



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Búsqueda de la citocromo oxidasa *caa*₃
a través del género *Bacillus*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

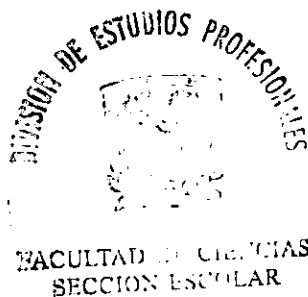
PRESENTA

Miguel Angel Maldonado Cuevas

DIRECTOS DE TESIS:

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

MEXICO. D. F.



2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



VALLE DEL NACIONAL
AGENCIA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Búsqueda de la citocromo oxidasa *caa3* a través del
género *Bacillus*"

realizado por Miguel Angel Maldonado Cuevas

Con número de cuenta 8224394-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. Edgardo Escamilla Marván
Director de tesis
Propietario

Biol. Fernando Hernández Sánchez
Propietario

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois
Propietario

Biol. Shaday Michán Aguirre
Suplente

M. en C. Luz María García Flores
Suplente

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz.

A mis Abuelos
RUBEN y JOSEFINA CUEVAS

A mi Madre
TERESA CUEVAS

A mi hermana VERONICA

Y a mi hija MARIA FERNANDA

Para ustedes con cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas.

De manera especial al Dr. José Edgardo Escamilla Marván quien me brindó su confianza, asesoría y apoyo hasta la conclusión final de este trabajo.

Al Biólogo Fernando Hernández agradezco el tiempo invertido en mi formación, así como su dedicación y entusiasmo en cada una de las etapas de este estudio.

A mis compañeros del laboratorio 101 oriente; Lucha, Fernando, Tete, Marcos, Hector, Luz, Enrique, Laucel, Miguel Angel Dominguez, Layla y Shaday; agradezco el haber hecho grata la estancia en el instituto, sus consejos y asesoría.

Al Dr. Germán Aguilar por su amistad y su apoyo en la aplicación de técnicas de biología molecular.

A la M.en C. Martha Contreras por la asesoría técnica, particularmente en el desarrollo de la estrategia de detección espectral.

A Juanito, que siempre respondió a dudas y necesidades con interés y profesionalismo.

A quienes donaron las cepas bacterianas: a la Dra. Bizerka y el Cepario de la Facultad de Química por los liofilizados de *B. Megaterium*, *B. Sphaericus*, *B. Polymyxa* y *B. Macerans*. Al Dr. Osamu Shida del Instituto Higeta Shoyu en Japón, quien amablemente respondió a nuestra solicitud y contribuyo con liofilizados de *B. brevis* y *B. Aneurinolyticus*.

A mis sinodales; la Dra. Luisa Alvarina Alba Lois, la M.en C. Luz María García Flores, la bióloga Shaday Michán Aguirre y el biólogo Fernando Hernández Sánchez, por revisar este trabajo y mejorarlo con sus correcciones y sugerencias.

AL Dr. Eric Jordán Dahlgren del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por permitirme escribir la mayor parte de este trabajo en su laboratorio y por su ayuda en la digitalización de imágenes.

A mi hija María Fernanda agradezco su linda sonrisa, que es un estímulo para seguir siempre adelante.

A mi hermana Verónica le agradezco la motivación y el entusiasmo con que siempre me ha apoyado.

A Rosa Elisa por su amor y por que sus observaciones me ayudaron a mejorar este trabajo en redacción y estructura.

Finalmente agradezco a mi Madre por su cariño, por su apoyo y comprensión, y por ser ella la verdadera responsable de que haya llegado al punto de tener que redactar estas líneas

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 oriente, del Instituto de Fisiología Celular
de la Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. José Edgardo Escamilla Marván
y con el apoyo económico de la Fundación UNAM y de la dirección General de Asuntos del
Personal Académico.

"Búsqueda de la citocromo oxidasa *caa3* a través del género *Bacillus*"

Contenido

Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	6
III. Objetivos	22
IV. Material y métodos	23
V. Resultados	32
VI. Discusión y conclusiones	47
Apartado 1: Citocromos y cadena respiratoria	55
Apartado 2: Oxidasas y cadenas respiratorias bacterianas	59
VII. Referencias	63

RESUMEN

El género *Bacillus* es un grupo formado por bacterias que revelan una amplia radiación ambiental. En la adaptación a diversas presiones ambientales los sistemas respiratorios de los *Bacillus* expresan en forma diferencial los componentes de sus cadenas respiratorias, en particular a sus oxidasas terminales. La oxidasa tipo caa_3 es una enzima presente en especies de *Bacillus* y su expresión se ha relacionado hasta el momento con el crecimiento bajo condiciones de tensión metabólica, como lo es el proceso de esporulación. Aunque la esporulación es una característica diagnóstica de las especies de *Bacillus* se desconoce cual es el papel funcional de la expresión de la oxidasa caa_3 y si existe algún vínculo con este proceso de diferenciación celular. Con el propósito de contribuir al conocimiento de la funcionalidad de la oxidasa caa_3 se exploró su distribución en el grupo de los Bacillaceae, realizando una búsqueda de esta enzima en ocho especies localizadas dentro de los cinco grupos genéticos que lo conforman. Los resultados sugieren que la oxidasa caa_3 es una enzima ampliamente distribuida en este grupo bacteriano. Lo amplio de su distribución permite suponer que su presencia y expresión cubre algún requerimiento común entre los *Bacillus*. Sin embargo, debido a la diversidad fisiológica de las especies que lo conforman, definir el papel funcional de la oxidasa caa_3 requiere de un análisis más amplio que explore tanto las características fisiológicas y bioquímicas de la enzima, así como sus relaciones evolutivas.

I. INTRODUCCION

El género *Bacillus* es un grupo bacteriano heterogéneo (Ash *et al.*, 1991), cuyos miembros exhiben un amplio espectro de distribución ambiental. Entre ellos están presentes especies termófilas, como *B. stearotherophilus*; alcalófilas, como *B. firmus*; acidófilas, como *B. acidocaldarius* y otras de naturaleza esencialmente mesófila. Esto nos da una idea de la variedad de ambientes a los que este género se ha adaptado como consecuencia de su radiación ambiental.

Bajo situaciones adversas o cambios medioambientales abruptos los sistemas regulatorios bacterianos inducen la expresión de genes que codifican para enzimas intracelulares y extracelulares (Sauer *et al.*, 1995). Las enzimas intracelulares incluyen proteínas que participan en los sistemas relacionados con las formas de obtención de energía, como lo son; el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Hanson *et al.*, 1963; Carls y Hanson, 1971), los sistemas relacionados con la utilización de diversas fuentes de carbono (Nihashi y Fujita, 1984), y en particular los sistemas que determinan la utilización de una vía metabólica aerobia o anaerobia, así como los que definen la composición enzimática de la cadena respiratoria (Escamilla *et al.* 1985).

Una cadena respiratoria es un conjunto de macromoléculas asociadas a una membrana celular, y que son capaces de transferir electrones de una a otra en forma secuencial hasta un aceptor final. Los organismos con metabolismo aerobio generan energía por medio de una cadena respiratoria que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. En algunos puntos de esta cadena los componentes translocan protones hacia el exterior celular generando un gradiente electroquímico, y una diferencia de potencial como paso intermedio en la conversión de energía redox a ATP. La citocromo oxidasa es la enzima que cataliza la reducción de oxígeno molecular a agua y por lo tanto es esencial para el metabolismo aerobio (Capaldi, 1990; Saraste, 1990; Babcock y Wikström, 1992).

En la célula eucarionte la mitocondria posee un sistema respiratorio lineal (Santana *et al.*, 1992) en el que invariablemente una citocromo oxidasa tipo aa_3 es el último componente enzimático de la cadena, mientras que las cadenas respiratorias bacterianas pueden aparecer ramificadas, es

decir, presentar diferencias en el número y tipo de acarreadores electrónicos y oxidasas terminales que las componen (Anraku, 1988). La expresión diferencial de oxidasas terminales permite a las bacterias optimizar sus sistemas respiratorios y adaptarlos a variaciones medioambientales.

A la fecha han sido purificadas y caracterizadas varias oxidasas eubacterianas tipo *aa₃* (Poole, 1983; Ludwig, 1987) y se ha encontrado que son espectroscópica y funcionalmente similares a la citocromo *c* oxidasa mitocondrial (Garcia-Horsman *et al.*, 1991). Una de estas oxidasas es una isoforma de la oxidasa tipo *aa₃*; esta oxidasa contiene un citocromo *a* y un centro binuclear compuesto de citocromo *a₃* y *Cu₂*, además contiene un dominio para citocromo *c* en el extremo carboxilo terminal de la subunidad II (Cox 2); por ello es comúnmente denominada citocromo oxidasa *caa₃* (Sone, 1990; Saraste, 1991). La presencia de un citocromo *c* unido covalentemente a la subunidad II, puede considerarse como la unión de una enzima con su sustrato (Mather *et al.*, 1991) cuyo posible origen sea un evento de fusión y/o duplicación génica.

Aunque las características de la oxidasa *caa₃* se consideraron propias de oxidasas en bacterias termófilas como *Bacillus PS3* (Sone *et al.*, 1982; Nichols y Sone, 1984), *B. stearothermophilus* (De vrij *et al.*, 1989) y *Thermus thermophilus* (Yoshida y Fee, 1984; Mather *et al.*, 1991), varios reportes revelan su presencia en especies no termófilas pertenecientes al género *Bacillus* :

En *B. subtilis* se determinó la presencia de dos oxidasas tipo *aa₃*; el citocromo *aa₃*, con actividad quinol oxidasa; y el citocromo *caa₃*, con actividad citocromo *c* oxidasa (Lauraeus *et al.*, 1991). En *B. cereus* se ha observado una expresión diferencial de complejos citocromo *aa₃* y *caa₃* como oxidasas terminales en células vegetativas y esporulantes. En este caso la citocromo oxidasa *caa₃* se reporta ausente en células vegetativas, mientras que es ampliamente expresada solo durante la esporulación (Garcia-Horsman *et al.*, 1991). Quirk *et al.* (1993), reportan la presencia del complejo citocromo *caa₃* en *B. firmus* y una elevada expresión de esta enzima cuando la bacteria crece en condiciones de elevada alcalinidad (*B. firmus* es una especie facultativamente alcalófila que crece bien en un intervalo de pH que se extiende desde 7.5 hasta por encima de 10.5 unidades).

¿Cual puede ser la ventaja adaptativa que representa la expresión de la citocromo oxidasa *caa₃*? Se ha propuesto que la presencia de un dominio para el hemo *c* en esta oxidasa, puede ser una forma de evitar que el citocromo *c* libre se pierda durante la translocación a través de la membrana, debido a la carencia de un espacio periplásmico en bacterias gram-positivas (Wachenfeldt y Hedersstedt, 1992). Sin embargo, esta hipótesis solo explica parcialmente la función de la enzima, en virtud de su presencia en la bacteria termófila *Thermus thermophilus*, que es gram-negativa, y por consiguiente si presenta un espacio periplásmico. Garcia-Horsman *et al.* (1991) sugieren que la alta termoestabilidad de esta enzima, comparada con la de la citocromo oxidasa *aa₃*, puede ser la razón de la expresión del complejo *caa₃* durante la esporulación bacteriana. En el caso de *B. subtilis*, la presencia de *caa₃* se relaciona con la carencia de fuentes de carbono fermentables (Lauraeus *et al.*, 1991). Por otro lado, en bacterias alcalófilas donde la fosforilación oxidativa no cumple con el esquema planteado por Mitchell, se propone como esquema alternativo un acoplamiento de complejos que implica la transferencia intramembranal directa de protones de la cadena respiratoria al sector F₀ de la ATP sintetasa. Quirk *et al.* (1993) postulan al complejo citocromo *caa₃* en *B. firmus* como candidato a ser un componente de la cadena respiratoria de esta bacteria, involucrado en este proceso de transferencia intramembranal y directa de protones.

Los reportes de Sone *et al.* (1982), Nichols y Sone (1984), De Vrij *et al.* (1989), Garcia-Horsman (1991), Lauraeus *et al.* (1991), y Quirk *et al.* (1993), sugieren la existencia de un patrón diferencial en la expresión de las citocromo oxidases en *Bacillus*; en particular, la oxidasa *caa₃* se expresa preferencialmente bajo condiciones ambientales extremas que de alguna forma son causa de tensión metabólica, o que inducen la entrada al proceso de diferenciación de la espora como en *B. cereus* (Garcia-Horsman *et al.*, 1991). Sin embargo, aún no se tiene una idea clara de cual puede ser el papel fisiológico de la expresión alternativa de isoformas de la citocromo oxidasa *aa₃* en el género *Bacillus*.

El propósito de este estudio fue realizar una búsqueda de la citocromo oxidasa *caa₃* en diferentes especies bacterianas del género *Bacillus*, con el objeto de determinar lo amplio de su distribución dentro de este grupo bacteriano y contribuir al conocimiento de la funcionalidad y la historia evolutiva de la enzima.

En particular, la búsqueda de esta oxidasa, a través de los diferentes grupos filogenéticos que conforman el género *Bacillus* (Ash *et al.*, 1991), tiene como finalidad determinar si la distribución de esta enzima dentro del grupo es consecuencia de un solo evento de fusión génica, ocurrido antes de su diversificación, y que se ha conservado; o si solo está presente en algunas especies como resultado de eventos de fusión que se han dado de manera independiente. Dado que la expresión de la oxidasa *caa3* a la fecha se ha manifestado preferentemente en células de *Bacillus* en etapa esporulante, es de suponer que su presencia sugiere un vínculo con este proceso de diferenciación celular, y debido a que la esporulación es una característica diagnóstica del género *Bacillus*, se puede esperar que la enzima se encuentre ampliamente distribuida entre las especies que lo conforman.

II. ANTECEDENTES

Antecedentes y consideraciones teóricas en relación con el género *Bacillus*, su sistema respiratorio y métodos de estudio son tratados en esta sección. Aspectos generales acerca de citocromos y cadenas respiratorias bacterianas se presentan más ampliamente en dos apartados posteriores, esto se hace con la intención de facilitar la lectura y comprensión general del texto al lector especializado, los apartados se presentan como una herramienta de consulta al lector no especializado.

2.1 El género *Bacillus*, un grupo heterogéneo:

En el Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica (Claus y Berkeley 1986), el género *Bacillus* esta constituido como un grupo fenotípicamente heterogéneo cuyos miembros exhiben un amplio rango de requerimientos nutricionales, condiciones de crecimiento, diversidad metabólica y de composición de bases nucleotídicas en el DNA. Además de esta diversidad fenotípica hay cada vez más evidencia de heterogeneidad filogenética dentro del género (Ash *et al.*, 1991)

Sobre la base de criterios fenotípicos puede considerarse al grupo como un ensamblaje de diversas bacterias gram-positivas, aerobias o facultativamente anaerobias, formadoras de esporas y con forma de bastón. Aunque las bacterias pertenecientes a este género han sido exhaustivamente estudiadas se desconoce, por lo general, que su taxonomía es insatisfactoria.

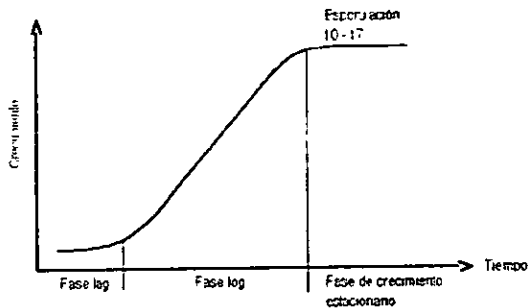
A partir del análisis de una matriz de distancias evolutivas, estimadas por comparación de secuencias de RNAr 16s de 51 especies del género *Bacillus*, Ash *et al.*, sugieren en 1991, 5 grupos genéticos. El árbol filogenético calculado (fig. 2.1) muestra una considerable diversidad dentro del género, que se hace evidente dado el amplio rango de variación del porcentaje de homología (83-99 %) (Ash *et al.*, 1991).

B.cycloheptanicus por su baja similitud de secuencia con las demás especies de *Bacillus* se propone como un taxón separado. En la misma forma *B. alcalophilus* y *B. aneurinolyticus* permanecen desagrupados. No obstante la diversidad fenotípica y filogenética entre estas especies, una característica fundamental las asocia: la esporulación.

2.2 Esporulación bacteriana y el género *Bacillus*:

Los cultivos bacterianos sincrónicos, en medio líquido y con agitación constante desarrollan una curva de crecimiento que incluye una fase lag, durante la cual no se detecta incremento de la población en cultivo y una fase de crecimiento exponencial log, en la que la población se incrementa rápidamente debido a la abundancia de nutrientes en el medio. La disminución en las fuentes asimilables de carbono provoca el ingreso a una fase de crecimiento estacionario en la que el tamaño de la población permanece constante (fig. 2.2).

Fig. 2.2 Curva de crecimiento bacteriano típica. En los *Bacillus* con la entrada a la fase de crecimiento estacionario se inician los eventos que inducen el proceso de esporulación.



Las bacterias cuentan con una amplia variedad de sistemas regulatorios que aseguran óptimas tasas de crecimiento, y la supervivencia bajo situaciones adversas o cambios medioambientales abruptos. Existen ejemplos bien caracterizados de estos procesos, como son: la respuesta al choque térmico (Heat shock) en enterobacterias; la síntesis de flagelo en muchas bacterias, el ingreso a la fase estacionaria, o la esporulación en *Streptomicetos* y *Bacillus* (Sauer et al., 1995).

En los *Bacillus* durante y después de la fase estacionaria (fig. 2.2) ocurren una serie de cambios en la célula vegetativa que se inician con la formación de un septo asimétrico localizado polarmente; el compartimento de mayor tamaño, la célula madre, eventualmente engulle al compartimento pequeño, la preespora (Errington, J., 1993). La culminación de estos eventos tiene como resultado la formación de una espora de alta resistencia.

Una espora es el resultado de un proceso de diferenciación que se induce bajo condiciones de estrés metabólico, como por ejemplo cuando decae fuertemente la concentración de nutrientes en el medio. Las esporas de *Bacillus* (fig 2.3a) no se dividen, soportan la desecación, pHs extremos, temperaturas elevadas y otras condiciones ambientales adversas. Desde la década de los 50's se ha reconocido a la esporulación en el género *Bacillus*, como un sistema modelo para analizar la diferenciación celular en organismos procariontes (Doi, 1989).

El desarrollo de la preespora hacia una espora madura, implica la formación de varias capas superficiales alrededor de ella, el proceso en general se ha subdividido convencionalmente en 7 etapas (fig. 2.3b). La duración de cada una de estas etapas es de aproximadamente 1 hora y se consideran a partir de la entrada a la fase estacionaria. En el contexto de este trabajo es importante mencionar que los principales cambios bioquímicos se detectan a partir de la etapa 0 en la que las células son iguales a las vegetativas, pero aparecen varios marcadores bioquímicos tales como: incremento en los niveles de proteasas y citocromos; es un estado permisivo del crecimiento de fagos ($\phi 2$ y $\phi 15$), y desarrollo de competencia para la transformación genética, además de que se revelan cambios en las enzimas del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones. Las siguientes etapas, I a VII: se caracteriza por la formación del septo y la acumulación de los precursores de las proteínas de la cubierta, también ocurre una síntesis asimétrica de la membrana de la preespora y síntesis de proteínas específicas para la formación del septo y para el engullimiento y acumulación de proteínas ácidas que se degradan durante la germinación y funcionan como reservorio de aminoácidos. Se conoce poco de los eventos ocurridos en las etapas finales pero en general se aprecia el acumulamiento de proteínas de diversa índole (Young y Madelsman, 1979).

