



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Caracterización de la actividad de los complejos respiratorios
de *Bacillus subtilis* creciendo en tres diferentes fuentes de
carbono”.**

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de Bióloga

PRESENTA:

ANA LAURA BARRIENTOS MIRANDA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Unidad de Biomedicina (UBIMED), FES Iztacala, UNAM.
Av. De los Barrios #1. Col. Los Reyes Iztacala.
Tlalnepantla, Estado de México, 2016.





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.

Agradecimientos.

A mi Alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme una formación académica y permitirme conocer a grandes profesores, compañeros y amigos.

Especiales a mis padres Doray Antonio, hermanos Paco, Toño y Ricardo, por su esfuerzo y trabajo en el apoyo de mis estudios y sobre todo por darme sabios consejos en todo momento ya que sin ustedes esto no hubiese sido posible, los AMO.

La realización de este trabajo fue posible con los donativos DGAPA UNAM IN221611 y 215915, CONACYT 102102.

Agradezco a mi tutora, la Doctora Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid por darme la oportunidad de trabajar con ella en este proyecto y apoyarme en cada momento durante esta etapa, también un agradecimiento especial para la Maestra en Ciencias Tecilli Cabellos Avelar por la asistencia técnica y por todos los consejos que me brindo durante mi estancia en el laboratorio.

Les agradezco a los sinodales; M. en C. Rafael Emiliano Quintanar Zuñiga, Dr. Ricardo Mejía Zepeda, Dr. Hugo Virgilio Perales Vela, Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid por brindarle el tiempo necesario a la revisión de este escrito.

A mis compañeros de laboratorio, Tecilli, Ana, Gerardo, Ale, Viri, Dulce, Led, Obed, Frida y Emanuel por todo el apoyo brindado y por todos aquellos buenos momentos que compartimos durante este tiempo, en especial a Millán por ser mi gran compañero y apoyarme en todo momento durante esta etapa, te quiero mucho.

Dedicatorias.

Con todo amor y cariño a mis padres: Dora y Antonio, por ser mi inspiración en cada momento para mi superación profesional, junto con mis hermanos Paco, Toño y Ricardo, gracias familia por apoyarme en todo momento, por sus consejos y enseñanzas y motivarme a superarme cada vez más, y ser un gran ejemplo para mí. A Lulu y Ana, a mis sobrinos Ricardo, Israel y José María, a mi tío Juan y a mis primos hermanos Ernesto y Santiago; a ustedes familia les dedico esta tesis en agradecimiento a su trabajo, compañía y esfuerzo, gracias por apoyarme en mis estudios y brindarme una formación moral y profesional.

A Millán, por ser mi gran amigo, mi gran compañero y mi gran confidente en todo momento, gracias por todos esos hermosos momentos y experiencias que vivimos juntos que nos llevaron de la mano a crecer profesionalmente (te quiero mucho), a lado de nuestros amigos: Luis Arratía (huicho), Ricardo Gutiérrez (guapo), Emmanuel Molina (flaco), Gallos, Imelda, Andy, Esther, Fer, Galeno, Chavita, Erick, Julio, Ale, Mary, Juliana, Paola, Adán, Daniel, Juanote, Manolo y Fer, gracias por todos estos años de risas, logros y sobre todo buenos momentos que quedaran siempre en mis recuerdos.

Índice.

