

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN
B. cereus

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA DE LOS ANGELES MARTINEZ OLMEDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LAB. Tesis 1977
NO. M-~~1~~262
FECHA _____
PROC. _____
S. _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Prof. Natalia Salcedo O.
VOCAL: Prof. Alfredo Echegaray A.
SECRETARIO: Dr. Enrique Piña G.
1er. Suplente: Prof. Magdalena Oliva
2o. Suplente: Prof. Olga Velázquez M.

Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE BIOLOGIA. Departamento de Biología
Experimental. UNAM.

Sustentante


Ma. Angeles Martínez Olmedo.

Asesor del Tema


Dr. Enrique Piña Garza.

A MIS PADRES

**Con profundo agradecimiento y cariño
porque con su ejemplo me impulsaron
a realizarme.**

A MIS HERMANOS

**José Alberto y Adriana para que sigan,
como hasta ahora, el camino de la
superación.**

A SERGIO

Con amor.

AGRADEZCO AL DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
SU VALIOSA DIRECCION PARA LA ELABORA-
CION DE ESTA TESIS.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	3
GENERALIDADES	
MECANISMOS DE TRANSPORTE	4
CINETICA	9
INHIBICION	10
MICROORGANISMO	12
ESPORULACION	13
ANTECEDENTES	19
MATERIAL	25
METODO	
I) INCORPORACION DE LOS AMINOACIDOS DURANTE EL CICLO DE VIDA DEL MI- CROORGANISMO	29
II) ESTUDIOS DE CINETICA	31
III) INCORPORACION DE LOS AMINOACIDOS EN PRESENCIA DE DONADORES DE ELEC- TRONES E INHIBIDORES	33
RESULTADOS Y DISCUSION	36
CONCLUSION	50
BIBLIOGRAFIA	52

INTRODUCCION

En principio, la membrana celular de las bacterias representa una barrera al libre paso de moléculas, tanto del exterior al interior de la célula, como viceversa. Muy pocas moléculas, entre las cuales se encuentra el agua, pasan libremente a través de la membrana. La mayoría de las moléculas cuentan con especializados sistemas de transporte que de acuerdo con sus características se han agrupado en los que no requieren de energía para su funcionamiento y los que sí la requieren. Entre estos últimos se distinguen dos tipos de sistemas: aquellos en que la energía proviene de la hidrólisis de un fosfoanhídrido y aquellos en que la energía proviene del flujo de electrones a través de los acarreadores naturales presentes en las células.

Para el caso concreto de los aminoácidos se sabe que son transportados dentro de la célula por medio de un sistema de co-transporte recíproco de Na^+ , o sea que estos metabolitos se mueven dentro de la célula solamente con un movimiento simultáneo de Na^+ , del interior de la célula hacia afuera, por difusión

facilitada. El éxito de este transporte depende de la utilización de ATP para operar la bomba de Na^+ , que en la actualidad se ha demostrado se trata de un complejo situado en la membrana celular que hidroliza el ATP (ATPasa) en una reacción dependiente de Na^+ y K^+ .

OBJETIVO

En base a los estudios ya existentes sobre el transporte de aminoácidos, lo que se propone investigar en esta tesis son los cambios que ocurren en la captación de aminoácidos durante el ciclo de vida pre-esporulación del microorganismo:

Bacillus cereus (células completas) considerando los tres tipos de modelos de transporte descritos en la literatura en relación con la incorporación de los aminoácidos: el de los aminoácidos neutros, el de los aminoácidos básicos y el de los aminoácidos ácidos.

GENERALIDADES

MECANISMOS DE TRANSPORTE:

Un papel esencial de las biomembranas es promover el movimiento selectivo en ambos sentidos, de todos los compuestos necesarios para el funcionamiento normal de la célula a través de la barrera membranal. De fuera hacia adentro los nutrientes y de dentro hacia afuera los catabolitos.

Hay varios mecanismos generales por los cuales los metabolitos o los solutos pueden pasar a través de las biomembranas:

1) Difusión pasiva. - Sólo algunos metabolitos de peso molecular bajo se presume que son transportados de esta manera. La velocidad de flujo es directamente proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana. Si el gradiente cesa ya no hay flujo. Este proceso no sigue la cinética de saturación a la manera de la cinética enzimática clásica. Si se usan inhibidores del transporte activo, tales como el cianuro, el mecanismo no se

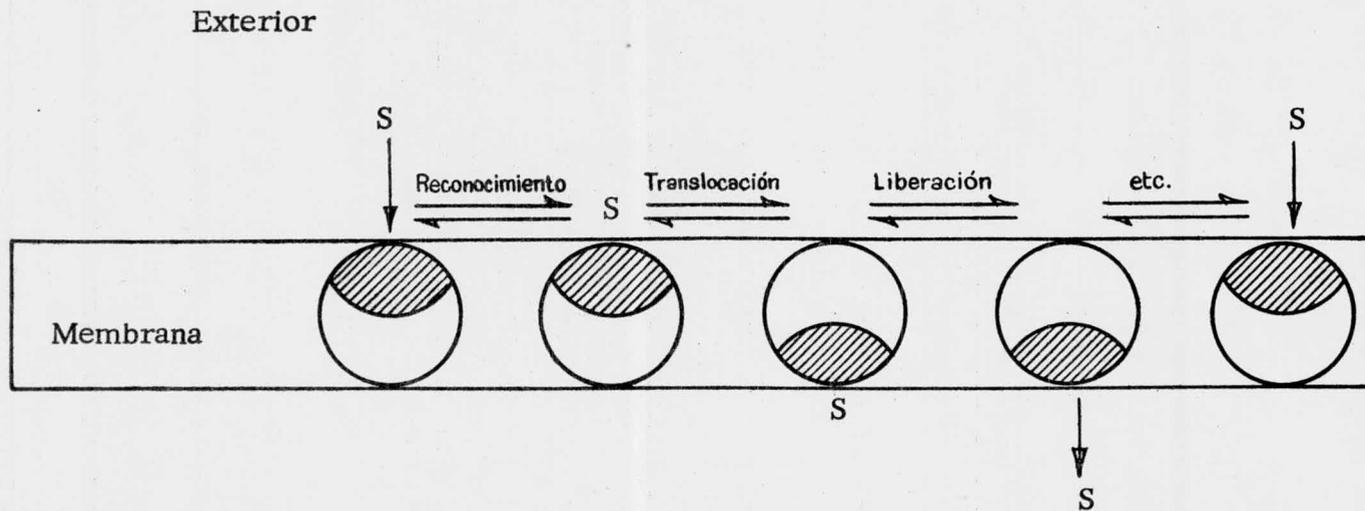
ve afectado. En general todos los metabolitos son transportados por procesos mejor regulados.

2) Difusión facilitada. - Requiere de un gradiente de concentración y no necesita de energía. La membrana celular contiene un gran número de componentes específicos de naturaleza proteica, llamados acarreadores, los cuales facilitan el proceso de transporte individual. La difusión, en este caso, es un mecanismo estereoespecífico y la velocidad de penetración del metabolito tiene un valor límite al incrementarse la concentración a un lado de la membrana. La velocidad del proceso es termosensible. El mecanismo general puede ser explicado por una molécula acarreadora específica presente en la membrana, la cual forma un complejo específico con el metabolito que va a ser transportado. El complejo por rotación, oscilación, difusión o por otro tipo de movimiento se transfiere a la parte interna de la membrana, donde se disocia para descargar el metabolito (Fig. 1).

Actualmente se han aislado y cristalizado un buen número de transportadores proteicos específicos que incluyen

Figura 1

MODELO PARA LA DIFUSION FACILITADA:



S = sustrato

proteínas acarreadoras para la glucosa, la galactosa, la arabinosa, la leucina, la fenilalanina, la arginina, la histidina, la tirosina, el Ca^{2+} , el Na^+ y el K^+ .

3) Transporte activo. - Es un proceso muy importante. Es muy similar a la difusión facilitada con la excepción de que el metabolito se mueve a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración y requiere, además, de energía.

MODELO: (Referencia 23). El metabolito que está fuera se combina con un acarreador y el complejo metabolito-acarreador es modificado en la membrana lipofílica por la energía, de tal manera que la afinidad del acarreador por el metabolito se ve disminuida, el metabolito es liberado en el interior de la célula, la conformación de alta afinidad del acarreador por su metabolito se regenera y el ciclo se repite. Una evidencia reciente indica que la energía que se requiere para el transporte activo envuelve dos diferentes sistemas: a) un proceso de respiración unido al transporte activo que no usa ATP y b) una utilización directa de ATP.

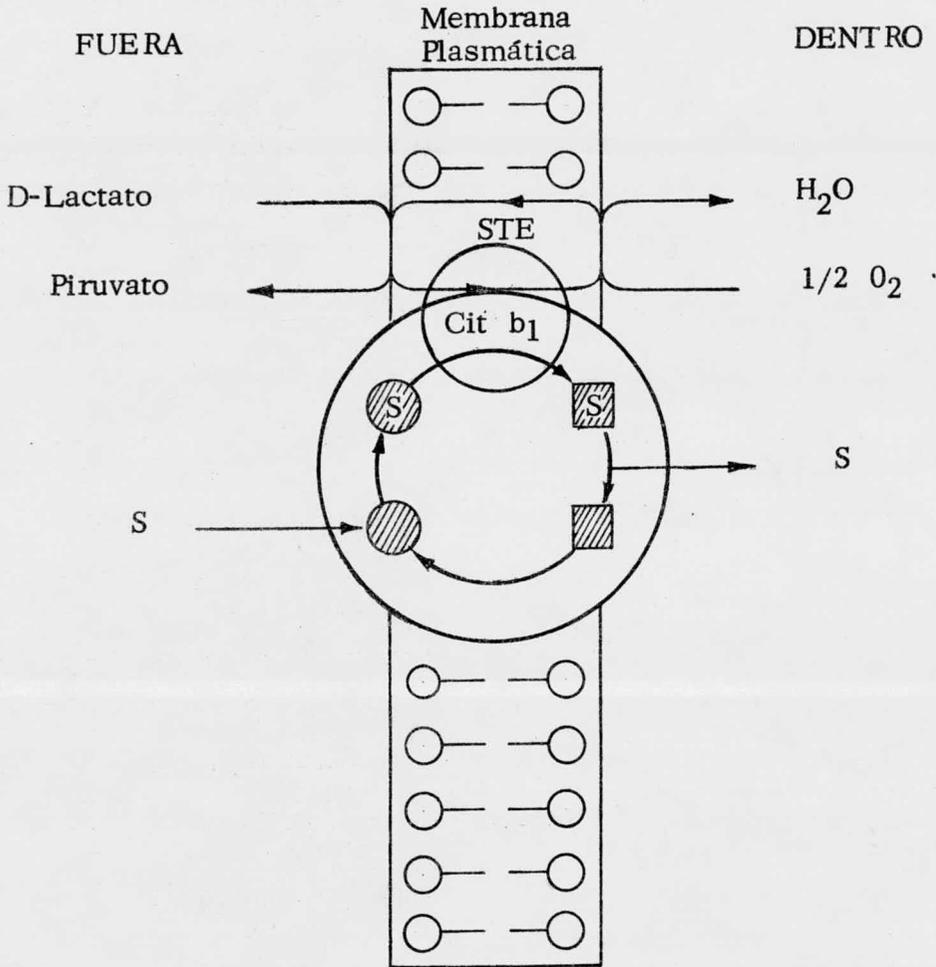
a) Proceso de respiración vinculado al transporte activo:

Este sistema está unido a la oxidación de un sustrato apropiado como el D-lactato, el L-malato, o el NADH, que es catalizado por una flavin-deshidrogenasa unida a la membrana. Los electrones derivados del sustrato son transferidos al oxígeno, o sea, a una cadena respiratoria ligada a la membrana, la cual está unida al transporte activo en el segmento de la cadena respiratoria entre la deshidrogenasa primaria y el citocromo b_1 . No hay hidrólisis de ATP. (Fig. 2). Un gran número de metabolitos se conoce que son transportados en las bacterias por este tipo de sistema; por ejemplo: la galactosa, la arabinosa, el ácido glucurónico, los aminoácidos, los ácidos hidroxil, ceto y dicarboxílicos, los nucleósidos, etc.

b) Utilización directa de ATP:

Todas las membranas plasmáticas tienen una actividad enzimática en común llamada ATPasa que se activa con Mg^{2+} , K^+ y Na^+ . La reacción abarca una hidrólisis de ATP, envolviendo: 1) una fosforilación de la enzima que depende del Na^+ y 2) una hidrólisis de la fosfoenzima que depende del K^+ . La unión enzima-fosfato ha sido identificada con un residuo aspartil- β -fosfato.

Figura 2



PROCESO DE RESPIRACION VINCULADO AL
TRANSPORTE ACTIVO.



= Sitio de unión de gran afinidad.

