

00322
45



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CRECIMIENTO Y EXPRESION DEL SISTEMA
RESPIRATORIO DE *Acetobacter diazotrophicus* EN
ETANOL COMO UNICA FUENTE DE CARBONO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

MIGUEL ANGEL DOMINGUEZ PEREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

CODIRECTOR:

DR. MARCOS FLORES ENCARNACION



2003

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO DE *Acetobacter
diazotrophicus* EN ETANOL COMO UNICA FUENTE DE CARBONO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

Miguel Ángel Domínguez Pérez.

Director de Tesis:

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Codirector:

Dr. Marcos Flores Encarnación

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente


Comunicamos a Usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Crecimiento y expresión del sistema respiratorio de Acetobacter diazotrophicus en etanol como única fuente de carbono", realizado por Miguel Ángel Domínguez Pérez con número de cuenta 7406753-4

quién cubrió los créditos de la carrera de BIÓLOGO


Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

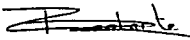
Atentamente

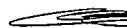
Director de Tesis

Propietario Dr. José Edgardo Escamilla Marván 

Coodirector
 Propietario Dr. Marcos Flores Encarnación 

Propietario Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella 

Suplente Biol. Beatriz Rodarte Murguía 

Suplente Biol. Sara Teresa Méndez Cruz 

Consejo Departamental de Biología


 M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHÁVEZ



A MIS PADRES

MANUELA PEREZ IBARRA Y
MIGUEL DOMÍNGUEZ VERA.

A LA MEMORIA DE MIS PADRINOS

ARTURO CAMPOAMOR CANCINO Y
MARIA LUISA ROLDAN VDA. DE
CAMPOAMOR.

A MIS HERMANOS
AMPARO Y ENRIQUE

A MI HIJAS
ETNA ARIADNA
CINTHIA GUADALUPE

A MIS SOBRINOS
PEPE, ANA Y MICHELL

AGRADECIMIENTOS:

Mi más sincero agradecimiento al Dr. José Edgardo Escamilla Marván por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. una pequeña parte de la bioquímica bacteriana, por aprender a manejar equipo para este fin y por la asesoría y paciencia obtenida durante la realización de esta tesis.

Agradezco también a la Dra. Patricia Del Arenal del depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de U.N.A.M.

Al Dr. Marcos Flores Encarnación por su valiosa ayuda en la asesoría y apoyo técnico en la utilización de los aparatos y equipo (oxímetro, espectrofotómetros, potenciómetro, fermentadores, etc). usados durante la realización de la tesis, especialmente por sus contribuir con sus muy valiosos conocimientos del tema y su codirección en la tesis.

A la Dra. Martha L. Contreras Zentella por su valiosa colaboración en la asesoría técnica y académica, así como en la revisión de la tesis y en la preparación de la presentación.

Al Ing. en Biotec. Juan L. Chávez Pacheco y a la QFB Suri Karina Martínez Yee, por la asesoría técnica y académica y por su gran ayuda en la elaboración de las diapositivas y en la preparación de la presentación.

A mi esposa Teresa por su apoyo

A mis compañeros y amigos del laboratorio 101 ote. del I.F.C. por que siempre hubo momentos en los que contaba con su apoyo, tiempo y asesoría en cualquier momento. A todos, tanto los arriba mencionados como a los de abajo muchas gracias por brindarme también algo importante que hay en la vida: su amistad.

Abigail	Lucha	Saúl
Bernardo	Martin	Tete
Bety	Marcela	Vero
Héctor	Paty	
Jorge	Rodrigo	

Al compañero Juan Méndez, muchas gracias por su apoyo en el laboratorio.

Un agradecimiento muy especial a mis amigos (as) y compañeros (as) trabajadores del departamento de Biología de la Facultad de Ciencias en los que siempre hubo momentos de apoyo en los laboratorios, desde el préstamo de una simple pipeta Pasteur o aguja de disección hasta un microscopio óptico o de campo claro. De igual manera, muchas gracias por su amistad. A todos ustedes muchas gracias, al igual que muchos no aparecen abajo y que no los olvido y que en algún momento conté con su apoyo.

Adolfo Pérez Gallardo
Alejandro Pérez Reyes
Benjamín Tirado
Braulio Magaña (Almacén)
Carmen Sánchez Rocha
Enrique Flores Balanzario
Felipe De Jesús López Solórzano
Flórida Cid (Biblioteca)
Guadalupe Sánchez Rocha
Javier Terán Castillo
Jesus García Escalona
Jesús García Sifuentes
Jorge Best Guzmán
Jorge Godínez García
Jorge Abel Aguilar
José Antonio González Resendiz (Biblioteca)
José Lucio Quintana Hernández
José Pérez Paz (Biblioteca)
Juan Monroy Fernández (Biblioteca)
Juan Aguilar Espinosa (Física)
Manuel Pérez Cornejo
Martín Espíndola
Miguel Martínez García
Paula Martínez García
Paulino Rojas Mendoza
Rafael Mejía Rivera (Biblioteca)
Reynaldo Hernández Aguilar
Rosa Elena Quintana
Rosario Arias Luna
Salomón López Noriega
Salvador Hernández Aguilar
Silvia Velasco Gutierrez (Ventanillas)
Susana Hernández Alvarez (Ventanillas)
Tomas Olvera (Almacén)
Victor Yáñez Calderón
Virgilio Santiago Gómez

Muchas gracias a la U.N.A.M. por brindarme la oportunidad de poder estudiar una profesión, en especial la Facultad de Ciencias. Gracias también a la Facultad de Medicina.

Agradezco infinitamente a todos los que fueron mis profesores (as) durante toda la carrera.

No puedo dejar de agradecer el apoyo que tuve en la carrera de todos mis amigos y amigas que junto con algunos maestros (as) compartimos momentos de trabajo, diversión, enojos, alegrías y otras muchas cosas buenas, especialmente a:

Angélica Lara
Alejandra Deolarte
Adelaida
Chabela
Edith Mora
Laura
Mari Paz (pasita)
Rocío Carrillo
Rocío Gómez
Rosa Sandoval
Sara T.
Talis

Finalmente un agradecimiento muy especial al ser divino: Dios, y al Universo por que por fin he alcanzado una meta que creí no iba a lograr.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	8
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	45
SUGERENCIAS.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

ABREVIATURAS

A-DH	Alcohol deshidrogenasa
AL-DH	Aldehído deshidrogenasa
ARA	Ensayo de reducción de acetileno
A	Absorbencia
Cit-	Citocromo
CO	Monóxido de carbono
D. O.	Densidad óptica
G-DH	Glucosa deshidrogenasa
KCN	Cianuro de potasio
KDa	Kilodaltones
LGIP modificado	Medio de cultivo con etanol como única fuente de carbono
Nasa	Nitrogenasa
NADH-DH	NADH deshidrogenasa
natmO ₂	Nanoátomos de oxígeno
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PQQ	Quinona de pirrol-quinolina
Succ-DH	Succinato deshidrogenasa

TMPD	N, N, N', N', Tetrametil-p-fenilendiamina
TMB	(3', 3', 5', 5',-terametilbencidina)
THQ	Tetraclorohidroquinol (2, 3, 5, 6, tetracloro- 1, 4-bencenediol)
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinol

RESUMEN

Acetobacter diazotrophicus es una bacteria aerobia estricta y diazótrofa que ha sido aislada de las raíces, tallos y hojas de la caña de azúcar y recientemente fue aislada del café y la piña. Hemos determinado que *A. diazotrophicus* posee un sistema aerobio en el que participan activamente las deshidrogenasas periplásmicas para glucosa, etanol y acetaldehído. En este trabajo se determinó el efecto del etanol como única fuente de carbono en la expresión del sistema respiratorio de este organismo. Los resultados indican que el sistema respiratorio está constituido por citocromos de tipo *b*, *c* y *a*, el citocromo *ba* fue identificado como la oxidasa terminal principal. Además, el sistema cuenta con varias deshidrogenasas membranales muy activas (i.e. glucosa, etanol y acetaldehído deshidrogenasas), que donan electrones directamente al sistema respiratorio. La inhibición con KCN de las actividades de glucosa y NADH oxidasa puso de manifiesto la presencia de un componente altamente sensible; la actividad del etanol oxidasa resultó ser más resistente.

INTRODUCCIÓN

Sistemas respiratorios en bacterias.

Muchos de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en los seres vivos tienen relación con el oxígeno presente en el entorno, tal es el caso de la respiración aeróbica encaminada a la producción de energía mediante el metabolismo oxidativo mitocondrial en eucariontes, o bien por medio del proceso oxidativo llevado a cabo en la membrana citoplásmica de los procariontes. Una de las funciones de las cadenas respiratorias desarrolladas aeróbicamente, corresponde a la translocación de protones (H^+) al exterior de la bacteria, lo cual genera un gradiente protón-electroquímico a través de la membrana citoplasmática, que puede ser utilizado para la síntesis de ATP, el paso de solutos (transporte activo) y otros procesos asociados a la membrana como el movimiento flagelar (Anraku y Gennis, 1987).

El funcionamiento secuencial de los citocromos, ubicados en la membrana citoplásmica, dio lugar al concepto de "cadena respiratoria", entendiéndose con esto que la transferencia de electrones procede desde los sustratos metabólicamente utilizables hasta el aceptor final de electrones; en el caso de la respiración aeróbica el aceptor final de electrones es el oxígeno. Una cadena respiratoria típica está formada por una serie de transportadores de electrones como los citocromos. Las deshidrogenasas funcionan como enzimas alimentadoras de la cadena respiratoria, mientras que las oxidasas terminales participan activamente en la reducción del oxígeno (Matsushita, *et al.*, 1994). La ubiquinona funciona como una molécula acarreadora de electrones cuyo tamaño pequeño y carácter no polar, le permite desplazarse con gran facilidad en el ambiente hidrofóbico membranar. Se pueden distinguir varios complejos proteicos que forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial y tienen actividad definida: el complejo I o NADH-ubiquinol oxido-reductasa, el complejo II o succinato-ubiquinol oxido-reductasa, el complejo III o ubiquinol citocromo-*c* oxido-reductasa y el complejo IV o citocromo-*c* oxido-reductasa (Stryer, 1995).

La oxidación de los compuestos como el NADH y el succinato, se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial y es un proceso que está ligado a la cadena respiratoria. Por ejemplo, durante la oxidación del NADH, los electrones resultantes son transportados desde el complejo I ó NADH-deshidrogenasa a la ubiquinona (UQ). Luego, los electrones fluyen al complejo ubiquinol-Cit-*c* oxidoreductasa (complejo Cit-*bc*₁) y del Cit-*c* al Cit-*c* oxidasa (Cit-*aa*₃), donde el oxígeno se reduce formando agua. Esto también ocurre en las bacterias, sin embargo, en éstas últimas hay bastante variabilidad en cuanto a la composición y organización de sus sistemas respiratorios. Muchos de los sistemas respiratorios reportados en bacterias, poseen ramificaciones en torno a la poza de quinona, lo que hace posible que las bacterias puedan contar con dos o más oxidasas terminales con diferente afinidad por O₂ que les permite aprovechar el poco o mucho oxígeno disponible en el medio ambiente (Poole y Gregory, 2000).