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 5 |
| 1. Descripción de <i>Bacillus subtilis</i> | 5 |
| 2. Cadena Respiratoria de <i>Bacillus subtilis</i> | 6 |
| 2.1. Componentes de la Cadena Respiratoria..... | 6 |
| 2.1.1. Deshidrogenasas..... | 6 |
| 2.1.2. Menaquinona- MQ-7..... | 8 |
| 2.1.3. Citocromos..... | 9 |
| 2.1.4. Complejo tipo <i>b_{6c}</i> | 10 |
| 2.1.5. Oxidasas terminales..... | 10 |
| 3. Metabolismo de <i>Bacillus subtilis</i> | 12 |
| Hipótesis | 17 |
| Objetivos | 17 |
| Materiales y Métodos | 18 |
| Preparación de cultivos y crecimiento de la bacteria..... | 19 |
| Cosecha de células y obtención de membranas..... | 19 |
| Cuantificación de la concentración de proteína total..... | 20 |
| Método de Lowry..... | 20 |
| Método espectrofotométrico por U.V..... | 21 |
| Obtención de la concentración de citocromos por espectro de absorción..... | 21 |
| Medición de actividades enzimáticas de los cuatro complejos respiratorios de las membranas aisladas..... | 23 |
| Medición del consumo de oxígeno..... | 26 |
| Análisis estadístico..... | 26 |
| Resultados y discusión | 27 |
| 1. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en tres diferentes fuentes de carbono..... | 27 |
| 2. Obtención de células de <i>Bacillus subtilis</i> crecidas en las tres fuentes de carbono..... | 28 |
| 3. Concentración proteína de membrana..... | 29 |
| 4. Espectros de absorción de las membranas aisladas y concentración de citocromos..... | 30 |
| 5. Actividad de los complejos respiratorios por espectrofotometría..... | 36 |
| 5.1. Complejo NADH-DH II..... | 36 |
| 5.2. Complejo SDH..... | 38 |
| 5.3. Complejo <i>b_{6c}</i> | 40 |
| 5.4. Complejo <i>caa₃</i> | 42 |
| 6. Actividad de Succinato y Ascorbato-TMPD Oxidasas..... | 44 |
| 6.1. Succinato Oxidasa..... | 44 |
| 6.2. Ascorbato-TMPD Oxidasa..... | 47 |
| 7. Modelos de la Cadena Respiratoria de <i>B. subtilis</i> en las diferentes condiciones de crecimiento..... | 51 |
| Conclusiones | 52 |
| Perspectivas | 53 |
| Bibliografía | 54 |

Lista de Abreviaturas.

| | |
|--------------------|---------------------------------------------------------|
| Ack: | Acetato cinasa |
| ACS: | Acetil-CoA-sintetasa |
| AEBSF: | Clorhidrato de 4-2 aminoetil-benceno sulfonilo fluoruro |
| ATP: | Adenosín trifosfato |
| CcpA: | Proteína de control catabólico A |
| Cit: | Citocromo |
| Cox: | Citocromo oxidasa |
| DBH ₂ : | Decil ubiquinol |
| DCPIP: | 2,6-diclorofenolindofenol |
| DHAP: | Dihidroxiacetona fosfato |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| DQ: | Decil quinona |
| EDTA: | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FAD: | Dinucleotido de flavín adenina |
| FADH: | Dinucleótido de flavin adenina reducido |
| FBF: | Fructosa 1,6-bifosfato |
| FMN: | Flavín mononucleótido |
| G-3-P: | Glicerol-3-fosfato |
| Glpk: | Glicerol cinasa |
| HPr: | Proteína pequeña, termoestable y rica en histidina. |

| | |
|---------------------|--------------------------------------------------|
| Hrs: | Horas |
| LB: | Luria Broth |
| MQ: | Menaquinona |
| MSR: | Medio super rico |
| NAD: | Nicotinamida adenina dinucleotido- Forma oxidada |
| NADH: | Nicotinamida adenina dinucleótido-Forma reducida |
| NDH-I: | NADH-deshidrogenasa tipo I |
| NDH-II: | NADH-deshidrogenasa tipo II |
| PEP: | Fosfoenolpiruvato |
| PMS: | Phenazine metholsulfato |
| PTA: | Fosfotransacetilasa |
| PTS: | Sistema de transporte de fosfotransferasa |
| Qox: | Quinol oxidasa |
| RCC: | Represión catabólica por carbono |
| SDH: | Succinato deshidrogenasa |
| Sitios <i>cre</i> : | Elementos de respuesta de catabolito |
| TMPD: | Tetrametil-p-enilendiamin |

Resumen.