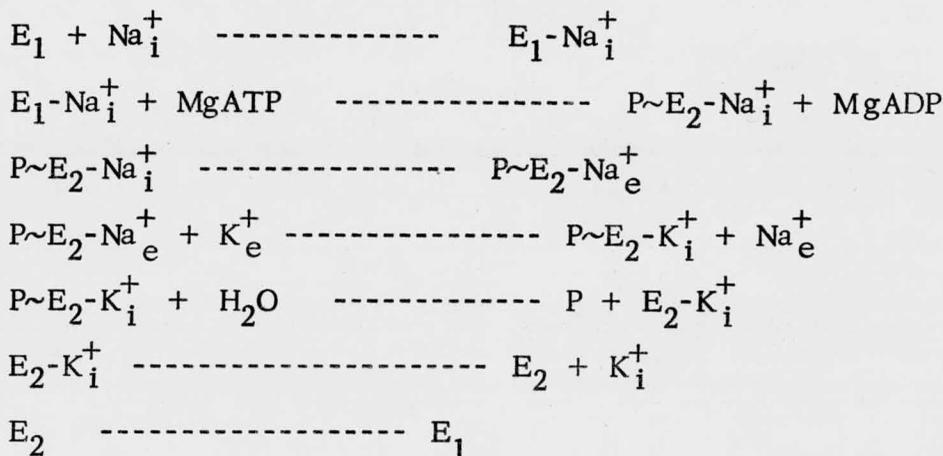


= Sitio de unión de baja afinidad.

STE

= Sistema de transporte de electrones.

Reacciones que se llevan a cabo:



E_1 y E_2 = diferentes conformaciones de E, que es la ATPasa dependiente de Na^+ y de K^+ .

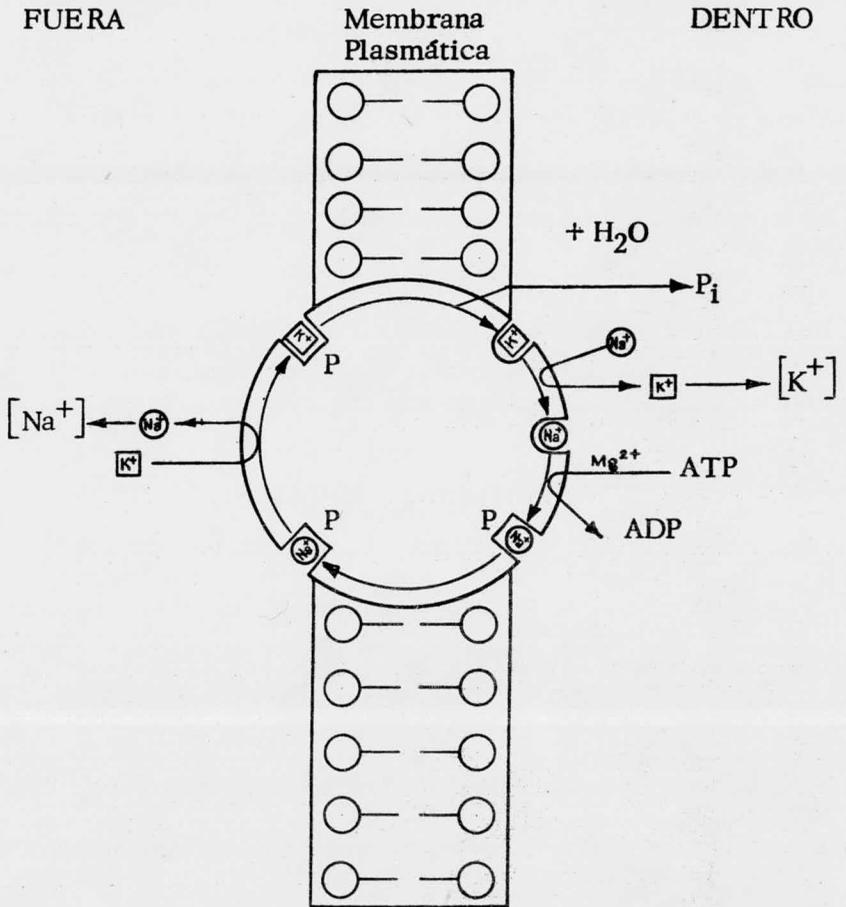
E_1 tiene una gran afinidad por el Na^+ y E_2 tiene gran afinidad por el K^+ .

i = en el interior de la célula

e = en el exterior de la célula.

E_1 representa la enzima no fosforilada cuyos sitios específicos para el Na^+ dan hacia adentro de la célula (Fig. 3). El Na^+ se une en estos sitios permitiendo la fosforilación de E_1 por MgATP,

Figura 3



BOMBA NaK ATPasa

⌋ = Sitio de unión de gran afinidad para el Na⁺; baja afinidad para el K⁺.

⌋ = Sitio de unión de gran afinidad para el K⁺; y baja afinidad para el Na⁺.

E_1 se convierte ahora en E_2 -P. Esta conversión hace que los sitios de unión con el Na^+ den hacia afuera de la célula con la subsecuente pérdida del Na^+ y unión del K^+ , que al unirse hace que se orienten hacia dentro; E_2P entonces regresa a $E_2 + Pi$ y el K^+ es liberado dentro de la célula y el ciclo está listo para empezar otra vez.

CINETICA:

Se ha demostrado (Ref. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12) que el transporte de aminoácidos, en las células de las bacterias, se realiza preferentemente por mecanismos de difusión facilitada y de transporte activo. En ambos mecanismos se forma un complejo acarreador-molécula acarreada, semejante al complejo enzima-sustrato de las enzimas. Por lo tanto la cinética que siguen los procesos de transporte de aminoácidos, es muy parecida a la cinética enzimática de Michaelis-Menten, o sea, que el sistema puede ser saturado y los valores de K_m y de velocidad máxima pueden ser medidos fácilmente, por medio de la elaboración de las gráficas:

a) Velocidad contra concentración de aminoácido

b) Los recíprocos: $1/\text{velocidad}$ contra $1/\text{concentración}$ de aminoácido. (Figs. 4 y 5).

INHIBICION:

El uso de inhibidores específicos ha servido para entender la manera como son transportados los diferentes metabolitos.

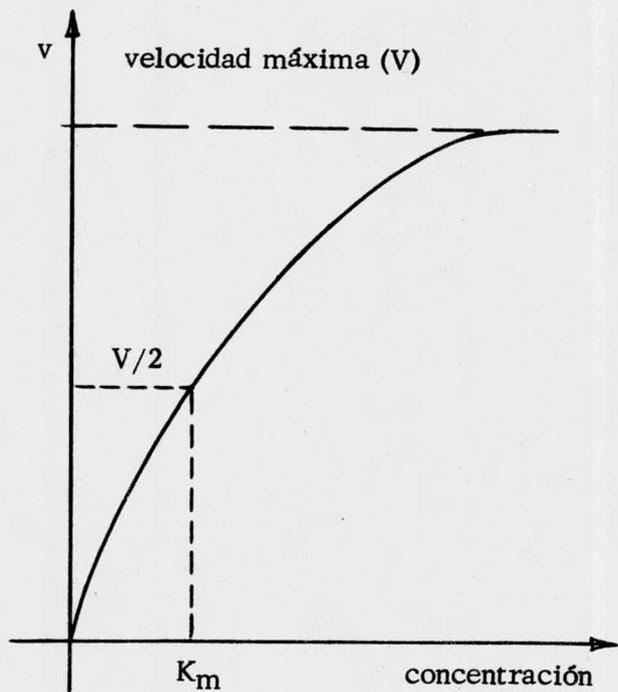
Si se usan inhibidores en la obtención de energía (bloqueo del despeño de electrones y síntesis de ATP) y ocurre una inhibición en el transporte de los aminoácidos, éste se lleva a cabo por el mecanismo de transporte activo y no habrá inhibición si el transporte de aminoácidos sucede por difusión facilitada. Si el inhibidor utilizado es un desacoplante que estimula la hidrólisis de ATP o evita la fosforilación del ADP a ATP, y el transporte de aminoácidos continúa, quiere decir que éste se lleva a cabo utilizando la energía liberada en el despeño de los electrones.

Se reconocen tres tipos generales de inhibición:

a) Inhibición competitiva. - Los compuestos que están o no relacionados estructuralmente con el sustrato natural del acarreador se combinan reversiblemente con éste en el sitio activo o cerca de él. Esto implica un equilibrio entre el acarreador y el inhibidor, la constante de equilibrio (K_i) es una medida de la afinidad del inhibidor por el acarreador. El inhibidor y el sustrato, por lo tanto, compiten por el mismo sitio. Grandes concentraciones de sustrato vencen la inhibición. Las figuras 6 y 7 son los diagramas de las curvas típicas observadas en este tipo de inhibición.

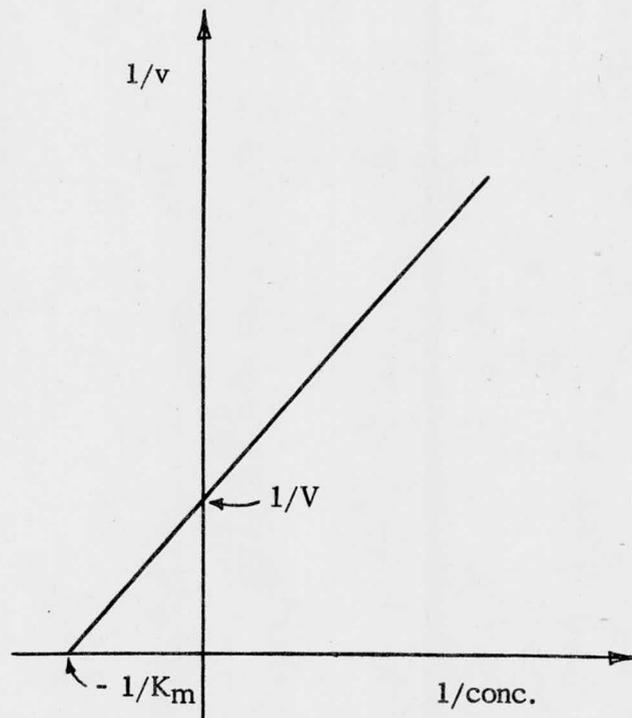
b) Inhibición no competitiva. - Los compuestos que se unen con el acarreador o con el complejo acarreador-sustrato se designan como inhibidores no competitivos. Esta inhibición entonces difiere de la competitiva en que el inhibidor se puede combinar con el complejo acarreador-sustrato y el sustrato se puede combinar con el complejo acarreador-inhibidor para formar en ambos casos el complejo acarreador-inhibidor-sustrato. Este tipo de inhibición no es reversible completamente por una alta con-

Figura 4



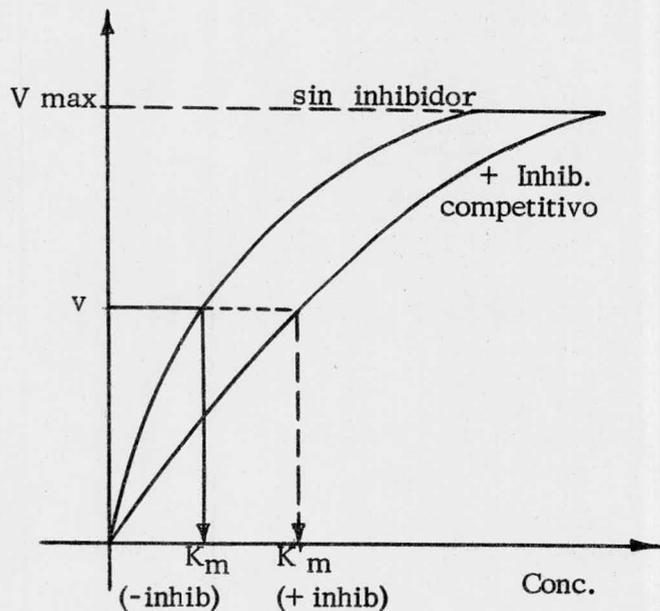
Relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato.

Figura 5



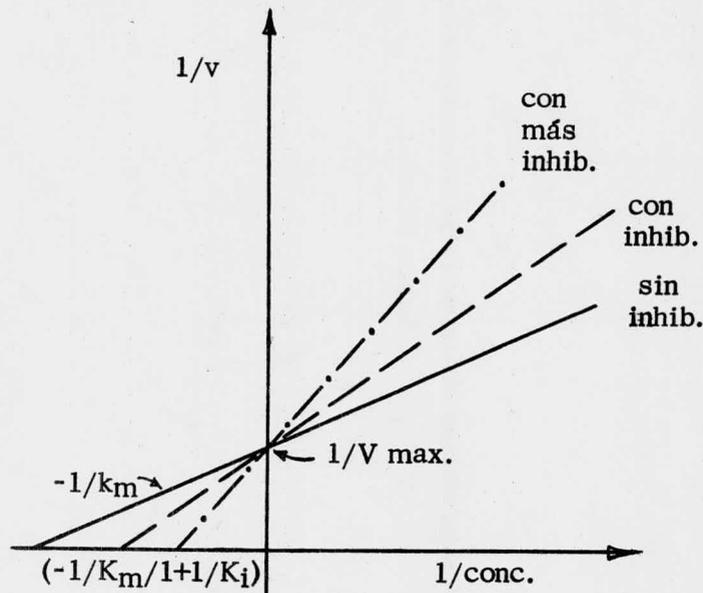
Curva recíproca de velocidad y concentración.

