

CUARTA PARTE

ACTIVIDAD METABOLICA

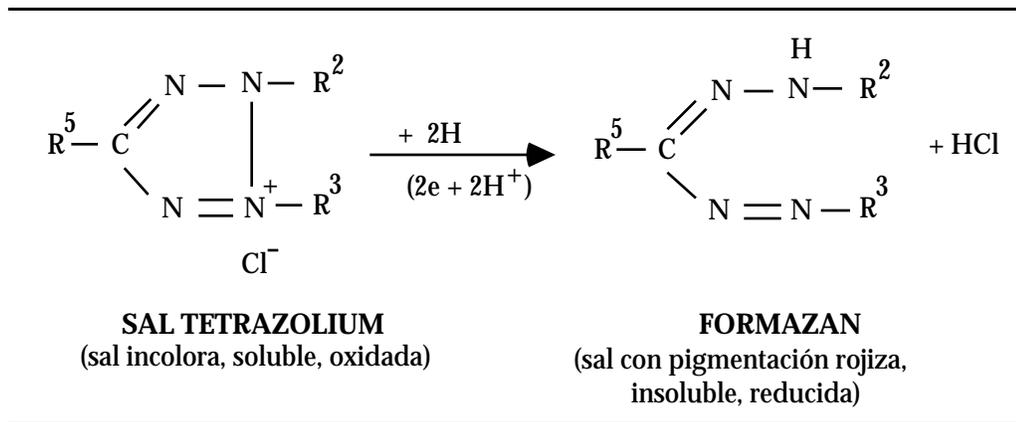
UNO DE LOS OBJETIVOS FUNDAMENTALES de la Ecología Microbiana es el estudio de la actividad metabólica de los microorganismos en su ambiente natural o bajo condiciones de laboratorio que intentan simular el ambiente natural. En términos generales, la metodología desarrollada hasta el presente para medir actividad metabólica de microorganismos incluye determinaciones de:

- grado de actividad de enzimas específicas (ej. deshidrogenasas, nitrogenasas, reductasas, celulasas, quitinasas y oxigenasas)
- potencial heterotrófico (incorporación de sustratos orgánicos marcados con radioisótopos)
- razón de crecimiento (estudios de la razón de incorporación de nucleótidos)
- productividad primaria (sistema botellas claras - oscuras)
- mineralización (descomposición de materia orgánica a CO₂),
- carga energética (ATP y adenilatos totales)
- alargamiento de células bacterianas en respuesta a un sustrato orgánico que sostiene el crecimiento (Técnica de Kogure)
- procesos metabólicos especiales (ej. metanogénesis, dechlorinación de PCB, biotransformación de xenobióticos); los procesos metabólicos se pueden monitorear midiendo la desaparición de un sustrato parental o la generación de productos intermediarios o del (los) producto(s) final(es)
- actividad respiratoria asociada a cadenas de transporte de electrones

Actividad respiratoria asociada a la cadena de transporte de electrones:

Las variaciones por unidad de tiempo en la actividad respiratoria pueden ser interpretadas como un reflejo de la actividad metabólica de los microorganismos que residen en determinado hábitat. Aún cuando se han desarrollado varios instrumentos y técnicas para medir actividad respiratoria (ej. respirómetro-Warburg, respirómetro-YSI, microcalorimetría y pruebas bioquímicas para medir actividad de deshidrogenasas) su utilización *in situ* ha sido limitada. De un lado, el consumo de oxígeno en muchos ecosistemas acuáticos resulta ser muy bajo para poder ser detectado, particularmente en ambientes marinos y por otro lado, la utilización del instrumento o técnica requiere de condiciones que difieren de las condiciones ambientales que prevalecen *in situ*. Más importante aún, los resultados obtenidos por los métodos antes mencionados son el reflejo de medidas macroscópicas (1 cm - 1 mm). Dicha escala de medidas no puede ser relacionada con procesos ejecutados por microorganismos que medimos en una escala mucho más pequeña (micrómetros). El desarrollo reciente de microelectrodos selectivos para oxígeno, óxido nitroso, sulfuro y pH ha permitido estudiar la actividad metabólica de comunidades microbianas *in situ*. No obstante, esta tecnología aún enfrenta algunos inconvenientes relacionados a su costo inicial, costos de operación para estudios *in situ* y a la fragilidad de los microelectrodos.

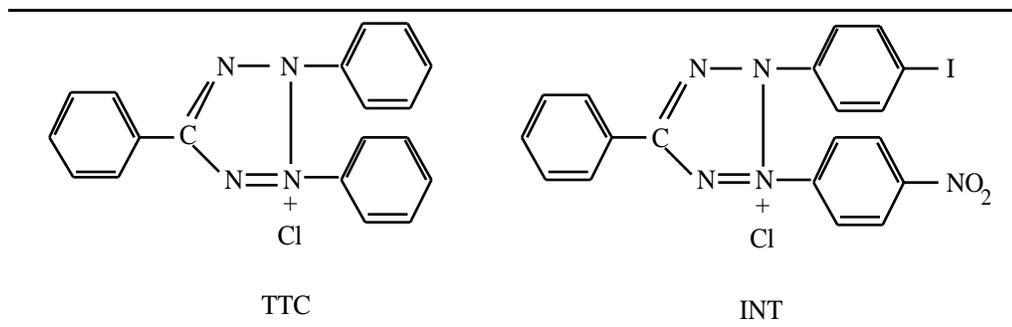
Figura 1:



El uso de sales de tetrazolium provee de métodos alternos indirectos para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones. Dichas sales se conocen desde el 1894, siendo reconocidas inicialmente por su efecto de teñir bacterias. La reducción de una sal de tetrazolium causa la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa, conocido con el nombre de formazán (Figura 1). Hoy día su utilización se extiende a: pruebas de viabilidad de semillas, presencia y enumeración de bacterias, pruebas de motilidad bacteriana en agar semisólido y detección de sistemas enzimáticos de deshidrogenasas. Las sales de tetrazolium presentan diferencias en

grado de solubilidad en grasas, tamaño de los cristales de formazán que generan al reducirse y la rapidez con que se produce la reacción de reducción. En términos generales, el potencial redox de las sales de tetrazolium al reducirse al estado formazán es de alrededor de -0.08 voltios, relativo al electrodo de hidrógeno. De esta forma, los tetrazoles actúan como aceptadores de electrones de muchos nucleótidos de pirimidinas asociados a sistemas enzimáticos (ej. deshidrogenasas).