Las bacterias requieren de los nutrientes necesarios para desarrollarse. Algunas pueden ser específicas y seleccionar fuentes de carbono que les suministren la mayor cantidad de energía para su crecimiento. *Bacillus subtilis* es una bacteria gram positiva, aeróbica facultativa, autóctona del suelo, presenta un mecanismo llamado represión catabólica por carbono (RCC), que le sirve a la bacteria utilizar una fuente de carbono preferentemente a partir de una mezcla en el medio de crecimiento, así como utilizar el carbono limitante de acuerdo a sus capacidades metabólicas; además se caracteriza por tener una cadena respiratoria ramificada; la cual presenta tres deshidrogenasas: NADH-deshidrogenasa, Succinato-deshidrogenasa y Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, que transfieren electrones desde los sustratos a las menaquinonas, y continúan hacia dos ramas, una con quinol oxidasa y otra como citocromo oxidasa como acarreadores de los electrones. Estas características le han permitido adaptarse a diferentes medios en que se encuentre, y es posible que la expresión de complejos respiratorios se adecúe al mismo. En este trabajo se cultivó a la bacteria con tres distintas fuentes de carbono: Succinato, Acetato y Glicerol, durante 5, 9 y 23 hrs, para caracterizar la cadena respiratoria. Se realizó una curva de crecimiento para comparar las tres fuentes de carbono, encontrando que el crecimiento de la bacteria con los medios Succinato y Glicerol es similar, comparándolos con el medio de Acetato en el cual se presentó un crecimiento más lento. La cantidad de proteína membranal y la concentración μM de citocromos *c* (550nm), *b* (560nm) y *a* (600nm) fue mayor a las 23hrs en las tres fuentes de carbono, además se detectó la presencia del citocromo tipo *d* en las membranas con succinato 5 hrs y glicerol 5 y 9 hrs. Se midieron las actividades de los complejos respiratorios utilizando espectrofotómetro de doble haz (Aminco, modernización OLIS). La actividad del Complejo NADH-DH II fue mayor a las 5 hrs y 9 hrs en las membranas con glicerol, sin embargo, a las 23 hrs la actividad disminuyó. En los medios con succinato y acetato la actividad fue similar a las 5 hrs,

aumentando a las 9 y 23 hrs en las membranas con succinato, no así con acetato. La actividad de los complejos: SDH, Citocromo *bc* y Citocromo c oxidasa, aumentaron de acuerdo a las horas de crecimiento en las tres fuentes de carbono, siendo glicerol el de menor actividad. Se midió la actividad de la Succinato-oxidasa utilizando como sustrato succinato-menadiona, obteniendo mayor consumo de oxígeno en las membranas con acetato en los tres tiempos de crecimiento comparado con las membranas con succinato y glicerol, datos que son comparables con lo obtenido en la medición de la actividad del complejo SDH. También se midió Ascorbato-TMPD-oxidasa ambas por oximetría, en ella se obtuvo mayor consumo de oxígeno a las 9 hrs en las membranas con succinato y a las 23 hrs con acetato, siendo las membranas con glicerol donde se obtuvo bajo consumo de oxígeno, datos que de igual manera se relacionan con lo obtenido en la medición del complejo *caa3*. Por lo tanto, concluimos que los complejos respiratorios se ven influidos por la fuente de carbono mediante el proceso de represión catabólica por carbono.

Introducción.

Las bacterias requieren de los nutrientes necesarios para desarrollarse. Para lograr éxito en la evolución, tienen que ser eficientes y competitivas en momentos de escasez y abundancia de nutrientes (Stülke y Hillen, 2000).

La mayoría de las bacterias pueden utilizar diversos compuestos como fuentes de carbono. Estas y su cantidad son a menudo limitadas, aunque pueden ser abundantes y múltiples en otros momentos. Algunas bacterias pueden ser específicas y tener ventaja ante otras bacterias al ser capaces de utilizar diversas fuentes de carbono presentes en su hábitat, permitiéndoles seleccionar aquellas que les suministren una mayor cantidad de energía para su crecimiento, como por ejemplo la bacteria *Bacillus subtilis* (Lambert, 2011).

