilización
Materia particulada	Cenizas, metales pesados, compuestos orgánicos generados por la combustión o erosión eólica

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

- Emisiones gaseosas (volatilización).

  Proceso por el cual una sustancia química abandona la fase líquida para entrar en la fase gaseosa. Se generan emisiones gaseosas a partir de depósitos de almacenamiento, conexiones de tuberías, en la superficie de lagunas, aunque también pueden provenir del subsuelo.

  Este proceso depende de la temperatura, la presión, la presión de vapor de la sustancia y la diferencia de concentración entre los estados líquido y sólido de la sustancia.

- Emisiones de materia particulada.
  - Las incineradoras son las principales productoras de este tipo de contaminación. Las emisiones instantáneas tienen su origen en la manipulación de materiales y en áreas superficiales: carreteras, vertederos, operaciones de tratamiento de terrenos y depósitos de estabilización de residuos.
  - El polvillo producido a partir de terrenos con residuos tóxicos suele ser un grave problema para cuyo control se recurre a los siguientes parámetros:
  - La acción del viento: erosiona y traslada materiales fuera de los terrenos.
  - La cantidad de suelo perdido por causa de la erosión eólica de terrenos inactivos va en función de la velocidad del viento, cobertura vegetal, características de los terrenos y el área superficial expuesta.
  - La acción humana a la que ha sido sometido ese terreno (ej. el tráfico de vehículos).
  - Procesos de recuperación de terrenos: excavaciones, descarga, almacenamiento, etc.

Vertidos acuáticos

El agua es el medio principal por el cual se trasladan sustancias contaminantes debido al uso generalizado de realizar vertidos controlados sobre superficies acuáticas del tipo arroyos, ríos o lagos (depuración de incineradoras con aguas residuales, lixiviados tratados en vertederos y aguas procedentes de limpieza de instalaciones de reciclaje y reutilización).

Ya que el porcentaje de recuperación de estas aguas nunca es del 100%, siempre habrá sustancias contaminantes presentes en el medio ambiente (Tabla 19.2).

El vertido de sustancias tóxicas en aguas subterráneas no suele ser tan habitual.

Los vertidos controlados de residuos tóxicos son siempre muy controvertidos, ya que se supone que dichas sustancias deberían permanecer retenidas en los pozos de inyección en las capas rocosas profundas.

Los vertidos incontrolados se producen tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas, como es el caso de lixiviados de vertederos y las escorrentías contaminadas.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 19.2. Origen y factores que influyen en la presencia de sustancias contaminantes en el agua.

ORIGEN	FACTORES
Transporte vertidos	 Descargas y accidentes de tráfico
Almacenamiento vertidos escapes	 Defectos en la estructura Edad de la instalación
Vertederos escorrentía infiltraciones superficiales lixiviado a través de la base	 Cobertura, pendiente, retención de agua de lluvia
Lagunas de almacenaje Derrames, fugas Escapes	 Errores en la estructura Permeabilidad en la base

Lixiviado de vertederos

Se genera tras el derrame de líquidos sobre el terreno del vertedero. Existen varias causas que generan este proceso:

- Precipitación caída directamente sobre el vertedero.
- Flujo superficial que desemboca en el vertedero.
- La penetración de las aguas subterráneas hacia capas inferiores del vertedero (Fig. 19.1).

En un primer paso, el agua se filtra y es absorbida por los residuos sólidos cuando éstos se encuentran por debajo de su capacidad de campo (mayor capacidad de un material para absorber agua). Posteriormente el agua resbala entre ellos y por efectos de la gravedad y de reparto se produce la contaminación.

Todo vertedero que cumpla la normativa vigente deberá controlar periódicamente los lixiviados y encargarse de su recogida y eliminación. Siempre existirá un cierto grado de filtración en la base dependiendo de la conductividad hidráulica que presenten los materiales del terreno. También contribuyen a este fenómeno de emisión el deterioro sufrido con el tiempo, las picaduras, grietas, suturas mal soldadas, etc. Gran parte de estos escapes son recogidos en sistemas secundarios de almacenamiento de lixiviados.

Algunas de las sustancias contaminantes detectadas en el lixiviado de vertederos, según la EPA, se muestran en la tabla 19.3:

19.1.2. Transporte

Transporte de sustancias líquidas

En el transporte subterráneo de sustancias contaminantes líquidas influye sobre todo el flujo de las aguas subterráneas. Además, la distribución espacial y temporal

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

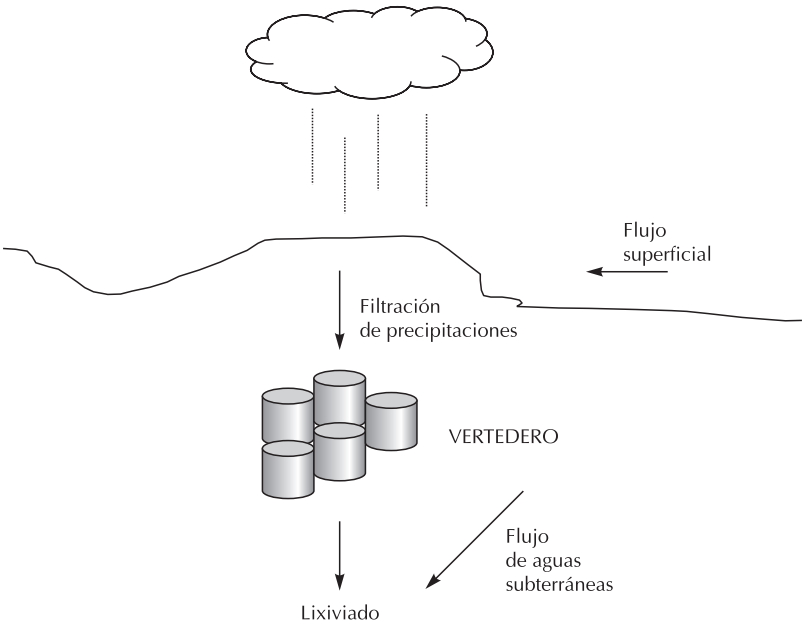


Figura 19.1. Origen del lixiviado de un vertedero.

Tabla 19.3. Sustancias contaminantes detectadas en el lixiviado de un vertedero.

SUSTANCIA		CONCENTRACIÓN ($\mu g \cdot l^{-1}$)
INORGÁNICAS	As	11-10.000.000
	Cd	5-8.200
	Cr	1-208,000
	Hg	0,5-7
	Pb	1-19.000
ORGÁNICAS	Benceno	1,1-7.370
	Cloroformo	0,02-4.550
	Cloruro de vinilo	140-32.500
	Diclorobenceno	10-517
	Fenol	3-17.000
	Tetraclorometano	1-25.000
	Tolueno	5-100.000
	Tricloroetileno	3-260.000

afecta a este traslado. Por lo tanto, será necesario analizar los procesos contaminantes de acuerdo con el ciclo hidrológico. En él hay que considerar los fenómenos de evaporación, escorrentía de aguas superficiales, corriente de agua, filtración, evapotranspiración y precipitación.

Otros parámetros a considerar son:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– La carga hidráulica. Fundamentalmente es un potencial que provoca el flujo de líquidos desde áreas de mayor a menor carga hidráulica.
– La diferencia de presión.
– La diferencia de altura.

Los mecanismos de transporte de sustancias líquidas contaminantes dependen de su solubilidad en agua:

– Las sustancias disueltas en el agua (solubles). El transporte de sustancias contaminantes en corrientes acuáticas de flujo a una velocidad media lineal de filtración se denomina advección. A gran escala es el suelo poroso el que regula la tasa de flujo y su dirección, aunque microscópicamente el agua fluye alrededor de las porosidades y a este fenómeno se le denomina dispersión mecánica. Otro parámetro a considerar es el debido al gradiente de concentración (difusión). Por lo general, las sustancias disueltas en el agua de media y alta conductividad hidráulica se transportan por advección, mientas que las sustancias de baja conductividad hidráulica se transportan por difusión.
– Los líquidos en fase no acuosa (poco o nada solubles). El transporte de estas sustancias es bastante más complejo ya que presentan distintas viscosidad y densidad que el agua. Si la densidad es superior a la del agua se denomina sumergidor (disolventes clorados), y si la densidad es menor a la del agua se denominan flotantes (productos petrolíferos). El traslado de estas sustancias depende de las fuerzas gravitacionales y de las diferencias de carga hidráulica.

El destino de estas sustancias líquidas en el subsuelo depende de una serie de procesos (transformación microbiológica) que ayudan al frenado o a la disminución de la concentración de las sustancias tóxicas. El frenado es consecuencia de los procesos que impiden su traslado (por eliminación o por inmovilización). Por el contrario, existen otro tipo de procesos naturales, tales como la disolución, ionización, formación de complejos, etc., que aumentan la movilidad de algunas sustancias contaminantes. Además, hay que considerar también los procesos de biodegradación e hidrólisis cuya consecuencia es la transformación de dicha sustancia.

Transporte de sustancias gaseosas

Las sustancias gaseosas se dispersan dependiendo de los factores naturales que afectan a su transporte, tales como propiedades de la estela, viento y turbulencias atmosféricas. Sin embargo, las predicciones no son muy fiables cuando se refieren a zonas muy próximas o muy lejanas del lugar de emisión.

– Elevación de la estela. Las sustancias tóxicas en suspensión muestran su efecto a ras del suelo, donde se sitúan los posibles receptores. La estela se define como la altura que alcanzan las emisiones antes de curvarse y dispersarse definitivamente. Por lo tanto, cuanto mayor sea la estela, menor es la concentración de contaminantes a ras del suelo. La elevación de la estela depende de su impulso y de su flotabilidad. La velocidad de salida de la chimenea proporciona

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

un determinado impulso a la estela. Además, los gases calientes, que tienen temperaturas más elevadas que la ambiental, provocan una baja densidad en la estela que la hace flotar en el aire. Un factor del que depende la flotabilidad de la estela es la velocidad de arrastre ocasionado por las fuerzas eólicas; a mayor velocidad de arrastre, menor flotabilidad de la estela.

Muchas emisiones de residuos tóxicos no proceden de chimeneas, sino que se producen a ras del suelo. En este caso, los impulsos y las diferencias de temperatura son mínimos. Aunque existan diferencias entre el peso molecular del aire y las sustancias contaminantes vertidas, las diferencias no son suficientes como para producir un flujo de flotabilidad. Por lo tanto, la elevación de la estela es mínima.

– Dispersión. El viento juega un papel importante en el traslado aéreo y, además, contribuye a dismuir la concentración. Por otro lado ayuda a que la materia particulada permanezca más tiempo en suspensión. Cuando las turbulencias son mayores, la estela alcanza el suelo antes. Las turbulencias dependen de dos factores, el viento y la estabilidad atmosférica que está relacioanda con el gradiente térmico atmosférico, la velocidad del viento superficial y del relieve del terreno.

19.2. Tratamiento de residuos urbanos (RU)

19.2.1. Introducción

Según el 5º Programa de Acción Europea se establece una estrategia comunitaria de gestión de residuos basada en la siguiente jerarquización de opciones para la gestión:

1. Prevención
2. Reutilización
3. Reciclado
4. Valorización energética
5. Eliminación en vertedero

La estrategia comunitaria de gestión de residuos contempla los siguientes aspectos:

a) El problema del crecimiento de residuos generados: se incluyen objetivos y actuaciones para reducir esta tendencia.
b) Lograr un desarrollo sostenible con alto nivel de protección del medio ambiente.
c) Disponer de estadísticas fiables en la planificación: elaborar, generar y suministrar los datos básicos sobre residuos producidos.
d) Todos los agentes económicos deben cargar con su parte específica de responsabilidad en la gestión, basándose en el principio de “quien contamina paga”.
e) Tener la prevención como primera prioridad en la jerarquía de actividades de gestión.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

f) Fijar objetivos cuantitativos para reducir la cantidad de residuos e incrementar la reutilización, reciclado y valorización de los mismos. De esta forma se pretende reducir en un 53,1% el volumen total de residuos destinados a vertido final en el año 2006. Se pasará del 70,4% de los RU totales vertidos en 1996, en su mayoría con poco control medioambiental, al 33,5% en el 2006, depositados en vertederos, que cumplirán la nueva Directiva de Vertido.

g) Será preferible la reutilización y valorización de materiales cuando éstos sean las mejores opciones medioambientales. Como ya se ha mencionado anteriormente, la eliminación final en un vertedero se contempla como la opción menos satisfactoria.

h) Se pretende potenciar los sistemas de devolución, recogida y valorización.

i) Fomento en los mercados para los productos reciclados, en especial para el plástico y el abono compuesto "compost".

j) Aplicar normas adecuadas de emisión a todas las instalaciones para la gestión de residuos, y en particular, a las plantas de incineración. España ha sido el primer país europeo que ha impuesto a las incineradoras de residuos urbanos las mismas exigencias en materia de emisiones de dioxinas y furanos que a las incineradoras de residuos peligrosos.

k) Se sellarán y restaurarán aproximadamente 5.000 vertederos incontrolados en desuso.

l) Cooperación en la lucha contra los traslados ilegales de residuos y contra los delitos ecológicos.

m) Apoyo económico para alcanzar los objetivos estratégicos.

n) Adoptar medidas de ayuda para la pequeña y mediana empresa (PYME) para incentivar medidas responsables de gestión de residuos.

19.2.2. Ámbito de aplicación

Quedan incluidos en este plan todos los residuos urbanos y municipales generados en domicilios particulares, comercios, oficinas y servicios, así como todos aquellos que tengan la calificación de no peligrosos y que se generen como consecuencia de cualquier actividad. Además, en el PNRU (Plan Nacional de Residuos Urbanos) se incluirán los tres grupos siguientes:

– Residuos procedentes de la limpieza de vías públicas, zonas verdes, áreas recreativas y playas.
– Productos textiles y residuos de maderas de origen doméstico.
– Otros residuos no peligrosos domésticos/comerciales (aceites y grasas vegetales y otros).

El plan impulsa la implantación de sistemas de gestión que garanticen la recogida selectiva y el tratamiento adecuado de forma separada del resto de RU, así como sus recipientes y materiales de envase, cuando se traten residuos del tipo:

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

– Colas y adhesivos.
– Pinturas, barnices y disolventes.
– Insecticidas y antiparásitos.
– Aceites minerales de origen doméstico.
– Aditivos y otros fluidos de automoción.
– Medicamentos y productos de uso terapéutico.
– Residuos eléctricos y electrónicos.
– Pilas y acumuladores usados.
– Vehículos fuera de uso.
– Neumáticos fuera de uso.
– Residuos de construcción y demolición.
– Residuos y despojos animales procedentes de mataderos, decomisos, subproductos cárnicos y animales muertos.
– Residuos voluminosos (muebles viejos, electrodomésticos usados, etc.).
– Barros y lodos de depuradoras municipales.

19.2.3. Situación actual de los RU en España

Actualmente se generan aproximadamente 1,2 kg de RU/habitante/día. Con algunas excepciones la gestión de estos residuos es deficiente: escasez de recursos económicos, poca conexión entre comunidades, escaso uso de material reciclado, infraestructuras insuficientes y obsoletas.

Composición de los RU

La última estimación en todo el país se realizó durante el año 1996 como se muestra en la tabla 19.4.

Tabla 19.4. Composición de los RU.

COMPONENTE	GENERACIÓN (Tm/año)
Materia orgánica	7.567.387
Papel/Cartón	3.637.704
Plástico	1.818.852
Vidrio	1.190.240
Metales férricos	589.109
Metales no férricos	116.791
Maderas	164.882
Otros	2.090.220
TOTAL	17.175.186

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Una estimación aproximada de la actualidad a base de consultas realizadas (sectores industriales) indican que aproximadamente el 30% de los RU pueden ser residuos de envases (RE), es decir, unos 5.000.000 millones de toneladas/año de RE. En cuanto al término "otros" de la tabla hace referencia a fracciones que incluyen textiles, gomas y cueros, elementos inertes (cenizas, cerámica, tierras, etc.), objetos voluminosos (muebles, electrodomésticos, etc.), pilas, baterías. Éstos podrían contribuir a un 2-3% de los RU totales. Por su posibilidad de reciclaje y su poder contaminante son de especial mención barnices, medicamentos, pinturas, etc. Se estima que una persona puede generar del orden de 2 a 3 kg/año (0,7% de los RU) de este tipo de residuos.

Reutilización

En la actualidad se reutilizan fundamentalmente envases de vidrio usados en las industrias relacionadas con la cerveza, aguas, refrescos y vinos (Tabla 19.5).

Tabla 19.5. Reutilización de los RU.

PRODUCTO	% AÑO
Aguas envasadas	11,6 (año 1997)
Bebidas refrescantes	18,0 (año 1997)
Cerveza	65,0 (año 1995)
Vino	2,4-4,0 (año 1995)

Reciclaje

Respecto a la recuperación y posterior reciclaje de los componentes de los RU, se ha estado desarrollando principalmente a través de dos líneas de actuación, una mediante la implantación de contenedores y recogidas específicos (papel/cartón y vidrio) favorecida por los respectivos sectores industriales, y la otra a través del tratamiento de los RU "todo uno" en plantas de clasificación y plantas de fabricación de abonos.

– Papel/cartón:

  En la última década se ha reciclado aproximadamente un 41-42% de papel y cartón, es decir 2.125.000 Tm. El desglose de este tipo de materiales según su origen (Tabla 19.6).

  En cuanto a papel no recuperable se refiere a papel higiénico, libros, pintados, de fumar, etc. Dado que el consumo de papel/cartón usado en 1996 fue aproximadamente 2.774.000 Tm, se tuvieron que importar 700.000 Tm para equilibrar nuestro balance.

– Vidrio:

  El reciclaje de envases de vidrio en España alcanzó en 1996 una tasa de recuperación del 35%, con 456.000 Tm recicladas, la cual se elevó al 37,3% en 1997 (Tabla 19.7).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 19.6. Reciclaje de papel/cartón.

ORIGEN		CONSUMO (Tm/año)(A)	RECICLADO (Tm/año)(B)	TASA DE RECICLAJE (B/A) %
Papeles Gráficos	Doméstico	1.650.000	950.000	42
	Comercial/industrial	600.000		
Envases	Doméstico	1.400.000	675.000	48
	Comercial/industrial	750.000	500.000	67
Otros no recuperables		770.000	0	0
TOTAL		5.170.000	2.125.000	41

Tabla 19.7. Reciclaje de vidrio.

	AÑO 1996	AÑO 1997
Consumo Tm/año (A)	1.303.410	1.409.438
Vidrio reciclado (B = C + D)	456.193	521.492
Doméstico/Municipal (C)	220.446	249.866
Otros domésticos (D)	235.747	271.626

– Plásticos:

  En España, un 66% de plásticos reciclados corresponde a la industria, un 18% al sector agrícola, un 7% al doméstico, un 7% al comercial y un 2% al de automoción. El polietileno es el plástico que más se recicla seguido del PVC (cloruro de polivinilo). En 1996 se consumieron 1.112.000 Tm de plástico para envase y embalaje, con una recuperación de 66.700 Tm/año (6,5%).

– Metales:

  La recuperación de acero se ha incrementado considerablemente en los últimos años, debido a la entrada en funcionamiento de nuevas plantas de reciclaje de RU (incineración y fabricación de abonos). Así, en 1995 se recuperó un 17,4% de los envases de acero, siendo del 23,2% en 1997. En cuanto a los envases de aluminio empleados es aproximadamente del 45% de los envases totales y en 1996 se recuperó aproximadamente un 17%.