Figura 6



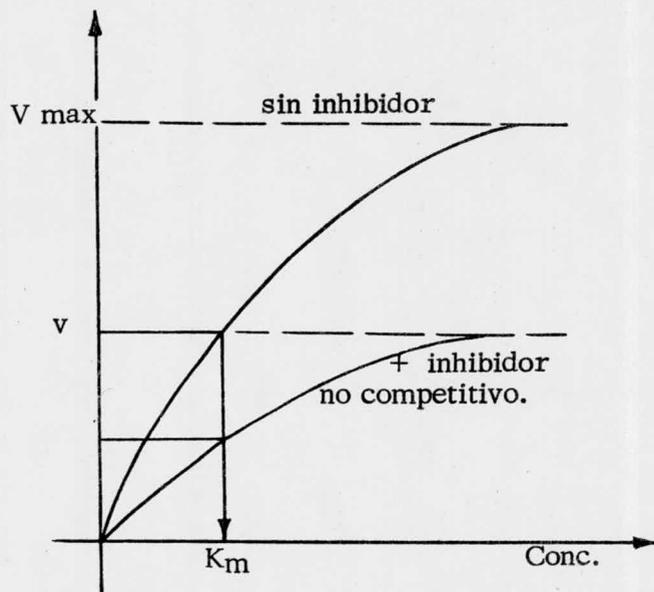
Relación entre v , velocidad de reacción y concentración de sustrato con y sin inhibidor competitivo. Hay un cambio en la K_m en ausencia y presencia del inhibidor y no lo hay en la V_{max} .

Figura 7



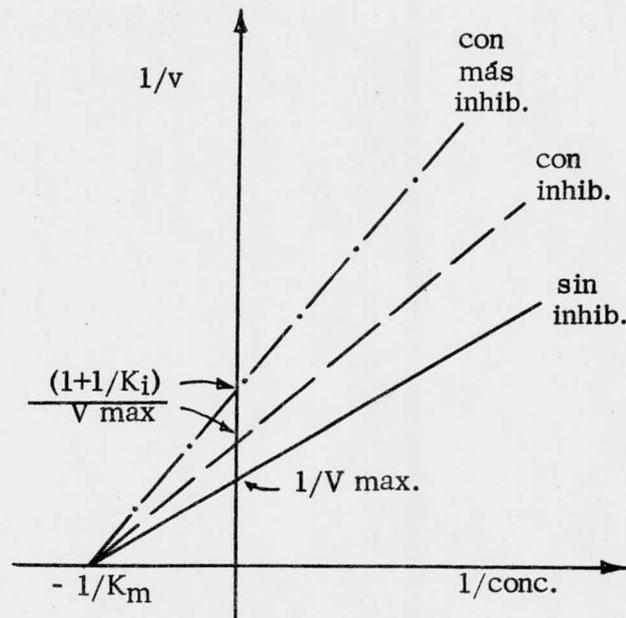
Curva recíproca de velocidad y concentración con diferentes concentraciones de inhibidor competitivo.

Figura 8



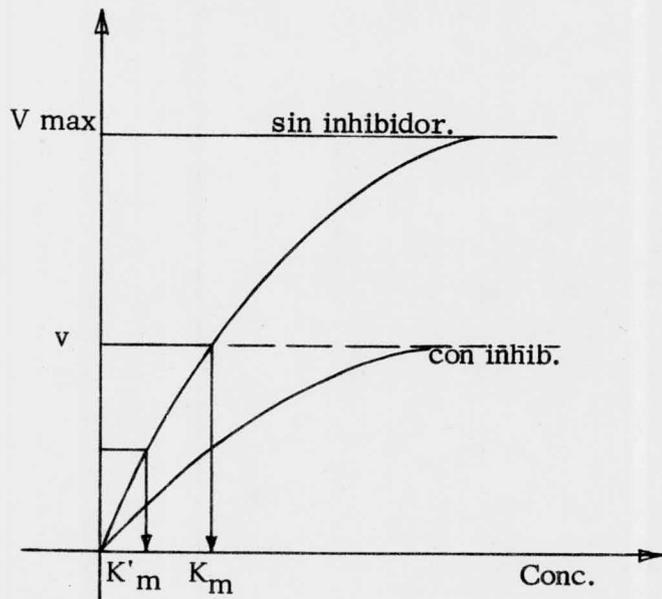
Relación entre v y concentración de sustrato con y sin inhibidor no competitivo. Hay un cambio en la velocidad máxima pero la K_m permanece constante.

Figura 9



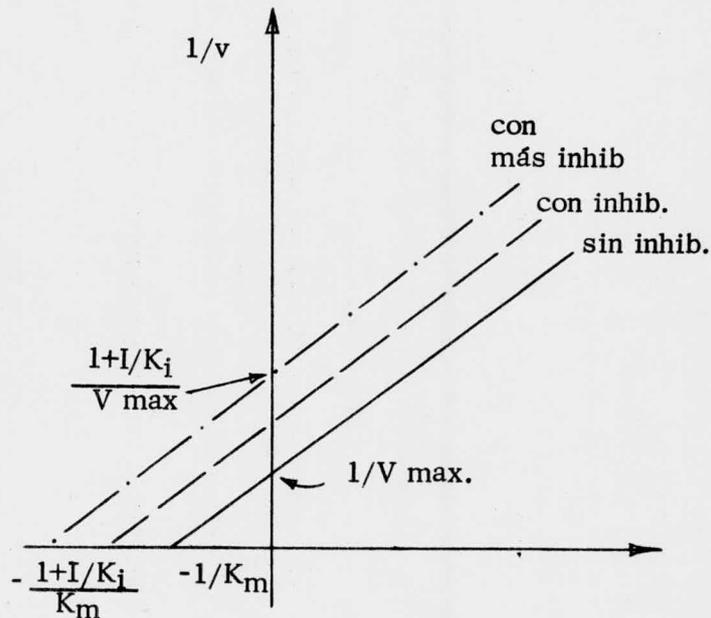
Curva recíproca de velocidad y concentración, con un incremento en la concentración de un inhibidor no competitivo.

Figura 10



Relación de v y concentración de sustrato con y sin inhibidor uncompetitivo. Hay una disminución en el valor de K_m (K'_m) y en la velocidad máxima.

Figura 11



Curva recíproca de velocidad y concentración con y sin inhibidor uncompetitivo.

centración de sustrato, inclusive puede ser irreversible, esto es, que se forme una unión covalente con una función específica, usualmente un residuo de aminoácido, el cual de alguna manera está asociado con la actividad del acarreador; el inhibidor, por lo tanto, no se puede liberar. Ya que el sitio de unión del inhibidor no es idéntico, no modifica el sitio activo, la K_m no se ve alterada. Las figuras 8 y 9 son las gráficas características de esta inhibición.

c) Inhibición uncompetitiva. - Los compuestos que solamente se combinan con el complejo acarreador-sustrato pero no con el acarreador libre, se llaman inhibidores uncompetitivos. En este caso la inhibición no se vence por grandes concentraciones de sustrato. Las figuras 10 y 11 describen las curvas típicas de este tipo de inhibición.

MICROORGANISMO:

El microorganismo que se utilizó para la investigación fue: B. cereus, que pertenece a la familia Bacillaceae; Género: Bacillus. Es un organismo aeróbico, Gram + , esporulado,

de forma cilíndrica y mesófilo (33). Normalmente se encuentra en el suelo, el polvo y el agua.

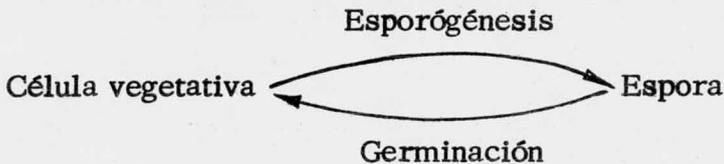
La razón por la cual fue seleccionado este microorganismo, es por su facilidad de aislamiento, fácil sincronía de cultivo, además de no ser patógeno y formar esporas con rapidez en medios sencillos y de manera sincronizada.

ESPORULACION:

Todos los eventos genéticos, morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que dan lugar a la conversión de las células vegetativas a esporas son definidos como ESPOROGENESIS O ESPORULACION. El producto final son las esporas que difieren citológica, fisiológica y bioquímicamente de la célula vegetativa.

Las esporas bacterianas son células altamente deshidratadas que forman interiormente ciertas bacterias (Género *Bacillus*), como respuesta a un medio ambiente subóptimo. Comparadas con células vegetativas son muy resistentes a tratamientos adversos como el calentamiento o la deshidratación importante.

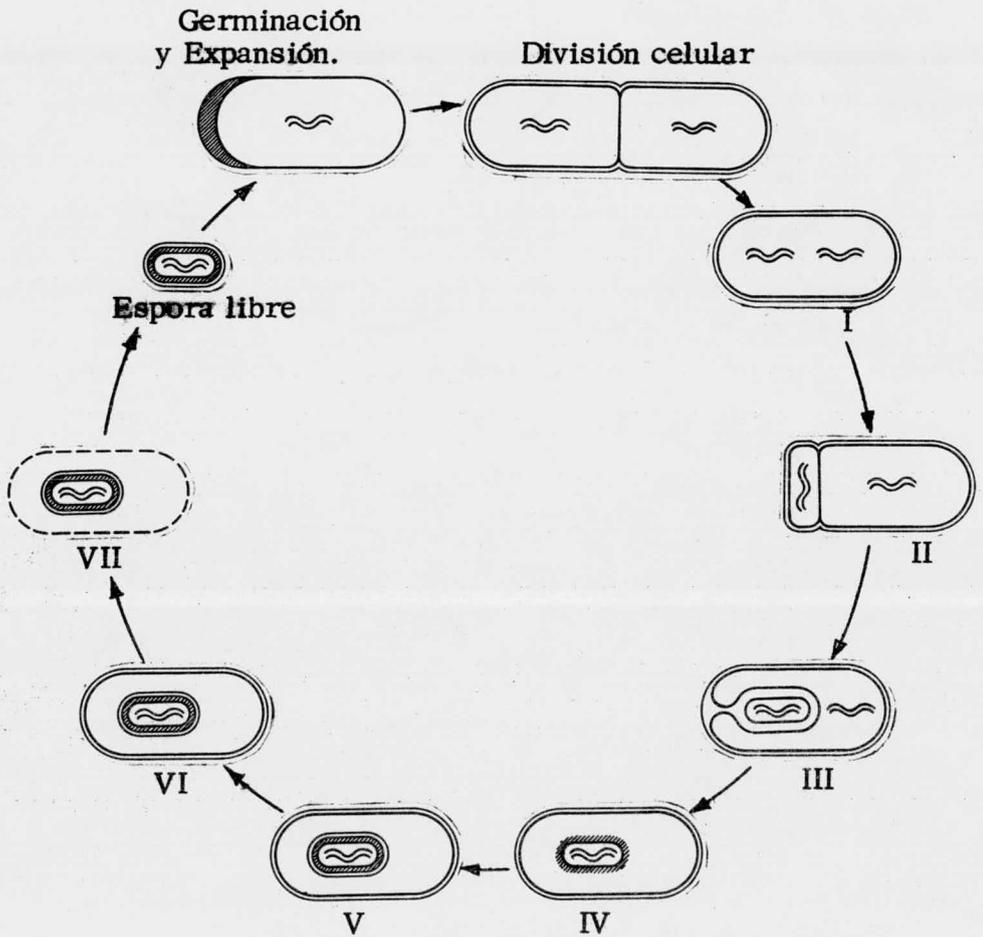
La transición de la forma vegetativa a la latente constituye para muchos investigadores el ejemplo más sencillo en la naturaleza del proceso de diferenciación celular. La emergencia de células vegetativas, a partir de las esporas, bajo condiciones fisiológicas favorables, se lleva a cabo en unos cuantos minutos en respuesta a agentes químicos específicos y se conoce como germinación:



La morfología de la formación de la espora está bien establecida. En la figura 12 están representados los siete pasos que se han descrito como característicos y distintivos estructurales, reconocibles en microscopía electrónica, del ciclo de vida de una bacteria esporogénica.

En primer lugar se observa un filamento axial de material cromático parte del cual es destinado para la espora, I. Esto es seguido por el plegamiento de la membrana celular

FIGURA 12



Ciclo de vida de una bacteria esporogénica y etapas morfológicas de la esporulación.

para formar el "septum" de la forespora, II, este evento coincide con el tiempo en el cual el DNA es compartimentalizado. El crecimiento continuo de la membrana y el englobamiento de la forespora da lugar a la pre-espora, III. El paso IV marca el comienzo de la formación de la corteza y es también el período en el cual el ácido diaminopimélico, que es un constituyente de la corteza y la cisteína, constituyente de la cubierta de la espora, son incorporados. Este paso es seguido por la completa formación de la cubierta, acumulación de ácido dipicolínico e incorporación de Ca^{2+} , es el final del desarrollo de la corteza y la resistencia térmica de la espora, V. Paso VI, la espora madura dentro del esporángio. Finalmente las enzimas líticas liberan la espora, VII.