1. Descripción de *Bacillus subtilis*.

B. subtilis, es una bacteria Gram positiva autóctona del suelo, se encuentra ampliamente distribuida en diversos hábitats los cuales ha colonizado eficientemente. Es un microorganismo en forma de bacilo móvil, puede encontrarse como células individuales o en pequeñas cadenas, crece en un intervalo de temperaturas de entre 15 a 50 °C. En su metabolismo, puede reducir el nitrato a nitrito, e hidrolizar almidón y caseína, se caracteriza por poseer metabolismo aeróbico facultativo (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). Pertenece al grupo II de las especies *Bacillus*, el cual se caracteriza por producir ácidos (como ácido poliglutámico) a partir de una variedad de azúcares incluyendo la glucosa (Priest., 1993).

Bacterias aeróbicas y aeróbicas facultativas como *B. subtilis* pueden responder a cambios en el medio ambiente mediante el uso de diferentes tipos de vías respiratorias (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000).

2. Cadena Respiratoria de *B. subtilis*.

Bacillus subtilis presenta una cadena respiratoria ramificada (Figura 1). En condiciones aeróbicas utiliza oxígeno como aceptor terminal de electrones y en condiciones anaeróbicas utiliza nitrato y nitrito como aceptor terminal de electrones (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002). Tiene tres deshidrogenasas: NADH-deshidrogenasa, Succinato-deshidrogenasa y Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa asociadas a la membrana, las cuales transfieren los electrones extraídos de los sustratos para reducir a la menaquinona (MQ-7) en menaquinol, continuando hacia dos ramas, una con quinol oxidasas y otra con citocromo oxidasa como aceptores de los electrones (Fig. 1) (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000).

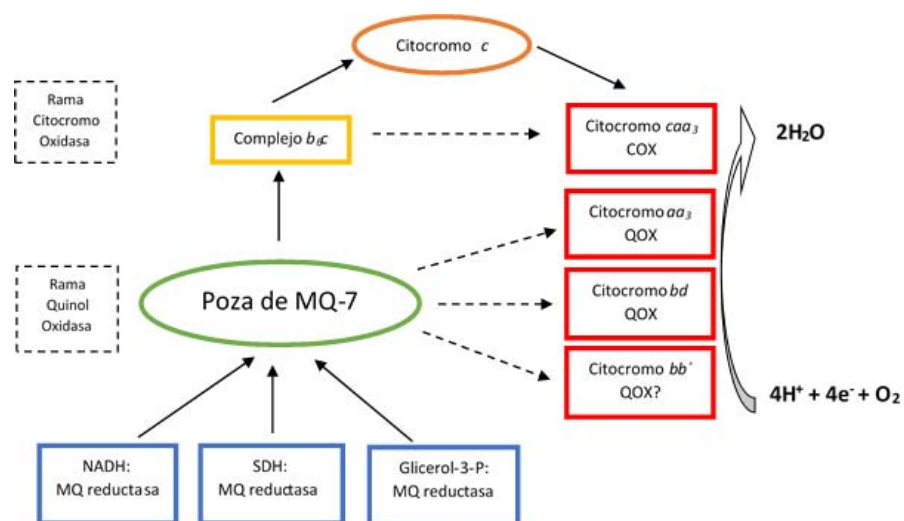


Figura 1. Cadena Respiratoria de *Bacillus subtilis* 168. Las líneas continuas representan la vía común del transporte de electrones, y las líneas punteadas representan la vía alterna de transporte de electrones. (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002).

2.1 Componentes de la Cadena Respiratoria.

2.1.1. Deshidrogenasas.

En condiciones aerobias *B. subtilis* utiliza los electrones transportados en la cadena respiratoria para reducir el oxígeno a agua. Uno de los principales donadores de electrones en la respiración es el $\text{NADH} + \text{H}^+$ producido en la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Existen dos tipos de NADH deshidrogenasas unidas a la membrana (NDH-I y NDH-II), descritas en bacterias

para catalizar la oxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ . La clasificación de estas enzimas está en función de la capacidad de generación de energía (Härtig y Jahn, 2012). Todos los miembros del grupo NADH-deshidrogenasa 1 (NDH-I) son enzimas de múltiples polipéptidos con capacidad de bombear protones, contiene grupos flavín mononucleótido (FMN) y hierro-azufre no covalentemente unidos como grupos prostéticos. Las enzimas NDH-II, no tienen la capacidad de generar un gradiente de protones. Estas enzimas son polipéptidos individuales y contienen al grupo flavín adenín dinucleótido (FAD) no covalentemente unido además de no presentar grupos hierro-azufre (Yagi, 1991).