En la Fig. 1 se muestra la organización de un sistema respiratorio bacteriano típico, el cual forma 2 ramas a partir de la poza de ubiquinol (UQH₂) (Anraku y Gennis, 1987). De acuerdo con lo anterior, aquellas oxidasas que utilizan ubiquinol como sustrato reciben el nombre de "quinol oxidasas", mientras que las oxidasas que reciben electrones de un citocromo *c* se les denomina "citocromos *c* oxidasas" (Anraku y Gennis, 1987).

Como mencionamos anteriormente las vías alternas transportadoras de electrones terminan en oxidasas con afinidades diferentes por el oxígeno. La expresión de estas vías dependen de las condiciones ambientales en que se desarrolle el microorganismo, según lo demuestran los estudios realizados en *E. Coli*, *Azotobacter vinelandii* y *Acetobacter acetii* (Anraku y Gennis, 1987; Jones y Redfarm, 1967; Matsushita, *et al.*, 1992). A menudo, la presión de O₂ y fuente de C son determinantes para la expresión de vías alternas de respiración.

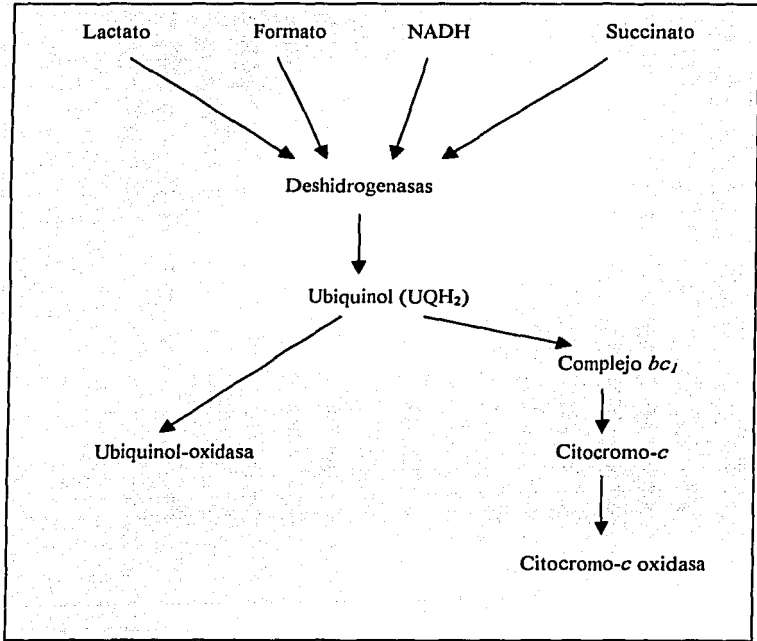


Fig. 1.- Esquema general de un sistema respiratorio bacteriano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caracterización de una cadena respiratoria.

Los citocromos fueron los primeros componentes de la cadena respiratoria que se detectaron debido a sus características espectrales en la región visible del espectro electromagnético (Nicholls, 1987). La secuencia de transportadores de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial fue establecida a principios de los años 60, como resultado de la aplicación del electrodo de oxígeno y de las técnicas de espectroscopía diferencial. Por otra parte, el descubrimiento de inhibidores específicos de la cadena respiratoria permitió la utilización del electrodo de oxígeno para localizar los sitios de acceso de los electrones y de los puntos de acción de los inhibidores. Con esta información es posible realizar el análisis de localización de cada transportador redox en relación con otros centros.

Antecedentes.

Las especies del género *Acetobacter* pertenecen al grupo de las bacterias acéticas y como tales poseen la maquinaria enzimática para catalizar la oxidación incompleta (fermentación aerobia) de azúcares y alcoholes (Matsushita, *et al.*, 1994). En este contexto, *A. diazotrophicus* utiliza preferentemente a la glucosa como fuente de carbono; también puede emplear sacarosa y gluconato (Cavalcante, *et al.*, 1988) (Fig. 2).

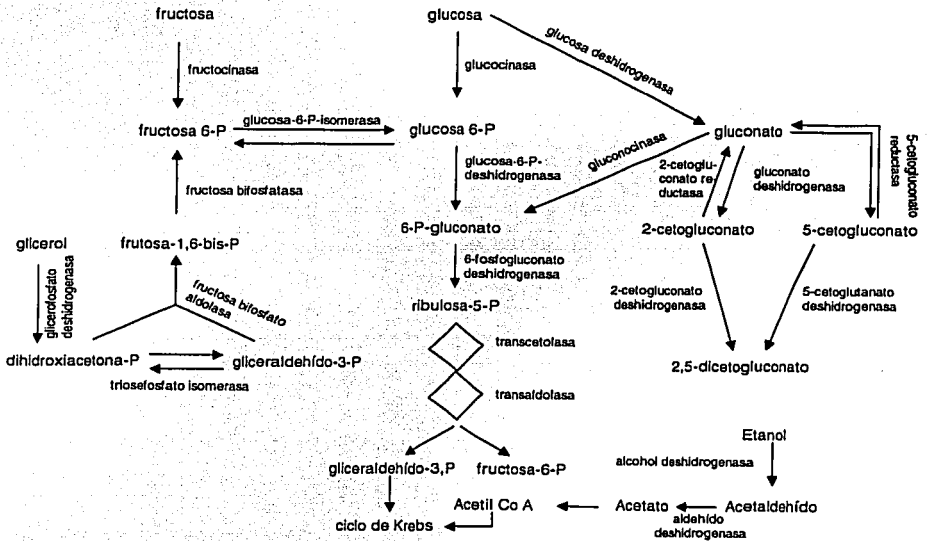


Fig.2.- Posibles rutas del metabolismo de carbohidratos de *A. diazotrophicus*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al igual que en otras bacterias acéticas, la oxidación de azúcares como la glucosa se lleva a cabo directamente en la membrana citoplásmica de *A. diazotrophicus*. En este proceso de oxidación participa activamente una PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal (G-DH), la cual tiene su sitio catalítico orientado hacia el espacio periplásmico. El producto de oxidación de la glucosa es el ácido glucónico que se acumula en el medio como producto de desecho (Matsushita, *et al.*, 1994).

No menos importante, son las PQQ-deshidrogenasas para etanol (A-DH) y acetaldehído (AL-DH) de *A. diazotrophicus*. Estas enzimas, al igual que la G-DH, tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico (Matsushita, *et al.*, 1994.) y contienen citocromos de tipo *c* asociados. Parece ser que los citocromos *c* de *A. diazotrophicus* están involucrados de alguna forma en una vía insensible al cianuro. Esto se sugiere de evidencia genética y mediante la solubilización de membranas con Triton X-100 a bajas concentraciones. Este procedimiento libera los citocromos *c* resultando en la pérdida de la resistencia al cianuro.

A. diazotrophicus, se ha aislado del interior de las raíces y tallos de la caña de azúcar (Attwood, *et al.*, 1991; Cavalcante, *et al.*, 1988; Gillis, *et al.*, 1989; Hernández, *et al.*, 1995; Stephan, *et al.*, 1991), recientemente fue aislado de la planta del café y de la piña (Jiménez, *et al.*, 1997; Tapia, *et al.*, 2000). Esta bacteria endófito no ha sido aislada del suelo. Es un bacilo Gram negativo, móvil, catalasa positivo, que posee un metabolismo aeróbico. Posee de uno a tres flagelos laterales y mide 0.7 x 2.0 μm de largo. La bacteria puede crecer a un pH de 3.0 pero no a pH 7.5. Sus valores óptimos para temperatura y pH de crecimiento son de 30 °C y 5.5 respectivamente (Stephan, *et al.* 1991).

Se ha demostrado que *A. diazotrophicus* fija nitrógeno en cultivo y presenta aerotolerancia durante la fijación de nitrógeno (Stephan, *et al.*, 1991; Flores, *et al.*, 1999). Esta aerotolerancia se puede atribuir a la probable existencia de un mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa de *A. diazotrophicus* similar al que opera en *Azotobacter vinelandii*. En un trabajo previo de laboratorio (Flores, *et al.*, 1999) se demostró que *A. diazotrophicus* tiene una tasa de

respiración muy alta que alcanza sus máximos niveles durante el crecimiento diazotrófico y disminuye notablemente durante el crecimiento en NH_4^+ como fuente de nitrógeno. También se demostró que durante el crecimiento diazotrófico con glucosa, como única fuente de carbono, la actividad específica de la PQQ glucosa deshidrogenasa y de la ubiquinol oxidasa a_1 (también conocida como ba) son notablemente altas y por tanto, responsables centrales de la actividad respiratoria. Durante el crecimiento en exceso de amonio (es decir, con 40 mM) la nitrogenasa se reprime y con ello baja varias veces la tasa respiratoria. Notablemente disminuye 6 veces la actividad de la PQQ glucosa DH y una oxidasa bd sustituye a la oxidasa a_1 como oxidasa principal (Fig. 3).

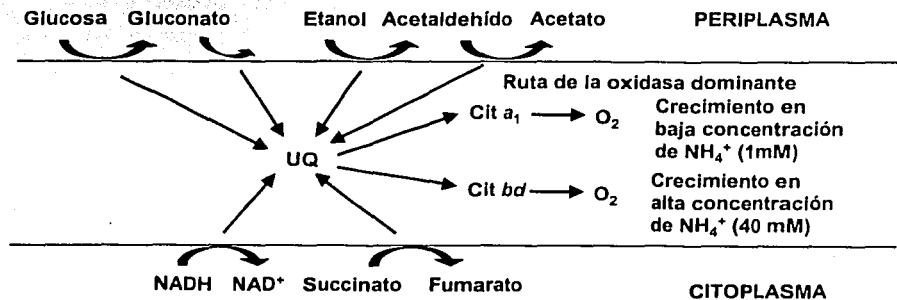
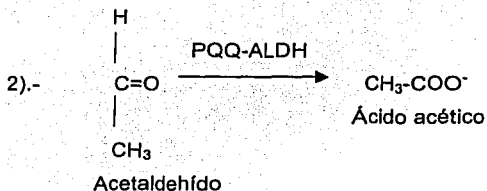
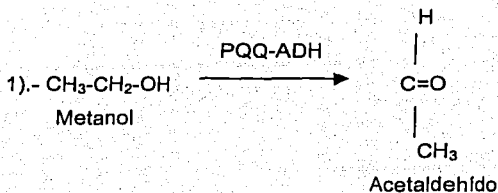


Fig.3.- Composición y organización del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*

Aunque las PQQ-DH para etanol y acetaldehído están presentes en cantidades considerables durante el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono, consideramos relevante definir las propiedades de crecimiento y respiración cuando *A. diazotrophicus* crece en ausencia de glucosa y en presencia de etanol como única fuente de carbono. En estas condiciones el etanol debe ser metabolizado a ácido acético mediante dos reacciones sucesivas de oxidación, catalizadas por la PQQ-alcohol deshidrogenasa y PQQ-acetaldehído deshidrogenasa de acuerdo a las siguientes reacciones:



Se han reportado ciertas especies en el género *Acetobacter* que tienen la capacidad de crecer empleando diferentes alcoholes como glicerol, sorbitol, manitol y etanol (Matsushita, *et al.*, 1994). En *A. diazotrophicus* SRT4 (Hernández, *et al.*, 1995) se ha estudiado el efecto de varias fuentes de carbono (sacarosa, glicerol y manitol al 1%) en el crecimiento y la producción de la enzima levansucarasa. Los autores reportan que ninguno de estos sustratos induce la producción de esta enzima. A las 40 horas se observa casi el mismo crecimiento con glicerol y sacarosa y menor crecimiento con manitol, todos al 1%. A las 72 horas, el mejor sustrato para su crecimiento es glicerol, seguido por la sacarosa y el manitol. En 1988, Cavalcante y Dobereiner señalan que *A. diazotrophicus* PAL 5 puede crecer utilizando como fuente de carbono etanol manitol y glicerol, (al 1%), aunque su crecimiento, cualitativamente es menor que el obtenido con sacarosa. Este dato fue confirmado por Gillis, *et al.*, 1989, pero señalan que no hay crecimiento de la cepa en cultivos con etanol al 10%. En ambos estudios, el

interés de los autores fue caracterizar la cepa, por lo que no analizaron a profundidad el comportamiento fisiológico de la bacteria en estos sustratos ni su efecto en otros componentes como el sistema respiratorio. Por ello, en este trabajo se propuso encontrar las condiciones para el crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol como única fuente de carbono y así analizar las consecuencias sobre la expresión del sistema respiratorio, en especial sobre la expresión de las PQQ deshidrogenasas para etanol (A-DH) y acetaldehído (AL-DH) y sus citocromos *c* asociados. En este sentido hemos determinado que la A-DH y la AL-DH siempre están presentes en las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en presencia de glucosa. Creemos que la presencia del etanol como única fuente de carbono, debe favorecer notablemente la expresión de las deshidrogenasas involucradas en la oxidación del etanol y paralelamente, los niveles de citocromos de tipo *c*.