La propiedad más característica de las esporas bacterianas es su resistencia: al calor, a la luz ultravioleta, a los rayos X, a los disolventes orgánicos, a las sustancias químicas en general y a la desecación.

La aparición de estos tipos de resistencia en dife-

rentes etapas durante la esporulación y su pérdida durante la germinación hace ver que son debidos a la particular composición fisicoquímica de la espora. Uno de los componentes químicos más distintivos de la espora es el agente quelante DPA (ácido dipicolínico o ácido 2,6-piridíndicarboxílico) el cual siempre se encuentra en la espora en una relación 1:1 con el Ca^{2+} . Desde hace mucho tiempo se cree que el DPA es esencial para la resistencia térmica, pero a pesar de considerables investigaciones todavía no se han establecido bien las bases bioquímicas.

El desarrollo morfológico de la espora está acompañado de cambios bioquímicos grandes. Algunas enzimas sintetizadas durante la esporulación están asociadas con la producción de las esporas, por ejemplo: las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico que en células vegetativas están reprimidas, son necesarias para la formación de la espora, pero están ausentes en la espora en estado latente. Otras, en cambio, son componentes de la misma espora.

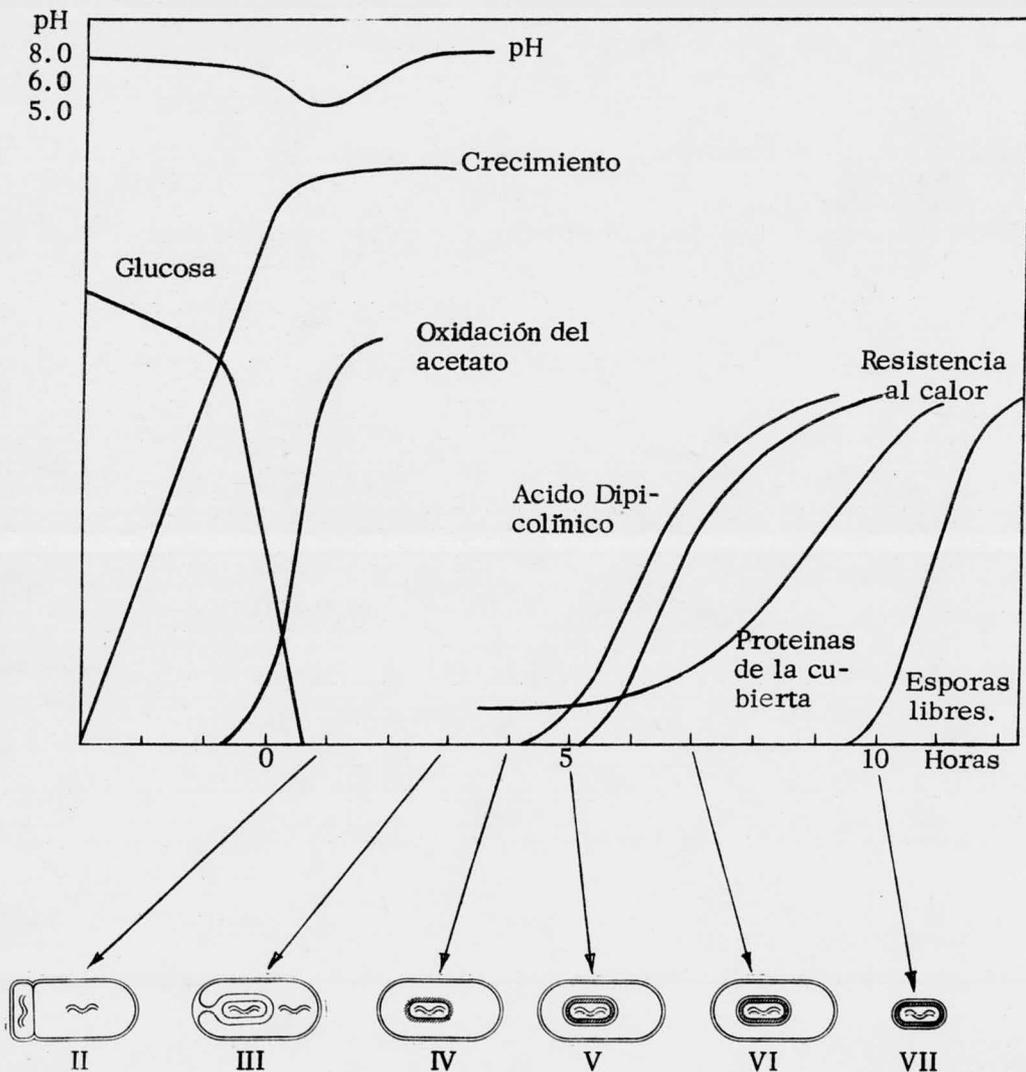
La esporulación se produce cuando cesa el crecimiento debido al agotamiento de un nutrimento esencial, entonces en vez de dividirse, cada célula producirá una espora intracelular llamada endoespora en un período de 8-10 horas. Así durante el crecimiento exponencial es fermentada la glucosa, acumulándose los ácidos de esta fermentación, lo que determina un descenso del pH, cuando la glucosa se agota la población cambia el crecimiento fermentativo por el oxidativo debido a la síntesis de enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico y los ácidos orgánicos son usados ahora como fuente de energía. En este momento hay un marcado incremento en el consumo de oxígeno y una elevación del pH debido al consumo por las células de los ácidos orgánicos. Hacia esta época comienza a aparecer el septum transversal de la espora y hay una degradación considerable de proteína en la región del citoplasma donde no se desarrolla la espora. Los aminoácidos liberados se usan en la síntesis de proteína para la espora y como fuentes adicionales de energía. A partir de este momento toda la energía de la esporulación debe venir de fuentes endógenas; puesto que las del medio están agotadas. A través de las etapas del proceso de esporulación hasta que la

espora madura está completa se forman nuevas moléculas de RNAm (mensajero) que son probablemente responsables de la síntesis de nuevas enzimas para la espora. Figura 13.

Una espora es capaz de permanecer latente durante muchos años, pero puede convertirse de nuevo en célula vegetativa (germinación) en cuestión de minutos. Este proceso implica tres etapas:

1. - **Activación.** - La cual condiciona a la espora a germinar en un medio adecuado. Es un proceso reversible que puede ser efectuado por tratamiento con agentes reductores o con calor.
2. - **Germinación.** - Es un proceso irreversible en el que se pierden todas las características típicas de la espora como la refringencia por ejemplo: hay un aumento en la capacidad de tinción por colorantes y marcada disminución de la resistencia al calor.
3. - **Expansión.** - En el cual nuevas clases de proteína y estructuras son sintetizadas dando lugar a la conversión de la espora en una nueva célula vegetativa (Ref. 39).

Figura 13. Secuencia de eventos que ocurren durante la esporulación de un bacilo aeróbico.



ANTECEDENTES

Se han hecho numerosos estudios sobre el transporte de aminoácidos en microorganismos, tanto en células completas como en vesículas de membrana. Sólo se mencionarán aquellos trabajos que de alguna manera están relacionados con los datos experimentales reportados en esta tesis.

En 1964 Giovanna Ferro-Luzzi A. (1) describió dos métodos para investigar el transporte de aminoácidos en bacterias. El primero consiste en medir la velocidad de formación de una poza de histidina marcada, observando que en células en crecimiento normal, esta poza se forma extremadamente rápido (en segundos a 37°) y es muy pequeña. Se obtuvieron las constantes de afinidad y otras características cinéticas de la incorporación de histidina y se detectó la presencia de permeasas para los aminoácidos aromáticos. En el segundo método se estudio la velocidad inicial de incorporación al añadir el aminoácido radioactivo a las células en crecimiento exponencial, la incorporación es inmediata y entra a la formación de proteínas.

En 1967 R. W. Bernlohr (2) investigó los cambios en la incorporación de aminoácidos en B. licheniformis y la formación de pozas de aminoácidos en otras tres especies de Bacillus, usando células en diferentes etapas de su ciclo de vida (tanto en etapas de crecimiento como en esporulación). Determinó la velocidad máxima de incorporación y las constantes de afinidad para cada aminoácido.

En 1972 W. N. Konings y E. Freese (3) hicieron estudios sobre el transporte de aminoácidos en vesículas de membrana en presencia de donadores de electrones como son: NADH, NADPH, L- α -glicerol-P, L-lactato, succinato y fenazina metosulfato. Determinaron también los valores de velocidad máxima y K_m para la incorporación de 18 aminoácidos. La energía para el transporte activo parece ser producida en la cadena de transporte de electrones a nivel citocromo, ya que todos los donadores de electrones causan una reducción de los citocromos ligados a la membrana. Usaron también varios inhibidores del transporte de electrones como antimicina y cianuro, observando que también se inhibe el transporte de aminoácidos, para todas las fuentes de energía

usadas. La rotenona y la oligomicina solamente inhiben el transporte al usar lactato como fuente de energía.

En 1972 F. J. Lombardi y H. R. Kaback (4) estudiaron el transporte de aminoácidos en membranas preparadas de E. coli, usando también donadores de electrones para estimular el transporte. Encontraron que el transporte de aminoácidos en estas vesículas de membrana presenta propiedades similares a las encontradas previamente para el transporte de β -galactósidos vinculados al proceso de respiración.

En 1974 M. L. Hampton y E. Freese (5) analizaron la eficiencia de donadores de electrones como el NADH y el glicero fosfato para dar energía al transporte de aminoácidos, en vesículas de membrana de B. subtilis. Vieron que para este microorganismo el L- α -glicero-P es mucho más eficiente que el NADH, pero este resultado se ve modificado según la orientación de las vesículas.

En 1974 V. L. Clark y F. E. Young (6) estudiaron el

transporte de D y L-alanina en células completas de B. subtilis, encontrando dos sistemas diferentes de transporte para estos aminoácidos. Un sistema de alta afinidad, específico para los dos estereoisómeros de la alanina y un sistema de baja afinidad que transporta glicina, D-cicloserina y D-serina, además de la D y L-alanina. Sugieren que la energía para el transporte de estos aminoácidos es obtenida de la cadena de transporte de electrones.

En 1975 W. N. Konings (7) hizo estudios con donadores de electrones para estimular el transporte de aminoácidos en células completas y en vesículas de membrana de B. subtilis. Usando succinato observó que éste es oxidado por las células completas y por las vesículas a baja velocidad y que no da suficiente energía para el transporte de L-glutamato. En presencia de fenazina metosulfato o de 5-N-metil fenazonio-3-sulfonato, la velocidad de oxidación y la velocidad de transporte del L-glutamato se ven aumentadas considerablemente. Los electrones son transferidos directamente de la deshidrogenasa succínica a estos aceptores. Usando NADH, éste es oxidado a una alta velocidad y

da energía para el transporte de L-glutamato en células completas y en vesículas. Tratando las vesículas con tripsina, la velocidad de transporte del L-glutamato se ve disminuída, o sea que uno o varios componentes del sistema de transporte para el L-glutamato se ven modificados por el tratamiento con tripsina.

En 1977 T. W. Krulwich, R. Blanco y P. A. Mc. Bride (8) observaron que algunos aminoácidos son transportados sólo si el sistema es estimulado por malato, tanto en células completas como en vesículas, en cambio otros aminoácidos no necesitan malato, pero si son estimulados por ascorbato-fenazina-metosulfato. Analizaron la cinética del transporte de los aminoácidos determinando las constantes de afinidad y encontraron además que estos sistemas de transporte están vinculados a la respiración.

En 1977 T. B. Brummett y G. W. Ordal (9) examinaron el efecto de tres desacoplantes de la fosforilación oxidativa: el pentaclorofenol, la trifluorometoxicarbonilcianofenilhidrazona y la tetraclorosalicilanilida, en el transporte de glicina y prolina en B. subtilis. Encontraron que estos desacopladores **inhiben** el

transporte de aminoácidos por interacción en sitios específicos más que por reducción del abastecedor de energía usado como combustible para el proceso metabólico.

De acuerdo con los antecedentes, y tal como se dijo, en esta tesis se pretende investigar los cambios que ocurren en la captación de aminoácidos durante el ciclo de vida pre-esporulación del microorganismo; B. cereus (Células completas).

MATERIAL:

- I) Microorganismo. Bacillus cereus. Cepa proporcionada por: California State University. Los Angeles.
- II) Medio. Se usó para crecer el microorganismo el Medio G modificado (14) que contiene: 0.1% de sacarosa, 0.1% de extracto de levadura y sales.
- III) Reactivos:
 - L-alanina-¹⁴C (U). New England Nuclear.
 - Acido L-glutámico-¹⁴C. New England Nuclear.
 - L-lisina-¹⁴C (U). New England Nuclear.
 - De los Laboratorios Difco:
 - Agar nutriente y Extracto de levadura.
 - De Eastman K. Co. :
 - 3,3' , 4',5-tetraclorosalicilanilida.
 - De la casa Merck:
 - Acido ascórbico, ácido succínico, cianuro de potasio, pentaclorofenol, N-N, dimetilformamida, y tetrametilparafenilendiamina.