La NADH deshidrogenasa presente en *B. subtilis* es del tipo NDH-II (Figura 1), contiene FAD como grupo prostético. Basadas en la similitud de la secuencia de la enzima presente en *Escherichia coli*, *B. subtilis* 168 tiene tres NADH deshidrogenasas, *YjID*, *YumB* y *YutJ*. La NADH deshidrogenasa que usa la bacteria en la cadena respiratoria es el tipo *YutJ* (Sone et al., 2004; von Wachenfeldt and Hederstedt, 2002).

SDH: succinato deshidrogenasa (Figura 1) ó más precisamente un succinato: quinona oxidorreductasa (SQR) es parte del ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria, realiza la oxidación de dos electrones del succinato a fumarato en el citoplasma acoplado a la reducción de la quinona. Tiene tres proteínas: SdhA, SdhB y SdhC; SdhA tiene un peso aproximado a 65-kDa, es una flavoproteína con un FAD unido covalentemente, SdhB pesa aproximadamente 29-kDa, contiene 3 grupos fierro-azufre 2Fe-2S, 3Fe-4S y 4Fe-4S, que funcionan en la transferencia de electrones entre el grupo flavina y hemo *b* del citocromo *b₅₅₈* en la proteína SdhC y por último la proteína SdhC de 23-kDa, contiene 5 segmentos transmembranales y un dímero SdhAB anclado en el lado citoplasmático de la membrana con funciones de transferencia de electrones a la MQ-7. Esta enzima presenta un citocromo *b-558* (que absorbe a 558 nm), como parte funcional de este complejo. Se ha reportado que en Bacilos como *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. subtilis*,

pueden utilizar succinato como fuente de carbono y energía (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002; Härtig y Jahn, 2012).

Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Figura 1), es esencial en los procesos de respiración celular, glucólisis y la biosíntesis de fosfolípidos. En *E. coli*, el glicerol-3-fosfato puede ser metabolizado adicionalmente a dihidroxiacetona fosfato mediante cualquiera de dos enzimas unidas a la membrana, dependiendo de las condiciones de crecimiento. El posible papel de este proceso es la captación de glicerol y glicerol fosfato generados por la descomposición de fosfolípidos y triglicéridos. En condiciones aeróbicas, *B. subtilis* expresa el gen *glpD* variante aeróbico del sistema de transferencia de electrones que codifica para glicerol-3-fosfato deshidrogenasa presente en la membrana de *B. subtilis* capaz de reducir a la menaquinona (Härtig y Jahn, 2012; Yeh y cols., 2008). Bajo condiciones anaeróbicas, una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa diferente se expresa preferentemente. Este complejo de proteína tri-heterodimérica, está codificada por el gen *glpACB*, y se ha demostrado que es una flavoenzima (enzima que funciona en la oxidación del piruvato, ácidos grasos y de aminoácidos), está débilmente unida a la membrana citoplasmática que ocurre a menudo en vesículas asociadas con fumarato reductasa; se ha visto que en la bacteria *E. coli* puede reducir menaquinona a menaquinol. La subunidad del complejo GlpABC, en condiciones anaeróbicas convierten el glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHPA) usando fumarato como aceptor terminal de electrones. (Cole y cols., 1988).

2.1.2. Menaquinona- MQ-7.

B. subtilis presenta Menaquinona (MQ) como componente redox móvil en la cadena respiratoria (Figura 1). Está compuesta por un sistema de anillo de naftoquinona a la que está unido un número variable de unidades de isoprenilo. La MQ-7 tiene una cadena lateral isoprenoide de siete unidades (Fig.2) (Taber, 1993).