HIPOTESIS

El crecimiento de *A. diazotrophicus* empleando etanol como única fuente de carbono debe favorecer la expresión de las deshidrogenasas para etanol y acetaldehído. Paralelamente, debe incrementar la expresión de los citocromos de tipo *c*.

OBJETIVOS

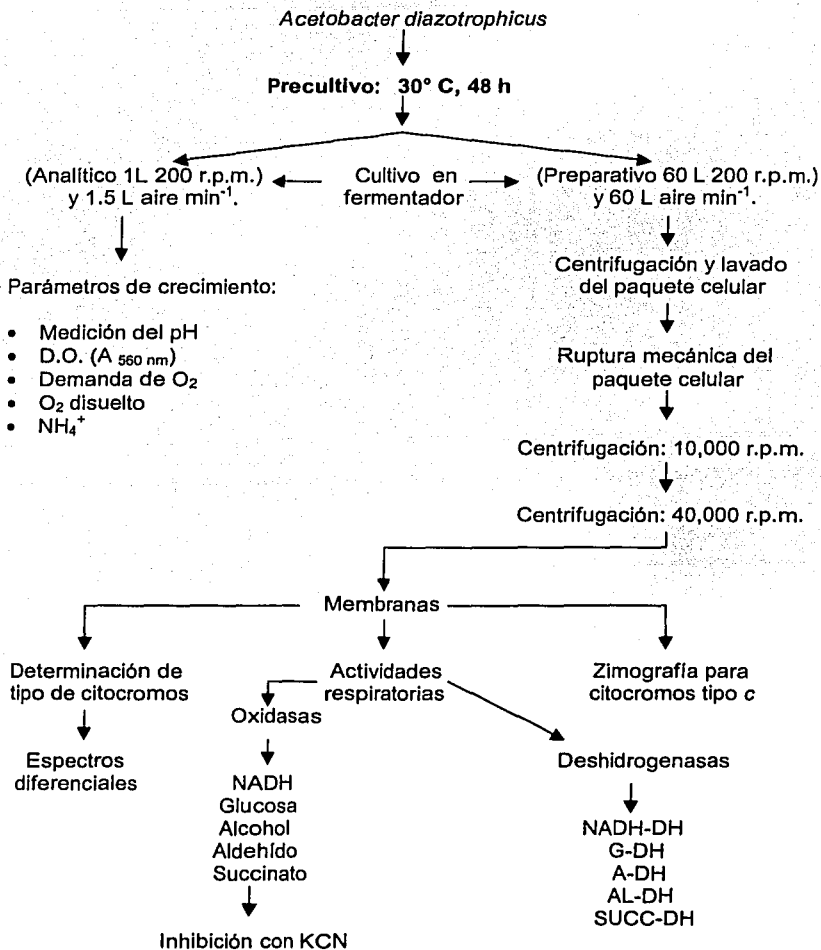
OBJETIVO GENERAL.

Conocer las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus* PAL 5 en etanol como única fuente de carbono y su efecto sobre la expresión de su sistema respiratorio, particularmente las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol como única fuente de carbono.
- 2.- Identificar los componentes citocrómicos de la cadena respiratoria de *A. diazotrophicus* cuando utiliza etanol como única fuente de carbono.
- 3.- Identificar la oxidasa terminal presente en *A. diazotrophicus* mediante técnicas de espectroscopía durante el crecimiento con etanol como única fuente de carbono.
- 4.- Cuantificar la expresión de las actividades de oxidasa y deshidrogenasa del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido con etanol como única fuente de carbono y utilizando como sustratos: NADH, glucosa, etanol, acetaldehído y succinato.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

Material biológico.

Cepa PAL-5 de *Acetobacter diazotrophicus* (Stephan, *et al.*, 1991).

Cultivo de *A. diazotrophicus*.

A. diazotrophicus se hizo crecer en medio de cultivo LGIP modificado conteniendo diferentes concentraciones de etanol. Para ello, se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio LGIP modificado. Las concentraciones de etanol empleadas abarcaron un rango de 0.1 a 30 %. Para el cultivo de *A. diazotrophicus* se utilizaron los componentes del medio de cultivo LGIP descrito por Reis, *et al* (Reis, *et al.*, 1994) sólo que la glucosa normalmente contenida en el medio LGIP fue sustituida por etanol en diferentes concentraciones, de esta manera el medio que a continuación se describe es llamado LGIP modificado para indicar que la única fuente de carbono es el etanol. El medio LGIP modificado, contiene lo siguiente: (g/L): 5 g de K_2HPO_4 , 4 g de KH_2PO_4 , 0.2 gr de $MgCl_2 \cdot 7 H_2O$, 0.02g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0.002 g de $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$, 0.01 g de $FeCl_3$, 5 g de citrato, 0.1321 g de $(NH_4)_2 SO_4$, y etanol en un rango de entre 0.1 y 30% de concentración. El pH del medio se ajustó a 5.5. El etanol fue esterilizado por filtración y fue adicionado antes de iniciar el cultivo. Todos los cultivos se llevaron acabo a 30 °C con agitación constante de 200 r.p.m. durante 48 h. El crecimiento fue determinado midiendo el incremento de la turbidez a 560 nm ($A_{560\text{ nm}}$).

Cultivo analítico de *A. diazotrophicus*.

El cultivo se inició con la adición de 50 ml de inóculo crecido por 66 h a un fermentador de 1 L de volumen de trabajo. La aereación fue de 1.5 L de aire min^{-1} y la agitación a 200 r.p.m. Las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus*

evaluadas fueron: curva de crecimiento, demanda de oxígeno del cultivo, pH del medio, concentración de amonio residual, así como la concentración de oxígeno disuelto.

Medición del pH y Densidad Óptica.

Se determinaron el valor de pH en los cultivos de *A. diazotrophicus* empleando un electrodo de pH Corning Co. y la densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC. Para ello se tomaron alícuotas de 10 ml del cultivo.

Amonio residual.

La cantidad de amonio residual presente en el medio de cultivo fue valorado empleando un electrodo de amonio (Orion Co.). Para ello, se tomaron alícuotas de 10 ml de cultivo en crecimiento activo y se adicionaron 100 μ l de KOH 10 M. La muestra fue llevada directamente al electrodo de amonio para cuantificar el amonio residual presente. El electrodo se calibró con una curva patrón que va desde cero (0) hasta 5mM de NH_4^+ .

Demanda de oxígeno.

La demanda de oxígeno fue determinada polarográficamente empleando un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments) de acuerdo al método descrito por Barquera, *et al.*, (1991). Para ello, se tomaron alícuotas del cultivo en pleno crecimiento. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 1.8 ml conteniendo medio de cultivo LGIP modificado fresco y estéril y 250 μ l de cultivo en pleno crecimiento.

Oxígeno disuelto.

La concentración del O_2 disuelto en el medio de cultivo a lo largo del crecimiento, fue medido con un electrodo de Clark. Para ello se utilizaron muestras del cultivo (10 ml) que fueron recibidas del tanque de fermentación en viales

conteniendo HgCl suficiente para dar una concentración final de 1.5 mM (Kim, *et al.*, 1994). Este tratamiento para instantáneamente el metabolismo y permite medir sin cambios, la concentración de O₂ disuelto en el cultivo en crecimiento.

Cultivo preparativo.

El cultivo preparativo de *A. diazotrophicus* se realizó utilizando el medio de cultivo LGIP modificado conteniendo 0.75% de etanol. El cultivo se llevó a cabo a 30 °C en un biofermentador de 60 L manteniendo un flujo de aire de 60 L min⁻¹ y una agitación de 200 r.p.m. El cultivo se incio con la adición de 4 L de un precultivo de 100 h. Después de 60 h de cultivo en las condiciones descritas, las células fueron cosechadas con una centrifuga Sharpless de flujo continuo. Las células se lavaron tres veces con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0, conteniendo CaCl₂ 0.5 mM y MgCl₂ 0.5 mM (Barquera, *et al.*, 1991) y fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Ruptura celular y preparación de membranas.

Las células fueron lavadas de acuerdo a la metodología establecida por Barquera, *et al.*, (1991) y se procedió a romperlas empleando perlas de vidrio (0.1-0.2 mm) en un Bead-Beter. Se aplicaron 6 pulsos de 1 min con intervalos de 2 min para evitar el calentamiento del homogeneado. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y se empleó 1 mM de PMSF (fluoruro de sulfonil-metil-fenilo), como inhibidor de proteasas. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 10,000 r.p.m. a 4°C por 10 min para recuperar las células que no fueron rotas, las cuales se desecharon. Después, el sobrenadante se centrifugó a 40,000 r.p.m. a 4 °C durante 40 min para recuperar el paquete membranar. Este paquete membranar se lavó tres veces con solución reguladora de fosfatos. Las membranas se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La cantidad de proteína en las membranas se determinó por el método de Lowry, *et al.*, modificada por Maxwell (1976), empleando albúmina bovina como estándar.

Actividades respiratorias.

Las actividades de las oxidasas fueron determinadas polarográficamente a 30°C de acuerdo al método descrito por Escamilla *et al.*, (1987). Para ello se empleó el oxímetro provisto de un electrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 2 ml conteniendo: solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 ó 7.4 (de acuerdo a la actividad a medir) y suspensión membranal (0.1 mg de proteína membranal). La reacción fue iniciada con la adición del sustrato donador de electrones: 10 mM de glucosa, etanol, acetaldehído, succinato, gluconato, glucosa 6PO₄, fructuosa, glicerol, metanol, 2-propanol o alcohol isoamílico. Para medir NADH oxidasa se utilizó 3 mM de NADH; mientras que en el caso de ascorbato-TMPD se utilizó ascorbato 3 mM y TMPD 2.5 mM y para ascorbato-THQ se empleó ascorbato 3 mM y THQ 2.5 mM. Se determinó el efecto de KCN sobre las actividades de oxidasas en las condiciones mencionadas anteriormente.