De la casa Sigma Chemical Co. :

DL- α -glícero-P, ácido DL-málico, D-alanina, L-alanina, ácido L-glutámico, glucosa, piruvato, fenazina-metosulfato, 2,5-difenil oxazol y (1,4-bis(2(4 metil-5-fenil-oxazolil)) benceno).

La trifluorometoxicarbonilcianofenilhidrazona (FCCP), fue un regalo de los Laboratorios Lilly.

Los demás reactivos de uso corriente en el laboratorio fueron de Merck de México.

El material de cristalería fue de la casa Pyrex.

IV Soluciones usadas en los experimentos. Concentraciones finales:

Solución de Ascorbato	10 mM
Solución de Succinato	10 mM
Solución de DL-malato	20 mM
Solución de DL- α -glícero-fosfato	1 mM
Solución de glucosa	20 mM
Solución de Piruvato	20 mM
Solución de Cianuro	1 mM

Solución de Fenazina-metosulfato	200 M
Solución de Pentaclorofenol	10 M
Solución de trifluorometoxicarbonilciano- fenilhidrazona	5 M
Solución de tetraclorosalicilanilida	0.020 M
Solución buffer. Se utilizó el Medio G sin sulfato de amonio, ni sacarosa, ni extracto de levadura y ajustado el pH a 6.5.	
Solución de centelleo para contar radiactividad:	
PPO (2,5-difeniloxazol)	5.0 g
Dimetil-POPOP (1,4-bis(2(4 metil-5-fenil-oxazolil))benceno).	0.5 g
Tolueno c. b. p.	1000 ml

V) Aparatos:

Espectrofotómetro Zeiss

Incubadora metabólica Dubnoff

Centrífuga Sorval, modelo RC2-B

Potenciómetro Coning, modelo 21

Aparato de filtración Millipore. Filtros de nitrocelulosa

con orificios calibrados de 45 U (25 mm de diámetro)
y 0.80 U (47 mm de diámetro).

Espectrómetro de Centelleo Líquido Packard Tri Carb.

Frascos del contador. (Viales).

METODO

Condiciones de cultivo: La cepa de B. cereus se mantiene en tubos con agar nutriente inclinado en refrigeración. A partir de éstos se inocula el microorganismo en matraces Erlenmeyer con medio G, incubándose a 30° C y con agitación. Para sincronizar el cultivo se hacen tres transferencias a intervalos de tiempo de tres horas.

Se mide la densidad óptica del cultivo a 540 nm, de manera que cuando se tenga la adecuada para el ensayo el crecimiento se detenga poniendo el matraz en hielo, para trabajar de inmediato. (Ref. 14).

Ensayos:

- I) Incorporación de los aminoácidos durante el ciclo de vida del microorganismo.

Para este ensayo se usó la concentración de 1 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}/\text{ml}$ de los aminoácidos: L-alanina- ^{14}C , L-lisina- ^{14}C

y L-glutamato-¹⁴C.

A los 30 minutos de haber hecho la tercera transferencia, se toma una muestra de células cada 15 minutos, a la cual se le hacen las siguientes determinaciones:

- a) se lee DO (540 nm)
- b) se mide pH
- c) para los experimentos con lisina y glutamato se filtra por filtros de membrana (Millipore), un volumen determinado de células, lavándolas tres veces con buffer, luego se suspenden en 9 ml de buffer de manera que se obtengan 9 ml de células con DO=0.5 para trabajar. Los 9 ml de células se incuban en el Dubnoff durante 2 minutos, al cabo de este tiempo se añade 1 ml de aminoácido radiactivo y se toma una muestra de 1 ml después de 1 minuto se filtra por Millipore y se lava 6 veces con agua fría. (En el caso de los experimentos con alanina, en vez de filtrar las células éstas

se centrifugaron 5 minutos a 12×10^3 rpm).

Los papeles filtro se dejan secar, se colocan en los viales con solución de centelleo y se cuentan.

II) Estudios de cinética:

Para estos experimentos se usaron las siguientes concentraciones de aminoácidos radiactivos:

<u>L-alanina-^{14}C</u>	<u>L-lisina-^{14}C</u>	<u>L-glutamato-^{14}C</u>
10 uc/25 umol/ml	10 uc/50 umol/ml	10 uc/25 umol/ml
5 uc/12.5 umol/ml	10 uc/ 1 umol/ml	10 uc/ 1 umol/ml
1 uc/6.25 umol/ml	5 uc/25 umol/ml	5 uc/12.5 umol/ml
1 uc/1.56 umol/ml	5 uc/0.5 umol/ml	5 uc/0.5 umol/ml
1 uc/1.00 umol/ml	2.5 uc/12.5 umol/ml	2.5 uc/6.25 umol/ml
1 uc/0.62 umol/ml	2.5 uc/0.25 umol/ml	2.5 uc/0.25 umol/ml
1 uc/0.31 umol/ml	1.25 uc/6.25 umol/ml	1.25 uc/3.12 umol/ml
0.66 uc/0.20 umol/ml	1.25 uc/0.12 umol/ml	1.25 uc/0.12 umol/ml
0.66 uc/0.05 umol/ml	0.62 uc/3.12 umol/ml	0.62 uc/0.06 umol/ml

0.50 uc/0.15 umol/ml 0.62 uc/0.06 umol/ml

0.25 uc/0.07 umol/ml

Se usó agua como patrón.

Procedimiento:.- Se filtra por filtros de membrana un volumen conocido de células (DO conocida), lavando tres veces con buffer. Se suspenden en un volumen adecuado de buffer para obtener una DO de 0.5 para trabajar. En el caso de la L-alanina, el buffer donde se suspenden las células contiene 0.5 mM de D-alanina. (Ref. 6). Se ayunan las células 5 minutos en hielo, al cabo de este tiempo se filtran 4 ml de células por Millipore lavando tres veces con buffer y se vuelven a resuspender en 4 ml de buffer para conservar la DO=0.5. Se incuban a 30° C, 4 minutos 30 segundos y se agrega 0.5 ml de agua, a los 5 minutos (30 segundos más) se agrega 0.5 ml del aminoácido radiactivo. Se toman muestras de 1 ml cada minuto, filtrándolas por Millipore y lavándolas seis veces con agua fría.

Los papeles filtro se dejan secar y se colocan en los viales con solución de centelleo para contarlos.

III) Incorporación de los aminoácidos en presencia de donadores de electrones e inhibidores:

1. Incorporación de L-alanina-¹⁴C

a) Sustratos usados: Glucosa, fenazina-metosulfato, glicero-P, ascorbato-fenazina-metosulfato, ascorbato-tetrametilenpara-fenilendiamina.

Cianuro como inhibidor

Agua como patrón.

En estos experimentos el volumen total de células se divide en dos partes, una de las cuales se ayuna en medio G con sacarosa y sin sulfato de amonio ni extracto de levadura, a 30°C en el Dubnoff durante 1 hora.

Se sigue el mismo procedimiento ya descrito para los ensayos de cinética tanto con las células ayunadas como con las no ayunadas, con la diferencia de que las células fueron centrifugadas 5 minutos a 12×10^3 rpm en vez de filtrarse. (Tablas II y III de resultados).

b) Sustratos usados: Glucosa y cianuro

Agua como patrón.

Se sigue el mismo procedimiento general, sólo que el medio ayuno es el medio G sin sacarosa. (Tablas IV y V).

2. - Incorporación de los aminoácidos en células ayunadas incubando 1 hora a 30°C en medio G sin sacarosa, ni sulfato de amonio, ni extracto de levadura.

Sustratos usados: Ascorbato-fenazinameto-sulfato, malato, succinato y glicero-fosfato.

Pentaclorofenol, trifluoremtoxycarbonilciano-fenilhidrazona, y tetraclorosalicilanilida como desacoplantes.

Agua como patrón.

Las concentraciones de los aminoácidos utilizadas fueron:

L-alanina- ¹⁴ C	10 uc/25 umol/ml
L-lisina- ¹⁴ C	10 uc/50 umol/ml
L-glutamato- ¹⁴ C	10 uc/25 umol/ml

Se sigue el mismo procedimiento que en el caso anterior.

NOTA: Cualquier modificación hecha al método se especifica en la discusión de los experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSION

I) Incorporación de los aminoácidos durante el ciclo de vida del microorganismo.

En las gráficas 1, 2 y 3 se pueden observar las curvas de crecimiento y de pH de un cultivo sincronizado de B. cereus así como la incorporación de los aminoácidos: L-alanina, L-lisina y L-glutamato. (Como la concentración de las soluciones de aminoácidos radiactivos fue la misma para los tres: 1 uc/ umol/ml es posible establecer comparaciones precisas trabajando en cuentas/min.). Se puede apreciar que el sistema con alanina se comporta diferente a los otros dos, o sea que con los aminoácidos neutros como la alanina en etapas previas a la esporulación es baja la incorporación, pero sube bruscamente la hora anterior a la formación de las esporas, alcanzando su máximo en T_0 , para luego disminuir en T_1 .

Se propone que este cambio brusco en la incorporación de la L-alanina 1 hora antes de la esporulación, se debe a

Gráfica 1:

$\frac{CPM}{0.5 DO}$

DO

- Δ Incorporación de L-alanina
 - \bullet Curva de Crecimiento
 - \times Curva de pH
- Experimento Seleccionado