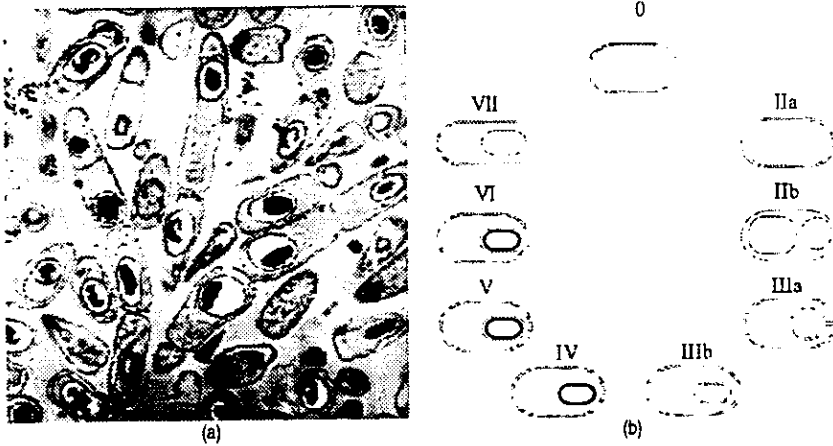


Fig. 2.3 a) Microfotografía electrónica de células de *B. cereus* en diversas etapas de esporulación, comparando con la figura (b) se pueden distinguir algunas de las etapas.

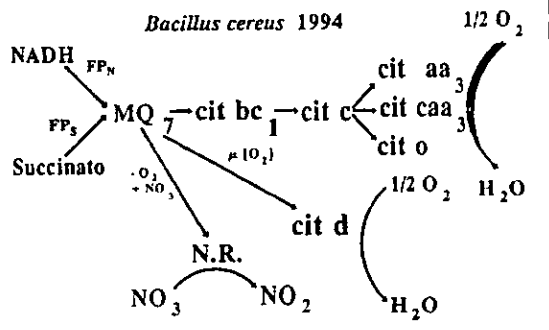
La bien reconocida diversidad entre bacterias formadoras de endosporas fue primero apreciada sobre la base de las diferencias existentes entre los géneros *Bacillus*, aerobios o facultativamente anaerobios y catalasa positivos; y *Clostridium spp.*, estrictamente anaerobios. Ahora, el grupo de procariontes esporoformadores incluye a otros géneros con forma de bastoncillo, tales como; *sporolactobacillus*, microaerófilicos, catalasa negativos, de fermentación homoláctica; *Thermoactinomyces spp.*, con forma de filamentos ramificados; *Desulfotomaculum spp.*, con respiración anaerobia de sulfato; y los cocos de *Sporosarcina spp.* Estos géneros difieren entre si en su morfología celular, sitio de formación de la spora, y detalles de la ultraestructura de la spora. Además presentan diferencias sustanciales en sus capacidades metabólicas. Una de estas diferencias esta relacionada con los procesos empleados para la obtención de energía. En específico, algunos de ellos son organismos estrictamente anaerobios fermentativos, otros pueden ser microaerófilicos de fermentación homoláctica. otros cuentan con una respiración anaerobia de sulfato y finalmente se encuentran las bacterias del género *Bacillus*. Que como ya se mencionó son de metabolismo aerobio o facultativamente anaerobio.

2.3 Cadena respiratoria en *Bacillus*:

La respiración aerobia en el género *Bacillus* presenta un sorprendente arreglo de soluciones bioenergéticas para el problema de maximizar la producción de energía en ambientes cambiantes y generalmente hostiles. La cadena respiratoria de dos grupos de *Bacillus* se ha caracterizado con algún detalle y muestran diversidad en la expresión de oxidasas terminales con diferencias de sustrato y afinidades por oxígeno. Una cadena respiratoria compuesta por deshidrogenasas, quinol-citocromo *c* reductasas y una citocromo *c* oxidasa tipo *caa₃*, se expresa principalmente en especies extremófilas como los termófilos; *B. Stearothermophilus*, *B. PS3*, y probablemente también en *B. Caldolyticus*, así como en el bacilo alcalófilo *B. firmus* (Quirk *et al.*, 1991). Por otro lado, los bacilos mesófilos como *B. subtilis* y *B. cereus*, cuando crecen en medios ricos, expresan principalmente una quinol oxidasa tipo *aa₃*, con lo que se recorta su cadena respiratoria por prescindir del paso a través del complejo citocromo *bc₁* (Yaginuma *et al.*, 1997). Sin embargo, bacilos mesófilos como *B. cereus* tiene la capacidad de expresar alternativamente ambos tipos de cadena. La expresión de distintas oxidasas terminales responde a diferencias en las condiciones de crecimiento y estado de desarrollo.

Diferentes rutas alternativas de transporte electrónico se han caracterizado al momento en *B. cereus* (García-Horsman *et al.* 1991; Escamilla *et al.*, 1984, 1986) (fig. 2.4). Como ya se mencionó la oxidasa *aa₃* se expresa en mayor proporción en etapa vegetativa, mientras que en células esporulantes se encuentra una mayor proporción de citocromo oxidasa *caa₃* (García-Horsman *et al.* 1991).

Fig. 2.4 Cadena respiratoria de *B. cereus* se observan tres rutas alternativas; una en la que los electrones pasan a través del complejo bc- hacia alguna de las citocromo c oxidasas alternativas caracterizadas hasta el momento, otra en la que los electrones fluyen desde la quinona hacia una quinol oxidasa tipo *d*, y otra en la que los electrones pueden fluir desde la quinona hacia un complejo reductor de nitratos. En el caso de la oxidasa *aa₃* aún no es clara su afinidad por sustrato y debido a que posee una baja tasa de recambio se piensa que puede tener actividad de nitrato oxidasa (Escamilla *et al.* 1984, 1986 García-Horman *et al.* 1991 Del Arenal *et al.* 1997)



2.4 Las oxidasas de *Bacillus*

Las oxidasas de *Bacillus* forman parte de la superfamilia de oxidasas hemo-cobre y pueden componerse de tres o cuatro subunidades (Las características de estas subunidades son descritas con mayor detalle en el apartado 2). La forma tradicional de diferenciar a las distintas oxidasas se basa en el contenido de hemo que contienen y en las características espectroscópicas que éstos les confieren.

En cuanto a sus grupos prostéticos la subunidad I de las oxidasas de *Bacillus* puede contener hemo A, B, u O. En el contexto del presente trabajo experimental es importante señalar que en el extremo carboxilo terminal de la subunidad II de algunas citocromo *c* oxidasas se presenta una extensión que contiene un hemo C, unido covalentemente. Sin embargo, no se conocen diferencias funcionales entre las oxidasas que contienen este hemo C y las que no lo contienen (García-Horsman *et al.*, 1991). La cuarta subunidad ha sido identificada como parte del operón *qox ABCD* (ver más adelante) que contiene los genes para la quinol oxidasa tipo *aa₃*, en *B. subtilis* (Saraste *et al.*, 1991) y en *B. PS3* (Ishizuka *et al.*, 1990). Esta subunidad ya fue aislada con el complejo de la oxidasa en *B. PS3* (Sone *et al.*, 1990).

Existe evidencia espectroscópica que sugiere la presencia de citocromo *d* en la cadena respiratoria de algunos *Bacillus* y por comparación con el citocromo *d* (o *bd*) de *E. Coli* se infiere que este puede reaccionar con el oxígeno. El citocromo *o* ha sido detectado espectrofotométricamente en *B. Megaterium*, *B. Subtilis* y *B. Firmus* (revisado en Taber, 19XX). En *B. Stearothermophilus* y *B. PS3* un hemo O puede remplazar al hemo A en el sitio activo de la de la citocromo *c* oxidasa (Sone *et al.*, 1991). En *B. PS3* una citocromo oxidasa tipo *o* se expresa bajo condiciones de baja tensión de oxígeno (Sone *et al.*, 1990). La tabla 2.1, enumera las distintas oxidasas reportadas en el género *Bacillus* a la fecha. Puede observarse que la oxidasa tipo *caa₃* está presente en la mayoría de los *Bacillus* explorados a la fecha. sin embargo, estas especies pertenecen solo a dos de los cinco grupos que conforman el género. con este trabajo se pretende extender el conocimiento que se tiene en relación a lo amplio de la distribución de la oxidasa *caa₃* a través del género *Bacillus*.

Oxidasa en el género <i>Bacillus</i>		
Especie	oxidasa	Sustrato
<i>B. PS3</i>	caa ₃	Citocromo c
	bb ₃	Citocromo c
	cao ₃	Citocromo c
<i>B. firmus</i> OF4	caa ₃	Citocromo c
<i>B. subtilis</i> W168	aa ₃	Quinol
	caa ₃	Citocromo c
<i>B. sp. cepa</i> YN2000	cao	Citocromo c
<i>B. cereus</i>	aa ₃	Citocromo c
	caa ₃	Citocromo c
	bo	?
<i>B. stearthermophilus</i>	caa ₃	Citocromo c
	bo	Quinol

Tabla 2.1 Oxidasas terminales descritas en el género *Bacillus* y sus sustratos.

2.5 La oxidasa *caa*₃ en *Bacillus*, su organización genética.

Las subunidades de las oxidosas terminales bacterianas son codificadas por genes agrupados en operones. Los operones correspondientes a las oxidosas *aa*₃ y *caa*₃ en *B. subtilis* se codifican en locus separados y su organización ya ha sido determinada. El grupo de genes *qoxABCD* codifican para las subunidades de la citocromo oxidasa *aa*₃ y están organizados en forma similar a los genes estructurales de la oxidasa *caa*₃ (Santana *et al.*, 1992). A la fecha se conoce la estructura genética de los operones que codifican para la citocromo oxidasa *caa*₃ en *B. PS3* (Ivey *et al.*, 1990), *B. firmus* (Quirk *et al.*, 1992) y *B. subtilis* (Saraste *et al.*, 1991; van der Oost *et al.*, 1991). En *B. Subtilis* la estructura del operón para la oxidasa *caa*₃, denominado operón *cta*, contiene los genes *ctaA*, *B*, *C*, *D*, *E*, y *F*.

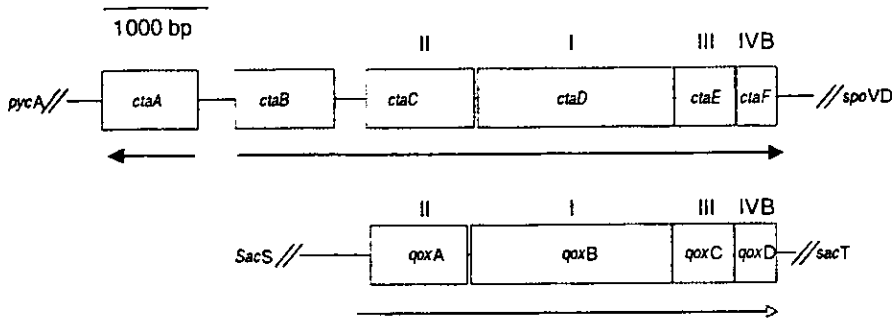


Fig 2.5 Estructura y Organización genética de los operones Cta (Saraste *et al.*, 1991; van der Oost *et al.*, 1991) y Cox en *B. subtilis* (Santana *et al.*, 1992).

Los genes regulatorios *ctaA* y *ctaB* codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de los grupos hemo (fig 2.6) y son adyacentes a los genes *ctaCDEy F*. que codifican para las subunidades estructurales de la oxidasa (fig. 2.5). Los genes *ctaD*, *ctaC*, *ctaE* y *ctaF* codifican para las subunidades I, II, III y IV (Cox 1, Cox 2, Cox 3 y Cox 4) respectivamente. Los genes *ctaBCDF* son transcritos en dirección opuesta al gen *ctaA* (Saraste *et al.*, 1991; van der Oost *et al.*, 1991) (fig. 2.5)

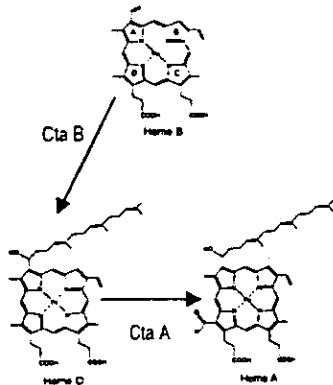


Fig 2.6 Los genes regulatorios *ctaA* y *ctaB* codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de los grupos hemo a partir del protohemo IX, que es el grupo precursor (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). El gen *ctaB* origina una farnesil transferasa que convierte al protohemo IX en hemo O, mediante la adición de un grupo hidroxietil farnesil. El gen *ctaA* codifica para una enzima que reemplaza al grupo metilo, en el carbono 8 del hemo B, por un grupo formilo, convirtiéndolo en un hemo tipo A

El gen *ctaD* codifica para la subunidad I de la oxidasa *caa3* y sus características son similares a las de las subunidades análogas en la superfamilia de oxidasa terminal.

El gen *ctaC* que codifica para la subunidad II es de particular importancia para la estructura de la *citocromo oxidasa caa3*, ya que esta subunidad es la que incluye el dominio de hemo C en el extremo carboxilo terminal. Este dominio para citocromo *c* muestra una gran similitud de secuencia con polipéptidos del grupo de los citocromos *c* mitocondriales. En bacterias gram-negativas los citocromos *c* se localizan en forma soluble en el espacio periplasmático o firmemente anclados a la parte externa de la membrana plasmática (Pettigrew *et al.*, revisado en Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). Las bacterias Gram-positivas no tienen espacio periplasmático de manera que un citocromo *c* translocado a través de la membrana plasmática pudiera perderse en el medio, a menos que de alguna forma quede anclado a la parte externa de la membrana. En la fig (2.7) se muestran dos mecanismos por los cuales el citocromo *c* puede quedar firmemente anclado a la membrana, una de ellas (fig 2.7b) es la fusión de dominios con la citocromo oxidasa.

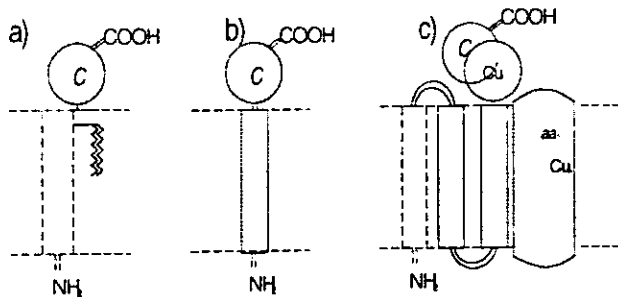


Fig 2.7 mecanismos por los que el citocromo *c* puede quedar anclado a la membrana. a) El péptido señal es procesado y se le une un diacilglicerol con el que se ancla a la membrana. b) Una fusión génica origina una subunidad II con el citocromo *c* unido covalentemente. c) Fusión en bacterias termófilas para conferir termoestabilidad.

2.6 Consideraciones evolutivas en relación con las oxidasas terminales

La aparición del metabolismo aerobio tuvo importantes consecuencias para la evolución de la vida. Dos hipótesis son generalmente aceptadas, la primera sugiere que su aparición solo fue posible después de la liberación de oxígeno a la atmósfera, provocada por la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias. Cuando el oxígeno atmosférico (O_2) alcanzó niveles altos, algunos organismos pudieron adaptarse utilizándolo como oxidante en sus cadenas respiratorias (Dickerson *et al.*, 1976). La segunda hipótesis considera que los organismos con metabolismo aerobio no conforman un clado monofilético (Fox *et al.*, 1980; Woese, 1987) y propone que este evento adaptativo ocurrió repetidas veces en forma independiente durante la evolución (origen polifilético) (Margulis, 1981; Woese, 1987, revisado en Castresana *et al.*, 1994). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el metabolismo aerobio, en organismos con citocromo oxidasas, tiene un origen monofilético y previo a la aparición de organismos eubacterianos fotosintéticos (Castresana *et al.*, 1994).

Castresana *et al.*, (1994) realizaron un análisis filogenético de las secuencias de citocromo oxidasas disponibles en bases de datos, con la idea de trazar la historia evolutiva de esta enzima. Los árboles (Fig 2.9) derivados de este análisis no concuerdan con la filogenia de los organismos basada en la comparación de secuencias de RNA ribosomal obtenidas por Woese (1987) y Cedergren *et al.*, (1988), lo que implica que diversos eventos de duplicación genética y transferencia horizontal de genes, ocurrieron durante la evolución de la proteína (Castresana *et al.*, 1994).

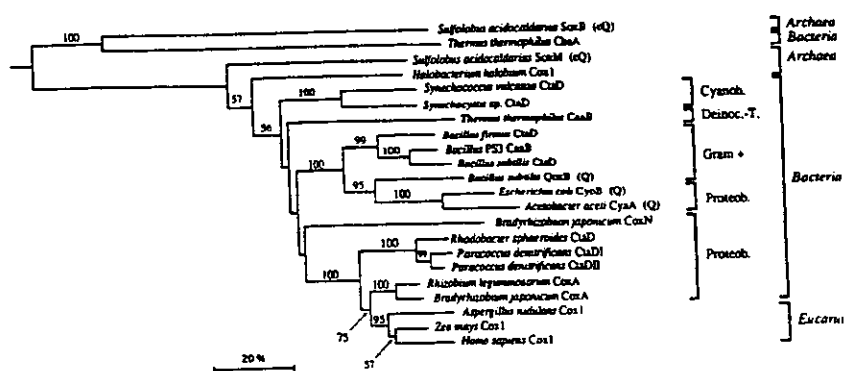


Fig. 2.9 Árbol filogenético de la subunidad I de citocromo oxidasas inferido por el método de Neighbour-joining con corrección de distancia. El género *Bacillus* conforma el grupo de las eubacterias Gram-positivas

En base a la presencia en bacterias fijadoras de nitrógeno de oxidasas que funcionan en condiciones microaeróbicas, Castresana *et al.*, (1994) proponen, que una oxidasa ancestral pudiera haber funcionando en una biosfera con muy baja presión de oxígeno. de esta forma la raíz del árbol de la subunidad I se separa a partir de una bifurcación de las oxidasas de las bacterias fijadoras de nitrógeno. En su análisis se propone que un proceso de duplicación génica originó la separación evolutiva de ambos grupos de oxidasas.

Un segundo evento de duplicación génica explica la segunda gran divergencia evolutiva, previa a la separación de arqueobacterias y eubacterias, en este caso se separa el grupo que incluye a oxidasas de *Sulfolobus acidocaldarius* y *Thermus thermophilus* del resto de las oxidasas en eubacterias y arqueobacterias.