Las actividades de las deshidrogenasas membranales fueron determinadas espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones, siguiendo la metodología establecida por Ameyama, *et al.*, (1982). La mezcla de reacción se ajustó a 1 ml y contenía solución reguladora de citrato (Macllvaine), suspensión membranal (0.075 mg de proteína membranal) y ferricianuro de potasio 10 mM. Las membranas fueron inhibidas previamente con KCN 2 mM y la reacción se inició con la adición de sustratos a concentración 10 mM excepto NADH y succinato que fueron utilizados a concentración de 3 mM. La actividad fue cuantificada por el cambio de la absorbencia a 660 nm. (A_{660 nm})

Análisis espectral del contenido citocrómico.

El análisis espectrofotométrico de citocromos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por Barquera, *et al.*, (1991) en un espectrofotómetro SLM-Aminco DW 2000; se usaron celdas con paso de luz de 0.2 cm y los espectros fueron obtenidos a 77 K. Para los espectros diferenciales reducido menos oxidado se emplearon partículas membranales (5 mg de proteína) y se suspendieron en solución de fosfatos pH 6.0 adicionado de etilenglicol al 30%. Las membranas fueron reducidas con ditionita y oxidadas con persulfato de amonio. Después de un periodo de incubación (10 min) las preparaciones fueron congeladas a 77 K con nitrógeno líquido. La reducción también fue hecha utilizando como sustratos ascorbato 3 mM-TMPD 2.5 mM, NADH 3 mM, succinato 30 mM, y glucosa 10 mM. Para la obtención de espectros de los complejos citocromo-CO, se hizo burbujear monóxido de carbono (CO) por 5 min, en una muestra reducida previamente con ditionita (Barquera *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1978).

Electroforesis desnaturalizante.

La electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Laemli modificada (Del Arenal, *et al.*, 1997). El gel resolvidor (11.5 cm de largo X 14 cm de ancho), se preparó en gradiente de acrilamida de 10 a 16%. La mezcla estaba compuesta por: glicerol al 8%, SDS al 1%, Tris-HCl 0.375M, pH 8.9, persulfato de amonio 0.028% y TEMED 0.074%. Se preparó el gel concentrador a una concentración de 4.5% de acrilamida, 8% de glicerol, 1% de SDS, 0.066 % de TEMED, 0.05% de persulfato de amonio y 0.125 M de Tris-HCl, pH 6.8.

La mezcla de digestión esta compuesta por: 5% de SDS, 3% de β -mercaptoetanol, 15% de glicerol, 0.15 M de Tris HCl, pH 6.7, azul de Bromofenol y 400 μ g de proteína. Esta mezcla se calentó durante 3 minutos a temperatura de

ebullición. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA durante aproximadamente 9 horas (Del Arenal, *et al.*, 1997).

Zimografía para citocromo *c*.

Las bandas de los citocromos *c* en PAGE-SDS fueron reveladas por su actividad de peroxidasa empleando la técnica de Thomas, *et al.*, (1976). Después de la electroforesis el gel fue sumergido en una solución reguladora de acetato de sodio 175 mM pH 5.0. Inmediatamente se adicionó 55 ml de TMB (3',3',5',5'-tetrametilbencidina) 0.2 mM disuelta en metanol. La mezcla se incubó 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Las bandas de los citocromos *c* fueron visualizadas después de la adición del H₂O₂ al 30%. La reacción fue detenida lavando el gel con solución reguladora de acetato de sodio 175 mM, pH 5.0 conteniendo alcohol isopropílico al 30%.

RESULTADOS

Efecto de la concentración del etanol en el crecimiento de *A. diazotrophicus*.

A. diazotrophicus al igual que otras especies del género tienen la capacidad para oxidar azúcares y alcoholes de manera incompleta (fermentación oxidativa); Cavalcante, *et al.*, (1988); Hernández, *et al.*, (1995) reportan que la bacteria puede crecer en etanol (1%) como única fuente de carbono, aunque el estudio realizado fue sólo para caracterizar la cepa, más no analizaron a profundidad el comportamiento fisiológico de la bacteria en etanol, glicerol y manitol ni su efecto sobre el metabolismo oxidativo, particularmente sobre el sistema respiratorio. Basandonos en estos reportes decidimos establecer las condiciones óptimas de cultivo para el crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol.

Inicialmente consideramos que el etanol siendo sustrato potencial para el crecimiento es también una sustancia tóxica y por tanto era de esperarse que a cierta concentración pudiera actuar como inhibidor de crecimiento. De esta manera decidimos estudiar el efecto de la concentración de etanol en el medio LGIP modificado sobre el crecimiento de *A. diazotrophicus*. Para conocer el efecto de la concentración del etanol (como única fuente de carbono) sobre el crecimiento de *Acetobacter diazotrophicus*, se realizaron varios cultivos en matraces de 250 ml (50 ml de medio) en los que la concentración de etanol fue la única variante del medio LGIP modificado. La agitación se mantuvo constante a 200 r.p.m. y el crecimiento de *A. diazotrophicus* fue medido por la turbidez del medio ($A_{560\text{ nm}}$) producida a las 48 h de incubación. También se midió el pH alcanzado por el cultivo como una medida de la producción de ácido acético. Los resultados se muestran en la tabla 1 y la Fig. 4.

Etanol (%)	A _{560 nm}	pH
0	0.13	5.5
0.1	0.65	5.5
0.25	0.94	5.1
0.3	0.78	5.2
0.50	0.72	4.4
0.75	0.67	4.5
1.0	0.42	4.7
2.0	0.07	5.2
3.0	0.03	5.3
7.5	0.04	5.1
10.0	0.01	5.5
20.0	0.01	5.7
30.0	0.03	5.8

Tabla 1.- Crecimiento de *A. diazotrophicus* a diferentes concentraciones de etanol en medio LGIP modificado y 1 mM de NH_4^+ . Los cultivos fueron realizados a 30 °C con agitación de 200 r.p.m. durante 48 h. El pH inicial del medio fue ajustado a 5.5.

Los resultados registrados en la Tabla 1 nos muestran que el etanol puede funcionar como única fuente de carbono. Es claro que las concentraciones de etanol menores que 0.75% son adecuadas para el crecimiento de *A. diazotrophicus* y declina abruptamente a concentraciones mayores que 1%. A una concentración de 2% de etanol ya no se registra crecimiento. Por lo tanto, se puso en evidencia que las células de *A. diazotrophicus* no tienen la capacidad para contender con altas concentraciones de etanol, al parecer la presencia de concentraciones de etanol de 1% y mayores resultan tóxicas para el crecimiento

de la bacteria. En cambio, el crecimiento de *A. diazotrophicus* fue aceptable a bajas concentraciones de etanol (0.25 – 0.75%). En este intervalo, la concentración óptima fue de 0.25% (Tabla 1). Paralelamente, los mayores niveles de acidificación debidos a la producción de ácido acético a partir de etanol, se alcanzaron en los cultivos con mayor crecimiento. Como era de esperarse, en los cultivos con poco crecimiento hubo poca variación del pH.

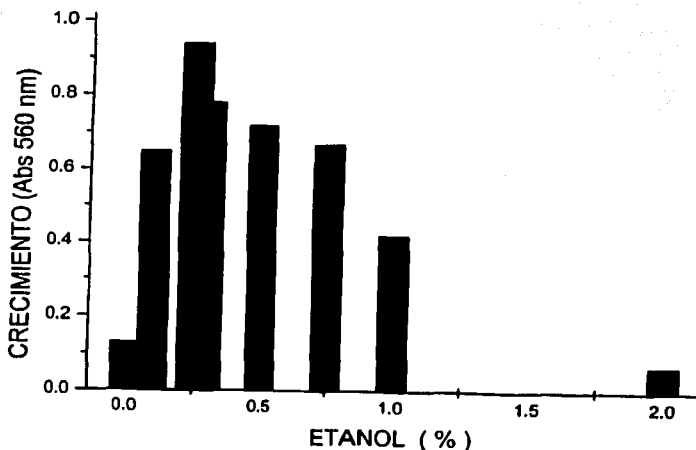


Fig. 4.- Crecimiento de *A. diazotrophicus* a diferentes concentraciones de etanol en medio LGIP modificado y 1 mM de NH_4^+ . Los cultivos se realizaron a 30 °C con agitación de 200 r.p.m. durante 48 h. El pH inicial del medio fue ajustado a 5.5. Aquí sólo se muestra hasta un 2 % de concentración de etanol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A una concentración de 0.25% se alcanzó la máxima turbidez ($A_{560\text{nm}}$ 0.94; 48 h de cultivo). Este crecimiento es aproximadamente el 50% del crecimiento registrado en el medio LGIP donde la glucosa al 5% es la única fuente de carbono (Flores *et al.*, 1999). Crecimientos aun mayores ($A_{560\text{nm}} = 8$) son registrados cuando el medio LGIP es enriquecido con sulfato de amonio 40 mM o peptona (Flores *et al.*, 1999) condición en la cual *A. diazotrophicus* crece utilizando el NH_4^+ o la peptona como fuente de nitrógeno y entonces no manifiesta su capacidad diazotrófica.

Es importante decir que al realizar los ensayos para probar la concentración óptima de etanol para el crecimiento de *A. diazotrophicus*, se realizaron también ensayos con otros alcoholes tales como manitol, isopropanol, glicerol y metanol a bajas concentraciones (0.2, 0.5 y 1.0%) para ver cual de ellos puede ser también óptimo para su crecimiento. Los resultados (no mostrados) indicaron que sólo el glicerol al 0.2% permite el crecimiento ($A_{560\text{nm}} = 0.82$). En los demás alcoholes el crecimiento fue prácticamente nulo.

Cultivo analítico de *A. diazotrophicus*.

Los experimentos anteriores permitieron conocer el rango de concentración de etanol adecuado para el crecimiento de *A. diazotrophicus*. Ahora, para caracterizar el crecimiento de *A. diazotrophicus* empleando etanol como única fuente de carbono, se realizaron cultivos analíticos en un biofermentador Applikon con capacidad de 1 L. Para ello, se empleó el medio de cultivo LGIP modificado (pH 5.5) conteniendo etanol al 0.75%. La agitación (200 r.p.m.), la aereación ($1.5 \text{ L aire min}^{-1}$) y un $\text{kLa} = 77 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se mantuvieron constantes. El termino kLa es el coeficiente de transferencia de O_2 y nos indica la cantidad de O_2 que se transfiere de la fase gaseosa a la fase acuosa en una condición de aereación y agitación definidos, y a un tiempo establecido. Las propiedades determinadas durante el crecimiento fueron: la $A_{560\text{nm}}$, la demanda de oxígeno del cultivo, la concentración de oxígeno disuelto, la cantidad de amonio residual y el pH del medio de cultivo.