pH

4000

4

3000

3

2000

1.5

1000

1.0

0.5

7.0

6.5

6.0

5.4

T-3

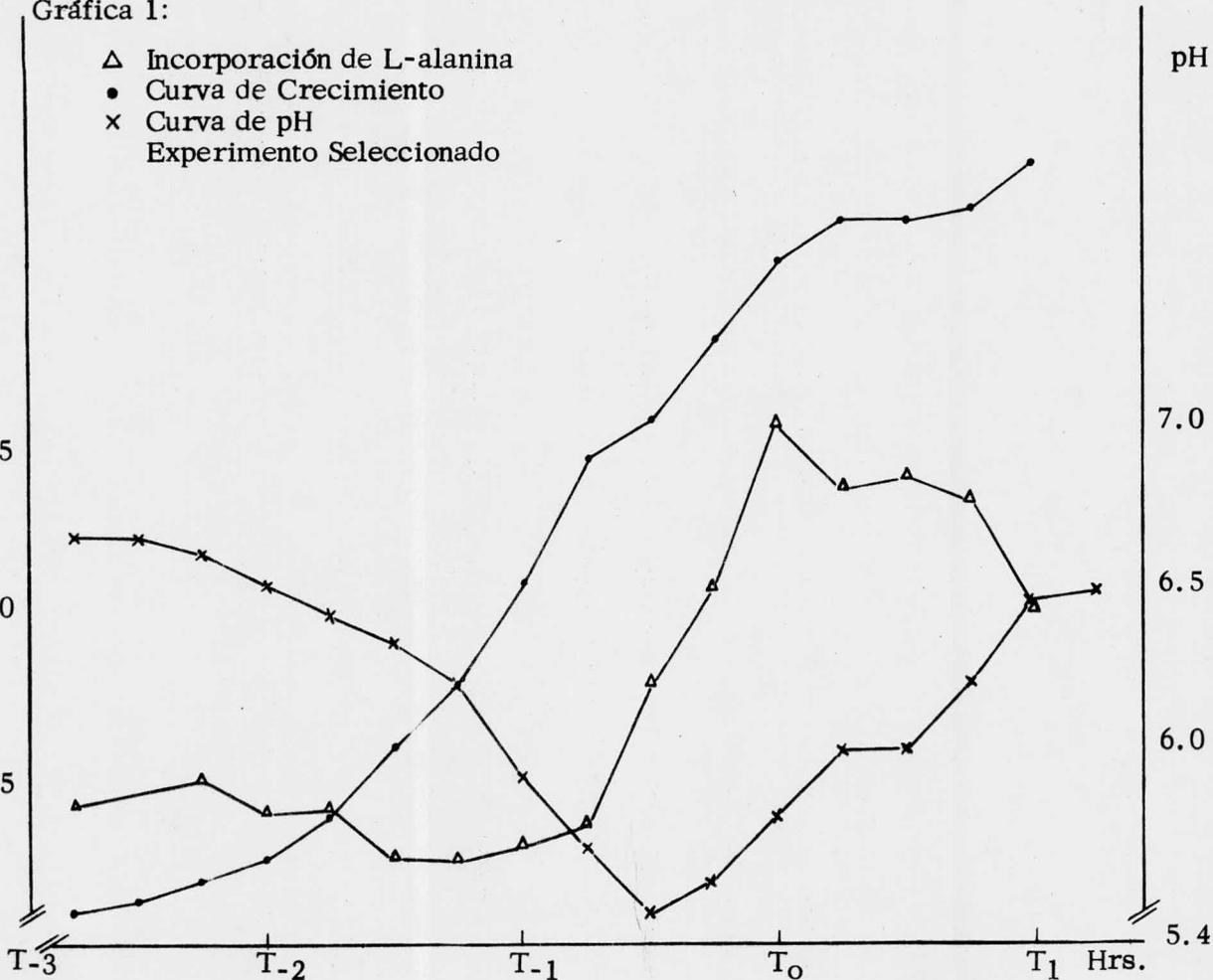
T-2

T-1

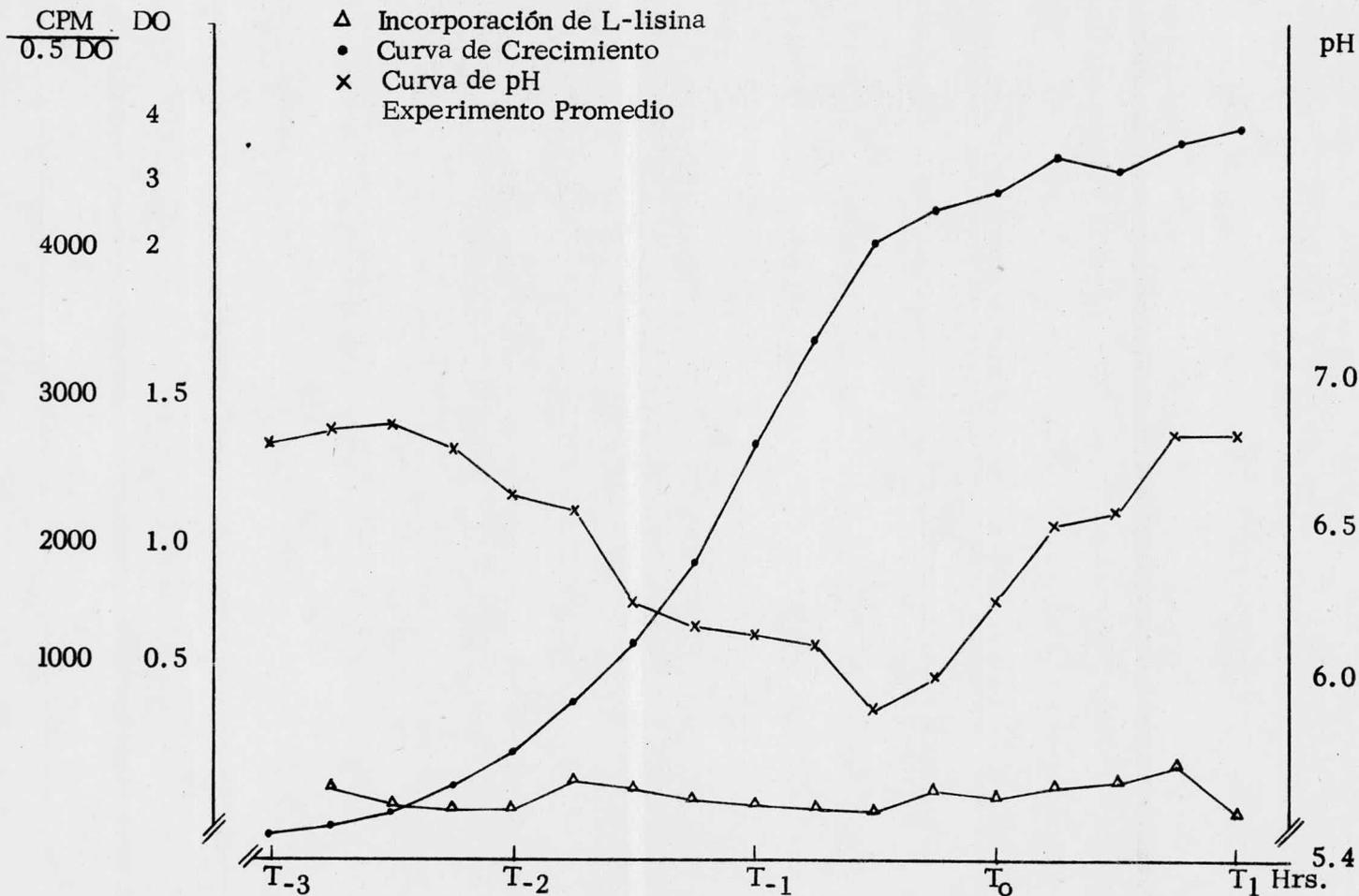
T₀

T₁

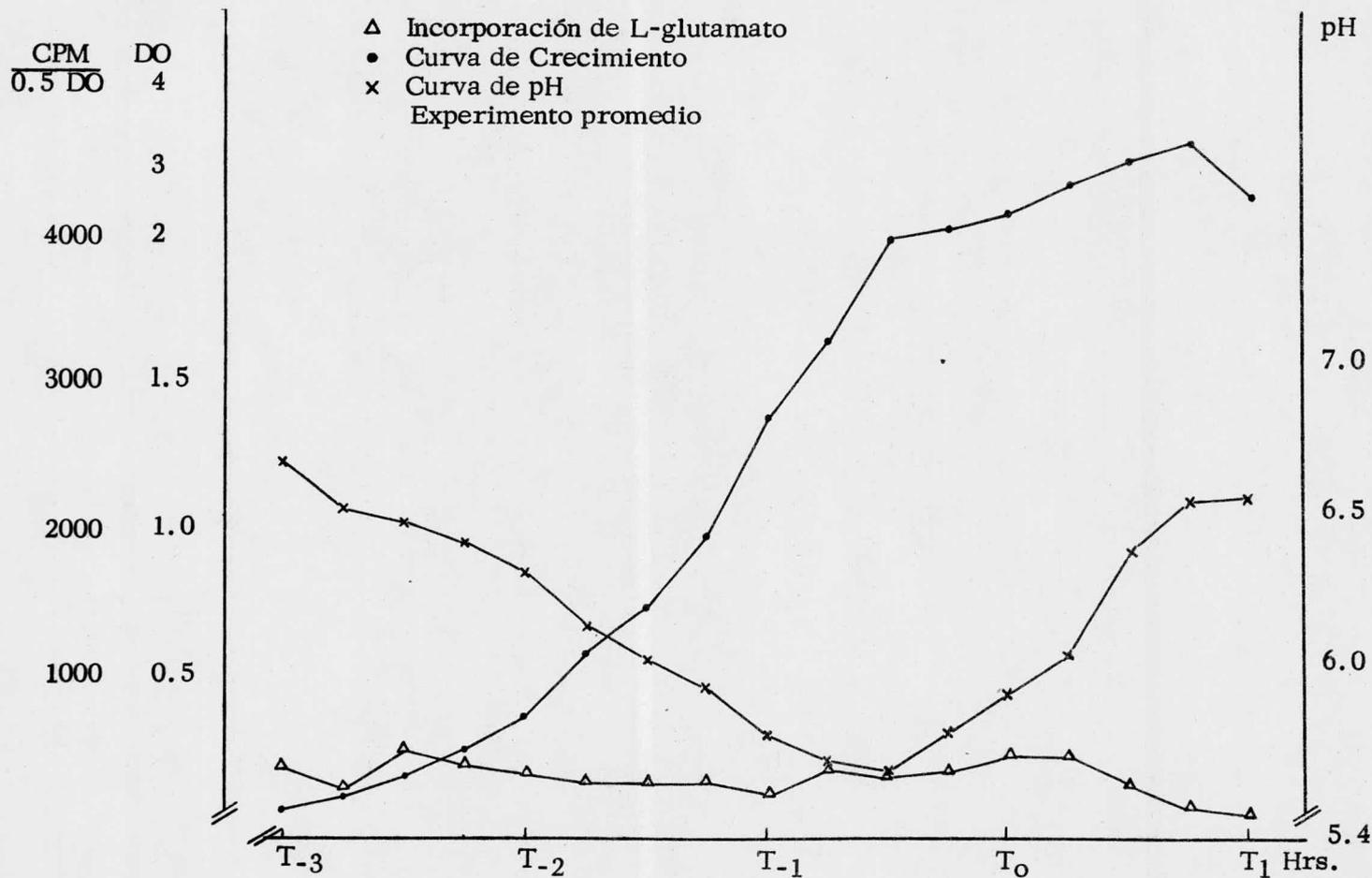
Hrs.



Gráfica 2:



Gráfica 3:



que la célula madre la está captando como fuente adicional de energía.

En los sistemas con L-lisina y L-glutamato no hay grandes cambios en la incorporación durante el ciclo de vida del microorganismo, observándose solamente, al igual que con la alanina, que la captación disminuye un poco en T_1 .

No se puede establecer con seguridad porqué la alanina si es captada por la célula y la lisina y el glutamato no. En la referencia 20 viene reportado que las enzimas transaminasas glutámico-oxalacética y glutámico-piruvica están completamente activadas durante las primeras etapas de la esporulación, así como el nivel de la deshidrogenasa de la alanina es muy alto durante todo el ciclo de cultivo, no así la glutámico-deshidrogenasa ni la α -ceto flutarato deshidrogenasa, que no fueron detectadas, de manera que se sugiere que el transporte de alanina a través de la membrana está facilitado, para incorporarla después al ciclo del ácido tricarboxílico por medio del ácido pirúvico en etapas previas a la esporulación, en las cuales está activado este ciclo.

Se puede proponer un experimento en el cual se incorpore alanina y glutamato marcados, recuperando después el bióxido de carbono, si en realidad la célula prefiere la alanina al glutamato, se recuperará una cantidad mayor de CO_2 .

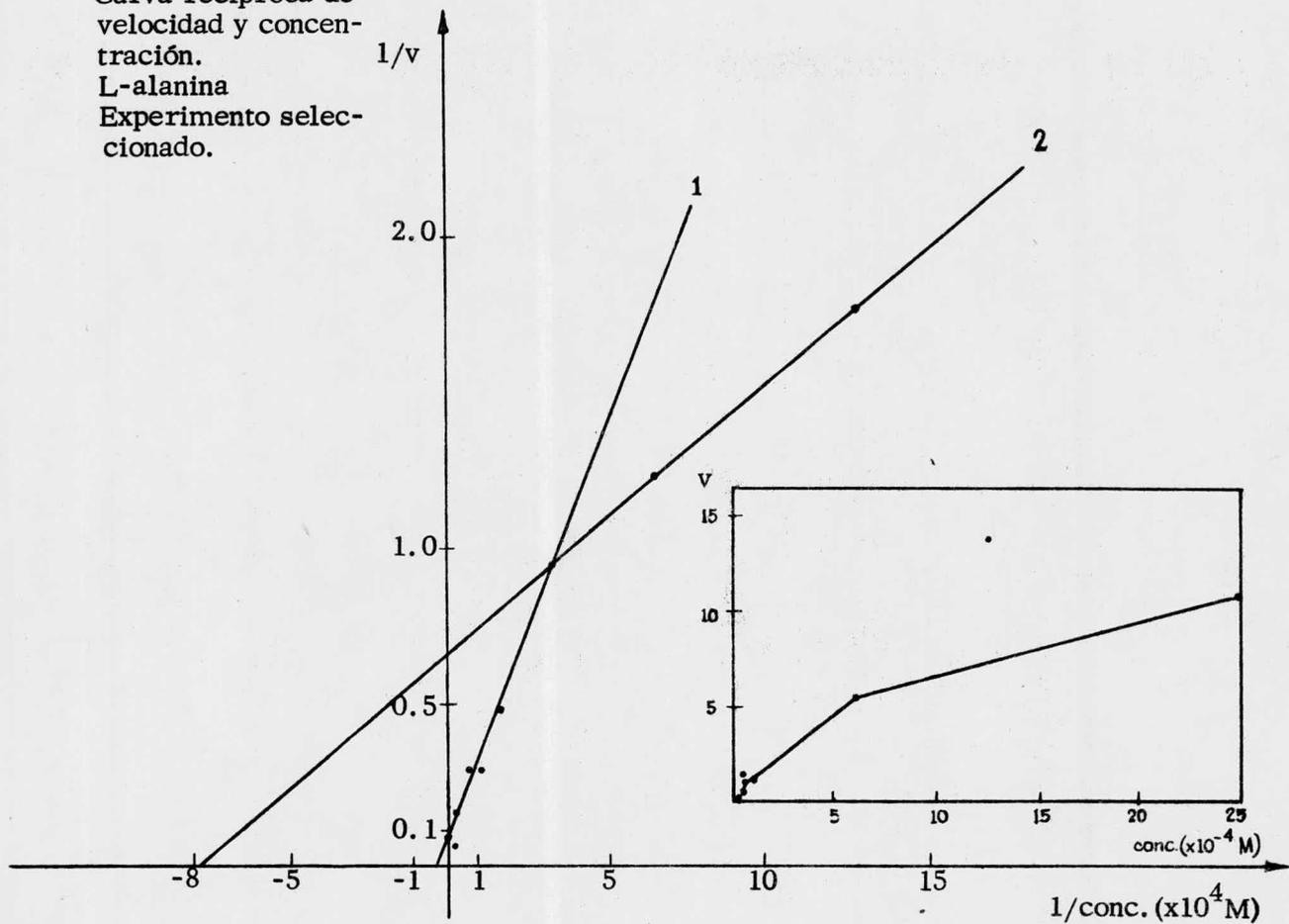
II) Estudios de cinética:

En las gráficas 4, 5 y 6 vemos que en el rango de concentración que se exploró (Ref. 2, 4, 6, 8, 12); existen dos sistemas de captación de los diferentes aminoácidos, ya que se tienen dos valores de K_m y de velocidad máxima. (Tabla I).