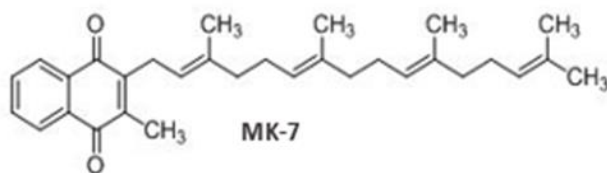


Figura 2. Fórmula estructural de la Menaquinona MQ-7 (2 Metil-3 Heptaprenil- 1, 4 Naftoquinona).

2.1.3. Citocromos.

Los citocromos tienen como grupo prostético al hemo que contiene hierro unido covalentemente, el hierro del hemo de un citocromo puede estar oxidado (Fe^{3+}) o reducido (Fe^{2+}) cuando funciona en la cadena transportadora de electrones. La clasificación de los diferentes tipos de citocromos se basa en la estructura química del hemo y la manera en que está ligado al polipéptido. El citocromo tipo **a** contiene al hemo A que es una forma modificada de la protoporfirina IX en la que se ha añadido a la molécula un grupo formilo. El citocromo tipo **b** tiene el hemo B (protohemo IX) que se encuentra dentro de la membrana y no puede fijar oxígeno. El citocromo tipo **c** alberga al protohemo IX covalentemente unido a uno o más residuos de cisteína y finalmente el citocromo tipo **d** que contiene dos hemos tipo **b** y un hemo tipo **d** unido al oxígeno para catalizar la reducción de O_2 a H_2O . *B. subtilis* requiere de citocromos para su crecimiento y puede sintetizar los citocromos tipo **a**, **b**, **c** y **d** (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992; Wu y cols., 1992). Estos citocromos transfieren electrones de componentes de bajo potencial a oxidasas terminales.

B. subtilis 168 contiene cuatro citocromos unidos a la membrana: CccA (citocromo $c-550$), CccB (citocromo $c-551$), ambos citocromos son de bajo peso molecular cuya función fisiológica es desconocida. Por último, están dos citocromos, QcrC (citocromo $c-554$) y CtaC (citocromo $c-551$), pertenecientes al complejo *bc* y a la oxidasa terminal citocromo *caa*₃ (Fig.3). El citocromo *d* pertenece a la oxidasa terminal tipo *bd* (von Wachenfeldt y Hederstedt, 1992; von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002).

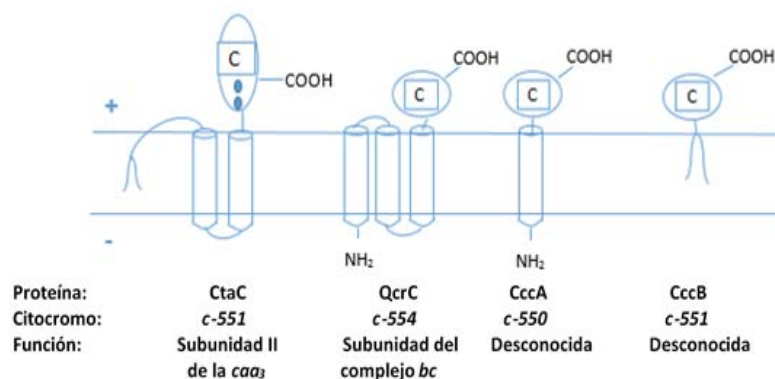


Figura 3. Citocromos presentes en *Bacillus subtilis* 168. Los cuatro citocromos se encuentran unidos a la membrana. La secuencia de aminoácidos de los dominios hemo C de CccA, CccB, y QcrC son muy similares. El dominio hemo C de CtaC es diferente a los otros tres citocromos, pero muy similar a la del citocromo *caa3* de varias especies de *Bacillus* (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002).