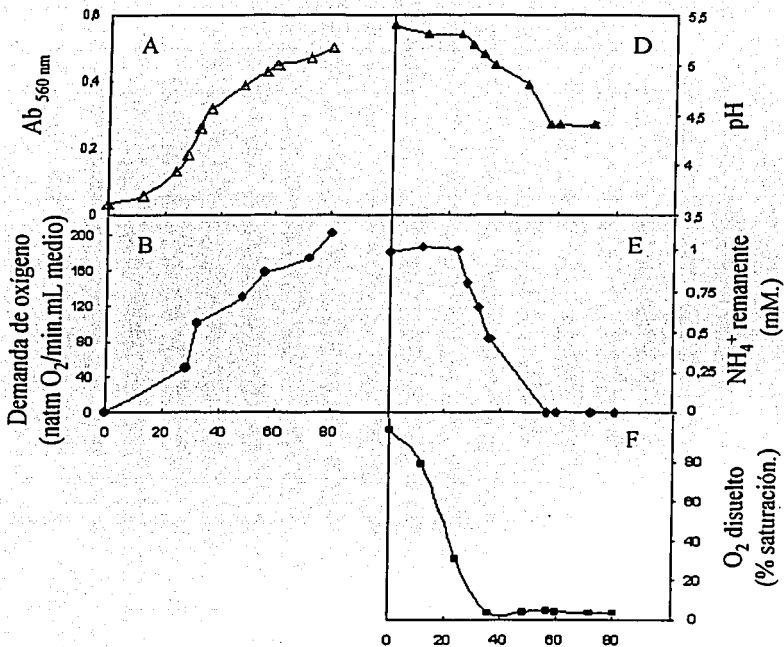


Fig. 5.- Parámetros de crecimiento de *A. diazotrophicus*. El cultivo fue realizado en un biofermentador de 1.0 L conteniendo medio LGIP modificado adicionado con 1 mM de NH_4^+ , y etanol al 0.75% como única fuente de carbono. El pH inicial fue 5.5 y el O_2 disuelto inicial fue de 400 natm gr de $\text{O}_2 \text{ ml}^{-1}$ (100 % saturación con aire). El cultivo fue aerado constantemente con 1.5 L de aire min^{-1} . Todos los parámetros están en relación al tiempo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el cultivo analítico decidimos utilizar una concentración de etanol de 0.75% que no es la óptima (0.25%) debido a que las condiciones de aereación intensa utilizada (1.5 L de aire / min) provocaba la pérdida, por evaporación, de cantidades apreciables de etanol.

El crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol al 0.75% fue inferior al registrado por esta misma bacteria en sacarosa al 5%, tanto en su velocidad como en el rendimiento final alcanzado. En etanol se registró una larga etapa de adaptación inicial (20 h) con crecimiento lento, en comparación con 5 h en sacarosa, seguida por un periodo de crecimiento logarítmico entre las 25 y 40 h para continuar en el resto del cultivo (hasta las 80 h) con un crecimiento lento. La $A_{560\text{ nm}}$ máxima alcanzada fue baja (0.5 unidades) comparado con el crecimiento en sacarosa ($A_{560\text{ nm}} = 2$) (Flores, *et al.*, 1999). La demanda de oxígeno por el cultivo en etanol también fue baja llegando a un máximo de $200\text{ natm gr O}_2 / \text{min}^{-1}\text{ ml}^{-1}$ de medio comparado con la demanda alcanzada en cultivos con sacarosa que fue de $450\text{ natm gr O}_2 / \text{min}^{-1}\text{ ml}^{-1}$ de medio (Flores, *et al.*, 1999).

La demanda de O_2 en el medio LGIP modificado nunca fue suficientemente alta para abatir el registro de O_2 disuelto en el medio que llegó a un registro mínimo y constante del 4% (es decir, $6\text{ }\mu\text{M}$ de O_2) comparado con el abatimiento total que se alcanza en el medio de sacarosa, donde a partir de las 20 h ya no se puede detectar O_2 disuelto (Flores, *et al.*, 1999). En cuanto al NH_4^+ disuelto en el medio, en el cultivo con etanol este ión ya no es detectable a partir de las 60 h tiempo en que coincide con la pendiente de lento crecimiento. Es probable que a partir de este tiempo, el lento crecimiento sea debido a una actividad diazotrófica limitada. Esto contrasta con la cinética de crecimiento rápido que se observa durante la etapa N_2 -dependiente del crecimiento en el medio de sacarosa a partir de las 10 h tiempo en el que se agotan el NH_4^+ y el O_2 disuelto a niveles no detectables por el electrodo de Clark (Flores, *et al.*, 1999).

Para comprobar de una manera indirecta, si *A. diazotrophicus* podía continuar su crecimiento a base de la fijación de nitrógeno (una vez que se ha agotado el amonio), se continuó con el cultivo hasta las 110 h sin que ocurriera crecimiento significativo. La adición de una segunda dosis de etanol (0.75%) al

cultivo en fase estacionaria (110 h) reinició el crecimiento el cual alcanzó una $A_{560\text{ nm}}$ de 0.9 a las 200 h (datos no mostrados). Así, pareciera que la concentración inicial de etanol se convirtió en un factor limitante para el crecimiento de N_2 dependiente.

Se sabe que la oxidación del etanol conduce a la formación de ácido acético. La medición del pH del medio de cultivo proporcionó información a cerca de dicha producción de por las células de *A. diazotrophicus*. En este sentido se observó que la acidificación se intensificó durante la fase logarítmica de crecimiento (Fig. 5 A, triángulos blancos y F, triángulos negros). El pH mínimo (4.5) se registró entre las 55 y las 70 h.

Composición citocrómica del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido en etanol al 0.75%.

Se determinaron los componentes citocrómicos presentes en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido por 48 h en etanol al 0.75%. Para ello se realizaron cultivos en un fermentador de 60 L (Flores, *et al.*, 1999) en el medio de cultivo LGIP modificado limitado de amonio. Se ajustaron las condiciones para mantener una aereación de 1.5 L de aire min^{-1} por litro de medio. Las células fueron cosechadas y rotas y las membranas fueron recuperadas de acuerdo a lo mencionado en materiales y métodos. Los componentes citocrómicos fueron determinados en las membranas mediante espectros diferenciales reducido menos oxidado a 77K. Los espectros diferenciales reducidos con glucosa, etanol o ditionita mostraron un perfil espectral parecido, indicando que los tres donadores de electrones utilizados reducen los mismos componentes citocrómicos, aunque en diferente proporción, siendo la ditionita el reductor más potente seguida por la glucosa y el etanol (ver Fig. 6A). El efecto hipercrómico del KCN en el espectro reducido (589 nm) ha sido considerado como un criterio para identificación de la citocromo oxidasa de tipo *ba* (también conocida como a_1). (ver Fig. 6A) (Matsushita, *et al.*, 1990). Las células crecidas con etanol al 0.75% mostraron la

presencia de citocromos de tipo *b* (picos a 428, 528, 555 y 564 nm), *c* (picos a 520 y 547 nm) y *a*₁ (hombros a 440 y 589 nm) (ver Fig. 6A).

En el caso de la reducción con etanol destaca la reducción de citocromo *c* a 547 nm, sobre la reducción de citocromos *b* a 555 y 564 nm. Esto se explica ya que la PQQ deshidrogenasa para alcohol contiene 4 citocromos *c* asociados a su estructura (Matsushita, *et al.*, 1994). Llama la atención los bajos niveles de reducción para citocromos tipo *b*, generados por etanol en comparación por ejemplo con glucosa que es otro sustrato fisiológico. Por lo pronto no tenemos explicación para esta diferencia. Los espectros diferenciales con monóxido de carbono (CO) revelaron la presencia de un citocromo *a*₁ reactivo con CO (picos a 424 y 589 nm y valles a 441 y 610 nm) (Fig. 6B). A este citocromo se le atribuyó la actividad de oxidasa terminal.

Nuevamente, comparando los niveles de reducción inducido por etanol y por glucosa, vemos en la Fig. 6A que la señal a 589 nm para citocromo *a* es de la misma magnitud en ambos sustratos, indicando igual nivel de reducción; lo mismo ocurre en el caso de los espectros diferenciales con monóxido de carbono (Fig. 6B), las señales para el aducto *a*-CO también son de la misma magnitud.

La identidad de la oxidasa terminal *a*₁ fue confirmada por las señales espectrales obtenidas al realizar el espectro de fotodisociación del aducto citocromo *ba*-CO, reducido con ditionita (valles a 427 y 589 nm) (Fig. 6C). El espectro de fotodisociación obtenido es semejante al espectro que se obtiene cuando se disocia el complejo de CO que forma una oxidasa de tipo *aa*₃ como es el caso de la oxidasa mitocondrial y la oxidasa *aa*₃ bacteriana (Poole y Gregory 2000). Así el efecto hipercrómico del cianuro sobre el espectro reducido (Fig.6A), el espectro diferencial de CO (Fig.6B) y el espectro de fotodisociación del aducto de CO (Fig. 6C) nos indica que la oxidasa de *A. diazotrophicus* tiene citocromo *a* en su centro reactivo para oxígeno; el efecto hipercrómico del cianuro nos indica que se trata de una oxidasa citocromo *ba* también conocida como citocromo *a*₁, que fue inicialmente descrita en *A. pasteurianus* (Takemura, *et al.*, 1993).

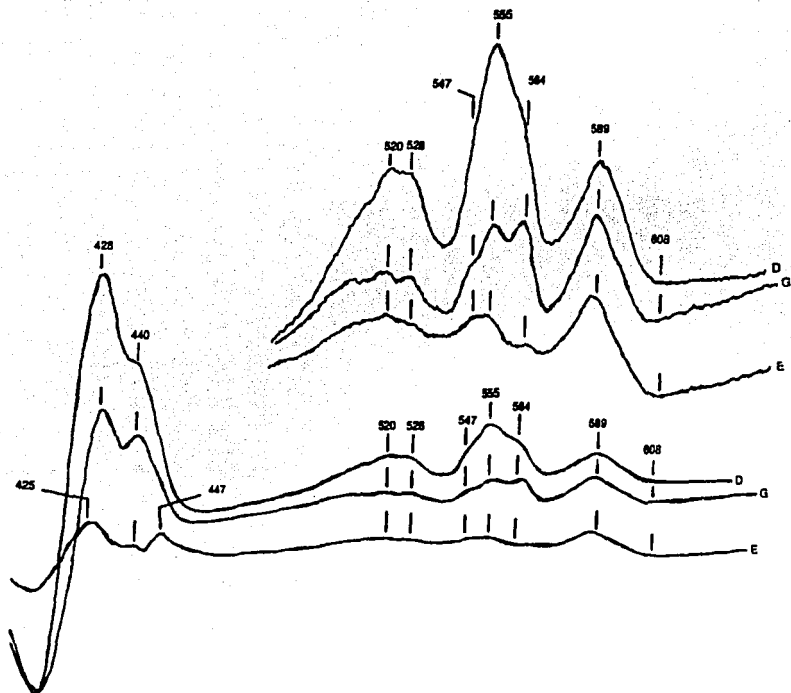


Fig. 6 A .- Espectros diferenciales reducido + KCN - oxidado a 77K de membranas de *Acetobacter diazotrophicus* obtenidas de células crecidas en medio LGIP modificado con 0.75 % de etanol como única fuente de carbono y 1 mM de NH_4^+ . Las membranas fueron reducidas con ditionita (D), glucosa (G) o etanol (E) y oxidadas con persulfato de amonio. En la parte superior derecha se muestra la amplificación de la región comprendida entre 500 y 620 nm. En todos los casos se utilizaron 5 mg de proteína membranal y a cada muestra se le adicionó KCN (1mM).