– Envases compuestos:

  En esta denominación se incluyen los envases formados por diversos materiales, tales como cartón plástico, metales, etc. Los cartones para bebidas son los envases mayoritarios, constituyendo un 1% de los RU. Los datos de reciclaje en España más recientes son de 1999, siendo un 4,5%, mientras que es del 20% en otros países europeos.

– Madera:

  Este tipo de envase prácticamente no llega al usuario doméstico, siendo el sector hortofrutícola y los comercios los principales usuarios. En 1997 se consumieron 357.500 Tm/año de las cuales se recuperaron 34.200, es decir un 9,6%.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Gestión de los RU

Actualmente la mayoría de los RU son depositados en vertederos, y en algunos casos sin control alguno. Los datos mostrados en la tabla 19.8 se han elaborado teniendo en cuenta la generación total de RU en 1996.

Tabla 19.8. Gestión de los RU.

Sistema	RU tratados (Tm/año)	RU tratados (%)
Vertido autorizado	9.989.386	58,2
Vertido incontrolado	2.101.250	12,2
Reciclaje	1.985.040	11,6
Generación de abonos	2.394.162	13,9
Incineración (recuperando energía)	627.949	3,7
Incineración (sin recuperar energía)	77.399	0,5
TOTAL	17.175.186	100

Los principales problemas encontrados son:

a) Ausencia de estadísticas fiables y actualizadas.
b) Existencia de un elevado número de vertederos incontrolados (no cumplen la normativa de la nueva Directiva de Vertido) y pueden dar lugar a problemas de tipos sanitario y contaminación.
c) Existencia de plantas de incineración que no se ajustan a la normativa sobre emisión de contaminantes a la atmósfera, algunas de las cuales no disponen de sistemas para la recuperación de energía contenida en los RU.
d) El reciclaje y valorización de algunos materiales está muy lejos de conseguirse debido a que no existe ninguna Ley que los ampare.
e) Escasos conocimientos a nivel ciudadano.
f) Fuerte oposición social frente a cualquier iniciativa tendente a la construcción de infraestructuras o instalaciones para la gestión de RU.

Vertederos para RU

Los vertederos constituyen la forma más sencilla de eliminar los residuos sólidos con el mínimo coste directo. Dentro del vertedero los microorganismos anaerobios y facultativos atacan a los componentes orgánicos de los residuos. El contenido orgánico de un vertedero sufre una descomposición anaeróbica lenta durante un periodo de 30-50 años. En este periodo, el vertedero se hunde lentamente y se produce gas metano. No todos los materiales son susceptibles de ser degradados en un vertedero (a veces se han recuperado alimentos, periódicos, etc.; después de varias décadas de ser depositados). La basura expuesta produce varios problemas, tales como problemas de salud pública, de incendios, etc. En los vertederos controlados, los residuos se cubren con una capa de tierra, lo cual limita la proliferación de plagas y disminuye los problemas de salud pública. Aunque presentan algunos inconvenientes entre los cuales

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

hay que destacar: la falta de espacio en las sociedades urbanas, la construcción prematura de edificios en zonas donde había un vertedero, la filtración de metano puede provocar problemas sobre plantaciones, etc.

Fabricación de abonos compuestos

La fabricación de abonos es un proceso microbiológico que transforma los residuos orgánicos putrescibles en un producto estable e higiénico, parecido al humus, que es utilizable para la mejora de suelos. Para que se produzcan abonos se tienen que dar unas condiciones específicas de humedad (50-60%) y de proporción C : N (nunca puede ser del orden 25 : 1 o menor, ya que se produce un escape de amoniaco y eso produce mal olor y disminuye el valor del fertilizante). Es una buena alternativa a la utilización de vertederos para los RU sólidos domésticos y agrícolas. En principio supone la separación de la materia orgánica de la inorgánica, que puede hacerse en el lugar de origen o en el de recogida. La parte orgánica se entierra mezclada con el fango de aguas residuales y/o tiras de papel de periódico o virutas de madera que impidan el apelmazado. La fabricación de abonos se puede realizar mediante tres métodos diferentes:

a) Pilas estáticas (caballones).
b) Pilas aireadas o de alimentación continua.
c) Biorreactores.

a) Pilas estáticas:

En condiciones favorables, durante dos o tres días la temperatura se eleva hasta 55-60 °C (etapa termófila de esterilización), después baja progresivamente la temperatura (etapa mesófila) durante varios meses. Temperaturas superiores a 63 °C inhiben el proceso termófilo. Entre los microorganismos termófilos se encuentran los géneros *Bacillus*, *Clostridium, Thermoactinomyces*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, etc. Normalmente la concentración de oxígeno en el abono es 5 veces inferior que en el aire ambiental, el proceso de compostaje se acelera cuando la concentración de oxígeno es mayor, así que a veces las pilas se remueven mecánicamente para mantener las condiciones aeróbicas.

b) Pilas aireadas o de alimentación continua:

En este caso se consigue acelerar el proceso que tiene una duración total de unas tres semanas. Hay dos métodos:

– Succión de aire a través de cañerías perforadas que están enterradas dentro de la pila. En este caso se alcanzan temperaturas limitantes de 70-80 °C.
– En este caso se invierte el flujo y unos termostatos junto con una bomba que están colocados dentro de la pila inyectan el aire. Las temperaturas alcanzadas nunca pasan de 60 °C. La inyección de aire no sólo oxigena la pila, sino que hace que la temperatura disminuya considerablemente.

c) Biorreactores:

La fabricación de abono es mucho más rápida, ya que el proceso se completa en 2-4 días, después el producto ha de reposar al menos durante un mes antes

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

de ser comercializado. En este caso se requieren alrededor de 560 m^3/Tm de materia orgánica por día. La ventaja de este método es que se pueden planificar cómo va a ocurrir el proceso, aunque siempre es deseable hacerlo en el margen de la temperatura termófila para la eliminación de patógenos y por la aceleración del proceso a esas temperaturas.

19.3. Tratamiento de aguas residuales

19.3.1. Generalidades

Se generan como consecuencia del uso doméstico de agua y de diferentes actividades agrícolas e industriales. Mediante drenaje y el alcantarillado estas aguas alcanzan lo ríos, lagos y océanos.

La contaminación del agua puede ser de naturaleza muy diversa, orgánica e inorgánica, y alteran demasiado la salinidad, pH, oxigenación o temperatura del agua. Las aguas naturales tienen cierta capacidad de "amortiguación" ya que pueden autopurificarse: los microorganismos heterótrofos mineralizan los nutrientes orgánicos, el amonio se nitrifica y junto con los nutrientes inorgánicos son inmovilizados por las algas y las plantas superiores acuáticas. Las poblaciones bacterianas patógenas se reducen hasta que desaparecen por fenómenos de competencia y depredación.

En el tratamiento de aguas residuales existe un parámetro que indica el grado de contaminación de esas aguas denominado la demanda biológica o bioquímica de oxígeno (DBO). La DBO se define como la cantidad de oxígeno consumido como consecuencia de la oxidación microbiana de compuestos. La DBO se mide preparando un medio saturado de oxígeno que contiene microorganismos y se incuba en condiciones óptimas durante 5 días a 20 °C. Otro parámetro a considerar es la demanda química de oxígeno (DCO), determinada usando oxidante fuertes. Como existe producción de biomasa, la DBO es siempre menor que la DCO. La consecuencia principal de una contaminación fuerte por aguas residuales es el considerable descenso de oxígeno por la actividad de organismos heterótrofos en presencia de sustratos orgánicos abundantes. Esta falta de oxígeno mata a los organismos aeróbicos y se reduce la diversidad biológica.

El tratamiento de aguas residuales tiene como objetivo la reducción de la DBO y se realiza fundamentalmente en tres etapas. Las dos primeras causan una mayor reducción de la DBO y la tercera está más encaminada a la eliminación de nutrientes minerales y compuestos orgánicos recalcitrantes (Fig. 19.2):

1. Tratamiento primario en el que se utilizan métodos físicos que eliminan los sólidos (materia en suspensión) y reducen la DBO.
2. Tratamiento secundario que emplea métodos biológicos (degradación microbiana), aeróbicos fundamentalmente, para eliminar (mediante oxidación) compuestos orgánicos disueltos y reducir la DBO. Los tratamientos anaeróbicos son muchos más lentos que los aeróbicos pero a la vez son bastante más económicos y permiten un ahorro de energía y no hay que bombear oxígeno.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

3. Tratamiento terciario que emplea métodos físico-químicos y/o biológicos para eliminar componentes específicos tales como amonio y fosfatos. El objetivo de este tipo de tratamiento es la eliminación de materia orgánica y nutrientes no biodegradables. Actualmente hay tratamientos secundarios capaces de eliminar sales nitrogenadas y fosfatos.

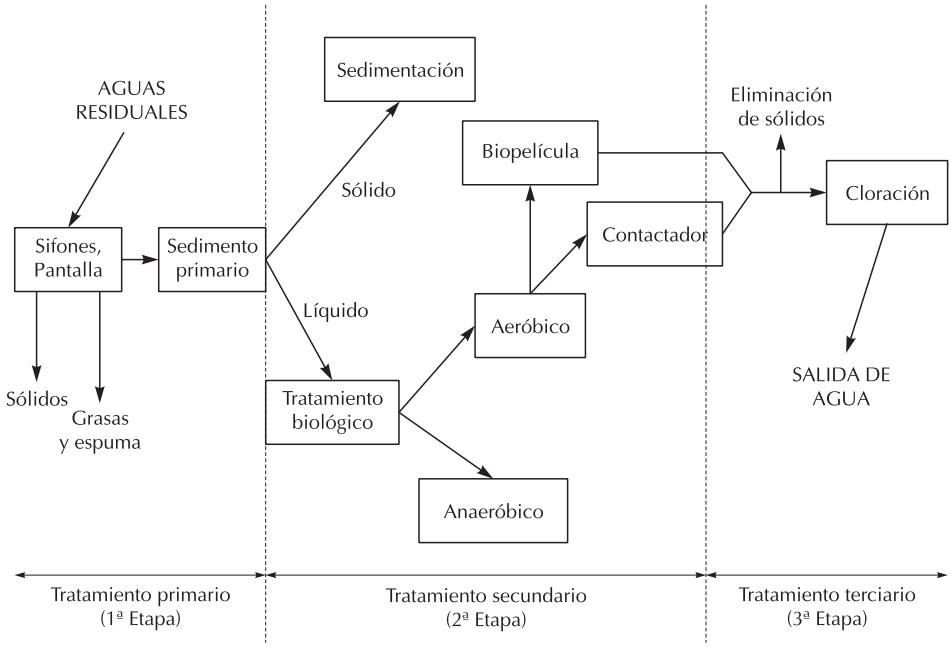


Figura 19.2. Etapas del tratamiento de aguas residuales.

El agua entra en la planta depuradora a través de sifones, pantallas y mecanismos de espumación para eliminar los objetos más grandes, arenilla, espuma flotante y grasa. Este primer proceso se realiza en tanques de sedimentación o piletas. Los sólidos decantados se pueden someter a digestión anaeróbica y/o compostaje antes de la distribución final en terraplenes o como acondicionadores del suelo. La mayor parte de la materia orgánica suspendida o en disolución no se mineraliza. La materia orgánica suspendida se elimina por sedimentación. La parte líquida de las aguas residuales que contiene la materia orgánica disuelta se somete a tratamiento adicional o se vierte después en el tratamiento primario. Aunque los residuos líquidos varían en composición, si contienen poca materia orgánica disuelta y principalmente sólidos, este tratamiento primario puede eliminar el 70-80% de la DBO. Si son aguas residuales domésticas típicas el tratamiento primario sólo elimina un 30-40% de la DBO y se requiere un tratamiento secundario aeróbico o anaeróbico. En éste se mineraliza una menor proporción de la materia orgánica disuelta y una gran parte disuelta se transforma en sólido para una mejor eliminación.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

19.3.2. Tratamiento biológico aeróbico

Los nutrientes orgánicos disueltos son absorbidos y mineralizados por una comunidad microbiana:

1. Mediante biopelículas fijadas (filtros por goteo).

   Las aguas residuales se reparten mediante un brazo giratorio sobre una capa de material poroso que asegura la oxigenación pasiva. El fluido se va filtrando y el vertido se acumula en el fondo donde se produce el crecimiento bacteriano denso y viscoso (bacterias pertenecientes al género *Zooglea ramigera*). Sobre esta matriz crecen otras bacterias, hongos, protozoos, nematodos y rotíferos (biopelícula) que reducen la DBO.

2. Mediante contactador biológico giratorio (biodisco).

   Este sistema, aunque es más caro que el de biopelículas fijadas, es más eficaz y requiere mucho menos espacio. Las aguas se recogen mediante unos discos giratorios, que son generalmente de plástico, unidos por un eje y fuertemente compactados, generando un cilindro que se encuentra parcialmente sumergido en agua. En la zona sumergida se desarrolla una población microbiana similar a la de filtro por goteo. La parte externa de la biopelícula presenta un color blancuzco generado por filamentos de *Beggiatoa* y una parte interna de color oscuro perteneciente a la presencia de sulfuro de hidrógeno generado por especies sulfatorreductoras pertenecientes al género *Desulfovibrio* (Fig. 19.3). En la zona anóxica bacterias fermentadoras generan alcoholes y ácidos orgánicos que son utilizados a su vez por *Desulfovibrio*. El sulfuro de hidrógeno migra hacia la región aeróbica y es usado como donador de electrones por *Beggiatoa*. Este sulfuro de hidrógeno es transformado en azufre elemental que precipita dentro del organismo y que posteriormente se descompone generando de nuevo sulfatos que son utilizados en la zona anaeróbica por *Desulfovibrio*.

   La membrana de flujo crece hasta un grosor limitado ya que llega a un punto que impide que los nutrientes sean accesibles a las células que se encuentran en la parte más interna. Posteriormente se autolisan y se produce un desprendimiento de la capa de lodo que puede ser eliminada por sedimentación.

3. Filtros aeróbicos sumergidos.

   En este caso se aumenta considerablemente el rendimiento del proceso, que consiste en que el efluente se canaliza a través de un lecho que se oxigena por la base.

4. Biorreactores.

   Los materiales de soporte (arena, plástico, piedra pómez, etc.) se fluidifican con las aguas residuales mediante la inyección con una bomba hacia arriba. Esto requiere un gran gasto de energía, aunque se pueden realizar tratamientos anaeróbicos o bien aeróbico mediante la inyección de aire.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

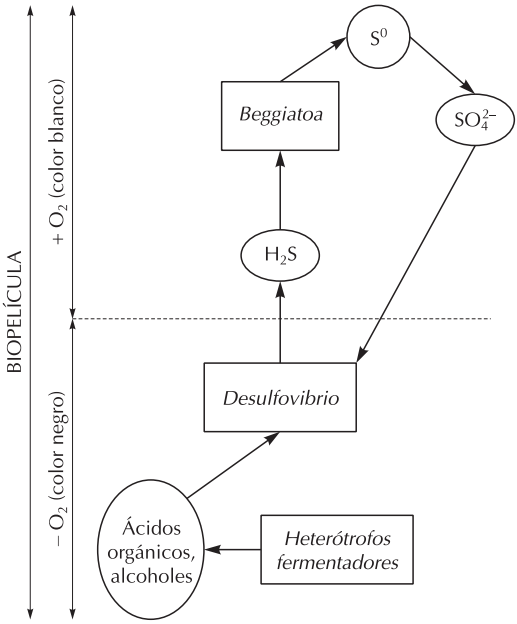


Figura 19.3. Esquema de un biodisco.

5. Mediante células en suspensión.

   En el tratamiento de aguas residuales, generalmente en primer lugar, se transfieren a una laguna donde precipitan los sedimentos más grandes y entre ellos la mayor parte de algas y bacterias; posteriormente el agua se transfiere a otra laguna de infiltración poco profunda y de gran extensión y de forma natural el agua vuelve al acuífero subterráneo. A este tipo de lagunas también se las denomina lagunas de oxidación ya que ahí se va a llevar a cabo la mayor parte de la oxidación de la materia orgánica. Con el tiempo, en estas lagunas se acumulan restos de células muertas, polisacáridos, sulfuro ferroso, etc. que impiden el proceso de infiltración de agua. Este problema se resuelve dejando las lagunas en reposo durante un tiempo y permitiendo su reoxigenación.

6. Mediante lodos activados.

   Se denomina así porque en este tipo de tratamiento hay una biomasa microbiana, fundamentalmente organismos heterótrofos, suspendida en los residuos líquidos a tratar durante todo el proceso. Este tratamiento se realiza después de la sedimentación primaria y consiste en el tratamiento aeróbico del agua que contiene materia orgánica disuelta. La mayor parte del lodo activado sedimentado se reintroduce de nuevo en el sistema para reducir al mínimo la pérdida de biomasa. En una etapa avanzada del proceso la mayor parte de la biomasa está asociada a flóculos (biomasa microbiana cementada por excreciones mucosas bacterianas como las producidas por *Zooglea ramigera*). La sedimenta-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ción primaria junto con este tratamiento reducen la DBO entre un 5-15%. Además, en los sistemas actuales también se consigue eliminar la presencia de sales de nitrógeno y fosfato. Esto es muy importante ya que consigue reducir la eutrofización, que se caracteriza por una progresión masiva inicial de microorganismos, sobre todo de algas, que provoca un consumo de oxígeno elevado provocando generalmente un cambio de poblaciones autóctonas en todos los habitats naturales.

10.3.3. Tratamiento biológico anaeróbico

Los digestores anaeróbicos son tanques de fermentación, que constan de un sistema mezclador, calefacción (normalmente a 37 °C), entrada de lodos, salida de los mismos ya estabilizados y toma de gas. En dicho tratamiento, la materia orgánica se transforma en ácidos grasos, CO_2 y H_2, en primer lugar por fermentación. Posteriormente se genera metano, por la reducción de grupos metilo o CO_2 con H_2 o a partir de productos parcialmente reducidos tales como metanol, monóxido de carbono, etc. La producción de biogás por bacterias metanogénicas compensa en parte los gastos ocasionados en este tipo de tratamiento.

10.3.4. Tratamientos terciarios

Se tratan los residuos que por su toxicidad no han podido ser degradados por microoganismos, tales como compuestos cloroaromaticos, bifenilos policlorados, etc. Para su tratamiento se utilizan filtros de carbono activado. El fosfato se precipita en forma de sales de calcio o de hierro. El amonio se elimina generalmente en forma de NH_3 a pH elevado, aunque se elimina en su totalidad cuando se añade cloro en forma de ácido hipocloroso, que se utiliza para la desinfección de las aguas que es el tratamiento final, generándose nitrógeno molecular como producto final.

Bibliografía

AHMED, N., QURESHI, F. M., KHAN, O. Y. (2001). *Industrial and environmental biotechnology*. Horizon Press.

ATLAS, R. M., BARTHA, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Addison Wesley, 4th ed.

LA GREGA, M. D., BUCKINGHAM, P. L., EVANS, J. C. (1996). *Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*. McGraw Hill, Inc.

RUSSEL BOULDING, J. (1994). *Description and sampling of contaminated soils. A Field guide*. Lewis Publishers.

PITTER, P., CHUDOBA, J. (1990). *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*. CRC Press.

WAINWRIGHT, M. (1999). *An introduction to environmental biotechnology*. Kluwer Academic Publishers.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

CAPÍTULO 20

LEGALIDAD Y ÉTICA DE LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Glosario
20.1. La comunidad internacional y el medio ambiente
20.1.1. El informe del MIT para el Club de Roma
20.1.2. El Informe Brundtland
20.1.3. Conferencia de las Naciones Unidas para el medio ambiente y desarrollo. UNCED (1992)
20.1.4. Conferencia de las Naciones Unidas para el medio ambiente y desarrollo. UNCED (2002)
20.2. La UE y la política ambiental
20.2.1. Principios técnicos
20.2.2. Principios económicos
20.2.3. Principios jurídicos
20.3. España y la política ambiental
20.4. Hacia un cambio de comportamiento
20.4.1. La tercera revolución verde
20.4.2. Educación ambiental
20.4.3. Evaluación del impacto ambiental
20.4.4. Seguimiento ambiental
Bibliografía

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glosario

Agencia Europea del Medio Ambiente: Organismo de la UE que proporciona a los estados miembros información medioambiental.