Comparando con lo reportado por V. L. Clark y F. E. Young (Ref. 6) y Glober, D'Ambrosio y Jensen (Ref. 12) que también reportan dos sistemas de transporte de aminoácidos, uno de alta afinidad y uno de baja afinidad con valores específicos para cada aminoácido ensayado, se puede ver por los datos obtenidos en los experimentos que efectivamente se trata de 2 sistemas con diferentes afinidades, comprobándose una vez más lo ya establecido.

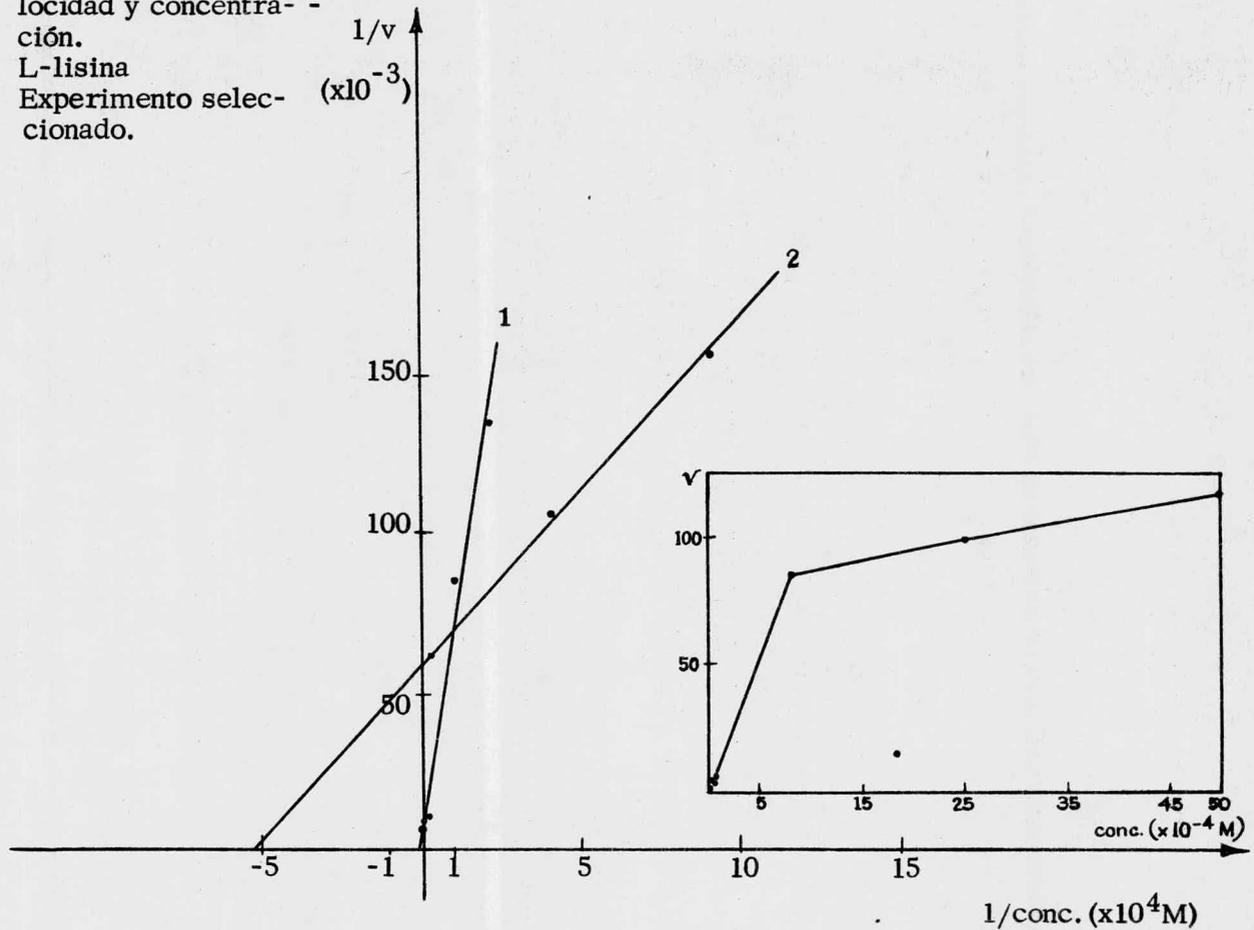
Gráfica 4:

Curva recíproca de
velocidad y concen-
tración.
L-alanina
Experimento selec-
cionado.



Gráfica 5:

Curva recíproca de ve-
locidad y concentra- -
ción.
L-lisina
Experimento selec-
cionado.



Gráfica 6:

Curva recíproca de
velocidad y concen-
tración.
L-Glutamato
Experimento selec-
cionado.

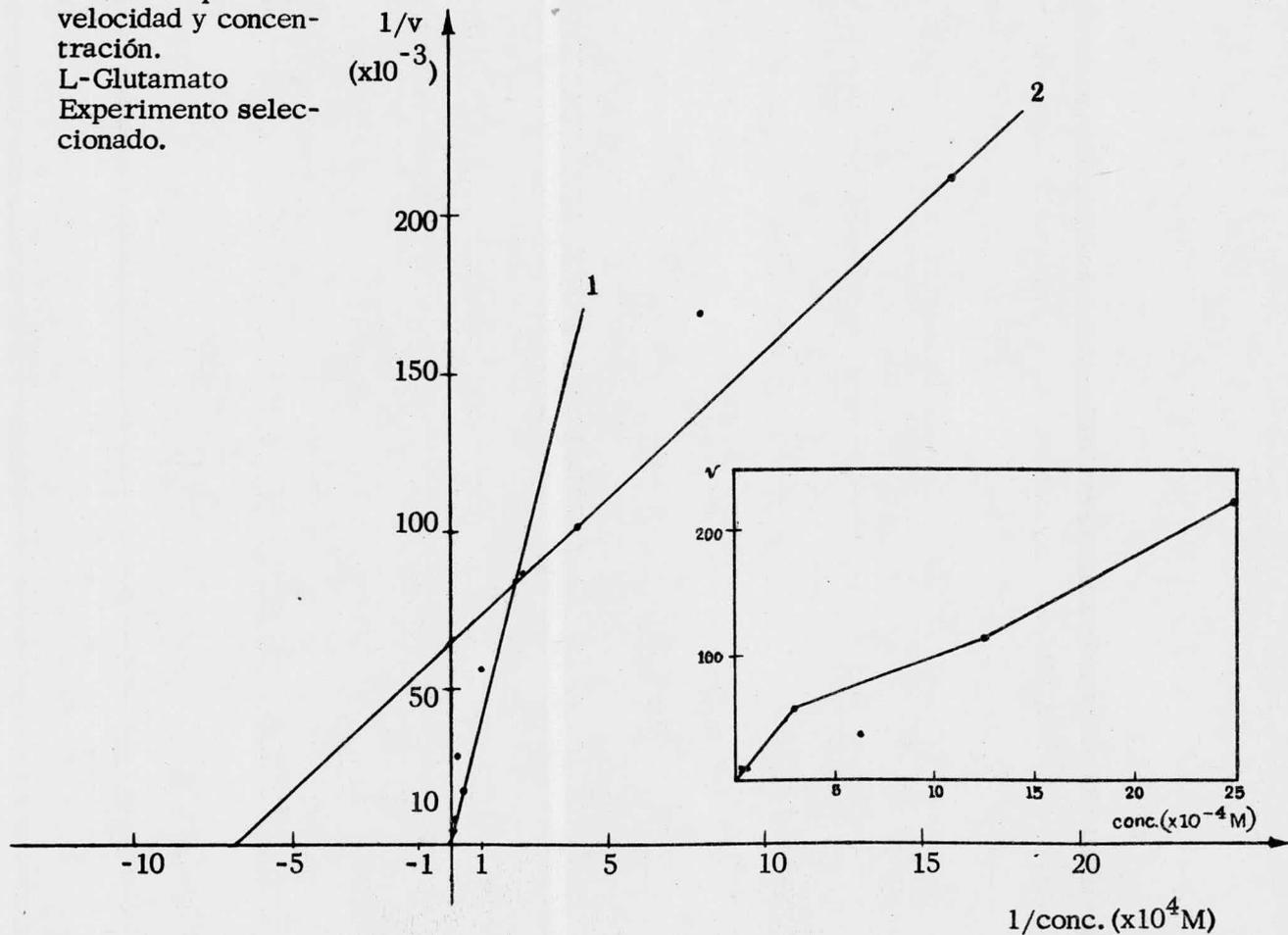


TABLA I. - Características cinéticas del transporte de L-aminoácidos en

B. cereus

Aminoácido transportado	Sist. de alta afinidad		Sist. de baja afinidad	
	Km (uM)	V. max. (nmoles/min/10 ml) DO=1.0	Km (mM)	V. max. (nmoles/min/10 ml) DO=1.0
Alanina	12.5	1.47	0.4	14.28
Lisina	19.0	16.12	1.0	100
Glutamato	14.5	15.63	1.6	333

III) Incorporación de los aminoácidos en presencia de donadores de electrones e inhibidores.

1. - Incorporación de L-alanina- ^{14}C :

a) Células sin ayunar y ayunadas en medio G con sacarosa, Tablas II y III.

La concentración de L-alanina- ^{14}C que se usó para estos experimentos fue de: 1 uc/umol/ml.

Como se puede observar en estos ensayos, comparando los valores obtenidos con los del agua, se ve que la glucosa no estimula el transporte del aminoácido, porque la célula tiene sacarosa en el medio, inclusive se puede ver una pequeña disminución en la incorporación tanto en las células ayunadas como en las no ayunadas.

En el caso del cianuro, éste no tiene efecto en ninguno de los dos casos.

TABLA II. - Incorporación de L-alanina- ^{14}C (1 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}/\text{ml}$)

Células sin ayunar

No. Experimento	H_2O	$\Delta \text{CPM}/\text{DO}=0.1/\text{min}$		Otro sustrato
		Glucosa	Cianuro	
1	50.3	66.7	60.77	
2	10.75	2.25	0.25	
3	136.37	66.4	837.75	
4	40.3		9.67	Glicero-P 27
5	53.25			Ascorbato Fenazina- metosulfato -4.65

TABLA III. - Incorporación de L-alanina- ^{14}C (1 uc/umol/ml)

Células ayunadas 1 h a 30°C en medio G con sacarosa.

No. Experimento	H_2O	$\Delta \text{CPM}/\text{DO}=0.1/\text{min}$		Otro sustrato
		Glucosa	Cianuro	
1	0.785	0.87		
2	0.27	2.10		
3	76.79	49.47		
4	129.59	94.15		
5	15.70	25.10		
6	135.35	64.15	107.7	
7	65.00	41.80	56.4	
8	20.20	4.60	22.00	
9	16.50	20.60	23.77	
10		33.45		Ascorb. -TMPD -1.95
11	5.0			Ascorb. -PMS 0.75
12	11.20			PMS 10.40
13	4.72		1.50	Glicero-P 4.70

TMPD = Tetrametilenparafenilendiamina

PMS = fenazina-metosulfato

Usando otros sustratos para estimular el sistema de transporte, se observa que prácticamente ninguno de los usados funcionó de esta manera, inclusive el ascorbato-fenazina-metosulfato y el ascorbato-tetrametilenparafenilendiamina, tienden a disminuir la incorporación en vez de estimularla.

b) Células sin ayunar y ayunadas en medio G sin sacarosa, Tablas IV y V.

El experimento 1 se hizo centrifugando las células mientras que los otros tres se filtraron. (La diferencia obtenida en los resultados no es lo suficientemente grande como para ser significativa, por lo tanto, se pueden comparar los datos). Por otra parte, los tres primeros se hicieron con una concentración de L-alanina- ^{14}C de 1 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}/\text{ml}$ y el no. 4 con una concentración de 10 $\mu\text{C}/25 \mu\text{mol}/\text{ml}$ y con 0.5 mM de D-alanina en el medio de ayuno. La diferencia de los primeros datos con los del experimento 4 se debe probablemente a que la D-alanina añadida al medio de ayuno actúa como inductor del sistema de transporte de la L-alanina, funcionando mejor de esta manera el sistema.

Se sigue observando la misma tendencia que en los experimentos anteriores, o sea que ni la glucosa funciona como estimulantes del transporte ni el cianuro como inhibidor.