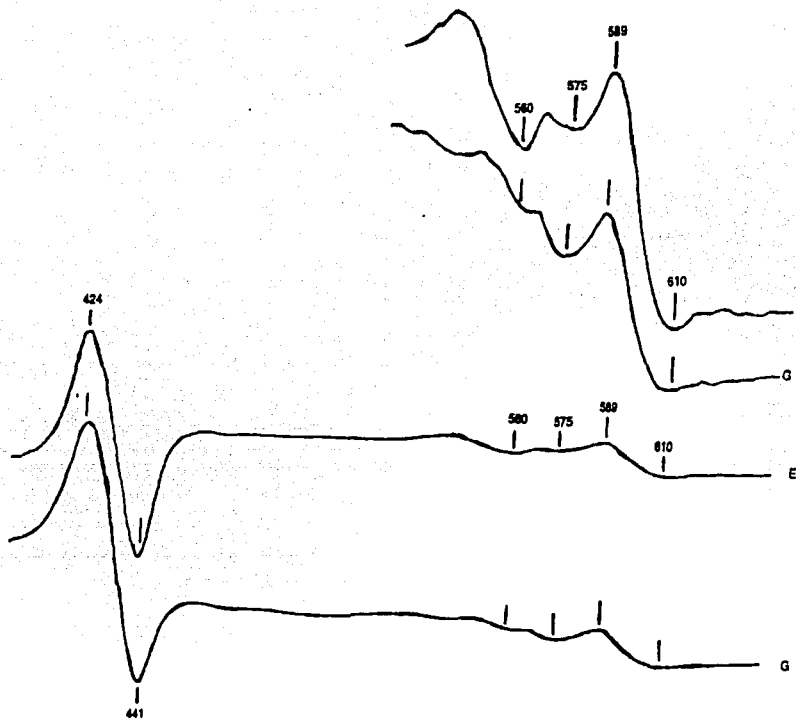


Fig. 6 B.- Espectros diferenciales reducido + CO - reducido a 77K de membranas de *Acetobacter diazotrophicus* obtenidas de células crecidas en medio LGIP modificado con 0.75 % de etanol como única fuente de carbono y 1 mM de NH_4^+ . Las membranas fueron reducidas con etanol (E) o glucosa (G). Se utilizaron 5 mg de proteína membranaral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

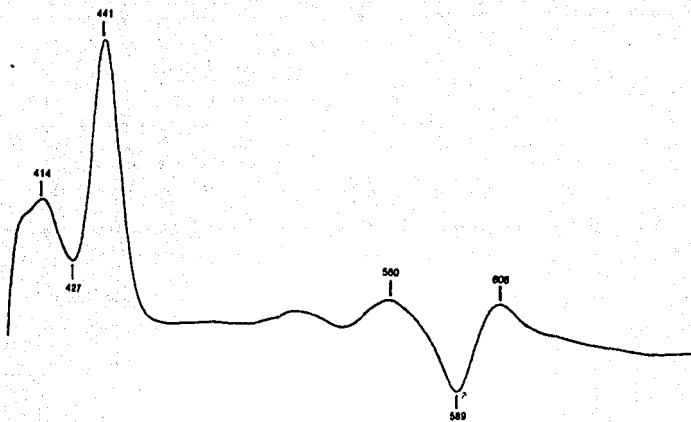


Fig. 6 C.- Espectro diferencial de membranas reducidas con ditionita y burbujeadas con CO y fotodisociadas menos membranas reducidas con ditionita CO. Se utilizaron 5 mg de proteína.

Las actividades respiratorias de *A. diazotrophicus* crecido en etanol al 0.75% como única fuente de carbono.

Se determinaron las actividades de oxidasas y deshidrogenasas de *A. diazotrophicus* en membranas de células crecidas en etanol al 0.75%. Las actividades de las oxidasas se midieron polarográficamente con un electrodo tipo Clark (Burris, 1991; García, *et al.*, 1994; Hartmann, *et al.*, 1987). Las actividades de las deshidrogenasas se midieron espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones (Ameyama, *et al.*, 1982).

Los resultados indicaron que las células crecidas en etanol al 0.75% (tabla 2) poseen una variedad de deshidrogenasas activas asociadas a la membrana y que son capaces de donar electrones a la cadena respiratoria dando como resultado las actividades de oxidasas correspondientes (tabla 2). Las actividades específicas de deshidrogenasas con diferentes sustratos han sido arregladas de mayor a

menor de acuerdo con la actividad registrada con ferricianuro como aceptor de electrones y podemos distinguir tres grupos: actividades notablemente altas, aquellas registradas con glucosa, acetaldehído, NADH, etanol e isopropanol con 3527, 4347, 3157, 3228 y 1431 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ respectivamente; actividades moderadas: succinato, gluconato, glucosa 6P y glicerol con 183, 137, 120 y 115 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ respectivamente y actividades bajas de la fructuosa y metanol con 58 y 31 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteina}^{-1}$ respectivamente.

Las actividades de las oxidasas no mostraron el mismo patrón que las deshidrogenasas y de igual manera las dividiremos en tres bloques: 1) actividades altas con glucosa, acetaldehído, NADH, etanol, succinato, ascorbato + THQ y ascorbato + TMPD, con actividades de 4136, 3962, 3725, 650, 419, 350 y 575 $\text{natmO}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg de proteina}^{-1}$ respectivamente. 2) Actividades medias en isopropanol y gluconato con 275 y 152 $\text{natmO}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}$, respectivamente y 3) actividades bajas: sólo ocurrió en el metanol con 50 $\text{natmO}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg de proteina}^{-1}$. En la tabla 2 se muestran las actividades respiratorias comparativas de *A. diazotrophicus*.

TABLA 2.- Actividades respiratorias de *A. diazotrophicus* crecido en etanol al 0.75 % y en sacarosa al 5 %. Las actividades para oxidasas están expresadas como: nátomo gramo de O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹, mientras que las actividades de las dehidrogenasas se expresan como: nmol Fe(CN)₆⁻ reducido min⁻¹ mg proteína⁻¹. n. d. no detectado.

SUSTRATO	Actividades respiratorias de las membranas de células crecidas en etanol al 0.75 %		Actividades respiratorias de las membranas de células crecidas en sacarosa al 5 %		Relación a/b
	(a) Oxidasas	Deshidrogenasas	(b) Oxidasas	Deshidrogenasas	
Glucosa	4136	3527	2085	2180	1.98
Acetaldehído	3962	4347	1082	1633	3.66
NADH	3725	3157	2824	2563	1.31
Etanol	650	3228	235	826	2.76
Isopropanol	275	1431	n.d.	n.d.	-
Succinato	419	183	235	680	1.78
Gluconato	152	137	314	127	0.48
Glucosa-6P	0	120	n.d.	n.d.	-
Glicerol	0	115	n.d.	n.d.	-
Fructuosa	0	58	n.d.	n.d.	-
Metanol	50	31	n.d.	n.d.	-
Ascorbato+THQ	350	-	750	-	0.46
Ascorbato+TMPD	575	-	141	-	4.07

Inhibición con cianuro de potasio.

Las oxidasas terminales de las células crecidas en etanol al 0.75% , fueron caracterizadas por su inhibición con KCN en membranas de *A. diazotrophicus*. El KCN es un inhibidor de las oxidasas terminales de la familia $Fe^{2+} Cu^{2+}$ (von Jagow *et al.*, 1986). De esta forma las actividades de oxidasa de glucosa, etanol, NADH, acetaldehído, TMPD y THQ oxidasa fueron tituladas con KCN (Fig. 7). Las membranas obtenidas en crecimiento con etanol al 0.75% mostraron claramente la presencia de dos componentes cinéticos, uno altamente sensible al KCN y otro resistente. Cerca del 40% de la actividad de oxidasa fue inhibida por bajas concentraciones del inhibidor (0.25 mM). El segundo componente cinético fue resistente hasta una concentración de 2.5 mM. A manera de especulación podríamos suponer que la actividad sensible a KCN se asocia con la oxidasa *ba*, mientras que la oxidasa resistente a KCN no está identificada. En la gráfica destacan el grupo de las actividades con asc-TMPD, asc-THQ, acetaldehído y etanol por su menor sensibilidad a KCN. Las actividades con NADH y glucosa fueron más sensibles al KCN.

Análisis electroforético en PAGE-SDS.

Con la finalidad de caracterizar los citocromos de tipo *c*, se realizó la separación electroforética por PAGE-SDS de las membranas completas de *A. diazotrophicus*. (Fig. 8). Los citocromos de tipo *c* fueron identificados por su actividad de peroxidasa (Thomas, *et al.*, 1976). Los resultados indicaron que las membranas de las células crecidas en etanol al 0.75%, fueron ricas en citocromos de tipo *c*. Estos citocromos resultaron novedosos ya que presentaron pesos moleculares elevados. Su masa relativa (Mr) fue: 67, 56 y 45 kDa (Fig. 8 carril a). También se realizó el análisis PAGE-SDS en membranas de *A. diazotrophicus* obtenidas de células crecidas en sacarosa al 5% obteniéndose resultados similares con citocromos de tipo *c* cuyos pesos moleculares fueron: 67, 56, 52 y 45 kDa (Fig. 8, carril b). Se ha reportado que las PQQ-deshidrogenasas de

bacterias acéticas contienen citocromos tipo *c* de alto peso molecular (Matsushita, *et al.*, 1994) de tal manera que los citocromos *c* aquí detectados deben ser parte de la estructura funcional de las PQQ-deshidrogenasas de *A. diazotrophicus*. La imagen que muestra el zimograma de la figura 8 nos indica que la cantidad de citocromos *c* asociados a membranas crecidas en etanol es notablemente superior a la que se muestra en células crecidas en sacarosa. Destacan las bandas de 67, 56 y 45 kDa. La banda 52 kDa que se visualiza en membranas de células crecidas en sacarosa no se observa en el caso de las células obtenidas en etanol. En el laboratorio se está purificando las tres PQQ deshidrogenasas y muy pronto podremos identificar a cada una de las bandas de citocromo *c* aquí detectados.

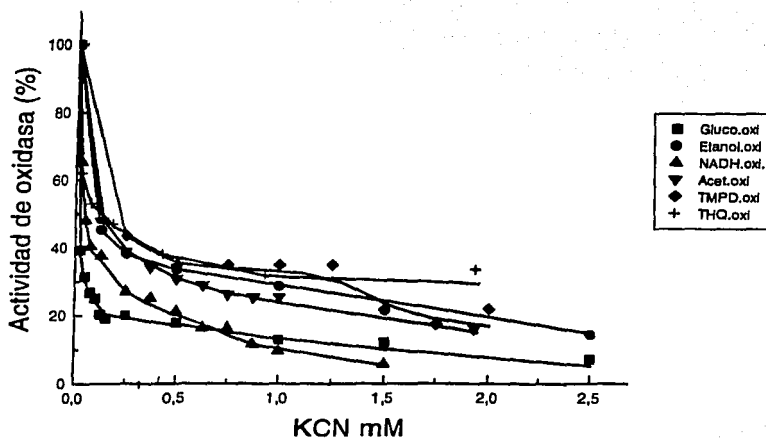


Fig. 7.- Efecto del KCN sobre las actividades de oxidasa para glucosa (■), etanol (●), NADH (▲), acetaldehído (▼), Asc. + TMPD (◆) y Asc. + THQ (+) s en membranas de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP modificado con 0.75 % de etanol como única fuente de carbono y 1 mM de NH_4^+ .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

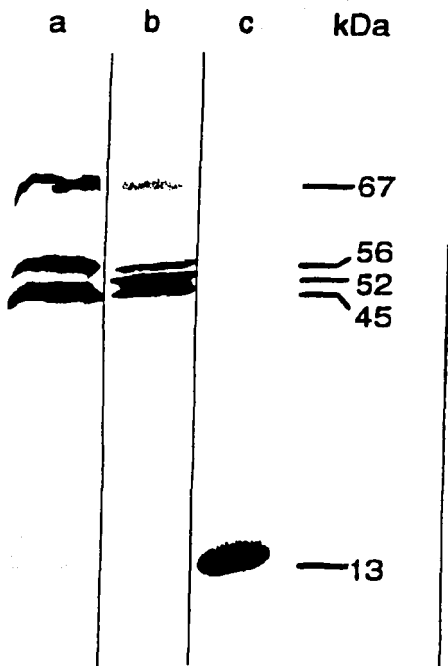


Fig. 8.- Detección de citocromos tipo c por reacción de peroxidasa con bencidina en membranas completas de *A. diazotrophicus* crecidas en medio LGIP modificado con 0.75 % de etanol como única fuente de carbono (carril a) y sacarosa al 5% (carril b) como únicas fuentes de carbono y 1 mM de NH_4^+ en ambos casos. Como referencia se empleó citocromo c de caballo (carril c). Las cantidades de proteína empleada fueron: carril a, 400 μg ; carril b, 2 mg y carril c, 5 μg .