Conferencias de Estocolmo y de París (1972): Primeras reuniones de las NU sobre cuestiones ambientales.

Crecimiento cero: Congelación del crecimiento de la población y de la producción y redistribución de la riqueza.

Desarrollo sostenible: Solución de los problemas actuales sin comprometer el futuro del planeta.

Educación Ambiental: Concienciación por parte del público de los problemas ambientales.

Estudio de impacto ambiental (EsIA): Documento técnico del EIA.

Estrategia de Educación Ambiental (EEA): Programa de las comunidades autónomas sobre educación ambiental.

Evaluación de impacto ambiental (EIA): Identificación y prevención de las repercusiones ambientales de los proyectos de desarrollo.

Huella ecológica: Relación hectáreas de ecosistema/habitante.

Indicador ambiental: Variable ambiental que debe considerarse en la toma de decisiones políticas.

Informe Brundtland: *Nuestro futuro común* (1983). Solución de los problemas de la generación actual sin comprometer a las generaciones futuras. "Desarrollo sostenible".

Informe del MIT para el Club de Roma: *Los límites del crecimiento* (1972). Congelación del crecimiento de la población y de la producción y redistribución de la riqueza. "Crecimiento cero".

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

Protocolo de Kyoto: Limitación de las emisiones de dióxido de carbono.

Recursos renovables/no renovables: Equivale a recursos inagotables y limitados.

SALEM: Servicio de actualización de legislación medio ambiental.

Tercera revolución verde: Aplicación biotecnológica a la producción agrícola.

UNCED: Conferencias de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Desarrollo. Cumbres de Río de Janeiro (1992) y de Johanesburgo (2002).

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

20.1. La comunidad internacional y el medio ambiente

Las actividades humanas se han dirigido desde sus orígenes a obtener de la naturaleza todo lo que contribuyera a satisfacer sus necesidades inmediatas. Las transformaciones antropógenas eran insignificantes en la Antigüedad en comparación con los propios cambios naturales del medio. En realidad puede decirse que el ser humano era víctima entonces de casi todo lo que le rodeaba. Con la colonización de la tierra, el cultivo y la domesticación, el hombre comenzó a explotar los recursos y se convirtió en protagonista destacado de la Biosfera.

La formación de las ciudades planteó la necesidad de solucionar el deterioro que inevitablemente conlleva la aglomeración y de racionalizar los usos del espacio urbano. Los avances científicos y técnicos aceleraron la explotación del medio con objeto de obtener óptimamente bienes y servicios que mejoraran la calidad de vida. La obsesión por aumentar la productividad ha propiciado desde la Revolución Industrial un desarrollo incontrolado que, después de la Segunda Guerra Mundial, se ha multiplicado considerablemente. Ahora se han cambiado las tornas y puede decirse que el medio es víctima de la Civilización.

No fue hasta los años sesenta del pasado siglo cuando se tomó consciencia general de que las actividades humanas estaban alterando los parámetros fundamentales que condicionan los equilibrios naturales y que se podía afectar la supervivencia a escala planetaria. Desde el "Creced y multiplicaos, y henchid la tierra, y enseñoreaos de ella, y dominad a los peces del mar y a las aves del cielo y a todos los animales sobre ella" (Génesis I, 28) hasta "El progreso social y económico debe resolver las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer las suyas" (Informe Brundtland,1983) sólo han pasado unos pocos milenios. Entre los esfuerzos mundiales por solucionar los problemas ambientales cabe destacar los siguientes hitos.

20.1.1. Informe del MIT para el Club de Roma. *Los límites del crecimiento* (1972)

1) Si las actuales tendencias de crecimiento en la población mundial, industrialización, contaminación, producción de alimentos y explotación de recursos continúan sin modificaciones, los límites del crecimiento en nuestro planeta se alcanzarán en algún momento del próximo siglo.
2) Es posible alterar estas tendencias y establecer condiciones de estabilidad económica y ecológica que puedan sostenerse en el futuro.
3) Si la población mundial decidiera encaminarse en este segundo sentido, cuanto antes inicie esfuerzos para lograrlo, mayor será su posibilidad de éxito.

La solución del Club de Roma se llama "crecimiento cero", una congelación del crecimiento de la población y de la producción y una redistribución de la riqueza.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

20.1.2. Informe Brundtland de la Comisión Mundial sobre el medio ambiente y desarrollo. *Nuestro futuro común* (1983)

1) Erradicación de la pobreza del Tercer Mundo mediante una ayuda inmediata que incluya la condonación de la deuda externa y una inyección económica. Automáticamente se produciría una disminución de la natalidad.
2) Protección de la producción del Tercer Mundo y ahorro de energía en los países desarrollados. La industria debe asumir el coste de la contaminación.

La solución del Informe Brundtland se llama "desarrollo sostenible", el progreso social y económico que resuelva las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer las suyas. Para que haya desarrollo sostenible se tienen que dar tres condiciones:

a) El ritmo de explotación de los recursos renovables no puede exceder el de su generación.
b) El ritmo de consumo de los recursos no renovables ha de ser menor que el de sustitución por recursos renovables.
c) El ritmo de contaminación debe ser inferior al de absorción y procesamiento del ambiente.

20.1.3. Conferencia de las Naciones Unidas para el medio ambiente y desarrollo. UNCED (1992)

1) *Declaración de Río*. Reconocimiento del derecho de las naciones a utilizar sus recursos propios siempre y cuando al hacerlo no dañen el medio ambiente en otros lugares.
2) *Convenio sobre Cambio Climático*. Obligación de las naciones industrializadas a reducir sus emisiones de CO_2 y otros gases invernadero hasta alcanzar los valores de 1990.
3) *Convenio sobre Biodiversidad*. Protección de la diversidad biológica, su uso sostenible y la distribución de los beneficios de los nuevos productos.
4) *Agenda 21*. Descripción de los instrumentos políticos necesarios para un desarrollo respetuoso con el medio ambiente.

20.1.4. Conferencia de las Naciones Unidas para el medio ambiente y desarrollo. UNCED (2002)

En la Cumbre de Johanesburgo, calificada por muchos autores como una mera declaración de intenciones, se ha constatado que gran parte de los indicadores ambientales dicen que la situación ha empeorado en los últimos años. Según M. Delibes de Castro (2002) "Es cierto que estamos más cerca del abismo, ..., pero también es verdad que somos más conscientes del peligro".

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

En la tabla 20.1 se resumen los esfuerzos mundiales de los últimos años sobre la problemática medioambiental.

Tabla 20.1. Reuniones Internacionales sobre Medio Ambiente.

REUNIÓN	AÑO	ASUNTO
Declaración de París	1972	Agua y Desarrollo Sostenible
Declaración de Estocolmo	1972	Medio Ambiente
Convenio de Viena	1985	Capa de ozono
Protocolo de Montreal	1987	Destrucción de la capa de ozono
Cumbre de Río	1992	Desarrollo Sostenible
Convenio de Nueva York	1992	Cambio Climático
Convenio de París	1994	Desertización y sequía
Protocolo de Kyoto	1997	Emisiones de dióxido de carbono
Convenio de Rotterdam	1998	Comercio de productos peligrosos
Convenio de Basilea	1989	Transporte mercancías peligrosas
Declaración de Bahía	2000	Seguridad química
Convenio de Estocolmo	2001	Contaminantes recalcitrantes
Cumbre de Johanesburgo	2002	Desarrollo sostenible

En la tabla 20.2 se da una lista de las organizaciones más importantes relacionadas con el medio ambiente.

Tabla 20.2. Organizaciones Internacionales y Medio Ambiente.

ORGANISMO	SEDE	www.
Agencia Internacional de la Energía (IEA)	París	iea.org
Comisión para el Desarrollo Sostenible (CSD)	Nueva York	un.org/esa/sustdev
Convenio para la Lucha contra la Desertificación (UNCCD)	Bonn	unccd.int
Agencia de Protección Ambiental (EPA)	Washington	epa.gov/infoterra
Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático (IPCC)	Ginebra	ipcc.ch
Org. de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE)	París	ocde.org
Org. N.U. para la Agricultura y Alimentación (FAO)	Roma	fao.org
Organización Mundial de la Salud (OMS). Oficina Europea	Copenhague	who.int/es
Prog. N.U. para el Medio Ambiente (PNUMA). Oficina Europea	Ginebra	unep.org
Programa de las N.U. para el Desarrollo (UNDP)	Nueva York	undp.org
Programa Hombre y Biosfera (MAB)	París	unesco.org/mab
Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)	Bruselas	iucn.org
Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA)	Copenhague	eea.eu.int
Comité Científico sobre Problemas ambientales (SCOPE)	París	

En el cuadro 20.1 se resumen las figuras jurídicas medioambientales.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Cuadro 20.1. Niveles y tipos de normativas medioambientales.

NIVEL	TIPO			
Internacional	Convenios y Tratados			
Unión Europea	**Disposición** Reglamento Directiva Decisión Recomendación	**Alcance** General General Concreto Gen/Conc	**Obligatoriedad** Total Parcial Total Valor escaso	**Aplicabilidad** Directa Transposición Directa –
Estado	**Rango**		**Aprobación**	
	Ley (Orgánica, Ordinaria)		Parlamento	
	Real Decreto		Gobierno	
	Orden		Ministerio	
Autonomía	Ley autonómica		Parlamento autonómico	
	Decreto		Gobierno autonómico	
	Resolución		Consejería	
Municipio	Ordenanza		Gobierno municipal	

20.2. La UE y la política ambiental

Los Tratados de París (1951) y Roma (1957) que dieron origen a la Comunidad Europea (Tabla 20.3) se firmaron en una época de depresión posbélica en la que la recuperación económica y el desarrollo primaban sobre cualquier otro tipo de consideración y, por tanto, el medio ambiente no entraba en las ecuaciones.

Tabla 20.3. Fechas clave de la Comunidad Europea.

TRATADOS	AÑO	ASUNTO
París y Roma	1951, 1957	Fundación
Acta Única	1986	Europa de los Once
Maastricht	1992	Europa de los Quince
Niza	2001	Ampliación a los Estados del Este

Las Conferencias de Estocolmo y de París (1972), organizadas por las Naciones Unidas, marcaron el punto de inflexión a nivel internacional en lo que respecta a consideraciones ambientales. Ese mismo año la Comisión envió al Consejo Europeo una comunicación sobre protección del medio ambiente y a partir de entonces se propusieron programas (Tabla 20.4), el último de los cuales estuvo vigente hasta 1992.

Tabla 20.4. Primeros programas medioambientales de la Unión Europea.

PROGRAMA	AÑO	ENFOQUE
Primero	1973	Medidas correctoras sobre la atmósfera y el agua.
Segundo	1977	Insistencia en el programa anterior. Control del ruido.
Tercero	1983	Relación protección ambiental-empleo. Prevención.
Cuarto	1987	Normas más estrictas. Información y educación ambientales. Biotecnología.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Con la aprobación del Acta Única (1986) y la integración de España y Portugal se ponen en funcionamiento los principios básicos (técnicos, económicos y jurídicos) de la política ambiental comunitaria, de los que derivan la mayoría de las normas vigentes en la actualidad. En 1990 se crea la Agencia Europea del Medio Ambiente con el objetivo de proporcionar a los estados miembros información científica y técnica que permita adoptar medidas preventivas y correctoras y transmitir a la opinión pública la situación del medio ambiente.

20.2.1. Principios técnicos

El control de la contaminación puede ejercerse sobre las emisiones y sobre la calidad del medio. El primero fija valores límite de emisión y es más restrictivo y eficaz puesto que permite identificar fácilmente el foco infractor de la norma. El segundo fija un nivel mínimo de calidad dependiendo de la vulnerabilidad del enclave.

20.2.2. Principios económicos

Todos los métodos destinados a sufragar los costos de la contaminación se basan en la internalización de los beneficios, bien por parte del que la produce ("Quien contamina, paga"), bien del benefactor del servicio (contraprestación del consumidor).

Ya que el deterioro ambiental tiene una causa económica, parece apropiado que los intentos de solucionarlo consideren los principios de la economía. El ideal del desarrollo sostenible, adelantado por J. S. Mill con su teoría del estado estacionario (1848) se puede ubicar entre el optimismo del crecimiento sin límites de A. Smith (1776) y el pesimismo de T.R. Malthus con su relación recursos/población (1798) y de D. Ricardo y su ley de los rendimientos decrecientes (1821).

El concepto de mercado se basa en la idea de que en toda transacción libre, cada una de las partes tiende a mejorar su situación actual y asume los costos y beneficios que conlleva. El mercado fracasa cuando se producen externalidades (deseconomías), esto es, cuando una asignación errónea de los recursos posibilita que partes no intervinientes participen de los costos y beneficios. La meta fundamental de la Economía ecológica es desarrollar un análisis de costos/beneficios de las transacciones en los que se evalúen todos los componentes del ambiente y la biodiversidad. Como ya adelantó A. Smith, es injusto que "en el sistema mercantil, el interés del consumidor se sacrifica de forma casi constante al interés del productor".

El método de J. A. McNeely *et al.* (1990) asigna valores tanto a los bienes privados que implican recolección (valores directos) como a los bienes públicos de propiedad común (valores indirectos) según la siguiente partición:

- Directos
  - Uso consuntivo: Empleados localmente.
  - Uso no consuntivo: Vendidos en los mercados.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

- Indirectos
  - Uso no consuntivo: “Servicios ecológicos”.
  - Potenciales: Opción de proporcionar beneficios en el futuro.
  - Intrínsecos: Valores éticos y estéticos.

Los términos más complejos de la ecuación se refieren a los valores indirectos. P. Saint-Marc (1971) ha propuesto una ecuación del bienestar:

$$B = \alpha N + \beta C + \gamma M \qquad (20.1)$$

donde $\alpha + \beta + \gamma = 1$ y N es el nivel de vida (renta percápita o consumo), C son las condiciones de vida (trabajo y hogar) y M el medio de vida (ambiente).

En países desarrollados (D) N y C son temas más o menos resueltos, pero en países subdesarrollados (SD) N está sin resolver y C es mediocre. R. Tamames (1977) ha indicado que, a modo de ejemplo, se podría escribir:

$$B_D = 0{,}1\ N + 0{,}2\ C + 0{,}7\ M$$

$$B_{SD} = 0{,}8\ N + 0{,}15\ C + 0{,}05\ M$$

20.2.3. Principios jurídicos

La mayoría de la legislación se apoya en los artículos 2, 36, 100 y 235 del Tratado de Roma. El artículo 2 se refiere a la necesidad de un desarrollo armonioso de las actividades económicas. El 36 arbitra las restricciones por razones de salud, ecológicas y patrimonio histórico-artístico. El 100 armoniza la legislación estatal-comunitaria. El 235, calificado de cajón de sastre, autoriza al CE a legislar sobre materias no previstas.

Aunque el punto de partida difiere bastante de unos miembros a otros en parámetros estructurales e índices del desarrollo, se pretende conseguir un espacio ambiental europeo basado en los siguientes principios:

1. La protección del medio ambiente no debe considerarse como una política limitadora del desarrollo sino que debe contribuir al crecimiento económico y a la creación de empleo.
2. El instrumento capaz de prevenir las incidencias sobre el medio ambiente de las actividades socioeconómicas es la Evaluación de Impacto Ambiental (EIA).
3. Control de la contaminación transfronteriza mediante una red de sensores.
4. Adaptación de los diferentes sectores productivos a los parámetros de protección.
5. Solución intraterritorial de los problemas de eliminación y reciclado de los residuos que genera cada miembro.
6. Cooperación internacional sobre el cambio climático.

Actualmente se dispone de un servicio de actualización de la legislación medioambiental (SALEM). En la tabla 20.5 se recoge la legislación comunitaria.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 20.5. Legislación Comunitaria sobre Medio Ambiente.

MEDIO		RANGO	DOCE	FECHA
ACUÁTICO	Intercambio de información sobre calidad de aguas	Decisión	L 334	24/12/77
	Tratamiento de aguas residuales urbanas	Directiva	L 135	30/05/91
	Condiciones mínimas exigidas a los buques	Directiva	L 158	17/06/97
	Sobre el Derecho del Mar (1982)	Decisión	L 179	23/06/98
	Aguas destinadas al consumo humano	Directiva	L 330	05/12/98
	Mar Mediterráneo	Decisión	L 322	14/12/99
	Marco sobre política de aguas	Directiva	L 327	22/12/00
	Contaminación marina	Decisión	L 332	28/12/00
	Sustancias prioritarias en la política de aguas	Decisión	L 331	12/12/01
	Seguridad marítima	Reglamento	L 324	29/11/02
ATMOSFÉRICO	Intercambio de información sobre calidad del aire	Decisión	L 210	19/07/82
	Sustancias que destruyen el ozono	Reglamento	L 182	28/07/93
	Evaluación y gestión de la calidad del aire	Decisión	L 196	21/11/96
	Emisiones de los vehículos a motor	Directiva	L 125	16/05/97
	Incineración de residuos peligrosos	Decisión	L 267	07/03/98
	Contaminación atmosférica transfronteriza	Decisión	L 326	03/12/98
	Sobre la calidad de la gasolina y gasóleo	Directiva	L 350	28/12/98
	Emisión de CO_2 por automoción	Recomendación	L 40	13/02/90
	Emisión de compuestos orgánicos volátiles	Directiva	L 85	29/03/99
	Seguimiento de la emisión de gases con efecto invernadero	Decisión	L 117	05/05/99
	Contenido de azufre en combustibles	Directiva	L 121	11/05/99
	Contaminación por dioxinas	Decisión	L 232	02/09/99
	Valores límites sobre los contaminantes atmosféricos	Decisión	L 278	23/10/01
	Aprobación del Protocolo de Kyoto	Decisión	L 130	15/05/02
TERRESTRE	Disolventes	Directiva	L 189	11/07/73
	Detergentes	Directiva	L 347	17/12/73
	Gestión de residuos	Directiva	L 194	25/07/75
	Residuos tóxicos y peligrosos	Directiva	L 84	31/03/78
	Traslado transfronterizo de residuos peligrosos	Directiva	L 326	13/12/84
	Lista de residuos peligrosos	Decisión	L 356	31/12/94
	Clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos	Directiva	L 110	01/05/91
	Comercialización de productos fitosanitarios	Directiva	L 230	19/08/91
BIÓTICO	Contaminación de los bosques	Reglamento	L 326	21/11/86
	Conservación de hábitats naturales	Directiva	L 409	27/10/97
	Utilización de organismos modificados genéticamente	Directiva	L 117	08/05/90
	Comercio de especies amenazadas	Reglamento	L 201	20/07/92
	Organismos transgénicos	Directiva	L 106	17/04/01
EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL	Evaluación de los efectos de planes y programas en el Medio ambiente	Directiva	L 130	21/07/01

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

20.3. España y la política ambiental

La Constitución Española de 1978 (BOE de 27/12/78) marca en los artículos 45, 148 y 149 las directrices en materia medioambiental.