En el árbol de la figura 2.9 se observa que el grupo de bacterias gram-positivas lo conforman especies de *Bacillus*. Castresana *et al.* (1994) proponen que el gen ancestral de una citocromo c oxidasa, presente en bacterias gram-positivas, debió duplicarse dando origen a un nuevo gen cuyo producto proteico fuese una enzima con actividad quinol oxidasa. Posteriormente, a partir de un evento de transferencia horizontal, este gen para quinol oxidasa se transmitiría del grupo de las bacterias gram-positivas hacia otros grupos bacterianos. Esta propuesta se fundamenta en el hecho de que las citocromo c oxidasas de bacterias gram-positivas del género *Bacillus* se relacionan más estrechamente con quinol oxidasas de eubacterias como *Acetobacter aceti* y *Escherichia coli*, que con citocromo c oxidasas de otras eubacterias. Con ya se mencionó en el grupo de los *Bacillus* la oxidasa *aa₃* se reporta con actividad quinol oxidasa y la oxidasa *caa₃* presenta actividad citocromo c oxidasa.

Finalmente, la ramificación de citocromo oxidasas de eucariontes a partir de la subclase alfa de Proteobacterias es otro ejemplo de la baja correspondencia del árbol de la oxidasa con respecto a la filogenia de los organismos. sin embargo esta situación es mejor documentada ya que existe abundante evidencia del origen endosimbótico de la mitocondria a partir de Proteobacterias de la subclase alfa (Margulis, 1981; Cedergren *et al.*, 1988; revisado en Castresana *et al.*, 1994).

2.7 Métodos de estudio de las oxidasas

Análisis espectral: Los citocromos son pigmentos proteicos que absorben luz a longitudes de onda específicas. Las características espectrales de los citocromos dependen del cofactor hemo que los constituye y del ambiente local en el sitio de unión del hemo con la apoproteína (Thöny-Meyer, 1997).

Espectrofotométricamente puede definirse el estado de oxidación del hierro en los citocromos. La forma reducida origina tres picos principales de absorción en el espectro del visible a UV, basándose en estos picos, se definen tres regiones espectrales α , β , y γ . Con pocas excepciones la región α (>550 nm) puede ser usada para identificar a un determinado tipo de citocromo: en esta región los citocromos tipo *c* presentan un máximo entre 550 y 557 nm, los citocromos tipo *b* y *o* tienen máximos entre 555 y 565 nm, los citocromos tipo *a* presentan máximos alrededor de los 600 nm y los citocromos tipo *d* tienen máximos alrededor de los 630 nm. La nomenclatura de los citocromos comúnmente incluye el tipo de citocromo y como subíndice su máximo de absorción en la región α (revisado en Thöny-Meyer, 1997).

Existen diversos métodos espectroscópicos para el análisis de las características espectrales de los citocromos. entre los principales se encuentran: la espectrofotometría de haz partido, la de longitud de onda sencilla, la de longitud de onda múltiple y la de doble longitud de onda (Jones y Poole, 1985). En la espectrofotometría de doble longitud de onda los espectros diferenciales reducido menos oxidado permiten revelar claramente los máximos de absorción de las diferentes especies de citocromo que componen una muestra. Los registros se pueden conseguir a partir de células enteras, membranas celulares, fracciones puras, o parcialmente purificadas de las membranas celulares.

El método utiliza como referencia el patrón espectral de la muestra oxidada que se sustrae contra sí mismo. lo que genera una línea basal. Al patrón espectral de la muestra reducida se le sustrae esta basal con lo que se genera un espectro reducido menos oxidado. Las firmas espectrales de cada tipo de citocromo presente en la muestra pueden ser identificadas en este registro.

Comúnmente la muestra de referencia se oxida por aireación vigorosa o con el empleo de un agente químico oxidante como el persulfato de amonio. La muestra reducida se consigue a partir de la aplicación de un agente químico reductor como la ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), el N,N,N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) o el ascorbato.

La citocromo oxidasa *caa3* de *B. subtilis* muestra picos de absorción a 605 y 445 nm, derivados de las longitudes de absorción del citocromo *a* y *a* 551, 520, y 417 nm, como consecuencia de su contenido de citocromo *c*. La enzima purificada tiene una alta actividad oxidasa con TMPD más ascorbato, como donadores de electrones (Lauraeus *et al.*, 1991). En *B. cereus*, la citocromo oxidasa *caa3* purificada muestra picos de absorción característicos a 603 y 445 nm, correspondientes al citocromo tipo *a*, y picos a 417 y 523 nm, atribuibles al citocromo tipo *c* (Garcia-Horsman *et al.*, 1991).

Análisis electroforético: La separación y determinación del tamaño de las moléculas tiene una importancia central en los análisis bioquímicos y genéticos. El método utilizado con este propósito es la electroforesis en gel. La separación electroforética se fundamenta en el hecho de que las moléculas disueltas en una matriz porosa dentro de un campo eléctrico, se muevan a una velocidad que está determinada por su forma, su tamaño y su carga. El gel actúa como soporte y resistencia para la migración de las moléculas.

La separación electroforética en geles de acrilamida en gradiente (10-16 %), y bajo condiciones desnaturalizantes, permite separar a las subunidades proteicas de los complejos respiratorios. Con el método de SDS/PAGE reportado por Schägger y von Jagow (1987) es posible separar apropiadamente estas subunidades y visualizar posteriormente las proteínas que contienen hemo C, a partir de su actividad peroxidasa y la tinción específica con tetrametil bencidina. La subunidad II de la oxidasa *caa3* puede revelarse de esta manera ya que contiene un citocromo *c* unido covalentemente. La estimación de los pesos moleculares de las subunidades se consigue a partir de la comparación con un patrón de bandas de una mezcla de proteínas de peso conocido (marcador de pesos moleculares).

Análisis genético: La determinación del tamaño de las moléculas de DNA se consigue a partir de electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. Los ácidos nucleicos en solución tienen una carga negativa, debido a que sus grupos fosfato están ionizados, de esta manera migran hacia el polo positivo del campo eléctrico al que se someten. La determinación del tamaño se estima sobre la base del corrimiento simultáneo de un patrón de fragmentos de DNA de tamaño conocido (marcador).

Quizá la técnica de mayor impacto y auge reciente es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se trata de un método enzimático para la amplificación de segmentos específicos de secuencias de DNA. Para la amplificación se emplean un par de oligonucleótidos, que hibrida con las cadenas complementarias del DNA utilizado como molde (DNA blanco). Los oligos flanquean los extremos de la región que se desea amplificar. El mecanismo de amplificación consiste en una serie de ciclos repetitivos de los siguientes pasos:

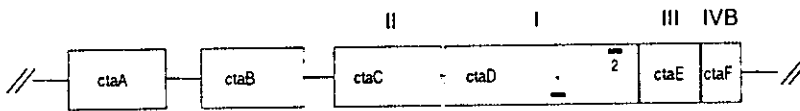
- Desnaturalización del templado a una temperatura cercana a los 94 °C (DNA genómico)
- Alineación o hibridación de los oligos a una temperatura menor que depende de la especificidad y punto de fusión de los oligos (alrededor de los 55 °C)
- Extensión enzimática de los oligos alineados por acción de la DNA polimerasa.

Debido a que los productos de la extensión de los oligos en un primer ciclo de amplificación sirven como molde para el ciclo siguiente, el número de copias de DNA templado puede duplicarse en cada ciclo. Así, un PCR de 20 ciclos de amplificación, que parte de una sola molécula de templado, da una amplificación de aproximadamente un millón de veces (20^{20}) (Erich, 1992).

Los componentes de una mezcla de reacción para PCR son: DNA polimerasa, desoxirribonucleótidos de trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), DNA molde o secuencia blanco, los oligos, y un amortiguador con la concentración adecuada de ion Mg^{++} . Por lo general la reacción se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l con 30 ciclos de amplificación. El buen diseño de los

oligos o primers, es fundamental para el éxito de la amplificación. Se busca que hibriden lo más específicamente posible con la secuencia blanco; además, antes de su aplicación es recomendable someterlos a un análisis para determinar que tan complementarios pueden ser uno con otro, y si forman estructuras secundarias estables entre ellos. Estos dos factores afectan directamente la eficiencia de amplificación. Finalmente el tiempo y temperatura de cada paso de amplificación influyen directamente en la calidad de los resultados (Saiki, 1992).

En el proceso de localización de los genes que codifican para la *citocromo oxidasa caa3* en *B. subtilis* (Saraste *et al.*, 1991) y *B. firmus* (Quirk *et al.*, 1993), fueron empleados un par de oligos dirigidos contra una zona altamente conservada dentro del gen *ctaD* (Subunidad 1) del operón *cta*. La utilización exitosa de este par de oligos en la localización y amplificación específica de un fragmento de aproximadamente 150 pb dentro del gen *ctaD* de estas especies, los postula como buenos candidatos para ser utilizados como sonda en la búsqueda de los genes de la citocromo oxidasa *caa3* en otras especies bacterianas. La fig. 2.8 muestra los sitios de unión de estos oligos dentro del gen *cta D*, y la secuencia de los oligos utilizada por Quirk *et al.* (1993).



Oligo:	Secuencia:
1	5'-GGNCACCCNGAGGTNTACAT-3'
2	5'-ACATGTGGTGNACCCANACCAT-3'

Fig. 2.8 El dibujo muestra un esquema del operón *cta* señalando los sitios de unión de los oligos 1 y 2 utilizados en la amplificación de un fragmento de DNA de aproximadamente 150 pb dentro del gen *cta D* (representado por la barra inferior en el dibujo) en *B. firmus* (Quirk *et al.*, 1993). En la parte inferior se muestra una tabla con las secuencias de los oligos utilizada.

III. OBJETIVOS

- Analizar la distribución de la citocromo oxidasa *caa₃* a través del género *Bacillus* realizando una búsqueda de esta oxidasa entre diferentes especies pertenecientes a cada uno de los cinco grupos del árbol filogenético de *Bacillus* propuesto por Ash *et al.* (1994).

Con esta finalidad se aplicaron tres diferentes pruebas de análisis en la determinación de la presencia de la oxidasa *caa₃* en cada una de las especies seleccionadas.

1. Análisis espectral de membranas celulares por espectrofotometría de doble rayo.
2. Análisis electroforético en condiciones desnaturizantes de membranas celulares digeridas y desnaturizadas. Revelado de subunidades con actividad peroxidasa.
3. Utilización del DNA genómico de cada una de las especies de *Bacillus* como molde en la amplificación por PCR de un fragmento altamente conservado dentro de la subunidad I de la citocromo oxidasa *caa₃*.

IV. MATERIAL Y METODOS

4.1 Especies de *Bacillus* analizadas

Siete de las especies empleadas en este estudio se obtuvieron de colecciones bacterianas en instituciones del País, dos especies se obtuvieron por donación del Instituto de investigación "Higeta Shoyu". en Japón., una fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC)(Tabla 4.1). Las especies fueron seleccionadas intentando cubrir el espectro del árbol filogenético propuesto por Ash *et al* en 1991 (Fig 2.1), en forma tal que de cada grupo se contara con al menos un representante. En el caso del grupo 5, este se constituye por tres especies entre las que se encuentra *B. stearothermophilus*, para la cual existe un reporte previo de la presencia de la oxidasa caa_3 (De vrij *et al.*, 1989) las otras dos especies pertenecientes a este grupo (*B. kaustophilus*, y *B. thermoglucosidasius*) no están disponibles en ningún cepario nacional, sin embargo, la donación de un conjunto de cepas por parte del Dr. Osamu Shida del Centro de Investigación Higeta Shoyu en Japón, permitió trabajar con *B. aneurinolyticus*, una especie cercana a este grupo, pero que no obstante permanece desagrupada, dada su baja relación filogenética con las demás especies de *Bacillus*. En la clonación de un fragmento de DNA producto de PCR fue empleada la cepa DH α 5 de *Escherichia coli*.

Grupo	Especie	Origen
1	<i>B. thuringiensis</i>	Cepario de la Facultad de química de la UNAM
1	<i>B. megaterium</i>	Cepario de la Facultad de química de la UNAM
2	<i>B. sphaericus</i>	Cepario de la Facultad de química de la UNAM
2	<i>B. pasteurii</i>	American Type Culture Colection (ATCC 11859)
3	<i>B. polymyxa</i>	Cepario de la Facultad de química de la UNAM
3	<i>B. macerans</i>	Cepario de la Facultad de química de la UNAM
4	<i>B. brevis</i>	Donada por el Dr. Shida. "Higeta Shoyu" Japón (HSCC 186).
---	<i>B. aneurinolyticus</i>	Donada por el Dr. Shida. "Higeta Shoyu" Japón (HSCC 149).

Tabla 4.1 Especies seleccionados para la búsqueda de la oxidasa caa_3 se señala el grupo al que pertenecen y el cepario de origen *B. aneurinolyticus* no pertenece a ninguno de los cinco grupos.

4.2 Cultivos Bacterianos

Cada cepa fue crecida preferentemente en medio con fuente de carbono no fermentable, debido a que reportes previos documentan la expresión de la oxidasa caa_3 en medios de está naturaleza. Se empleo la formulación del medio de caseína y aminoácidos (CAAS). Sin embargo, cuando el crecimiento en medio CAAS fue nulo, o de bajo rendimiento, fue necesario crecer a la especie en particular, en un medio complejo con fuentes de carbono tanto fermentables como no fermentables (T2), o en un medio específico para esa especie. Este último fue el caso de *B. pasteurii*, que por sus peculiaridades metabólicas requiere de la complementación del medio de crecimiento con amonio $((NH_4)_2 SO_4)$. Esta cepa fue adquirida del ATCC y se empleó el medio de cultivo sugerido por el proveedor. En la tabla (4.2) se listan los medios de cultivo en que fueron crecidas cada una de las cepas y la temperatura que resultó ser óptima para su crecimiento, y a la cual se incubaron los cultivos. *Escherichia coli* DH α 5 fue crecida en medio Luria Bertania (LB).

Composición de los medios de cultivo

Medio CAAS: (1 litro): Caseína hidrolizada (8.6 gr). Ac. L-glutámico (3.6 gr), D-L alanina (2.14 gr), L-asparagina (1.2 gr), KH_2PO_4 (1.36 gr), Na_2SO_4 (0.107 gr), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.60 gr), NH_4Cl (0.535 gr), NH_4NO_3 (0.96 gr), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.0986 gr), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.02 gr), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0.022 gr), pH 7.1

Medio T2: Peptona 1%, extracto de carne 0.5 %, extracto de levadura 0.2 %, glucosa 2% (esterilizada por separado). pH ajustado a 7 con NaOH 1N.

Medio para *B. Pasteurii* (1 lt.): este medio es indicado en el catalogo del American Type Culture Colection (ATCC). como específico para el crecimiento de *B. Pasteurii*. su composición es: Extracto de levadura (20 gr), $(NH_4)_2SO_4$ (10 gr), Tris 0.13 M pH 9 (1 lt).

LB: Triptona de caseína 1 % p/v, extracto de levadura al 0.5 % p/v, NaCl 1 % p/v.

Especie	Medio de cultivo	Temperatura °C
<i>B. thuringiensis</i>	CAAS	30
<i>B. megaterium</i>	CAAS	37
<i>B. sphaericus</i>	CAAS	30
<i>B. pasteurii</i>	Medio para <i>B. pasteurii</i> (ATCC)	37
<i>B. polymyxa</i>	CAAS	30
<i>B. macerans</i>	CAAS	30
<i>B. brevis</i>	Medio T2	37
<i>B. aneurinolyticus</i>	Medio T2	37

Tabla 4.2 Esta tabla muestra el medio de cultivo en el que se creció cada especie de *Bacillus* así como la temperatura que resultó ser óptima para su crecimiento.

4.3 Obtención de membranas celulares

Cada cepa se creció en 5 lt. de medio de cultivo. Los cultivos se obtuvieron a partir de la inoculación, con cultivo sincrónico (transferencias sucesivas), de 1 lt. de medio estéril en matraz Erlenmeyer de 2 lt. esto deja una cama de aire similar al volumen de cultivo empleado en cada matraz. Los cinco matraces inoculados se incubaron a temperatura controlada con agitación a 200 rpm. La progresión de los cultivos y la fase de crecimiento fue monitoreada valorando las células al microscopio. Estas fueron cosechadas cuando se hicieron evidentes los cambios en morfología relacionados con las fases 2 y 3 de esporulación, inducida por el agotamiento de nutrientes (Hanson *et al*, 1963). La cosecha celular se realizó por centrifugación en una centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-14 a 7500 rpm (8630 g) durante 15 min. La pastilla celular fue lavada y resuspendida en un mínimo de volumen de buffer de fosfatos 50 mM. (pH 7.1) (100 ml. finales para 60 g de células aproximadamente). Se agregaron 7.4 mg de "PMSF" (inhibidor de serin-proteasas) previamente disueltos en 1 ml. de DMSO. Se homogeneizó muy bien con ayuda de un Ultraturrax T8-01 (Labortechnik) debido a que el "PMSF" es poco soluble. Las células fueron rotas por acción mecánica en una licuadora "Bit beater" con perlas de vidrio de 150-212 μ de diámetro. En el vaso del Bit beater se vertieron 190 ml de perlas y se adicionó el total del resuspendido. se lleno con perlas y

amortiguador licuando durante 15 ciclos de 30 seg. de ruptura con descansos de 5 minutos. Finalmente se filtró la mezcla para separar las perlas.

Las membranas fueron recuperadas por centrifugación en la centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-14 a 8500 rpm (11100 g) durante 15 min. El sobrenadante separado se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L-60, rotor 45 Ti, a 40 000 rpm (125 000 g) por 40 mins a 4 °C. De la pastilla se recuperó la capa de color café oscuro a rojo (membranas), evitando la parte blanca pegada a las paredes de los tubos. Las membranas fueron lavadas con buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.1) y vueltas a ultracentrifugar. Finalmente, se recuperó la pastilla de membranas resuspendiéndolas en un mínimo de buffer de fosfatos 50 mM, y distribuyéndola en alícuotas de 500 µl en tubos Eppendorf. Se almacenaron a -70 °C. La concentración de proteína total presente en las membranas celulares fue determinada aplicando la técnica de Lowry (Lowry et al, 1951).

4.4 Análisis espectroscópico de grupos prostéticos

Los espectros de citocromos fueron registrados en un espectrofotómetro de doble rayo SLM-Aminco DW-2000 (Silver Springs, MD). Las muestras de membranas fueron reducidas secuencialmente con 20 µl de ascorbato (0.3 M), incubando durante 30 min antes de la lectura espectrofotométrica, 20 µl de ascorbato (0.3 M) más 100 µl de TMPD (4mM), incubando durante 15 min antes de la lectura y finalmente con ditionita, incubando durante 15 min antes de la lectura. Como referencia fueron usadas preparaciones oxidadas con persulfato de amonio. Todos los espectros fueron registrados de 400 a 700 nm a temperatura de nitrógeno líquido.