DISCUSIÓN

Acetobacter diazotrophicus es una bacteria aerobia y diazotrófica cuya capacidad para fijar nitrógeno en vida libre destaca por su gran tolerancia al oxígeno (Ping, *et al.*, 1978). Se ha aislado de raíces, tallos y hojas de la caña de azúcar (Cavalcante, *et al.*, 1988; Galar, *et al.*, 1995; Gillis, *et al.*, 1989; Hernández, *et al.*, 1995; Stephan, *et al.*, 1986) y más recientemente de la piña y el café. En el laboratorio, se han obtenido resultados que llevan a proponer que *Acetobacter diazotrophicus* presenta un mecanismo de protección respiratoria para su nitrogenasa, similar al que opera en *Azotobacter vinelandii*. (Oelze, 2000). De esta forma, las altas tasas de respiración registradas en *Acetobacter diazotrophicus* permiten mantener un ambiente intracelular bajo en oxígeno, compatible con la función de la nitrogenasa (Flores, *et al.*, 1999). Las altas tasas de respiración se atribuyen a un conjunto de deshidrogenasas muy activas y a la presencia de varias oxidasas terminales en el sistema respiratorio de *Acetobacter diazotrophicus* como el citocromo *ba* (también conocido como citocromo a_1), el citocromo *bd* y una oxidasa insensible al cianuro, de la cual no se tienen datos para su identificación.

Reis, *et al* (1994) estudiaron el crecimiento de *Acetobacter diazotrophicus* empleando el medio LGI limitado de nitrógeno y con diferentes fuentes de carbono. Encontraron que el azúcar de caña permitió buen desarrollo de la bacteria y actividad de la nitrogenasa (Nasa) más alta. En nuestro estudio el etanol se empleó como única fuente de carbono para caracterizar el crecimiento de *Acetobacter diazotrophicus* en cultivo, así como el sistema respiratorio de la bacteria en presencia de etanol. Como ensayos preliminares se realizaron los cultivos de *A. diazotrophicus* en presencia de diferentes concentraciones de etanol. Los resultados indicaron que la concentración óptima de etanol para el desarrollo de *Acetobacter diazotrophicus* está entre 0.25, y 0.75 %. Como se puede observar, el crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol fue bueno pero no tanto como en glucosa o sacarosa. Se ha reportado que los microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias acéticas poseen la capacidad para crecer en una amplia variedad de azúcares y alcoholes (Matsushita, *et al.*, 1994). En concordancia con los datos descritos en la literatura, hemos

comprobado que *A. diazotrophicus* es capaz de crecer en altas concentraciones de sacarosa (Stephan, *et al.*, 1988; Reis, *et al.*, 1995; Flores, *et al.*, 1999), sin embargo, el emplear etanol como única fuente de carbono no promueve un crecimiento similar. El mejor crecimiento de *A. diazotrophicus* fue detectado a bajas concentraciones de etanol. A concentraciones de etanol superiores al 0.75% (por ejemplo de 1 a 30 %) no se registró crecimiento (tabla No. 1). Lo anterior nos llevó a proponer que el etanol en altas concentraciones es tóxico para el crecimiento de *A. diazotrophicus*. La razón se desconoce, sin embargo, se ha reportado que el etanol y en general los alcoholes, afectan numerosos procesos biológicos en la mayoría de los microorganismos, muchos de los cuales son procesos asociados con la membrana celular. Los alcoholes como moléculas anfipáticas alteran tanto ambientes hidrofóbicos como hidrofílicos (Ingram, *et al.*, 1980). La baja oxidación del etanol también se reflejó en la acidificación producida en los cultivos: los cultivos con mayor crecimiento apenas alcanzaron un valor de pH de 4.4.

La caracterización de las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus* indicaron que la bacteria presenta una cinética lenta de crecimiento y un bajo rendimiento celular. La curva de crecimiento de *A. diazotrophicus* mostró dos componentes cinéticos. Proponemos que la primera fase de crecimiento, la más rápida, debe atribuirse al crecimiento soportado por la presencia del NH_4^+ añadido al medio de cultivo. La segunda etapa, más lenta ocurre a partir del agotamiento del NH_4^+ en el medio y por tanto es probable que una actividad diazotrófica limitada sea responsable del crecimiento lento a partir de N_2 .

En las bacterias acéticas se ha reportado, que la oxidación del etanol es llevado a cabo por deshidrogenasas membranales específicas como la quinolcitocromo *c* alcohol deshidrogenasa (A-DH) y la aldehído deshidrogenasa (AL-DH) (Ameyama, *et al.*, 1982; Matsushita, *et al.*, 1990; Matsushita, *et al.*, 1992; Matsushita, *et al.*, 1994). Ambas enzimas presentan sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico; de esta forma, la oxidación de los azúcares y alcoholes ocurre en el exterior de la bacteria (Matsushita, *et al.*, 1994) y la acumulación de los productos de oxidación favorece la acidificación del medio de cultivo (Matsushita, *et al.*, 1994; Flores, *et al.*, 1999). La oxidación del etanol por las células de *A.*

diazotrophicus causó una acidificación moderada del medio de cultivo (pH 4.5) comparado con la mayor acidificación registrada en los cultivos de *A. diazotrophicus* crecido en sacarosa (pH 3.5) (Flores, *et al.*, 1999). Proponemos que esta diferencia está directamente relacionada con las cinéticas de crecimiento en los dos sustratos y su metabolismo asociado. Los cultivos realizados en sacarosa alcanzaron una A_{560nm} de 2 mientras que los cultivos de *A. diazotrophicus* crecidos en etanol alcanzaron una A_{560nm} de 0.5. La cantidad de ácidos orgánicos generados en estos cultivos fue proporcional al crecimiento. Por lo tanto la presencia de sacarosa al 5% en el medio de cultivo permitió el mejor crecimiento de la bacteria y la mayor acidificación del medio, en comparación con el cultivo de *A. diazotrophicus* realizado en etanol.

La curva de la demanda de oxígeno mostró un comportamiento paralelo al crecimiento. Las tasas de respiración fueron bajas (la velocidad de oxidación del etanol fue baja). Esto podría explicar el pobre crecimiento registrado cuando se emplea etanol como única fuente de carbono. A pesar de ello la respiración de las células disminuyó considerablemente la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, (3% de saturación ó 66 μM). Esta cifra contrasta con la nula detección de O_2 durante el crecimiento en sacarosa.

Hacia las 60 h, la concentración de amonio residual llegó a ser indetectable por el electrodo de amonio. A pesar de que el consumo fue lento, consideramos que el agotamiento del amonio en el medio de cultivo debió ser causa de que el cultivo alcanzara la fase de lento crecimiento.

A. diazotrophicus crecido en etanol presenta un conjunto de deshidrogenasas membranales, similar al registrado cuando la bacteria es crecida en altas concentraciones de sacarosa (Flores, *et al.*, 1999). De esta forma, se detectó la presencia de la G-DH, NADH-DH, A-DH, AL-DH, succinato deshidrogenasa (S-DH) y gluconato deshidrogenasa (G-DH). Entre las deshidrogenasas más activas fueron detectadas la G-DH y NADH-DH y las deshidrogenasas involucradas en la oxidación de alcoholes: A-DH y AL-DH. Lo interesante de este estudio fue haber encontrado que la presencia del etanol favorece notablemente la expresión de estas últimas enzimas, comparado con su expresión durante el crecimiento en sacarosa (Stephan, *et al.*, 1991; Matsushita, *et al.*, 1992; Flores, *et al.*, 1999). El etanol tuvo un fuerte

efecto positivo sobre la expresión de la A-DH y AL-DH de *A. diazotrophicus*, lo cual está de acuerdo a lo observado en *Gluconobacter suboxidans*, *G. Liquefaciens* y otras bacterias acéticas cuando son crecidas en etanol (Matsushita, *et al.*, 1994). Al parecer se trata de dos ejemplos de enzimas constitutivas en *A. diazotrophicus*. Se ha reportado que la A-DH y la AL-DH se encuentran formando un complejo en la membrana citoplásmica (Ameyama, *et al.*, 1982). La presencia de este complejo es importante porque debe impedir la intoxicación de la célula bacteriana por la presencia del acetaldehído. El acetaldehído es un compuesto sumamente tóxico para el metabolismo celular. De esta forma, el acetaldehído producido por la A-DH debe ser rápidamente oxidado por la AL-DH produciendo ácido acético (Ameyama, *et al.*, 1982). Proponemos que el complejo formado por la A-DH y AL-DH debe funcionar como un eficiente sistema de desintoxicación por acetaldehído y está acoplado al sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Otra de las enzimas que incrementó su actividad fue la G-DH. Esta deshidrogenasa participa activamente en el proceso de oxidación de la glucosa para producir ácido glucónico y es una de las enzimas clave del metabolismo de azúcares en *A. diazotrophicus* (Attwood, *et al* 1999; Ameyama, *et al.*, 1994). La presencia de la G-DH en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido en etanol puede indicar que esta enzima es constitutiva, o bien que los genes de la G-DH y la AL-DH de *A. diazotrophicus* se transcriben de manera simultánea, independiente de la fuente de carbono empleada. No se tienen datos al respecto y esto podría ser motivo de estudios posteriores.

Los datos del laboratorio indicaron que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido en etanol se compone de los citocromos *c*, *b* y *a*₁ (también conocido como citocromo *ba*). En este caso, el KCN tuvo un fuerte efecto hipercrómico (a 589 nm) que nos permitió confirmar la identidad del citocromo *a*₁ en las células de *A. diazotrophicus*. Su función como oxidasa terminal fue determinada mediante los espectros con CO y los espectros de fotodisociación. El citocromo *a*₁ no es muy frecuente entre las bacterias. Hay pocos reportes que indican su presencia en algunas bacterias como *A. aceti* y *A. pasteurianum* (Poole, 1983), por lo que resulta interesante su estudio ya que como determinamos en este trabajo, en *A. diazotrophicus* participa en la oxidación del etanol acoplado a la cadena respiratoria.

La cinética de inhibición con KCN mostró que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* posee una oxidasa terminal resistente al cianuro. La naturaleza de la oxidasa resistente al cianuro no se conoce y deberá ser objeto de un estudio posterior.