Art. 45

1. Todos tienen el derecho a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, así como el deber de conservarlo.
2. Los poderes públicos velarán por la utilización racional de todos los recursos naturales, con el fin de proteger y mejorar la calidad de la vida y defender y restaurar el medio ambiente, apoyándose en la indispensable solidaridad colectiva.
3. Para quienes violen lo dispuesto en el apartado anterior, en los términos que la ley fije, se establecerán sanciones penales o, en su caso, administrativas, así como la obligación de reparar el daño causado.

Art. 148

1. Las Comunidades Autónomas podrán asumir competencias en las siguientes materias:

   9º. La gestión en materia de medio ambiente.

Art. 149

1. El Estado tiene competencia exclusiva sobre las siguientes materias:

   23º. Legislación básica sobre protección del medio ambiente, sin perjuicio de las facultades de las Comunidades Autónomas de establecer normas adicionales de protección. La legislación básica sobre montes, aprovechamientos forestales y vías pecuarias.

En la tabla 20.6 se recoge la legislación estatal medioambiental.

La Península Ibérica, "un continente in miniatura", ha sido considerada tradicionalmente como un paraíso de biodiversidad (Tabla 20.7). Sin lugar a dudas es uno de los espacios europeos menos alterados y parecen apropiados todos los esfuerzos destinados a su conservación. Criterios científicos, sociopolíticos y de gestión han diferenciado diversas figuras de protección en España (6% de la superficie) entre las que destacan 12 Parques Nacionales y 81 Parques Naturales (10% y 61% de las áres protegidas).

20.4. Hacia un cambio de comportamiento

Un indicador del estado de salud planetaria puede ser la diversidad biológica y el índice de extinción (una especie se considera extinguida cuando han pasado 50 años sin ser vista). Aunque las causas más importantes de extinción (destrucción de hábitats e intercambio biótico) pueden ser naturales, se dispone de muchos indicios que apuntan a la acción antropógena. Esta es evidente desde la época de la expansión co-

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 20.6. Legislación Española sobre Medio Ambiente.

MEDIO		RANGO	BOE	FECHA
ÁMBITO GENERAL	Delito ecológico (Código Penal)	Ley Orgánica 8/83	152	27/06/83
	Bases de Régimen Local	Ley 7/85	80	03/04/85
	Ley de Sanidad	Ley 14/85	102	29/03/86
	Delito de incendio (Código Penal)	Ley Orgánica 7/87	297	12/12/87
	Evaluación impacto ambiental (EIA)	Real Decreto L 1.302/86	239	05/10/88
	Delito por tenencia de sustancias peligrosas (C.P.)	Ley Orgánica 3/89	148	22/06/89
	Fondo para el Medio Ambiente Mundial	Ley 7/94	113	12/05/94
	Acceso a la información ambiental	Ley 38/95	297	13/12/95
	Prevención y control integrados de la contaminación	Ley 16/02		02/07/02
ACUÁTICO	Contaminación marina	Ley 21/77	80	04/04/77
	Mar territorial	Ley 10/77	7	08/01/77
	Ley de aguas	Ley 29/85	189	08/08/85
ATMOSFÉRICO	Protección de la atmósfera	Ley 38/72	309	26/12/72
TERRESTRE	Residuos sólidos urbanos	Ley 42/75	280	21/11/75
	Residuos tóxicos y peligrosos	Ley 20/86	120	20/05/86
BIÓTICO	Organismos modificados genéticamente	Ley 15/94	133	04/06/94
	Conservación espacios naturales	Ley 41/97	74	05/11/97

Tabla 20.7. Diversidad ibérica comparada con la global.
(Diversos autores en F. Díaz Pineda *et al.*, Coords., 2002).

GRUPO	ESPECIES TOTALES	ESPECIES IBÉRICAS
Hongos	70.000	20.000
Briofitas	25.000	1.000
Plantas vasculares	220.000	7.500
Insectos	1.110.000	47.000
Artrópodos no insectos	125.000	5.300
Otros invertebrados	116.000	4.900
Vertebrados	44.000	1.068

lonial europea y la revolución industrial (desde el el año 1600 se ha registrado la extinción de 486 especies de vertebrados y 600 especies de plantas), pero también hay casos bien documentados de extinciones promovidas por los hombres primitivos.

Un equipo internacional coordinado por O. Sala (2000) ha presentado el primer modelo predictivo de los cambios que experimentará la diversidad a escala planetaria en el siglo XXI. Si los cinco factores generalmente considerados clave (clima, deposición de nitrógeno, erosión del suelo, aumento de CO_2 e intercambio biótico) actúan de forma sinérgica, se ha adelantado que el mayor impacto negativo tendrá lugar en los ecosistemas mediterráneos (Mediterráneo propiamente dicho, California, Chile Central, punta suroeste de África y Sur de Australia), en los que viven 25.000 especies de plantas (unos 13.000 endemismos) y más de mil especies de Vertebrados.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Alimentación, educación y desarrollo son las tres estrategias más importantes que pueden contribuir a paliar los problemas ambientales.

20.4.1. La tercera revolución verde

El desarrollo de la Humanidad está íntimamente ligado a las plantas cultivadas. Se estima que las especies vegetales aportan el 90% de las necesidades energéticas y, en última instancia, los alimentos de origen animal también dependen de ellas. La Agricultura ha pasado por tres revoluciones (F. García Olmedo, 1998), relacionadas con la variabilidad y, por tanto, con la Genética (sea de forma inconsciente o consciente):

a) Utilización de la variabilidad natural mediante selección artificial (a partir del Neolítico).

b) Creación de variabilidad mediante cruzamientos dirigidos (a partir de los hibridistas de los siglos XVIII-XIX, J. G. Kölreuter, F. C. Gärtner, G. Mendel).

c) Creación de variabilidad por manipulación genética (a partir de la ingeniería genética basada en la tecnología del DNA recombinado, 1970).

Los rendimientos de las cosechas actuales están muy próximos a los máximos teóricos que pueden lograrse en condiciones óptimas de cultivo. Por consiguiente, los esfuerzos han de dirigirse a obtener cosechas más productivas en condiciones reales porque sean menos vulnerables a los factores limitantes abióticos (agua, suelo) y bióticos (plagas) y empleen técnicas respetuosas con el medio ambiente. Puesto que la "agricultura ecológica" (con rendimientos del 60-85%) no es económicamente mantenible, sólo queda la alternativa de la "agricultura biotecnológica". Lo cual plantea el posible impacto ambiental de los organismos modificados genéticamente (OMG).

Ni todo lo natural es inocuo (piénsese en los venenos vegetales), ni todo lo artificial es nocivo (insulina humana obtenida por ingeniería genética). Ninguno de los conservantes alimentarios autorizados es más peligroso que las toxinas bacterianas que combaten. Todas las actividades humanas llevan asociadas un riesgo objetivo que ha de evaluarse en función de los beneficios que reporta. La Biotecnología no es una excepción. Cabe distinguir el riesgo intrínseco a la propia investigación y el derivado de la aplicación industrial. En lo que se refiere a la investigación en sí, parece que en la actualidad no hay serios reparos generalizados ya que la tecnología del DNA recombinado está muy bien fundada y se han superado los lógicos temores iniciales. Con respecto al uso comercial de los productos transgénicos, la lógica más elemental aboga por la prudencia y la aprobación de caso por caso.

La triple vertiente de los riesgos medioambientales que plantean los organismos transgénicos comercializados ha sido analizada por F. García Olmedo (1998) con relación a las plantas:

a) Dispersión incontrolada de la descendencia.

b) Transferencia génica desde los organismos transgénicos a los silvestres.

c) Inducción de resistencia por parte de los silvestres que se desea combatir.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tales riesgos no son exclusivos de los organismos transgénicos. Todos los organismos participan en una "lucha por la vida" que en muchos casos significa una auténtica "carrera de armamentos".

La directiva comunitaria en vigor (DOCE L 106, de 17/04/01) sobre comercialización de productos transgénicos incorpora todos los aspectos necesarios que se han aplicado en los últimos años:

1) Procedimiento de evaluación de riesgo para el medio ambiente basado en el principio de precaución.
2) Inclusión de los posibles efectos directos, indirectos y a corto y largo plazos.
3) Plan de seguimiento.
4) Periodo máximo de diez años de autorización.
5) Eliminación de los marcadores de resistencia a antibióticos en el 2004 para los cultivos comerciales y en el 2008 para los experimentos de campo.

La autorización de la comercialización debe aprobarse por mayoría cualificada entre los estados miembros y usarse en los países en los que lo aprueben las autoridades competentes.

La solicitud de autorización de una nueva modificación genética destinada a la comercialización se tramita en España a través del Ministerio de Medio Ambiente. Las propuestas deben contener la información especificada en el Anexo 5 del Reglamento 951/1997, que desarrolla la Ley 15/94 (BOE nº 103 de 04/06/94). La autorización para el consumo humano requiere, además, los requisitos establecidos por las autoridades sanitarias en los Reglamentos 258/97, 49/00 y 50/00. La Comisión Nacional de Bioseguridad estudia el expediente y propone su aprobación o denegación al Comité de Directores Generales. Una vez aprobado el expediente se remite a la Comisión Europea para que el resto de los países miembros procedan a su autorización.

20.4.2. Educación ambiental

La relación entre hectáreas de ecosistema requeridas para producir recursos y asimilar residuos y el número de habitantes (huella ecológica, W. E. Rees, 1992), es 1,9. La media en 1999 fue de 2,3, un 20% superior a la capacidad de la Tierra. Esta cifra se torna más preocupante cuando se considera que el 15 y 40% de la población consumen, respectivamente, el 56 y 11% de los recursos (5-10 ha y 0,5 ha, respectivamente). Esta realidad es claramente insostenible (J. C. del Olmo, 2002) y requiere un cambio de comportamiento.

La importancia de la educación en la conservación del medio ambiente se constató por primera vez en la Conferencia de NU sobre El Medio Humano (Estocolmo, 1972) y hay que reseñar las reuniones al respecto que han tenido lugar en Belgrado (1975), Tbilisi (1977), Moscú (1987) y Tesalónica (1997). En el Congreso de Moscú se definió la educación ambiental como "proceso permanente en el que individuos y comunidades adquieren consciencia de su medio y aprenden conocimientos, valores,

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

destrezas, experiencia y determinación que les capacite para actuar, individual y colectivamente, en la resolución de los problemas actuales y futuros".

El Libro Blanco de la Educación Ambiental en España (1999) concede un protagonismo destacado a las administraciones autonómicas a través de las Estrategias de Educación Ambiental. La Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía ha publicado su estrategia (EAdEA, 2003) donde se diagnostica la situación ambiental de la comunidad respecto al agua, suelo, biodiversidad, litoral, materiales y residuos, se analiza y valora la percepción social de los problemas ambientales (Tabla 20.8) y se presentan los escenarios de actuación (administración, sistema educativo, universidad, asociaciones, empresas, sindicatos, medios de comunicación, espacios naturales y centros de educación ambiental).

Tabla 20.8. Percepción social de los problemas ambientales andaluces.

REGIONAL		LOCAL	
PROBLEMA	%	PROBLEMA	%
Incendios forestales	63,5	Ruido	40,6
Contaminación	36,8	Suciedad calles	32,5
Falta de agua	34,1	Falta de parques	31,0
Erosión y desertificación	22,6	Calidad del agua de grifo	25,3
Desaparición de especies	20,0	Contaminación del aire	23,3
Contaminación del aire	19,7	Basuras y RSU	18,7
Otros	0,2	Deterioro paisaje urbano	17,1
NS/NC	1,5	Otros	2,0
		NS/NC	9,3

20.4.3. Evaluación del impacto ambiental

El Real Decreto 1.131/88 define la evaluación del impacto ambiental (EIA) como "Estudio realizado para identificar, predecir e interpretar, así como para prevenir, las consecuencias o efectos ambientales que determinadas acciones, planes, programas o proyectos pueden causar a la salud y bienestar humanos y al entorno". Los conceptos del EIA se resumen en el cuadro 20.2.

La legislación española obliga a realizar una EIA a las empresas que proyectan realizar alguna de las actividades encuadradas en doce grandes grupos (refinerías, centrales térmicas y nucleares, instalaciones químicas, construcciones civiles, etc.) susceptibles de repercutir negativamente en el medio ambiente. Así como el EIA es un instrumento gestor de carácter preventivo, el EsIA es un documento prospectivo que debe contener los siguientes apartados (D. López Bonillo, 2001):

a) Descripción del proyecto considerando tanto la fase de realización como la de funcionamiento.
b) Inventario ambiental previo a la realización del proyecto.
c) Identificación y valoración de impactos que producirá.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Cuadro 20.2. Conceptos fundamentales de la Evaluación del Impacto Ambiental. (V. Conesa Fernández-Vítora, 1997).

A) Adyacentes	Medio Ambiente (MA): Es el medio de la Antroposfera [factores abióticos, bióticos y culturales (económicos, sociales, estéticos, etc.)].
	Gestión Ambiental (GA): Acciones encaminadas a lograr la conservación, protección y mejora del MA.
B) Propiamente dichos	Impacto Ambiental (IA): Acción (proyecto, plan, ley) que produce una alteración en alguno de los componentes del medio ambiente.
	Evaluación Estratégica Ambiental (EEA): Procedimiento para evaluar las consecuencias de la política ambiental.
	Evaluación del Impacto Ambiental (EIA): Procedimiento jurídico-administrativo para interpretar, identificar y predecir el IA que produciría una acción.
	Estudio del Impacto Ambiental (EsIA): Análisis interdisciplinar incorporado al EIA que valora y, en su caso, corrige los efectos ambientales de una acción.
	Valoración del Impacto Ambiental (VIA): Fase final del EsIA que evalúa en unidades el IA.
	Declaración de Impacto Ambiental (DIA): Pronunciamiento de la autoridad competente en el que se determina la conveniencia o no de realizar la acción.
C) Intrínsecos	Calidad Ambiental (CA): Méritos del MA que conducen a conservar la esencia actual del MA.
	Indicador del Impacto Ambiental: Medida (cuali o cuantitativa) de la magnitud del IA.
	Fragilidad Ambiental: Susceptibilidad del MA de ser deteriorado por una acción.

d) Propuesta de medidas protectoras y correctoras.

e) Programa de vigilancia.

En lo que respecta a los aspectos técnicos del EsIA, el punto clave es el que concierne a la identificación y valoración de impactos. Existen multitud de procedimientos y a continuación se resume uno de los más sencillos.

Una matriz de impactos es una tabla de doble entrada en cuyas filas se disponen los factores medioambientales susceptibles de ser impactados F_i (Tabla 20.9) y en cuyas columnas figuran las acciones impactantes A_j identificadas mediante cuestionarios específicos, consultas a paneles de expertos, escenarios comparados, etc.

Posteriormente se elabora la matriz de importancia cuyos elementos identifican el impacto I_{ij} generado por la actividad A_i sobre el factor F_j según el algoritmo I que tipifica el impacto del proyecto dependiendo del carácter beneficioso o perjudicial (+/–), grado de incidencia (intensidad, I), área afectada (extensión, EX), tiempo de manifestación (momento, MD), persistencia (PE), reversibilidad (RV), sinergia (SI), acumulación (AC), efecto (EF), periodicidad (PR) y recuperabilidad (MC):

$$\boldsymbol{I} = +/- \ (3\ I + 2\ EX + MO + PE + RV + SI + AC + EF + PR + MC) \qquad 20.2$$

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tabla 20.9. Componentes medioambientales a considerar en un EsIA. (UIP, unidades de importancia).

SISTEMA	SUBSISTEMA	COMPONENTE	UIP
Medio físico	Abiótico	Aire	300
		Tierra/suelo	
		Agua	
	Biótico	Flora	200
		Fauna	
	Perceptual	Unidades de paisaje	100
Medio cultural	Social	Usos del territorio	275
		Estética	
	Económico		125

A cada sumando se le asigna un valor que oscila de 1 a 12 (para *I*), de 1 a 8 (para *EX*, *MO* y *MC*) o de 1 a 4 (para los restantes). La importancia va de 13 a 100 y se considera irrelevante (< 25), moderada (25-50), severa (50-75) o crítica > 75). La matriz de importancia es el punto de partida para un estudio más completo.

La toma de decisiones es fundamentalmente una cuestión política.

20.4.4. Seguimiento ambiental

Un indicador ambiental es una variable con, mayor significación que el puramente científico, que refleja una preocupación social sobre el medio ambiente y hay que

Tabla 20.10. Indicadores ambientales y socioeconómicos.

Ambientales	Aire (6)	
	Aguas	Calidad (7) Recursos (5)
	Costas y medio marino (10)	
	Medio terrestre	Residuos (6) Suelo (4)
	Medio urbano (8)	
	Accidentes (2)	
	Naturaleza	Biodiversidad (10)
		Ecosistemas (4)
Socioeconómicos	PIB y población (5)	
	Energía (3)	
	Transporte (6)	
	Agricultura (6)	
	Industria (1)	
	Turismo (3)	
	Gasto ambiental (3)	

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

considerar en la toma de decisiones. Los primeros indicadores ambientales se remontan en España a los propuestos por el Ministerio de Medio Ambiente en 1996 siguiendo normativas europeas y que incluían mediciones sobre la atmósfera, residuos, medio urbano y recursos naturales (biodiversidad, bosques, costas, medio marino, suelo y agua).

Actualmente el MMA está trabajando en indicadores que permitan integrarlos en las políticas sectoriales (M. A. Aguirre Royuela, 2000). En La tabla 20.10 se ofrece un resumen.

Bibliografía

AGUIRRE ROYUELA, M. A. (2000). *Los sistemas de indicadores ambientales y su papel en la información e integración del medio ambiente*. Primer Congreso de Ingeniería Civil, Territorio y Medio Ambiente. Madrid.

CONESA FDEZ.-VITORIA, V. (1997). *Guía metodológica para la evaluación del impacto ambiental*. 3ª Edn. Mundi-Prensa. Madrid.

GARCÍA OLMEDO, F. (1998). *La tercera revolución verde*. Debate. Madrid.

JA (2002). *Río + 10*. Consejería Medio Ambiente. Sevilla.

JA (2003). *Estrategia andaluza de educación ambiental*. Consejería Medio Ambiente. Sevilla.

LÓPEZ BONILLO, D. (2001): *El medio ambiente*. 3ª Edn. Cátedra. Madrid.

MMA (1999). *Libro blanco de la educación ambiental en España*. Secret. Gral. de Medio Ambiente. Madrid.

MOPU (1993): *Un futuro para ganar*. Secret. Gral. de Medio Ambiente. Madrid.

MULERO MENDIGORRI, A. (1999). *Introducción al medio ambiente en España*. Ariel. Barcelona.

PRIMACK, R. B., ROS, J. (2002). *Introducción a la biología de la conservación*. Ariel. Barcelona.

SEBIOT (2000). *Plantas transgénicas*. 3ª Ed. Madrid.