2.1.4. Complejo tipo *b_{6c}*.

En especies de *Bacillus*, el complejo *bc* tiene tres proteínas: la proteína Rieske (QcrA) que contiene un grupo (2Fe-2S). La subunidad QcrB es un citocromo *b₆*, tiene cuatro segmentos transmembranales alfa helicoidales, dos hemos tipo *b* unidos por medio de dos residuos de histidina, que sirven como ligandos axiales. Los hemos se denominan: *b_H* (potencial alto), se encuentra en la parte negativa de la membrana donde se reduce la MQ y *b_L* (potencial bajo), se encuentra cerca del lado positivo de la membrana donde el menaquinol se oxida. Se sabe que existe un tercer hemo unido covalentemente a la proteína en la cisteína 45. QcrC es un citocromo tipo *c* semejante al citocromo *c₅₅₁*, esta proteína tiene tres cruces transmembranales y es semejante a la subunidad IV de los complejos fotosintéticos denominados *b_{6f}*, por tanto, se puede denominar complejo *b_{6c}*. (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000; von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002). El menaquinol es oxidado por el complejo *b_{6c}*, que transfiere los electrones a un citocromo *c* oxidasa *caa3* (Figura 1) (Arzaquina y cols., 1999; García y cols., 2012).

2.1.5. Oxidasas Terminales.

El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria está acoplado a la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana celular, utilizado para la síntesis

de ATP y otros procesos que consumen energía. El paso final de la respiración aeróbica es la reducción de oxígeno a dos moléculas de agua ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$) catalizado por un grupo de enzimas unidas a la membrana llamadas oxidasas terminales que pueden contribuir al gradiente electroquímico (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002). Son proteínas hemo o hemo-cobre que oxidan reductores de menor potencial y utilizan los electrones para reducir el oxígeno a agua. Las oxidasas tienen afinidad en ambientes aeróbicos. Se ha estimado que cerca del 90% del oxígeno que es consumido es reducido a agua por las oxidasas (Taber, 1993).

La cadena transportadora de electrones de *B. subtilis* presenta dos ramas, una rama de quinol oxidasa y otra rama de citocromo oxidasa. Tiene tres oxidasas terminales que forman parte de esta última rama: citocromo oxidasa *caa₃*, citocromo oxidasa *aa₃*, citocromo oxidasa *bd*, y el operón *YthAB* que codifica para una oxidasa terminal tipo *bb'* (Figura 1). Los distintos tipos de oxidasas presentes le brindan a la bacteria la capacidad para crecer en una enorme variedad de condiciones ambientales dependiendo de la concentración de oxígeno (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000; Toledo Cuevas, 1997).

Las oxidasas tipo *a* pertenecen a la súper familia hemo-cobre, su característica es que tiene una subunidad homóloga de tipo I al del citocromo *c* oxidasa mitocondrial, bombea protones a través de la membrana citoplasmática en respuesta a la transferencia de electrones. La citocromo oxidasa *caa₃* está codificada por los genes *ctaCEDF*; dos genes adicionales *ctaA* y *ctaB* que se requieren para la producción de las citocromos oxidasas *caa₃* y *aa₃*; además de la biosíntesis del grupo prostético hemo *a*; y la citocromo *aa₃* está codificada por los genes *QoxABCD*. La oxidasa terminal tipo *bd* es distinta a las demás oxidasas, ya que no está relacionada con las oxidasas hemo-cobre. Esta oxidasa no bombea protones en comparación con las oxidasas hemo-cobre. Las oxidasas terminales se bloquean por cianuro o azida, salvo algunas que pueden ser resistentes a estos inhibidores (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002; Castillo, 2005).

B. subtilis presenta una cuarta oxidasa terminal descrita a partir del genoma secuenciado, en la cual se identificó un grupo de genes *ythA*, *ythB* y *ythC*. Hay evidencia espectroscópica que sugiere a una oxidasa terminal tipo *bb'*. Se ha reportado que la presencia de las quinol oxidasa *caa₃*, citocromo *aa₃* y citocromo *bd*, son esenciales para el crecimiento aeróbico de *B. subtilis*, siendo la citocromo *aa₃* más importante para el crecimiento aeróbico (Winstedt y von Wachenfeld, 2000). Las oxidasas *caa₃* y *aa₃* en membranas de *B. subtilis* fueron aisladas utilizando como fuente de carbono succinato (Henning y cols., 1995).