Figura 2:



Las sales de tetrazolium: cloruro de trifeníl tetrazolium (TTC) y cloruro de iodo-nitrotrifenil tetrazolium (INT), (Figura 2), son utilizadas frecuentemente para medir actividad respiratoria asociada a cadenas de transporte de electrones, dada la rapidez con que son reducidas por la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas. Estas sales, al reducirse, se precipitan formando un complejo insoluble en agua de color rojo intenso. Podemos extraer el precipitado usando alcoholes (metanol, etanol o propanol) o mezclas de solventes orgánicos (tetracloroetileno-acetona, 2:3) (Burton et al., 1986). La eficiencia de extracción del formazán por estos solventes es la siguiente: tetracloroetileno-acetona > propanol > etanol > metanol. La concentración de formazán extraída puede ser determinada por espectrofotometría. El uso de estas sales nos permite estimar la actividad respiratoria ligada a cadenas de transporte de electrones que operan bajo condiciones aeróbicas (respiración aeróbica) y anaeróbicas (respiración anaeróbica). Finalmente, es importante señalar que la reducción de sales tetrazolium es afectada por el pH. A pH bajos (pH < 5) se inhibe la reducción del TTC o del INT a la correspondiente sal formazán. Por consiguiente, es importante considerar el pH de la muestra, cuando utilizamos la reducción de sales tetrazolium como un indicador de la actividad respiratoria de una comunidad de un cultivo microbiano.

Equipo y materiales:

- Espectrofotómetro (VIS)
- Celdas de espectrofotómetro (1 cm)
- Botellas de suero de 60 ml con tapón de ter-butyl

- Solución de cloruro de 2 - iodofenil - 3 - fenil - 5 - nitrofenil tetrazolium (2%)
- Pipetas (2.0 ml y 10.0 ml)
- HgCl₂ (30%) **¡Cuidado, es un material tóxico, utilice guantes desechables al trabajar con esta solución!**
- Etanol 100%
- Centrífuga clínica o centrífuga refrigerada de alta velocidad
- Tubos de cristal de 40 ml, con tapa de rosca (para centrífuga clínica)
- Tubos de centrífuga plásticos de 50 ml (para centrífuga refrigerada)



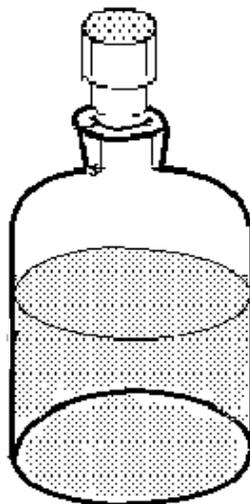
METODOLOGIA

METODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD RESPIRATORIA ASOCIADA A CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

TIPO DE MUESTRA

28.5 ml muestra de agua
○
28.5 ml muestra de sedimento acuoso
○
28.5 ml dilución de sedimento
○
28.5 ml de un cultivo o suspensión bacteriana

1. Transfiera muestra a botella de suero de 60 ml (con tapón de ter-butyl).



2. Añadir 1.5 ml INT (2%).
3. Incubar 1 hr, en obscuridad (incubación *in situ* para muestras de campo).
4. Fijar muestra con 1.0 ml de HgCl_2 (30%) (guardar a 4°C o en hielo en obscuridad).
5. Centrifugar muestra a 500 g por 20 min en centrífuga clínica (o 10,000 rpm en centrífuga refrigerada de alta velocidad, 2°C).
6. Decantar sobrenadante.
7. Añadir 5 ml etanol (100%) al pellet y agitar vigorosamente en Vortex por 2 minutos.
8. Centrifugar extracto a 400 g/20 min (centrífuga clínica) o a 10,000 rpm/10 min a 2°C en centrífuga refrigerada de alta velocidad.
9. Transferir sobrenadante (a tubo de 15 ml de cristal, limpio y con tapa de rosca).
10. Repetir extracción INT-Formazán del pellet con 5 ml adicionales de etanol (repetir pasos 7 - 8).
11. Mezcle el sobrenadante de la segunda extracción con sobrenadante de primera extracción.
12. Leer absorbancia del extracto a 485 nm (utilice etanol 100% como blanco) (Ver espectro de absorción en **Apéndice #1**).
13. Calcule concentración de INT-Formazán en $\mu\text{g/L}$ utilizando la curva estándar que aparece en el **Apéndice # 2**.



PREGUNTAS...

1. A diferencia de otras bacterias, las colonias de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* desarrollan colonias amarillo-anaranjado en el medio de cultivo de Tergitol TTC, en lugar del color rojizo que adquieren las colonias de otras especies bacterianas. Provea una explicación a este fenómeno. Considere en su análisis el patrón metabólico que exhiben ambas especies bacterianas cuando se cultivan en medios ricos en carbohidratos.
2. Indique por qué las muestras suplementadas con el INT se incuban en la oscuridad.

Apéndice #1

ESPECTRO ABSORCION DE INT - FORMAZAN EN ETANOL 100%



Apéndice #2