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

LISTADO DE PALABRAS, TÉRMINOS Y NOMBRES POR ORDEN ALFABÉTICO

A. calcoaceticus, 225, 453
A. thaliana, 232, 323, 538, 540
A. tumefaciens, 374, 453, 553
Abcísico, ácido, 264
Abies balsamea, 278
Abiótica, 43, 48, 156, 486, 496
Abrina, 271
Abrus precatorius, 271
Acacia, 273
Acetabularia, 216
Acetaldehído, 263, 429, 474, 518
Acetaminofenol, 519, 523
Acetato kinasa, 78, 109, 114, 134
Acetato, 61, 78-81, 101, 102, 105, 109-111, 114-123, 126-132, 135, 138, 142, 184, 192, 194, 206, 212, 213, 220, 223, 244, 269, 270, 286, 287, 305, 363, 405, 411, 418, 419, 519, 544
Acetil fosfato, 79
Acetil-CoA sintetasa, 110, 135
Acetil-CoA, 77, 101, 106, 107, 110, 112, 114, 115, 117-119, 121, 135, 138, 141-144, 190, 192, 427, 428
Acetivibrio, 401, 403
Acetobacter, 109, 124
Acetobacterias, 109
Acetobacterium woodi, 116
Acetomaculum ruminis, 138
Ácida mixta, fermentación, 110, 111
Acidithiobacillus thiooxidans, 236
Ácido fítico (hexafosfato de inositol), 212
Ácido fólico, 114
Ácido fórmico, 352, 410
Ácido hipocloroso (HOCl), 575
Acido lipoico, 108
Ácido murámico, 120
Acidobacterium capsulatum, 234
Acidófilos, 109, 207, 234, 385-387
Ácidos grasos, 45, 119, 128, 131, 260, 382, 384, 390, 404, 420, 430, 508, 510, 514, 515, 521, 575
Acidos picolínicos, 462
Acil kinasas, 79
Acinetobacter calcoaceticus, 225
Acinetobacter, 543, 545
Aconitasa, 119, 271, 274
Acoplamiento, 70, 75, 82,, 83, 90, 96, 98, 102, 135, 137, 180, 185, 183, 188
Activación, 59, 110, 157, 175, 188, 191, 192, 215, 261, 285, 282, 297, 305, 333, 341, 344, 426, 428, 450, 507, 508, 513, 518, 521, 526, 536, 545, 458
Actividad del agua (a_w), 387
Adaptación a la anaerobiosis, 263
Adaptación a la humedad, 263
Adaptación a la radiación solar, 258
Adaptación a la salinidad, 265
Adaptación a la temperatura, 258
Adaptación a metales, 264
Adaptación a temperaturas extremas, 261
Adaptación al clima, 258
Adaptación biológica, 12, 257
Adaptación molecular, 54
Adenilato ciclasa, 280, 341, 344
Adenilato quinasa, 238
Adenililación/desadenililación, 174, 175
Adenosina fosfosulfato (APS), 188, 198
ADEPT, 501
Advección , 436, 561
Aerobios nitrosos, 125
Aeschinomene virginica, 533
Aflatoxina, 516, 524
Agente flotante, 556
Agente sumergidor, 556
Agentes contaminantes, 31
Agricultura biotecnológica, 586
Agrobacterium, 180, 554
Agrobacterium tumefaciens, 372, 373, 551
Agrostis tenuis, 265
Agrupación P, 158
Aitia aristotélicas, 39
Akokhantera ouabaio, 271
Alan Maxam, 352
Alcaligenes, 182, 206, 445
Alcaligenes faecalis, 243
Alcalófilo, 378

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Alcalófilos, 74, 75, 337, 385-387, 393, 410
Alcaloides esteroideos, 280
Alcaloides, 256, 269-271, 273, 274, 278, 279, 281, 508
Alcanfor, 282, 458, 511, 512
Alcohol deshidrogenasa, 109, 110, 230, 233, 263, 297, 399, 519
Aldehído descarboxilasa, 238
Aldehído ferredoxina óxido-reductasa, 236
Aldolasa 1, 140, 145, 412
Aldrina, 508
Alelopatía, 256, 282
Alelopático, 530
Alfred Russel Wallace, 258
Almidón, 105, 110, 260, 303, 315, 395, 404, 417-419
Alnus incana, 263
Alnus, 162, 547, 550
Alquilfenoles, 362, 526
Alternaria alternata, 534
Alto espín, 512, 513
Alúmina, 235
Aluminio, ciclo biogeoquímico del, 235, 236
Aluminio, resistencia al, 236
Aluminio, toxicidad del, 235, 236
Alyssum, 538
Amigdalina, 272
Amino oxidasa, 237
Amino-4,6-dinitrofenol, 495
Amino-4-nitrofenol, 494, 495
Aminoácidos aromáticos, 428, 525
Aminoalifáticos, 491
Aminoarenos, 491
Aminoazúcares, 106, 153
Aminofenol, 487, 491
Aminoides, 269
Aminonitrotoluenos, 502
Amonificación, 155, 156,176, 182, 218
Amonio monooxigenasa (AMO), 178
Amonio, asimilación, 155,173-176, 180
Amonio, oxidación anaeróbica de, 184
AMP cíclico, 112, 257, 280, 344
AMP, 108, 119-121, 135, 150, 174, 192, 200, 333
Anabaena, 159, 160, 547
Anabaena azollae, 162
Anabolismo, 62
Andrógenos, 276, 528, 529
Androstanol, 520
Androstenol, 520
Angiospermas, 266, 267, 270, 273, 279, 284, 510
Anhidrasa carbónica, 230, 232, 233, 410
Antagonismo, 280, 532
Antena receptora de luz, 95
Anticuerpo, 309, 343, 413, 417, 501
Antimicina, 93
Antiporte electrogénico, 85
Antocianidinas, 267
Apigenina, 268
Aplasmomicina, 235
Apoptosis, 501
APS reductasa 189,191-193, 199, 200
Aquaquelina, 203, 205
Aquifex psycrophilus, 380
Arabidopsis thaliana, 232, 323, 538
Arabidopsis, 285, 539
Archaea, 34, 38, 60, 61, 102, 122, 262, 326, 379, 380, 384, 386, 388, 546
Archaeoglobus fulgidus, 117
Arcillas, 177, 213, 214, 216, 232, 235, 367
Arctia caja, 275
Armeria, 266
Arqueobacterias, 60, 93, 102, 104, 107, 109, 112, 117, 122, 126, 132, 138, 139, 156, 182, 194, 238, 239, 323, 379, 380, 383, 386, 387
Arseniato reductasa, 242
Arseniato, 238, 241-243, 252, 255
Arsénico, 233, 241-243, 252, 255, 265
Arsénico, ciclo biogeoquímico del, 241
Arsénico, resistencia al, 241, 242
Arsénico, toxicidad del, 241
Arsenito oxidasa, 239, 243
Arsenito, 238, 241-243
Arsenobetaína, 242, 265
Arsinas, 241
Arthrobacter, 220
Arum maculatum, 269
Arum nigrum, 269
Asclepias, 273
Ascorbato, 109
Aspartato transcarbamilasa, 230
Aspartato, 112, 120, 150, 230, 256, 259, 260, 263, 530
Aspergillus, 229, 301, 439, 569
Aspergillus flavus, 271, 524
Astragalus bisculatus, 540
Astragalus, 264, 265, 538

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

ATP quinasa, 186-188, 190
ATP sintasa, 75, 388
ATP sulfurilasa, 187-189, 190-192, 197, 199, 200
ATPasas translocadoras de iones metálicos débiles, 233
ATP-citrato liasa, 142
Atrazina, 362, 449, 527
Atriplex, 260, 266
Atropa bella-donna, 270, 271
Atropina, 270, 271
Autofosforilación-transfosforilación, 210
Auxinas, 516
Avogadro, número de, 70
Azolla, 162, 547, 549, 551
Azospirillum, 182, 547, 551
Azotobacter, 159, 551
Azotobacter chloroococcum, 239
Azotobacter paspali, 551
Azotobacter vinelandii, 171
Azoxi, compuestos, 497, 505
Azufre, ciclo del, 34, 35, 185-187
Bacillus, 124, 182, 206, 220, 301, 386, 411, 542, 569
Bacillus megaterium, 229, 514
Bacillus selenitereducens, 243
Bacillus subtilis, 171, 242
Bacillus thuringiensis, 286, 535
Bacteria, 38, 43, 60, 61, 82, 84, 163, 164, 167, 170, 184, 199, 213, 220, 221, 229, 232, 242, 252-254, 256, 257, 271, 286, 287, 289, 291, 301, 302, 326, 329, 373, 379, 380, 382, 389, 394, 410, 416, 429, 448, 449, 458, 463, 464, 466, 469, 470, 474, 476, 478, 481, 482, 490, 494, 503, 545, 546
Bacterias metanogénicas, 575
Bacterias nitrificantes, 89, 125, 156, 178, 185, 201, 207, 418
Bacterioclorofilas, 94
Bacteriofeofitina, 93
Bacteriorrodopsina, 83, 87, 388
Bacteroide, 168, 547
Bacteroides, 150, 164, 167, 168, 403, 547
Bajo espín, 512
Balance C/N, 183, 191, 486, 494, 495
Balance rédox, 80
Banda Soret, 506, 508
Bases pirimidínicas, 352
Bases púricas, 352
Basidiomicetos, 405
Beggiatoa, 198, 201, 572
Beijerinckia, 551
Benzaldehído, 280, 281
Benzilcinamato, 269
Benzimidazol, 521
Benzo(a)pireno, 523-525
Benzoato, 132, 285, 429, 452, 454
Benzopireno, 521
Bioacumulación, 222, 241, 472, 541, 543
Bioadsorción, 530, 514-543, 545
Biocidas, 370, 530, 532, 534, 555
Biodegradación, 12, 307, 360, 364, 368, 407, 423, 424, 426, 429, 434, 440, 441, 442, 444, 447, 449, 450, 463, 466-469, 471-473, 483, 486, 496-498, 502, 504, 505, 507, 508, 524, 525, 543, 561
Biodisponibilidad, 206, 400, 407, 416, 441, 449, 538
Biolixiviación, 252, 254-256
Biomagnificación, 33, 219, 222, 365, 422
Biominería, 251, 360
Biomoléculas, 17, 41, 61, 62, 67, 69, 103, 104, 109, 156, 186, 190, 237, 262, 379, 392
Biopelícula (biofilm), 358, 368-370, 572
Bioquímica ecológica, 257
Biorreactor, 358, 366, 417, 444, 502
Biorreactores, 255, 292, 365, 413, 417, 488, 496, 501, 503, 544, 569, 573
Biorreactores aerobios, 502
Biorreactores anaerobios, 501
Biorremediación, 222, 358, 364, 365, 415, 422, 446, 447, 450, 466, 486, 541, 543-545
Biorremediación de nitroaromáticos, 501
Biorremediación ex situ, 365, 368
Biorremediación in situ, 365, 488, 496
Biosensor, 308, 413, 415, 416
Biotecnología, 16, 28, 29, 33, 80, 81, 110, 113, 277, 323, 324, 339, 360, 377, 383, 392, 399, 405, 410, 425, 429, 435, 446, 460, 466, 486, 500, 508, 531, 554, 587
Biotecnología de las fermentaciones, 80
Biotecnología molecular, 323, 324
Biotransformación, 257, 275, 276, 447, 461, 487, 506-510, 514, 522, 523, 525, 526, 538, 540, 543, 544

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Biotransformación en plantas, 507, 526
Biotransformación, Fase I, 508
Biotransformación, Fase II, 521
Bioventing, 442, 443
Bisabolol, 269
Bisfenol A, 363, 525, 526
Boltzmann, constante, 70
Bombas de H^+, 85, 94
Bombix mori, 279
Bórax, 234
Bordetella pertussis, 341, 344
Boro, 234, 235, 289
Boro, ciclo biogeoquímico del, 234, 235
Boromicina, 235
Borrelia burgdorferii, 202, 219
Bosh, Karl, 545
Botrytis, 283
Brassica juncea, 538, 539
Brevibacterium, 445
Brocadia anammoxidans, 184
Bromo atómico, 245, 246
Brucella, 106
Butirato, 78, 81, 130-132, 184, 240
C. thermoaceticum, 114, 116, 411, 499
Cadena alimenticia anaeróbica, 288
Cadena alimenticia en el rumen, 130, 131
Cadena respiratoria mitocondrial, 90
Cadineno, 269
Cadmio, ciclo biogeoquímico del, 231
Caenorhabditis elegans, 323, 352
Cafeico, ácido, 280
Cafeína, 274
Caja pho, 210
Calcio, ciclo biogeoquímico del, 214-216
Calcocita (Cu_2S), 237, 246, 252, 254
Calcopirita ($CuFeS_2$), 237, 252
Caloría, 70
Calotropina, 273
Calvin, ciclo de, 63, 118, 138, 139, 142-144, 200, 202, 258, 411
Cambio conformacional, 87, 88, 136, 158
Campylobacter, 194, 196
Candida, 439
Cannabidiol, 275
Cannabis sativa, 275
Cannabis, 275, 537
Capa de ozono, 27, 248, 250, 251, 550
Capa de ozono, destrucción de la, 183, 245, 246
Capa de ozono, formación de la, 248
Capacidad de campo, 556, 559
Capacidad de carga del planeta, 26
Capacidad de contaminación, 16, 467
Capacidad transformante, 530, 553
Carbamazepina, 520
Carbamil fosfato kinasa, 79, 410
Carbónico, ácido, 218, 246
Carboxidotrofas, bacterias, 104, 123
Carboxilasa, 139, 141, 143, 144, 149, 258, 259, 261
Carboxilo, grupo, 78, 103, 173, 217, 525
Carboxipeptidasa, 230
Cardenólido, 273
Carotenoides, 267, 268, 270
Carotenos, 94, 95
Carvona, 276
Casuarina, 547, 550
Catalasa, 109, 199, 202
Catequinas, 541
Ceanothus, 547
Cellulomonas, 401, 403
Célula mínima, 59, 60
Células de Goblet, 536
Celulosa, 105, 131, 150, 167, 240, 279, 305, 363, 400-405, 418, 419, 542
Celulosomas, 402, 403
Centro de reacción, 64, 95, 96
Ceras, 274
Chaetomium, 569
Chaim Weizmann, 81
Chaparral, 282, 551
Charles Darwin, 258
Cheiranthus allionii, 280
Chlamydomonas nivalis, 382
Chlamydomonas reinhardtii, 113
Chlordecona, 527, 528
Chlorella, 545
Chloris, 266
Chlorobium, 95, 141, 142, 198, 200, 208
Chloroflexus, 95, 142, 143
CHO-MF sintetasa, 137
Chondrilla juncea, 534
Choque térmico, proteínas de, 262
Chromatium, 95, 198, 200, 208
Chrysiogenes arsenatis, 243
Chytridiomycetes, 403
Cianasa, 410, 415, 416
Cianato, 407, 410, 415, 416
Cianidina, 267, 268

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Cianuro, 137, 195, 255, 256, 270-272, 311, 400, 470-410, 417, 418
Cicasterona, 277
Ciclo de Krebs reductivo, 117, 138, 141, 142
Ciclo de Sharp, 59
Ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs (CAT), 49, 105, 106, 108, 109, 112, 114, 115, 117, 119, 120, 124, 138, 141-143, 168, 194, 265, 271, 274, 428, 451, 459, 574
Ciclo del carbono en la naturaleza, 104, 105, 147
Ciclo Fe(II)/Fe(III), 52
Ciclo fotosíntesis/respiración aerobia, 21, 86
Ciclohexano, 513
Ciclohexanol, 513
Ciclohidrolasa, 116, 134
Cinabrio (HgS), 223
Cinamato, 516, 525
Cinámico, ácido, 282
Cinc, ciclo geoquímico del, 231
Cinc, deficiencia de, 231
Cinética enzimática, 296
Citrobacter freundii, 229
Citocromo a, 207
Citocromo aa_3, 179
Citocromo b, 181, 244
Citocromo b_5, 199, 200, 511, 514
Citocromo b_{557}, 169
Citocromo bc_1, 92, 96, 97, 183
Citocromo c, 89, 179, 181, 199, 200, 208, 221, 243, 408
Citocromo c_3, 193, 240
Citocromo c_4, 207
Citocromo c_{550}, 181, 183
Citocromo c_{554}, 178, 179
Citocromo cd_1, 181, 183
Citocromo oxidasa, 61, 89, 91, 94, 113, 200, 237, 547
Citocromo P450, 274, 508-510, 513
Citocromos b y d, 263
Citocromos b, 135-137, 263
Citocromos o y d, 112
Citocromos P450 (CYP), 276, 508
Citokininas, 554
Citrato sintasa, 119, 143
Citrato, 80, 144, 204, 236, 265, 274, 539
Citrobacter, 229, 542, 545
Cl-4,6-dinitrofenol, 496
Clonación, 296, 302, 312, 320, 323, 329-331, 333, 334, 339, 345, 351, 374, 446, 458, 462
Cloración alcalina, 408
Cloro atómico, 245, 246
Cloro-6-tricloromethilpiridina, 177
Clorobenzoatos, 474-476, 478, 482
Clorobromocarbonos (CBC), 250
Clorocatecoles, 368, 468, 471, 477, 478, 480, 482
Clorofila, 62, 64, 95, 99, 101
Clorofilas, 94, 95, 122, 217, 267
Clorofluorocarbonos (CFC), 32, 146, 250
Cloroplastos, 92, 98, 102, 139, 170, 172, 176, 188, 190, 219, 326, 490
Clostridium, 401, 403, 411, 502, 569
Clostridium acetobutylicum, 81
Clostridium desulfuricans, 224
Clostridium pasteurianum, 499
Clostridium thermoaceticum, 114, 116
Clostridium thermocellum, 402, 403
CO deshidrogenasa, 114, 123, 136, 160
CO_2, 19, 21, 23, 26, 34, 41, 45, 49, 51, 60-64, 67, 78-81, 88, 102, 104-108, 110, 114-116, 118, 119, 121-128, 130-132, 134, 136-144, 146-150, 177-179, 185, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 205, 207-209, 212, 213, 218, 220, 222, 224, 232, 238, 240, 244, 246, 247, 250, 256, 258-261, 286, 287, 288, 358, 364, 367, 369, 400, 405, 410, 411, 442, 451, 459, 489, 502, 519, 521, 542, 550, 552, 575, 578, 586
Cobalamina, 238
Cobalto, ciclo biogeoquímico del, 238
Cobalto, toxicidad por, 238
Cobre, ciclo biogeoquímico del, 237
CO-deshidrogenasa, 114, 123, 161, 490
CODH (monóxido de carbono deshidrogenasa), 114-116, 123, 135, 136, 161, 499
Coenzima A, 186, 427
Coenzima F430, 238
Coenzima, 78, 125, 292, 297
Coenzimas metanogénicos, 132
Coevolución CYP planta-animal, 510
Coevolución toxinas-CYP, 516
Cofactor de bis-molidopterina y guanina, 170
Cofactor de hierro y molibdeno, 157, 158