4.5 Análisis electroforético

Las membranas celulares de cada una de las especies fueron digeridas y desnaturalizadas calentando en baño María a ebullición durante tres minutos, en presencia de SDS, mercaptoetanol y glicerol (SDS 5%, glicerol 15 %, Mercaptoetanol 3 %, 150 µl tris-HCl pH 6.8). La cantidad de membranas aplicadas fue la necesaria para digerir al menos 1300 µg de proteína total.

La preparación de membranas digeridas y desnaturalizadas fue sometida a electroforesis desnaturalizante (SDS) en gel de acrilamida con un gradiente de concentración de 10 a 16 %. Se utilizó el método de SDS/PAGE reportado por Schägger y von Jagow (1987), en la forma descrita por Garcia-Horsman *et al.*, (1991).

El gel de acrilamida constaba de dos partes, una denominada "espaciadora", gel de acrilamida en gradiente 10-16 %. y otra "concentradora" al 4.5 %. Los componentes de la mezcla para elaboración de estos geles se muestran en la tabla 4.3.

Componente	10 %	16%	Concentrador
Acrilamida (X)	6.6	10.56	1.5
Tris-HCl (1.5 M) pH 9	5	5	-
Tris-HCl (0.5 M) pH 6.7	-	-	2.5
H2O	5.8	1.84	4.7
Glicerol	1.6	1.6	0.8
SDS 20 %	1	1	0.5

Tabla 4.3 Volumen (ml) de los componentes aplicados en la elaboración de los geles de acrilamida desnaturalizantes. 10-16 % son las soluciones a partir de las cuales se obtuvo la parte resolvidora del gel en gradiente

Las soluciones para el gel espaciador (10 y 16 %) se depositaron en un gradintero montado sobre un agitador magnético, de aquí se vertieron a la cámara mezclándolos por agitación constante, para su polimerización se les adicionó, en el momento de verterlas a la cámara, 50 µl de persulfato de amonio (10 %) y 15 µl de TEMED. Una vez gelificado el gel resolvidor se adicionó la solución para el gel concentrador utilizando los mismos reactivos para su polimerización. Sobre esta solución se acomodó el peine para la construir los pozos de muestra.

Las electroforesis fueron realizadas en una cámara electroforética Hoefer (vertical slab gel unit. modelo SE 400), utilizando para la corrida un buffer que por litro contenía 3.3 gr. de Tris, 14.4 gr. de glicina y 1 gr. de SDS. La carga utilizada en la entrada de la muestra al gel concentrador fue de 25 miliamperes (mamp) y se elevó a 35 mamp una vez que la muestra entraba en el gel

resolvidor. Se utilizó citocromo c de caballo como control estándar en cada corrida. Terminada la separación electroforética los geles fueron incubados en oscuridad en una solución de tetrametilbencidina solubilizada en 60 ml. de metanol absoluto más 140 ml. de acetato de sodio (0.25 M, pH 5.0). después de 30 a 60 minutos se detuvo la reacción de tetrametil bencidina aplicando una solución de 60 ml. de isopropanol con 140 ml. de acetato de sodio (0.25 M, pH 5.0). Las proteínas con contenido de citocromo c fueron reveladas por ensayo de su actividad peroxidasa sobre los geles, aplicando 300 μ l de peróxido de hidrógeno e incubando de 3 a 30 minutos. Para la determinación de pesos moleculares se utilizó el marcador Mark VII de SIGMA, cuyo patrón de bandeo fue revelado incubando el gel en una solución con colorante de proteínas Coomassie al 0.2%.

4.6 Obtención de DNA genómico:

Cada una de las cepas utilizadas fue crecida en un litro de medio hasta alcanzar una densidad óptica de 2.5 a 550 nm. Las células fueron cosechadas centrifugando a 10 000 rpm (rotor JA-14, 15 300 g) durante 15 minutos. La pastilla celular fue lavada con una solución de NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.9 y EDTA 10 mM, y vuelta a centrifugar. La masa celular lavada se resuspendió en 5 ml de una solución con NaCl 150 mM, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.9. Se agregó lisozima a una concentración final de 4 mg/ml incubando a 37 °C durante 30 minutos. Las células fueron lisadas utilizando una solución de SDS al 2 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.9, incubando con agitación constante durante aproximadamente 30 minutos o hasta que la solución se aclarara. Para la extracción del DNA del lisado celular se elevó la concentración de NaCl hasta 1.4 M y se agregó un volumen igual de fenol saturado con cloroformo agitando vigorosamente durante un par de minutos, la emulsión obtenida se centrifugó a 3 000 rpm (1 090 g) durante 10 minutos en la centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-20, a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa la cual se extrajo 3 veces con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Después de la tercera extracción se adicionó al volumen de la fase acuosa recuperada 2/3 de volumen de isopropanol, se agitó y centrifugó a 5 000 rpm (3 030 g) durante 30 minutos. El botón fue lavado con una solución de etanol al 76% v/v, acetato de amonio 10 mM, durante 20 minutos. Posteriormente esta solución fue centrifugada a 3 000 rpm (1 090 g) y el botón se resuspendió en 1 ml de Tris-acetatos pH 8 (TE8) con 10 μ g de RNasa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se diluyó la solución con dos volúmenes de TE8 y se agregó acetato de amonio 7.5 mM pH 7.7 hasta alcanzar una

con dos volúmenes de TE8 y se agregó acetato de amonio 7.5 mM pH 7.7 hasta alcanzar una concentración final de acetato de 2.5 M. Se adicionaron 2.5 volúmenes de isopropanol muy cuidadosamente y por las paredes del tubo, cuando se establecieron dos fases se mezclaron suavemente por inversión. El DNA se recuperó con una varilla de vidrio y se resuspendió en 1 ml de TE8.

La concentración de DNA y su pureza se determinó midiendo la absorbencia de una dilución 1:10, a 260 nm y se aplicó a la formula: $(\text{Absorbencia a } 260 \text{ nm}) \times (\text{factor de dilución}) \times (0.05) = (\text{concentración de DNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l})$, con la absorbencia a 280 nm, se obtuvo el cociente $(\text{absorbencia DNA } 260\text{nm}) / (\text{absorbencia Proteina } 280 \text{ nm})$, lo cual nos da un índice de pureza.

4.7 Diseño de oligos y amplificación por PCR:

Se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos (primers) empleadas por Quirk *et al.* (1991) y previamente por Saraste *et al.* (1991), sobre DNA genómico de *B. firmus* y *B. subtilis* respectivamente. en la amplificación de un fragmento de DNA altamente conservado de aproximadamente 150 pb. dentro del gen Cta D (Cox 1). A la secuencia de los oligonucleotidos reportada (Tabla 4.4), se le adicionó un gancho para la polimerasa (GGC), con la finalidad de incrementar la afinidad en el proceso de amplificación por PCR. Además, del gancho GGC se adicionó a la secuencia de estos oligos secuencias que definen sitios de restricción para las enzimas Bam H1 y Eco R1, hacia el extremo 5' terminal, lo anterior con la finalidad de hacer mas manejables los productos de PCR en un eventual proceso de inserción y corte dentro de un plásmido . La síntesis de los oligos estuvo a cargo de la Doctora Laura Ongay (IFC-UNAM).

OLIGO	GANCHO	SITIO	SECUENCIA BASE
1	GGC	GGATCC (BAMH1)	GGNCACCCNGAGGTNTACAT
2	GGC	GAATTC (ECOR1)	ACATGTGGTGNACCCANACCAT

Tabla 4.4 Secuencia "gancho" y sitios de restricción adicionados a la secuencia base en la construcción los oligos 1 y 2 utilizados en la amplificación por PCR

La secuencia final de los oligos fue analizada con ayuda del programa OLIGO 4.03 (primer analysis software.) con la finalidad de determinar la complementariedad entre oligos, la formación de

estructuras secundarias, así como sus puntos de fusión.

En la reacción de amplificación por PCR, el volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 μ l, esta mezcla incluía DNA genómico (molde) (el volumen necesario para alcanzar una concentración final aproximada de 0.4 μ g/ μ l en la mezcla de reacción), Oligo 1 (1 μ l: 300 η g/l) y Oligo 2 (1 μ l: 300 η g/l), 5 μ l de mezcla de oligonucleósidos (dNTPs: 200 μ M cada uno), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer), 5 μ l Buffer (10 X) para Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, este Buffer ya incluye la concentración adecuada de Mg²⁺), y agua desionizada estéril hasta completar 50 μ l. La mezcla se cubrió con 50 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación.

El programa de amplificación incluye un ciclo inicial con una temperatura de alineamiento de baja astringencia (30 °C), la temperatura de alineamiento de los ciclos posteriores fue determinada en base a lo sugerido por el análisis aplicado a los oligos. En total se aplicaron 30 ciclos de amplificación usando un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) (Tabla 4.5)

En base al resultado obtenido de los primeros ensayos de amplificación aplicados para cada una de las especies, se hicieron modificaciones a la temperatura de alineamiento en el programa de amplificación.

Etapa	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	95	3
2	Alineamiento inicial	30	1
3	Extensión inicial	72	1
4	Desnaturalización	92	1
5	alineamiento*	59	1
6	Extensión (regresa a 4, 29 ciclos)	72	1
7	Extensión final	72	3
8	Temp. de conservación	4	X

Tabla 4.5 Esquema general de los ciclos de amplificación indicando la secuencia de temperaturas y tiempos programados en el termociclador

4.8 Clonación y secuenciación de uno de los productos de PCR:

Para la clonación de uno de los productos de PCR (derivado de la reacción de amplificación sobre DNA genómico de *B. thuringiensis*, se corrió electroforéticamente la totalidad de la mezcla de reacción (50 μ l) en gel de agarosa al 1%. La banda con un peso de aproximadamente 150 pb fue recortada del gel y se extrajo empleando el Kit "GeneClean II" de Bio 101, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Para la clonación de este producto se utilizó el kit de clonación "TA cloning kit" de Invitrogen. Las células competentes empleadas para la transformación, fueron preparadas según el método descrito por Maniatis (1982) y sembradas en cajas Petri con medio LB y ampicilina (100 μ g/ml) como agente de selección. El medio se adicionó además con IPTG (a una concentración final de 5 mM) y X-gal (40 μ g/ml).

La clona aislada se creció en 3 ml de medio Lb incubando a 37 °C durante 12 hrs. Las células obtenidas fueron usadas para la obtención de suficiente DNA mediante la técnica de minipreps y se purificó extrayendo con fenol saturado con cloroformo y alcohol isoamílico. La secuenciación se realizó aplicando el método de Sanger *et al.*, (1976) empleando el kit de Secuencas de USB, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se utilizó el primer universal (forward) de Stratagene, amplificando en presencia de adenina marcada con S³². El resultado se reveló mediante electroforésis en gel de acrilamida/urea, al 6 % a 50 °C y exponiéndolo contra una placa fotográfica durante 14 hrs. La secuencia obtenida se comparó contra la secuencia homóloga de *B. subtilis* disponible en el GEN BANK, para confirmar su identidad.

V. RESULTADOS

La expresión de la citocromo oxidasa *caa₃* en etapa esporulante fue detectada a partir de la aplicación de técnicas de análisis espectral y electroforesis desnaturalizante de membranas celulares. La presencia del gen *cta D*, que codifica para la subunidad I de esta oxidasa, se detectó por la amplificación específica de un fragmento de 160 pb, altamente conservado dentro de este gen. Los resultados experimentales de las tres técnicas permiten sugerir la presencia o ausencia de la oxidasa *caa₃* en cada especie de *Bacillus* analizada (tabla 5.1).

Especie	Firma espectral	Presencia polipeptido	Presencia del gen
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+
<i>B. megaterium</i>	+	+	+
<i>B. sphaericus</i>	-	+	-
<i>B. pasteurii</i>	+	?	+
<i>B. polymyxa</i>	+	?	+
<i>B. macerans</i>	+	+	+
<i>B. brevis</i>	+	+	+
<i>B. aneurinolyticus</i>	-	-	-

Tabla 4.1 Relación de resultados de las pruebas aplicadas en la detección del oxidasa *caa₃*. El signo (+) significa que la prueba confirma su presencia y el signo (-) que la rechaza.

5.1 Análisis espectral

El primer acercamiento en la detección de la oxidasa *caa₃* se consiguió mediante el análisis espectroscópico de membranas celulares de *Bacillus* en estado esporulante (etapa T2-T3). Los espectros diferenciales reducido menos oxidado revelan la presencia de la *citocromo oxidasa caa₃* con picos de absorción a 603 y 445 nm (García-Horsman *et. al.*, 1991). Otros picos de absorción se relacionan con la presencia de esta enzima y son los correspondientes al citocromo *c*, que lleva unido covalentemente, y que absorbe a 417, 523 y 550 nm.

La tabla (5.2) muestra las longitudes de onda de los picos de máxima absorción observados en los espectros diferenciales de cada una de las especies (fig. 5.3(a) - 5.10(a)), y relacionados con la firma espectral de la oxidasa caa_3 . Los picos de absorción de las oxidasas aa_3 y caa_3 tienden a superlaparse por su cercanía, lo que dificulta la identificación de una u otra. Con la intención de salvar este inconveniente se redujo secuencialmente con tres especies químicas de distintos potenciales redox (ascorbato, ascorbato-TMPD y ditionita), esto permitiría reducir la cadena respiratoria a diferentes niveles y discernir entre la señal generada por la presencia simultanea de ambas enzimas. Sin embargo, puede observarse cierta heterogeneidad en los resultados obtenidos con este tratamiento, el comportamiento espectral entre las distintas especies no sigue el mismo patrón; en algunos casos no se observa desplazamiento significativo en los picos de absorción (lo cual sugiere la presencia de una sola de las enzimas), en otros los picos se corren a la izquierda, o a la derecha con la adición de ditionita. No obstante estas diferencias en los casos en que se observa un corrimiento significativo de los picos de absorción puede suponerse que se debe a la presencia de ambas enzimas en las membranas celulares.

Especies	Reducción con Ascorbato	Reducción con Ascorbato-TMPD	Reducción con Ditionita
<i>B. thuringiensis</i>	606.4-443.2	602.8-442.3	600.1-442.6
<i>B. megaterium</i>	599.8-445.9	602.2-443.2	602.8-443.5
<i>B. sphaericus</i>	599-446.2	599.5-445	599.2-442.9
<i>B. pasteurii</i>	600-439.75	604-440.5	603.1-440.8
<i>B. polymyxa</i>	602.5-445	605.25-448	-----
<i>B. macerans</i>	599.8	601.9-442.6	603.1-444.1
<i>B. brevis</i>	603.1-440.2	603.7-442.3	603.4-442
<i>B. aneurinolyticus</i>	Ausente-441	Ausente-441	Ausente-441

Tabla 5.2 Longitud de onda de los picos de absorción en nm relacionados con la presencia de la oxidasa caa_3 (alrededor de los 600 y 445 nm) en diferentes especies de *Bacillus*, usando tres distintos reductores: Ascorbato, ascorbato-TMPD y ditionita.

5.2 Análisis electroforético

Las membranas de células en etapa esporulante (T2-T3) fueron calentadas, solubilizadas y digeridas en presencia de SDS, β -mercaptoetanol y glicerol. La electroforesis en gradiente (10-16%) sobre geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS/PAGE), permitió separar las subunidades de complejos proteicos. A partir de la tinción específica con tetrametil bencidina y la reacción con peróxido de hidrógeno, se revelaron las subunidades proteicas con actividad peroxidasa (Fig 5.3(b)-5.5(b) y 5.8(b)-5.10(b)). La actividad peroxidasa hizo evidente la presencia de hemos tipo c unidos covalentemente a diversas subunidades proteicas presentes en las muestras de membranas digeridas. En el caso de *B. pasteurii* y *B. polymyxa* no fue posible revelar las subunidades proteicas por este método, de manera que se tuvo que prescindir de este criterio al evaluar la presencia de la oxidasa.

La tabla (5.3) presenta el peso de las bandas, que por analogía a lo reportado para *B. cereus* (Garcia-Horsman *et al.*, 1991), corresponden a la subunidad proteica II de la citocromo oxidasa *caa3*. Además, se presentan en algunos casos los valores de subunidades proteicas más pesadas que de igual forman revelan la presencia de un citocromo tipo c unido covalentemente.

Especie	Masa relativa (Mr)
<i>B. thuringiensis</i>	37,483
<i>B. megaterium</i>	36,698
<i>B. sphaericus</i>	36,698 y 37,881
<i>B. pasteurii</i>	?
<i>B. polymyxa</i>	?
<i>B. macerans</i>	37,088 (40,364)
<i>B. brevis</i>	34,264
<i>B. aneurinolyticus</i>	39,568 (49,813)

Tabla 5.3 Subunidades proteicas con actividad peroxidasa y un peso alrededor de 37 Kda. Entre paréntesis se muestran además los pesos de subunidades mayores reveladas y cuya identidad es indefinida. El revelado de subunidades proteicas con actividad peroxidasa no fue posible para *B. pasteurii* y *B. polymyxa*.

5.3 Análisis genético

5.3.1 Diseño y evaluación de oligos

A continuación se presentan las secuencias finales de oligos utilizados, así como los resultados de la prueba de complementariedad y puntos de fusión aplicada con el programa OLIGO 4.03 (primer analysis software)(Tablas 5.4 y 5.5) . Esta prueba permitió estimar la eficiencia de reacción de PCR, a partir de los valores de Tm de los oligos (ver material y métodos) con y sin sitio de restricción; Tm del producto; y diferencias de Tm entre ambos oligos. Además se determinó la no existencia de sitios falsos de apareamiento, la formación de estructuras secundarias entre los oligos (tallo- asa) o de apareamiento entre oligos para evaluar, al menos cualitativamente, su eficiencia durante la reacción. Aunque el análisis revela sitios de apareamiento entre oligos, y formación de estructuras tallo asa (fig 5.1) en la práctica no afectaron de manera crítica la eficiencia de amplificación.

SECUENCIA INTEGRADA:

OLIGO 1 ⇒ 5' GGCGGATCCGGNCACCCNGAGGTNTACAT 3'

OLIGO 2 ⇒ 5' GGCGAATTCACATGTGGTGNACCCANACCAT 3'

Parámetro	Sin sitio de restricción		Con sitio de restricción	
	Oligo 1	Oligo 2	Oligo 1	Oligo 2
Td	60.4	63.2	87.3	81.0
Tm	68.2	69.5	82.3	79.6
Tm	60.0	64.0	92.0	92.0
Tm durante la reacción	47.8	50.6	70.8	68.0

Tabla 5.4 Resultados del análisis con el programa OLIGO 4.03 (primer analysis software). se señalan los puntos de fusión (Tm) de los oligos, con y sin sitio de restricción

5.3.2 PCR

Una vez definida la secuencia final de los oligos se solicitó su síntesis y se procedió a optimizar la técnica de extracción de DNA. El ensayo de amplificación por PCR de un fragmento de DNA altamente conservado, permitió detectar la presencia del gen *ctaD*. La aplicación de los oligonucleótidos (Oligos 1 y 2), diseñados para hibridar con este gen, permitió amplificar fragmentos de aproximadamente 160 pb.. a partir de DNA genómico purificado de diferentes cepas del género *Bacillus*. Las figuras (5.3(c)- 5.5(c), 5.6 y 5.7 (b), 5.8 y 5.10(c) muestran los resultados correspondientes a la amplificación de este fragmento de 160 pb. Las especies para las que no fue posible la amplificación de este fragmento, fueron *B. sphaericus* y *B. aneurynoliticus* (fig. 5.5(c) y 5.10(c)).