A través del PAGE-SDS se descartó la presencia del complejo *bc₁*, y del citocromo *c* soluble (de 13 kDa). En su lugar se detectaron tres bandas de citocromos *c* con alto peso molecular: 45, 56 y 67 kDa. Datos de la literatura indican que estos citocromos *c* forman parte de las subunidades I y II de las deshidrogenasas para alcohol y aldehído (Matsushita, *et al.*, 1990; Matsushita, *et al.*, 1992). El PAGE-SDS de las membranas de *A. diazotrophicus* obtenidas de células crecidas en presencia de sacarosa reveló la presencia de 4 bandas correspondientes a los citocromos *c* de 46, 52, 56 y 67 kDa (Flores, *et al.*, 1999). La banda de 52 kDa no fue detectada en las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en etanol; tampoco fue detectado en las membranas de *A. diazotrophicus* crecido con sacarosa y exceso de amonio (el exceso de amonio reprime la actividad de la nitrogenasa y la expresión de ciertos componentes del sistema respiratorio) (Flores, *et al.*, 1999). Los datos anteriores podrían sugerir que el citocromo *c* de 52 kDa se pone de manifiesto cuando la bacteria se encuentra fijando nitrógeno y el metabolismo del carbono se mantiene activo a través de la vía de la G-DH. Sin embargo, las mutantes de *A. diazotrophicus* carentes de citocromos de tipo *c* son capaces de fijar nitrógeno (Sunhe Lee, *et al.*, 2000; comunicación personal).

La presencia del etanol en el medio de cultivo favoreció notablemente la expresión de los citocromos *c* de 45 y 67 kDa, lo cual se pudo visualizar fácilmente en el análisis electroforético de PAGE-SDS por la intensificación de las bandas. Estos citocromos *c* deben estar asociados a las deshidrogenasas para alcohol y acetaldehído en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. No sabemos si *A. diazotrophicus* crecido en etanol sea capaz de fijar nitrógeno. No tenemos evidencias y tampoco se ha reportado de que *A. diazotrophicus* fije nitrógeno en presencia de etanol, por ello proponemos la realización de ensayos ARA para determinarlo. Del mismo modo, será necesario analizar el crecimiento de *A. diazotrophicus* en etanol

bajo técnicas de cultivo en equilibrio utilizando un quimiostato donde el factor limitante para el crecimiento sea el aporte de etanol al medio.

CONCLUSIONES.

1.- El etanol es utilizado por *A. diazotrophicus* como única fuente de carbono en concentraciones bajas. Concentraciones mayores a 0.75% resultaron tóxicas para el crecimiento de la bacteria.

2.- *A. diazotrophicus* crece en etanol con una cinética bifásica, durante la primera fase utiliza el amonio del medio (1 mM) y cuando éste se agota y el O₂ alcanza su nivel más bajo (30 h) se inicia una fase de lento crecimiento que tal vez sea diazotrófica.

3.- Los espectros diferenciales de baja temperatura (77 K) indicaron la presencia de los citocromos de tipo *b*, *c* y *a*₁ (*ba*). El citocromo *a*₁ es la oxidasa terminal principal en las células crecidas empleando etanol como única fuente de carbono. También se detectó una oxidasa resistente al KCN pero se desconoce su identidad.

4.- Los citocromos *c* mostrados por los espectros diferenciales están asociados directamente con las deshidrogenasas para alcohol (A-DH) y aldehído (AL-DH) en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. El complejo *bc*₁ no parece estar presente en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* ya que no se detectaron las bandas de proteína referentes a los citocromos *c*₁ (30 kDa) y de un citocromo *c* soluble (13 kDa).

5.- El espectro de fotodisociación y los espectros diferenciales con CO sugirieron la presencia de la oxidasa terminal *ba* (ubiquinol oxidasa). La presencia de la citocromo oxidasa *ba* fue confirmada por el efecto hipercrómico del KCN a 589 nm.

6.- Las altas tasas de respiración encontradas en *A. diazotrophicus* son favorecidas por varias deshidrogenasas membranales muy activas; algunas tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico (G-DH, A-DH y AL-DH) y otras hacia el citoplasma (NADH-DH y SUCC-DH).

7.- Los citocromos de tipo *c* asociados a la A-DH y AL-DH incrementan su expresión en presencia de etanol. Las actividades respiratorias referentes a la oxidación de etanol y acetaldehído también fueron favorecidas notablemente en presencia de etanol.

SUGERENCIAS

Hemos demostrado que *A. diazotrophicus* puede crecer en etanol como única fuente de carbono y que los niveles de expresión del sistema respiratorio serían suficientes para contender con el O_2 y así proteger a la nitrogenasa contra la inactivación por O_2 .

Como sugerencia única del presente trabajo:

Definir la capacidad de *A. diazotrophicus* para fijar N_2 durante el crecimiento aerobio con etanol como única fuente de carbono. La fijación de nitrógeno podría ser medida por el sistema de ensayo en células enteras (ARA) que se afoca en la reducción del acetileno a etileno por la nitrogenasa. Sustrato y producto son determinados por cromatografía de gases.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Albert L. Lehninger. Bioquímica. Ed. Omega, S. A. España, 1978.
- 2.- Ameyama, M and Adachi, O. 1982. Alcohol dehydrogenase from acetic bacteria, membrane-bound. Methods in Enzymology. Edited for Wood, W. A. Academic Press, Inc. 1982. London. 89: 451-457.
- 3.- Ameyama, M. and Adachy, O. 1982. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. Methods in Enzymology. Edited for Wood, W. A. Academic Press, Inc. 1982. London. 89: 491-497.
- 4.- Anraku, Y. And Gennis, B. 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. TIBS. 12: 262-266.
- 5.- Attwood, M. M.; Johannes, P. van Dijken, P. and Pronk, J. T. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioengin. 72: 101-105.
- 6.- Barquera, B.; Garcia-Horsmann and Escamilla, J.E. 1991. An alternative non-cytochrome contain branch in the respiratory systems of free-living *Rhizobium phaseoli*. Arch. Microbiol. 155: 428-435.
- 7.- Barquera, B.; Garcia-Horsmann, A. and Escamilla, J.E. 1991. Cytochrome *d* expresión and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. Arch. Microbiol. 155: 114-119.
- 8.- Burris, R.H.; Harmann, A.; Zhang, Y. and Fu, H. 1991. Control of nitrogenase in *Azospirillum sp.* Plant and soil. 137: 127-134.
- 9.- Burris, R.H. 1991. Minireview. Nitrogenases. J. Biol. Chem. 266: 9339-9342.

- 10.- B. Alvarez and G. Martinaz Drets. 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- 11.- Cavalcante, V.A. and Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil. 108: 23-31.
- 12.- Del Arenal, I.P.; Contreras, M. L.; Svlateorova, B.B.; Rangel, P.; Lledias, F.; Dávila, J.R.; and Escamilla, J.E. 1997. Haem O and a putative cytochrome *bo* in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. Arch Microbiol. 167: 24-31.
- 13.- Drozd, J. and Postgate, R. J. 1970. Effects of oxygen on acetylen reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 63: 63-73.
- 14.- Escamilla J.E.; Ramírez, R.; Del Arenal. I.P. ; Zarzoza, G. and Linares, V. 1987. Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: Effects of oxygen tension and carbon source. J. Gen. Microbiol. 133: 3549-3555.
- 15.- Jimenez-Salgado T. ; Fuentes-Ramírez, L. E.; Tapia-Hernández; A.; Mascarua-Esparza, M. A.; Martinez-Romero, E. ; Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Appl. Environ Microbiol. 63 (9) : 3676-3683.
- 16.- Galar, M. L. and Boardi, J. L. 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose-deshydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 713-716.
- 17.- García-Horman, A.; Barquera, B; Rumbley, J.; Ma. J.; and Gennis, R.B. 1994. Minireview. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. J. bacteriol. 176: 5587-5600.

18.- Gillis, M.; Kebsters, K.; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt.; Stephan, M. P.; Teixeira, K. R. S. and De Ley, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Inter. J. Sist. Bacteriol. 39: 161-164.

19.- Hartmann, A. and Burris, R.H. 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 169: 944-948.

20.- Hernández, L. ; Arrieta, J.; Menéndez, C; Vázquez, R.; Coego, A.; Suarez, V.; Selman, G.; Petit-Glatron and Chambert, R. 1995. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacteria associated with sugar cane. Biochem. J. 309: 113-118.

21.- Jones, C.W. and Redfeam, R. 1967. The cytochrome system of *Azotobacter vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta. 143: 340-353.

22.- Kim, J. And Rees, D.C. 1994. Nitrogenasa and nitrogen fixation. Biochemistry. 33: 389-397.

23.- Lazaro, H.; Juan, A.; Carmen M.; Roberto V.; Alberto C.; Vivian S.; Guillermo S.; Marie F.; Petit G.; y Régis Ch. 1995. Isolation and enzymic properties of levansucrase by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. Biochen. J. 309: 113-118.

24.- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193: 265-275.

25.- L. O. Ingram; N. S. Vreeland. 1980. Differential effects of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cell envelope.

- 26.- M. Flores-Encarnación; M. Contreras-Zentella; L. Soto-Urzuá; G. R. Aguilar ; B. E. Baca and J. E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. J. Bacteriol. 181: (22) 6987-6995.
- 27.- Matsushita, K.; Ebisuya, H.; Ameyama, M. and Adachi, O. 1992. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a₁* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. J. Bacteriol. 174: 122-129.
- 28.- Matsushita, K.; Shinagawa, E. Adachi, O. and Ameyama, M. 1990. Cytochrome *a₁* of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. Proc. Natl. Acad. USA. 87: 9863-9867.
- 29.- Matsushita, K.; Takahashi, K.; Takahashi, M. Meyama, M. and Adachi, O. 1992. Methanol and ethanol-oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. J. Biochem. 111: 739-747.
- 30.- Matsushita, K.; Ebisuya, H. and Adachi, O. 1992. Homology in the structure and the prosthetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, Cit-*a₁* and Cit-*o* of *Acetobacter aceti*. J. Biol. Chem. 267: 27748-27753.
- 31.- Matsushita, K.; Toyama, H. and Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. Advances in microbial. physiology. 36: 247-301.
- 32.- Nicholls, D.G. Bioenergética. 1987. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España. p: 89-125.

- 33.- Oelze J. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? FEMS Microbiology Reviews 24 (2000) 321-333.
- 34.- Poole, R. K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer protein. Biochim. Biophys. Acta. 726: 205-243.
- 35.- Rels, V.W.; Olivares, F.L. and Dobereiner, J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. Word J. Microbiol. And biotech. 10: 401-405.
- 36.- Robert K. Poole and Gregory M. Cook. 2000. Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? routes, reasons and regulation. Advan. microbial physiol. 43: 167-222.
- 37.- Smith, A.; Hill, S. and Anthony, C. 1990. The purification, characterization and role of the α -type cytochrome oxidase of *Klebsiella pneumoniae* during nitrogen fixation. J. gen. Microbiol. 136: 171-180.
- 38.- Stephan, M. P.; Oliveira, M.; Martinez-Drets and Döbereiner, J. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67-72.
- 39.- Tapia-Hernández, A.; Bustillos-Cristales, M. R.; Jiménez-Salgado, T.; Caballero-Mellado, J. and L. E. Fuentes-Hernández. 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microb. Ecol. 39: 49-55.

40.- Thomas P. E. and Ryan D. Levin W. 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75 (1): 168-176

41.- Wilson, D.F. and Erecinska, M. 1978. Ligands of Cytochrome c oxidase. *Methods in Enzymology*. Edited for Flescher, S. and Packer, L. Academic Press, London. Vol. 53: 191-202.