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Cofactor de hierro y vanadio, 239
Cofactor de molibdeno, 169, 182, 184, 196, 197
Coffea arabica, 274
CO-hemocromo, 508
Colágeno, 234
Colesterol, 310, 516, 517
Colletotrichum gloeosporioides, 533
Cometabolismo, 364, 446, 448, 483, 486, 492, 494, 495
Competencia, 300, 320, 532, 533, 550, 570, 586
Complejación, 530, 541, 542
Complejo enzima-sustrato, 293, 297, 298, 301
Complejo octaédrico hemínico, 512
Complejo Rnf, 494
Complejos respiratorios, 90
Compuesto xenobiótico, 32, 358, 364, 446, 490, 493, 501, 503, 506, 507, 525
Compuestos de azufre, oxidación de, 194, 198, 200
Compuestos nitroaromáticos, 448, 487, 488, 500-502, 540
Compuestos xenobióticos, 12, 32, 258, 360-362, 364, 368, 400, 405, 450, 465-467, 469, 472, 476, 480, 483, 485, 487, 502, 506, 518, 524, 526, 532, 541
Condiciones estándares, 64, 69, 70, 75, 79
Conium maculatum, 531
Conjugasas, 522
Conservación de la energía, 50, 80, 96, 193, 202
Contaminación por vertido de petróleo, 435, 439-443
Contaminantes químicos, 32
Contención biológica, 463, 464, 482
Contención génica, 445, 464, 482
Continuación de efecto, 506, 518
Copidosoma truncatellum, 534
Copolímero, 420
Coreopsis, 267
Corynebacterium, 244
Covelita (CuS), 252, 254, 255
Cr^{6+} , reducción respiratoria del, 240
Craig Venter, 322
Crasuláceas, metabolismo ácido de las, 260
Cromátidas, 326
Cromatografía de afinidad, 302, 340, 344, 346
Cromenos, 278
Cromo, ciclo biogeoquímico del, 239-241
Cromodulina, 241
Croton tiglium, 274
CRP, 289, 290
Crucíferas, 273, 280
Cuantos, 71
Culombio, 70
Cumarinas, 274, 281, 515, 516, 541
Cunninghamella elegans, 500
Cuprita, 237
Cuscuta, 283
Cutina, 515
Cyanocitta cristata bonia, 273
Cycas, 277
CYP de animales, 508, 516
CYP de plantas, 514-516
CYP esteroidogénico-biotransformante, 510
CYP microsómico-mitocondrial, 509, 510
CYP microsómicos, 508
CYP mitocondiales, 510, 513, 514
CYP y carcinogénesis, 523
CYP, ciclo catalítico, 513
CYP, gen, 518
CYP, mecanismo de reacción, 510, 511
CYP, sustratos preferentes, 519
Cyperus rotundus, 533
Dactilopius ceylonicus, 533
Danaidal, 273
Danaus plexippus, 273
DBO, 214, 422, 433, 556, 570-573
DCCD, 136, 137
DDE, 363, 508, 527-529
DDT, 359, 362-364, 507, 508, 525-528
Decilacetato, 269
Dedos de cinc (zinc fingers), 231
Degradación proteolítica, 303, 350
Deinococcus radiodurans, 233, 391, 394, 545
Delfinidina, 267, 268
Dendroctonus brevicornis, 278
Deposición ácida, 247, 248
Deposición húmeda, 248
Deposición seca, 248
Derxia, 551
Desacoplante, 446, 448, 487, 494
Descarboxilación, 82, 108, 110, 121, 260
Descarboxilasa, 85, 108
Descomponedores, 33
Deshalorrespiración, 471

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Desnitrificación, 60, 154, 156, 177, 180-185, 200, 245, 250, 552
Desulfobacter, 117, 192, 212
Desulfobacterium, 141
Desulfotignum phosphitoxidans, 212
Desulfotomaculum, 192, 195
Desulfotomaculum acetoxidans, 116, 117
Desulfotomaculum reducens, 240
Desulfovibrio, 113, 192, 195, 490, 572, 573
Desulfovibrio desulfuricans, 244
Desulfovibrio sulfodismutans, 194
Desulfovibrio vulgaris, 240
Desulfuromonas, 194
Desulfuromonas acetoxidans, 194
Detección de quórum, 256
Detergentes, 182, 214, 215, 218, 219, 314, 315, 362, 369, 392-394, 396, 400, 440
Devónico, 509
Diamante, 103
Diamino-2-nitrotolueno, 490
Diazepam, 517, 518
Diazotrofo, 150, 530, 551
Dichapetalum cymosum, 271
Dieldrina, 528
Dietilestilbestrol, 277, 363
Diferencia de potencial rédox (ΔE), 69
Difusión, 58, 83, 129, 438, 509, 556, 560, 561
Digitalis purpurea, 271
Digitalis, 268, 272
Digitoxigenina, 271, 272
Dihidrodioles, 499
Dihidroxiacetona fosfato, 140
Dimetilaminas, 412
Dimetilarsenito, 241, 540
Dimetilarsenoazúcares, 241
Dimetildiseleniuro, 244
Dimetilmercurio (CH_3HgCH_3), 223, 224
Dimetilseleniuro, 240
Dimetilsulfonio, propionato de (DMSP), 129, 185, 186, 193, 195, 266
Dimetilsulfóxido (DMSO), 124, 129, 194, 195
Dimetilsulfuro (DMS) 124, 128, 129, 189, 195, 241, 244
Dinitrofenol, 448, 487, 492-496, 502
Dinitrogenasa reductasa, 157-159, 162
Dinitrogenasa, 157-162
Dinitrotolueno, 497
Dióxido de azufre, 245, 246
Dióxido de carbono, 21, 27, 404, 410, 435, 439, 576
Dióxido de nitrógeno (NO_2), 245, 246
Dioxigenasas, 428, 446, 450-452, 476, 478, 488, 499, 525
Dioxinas, 362-364 466, 468-470, 474, 518, 526, 563
Diversidad ibérica, 585
DMSO reductasa, 196,239
DNA, 29, 33, 39, 40, 60, 92, 150, 151, 186, 203, 208, 210, 215, 217, 219, 227, 230, 231, 233, 256, 262, 272, 275, 283, 289, 296, 319-321, 323-327, 329-335, 337-339, 341-344, 346-354, 356, 357, 373-376, 378, 383, 391, 396, 397, 412, 430, 446, 459, 466, 481, 486, 494, 506, 507, 523, 524, 530, 544, 546, 553, 554, 587
Dnasa, 320
Dogma central de la Biología Molecular, 325
Dominio LRR, 285
Dominios TIR, 284
Dopamina monooxigenasa, 237
DQO , 422, 433
Drenaje ácido de las minas, 256
Drosophila melanogaster, 323, 352
Drosophila pachea, 278
Eadie-Hofstee, Transformación de, 299
Ecdisona, 276, 277, 527
Eclonia radiata, 265
Ecología, 257
Ecosistemas arcaicos, 44
Ecotoxicología, 430
Ecuación de continuidad, 17
Ecuación de Michaelis-Menten, 299
EDTA, 228, 303, 530, 537, 543
Efecto invernadero inverso, 23
Efecto invernadero, 20, 23, 27, 41, 61, 102, 104, 122, 126, 144, 146, 147, 149, 183, 550, 552
Efectos de la contaminación, 446, 466
Eflujo de ácidos, 84
Eicosanoides, 506, 510, 514, 521
Elaeagnus, 550
Electrofílico, 466, 486
Electrofílico, ataque, 474, 487, 488
Electroforesis bidimensional, 356-358
Electroforesis en SDS, 338

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Electrones π de antienlace, 511
Electrones, flujo inverso de, 90, 178, 179, 200, 207
Eliminación de los PCB, 472
ELISA, 309
EMIT, 309
Endergónico, 51, 64, 69, 70
Endoglucanasas, 402, 403
Endosimbiontes metanogénicos, 113, 287
Endosulfan, 526, 528
Energética de la metanogénesis, 127, 128
Energía libre de Gibbs, 64, 69
Energía radiante *hv*, 94
Energía rédox, 71, 74, 78, 87, 94, 96
Enfermedades metabólicas, 312
Enolasa, 143, 144
Entalpía, 64, 66, 67
Enterobacter cloacae, 244
Enterobacter faecalis, 289, 290
Enterobacter, 551
Enterobacteriaceae, 263
Enterobacterias, 110, 111, 180, 182, 203, 458
Enterobactina, 203
Enteroquelina, 201
Entner-Doudoroff, ruta de, 105, 106, 145
Entropía, 64, 68
Enzima málica, 141, 260
Enzimas ligninolíticas, 406
Eón, 38
EPA, 256, 261, 262, 506, 510
EPA, 358, 360, 430, 501, 556, 559
Epóxidos, 447, 521, 523, 524
Equilibrio termodinámico, 69
Era antropozoica, 25
Eriogonum ovalifolium, 265
Eritrosa-4 fosfato, 107
Erwinia, 283
Escatol, 269
Escherichia coli, 326, 329, 339, 352, 381, 410
Espacio de secuencias, 54
Espacio intermembranal, 88
España y la política ambiental, 584
Especies reactivas del oxígeno (ROS), 109, 285, 502, 508, 511
Estado de oxidación, 80, 103, 128, 139, 156, 168, 172, 194, 202, 210, 212, 219, 229, 230, 238, 292
Estados de oxidación del carbono, 102
Estela, 556, 562
Esterasas termofílicas, 394
Ésteres de forbol, 274
Esteroides cardiotónicos, 271
Esteroides sexuales, 276
Estilbenoides, 515
Estomas, 260, 263, 264
Estradiol, 363, 468, 510, 517, 521, 528, 529
Estratosfera, 248-251
Estrofaxantidina, 280
Estrógeno, 277, 527-529
Estrógenos, 276, 364, 526, 528
Estroma, 98, 101, 102
Etanol, 78, 80, 109, 110, 128, 131, 194, 206, 262, 263, 286, 287, 401, 425, 449, 519, 522
Etileno, 275, 237, 285
Etinil estradiol, 521
Eubacteria, 34, 113, 262, 546
Eugenol, 269
Euglenol, 269
Eukarya, 127, 326
Euphorbia, 261
Euprymna scolopes, 289
Euryarchaeota, 102, 122, 127
Eutrofización, 214, 219, 550, 573
E-verbenol, 278
Evolución cosmoquímica, 39
Excitón, 96
Exergónico, 157
Exo-brevicomina, 278
Exoglucanasas, 402
Expansión vertical de rutas catabólicas, 502
Experimento de huella, 342, 343
Explosión Cámbrica, 23, 506, 510
Explotación, 16, 18, 26, 278, 577, 578
Expresión heteróloga, 339, 345
Extensión del cebador, 339, 340
Extinciones, 21, 147, 509, 586
F 1,6 bisfosfato aldolasa, 140
F 1,6 BP aldolasa, 145
F420 deshidrogenasa, 135, 136
F420, 113, 132, 134, 136, 137, 493
F430, 136, 238
Factor de tolerancia a la glucosa (GTF), 241
Factor de transcripción, 92, 112, 240, 256, 289, 506, 520
Factores ambientales (ecológicos), 16

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Factores medioambientales y metanogénesis, 128
Factores Nod, 162, 165-167
FAD, 92, 99, 108, 113, 117, 125, 136, 162, 169, 171, 173, 175, 190, 226, 297, 466, 509, 510, 514
Faraday, constante, 69, 70
Farnesol, 264
FCCP, 136, 137
Fe^{2+}, oxidación del, 206-208
Fe^{3+}, reducción respiratoria del, 206
Feldespatos, 216, 235
Felis domestica, 280
Fenacetina, 519, 522
Fenil propanoides aromáticos, 280
Fenilpropanoides, 515
Fenoles, 274, 363, 405, 498
Fermentación aceto-butílica, 81
Fermentación alcohólica, 109, 110
Fermentación, 34, 61, 64, 78, 81, 104, 110, 111, 131, 180, 286, 292, 302, 315, 383, 417, 420, 448, 574, 575
Feromonas, 256, 269, 273, 276, 278, 289
Ferredoxina, 64, 94, 97, 99, 110, 111, 114, 116-118, 131, 141, 142, 156, 158, 168, 169, 171-173, 175, 190, 202, 240, 490, 495
Ferroglobus placidus, 208
Ferroplasma, 386
Ficobilinas, 92, 94, 122
Fijación de nitrógeno molecular, 156
Fijación de nitrógeno, 26, 155, 157, 161-163, 165, 166, 174, 235, 495
Fijación del CO_2, 34, 138, 150, 178, 202, 259, 411
Fijación simbiótica de N_2, 162, 191, 546, 547
Fitasa, 212
Fitoalexinas, 256, 275, 285, 506, 509
Fitófagos, 279, 536
Fitohemaglutinina, 270
Fitoquelatinas, 232, 237, 265, 539
Fitosideróforos, 204, 538
Fix, genes, 546
Flavobacterium sp., 381
Flavobacterium, 490
Flavodoxina, 157-159, 161, 162, 168, 171
Flavonas, 267, 282, 516
Flavonoides, 164, 165, 226, 267, 270, 279, 509, 550
Flavoproteína, 190, 192, 200, 226, 494, 511, 514
Fluorocetato, 274
Fluorocitrato, 274
Formaldehído, 412, 413
Formamida hidroliasa, 271
Formamida, 271
Formiato deshidrogenasa R, 116
Formiato deshidrogenasa, 112, 125, 182, 239
Formiato:hidrógeno liasa, 111
Formiato-H_2 liasa, 80
Fórmico, ácido 103, 352, 410
Formil tetrahidrofolato sintetasa, 79
Formil transferasa, 134
Formil-MTF deshidrogenasa, 132, 134
Formiato deshidrogenasa, 112, 116, 182, 239
Forzamiento del ecosistema, 17
Fosfatasa alcalina, 210, 213, 230, 265, 314
Fósfato, mineralización, 212
Fosfina (fosfuro de hidrógeno), 209, 211, 212, 214
Fosfito deshidrogenasa, 210, 213
Fosfito e hipofosfito, sistemas de transporte de, 212
Fosfito, 86, 212-214, 288
Fosfoadenosil fosfato (PAP), 189
Fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS), 188, 189
Fosfoenolpiruvato (PEP), 77, 79, 112, 260
Fosfoenolpiruvato carboxikinasa, 108, 260
Fosfofructokinasa, 106, 107, 121, 144
Fosfoglicerato kinasa, 79, 139
Fosfolipasa, 230
Fosfolípidos, 208, 304, 390, 542
Fosfonolípidos, 209, 212
Fosforilación a nivel de sustrato, 50, 64, 78, 79, 82, 84, 114, 116, 132, 192, 200, 212
Fosforilo, transferencia de, 77
Fósforo, ciclo biogeoquímico, 208-214
Fósforo, oxidación de compuestos de, 210, 212
Fósforo, sistemas de transporte del, 209, 210
Fosfotransacetilasa, 111, 118, 135
Fosfonato, 212, 542
Fotofosforilación, 64, 101
Fotoisomerización, 82, 83

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Fotólisis del O_2, 244, 245, 248
Fotones, 71, 101, 102, 248, 249, 256
Fotorrespiración, 141, 176, 261
Fotosintato, 530, 541, 551
Fotosíntesis clorofílica, 94
Fotosíntesis oxigénica y anoxigénica, rendimiento de, 34, 102
Fotosíntesis, 20-24, 60, 62, 64, 65, 85, 86, 94, 96-98, 100, 122, 129, 149, 157, 160, 170, 189, 216-218, 237, 248, 430, 495, 531
Fotosistema, 64, 94, 486
Fotosistema tipo I, 93
Fotosistema tipo II, 89, 96, 150, 160, 219, 548
Fotosistemas, 94, 96, 98, 102, 122
Francis Crick, 325
Frankia, 162, 547
Fred Sanger, 352
Frontalina, 278
Fructosa 1,6-bisfosfato, 106
Fructosa bisfosfatasa, 140
Fructosa, 105, 261, 270, 395, 397
Fructosa-6P, 77, 144
Fosfinato, 212
Ftalatos, 363, 521, 526
Fucsia hibrida, 267
Fuentes de metano, 127
Fuentes hidrotermales submarinas calientes (chimeneas negras), 201
Fuentes hidrotermales submarinas templadas (chimeneas blancas), 201
Fuentes hidrotermales submarinas, 201, 202, 220, 383
Fuerza motriz de iones, 64, 65, 73, 94, 102, 114, 116, 122
Fuerza motriz de protones y de sodio, 137
Fuerza motriz de sodio, 82, 116, 134, 136
Flujos energéticos, 67
Fumarasa, 111
Fumarato reductasa, 112, 117, 142
Fumarato, 83, 88, 91, 108, 113, 120, 168, 244, 428
Furano, 277, 466, 521
Furocumarina, 515
Furocumarinas, 271
Fusarium, 439
Fusarium oxysporium, 532
G.E. Briggs, 299
G-6P isomerasa, 140
Gaia, hipótesis de, 16, 21, 147
Galactosa oxidasa, 233, 237
Galactosidasa, 329, 334, 341, 344, 345, 396, 416
Gallionella, 207, 220
Gases con efecto invernadero, 144, 146, 147
Gases invernaderos, 250
Gases, constante, 70
Gasohol, 110
Gastrolobium, 273, 274
Gen phoN, 545
Gen supresor de tumores , 506
Genes ars, 238, 239, 242
Genes de avirulencia, 284
Genes lux, 289, 345
Genes mer, 224, 226, 227
Genes nar, 183
Genes nif, 161, 162, 165, 546, 550
Genes nod, 164, 165
Genes pbr, 225, 226, 229
Genes reporteros o informadores, 339, 344
Genisteína, 277
Genoma Humano, Proyecto, 555
Genómica, 322, 354, 360
Gentisato, 452, 470
Geobacter metallireducens, 206
Geobacter sulfurreducens, 220
Geraniol, 281
Giberelinas, 506, 508, 516
Gibsita, 235
Gimnospermas, 266, 268, 273
Glicerol, 50, 242, 262, 263, 303, 388
Glicina, 142, 174, 265, 396
Glicósidos cardiotónicos, 273, 281
Glicósidos cianogénicos, 270, 272, 280, 281
Glicosil-flavonas, 267
Glifosato, 533, 534
Glioxilato, 142-144
Glioxilato, ciclo del, 109, 118-120
Gloeotrichia, 551
Glomus, 551
Glucanasa, 285, 286
Glucosaminoglucanos, 230, 234
Glucólisis, 78, 105-107, 110, 114, 115, 120, 121, 131, 140
Gluconeogénesis, 118-120, 130
Gluconobacter, 109
Glucosa isomerasa, 238, 394

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Glucosa, 66-68, 78, 81, 105, 107, 109, 114, 119, 130, 140, 239, 257, 258, 261, 270, 279, 307, 309, 310, 395, 400-402, 415, 418, 501
Glucosidasa, 311, 312, 372
Glucosinolatos, 190, 271, 280
Glucuronato, 507, 521, 522
Glucuronización, 522
Glutamato deshidrogenasa, 176, 312
Glutamato sintasa, 173, 174
Glutamina sintetasa, 173
Glutarredoxina, 242
Glutation perosidasa, 264
Glutation, 466, 484
Glutatión-S-transferasa, 525
Gossypium barbadense, 280
Gossypol, 280
Grafito, 103
Gram positivas, 225, 229, 492
Grupo formilo, 103
Gt (gigatonelada) , 102, 104, 122, 123, 127, 147, 149, 530, 535, 548
Guanina, 170
Guano, 154, 549
Gunnera, 546, 550
Gutsducina, 280, 281
H_2, transferencia interespecífica de, 113, 223, 285, 286
Ha, 112, 113, 530, 537, 549-551, 588, 589
Haber, Fritz, 156, 545
Haber-Bosh, proceso de, 546, 549
Haemophilus influenzae, 233
Haloalcalófilos, 386
Halobacterias, 83
Halobacterium, 182
Halobacterium halobium, 388, 396
Halobacterium salinarum, 389
Haloferax alicantei, 396
Halófitos, 266
Halógeno, 150, 250, 487
Halorhodospira, 198
Halorrodopsina, 83, 389
Halorrodopsina, 82
Hanes-Wolf, Transformación de, 299
Hatch-Slack, ciclo de, 141, 259
Helicoverpa zea, 535
Heliothis zea, 280
Heliotis virescens, 536
Hellriegel, H, 546
Hematita, 206
Hemo, 64, 92, 112, 169, 181-183, 199, 202, 221, 227, 228, 239, 408, 412, 510-512, 515, 521
Hemoglobina, 163, 202, 226, 408, 500, 507, 530
Heracleum, 515
Heterocistos, 150, 159, 160, 235, 548
Heterodisulfuro reductasa, 136-138
Hibridación northern, 338
Hibridación southern, 335, 338
Hidrocarburos poliaromáticos, 518
Hidrocarburos alifáticos, 361, 427
Hidrocarburos aromáticos, 424, 428, 500
Hidrocarburos nitroaromáticos policíclicos (Nitro-PAH), 499
Hidrocarburos policíclicos (PAH), 32, 428-430, 499
Hidroclorofluorcarbonos (HCFC), 250
Hidrofluorcarbonos (HFC), 250
Hidrofóbicas, interacciones, 305, 487
Hidrogenasa de reciclado, 123, 547
Hidrogenasa, 80, 115, 116, 135, 192, 193, 213, 287, 490, 499
Hidrogenasas de producción, 111, 286
Hidrógeno, puentes de, 401, 487, 544
Hidrogenosomas, 287
Hidrolasas, 296, 402
Hidroperóxido, 511
Hidropesía, 272
Hidroxianisol, 526
Hidroxiaspartato, 143
Hidroxicinamatos, 283
Hidroxilamina óxido-reductasa (HOR), 178
Hidroxilamino, grupo, 491
Hidroxipiruvato, 143
Hidruro transferasas, 492
Hidruro-Meisenheimer, 493
Hierro férrico reductasa, 206
Hierro, solubilización del, 201-202
Hígado verde, 32, 523-525
Hipertermófilo, 110, 378, 383, 396
Hipertermófilos, 44, 222, 262, 380, 382-384, 392, 395
Hipofosfito, 212-214
Hiposfosfito dioxigenasa, 213
Hippophae, 550
Hofmeister, 540
Holocalyx glaziovii, 272
Homeostasia geofisiológica, 27
Homeóstasis, 526