El esquema general de los ciclos de amplificación se refiere en la tabla 4.5, algunas veces se modificó la temperatura de alineamiento, disminuyendo o aumentando la astringencia, para facilitar la posibilidad de amplificación o evitar la aparición de amplificaciones inespecíficas. Se comprobó que la temperatura óptima de alineamiento de los oligos se da a los 59 °C, el análisis en computadora sugiere 58 °C, pero aplicando una temperatura de alineamiento de 59 °C se reduce en buena medida la amplificación de productos de PCR inespecíficos.

Trabajando sobre DNA genómico de *B. sphaericus* y *B. aneurynoliticus* como molde, ningún tipo de modificación en las condiciones de la reacción y temperatura de alineamiento, permitió la amplificación de un fragmento del tamaño esperado. Otras bandas de mayor peso aparecieron cuando se redujo demasiado la astringencia, pero de ellas ninguna, por su tamaño, puede corresponder al producto de PCR esperado. En las figuras 5.9(c) y 5.10(c) se presentan los productos de PCR obtenidos para *B. brevis* y *B. aneurinoliticus*, en un proceso de amplificación relativamente laxo (57°C) para la temperatura óptima de alineamiento de los oligos (59 °C). El patrón de amplificaciones inespecíficas para ambas cepas es similar, sin embargo, es notoria la ausencia de la banda de 150 pb. en *B. aneurynoliticus*, con respecto a *B. brevis*. Esta misma situación se mantuvo aún alineando a 56 °C. El intento de amplificación sobre DNA genómico de *B. sphaericus* tuvo un resultado similar al de *B. aneurynoliticus*.

La clonación y secuenciación del producto de PCR amplificado a partir de DNA genómico de *B. thuringiensis* dio por resultado una secuencia que presenta homología con la secuencia correspondiente en *B. subtilis* (fig. 5.2).

CLUSTAL W(1.4) multiple sequence alignment

```

ctaD      CACCCGGAGGTTTATATCCTAATTTGCTGCATTCCGGTATTTTCTGA
wen10     CACCCGGAGGTTTACATT-----TTCCG-AATATCTCAGA
          ***** **                               ***** * * * * *

ctaD      GGTCAATCCCTGTGTTCCGCCAGAAAGCGTTTGTGGCTATTCTTCAATGG
wen10     AATIIIIIGCA-ACANNNNNGAAAAACGATTGTTGGTTATCCATCGATGG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ctaD      TTTTTC-CAATCGTGCT--TGGCTTCTGGGCTTTATGGTTTGGGTGCA
wen10     TGTTTGACGACTGTATTAATTGGATTTTATAGGATTTATGGTATGGGTCCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

ctaD      CCACATGTTC
wen10     CCACATGTGA
          *****

```

.....

Fig. 5.2 Comparación de las secuencia del gen para la subunidad I (cta D) en *B. subtilis* contra la secuencia del fragmento de DNA amplificado a partir de DNA genómico *B. thuringiensis* (Wen10). Los asteriscos señalan sitios de correspondencia y los guiones indican huecos o "indels" introducidos con la finalidad de optimizar el alineamiento. El alineamiento fue realizado con el uso del programa CLUSTAL W(1.4) multiple sequence alignment.

Bacillus thuringiensis

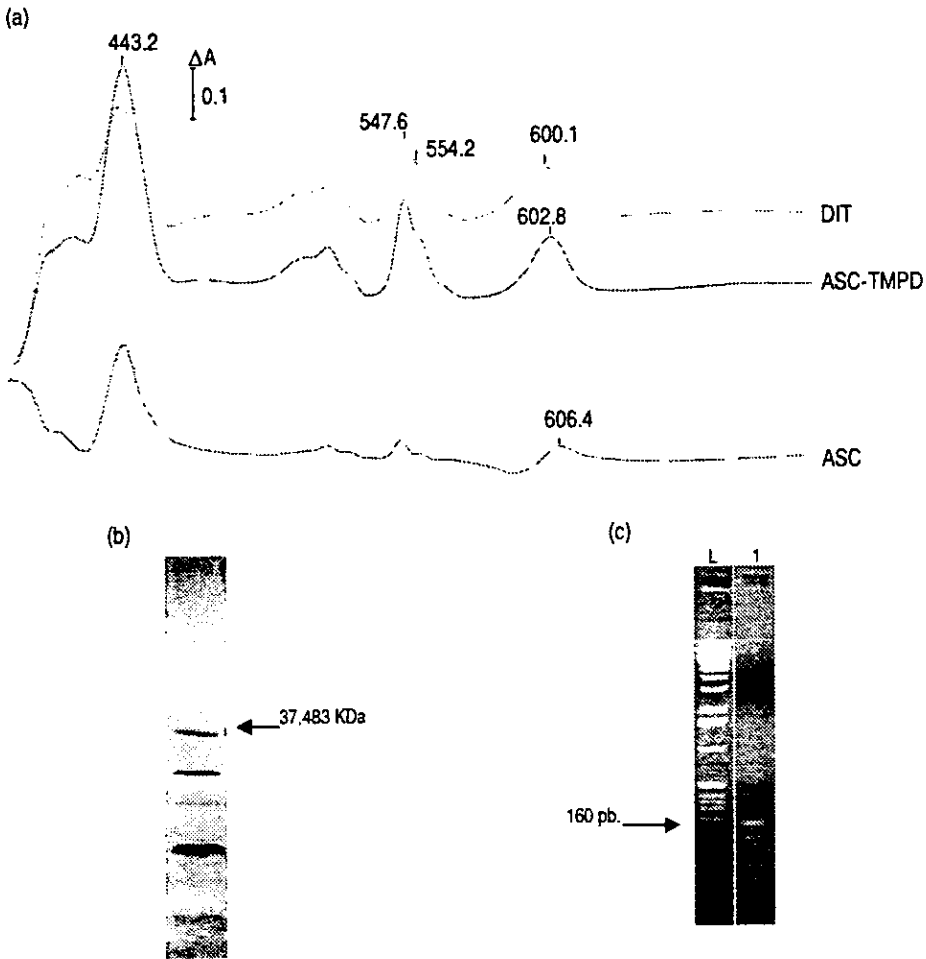


Fig. 5.3 (a) En los espectros diferenciales la reducción secuencial con ascorbato, ascorbato-TMPD y ditionita provoca un cambio hacia el ultravioleta. Este cambio sugiere la presencia de más de una isoforma de la citocromo oxidasa aa_3 en membranas de *B. thuringiensis*. El pico de absorción a 606.4 nm al reducir con ascorbato pudiera ser una señal generada por la presencia de la oxidasa caa_3 . (b) La búsqueda de subunidades proteicas con actividad peroxidasa revela la presencia de una subunidad con un peso aproximado a 37 Kda (37.483 KDa) acorde a lo reportado para la subunidad II de la oxidasa caa_3 . (c) Cam. I. marcador 1 Kb Ladder, carril 1 producto de PCR. A partir de DNA genómico de *B. thuringiensis* se amplificó un fragmento de aproximadamente 160 pb de DNA con el uso de los oligos 1 y 2. Los resultados de las tres estrategias de detección aplicadas sugieren la presencia de la oxidasa caa_3 en *B. thuringiensis*.

B. megaterium

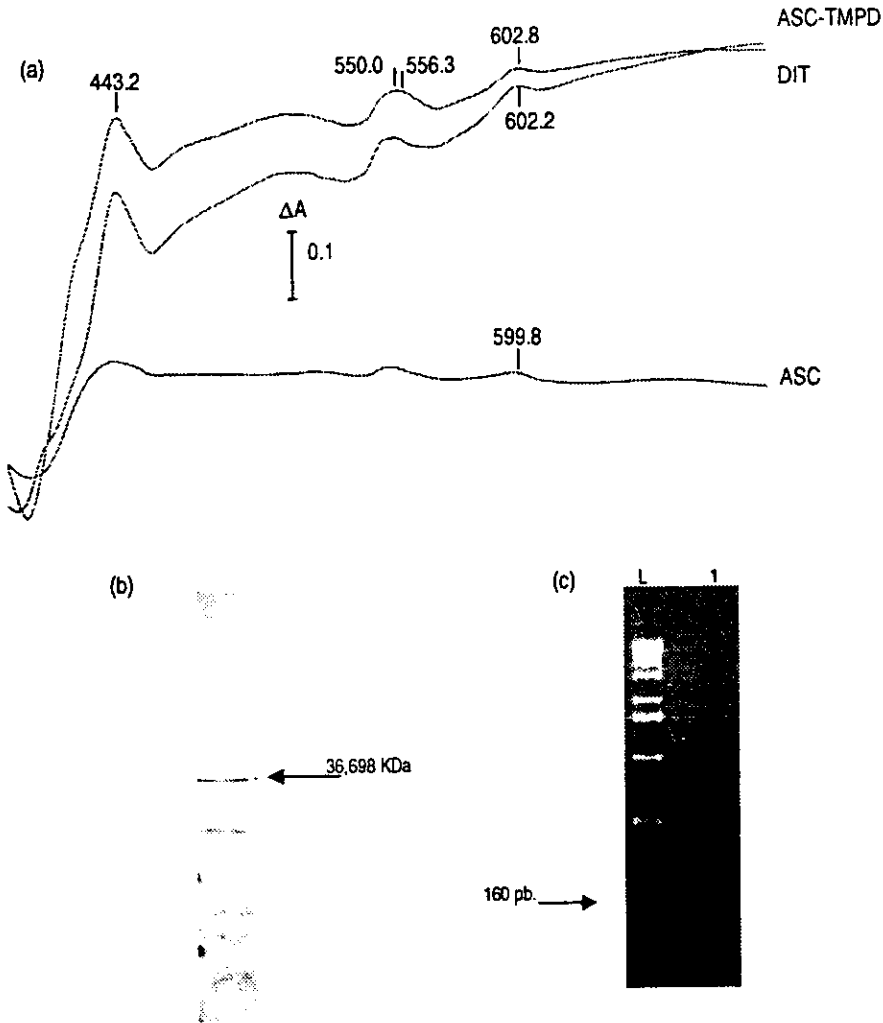


Fig. 5.4 (a) Espectros diferenciales de membranas de *B. megaterium*. La reducción secuencial con los reductores ascorbato, ascorbato -TMPD y dilionita provoca un corrimiento del pico de absorción alrededor de los 600 nm, lo cual indica la presencia de más de una isoforma de la oxidasa *caa₃*, el pico a 602.8 pudiera corresponder a la absorción generada por la presencia de la oxidasa *caa₃*. (b) El análisis electroforético (SDS/PAGE) revela una subunidad proteica con actividad peroxidasa, de un peso aproximado a los 37 KDa reportados para la subunidad II de la oxidasa *caa₃*. (c) La reacción de PCR permitió amplificar un fragmento de aproximadamente 160 pb lo que sugiere la presencia del gen *cta D* en el genoma de *B. megaterium*. Carril L: marcador 1 Kb Ladder, carril 1: producto de PCR. Los resultados de las tres pruebas de detección sugieren la presencia de la oxidasa *caa₃* en esta especie de *Bacillus*.

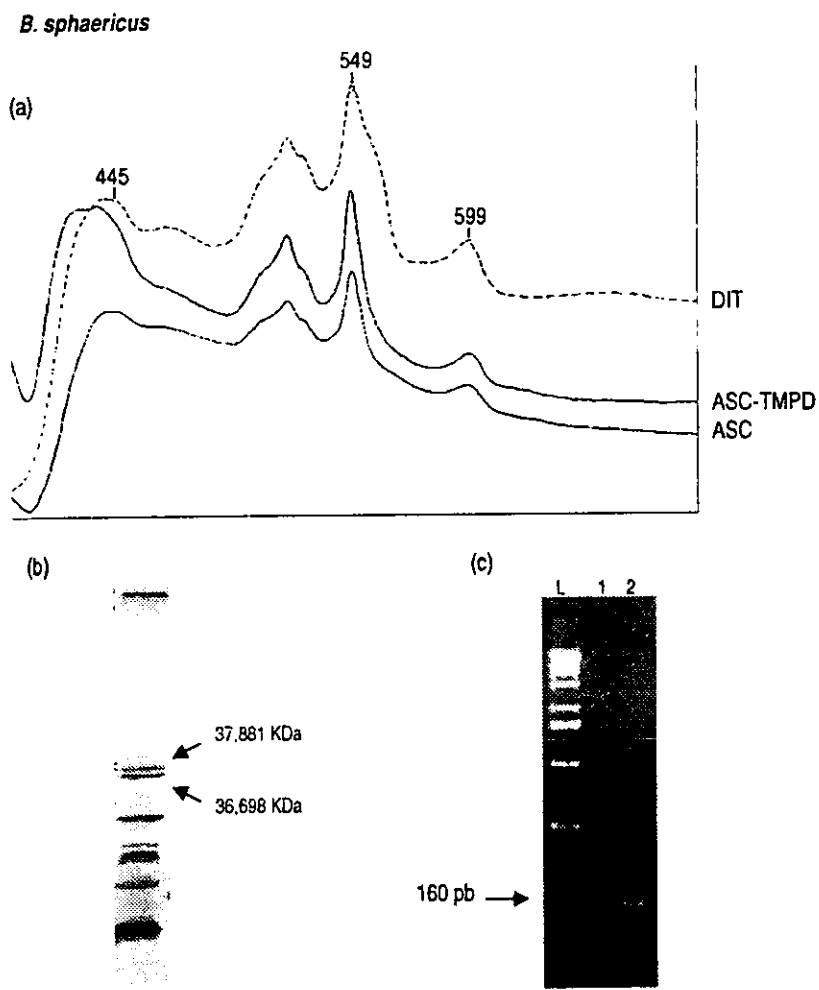
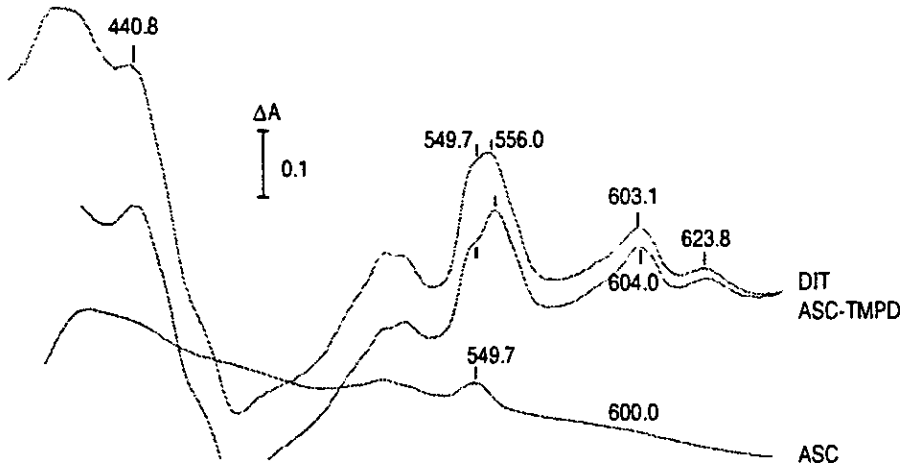


Fig. 5.5 (a) Los espectros diferenciales de membranas de *B. sphaericus* revelan picos de absorción a 599 nm, característicos de la oxidasa *aa₃* este pico se mantiene aún aplicando reductores con distinto potencial redox (ASC, ASC-TMPD y Ditionita). (b) El análisis electroforético revela un par de bandas con pesos de 36,698 y 37,881 Kda, cualquiera de estas dos bandas podría corresponder a la subunidad II de la oxidasa *caa₃* (c) El camil L corresponde al marcador 1 Kb ladder, el camil 1 al producto de PCR amplificado sobre DNA genómico de *B. sphaericus*, el camil 2 al producto de PCR amplificado sobre DNA genómico de *B. megaterium*. como puede observarse no se consiguió la amplificación de un producto cercano a los 160 pb en *B. sphaericus*. En este caso el análisis espectral y la amplificación por PCR rechazan la posibilidad de la existencia de la oxidasa *caa₃* en esta especie y el análisis electroforético no es argumento suficiente para sugerir su presencia.

B. pasteurii

(c)



(b)

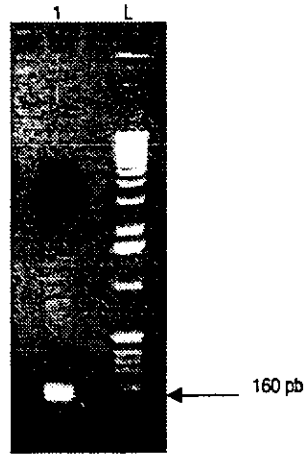


Fig. 5.6 (a). Los espectros diferenciales de membranas de *B. pasteurii* revelan la presencia de isoformas de la oxidasa aa_3 ; esto se deduce del cambio del pico de absorción alrededor de los 600 nm, provocado por la reducción secuencial con ASC, ASC-TMPD y ditionita. Es probable que el pico de absorción a 604 nm en el espectro diferencial obtenido al emplear ASC-TMPD como reductor se corresponda a la señal generada por la presencia de la oxidasa caa_3 . (b) El ensayo de PCR dio un producto de aproximadamente 160 pb (carril 1) que sugiere la presencia del gen *cta* en el genoma de *B. pasteurii* (Carril L. marcador 1 Kb ladder). El análisis espectral y la búsqueda del gen *cta* D sugieren la presencia de la oxidasa caa_3 en esta especie de *Bacillus*.