Comparando los resultados de las células sin ayunar y las ayunadas se observa una diferencia en la incorporación que puede ser debida a que durante la hora de ayuno se suceden cambios metabólicos en la célula, ya que éstas siguen hacia la esporulación. La glucosa tiende a inhibir más la incorporación, notándose una preferencia de la célula por la glucosa. El cianuro continúa sin ejercer ningún efecto inhibitorio.

Comparando las tablas II y III con la IV y V, se podría decir que las células funcionan de la misma manera, esto se observa en los valores para agua, o sea que a las células no les importa ser ayunadas en un medio con o sin sacarosa.

Ya que los resultados no se pueden comparar bien por sus pequeños cambios, se propone que se hagan más experimentos para poder llegar a una conclusión concreta sobre el efecto de los sustratos ensayados, en el transporte de los amino ácidos.

TABLA IV. - Incorporación de L-alanina			
Células sin ayunar			
No. Experimento	Δ CPM/DO=0.1/min		
	H ₂ O	Glucosa	Cianuro
1	6.35	6.05	2.92
2	98.40	115	51.70
3	43.80	111.15	40.25
4	210.22	131.55	0.36

TABLA V. - Incorporación de L-alanina			
Células ayunadas 1 h a 30°C en medio G sin sacarosa.			
No. Experimento	Δ CPM/DO=0.1/min		
	H ₂ O	Glucosa	Cianuro
1	23.05	10.85	7.05
2	3.10	1.50	2.25
3	2.85	2.25	0.05
4	65.95	29.60	-2.60

2. - Incorporación de los aminoácidos en células ayunadas 1 hora a 30°C en medio G sin sacarosa, ni sulfato de amonio, ni extracto de levadura.

Las concentraciones de los aminoácidos seleccionadas para estos ensayos son las concentraciones que saturan los sistemas de transporte, obtenidas de los estudios de cinética.

En estos experimentos se ensayaron varios sustratos, que reportados en la literatura (Ref. 3, 4, 5, 7, 8) funcionan como estimuladores del sistema de transporte, y otros tres que son desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Ref. 9), al tiempo T-1,45 del crecimiento del microorganismo. Tabla VI.

Se seleccionó un experimento representativo hecho con L-alanina y para L-lisina y L-glutamato se tiene un promedio de los experimentos realizados.

Se puede observar que la incorporación es similar para la alanina y lisina y mejor que con el glutamato, con el cual los resultados son diferentes. En general se observa que el

ascorbato-fenazinametosulfato no funciona como estimulante del transporte en ninguno de los tres sistemas de aminoácidos ensayados.

Para la alanina y lisina, el malato, succinato y glicero-fosfato estimulan ligeramente el sistema, siendo para la alanina el succinato el mejor y para la lisina el glicero-fosfato. En el caso del glutamato el glicero-fosfato funciona mejor que el malato, y el succinato prácticamente no actúa, inclusive disminuye la incorporación más que con los desacoplantes.

Con respecto a los desacoplantes se observa que sí actúan inhibiendo el transporte de los aminoácidos alanina y lisina, siendo la trifluorometoxicarbonilcianofenilhidrazona (FCCP) el mejor en el caso de la alanina y el pentaclorofenol (PCP) en el de la lisina. Con el glutamato no se observa acción inhibitoria por parte de los desacoplantes PCP y FCCP, inclusive la incorporación con FCCP es bastante alta.

Haciendo la suma del $\Delta \text{CPM}/\text{DO}=0.1/\text{min.}$ para cada

TABLA VI. - Incorporación de alanina, lisina y glutamato
Células ayunadas 1 h a 30°C en medio G sin sacarosa

Amino- ácido	Concentr. aminoác.	H ₂ O	Δ CPM/DO=0.1/min				Glíce-- ro-P	PCP	FCCP	TCSA
			PMS Ascorb.	Malato	Succi- nato					
Ala	10uc/25 umol/ml	8.88	0.92	11.94	14.44	9.62	2.68	1.57	2.03	
Lis	10uc/50 umol/ml	18.3	0.99	13.57	21.80	23.31	0.94	1.12	4.32	
Glut.	10uc/25 umol/ml	10.6	-0.25	11.25	0.21	16.06	10.26	24.2	3.24	
Suma total del Δ CPM/DO=0.1/min:										
		37.87	1.66	36.76	36.45	48.99	13.88	26.92	9.59	

PMS = Fenazina-metosulfato

PCP = Pentaclorofenol

FCCP = Trifluorometoxicarbonilcianofenilhidrazona

TCSA = Tetraclorosalicilanilida.

uno de los sustratos ensayados para los tres sistemas de amino-ácidos, se tiene que en total el mejor estimulador del sistema de transporte es el glicero-fosfato y el mejor desacoplante es la tetraclorosalicilanilida (TCSA).

CONCLUSION

Los aminoácidos son transportados según la edad del cultivo en función a las necesidades de la célula en etapas previas a la esporulación, de los tres sistemas de aminoácidos ensayados (ácidos, neutros y básicos), el de los aminoácidos neutros es el que es mejor captado por el microorganismo.

El estudio cinético reveló que éstos aminoácidos son transportados por dos sistemas diferentes, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, con valores de K_m y V_{max} específicos para cada aminoácido transportado.

En los ensayos con donadores de electrones: Glicero-fosfato, succinato, malato, ascorbato-fenazinametosulfato y glucosa, se encontró que ni el ascorbato-fenazinametosulfato ni la glucosa funcionan estimulando el transporte, en las condiciones experimentales ensayadas.

El glicero-fosfato, succinato y malato actúan energizando el transporte con diferentes rendimientos para cada uno

de los aminoácidos, siendo el más eficiente el glicero-fosfato.

Por la cinética encontrada, el mecanismo de transporte de los aminoácidos no es por difusión pasiva, ni por difusión facilitada ya que al usar desacoplantes como el PCP, FCCP y TCSA el transporte se ve inhibido o sea que necesita energía para llevarse a cabo, concluyéndose que los aminoácidos son transportados por medio de un transporte activo, sin poder diferenciar si se trata de un transporte activo vinculado a la respiración, ya que el cianuro no inhibe el sistema al ser usado, o si se debe a una directa utilización de ATP.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferro-Luzzi, A. G. - 1964. Two methods for the assay of Amino Acid Transport in Bacteria. Arch, Biochem. Biophys. 104, 1.
2. Bernlohr, R. W. - 1967. Changes in Amino Acid Permeation during Sporulation. J. of Bacteriology, March, Vol. 93 # 3, pp. 1031-1044.
3. Koning, W. N. y Freese, E. - 1972. Amino Acid Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles of *B. subtilis*. J. of Biological Chem. Vol. 247, No. 8.
4. Lombardi, F. J. y Kaback, H. R. - 1972. Mechanism of Active Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles. J. of Biological Chem. Vol. 247, No. 24, pp. 7844-7857.
5. Hampton, M. L. y Freese, E. - 1974. Explanation for the Apparent Inefficiency of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Energizing Amino Acid Transport in Membrane Vesicles. J. of Bacteriology, May, Vol. 118, No. 2, pp. 497-504.
6. Clark V.L. y Young, F.E. - 1974. Active Transport of D-Alanine and Related Amino Acids by Whole Cells of *B. subtilis*. J. of Bacteriology, Dec., Vol. 120, No. 3, pp. 1085-1092.
7. Koning, W. N. - 1975. Localization of Membrane Proteins in Membrane Vesicles of *B. subtilis*. Arch. of Biochem. Biophys. 167, 570-580.
8. Krulwich, T.A., Blanco, R. y McBride, P.A. - 1977. Amino Acid Transport in Whole Cells and Membrane Vesicles of *Arthrobacter pyridinolis*. Arch. of Biochem. Biophys. Febrero, p. 108.

9. Brummett, T.B. y Ordal, G.W. - 1977. Inhibition of Amino Acid Transport in *B. subtilis* by Uncouplers of Oxidative Phosphorilation. Arch. of Biochem. Biophys. 178, pp. 368-372.
10. Bouknight, R.R. y Sadoff, H.L. - 1975. Transport of D- and L-Tryptophan in *B. megaterium* by an Inducible Permease. J. of Bacteriology, Vol. 121, No. 1, pp. 65-69.
11. D'Ambrosio, S.M. y Glover, G.I. - 1975. Kinetics of Affinity Labeling the L-Tyrosine-L-Phenilalanine Transport System in *B. subtilis*. Arch. of Biochem. Biophys. 167, pp. 754-760.
12. Glover, G.I., D'Ambrosio, S.M. y Jensen, R.A. - 1975. Versatile Properties of a Nonsaturable, Homogeneous Transport System in *B. subtilis*: Genetic, Kinetic and Affinity Labeling Studies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.
13. Annual Review of Biochemistry. - 1975. Vol. 44, Pág. 523.
14. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klute, MC. - 1973. Release and Recovery of Forespores from *B. cereus*. J. of Bacteriology, Vol. 115, No. 3. pp. 1159.
15. Castric, P.A. y Strobel, G.A. - 1969. Cyanide Metabolism by *B. megaterium*. The Journal of Biolo. Chem. Vol. 244, No. 15. Pag. 4089.
16. Ghei, Om. K. y Kay, W.W. - 1974. Regulation of C₄-dicarboxylic acid Transport in *B. subtilis*. Canadian J. of Microbiol. Vol. 21, pag. 527.
17. Bisschop, A., Jong, L., Lima Costa, M.E. y Konings, W.N.-1975. Relation between Reduced Nicotinamide Oxidation and Amino Acid Transport in Membrane Vesicles. J. of Bacteriol. V. 121. No. 3. 807.

18. Hanson, R. S., Srinivasan y Halvorson H. O.-1963. Biochemistry of Sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol. 85. pp. 451-560.
19. Franklin, M. H.- 1977. Current Topics in Bioenergetics. Vol. 6. Academic Press Inc. Cap. Membranes and Energy Transduction in Bacteria. Pag. 84-139.
20. Buono, F. Testa R. y Lundgren, D. G. - 1966. Physiology of Growth and Sporulation in *B. cereus*. J. of Bacteriol. June Vol. 91 # 6. Pag. 2291.
21. Ravendra, P. Singh, Setlow, B. y Setlow, P. - 1977. Levels of small Molecules and Enzymes in the mother cell compartment and the forespore of sporulating *B. megaterium*. J. of Bacteriol. June. Vol. 130, No. 3, pp. 1130-1138.
22. Lehninger A.L. - 1972. Biochemistry. Worth Publishers, Inc. Cap. 8, pag. 147; Cap. 10, pg. 189.
23. Conn, E. E., y Stumpf, P. K. -1976. Outlines of Biochemistry. 4a. Edición. John Wiley & Sons, Inc. USA. Cap. 9, pag. 247.
24. Neiland, R. y Stumpf, P. K. - 1958. Outlines of Enzyme Chemistry. 2a. Edición. John Wiley & Sons, Inc. New York. Cap. 8 y 9. pp. 94-122.
25. Colin, H. W. - 1973. The Structure and Function of Enzymes. The Camelot Press Ltd. London and Southampton. Cap. 4, pag. 39.
26. Walter, W.G. y McBee, R. H. - 1962. 2a. Edición. General Microbiology. D. Van Nostrand Company, Inc. Princeton, New Jersey.
27. Brock, T.D. - 1973. Biología de los microorganismos. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
28. Jay, J.M. - 1973. Microbiología Moderna de Alimentos. Acribia, Zaragoza, España.

29. White, A., Handler, P., Smith, E. L. - 1968. Principles of Biochemistry. 4a. Edición. McGraw-Hill Book Company. Cap. 33. Pag. 777.
30. Cantarow, A., Shepart, B. - 1969. Bioquímica. 4a. Edición Editorial Interamericana, S. A. Cap. 21. pag. 529.
31. Novikoff, A. B., Holtzman, E. - 1972. Estructura y Dinámica Celular. 1a. Edición. Editorial Interamericana, S. A.
32. Mahler, H. R. and Cordes, E. H. - 1966. Biological Chemistry, Harper & Row, A. Harper Internation Edition.
33. Bergey's, Manual of determinative Bacteriology. Ed. 8a. 1975.
34. Quantitative Problems in Biochemistry. - 1969. Dawes, E. A. 4a. edición. E & S Livingstone LTD. Edinburgh and London.
35. Boyer, P. D. - 1970. The Enzymes. Academic Press. EUA, Vol. II.
36. Gould, G. W. and Hurst, A. - 1969. The Bacterial Spore. Academic Press Inc. EUA.
37. Harper, H. A. - 1975. Manual de Química Fisiológica. 4a. Edición. El Manual Moderno, S. A. México. D. F.
38. Watson, J. D. - 1970. Molecular Biology of the Gene. 2a. Edición. W. A. Benjamin, Inc. New York.
39. Maldelstam, J. y K. McQuillen. - 1973. 2a. Edición Biochemistry of Bacterial Growth. Blackwell Scientific Publications. London, Oxford.

Esta Tesis se Imprimió en Diciembre de 1977
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F