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Homoacetogénesis, 34, 106, 114-116, 118, 132, 138
Hongos de la podredumbre blanca, 405
Hongos de la podredumbre marrón, 405
Hongos ligninolíticos, 502
Hormona juvenil, 516
Hormonales, interferidores, 362, 363, 526
Humus, 104, 154, 216, 367, 438, 487, 498, 568
Hup, genes, 547, 550
Hybantus furibundus, 265
Hydrogenobacter, 141
Imidazol, 346, 521
Inactivación, 159, 175, 275, 292, 300, 303, 506, 518
Indigo, 462
Inducción enzimática , 506
Inducible, 204, 410, 412, 446, 486, 494, 520
Inhibidores de proteasas, 274, 275, 303
Inositol, 212, 279
Interacción Rhizobium-leguminosa, 164, 283, 555
Interacciones entre microorganismos, 286
Interacciones plantas-animales, 276, 510
Interacciones tróficas entre plantas y animales, 278
Interferidor hormonal, 358, 526
Intoxicación, 234, 236, 273, 507, 519
Ión hidruro, 64, 214, 485, 492, 493
Iones hidruro, 491
Ips paraconfusus, 278
Iris germanica, 263
Iris pseudocorus, 263
Isocitrato deshidrogenasa, 119,120
Isocitrato, 108, 120, 144
Isocitrato liasa, 109, 111, 119, 144
Isoflavonas, 273, 276, 277, 281
Isomerasas, 397
Isotiocianato de alilo, 274
Isotiocianatos, 271, 273
J.B.S. Haldane, 35, 38, 40, 299
Jarosita, 252, 256
Jasmonato, 274, 275, 285
Joule ("julio"), 70
Juglans regia, 281, 282
Juncus effussus, 263
Juvabiona, 278, 527
Karl Ereky, 323
Kinasa del LHC, 95, 101
Kinasa sensora luxQ, 289, 290
Klebsiella pneumoniae, 161, 162, 546
Krebs, ciclo de, 49, 105, 106, 108, 109, 112, 115, 117, 119, 120, 124, 142, 144, 168, 194, 263, 271, 274, 428, 451, 458, 475, 547
Krebs, ciclo reductivo de (biosintético), 117, 120, 138, 140-143
Lacasa, 237, 406
Lacasas, 405, 406
Lactato deshidrogenasa, 111, 193, 310
Lactobacillus plantarum, 202, 219
Lactoferrina, 205
Látex, 274, 362
L-DOPA, 271
Lecitinas, 166
Leghemoglobina, 150, 163, 167, 168, 547
Legislación comunitaria sobre medio ambiente, 583, 585
Legislación española sobre medio ambiente, 585
Leonor Michaelis, 298
Leptinotarsa decemlineata, 280, 536
Leptospirillum ferrooxidans, 207, 255
Leptothrix, 207, 220
Leptothrix discophora, 220
Ley de Lambert-Beer, 308
Ligasas, 296, 327, 331-332
Lignina peroxidasas, 406
Lignina, 105, 260, 285, 400, 405, 406, 452, 498, 502, 524
Limoneno, 269
Linalool, 269
Linamarina, 257, 270, 272
Lindano, 508, 527
Lineweaver-Burk, Transformación de, 299, 301
Lipasas termofílicas, 395, 396
Lípidos , 49, 67, 105, 118, 130, 186, 212, 215, 241, 270, 374, 382, 384
Lixiviación, 150, 154, 209, 252, 254-256, 556
Lixiviación in situ, 253
Lixiviación, pila de, 253
Lluvia ácida, 26, 236, 244, 246-248, 256, 425, 444, 552
Locusta migratoria, 273
Longitud de onda, 64, 102, 122, 248, 253, 292, 308, 309
Lophocerus schotii, 278

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Lotaustralina, 272
Lotus corniculatus, 271
Luciferasa, 289, 416
Luteolina, 266
M barkeri, 129
M. themoautotrophicum, 142
Magnesio, ciclo biogeoquímico del, 217-219
Magnesio, dureza de las aguas, 218, 219
Magnesio, saturnismo, 219
Malaquita, 237
Malas hierbas, control de, 532-534
Malato deshidrogenasa, 119, 141, 259
Malato sintasa, 109, 119
Malato, 108, 144, 168, 204, 236, 259-261, 263, 265
MALDI-TOF, 348, 350
Maltosa, fermentación de, 110
Malvidina, 267, 268
Manduca sexta, 535
Manganeso oxidasa, 217
Manganeso peroxidasas, 406
Manganeso reductasa, 220
Manganeso, ciclo biogeoquímico del, 219,222
Manitol, 261, 303
Marte, 41, 391, 392
Matrices de DNA (chips de DNA), 354
Maud Menten, 298
Melibiosa, 270
Meisenheimer, derivados, 488, 492, 493
Membranas, 50, 52, 58, 77, 184, 212, 217, 235, 244, 286, 305, 307, 382, 384, 390, 391, 466, 536, 544
Membranas granales, 101
Membranas intergranales, 97
Membranas tilacoidales, 98
Menaquinona, 65, 196, 221
Mercúrico reductasa (Mer A), 226
Mercurio, ciclo biogeoquímico, 222-226
Mercurio, envenenamiento por, 219, 220, 222
Mercurio, resistencia al, 221, 222, 224, 225
Mesófilo, 141, 174, 259, 260, 264
Mesófilos, 381-384, 392, 399
Meta, 429, 446, 452, 458, 466, 480, 486, 493, 581
Meta, ruptura, 456, 458, 469, 489
Metabolismo del carbono en la biosfera, 106
Metabolismo exosomático, 24, 25
Metabolismo, 12, 24, 25, 32, 40, 46, 48, 50, 59, 60, 66, 67, 89, 92, 105, 107, 110, 111, 115, 122, 131, 132, 138, 153, 154, 156, 168, 170, 174, 175, 191, 195, 196, 198, 200, 212, 216-218, 220, 224, 227, 237, 238, 240, 243, 245, 246, 256-258, 260, 261, 264, 273, 279, 311, 312, 326, 370, 386, 388, 400, 402, 408, 430, 447, 448, 450, 451, 456, 461, 480, 484, 494, 498, 508, 510, 514-518, 520, 525, 533, 541, 543, 547, 548
Metabolista de superficie, 48, 49
Metales pesados, bioadsorción de, 540, 541
Metales pesados, fitoextracción de, 536, 538
Metales pesados, volatilización de, 540
Metalotioneínas, 265, 539, 544
Metano monoxigenasa, 125
Metano oxidasa, 237
Metano, 23, 24, 43, 61, 81, 104, 116, 123, 124, 126-129, 136-138, 143, 144, 147, 224, 236, 249, 250, 288, 383, 400, 404, 411, 412, 422, 424, 434, 447, 449, 552, 568, 575
Metanofenacina, 135-137
Metanofurano, 132, 133
Metanogénesis en el Rumen, 130
Metanogénesis en el tubo digestivo, 130
Metanogénesis, 34, 60, 61, 106, 115, 127-132, 134, 135, 196
Metanógenos acetotrofos, 115, 118, 128, 136, 142
Metanógenos autótrofos, 115, 118, 128, 129, 143
Metanógenos metilotrofos, 128, 129, 134-138
Metanógenos, 44, 48, 102, 113, 114, 122, 123, 126, 128, 131-133, 136, 138, 143, 243, 244, 387, 410, 434
Metanol deshidrogenasa, 124, 125
Metanol, 124, 125, 127, 129, 132, 137, 224, 425, 575
Metanotrofos, 102, 104, 122, 124, 126, 129, 149, 288, 412, 447
Methanobacteriales, 127
Methanobacterium thermoautotrophicum, 128
Methanobacterium, 113, 134

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Methanobrevibacter smithii, 131
Methanobrevibacter, 131
Methanocaldococcus jannaschii, 127
Methanococcales, 127
Methanococcoides methylutens, 128
Methanomicrobiales, 126
Methanopyrales, 127
Methanopyrus sp., 383
Methanopyrus, 262
Methanosarcina barkeri, 129
Methanosarcina, 126, 131, 135, 138
Methanosarcinales, 127
Methanosphaera stadtmanae, 131, 132
Methanothermus, 262
Methemoglobina, 500
Methemoglobinemia, 530, 552
Methoxychlor, 526, 528
Methylobacillus, 124
Methylobacter, 124
Methylobacterium, 124
Methylococcus, 124
Methylocystis, 124
Methylomonas, 124
Methylophilus, 124
Methylosinus, 124
Metil reductasa, 134-136
Metil transferasa, 116, 134-138, 166, 167
Metilamina, 124, 269, 412, 413
Metilaminas, 127, 128, 399
Metilarsenato, 238, 241, 242
Metilbutano-1-tiol, 280
Metil-cobalamina, 135
Metilén-THF deshidrogenasa, 116
Metilén-THF reductasa, 116
Metilfloroglucinol, 494, 498
Metilmercurio (CH_3Hg^+), 223-226, 359
Metilmercurio, desmetilación oxidativa del, 224
Metilmercurio, envenenamiento por, 224
Metilotrofas, bacterias, 104, 124
Metilotrofos tipo II, 144
Metilsulfato (MSA), 187, 195, 197
Metil-tert-butil éter (MTBE), 425, 430, 438, 437
Metionina aminopeptidasa, 238
Metionina, 120, 129, 188, 204, 236-238, 264
Metoxibenzaldehídos, 281, 282
Metoxipsoraleno, 515, 516
Mh, 530, 549
Micorrizas, 150, 212, 551
Micotoxinas, 530, 534
Micrococcus denitrificans, 143
Micromoléculas prebióticas, 45
Microorganismos celulolíticos, 401, 403, 404
Microsomas, 506, 508, 509
Mineralización, 153, 154, 176, 212, 358, 364, 449, 458, 472, 474, 481, 496, 498, 492, 540
Mirceno, 278
Mirestrol, 276
Mirosinasa, 274
Mitocondrias, 74, 88, 90, 91, 102, 195, 199, 219, 234, 274, 326, 508, 509, 514
Mixotiazol, 93
Molibdenita (MoS_2), 238, 254
Momento dipolar, 146
Monoaminotolueno, 498
Monocentris japonica, 289
Monofluoroacético, ácido, 271
Mononitrotolueno, 494
Monoterpenos, 256, 269, 275
Monóxido de carbono, 238, 411, 575
Monoxigenasas, 450, 489
Morina, 279
Moritella, 389
Morus alba, 279
Morus nigra, 279
Motor flagelar, 77
Mucuna, 271
Mus musculus, 323
Mutasa, 131
Mycobacterium tuberculosis, 242
Mycobacterium, 206, 411, 427, 545
Myrica, 547, 550
N_2O, 61, 91, 145, 177, 181, 183, 245, 251, 550, 552
N-aceilglucosamina (NAG), 165
N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), 522
NAD(P)H, 64, 78, 94, 132, 139, 169, 175, 176, 200, 206, 412, 490, 493, 509, 511
NADH, 81, 90-92, 107, 108, 113, 119, 125, 131, 144, 168, 171, 173, 176, 206, 208, 209, 213, 287, 309, 412
Naftaleno, 416, 430, 458, 462
Néctar, 266, 269, 270, 273
Nematodos, 284, 352, 533, 572
Nepetalactona, 280

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Nerium oleander, 273, 281
Nernst, ecuación de, 72
Neutrófilos, 385
N-glucosilación, 211
Nicotina, 276
Nif, genes, 161, 162, 165, 546, 550
Níquel, 113, 123, 252, 346, 407, 408
Níquel, ciclo biogeoquímico del, 237-238
Níquel, toxicidad por, 238
Níquel, transporte de, 238
Nitrato reductasa, asimiladora, 168-170, 182
Nitrato reductasa, desasimiladota, 182, 184, 240
Nitrato reductasa, periplásmica, 182, 184
Nitrato, 22, 43, 52, 112, 123, 153, 154, 156, 157, 171, 174, 177, 179-181, 185, 188, 192, 198, 200, 206, 208, 209, 214, 218, 237, 239, 244, 286, 369, 418, 426, 440, 487, 490, 543, 550
Nitrato, asimilación, 168-173
Nitrato, reducción asimiladora de, 182-184
Nitrificación 63, 155, 156, 176-181, 218, 552
Nitriloacetato, 543
Nitrito oxidasa, 179
Nitrito reductasa, asimiladora, 173
Nitrito reductasa, citoplásmica,182
Nitrito reductasa, periplásmica, 183
Nitro-4-aminofenol, 487
Nitroadipato, 493
Nitroareno, 486, 499
Nitroaromáticos, compuestos, 448, 487, 488, 500, 501, 502, 541
Nitrobacter, 177, 179
Nitrobenzoatos, 487
Nitrocatecol, 490, 495
Nitrococcus, 180
Nitrofenol, 490, 492, 494, 495
Nitrofenoles, 487, 491, 494
Nitrofuranos, 491, 500
Nitrogenasa, 62, 63, 80, 157, 160-162, 169, 195, 202, 239, 486, 494, 495, 546, 547
Nitrogenasas alternativas, 161, 239
Nitrógeno, ciclo biogeoquímico, 153-155
Nitrógeno, ciclo del, 153-184
Nitrógeno, estados de oxidación, 154
Nitrógeno, fijación biológica de, 159, 544
Nitro-PAH, 499, 500
Nitropropionato, 180
Nitrorreductasa, 490, 491, 494, 495, 500
Nitrorreductasas, 490, 493, 496, 499-501
Nitrosococcus, 179
Nitrosolobus, 179
Nitrosomonas, 90, 177, 179, 182, 185, 211
Nitrosospira, 179
Nitrosovibrio, 179
Nitrospina, 180
Nitrospira, 180
Nitrotoluenos, 486, 487, 497, 499
NO, 26, 61, 91, 146, 150, 181, 183, 245, 251, 285, 497, 521, 550, 552
Nocardia, 124, 411, 427
Nod, genes, 164, 165
Nodulación, 163, 164
Nodulinas, 150, 167
Nódulos ferromanganosos, 217, 220
Normativas medioambientales, 580
Nornicotina, 276
Nostoc, 547, 551
Notofagus nombeyii, 262
N-óxido de trimetilamina (TMAO), 129, 197
Nubes estratosféricas polares (PSC), 247, 251
Nucleofílico, 243, 486
Nucleofílico, ataque, 492
Nucleófilo, 506, 511
Nucleófilos, 524
O-acetilserina (OAS), 190, 191
O-acetilserina(tiol)liasa (OASTL), 190
O-cumarato, 283, 516
Octanol, 269
Octopina, 263
Oleandrina, 272, 273
Opheroptera brumata, 279, 280
Ophrys, 269, 270
Opuntia vulgaris, 533
Organomercurial liasa (Mer B), 222, 223, 225, 226
Organomercuriales, 222, 225
Oro, biolixiviación del, 252, 255
Orobanche, 282, 283
Orto, 446, 452, 456, 458, 466, 478, 480, 486, 489, 492
Orto, ruptura, 489
Oryza longistaminata, 535
Ostrinia nubilalis, 535, 536
Otto Röhm, 295

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Ouabaína, 271
Oxalacetato, 108, 111, 120, 121, 141, 144, 259, 260
Oxalobacter formigenes, 85
Oxidación anaerobia de metano, 126
Oxidación heterogénea, 245
Oxidación homogénea, 245
Oxidante, 64, 65, 71, 78, 85, 89, 98, 99, 110, 113, 139, 150, 252, 285, 406, 428, 440, 446, 450, 509, 552, 570
Óxido nitríco (NO), 172, 183, 184, 245, 249, 251, 285
Óxido nítrico reductasa, 183
Óxido nitroso (N_2O), 182, 245
Óxido nitroso reductasa, 183, 184, 236
Óxidos de nitroareno, 499
Oxigenasas, 484, 488, 491, 496
Oxígeno singlete, 109
Oxylobium, 274
Ozonización, 408
P. putida, 390, 439, 453-455, 478, 503, 511
P680, 89, 98, 99
P700, 98, 99
Pacelia sericea, 265
Panicum, 260
Papilio plyxenes, 516
PAPS reductasa, 187, 189-191
PAPS sintetasa, 190
Par reductor/oxidante, 85
Para, 446, 466, 486
Parabenos, 526
Paradoja del valor C, 326
Paraoxona, 521
Parasitismo, 256, 273, 532
Parasponia, 547
Paratión, 490, 518
Pares rédox biológicos, 86
Paspalum notatum, 551
Pastinaca sativa, 271
Patuletina, 268
P-benzoquinoneimina, 522, 523
PCB, 32, 359, 447, 466, 468, 471-476, 478, 480-482, 525, 526
PCR, 53, 346-349, 351, 383, 396, 397, 544
PCR (reacción en cadena de la polimerasa), 323, 346, 396
P-cresol, 498, 499
Pectina, 235, 404
Pelargonidina, 267, 268
Pentaclorofenol (PCP), 361, 362, 370, 483, 484, 525
Pentobarbital, 518
Pentosas, 105, 106, 140, 145, 172, 189
Peonidina, 267
PEP carboxikinasa, 121
PEP carboxilasa, 141, 143, 144, 260
PEP sintetasa, 119, 121, 142, 143
PEP, 77, 79, 106, 108, 111, 118-121, 144, 260
Péptidoglicano, 542
Peroxidasa fúngica, 502
Peróxido de hidrógeno, 109, 245, 406
Perturbaciones antrópicas, 25
Petróleo, 12, 31, 246, 248, 418, 419, 422, 423-426, 428-430, 434, 435, 438-440, 442, 444, 448, 456
Petunidina, 267, 268
P-fenetidina, 519
PGA (ácido poliglicólico), 421
PH óptimo, 255, 301, 384
Phanerochaete chrisosporium, 502
Phaseolus vulgaris, 276
Phaseolus, 270
PHBH, 420
P-hidroxi-cinamato, 282, 283
Phoenix dactylifera, 276
Photobacterium fisheri, 289
Phytolacca dodecandra, 281
Phytophtora infestans, 531
Picrámico, ácido, 495
Pícrico, ácido, 487, 492-496, 501
Picrophilus oshimae, 386
Pilas de combustible, 81, 113
Pinus ponderosa, 278
Pinus radiata, 515
Pirazol, 521
Pirita (FeS_2), 22, 43, 48, 49, 63, 186, 252, 256
Pirofosfato de tiamina, 108, 110
Pirrolizidinas, 272, 273
Pirrol-quinolín quinona (PQQ), 125
Pirrotita (FeS), 252
Piruvato carboxilasa, 112, 121
Piruvato descarboxilasa, 110
Piruvato deshidrogenasa, 106, 108, 110, 119
Piruvato fosfato dikinasa, 141, 260
Piruvato kinasa, 79, 106, 119
Piruvato sintetasa, 118, 119, 141