B. polymyxa

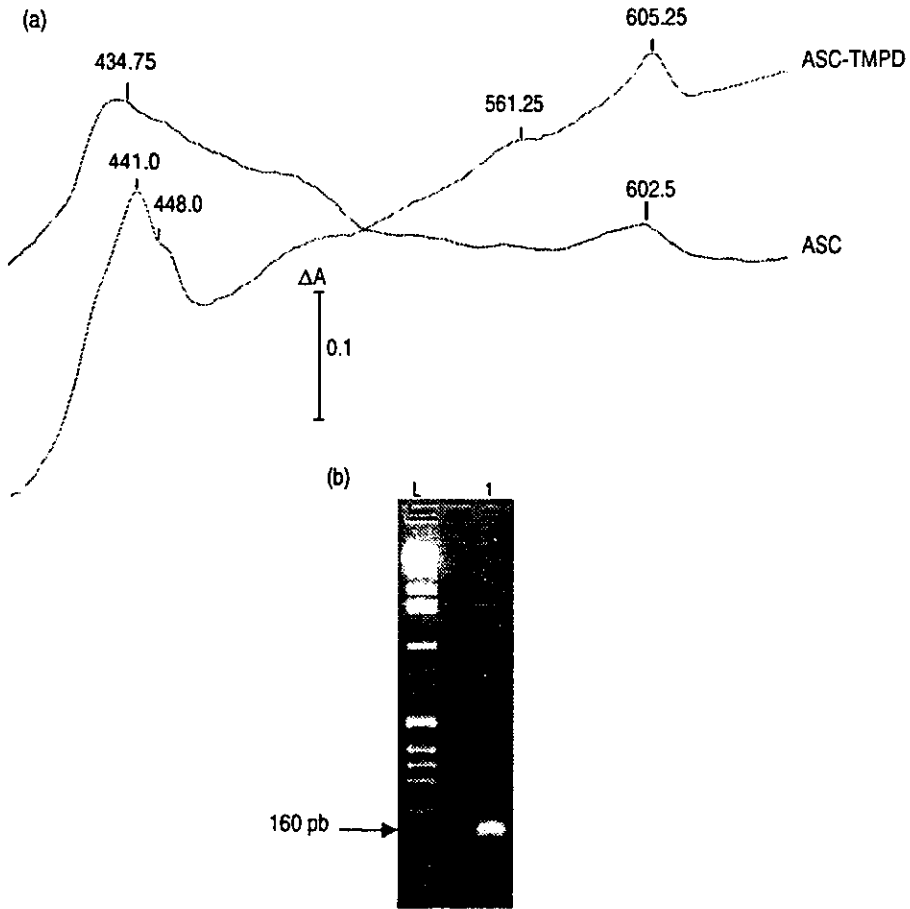


Fig. 5.7 (a) El análisis espectral de membranas celulares de *B. polymyxa* revela picos de absorción a 602.5 y 605 nm al reducir con ASC y ASC-TMPD respectivamente. esto indica la presencia de más de una isoforma de la oxidasa aa_3 en membranas de esta especie, la señal a 605 nm pudiera corresponder a la absorción generada por la presencia de la oxidasa caa_3 . No fue posible el revelado por actividad peroxidasa de subunidades proteicas presentes en membranas de *B. polymyxa*, aunque fueron digeridas y cargadas en gel junto con otras membranas que si dieron tinción específica. (b) La reacción de PCR permitió amplificar un fragmento de DNA de aproximadamente 160 pb, lo cual sugiere la presencia del gen *cta D* en el genoma de *B. polymyxa*. Carril L. marcador 1 Kb Ladder, carril 1 producto de PCR. El resultado de estas dos pruebas de detección sugieren la presencia de la oxidasa caa_3 en *B. polymyxa*.

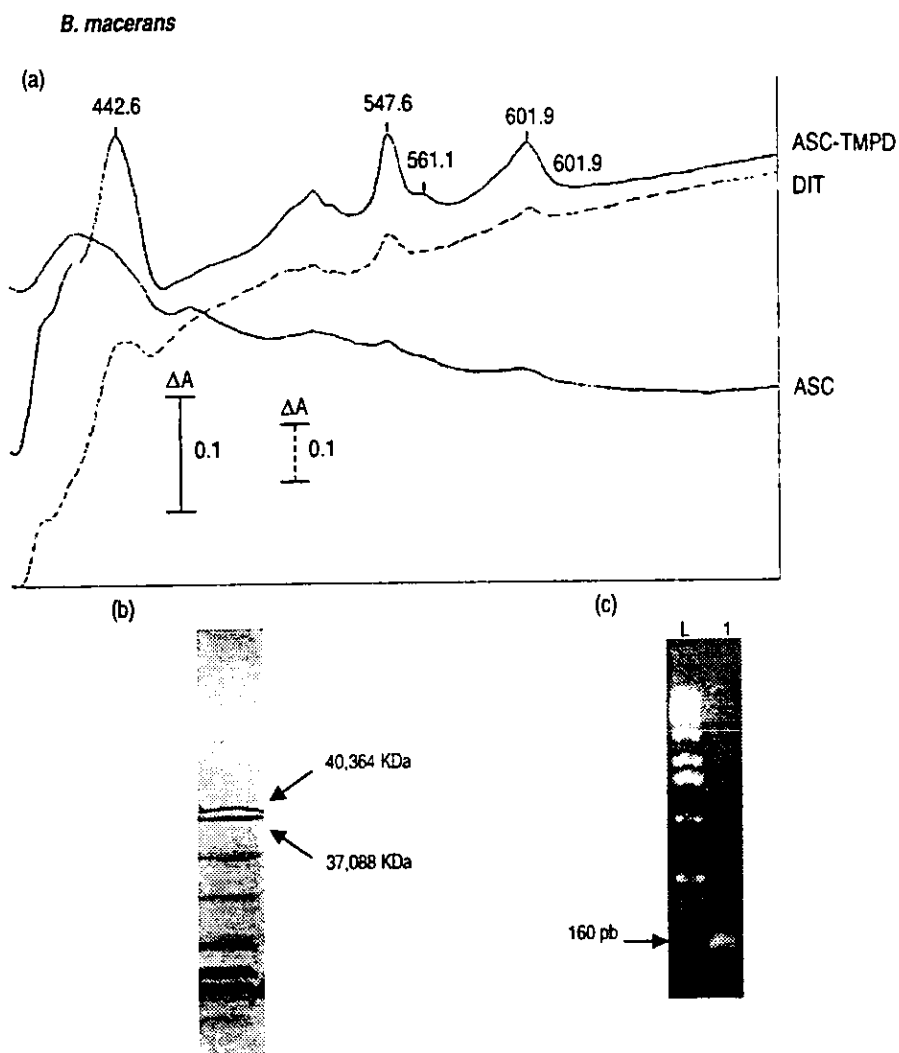


Fig. 5.8 (a) Para *B. macerans* el análisis espectral revela picos de absorción a 599.8, 601.9 y 603.1 nm en la reducción secuencial con ASC, ASC-TMPD y diuonita. El desplazamiento del pico de absorción cercano a los 600 nm sugiere la presencia de isoformas de la oxidasa *aa₃*. (b) El ensayo electroforético revela la presencia de una subunidad proteica con un peso de 37 088 Kda acorde con lo reportado para la subunidad II de esta enzima, (c) La amplificación por PCR da un producto de aproximadamente 160 pb lo que sugiere la presencia del gen *caaD* en el genoma de *B. macerans*. En conjunto estos resultados sugieren la presencia de la oxidasa *caa₃* en *B. macerans*.

B. brevis

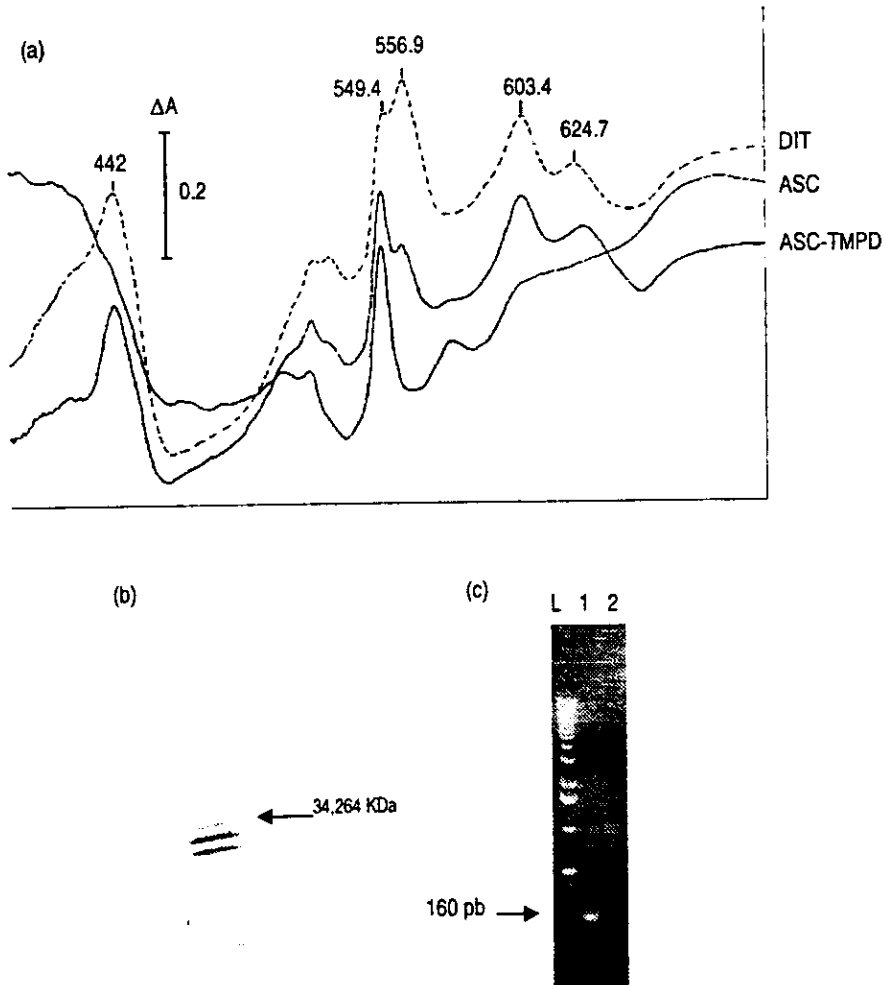


Fig. 5.9 (a) El análisis espectral muestra picos de absorción alrededor de los 603 nm con la aplicación de los reductores ASC, ASC-TMPD y ditionita (DIT), por lo que puede considerarse que existe una isoforma de la oxidasa aa_3 presente en membranas de células esporulantes de *B. brevis*. Por otro lado la reducción con ASC-TMPD y ditionita revela un pico a 624.7 nm, que sugiere la presencia de citocromo tipo d en esta especie de *Bacillus*. (b) Electroforéticamente se consiguió separar una subunidad con actividad peroxidasa y un peso de 34,264 KDa correspondiente a la subunidad II de la oxidasa caa_3 . (c) La amplificación por PCR dio un producto de aproximadamente 160 pb (carril 1), con lo que las tres estrategias de búsqueda confirman la presencia de la oxidasa caa_3 en esta especie.

B. aneurinolyticus

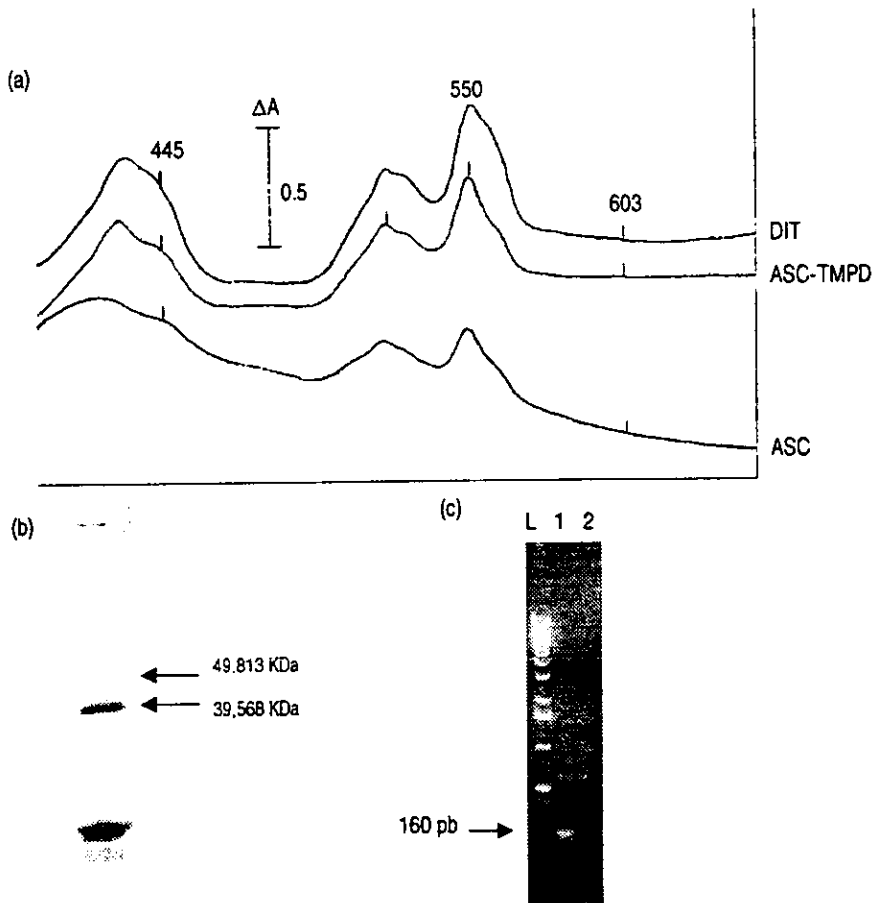


Fig. 5.10 (a) Los espectros diferenciales reducido-oxidado de membranas celulares de *B. aneurinolyticus* no presentan picos de absorción alrededor de los 600 nm lo que indica la carencia de oxidasas con hemo A. (b) La reacción peroxidasa no revela una subunidad con citocromo c, que tenga un peso aproximado a los 37 Kda. Se revelaron en este caso otras subunidades con pesos de 39,568 y 49,813 Kda, que no corresponden a lo reportado para la subunidad II de la oxidasa *caa₃*. (c) El carril L corresponde al marcador 1 Kb ladder, el carril 1 al producto de PCR amplificado sobre DNA genómico de *B. brevis*, el carril 2 al producto de PCR amplificado sobre DNA genómico de *B. aneurinolyticus*; como puede observarse no fue posible amplificar un fragmento de DNA que sugiera la presencia del gen *caa₃*. Esta evidencia permite sugerir que la citocromo oxidasa *caa₃* no está presente en esta especie de *Bacillus*.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados experimentales de esta determinación sugieren que la citocromo oxidasa *caa₃* está ampliamente distribuida dentro del género *Bacillus*. La presencia del gen que codifica para la subunidad I de esta oxidasa (cta D), y la expresión de la enzima, fueron explorados por métodos moleculares y bioquímicos, teniendo por resultado que se encuentra presente dentro de los cinco grupos genéticos propuestos por Ash *et al.* (1991).

El que esta oxidasa bacteriana se encuentre en especies de *Bacillus*, metabólicamente adaptadas a diversos ambientes, sugiere que su expresión satisface en cada una de ellas un requerimiento fisiológico aún no bien definido. A la fecha diferentes reportes documentan la expresión de la oxidasa *caa₃*, bajo distintas condiciones y estados de crecimiento, cuyo común denominador es la prevalencia de una condición de estrés metabólico. En particular existe evidencia de una elevada expresión de la enzima, y su acumulación, en membranas de células de *Bacillus*, cosechadas en etapas tempranas de esporulación (García-Horsman *et al.* 1991). La citocromo oxidasa *caa₃* puede tener una función específica en este proceso de diferenciación celular, y dado que la esporulación es una característica diagnóstica del grupo, ésta podría ser la razón que explica la amplia distribución de esta enzima entre las especies de *Bacillus*. En este trabajo no se explora esta posibilidad, sin embargo, representa un primer acercamiento en la determinación del papel funcional de la oxidasa *caa₃*, dado que apreciar su distribución permitirá inferir su importancia dentro del género. Para ello se estudiaron ocho especies de *Bacillus* distribuidas entre los cinco grupos que componen al género y se analizó la presencia y expresión de la oxidasa *caa₃* a partir de tres estrategias distintas de detección.

6.1 Los métodos de detección

Como primer paso se aplicó un análisis espectrofotométrico a membranas de células de *Bacillus*, con la finalidad de revelar los diversos componentes de sus cadenas respiratorias y entre estos componentes identificar la presencia de la oxidasa *caa₃*. Con este método es posible definir la presencia de la proteína funcional pero no informa sobre su nivel de actividad. De modo que se trata

de una detección fenotípica que depende del nivel de expresión de los genes en las condiciones de crecimiento a que se hallaban sujetas las células al momento de la cosecha.

Como ya se mencionó los picos de absorción característicos de las oxidasas aa_3 y caa_3 tienden a sobreponerse por su cercanía en la zona α alrededor de los 600 nm. La absorción a esta longitud de onda se atribuye principalmente a la presencia de hemo tipo A en ambas enzimas, la diferencia entre ellas se origina a partir de la presencia del citocromo c unido a la oxidasa caa_3 , lo que modifica sus características espectrales.

El análisis espectral de membranas celulares de las ocho especies de *Bacillus* exploradas revela picos de absorción dentro de un rango que va de los 599 a los 606.5 nm, según la especie y el agente reductor empleado (tabla 5.2). La aparición de un pico de absorción dentro de este rango indica en primer lugar la presencia del complejo citocromo aa_3 en las membranas analizadas; por otro lado, el corrimiento de este pico de absorción por la aplicación secuencial de reductores de distinto potencial redox sugiere la presencia simultánea de más de una isoforma de esta enzima.

Los picos de absorción de las oxidasas aa_3 y caa_3 en la zona α se reportan alrededor de los 601 y 603 nm respectivamente en especies de *Bacillus* como *B. subtilis* (Wachentfeldt y Hederstedt, 1990) y *B. cereus* (García-Horsman *et al*, 1991). Con la intención de diferenciar entre las señales espectrales de ambas oxidasas se redujo secuencialmente con especies químicas de distinto potencial redox, el comportamiento heterogéneo en el desplazamiento de los picos de absorción provocado por este tratamiento, entre las distintas especies de *Bacillus*, pudiera explicarse por diferencias en los potenciales redox, en los patrones de expresión y/o por diferencias en las características espectrales de un mismo tipo de oxidasa entre diferentes especies. Yaginuma *et al.* (1997) reportan picos de absorción a 603 nm para la quinol oxidasa aa_3 y a 601 nm para la citocromo oxidasa caa_3 presentes en *B. brevis*, señalando que el orden de los picos de absorción de las oxidasas tipo aa_3 en un organismo, no se determina por su tipo de sustrato. Es preciso tener en cuenta que las características espectrales de los citocromos no solo dependen del cofactor hemo que los constituye, también se definen en función del ambiente local en el sitio de unión del hemo con la apoproteína. Para el propósito de este estudio el grado de especificidad de este método de detección permitió definir la presencia de oxidasas tipo aa_3 en las especies exploradas, así como, en

la mayoría de los casos, la expresión simultánea de más de una isoforma de esta oxidasa. Por otro lado en los casos en los que se sugiere la presencia de una señal generada por la oxidasa *caa₃* también se observa que los picos de absorción debidos a citocromos tipo *c*, alrededor de los 550 nm, llegan a ser superiores que el pico de absorción debido a citocromos tipo *b*, tal como ocurre en especies termófilas de *Bacillus* (Sone *et al.*, 1983). Finalmente, la detección de la oxidasa *caa₃* por la búsqueda de su subunidad proteica II y la estrategia de detección por PCR del gen *cta D*, permiten complementar los resultados del análisis espectral y definir un resultado final para cada especie.

El criterio aplicado para la identificación de la oxidasa *caa₃* sobre geles de corrimiento electroforetico (PAGE/SDS), se fundamenta en la tinción específica y revelado de actividad peroxidasa. Las condiciones de corrimiento electroforetico fueron desnaturalizantes, los hemos tipo C unidos covalentemente a su apoproteína, son los que específicamente se revelan con esta reacción. La presencia de un polipéptido con un peso aproximado a 37.5 KDa, y que manifieste actividad peroxidasa, sugiere fuertemente que se trata del correspondiente a la subunidad II de una oxidasa tipo *caa₃*, dado que este es el peso reportado para esta subunidad en otras especies de *Bacillus*; *B. cereus* (Garcia-Horsman *et al.*, 1991) y *B. subtilis* (Wachenfeldt y Hederstedt, 1990).