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Piruvato, 49, 79, 101, 106, 107, 108, 110-112, 114, 115, 119-121, 131, 142, 158, 161, 168, 192, 193, 206, 260, 286, 287, 428-430, 458, 474, 490
Piruvato: ferredoxina óxidoreductasa, 114
Piruvato: flavodoxina óxido-reductasa (PFLOR), 159, 162
PLA (ácido poliláctico), 420
Plaguicidas, 31, 361, 362, 467, 487, 508, 527, 528, 531, 532, 535, 551, 555
Planck, constante, 70
Plantago, 266
Plantas C3, 259-261
Plantas C4, 141, 259, 261
Plásmido TOL, 428, 445, 450, 452, 456, 458, 460, 462, 463, 466, 478, 482, 503
Plásmidos sym, 165
Plastocianina, 99, 234, 237
Plastoquinona, 99, 101
PLC (policaprona), 421
Plomo, 110, 219, 226-229, 233, 243, 252, 265, 359, 438
Plomo, ciclo biogeoquímico del, 223-226
Plomo, envenenamiento por, 224-225
Plomo, resistencia al, 225-226
Plomo, transporte de, 225-226
P-nitrofenol, 490, 495
Poliacrilamida, 330, 340, 342, 343, 352, 353
Poliadenovirus, 536
Policondensación prebiótica, 45
Poliésteres alifáticos, 419, 420
Poliésteres aromáticos, 420
Polifenoles, 280, 433
Polifosfato, 44, 59, 544
Polifosfatos, 211, 212, 214, 215
Poligalacturonasas, 285
Poligalacturónidos, 275
Polímeros biodegradables, 418
Polímeros sintéticos, 418
Polimorfismo, 506
Polinización, 266, 268-270, 276
Polisacáridos, 102, 103, 120, 235, 400, 405, 573
Potasio, ciclo biogeoquímico del, 212-214, 215-217
Potencial bioenergético, 76, 77
Potencial biótico de las bacterias, 32, 33
Potencial de transferencia de grupo, 76
Potencial eléctrico, 65, 71, 96, 215
Potencial iónico, 72
Potencial negativo de grupos nitro, 497
Potencial rédox, 65, 71, 139, 192, 200, 207, 239, 243, 446, 513
Precipitación, 20, 218, 234, 303, 408, 438, 514, 544, 559, 561
Pregnano-2,3-diona, 520
Presión, 41, 66, 68, 82, 102, 111, 122, 131, 150, 156, 157, 201, 219, 249, 266, 273, 295, 357, 373, 374, 378, 379, 387, 389, 390, 393, 423, 438, 442, 481, 545, 546, 558, 561
Primera Ley de la termodinámica, 67
Prochloron, 94
Prolina, 237, 264, 266
Prolipoproteína señal peptidasa (Pbr C), 229
Promotor, 150, 151, 174, 320, 339, 340, 345, 346, 375, 376, 416, 446, 459, 463, 530
Promotor ptac, 462, 463
Propionato, 82, 129-132, 186, 195, 404
Propionigenium modestum, 82
Propionil-CoA carboxilasa, 143
Prostanoides, 506, 508, 510
Proteasas, 275, 303, 315, 393, 394, 396, 536
Proteína de fusión, 345, 375
Proteína FNR, 112
Proteína G, 281
Proteína quinasa C, 208, 211
Proteínas CheA/CheY, 83
Proteínas Mer, 224-227, 229
Proteínas Pbr, 229
Proteínas tipo LRR, 284, 285, 535
Proteoma, 354, 357, 359
Proteómica, 323, 354
Proteus, 206
Proteus mirabilis, 233
Protoanemonina, 368, 480, 479, 532
Protocatecuato, 283, 428, 452, 454, 456
Protocolo de Montreal, 250
Prunus amygdalus, 272
Pseudomonas, 182, 206, 220, 244, 283, 285, 408, 411, 413, 427, 429, 445, 499, 501, 532, 543
Pseudomonas aeruginosa, 225, 242
Pseudomonas diminuta, 490
Pseudomonas fluorecens, 545
Pseudomonas marginalis, 229
Pseudomonas mendocina, 459

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Pseudomonas oleovorans, 430
Pseudomonas putida, 390, 439, 453, 478, 503, 511
Pseudomonas sp., 395, 410, 411
Pseudomonas sp. B13, 476, 478, 481
Pseudomonas sp. BN10, 481
Pseudomonas sp. LB400, 474, 475
Pseudomonas stutzeri, 213, 244
Pseudomonas syringae, 284
Pseudomyrmex, 273
Psicrotolerantes, 381, 382
Psoraleno sintasa, 515
Psoraleno, 271, 274
Pterophyta, 273
Pto kinasa, 284, 285
Puccinia chondrillina, 533, 534
Pueraria mirifica, 276
Punica granatum, 276
Purificación de enzimas, 302
Pynus sylvestris, 276
Pyrobaculum islandicum, 222
Pyrococcus furiosus, 110, 240, 395
Pyrrocoris apteris, 194, 262
Pyrodictium, 194, 262
Pyrodictium brockii, 381
Pyrolobus fumari, 383
Pythium, 283
Quercetina, 268
Quercus robur, 280
Quimiosmótico, 102, 117, 137
Quinina, 281
Quinolina, 521
Quinonas, 86, 88, 91, 93, 96, 99, 111-113, 126, 182, 200, 267
Quitina, 166, 167, 401, 543
Radiación UV, efectos de, 248, 249
Radiación, Teoría de la, 258
Radical hidroxilo, 109, 245, 285, 511
Radical superóxido, 285
Radicales aniónicos del TNT, 502
Radionúclidos, 530, 537, 544
Radionúclidos, biorremediación de, 543
Rafinosa, 261, 270
Ralstonia metallidurans, 229
Ramnosa, 279
Rata canguro, 274
Reacciones rédox, 48, 85, 89, 90, 309
Recalcitrancia, 358, 466, 467, 472, 486, 495
Receptor AhR, 520
Receptor de andrógenos, 528, 529
Receptor de estrógenos, 528
Receptor serpentina, 256, 280, 281
Reductasa terminal, 91
Reductor, 49, 61, 64, 65, 71, 80, 85, 90, 96-99, 109, 111, 112, 117, 119, 123, 125, 134, 139, 142, 144, 145, 150, 158, 163, 166, 170, 173, 178, 182, 207, 221, 240, 242, 243, 286-288, 446, 451, 494, 511
Reductores de sulfato, 102, 113-115, 117, 118, 126, 129, 142, 288
Regla duplicación/decuplicación, 28
Regulación de la isocitrato deshidrogenasa, 119, 120
Regulador XylR, 503
Rendimiento energético, 78, 128, 179, 180, 182, 192, 207
Represión por catabolito nitrogenado, 495
Residuo, 157, 200, 358, 360, 405, 418, 423, 431, 433, 434, 439, 442, 443, 474, 537, 543
Residuos urbanos, 556, 562-564
Resonancia, 78, 486
Resonantes, formas, 487
Respiración de carbonato, 101, 114
Respiración, 21, 37, 32, 34, 60, 61, 64, 85, 86, 88, 104, 115, 123, 147, 149, 151, 159, 170, 172, 180-183, 188, 206, 220, 237, 243, 408, 411, 502
Resveratrol, 285, 506, 515
Retinal, 83
Retinoico, ácido, 520
Retraso de la movilidad electroforética, 339, 343
Rhizobium, 164, 165, 167, 182, 191
Rhizoctonia, 551
Rhizopus, 543
Rhodobacter capsulatus, 334, 493, 495
Rhodobacter, 95
Rhodococcus erythropolis, 496
Rhodococcus globerulus P6, 475
Rhodococcus, 492
Rhodopseudomonas, 182, 406
Rhodopseudomonas viridis, 96
Rhodospirillum, 551
Ribosa-5 fosfato, 107
Ribosa-5P, 140
Ribulosa 1,5-bisfosfato, 139
Ribulosa bisfosfato, 258

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Ribulosa monofosfato, ciclo de, 124, 143, 145
Ribulosa-5 fosfato, 107
Ribulosa-5P, 140, 145
Ricadhesina, 167
Ricina, 271
Ricinus communis, 271
Rifampicina, 520, 521
Rio Tinto, 392
RNA, 38, 40, 52, 53, 56, 58-60, 124, 151, 209, 215, 217, 219, 226, 227, 230, 233, 262, 283, 321, 232, 325-327, 333, 335, 338, 346, 348, 349, 354, 355, 376, 377, 384, 397, 446, 459, 530, 533
Rodanasa, 194, 195, 199
Rotura en meta, 456, 458, 480
Rotura en orto, 452, 480
RUBISCO, 138, 139, 141, 149, 202, 232, 258-261
Rudbeckia, 268, 269
Rumen, 102, 130, 131, 138, 277, 286, 288, 403, 404
Ruminococcus, 401, 403
Ruminococcus albus, 131
Rusticianina, 207, 208
Ruta de las pentosas, 101, 105, 106, 145
Ruta del 3-oxoadipato, 451-453, 455, 478-480
Ruta del acetil-CoA, 114, 117-119, 138, 142
Ruta Entner-Doudoroff, 145
Ruta fosforoclástica, 110, 111
Ruta oxidativa del Acetil-CoA, 117
Ruta reductiva del acetil-CoA, 143
Rutas anabólicas, 67
Rutas catabólicas, 12, 67, 429, 460, 461, 480, 481, 483, 503
Rutas ligninolíticas del TNT, 505
Saccharomyces cerevisiae, 232, 242, 323, 352
Saccharomyces, 110
Saccharum officinarum, 259
S-adenosilmetionina, 204, 244, 288-290
Salicilato, 283, 285, 430, 458, 470, 523
Salicornia, 266
Salmonella, 372
Samonella typhimurium, 202, 233
Saponinas, 279, 281
Scitonema, 550, 551
Se-cisteína, 540
Secuenciación del DNA, 348, 349, 351, 352
Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato, 140
Sedoheptulosa bisfosfatasa, 144, 145
Sedoheptulosa-7 fosfato, 107
Segunda Ley de la termodinámica, 68, 69
Selección Natural, Teoría de la, 258
Seleniato reductasa, 244
Seleniato, 244
Seleniato, reducción asimiladora del, 244
Seleniato, resistencia al, 244, 245
Selenio, 113, 252, 264
Selenio, ciclo biogeoquíco del, 239-241, 244
Selenito, 244
Seleniuro, 244
Selenocisteína, 243
Selenoproteínas, 243
Señalización intercelular en las bacterias, 289
Serina aciltransferasa (SAT), 189-191
Serina hidroximetilasa, 144
Serina, 120, 124, 142, 143, 190, 191
Serina, ciclo de, 142, 144
Serina/treonina kinasa, 284, 285, 535
Sesquiterpenoides, 280
Sesquiterpenos, 256, 264, 269
Sewanella putrefaciens, 543
Sexta extinción, 28
Shewanella, 206, 222
Shewanella oneidensis, 220-222
Shigella flexneri, 225
Shikimato, ruta del, 534
Sideróforos, 203, 205, 530, 532
Shigella diarrhea, 373
Silicio, ciclo biogeoquímico del, 234, 235
Silicio, transporte de, 234
Siloxanos, 230, 234
Simporte, 75-77, 84, 210, 216
Sinigrina, 274
Sintrofia intracelular, 287
Sintrofia, 61, 102, 113, 256, 286, 287, 364, 446, 449
Siringólido, 283
Sirohemo, 171-173, 190, 192
Sistema de dos componentes, 183, 233, 256, 289, 290
Sistema de dos híbridos, 339, 344
Sistema Omc (outer membrana cytochrome), 221

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Sistemas agregativos, 402
Sistemas no agregativos, 402
Sistemina, 275
Sitosterol, 278
Sodio, ciclo biogeoquímico del, 214-217
Solanáceas, 275, 281, 282
Solanum demissum, 280
Soluto compatible, 378, 388
Solutos crioscópicos, 262
Sonalum berthaultii, 274
Sorbitol, 109, 262, 263, 266, 303
Soret, 506, 508
Sorghum, 264, 272
Sphingomonas chlorophenolica, 483, 525
Sphingomonas sp. RW1, 469
Staphylococcus aureus, 229, 233
Stemphylium loti, 271
STr, sistema, 161
Streptococcus bovis, 130
Streptomyces, 373, 411, 542
Streptomyces thermoauttrophicus, 160, 161
Striga, 283
Suaeda, 266
Suberina, 515
Succinato deshidrogenasa, 111, 112
Succinato tiokinasa, 142
Succinato, 82, 89, 90, 96, 108, 110-112, 119, 144, 168, 213, 428
Succinil-CoA, 120, 142
Sulfatación, 190, 522
Sulfato, 23, 52, 61, 102, 109, 112-115, 117, 118, 126, 129, 142, 187, 188, 190-194, 198-201, 212-214, 218, 221, 223, 224, 236, 240, 244, 251, 252, 255, 256, 266, 286, 288, 303, 358, 369, 426, 520, 522, 541, 544
Sulfato, asimilación, 187-189
Sulfato, reducción respiratoria de, 192-195
Sulfito oxidasa, 199, 200
Sulfito reductasa, 187, 190, 192, 193, 499
Sulfocianina, 93
Sulfolobus, 194, 221, 254, 255, 386
Sulfolobus acidocalcarius, 138, 207, 383
Sulfonilureas, 533
Sulfurospirillum, 194
Superóxido dismutasa, 109, 112, 237, 285
Superóxido, 109, 160, 285, 490, 511
Synthrophomonas wolfei, 132
Talaromyces emersonii, 545
Taninos, 280, 281
Tartrolón B, 235
Tautomerasa, 492, 493
Taxus baccata, 277
TCCD, 520, 526
Teicoico, ácido, 542
Temperatura de fusión, 347
Temperatura optima, 254, 301, 347, 378, 380-383
Terapia enzimática, 311, 312
Terapia génica, 312
Terapias antibacterianas, 500
Terapias anticancerosas, 500
Tercera revolución verde, 531, 532, 576, 587
Termocicladores, 347
Termófilos, 61, 93, 239, 254, 262, 301, 380-384, 392, 394, 545, 569
Terpenoides, 269, 273, 274, 280, 282, 515, 516, 527
Testosterona, 363, 515, 517
Tetrahidrofolato, 114
Tetrametilaminas, 412
Tetrationato, 81, 199
Thalassia, 266
Thauera selenatis, 244
Thermoactinomyces, 569
Thermobifida, 401, 403
Thermococcus hydrotermalis, 395
Thermoplasma, 262, 386
Thermoproteus, 194
Thermotoga maritimea, 380
Thermus aquaticus, 347, 383, 396
Thermus thermophylus, 380, 397
Thiobacillus, 106, 182, 298, 201, 211, 221, 254, 386
Thiobacillus denitrificans, 198, 200
Thiobacillus ferrooxidans, 207, 208, 252, 253
Thiocapsa, 198
Thiomicrospira, 182, 198, 201
Thioploca, 198
Thiothrix, 201
Thiovulum, 201, 202
Thlaspi caerulescens, 538
Tilacoide, 65, 88, 98
Tiocianato, 195, 418
Tiocianatos, 271
Tiofeno, 93
Tiolato, 115, 508, 510, 511
Tiorredoxina, 189, 242

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Tiosulfato oxidasa, 199
Tiosulfato reductasa, 199
Tiosulfato, 193-195, 197, 199, 200, 244
Tiosulfato, aceptor oxido-reductasa, 199
Tipos de Fotosíntesis, 94
Tirosina fosfatasa, 239, 242
Tiroxina (T_4), 244, 363
TNT, 417, 487, 493, 495-499, 501-503, 505
Tolueno monooxigenasa, 503
Tolueno, 390, 417, 428, 429, 456-460, 462, 466, 474, 483, 499, 503
Tox, gen, 552
Toxafeno, 528
Tóxicos, 12, 92, 199, 223, 228, 236, 237, 250, 257, 263, 271, 273, 279, 280, 312, 314, 326, 358-361, 365, 367, 369, 373, 379, 390, 407, 408, 410, 415, 425, 428, 430, 441, 444, 450, 472, 480, 482-484, 487, 502, 507, 509, 510, 521, 526, 530, 533, 541, 557, 558, 562
Toxinas de arácnidos, 286
Toxinas exopolisacarídicas, 283
Transaldolasa, 145
Transaminasa, 144
Transcetolasa, 140
Transcriptoma, 354
Transferencia southwestern, 338
Transferrina, 205
Transformasas
Transgén, 358, 373, 375-377
Transgénicas, plantas, 373, 531, 532, 535, 539, 553
Transgénicos, 286, 530, 532, 554, 555, 587, 588
Transpeptidación, 232, 522
Transportador ABC (ATP-Binding Casette), 530
Transporte de nitrato, sistemas de, 170, 171
Transporte inverso de electrones, 88, 90, 179
Trehalosa, 270
Triacilgliceroles, 120
Triaminotolueno, 490, 493, 496, 497
Trichoderma viride, 402
Trichomonas, 287
Tricloroetileno (TCE), 447
Tricomas, 274, 539
Trifolium repens, 272
Trifolium subterraneum, 277
Trifosfato sódico (STP), 214, 215
Trimetilamina, 112, 124, 128, 196, 197, 412
Trimetilaminas, 412
Trinitrotolueno (TNT), 492, 495
Triosa fosfato isomerasa, 140
Tritionato, 193, 199
Triyodotironina (T_3), 244
Trofosoma, 201, 202
Troposfera, 248-250
Ubiquinona, 65, 179
Ulva, 266
Umami, 281
Umbelíferas, 274
Unidades Dobson (DU), 249
Uranio, biolixiviación del, 252
Ureasa, 177, 238, 297, 312
Vacuola, 261, 262, 266, 526, 539, 540
Vaina, 141, 220, 259-261
Valonia, 213
Van der Waals, fuerzas de, 487
Vanadato, 240
Vanadio, ciclo biogeoquímico del, 239, 240
Vanadocitos, 240
Vanadóforos, 240
Vanillato, 282, 283
Vanillina, 269
Vedalia cardinalis, 536
Velocidad de la luz, 102, 122
Ventana infrarroja, 146
Verbenona, 278
Vertidos de petróleo, 423, 430
Vibraciones moleculares, 144
Vibrio cholerae, 233
Vibrio fisheri, 289, 416
Vibrio harveyi, 290
Viola calaminaria, 537, 538
Viscotoxina, 270
Viscum, 270, 283
Vitamina B12, 102, 114, 116, 122, 138
Vitamina C, 109
Vitaminas, 45, 80, 270, 292, 297, 415, 508
Volatilización, 438, 537, 540, 544, 556, 558
Walter Gilbert, 352
Weltwitshia mirabilis, 261
Wilforth, H, 546
William Whitering, 272
Wolframio, ciclo biogeoquímico del, 239, 240

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial

Wolinella succinogenes, 244
Wolinella, 113
Xanthomonas, 225, 244
Xantofilas, 94, 267
Xantotoxina, 271
Xantoxina, 264
Xenoestrógenos, 363, 506, 526, 528
Xerófitos, 263
Xhantomonas oryzae, 535
Xhantomonas, 283, 284
Xhantotoxina, 516
Xilulosa-5 fosfato, 107
Xilulosa-5P, 139, 140
Yersinia pestis, 233
Yodotironina desyodinasa, 244
Zeolitas, 215
Zona habitable del sistema solar, 41
Zooglea ramigera, 572, 573
Zymomonas, 110

© Editorial Tébar. Prohibida la reproducción sin la autorización expresa de la editorial