Nuestros geles revelan un patrón de subunidades que en la mayoría de los casos corresponde a un patrón general que incluye básicamente a subunidades identificadas como correspondientes a la subunidad II de la oxidasa *caa₃* (≈ 37 KDa), el citocromo *bc₁* (≈ 27 KDa) y el citocromo *c* libre (≈ 14 KDa). Otras subunidades fueron reveladas, en algunos casos la identidad de estas subunidades permanece indefinida. En *B. sphaericus*, aparecen un par de bandas cercanas a los 37 KDa (36,698 y 37,881 KDa) pero no es posible definir si alguna de ellas corresponde a la subunidad II de una oxidasa *caa₃* presente en esta especie, dado que las otras dos técnicas de detección no confirman su presencia. En *B. macerans* aparece una banda de 37 KDa identificada como la subunidad II de la oxidasa *caa₃*, pero además se revela una subunidad de mayor peso (40,364 Kda) de naturaleza indefinida. En *B. aneurynoliticus* se revelan dos bandas de elevado peso molecular (39,568 y 49,813 KDa) de éstas, ninguna corresponde en peso a lo reportado para la oxidasa *caa₃* e indican la presencia de subunidades de elevado peso molecular que contienen un citocromo *c* unido covalentemente y que forman parte de componentes de la cadena respiratoria de esta especie, aún no identificados. Esta estrategia de detección reveló la presencia de subunidades

comparables a la subunidad II de la oxidasa *caa₃* en la mayoría de las especies de *Bacillus* analizadas, con excepción de *B. aneurinolyticus*. Sin embargo, su limitación consisten en que solo funciona con la expresión de la proteína. Es posible que aún contando con el gen correspondiente, el organismo en cuestión no lo exprese, al menos bajo las condiciones particulares en que se hallaba las células al momento de la cosecha. Es por esta razón que el siguiente paso en la detección de la oxidasa *caa₃* fue la identificación del gen *cta D* que codifica para su subunidad I de la oxidasa *caa₃*.

La búsqueda por PCR del gen *cta D* es quizá el método de mayor especificidad aplicado en la detección de la oxidasa *caa₃* ya que el grado de conservación de la secuencia de este gen es alto (47 %) entre las especies de *Bacillus* (Quirk et al., 1993). A pesar de que la subunidad II de la oxidasa *caa₃* es la que incluye el dominio para citocromo *c*, no se intento la detección de esta enzima a través de una sonda dirigida específicamente a la detección del gen para esta subunidad (*ctaC*) (particularmente al sitio de transición entre la secuencia homóloga a *aa₃* y la secuencia correspondiente al citocromo *c*) debido a que presenta un grado de conservación bajo (16 %) (Arredondo-Peter et al., 1993). En un intento por desarrollar oligos dirigidos a la detección de la subunidad II, se realizó en el laboratorio (Hernandez, F., 1995) el alineamiento de secuencias correspondientes a esta subunidad de varias especies bacterianas. Se obtuvo una secuencia consenso con un grado de conservación demasiado bajo (16.4 %), a partir de las zonas más conservadas dentro de esta secuencia se diseñaron dos oligos que resultaron poco funcionales e inespecíficos.

Los oligos 1 y 2, dirigidos a la amplificación de una secuencia de 160 pb dentro de la subunidad I, han confirmado su especificidad en la detección de subunidades homologas en *B. subtilis* y *B. firmus* (Lauraeus et al., 1991; Quirk et al., 1993). Por otro lado, en colaboración con un proyecto paralelo, se determinó la secuencia del fragmento de 160 pb amplificado a partir de DNA genómico de *B. thuringiensis* y se alineó contra la secuencia homóloga en el gen *cta D* de *B. subtilis*. El resultado de la comparación de ambas secuencias señala una amplia similitud y confirma la identidad de este fragmento (fig. 5.2). Los ensayos de PCR aplicados sobre DNA genómico de las distintas especies exploradas permitieron amplificar un fragmento del tamaño esperado en la mayoría de los casos, con excepción de *B. sphaericus* y *B. aneurinolyticus*.

Un paso conveniente en la continuidad de este estudio, es la determinación de la secuencia de cada uno de los fragmentos amplificados, esto permitiría, además de confirmar su identidad, realizar comparaciones entre secuencias, que nos brindarían la posibilidad de conocer algo acerca de la historia evolutiva de esta subunidad. La comparación de la genealogía del gen cta D de la oxidasa *caa₃* con la filogenia de los *Bacillus* permitiría hacer inferencias en relación con los mecanismos que operaron en la distribución de la enzima con la diversificación del género.

6.2 La oxidasa *caa₃* en los diferentes grupos de *Bacillus*.

El género *Bacillus* se compone de cinco grupos genéticos, el grupo 1 incluye las especies de *Bacillus* cuya cadena respiratoria ha sido más ampliamente caracterizada, entre estas especies se sabe que *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. firmus* cuentan con una oxidasa tipo *caa₃*, los resultados experimentales de este estudio sugieren su presencia en especies cercanas a ellas: *B. thuringiensis* y *B. megaterium*. Para el grupo 2 no existen reportes previos de la presencia de la oxidasa *caa₃*, sin embargo, el análisis espectral de membranas de *B. pasteurii* revela un corrimiento del pico de absorción cercano a los 600 nm con la aplicación de distintos reductores (tabla 5.2), esto sugiere la presencia simultánea, en membranas de esta especie, de más de una isoforma de la oxidasa *aa₃*, una de ellas pudiera ser el complejo citocromo *caa₃*. Aunque no fue posible revelar subunidades proteicas con actividad peroxidasa de esta especie, si se consiguió amplificar un fragmento de DNA de aproximadamente 160 pb. señalando la posibilidad de la existencia del gen cta D en el genoma de *B. pasteurii*. Estos resultados en conjunto sugieren la presencia de la oxidasa *caa₃* en *B. pasteurii*. No es posible llegar a la misma conclusión cuando se analizan los resultados experimentales derivados del análisis de *B. sphaericus*, debido a que la amplificación del fragmento correspondiente a la subunidad I de la oxidasa en esta especie no fue posible bajo ninguna condición. Los espectros diferenciales revelan un pico de absorción a 599 nm que no modifica su posición con la aplicación de diversos reductores, lo cual sugiere la presencia de una sola de las isoformas de la oxidasa *aa₃*, que bien pudiera ser la propia oxidasa *aa₃*. Aunque el análisis electroforético revela dos subunidades con actividad peroxidasa de un peso similar al de la subunidad II en otras especies de *Bacillus*, no es posible definir si alguna de estas subunidades pertenece a la oxidasa *caa₃*. El conjunto de estos resultados no permite definir la presencia de la

oxidasa *caa*₃ en *B. sphaericus*, sin embargo, su posible presencia en *B. pasteurii* sugiere que la enzima se encuentra dentro del grupo 2 de los *Bacillus*.

Dentro del grupo 3 tampoco existen reportes previos de la presencia de la oxidasa *caa*₃ pero este estudio sugiere su presencia en *B. macerans* y *B. polymixa*. Para estas especies se observa una señal espectral que sugiere la presencia de una isoforma de la citocromo oxidasa *aa*₃, y presentan una subunidad con actividad peroxidasa de un peso aproximado a los 37 Kda. Además de que a partir de su DNA genómico fue posible amplificar un fragmento de aproximadamente 160 pb de DNA con el uso de oligos 1 y 2 dirigidos a la detección del gen *cta D*. Para *B. brevis* dentro del grupo 4, los resultados experimentales de este estudio fueron confirmados por el reporte de la semipurificación de la oxidasa *caa*₃ a partir de membranas de *B. brevis* (Yaginuma *et al.*, 1997). Este reporte se publicó en el momento que este estudio se llevaba a cabo. Yaginuma *et al.*, (1997) reportan un peso de ≈ 34 Kda para subunidad II de la oxidasa *caa*₃, esto coincide con el resultado obtenido en esta determinación.

Dentro del grupo cinco la presencia de la oxidasa *caa*₃ está confirmada por reportes previos de su presencia y purificación en *B. stearotherophilus*. Por ello se decidió realizar su búsqueda en una especie de *Bacillus* cercana a este grupo, *B. aneurynoliticus*.

En los espectros diferenciales de membranas de *B. aneurynoliticus* se observa la ausencia de un pico de absorción alrededor de los 600 nm, lo cual sugiere que bajo las condiciones de cultivo en que fue crecida esta especie y la etapa de desarrollo en que fueron cosechadas sus células no se expresa alguna enzima o isoforma de la oxidasa *aa*₃; sin embargo, a los 445 nm se observa una señal típica de la presencia de hemo tipo A, sin embargo esta señal no tiene su replica en la zona α , alrededor de los 600 nm, por lo que no es posible definir su identidad. En el análisis electroforético las subunidades reveladas por actividad peroxidasa no incluyen alguna de un peso que sugiera la presencia de la subunidad II de la oxidasa *caa*₃. Tampoco se consiguió la amplificación por PCR del fragmento correspondiente a la subunidad I. Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que tanto la oxidasa tipo *aa*₃ y la oxidasa tipo *caa*₃ están ausentes en *B. aneurynoliticus*. Esta especie no fue incluida dentro de ninguno de los grupos filogenéticos propuestos por Ash *et al.* (1991). Shida *et al.* (1996) proponen que *B. aneurynoliticus* y *B. brevis* representan dos taxa filogenéticamente

distintos entre ellos, y también distintos a los demás miembros del género *Bacillus*, por lo que los separan, proponiendo a cada uno como un nuevo género. No existe un reporte previo que caracterice la cadena respiratoria de *B. aneurynliticus*, o acerca de su metabolismo energético, sin embargo se sabe que es una bacteria obligadamente aerobia y que esporula. Es posible que una de las subunidades pesadas reveladas por actividad peroxidasa, pertenezcan a una oxidasa alternativa que incluye un citocromo *c* y que se expresa en esporulación. El análisis de la cadena respiratoria de esta especie bajo distintas condiciones de crecimiento y estados de desarrollo parece interesante. Si el análisis filogenético separa a *B. aneurynliticus* de los demás grupos de *Bacillus*, la ausencia de la oxidasa *caa*₃ representa una evidencia fenotípica que habla de la divergencia de esta especie. Separándola tanto del grupo de *B. brevis* como del resto de los *Bacillus*.

6.3 El papel funcional de la oxidasa *caa*₃ en los *Bacillus*,

El análisis de distribución de la oxidasa *caa*₃ muestra que los cinco grupos que componen el género la presentan, sin embargo, no es posible en este momento hacer inferencias sobre la presencia de la oxidasa y su relación con el estilo de vida de los organismos que componen cada grupo, debido principalmente a la diversidad de condiciones ambientales en las que se desarrollan. La presencia de la oxidasa *caa*₃ pudiera estar asociada a otro proceso general dentro del grupo. La relación con el proceso de esporulación no es muy clara, dado que en los casos de *B. sphaericus* y *B. aneurinolitycus* no se detecta la expresión de la enzima, aun cuando el momento de cosecha fue durante las fases iniciales de esporulación. Además, el análisis de expresión de la oxidasa *caa*₃ en *B. thuringiensis*, realizado simultáneamente en el laboratorio, descarta la relación de esta oxidasa con la esporulación, sugiriendo que su expresión está regulada por un mecanismo de represión catabólica (Hernandez F. tesis de maestría). El caso de *B. aneurinolitycus* y el hecho de que la mayoría de las especies conserven esta enzima, permite sugerir que la oxidasa *caa*₃ es una enzima característica del grupo de los *Bacillus* e importante para algún proceso relacionado con este grupo bacteriano y que permanece indefinido.

La amplia distribución de la oxidasa *caa*₃ entre los *Bacillus* sugiere que el grupo de genes que participan en su expresión y regulación, estuvo presente en un posible ancestro común a las especies que conforman este grupo bacteriano, y que se conservó con su diversificación. La idea de

que estos genes pudieran aparecer de manera independiente dentro de cada uno de los cinco grupos, resulta improbable, dado que implica que eventos repetidos de duplicación y/o transferencia horizontal de genes debieron ocurrir dentro del género de manera independiente.

Castresana *et al.*, (1994) proponen que una enzima con actividad citocromo *c* oxidasa dentro del grupo de los *Bacillus* pudo originar una enzima con actividad quinol oxidasa por un evento de duplicación génica, esta enzima posteriormente se distribuiría entre los demás grupos bacterianos por procesos de transferencia horizontal de genes. Entre los *Bacillus* explorados a la fecha se revela actividad quinol oxidasa en el complejo citocromo *aa₃*, si el planteamiento de Castresana *et al.* es correcto existe la probabilidad de que un complejo citocromo *aa₃* con actividad quinol oxidasa en los *Bacillus* se haya derivado de una enzima con actividad citocromo *c* oxidasa como el complejo citocromo *caa₃*. El análisis de secuencia de las subunidades que componen estos complejos permitiría definir una respuesta en este sentido, sin embargo, el número de secuencias disponibles es bajo y son pocas las especies de *Bacillus* de las que existe una caracterización de sus cadenas respiratorias y oxidasas terminales.

Un mayor acercamiento en la determinación del papel funcional de la oxidasa *caa₃* y su historia evolutiva puede lograrse con el análisis de su expresión en especies de *Bacillus* adaptadas a cubrir los requerimientos que les imponen diversas presiones ambientales. Su búsqueda en especies de grupos bacterianos filogenéticamente relacionados, ayudaría a definir en concreto su relación con la esporulación. Por otro lado sería preciso realizar estudios cinéticos y fisiológicos de la oxidasa *caa₃* en diferentes contextos, y analizar las diferencias de árboles genealógicos, derivados de la comparación de secuencias de esta enzima, con los árboles filogenéticos obtenidos por comparación de secuencias de RNA ribosomal.

Resulta interesante definir cual es la razón de que la presencia de la oxidasa *caa₃* se manifieste como un tema común entre las especies de un grupo tan heterogéneo y diversificado como lo es el de los *Bacillus*.

Apartado 1: Citocromos y cadena respiratoria:

Los citocromos son proteínas que transfieren electrones y que poseen un hemo como grupo prostético. Su función redox está íntimamente relacionada con los cambios de valencia del hierro (revisado en Thöny-Meyer, 1997). La respiración tiene lugar en la membrana plasmática y los citocromos comúnmente están localizados en este compartimento, aunque también pueden ser solitarios y móviles al través del espacio periplasmático, donde su función transferidora de electrones se complementa con la de otros citocromos unidos a la membrana. En muchos casos los citocromos están ensamblados en complejos enzimáticos multisubunidades que pueden contener cofactores no hemo adicionales.

La química de los grupos hemo contribuye a las propiedades específicas de los diferentes citocromos, la estructura básica de este grupo prostético es la de un anillo de protoporfirina con un átomo de hierro que oscila entre el estado reducido Fe^{2+} y el estado oxidado Fe^{3+} . Las modificaciones a la periferia del anillo en las posiciones C_2 , C_4 , C_5 , y C_8 definen la naturaleza química y permiten clasificar al hemo en varios tipos (fig 2.8).

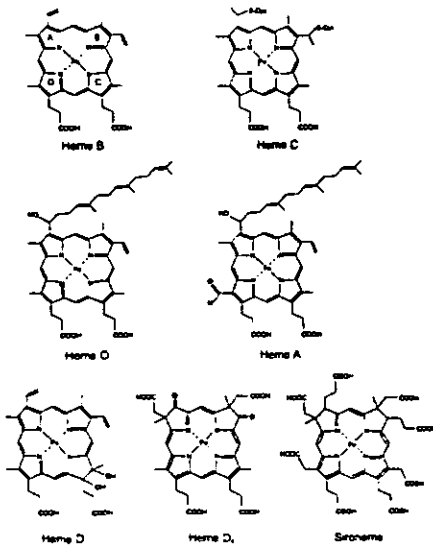


Fig. 2.8 Los hemos tipo A y O contienen una cadena lateral con un grupo hidroxiétil farnesil en la posición C_2 , la diferencia entre estos dos tipos de hemo estriba en la presencia de un grupo formil adicional en el hemo tipo A en la posición C_3 . El grupo prostético de los citocromos tipo *b* y *c* es el protohemo IX, el hemo B contiene un grupo vinil en la posición C_2 y un metil en la posición C_8 . El hemo O es esencialmente un hemo tipo B en el que el grupo vinil en C_2 se substituye por la cadena hidroxiétil farnesil, lo que indica que el Hemo tipo O es un intermediario en la síntesis del hemo tipo B (Svensson *et al.*, 1993). El hemo C, o mesohemo, está unido covalentemente a la apoproteína por dos puentes tioeter entre su cadena lateral vinil y las cadenas laterales de dos residuos de cisteína conservados en la apoproteína. El hemo tipo D es una dihidroporfirina, donde los anillos de C del tetraprol están saturados (Jones 1975).

Los citocromos se clasifican de acuerdo al tipo de hemo que contienen. Los del tipo-*a* presentan un hemo tipo A, e incluyen a las citocromo oxidasas del tipo *a₁* y *aa₃*, los del tipo-*b* incluyen varios citocromos *b*, a la citocromo oxidasa *o*, y a los citocromos *P-450* y *P-460*, en los cuales hay un grupo hemo B. Los citocromos del grupo *b* participan en cadenas respiratorias aerobias y anaerobias. En los citocromos del tipo-*c* se encuentra un hemo tipo C o mesohemo; el cual se une covalentemente a la apoproteína por medio de dos puentes tioeter en las posiciones *C₂* y *C₄*. Este grupo incluye a los citocromos del tipo *c*, *c₂*, *c₃*, *c₄*, *c'*, *c₅₅₀*, *c₅₅₁* y *c₅₅₅*. Los citocromos del tipo-*d* contienen un hemo tipo D (dihidroporfirina), y agrupan a la citocromo oxidasa *d* y al citocromo *cd₁*.

La cadena respiratoria:

En el metabolismo aerobio la ruta que va del NADH al oxígeno incluye tres grandes complejos enzimáticos unidos a la membrana, cada uno de estos complejos actúa como bomba de protones impulsada por la transferencia de electrones (fig. 5.9)

- El complejo NADH deshidrogenasa, es el complejo de mayor tamaño, acepta electrones del NADH a través del grupo prostético flavin mononucleotido (FMN) quien reduce al primero de un conjunto de al menos cinco centros hierro-azufre por los que circulan los electrones hasta la quinona.

La quinona es un acarreador de electrones no proteico de gran movilidad dentro de la membrana, y que toma temporalmente un protón del medio por cada electrón que acarrea. La quinona puede mantenerse en dos estados de reducción intermedios, la forma semiquinona con un solo electrón (QH1), y el ubiquinol (QH2). Los electrones que reducen a la quinona también pueden provenir del FADH₂; la Succinato deshidrogenasa cataliza la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona, por lo cual el succinato es oxidado a fumarato. Así, esta enzima cataliza una reacción del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La Succinato deshidrogenasa es una enzima del complejo succinato Q reductasa.

- Desde el quinol fluyen los electrones al siguiente complejo enzimático respiratorio, el complejo citocromo *bc₁* o citocromo reductasa (por analogía a la cadena respiratoria mitocondrial es llamado complejo III). La citocromo reductasa es un acarreador redox central en muchas

cadenas respiratorias bacterianas, es una enzima compuesta por tres subunidades proteicas con cuatro centros redox, dos de estas subunidades son citocromos, el citocromo *b* y el citocromo *c*. la subunidad restante es una proteina hierro-azufre (Fe-S). juntas conforman la unidad catalítica mínima, complementada por otras cadenas polipeptídicas, que sin participar en la catálisis son importantes para el arreglo y estabilidad del complejo. Este complejo oxida quinoles y reduce acarreadores electrónicos metalo-proteicos, comúnmente citocromos tipo *c*. Al mismo tiempo, dirige la traslocación vectorial de protones contribuyendo a la generación del gradiente electroquímico a través de la membrana (revisado en Thöny-Meyer, 1997).

El ubiquinol (QH₂) reduce con uno de sus electrones a la proteína Fe-S del complejo, ésta a su vez lo transfiere a una molécula de citocromo *c* libre. El ubiquinol entonces adopta la forma semiquinona (QH₁), reducida por una sola carga electrónica. La restitución del ubiquinol se da a través del citocromo *b*, a partir de dos semiquinonas. Este proceso cierra el ciclo de la quinona.

- El tercer complejo participante es el complejo citocromo *c* oxidasa, quien acepta electrones del citocromo *c* libre y los transfiere hacia el oxígeno molecular O₂ con la consecuente formación de 2 moléculas de H₂O. Esta reacción es el último punto acoplado a la translocación de protones en la cadena respiratoria. Las citocromo *c* oxidasas pertenecen a la familia de oxidasas hemo-cobre debido a que ellas contienen hemo y cobre como cofactores (revisado en Thöny-Meyer, 1997).

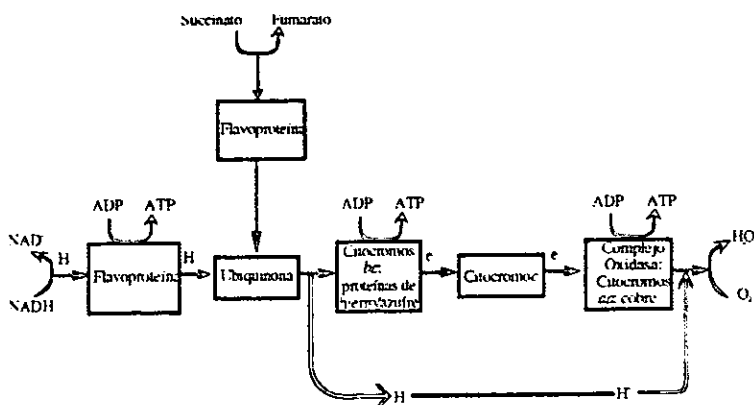


Fig. 5.9 Esquema general de la cadena respiratoria

Los citocromos, los centros hierro-azufre y los átomos de cobre pueden acarrear solo un electrón a la vez, no obstante, cada NADH dona dos electrones, y cada molécula de O₂ debe recibir cuatro electrones para producir agua. Hay muchos puntos de recolección y dispersión de electrones a lo largo de la cadena respiratoria donde estos cambios en número de electrones son ajustados.

Aunque la función primaria del sistema respiratorio es la generación de una fuerza proton-motriz que es utilizada para la síntesis de ATP, también tiene otras funciones esenciales:

- Regeneración del NAD⁺ a partir de NADH y al mismo tiempo la reducción del exceso de equivalentes reductores.
- Bajo ciertas condiciones de crecimiento el sistema respiratorio aerobio puede ser importante para reducir la concentración intracelular de oxígeno con lo que se protege de daño a enzimas sensitivas a O₂, como la nitrogenasa que fija nitrógeno molecular en bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium sp.* En casos como este la tasa de respiración puede ser de mayor importancia para la sobrevivencia que la eficiencia de la maquinaria de translocación de protones.

Apartado 2: Oxidasas y cadenas respiratorias bacterianas:

Como ya se mencionó los sistemas respiratorios bacterianos pueden ser considerablemente más complejos que los mitocondriales, ya que en los primeros la cadena de transporte de electrones puede ramificarse a distintas oxidasas terminales. Además, las bacterias pueden utilizar un gran número de aceptores alternos distintos del oxígeno, como son el nitrato, nitrito, sulfato, y fumarato; mientras que en la mitocondria el aceptor final exclusivo es el oxígeno. La cantidad específica de cada oxidasa presente en la membrana de una célula bacteriana, en un momento dado, está determinada directamente por las condiciones o estadio de crecimiento.

Algunas oxidasas terminales reciben electrones del citocromo *c* y se les denomina citocromo *c* oxidasas, mientras que otras los reciben de grupos quinol y son quinol oxidasas. En organismos procariontes existe una ruta alternativa en el transporte de electrones del quinol al oxígeno. Esta ruta prescinde del paso de los electrones a través del complejo citocromo *bc₁*. Las quinol oxidasas aceptan directamente los electrones del quinol y los usan en la reducción del oxígeno molecular. Esta ruta es sin embargo menos eficiente en la producción de energía, debido a que el acortamiento de la cadena propicia que el complejo quinol oxidasa sea el único sitio de translocación de protones. a diferencia de la vía *bc₁-c-aa₃*, en la que hay dos sitios de translocación acoplados.

Las secuencias de aminoácidos de citocromo *c* oxidasas y una subclase de quinol oxidasas son homólogas (Chepuri *et al.*, 1990). por lo tanto son agrupadas juntas en la misma superfamilia de "citocromo oxidasas" (Saraste, 1990; Saraste *et al.* 1991a). En eubacterias existe otra subclase de quinol oxidasas que no tiene homología con esta familia, el complejo citocromo *bd*, presente en *Escherichia coli* (Green *et al.*, 1988) y *Azotobacter vinelandii* (Moshiri *et al.*, 1991).

Los miembros de la familia de citocromo oxidasas son complejos multisubunidades unidos a la membrana celular. Las enzimas eubacterianas son las mejor conocidas y consisten de tres subunidades principales:

Subunidad I (Cox 1): Es la subunidad de mayor tamaño, en una citocromo *c* oxidasa típica. Cox 1 consiste de 12 posibles hélices transmembranales. La reducción del oxígeno tiene lugar en un centro bimetalico compuesto de un hemo de alto spin y un sitio de cobre (Cu₂). Este sitio activo se une a Cox 1 por cuatro histidinas. Cox 1 tiene otro centro hemo de bajo spin, involucrado en la transferencia intramolecular del electrón, este centro está coordinado a dos histidinas. Es esta subunidad la que cuenta con el canal conductor que posibilita el bombeo de protones que contribuye a la generación del gradiente electroquímico. Los tipos de hemo presentes en Cox 1 puede diferir entre distintas especies. Los hemos A, B, O y D pueden encontrarse en distintas combinaciones en cualquiera de los sitios, el de bajo o el de alto spin, aún entre enzimas con secuencias muy similares. Esta subunidad se caracteriza por poseer una alta similitud de secuencia entre los miembros de la superfamilia de oxidasas. Las 6 histidinas que unen los centros redox están completamente conservadas en todas las secuencias disponibles y son altamente diagnósticas de la familia. En la quinol oxidasa de *E. coli*, el centro bimetalico contiene un hemo O y el otro centro redox es un hemo B.

Subunidad II (cox 2): está anclada a la membrana por dos posibles hélices transmembranales. Contiene una región hidrofílica expuesta, que en el caso de las citocromo *c* oxidasas, se piensa que es el sitio de interacción con el citocromo *c*. Un centro redox Cu₂ está localizado en un dominio cupredoxin y está involucrado en la transferencia de electrones al sitio bimetalico activo de Cox 1 (Adman, 1991; Van der Oost et al., 1992). Dos cisteínas, dos histidinas y una metionina son los ligandos de este centro cobre (Kelly et al., 1993). Cuatro de estos aminoácidos están ausentes en las quinol oxidasas, lo que se correlaciona con la carencia en estas enzimas del centro Cu₂. La comparación de la secuencia de esta subunidad en distintas especies muestra que la proteína tiene un nivel de conservación menor al 16% (Arredondo-Peter et al., 1991). Su papel es proveer a la enzima del sitio de unión al sustrato, el citocromo *c*.

Subunidad III (Cox 3): En la citocromo *c* oxidasa de *P. denitrificans* esta subunidad presenta 7 posibles hélices transmembranales, pero este número puede ser inferior en otras oxidasas. Su función aún no se conoce con exactitud pero se propone que tenga un papel en el ensamblaje del complejo (Haltia et al., 1991) (revisado en Castresana et al., 1994).

La oxidasa de eucariontes puede constituirse hasta de 15 subunidades, tres de estas subunidades son homólogas a sus contrapartes eubacterianas. constituyen el grupo catalítico y son codificadas por el DNA mitocondrial. El resto de las subunidades son nuclearmente codificadas y pueden tener una función reguladora o estructural (Kadenbach *et al.*, 1991).

Entre las múltiples oxidasas que presentan las bacterias se encuentran las de los tipos *aas*, *caas*, *d*, *o*, *bb*, *cbb*, etc... las cuales difieren en su afinidad por el oxígeno y su sensibilidad al cianuro (Escamilla, 1987). Además, las oxidasas terminales de bacterias pueden ser quinol oxidasas (presentes solo en bacterias), o citocromo *c* oxidasas.

A continuación se presentan algunos ejemplos que ilustran claramente la diversidad y la complejidad de composición que puede encontrarse en cadenas respiratorias bacterianas.

Escherichia coli, tiene la capacidad de expresar dos diferentes oxidasas terminales en su cadena respiratoria, el citocromo *bd* y el citocromo *bo*, ambas enzimas son quinol oxidasas. La expresión de una u otra oxidasa esta en función de la tensión de oxígeno imperante en el medio en el que la bacteria crece. El citocromo *bd* tiene una afinidad por oxígeno superior a la del citocromo *bo* y se induce su expresión cuando la tensión de oxígeno en el medio es baja, es decir en condiciones microaerofilicas. La oxidasa *bo* se expresa, por el contrario, en condiciones aeróbicas, es decir, cuando la tensión de oxígeno es alta.

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria que puede crecer aeróbica, anaeróbica o fotosintéticamente. Tiene la capacidad de expresar tres distintas citocromo oxidasas en su cadena respiratoria. Dos de estas oxidasas utilizan ferrocitocromo *c* como sustrato y una de ellas utiliza el quinol como sustrato (Hosler *et al.*, 1992; Garcia-Horsman *et al.*, 1994). La citocromo oxidasa *aa₃* es predominante cuando la bacteria se crece en altas tensiones de oxígeno (Hosler *et al.*, 1992) y la citocromo oxidasa *cbb* se expresa en condiciones microaerofilicas y fotosintéticas (Garcia-Horsman *et al.*, 1994). Ambas enzimas son citocromo *c* oxidasas. La oxidasa *bb* es una quinol oxidasa y se presenta en condiciones donde se ha perdido el complejo *bc*. obteniendose bajo estas condiciones suficiente energia de la cadena respiratoria para sostener el crecimiento aeróbico (Yun *et al.*, 1990). Este esquema básico se encuentra en otras especies bacterianas como *Bradyrhizobium japonicum*

(Bott *et al.*, 1992); *Rhodobacter capsulatus*, que no presenta citocromo oxidasa aa_3 pero si contiene las oxidasas bb y cbb (Gray *et al.*, 1994).

Raitio *et al.* (1990) reportan que el genoma de *Paracoccus denitrificans* contiene un segundo locus que codifica para la subunidad I (Cox I) del citocromo aa_3 . La similitud entre los dos genes para Cox I (ctaDI y ctaDII), y el hecho de que el nivel de citocromo aa_3 funcional, expresado después de la delección de ctaDI, es inalterado, llevan a estos autores a sugerir la existencia de isoenzimas de citocromo aa_3 en *P. denitrificans*. *Paracoccus denitrificans* presenta un patrón de expresión similar al de *Rhodobacter sphaeroides*, sin embargo, en esta especie la quinol oxidasa es del tipo ba (Ludwig, 1992). Cuando *Paracoccus denitrificans* se crece en presencia de alta tensión de oxígeno expresa una cadena respiratoria muy similar a la mitocondrial. A pesar de la simplicidad estructural de la enzima de *Paracoccus*, se le relaciona funcionalmente con la enzima mitocondrial, tanto en sus propiedades oxidativas como en la translocación de protones. Se piensa que este organismo puede estar estrechamente relacionado con el posible ancestro de la mitocondria (John, 1987).

Los citocromos c se encuentran en casi todos los géneros bacterianos, con la excepción de algunas especies como *Pseudomonas syringae*, y *Salmonella sp.*, que al parecer transfieren los electrones directamente del sistema quinona-citocromo b hacia la citocromo oxidasa. Bajo condiciones aeróbicas las cadenas respiratorias de las bacterias quimioheterótrofas, quimiolitótroficas y fototróficas facultativas, contienen varios citocromos b , dos o más citocromos c y por lo menos una citocromo oxidasa.

VII. REFERENCIAS

- Anraku, Y. (1998) "Bacterial electron transport chains" *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 101-132
- Arredondo-Peter, R. Helman-Meneguzzi, F., Hernández, F. y Escamilla, J.E. (1993). Computer analysis and modelling of consensus sequence of bacterial cytochrome oxidase subunit II. *Rev Lab Microbiol.* **35** (44): 423-432.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Walbanks, S. & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Leet. Appl. Microbiol.* **13**, 202-206.
- Babcock, G.T. y Wikström M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**(26): 301-309.
- Capaldi, R. A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev. Biochem.* **59**, 569-596.
- Carls, R.A., and Hanson, R.S. (1971). Isolation and Characterization of tricarboxylic acid cycle mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **106** (3): 848-852.
- Castresana, J., Lübben., M., Saraste, M. Y Higgins D.G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J.* **13** (11): 2516-2525.
- De Vrig, W. y Konings, W.N. (1987). Kinetic characterization of cytochrome c oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem* **166**, 581-587.
- Del-Arenal, P., Contreras, M.L., Svlateorova, B.B., Rangel, P., Lledias, F., Dávila, J. R. y Escamilla, J. E. (1997). Haem O and putative cytochrome bo in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. *Arch Microbiol* **167**, 24-31.
- Doi, R.H. (1989). Sporulation and germination. Capítulo 8 en *Biothechnology Handbooks.2 "Bacillus"* editado por Colin R. Harwood. Plenum Press USA.
- Errington, J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 1-33.
- Escamilla, E., Contreras, M.L., Ramirez, L. y Linares, V. (1985). Organización, regulación y evolución del sistema respiratorio bacteriano. En *Mensaje Bioquímico Vol. VIII*, Alvarez, G. LL., *et al.* ed. UNAM. Mex.
- Escamilla, J. E., Ramirez, R., Del-Arenal, P. y Aranda, A. (1986). Respiratory systems of the *Bacillus cereus* mother cell and forespore *J Bacteriol.* **167** (2), 544-550.
- Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B. y Escamilla, J. E. (1991). Two different aa₃-type cytochrome can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* **199**, 761-768.

Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. Y Gennis, R. (1994). The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* **176** (18): 5587-5600.

Hanson, R.S., Srinivasan, V.R. y Halvorson, O. (1963). Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. *J. Bacteriol* **85**, 851-860.

Hernández S.F. (1999). Análisis genético de la citocromo oxidasa *caa₃* de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández, S.F. (1994). Construcción y análisis de una secuencia consenso para la citocromo oxidasa *caa₃*, y la búsqueda de su gen (cta D) en *Bacillus cereus*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.

Jones, C. W. & Poole, R. K. (1985). The analysis de Cytochromes. *Methods in Microbiology*. Vol. **18**, 285-293.

Lauraes, M., Haltia, T., Saraste, M. y Wikstrom, M. (1991). *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem-A-containing terminal oxidases⁻ *Eur J Biochem* **197**, 699-705.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., y Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. Cold Spring Harbor

Mather, W., Springer, P., Fee J. A. (1991). Cytochrome oxidase genes from *Thermus thermophilus* *J. Biol. Chem.* **266**(8): 5025-5035.

Nihashi, J., y Fujita, Y., 1984 Catabolite repression of inositol dehydrogenase and gluconate kinase synthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **798**, 88-95.

Poole, R.K. (1983). Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 205-243.

Quirk, P.G., Hicks, D. B. y Krulwich, T.A. (1993). Cloning of the cta operon from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 and characterization of the pH-regulated cytochrome *caa₃* oxidase it codes. *J Biol Chem* **268**(1): 678-685.

Ratio, M., Jalli, T. y Saraste, M. (1987) Isolation and analysis of the genes for cytochrome c-oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *EMBO J.* **6**, 2825-2833.

Sanger, F., Nicklen, S. Y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Santana. M. Kunst, F., Françoise, H., Rappaport, G., Danchin, A., y Glase, P. (1992) Molecular cloning, sequencing and physiological characterization of the COX operon from *Bacillus subtilis* encoding the aa₃ 600 quinol oxidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 10225-10231.

Saraste, M. (1990) Structure feature of cytochrome oxidase. *Q. Rev. Biophysica.* **23**, 3331-3336

Saraste, M., Metso, T., Nakari, T., Lauraeus, M., y Van Der Oost, J. (1991). The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme. *Eur. J. Biochem.* **195**, 517-525.

Sauer, U., Santangelo, J.D., Treuner, A., Buchholz, M., Dürre, P. (1995) Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 331-340.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., y Komagat., K. (1996). Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. Nov. y *Aneurinibacillus* gen. Nov. *Int. J. Systemat. Bacteriol.* **46**(4): 939-946.

Sone, N. (1986). *Methods Enzymol.* **126**, 145-153.

Sone, N., Shimada, S., Ohmiri, T., Souma, Y., Gonda, M., y Ishizuka, M. (1990). *FEBS Lett.* **262**, 249-252.

Sone, N., Yokoy, F., Fu, T., Otha, S., Metso, T., Raitio, M. Y Saraste, M. (1988). Nucleotide sequence of the gene coding for cytochrome oxidase subunit I from the thermophilic bacterium PS3. *J Biol Chem* **103**, 606-610.

Svensson, B., Mathias, L., and Hederstedt, I. (1993). *Bacillus subtilis* Cta A y Cta B function in haem A biosynthesis. *Mol microbiol* **10**(1): 193-199.

Thony-Meyer, L. (1997). Biogenesis of Respiratory Cytochromes in Bacteria. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **61**(3):337-376.

Wachentfeldt, C. y Hederstedt, L. (1993). Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes. *FEMS Microbiol lett* **100**, 91-100.

Yaginuma, A., Tsukita, S., Sakamoto, J. y Sone, N. (1997). Characterization of two terminal oxidases in *Bacillus brevis* and efficiency of energy conservation of the respiratory chain. *J biochem.* **122**, 969-976.

Yoshida, T., y Fee, J.S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1031-1036.