3. Metabolismo de *B. subtilis*.

B. subtilis tiene un mecanismo llamado represión catabólica por carbono (RCC), que le sirve para utilizar una fuente de carbono preferentemente a partir de una mezcla en el medio de crecimiento, así como utilizar el carbono limitante de acuerdo a sus capacidades metabólicas. La regulación molecular de la RCC se puede dar de dos formas, la primera se da reprimiendo los genes catabólicos y los operones mediante la proteína de control catabólico A, CcpA, la cual previene la transcripción de genes actuando sobre sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito). La segunda manera se da al no inducir operones catabólicos gracias a la fosforilación de la enzima HPr, que puede estimular la actividad de algunas enzimas, inductores, activadores transcripcionales, o antiterminadores (Forero y Sánchez, 2008; Brückner y Titgemeyer, 2002).

La RCC por fuente de carbono se da a través de diversos sistemas de control, el más conocido es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). Tanto en *E. coli* como en *Bacillus subtilis*, se transportan más de 20 carbohidratos diferentes por el sistema PTS, utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) como donador de grupo fosfato. El sistema PTS consta de dos enzimas generales no específicas que son la enzima EI y la proteína estable al calor HP; y las enzimas EII, que son una gran cantidad de permeasas específicas para cada carbohidrato (Fig. 4) (Forero y Sánchez, 2008). Las señales de la RCC son dependientes de las enzimas HPr

(proteína pequeña, termoestable y rica en histidina), HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y la enzima de control catabólico (CcpA), encargadas de censar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono.

Cuando la glucosa u otra fuente de carbono es rápidamente metabolizada, genera intermediarios metabólicos como la fructosa 1,6-bifosfato (FBF), reaccionando a través de dos vías. La más sencilla, incorporándose a la vía de la glucólisis para generar fosfoenolpiruvato (PEP) y obtener piruvato como producto final y la segunda, activando la HPr-K/P que fosforila a HPr en la serina 46, formando una interacción de HPr-Ser-P con CcpA permitiendo que CcpA se una a regiones de DNA denominados sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito) (Fig.4) (Forero y Sánchez, 2008; Stülke y Hillen, 2000; Varela y Grotiuz, 2006; Fugita, 2009).

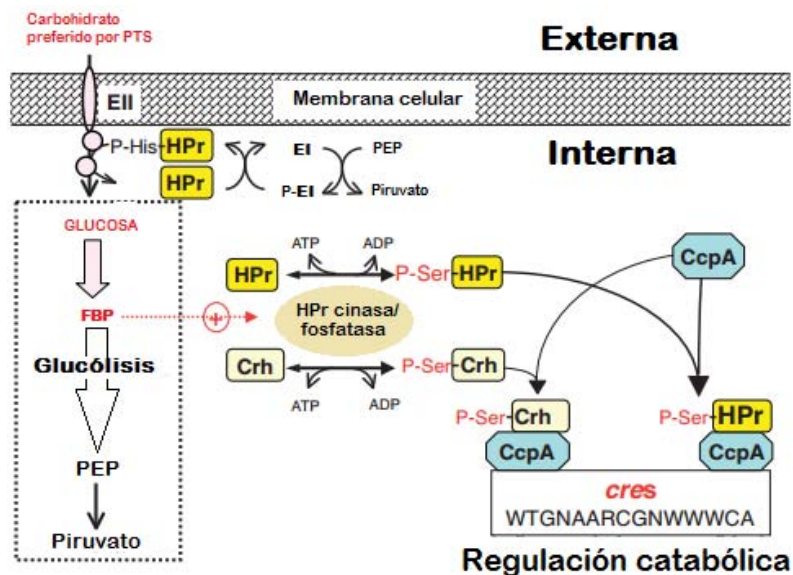


Figura 4. Mecanismo y activación molecular de la RCC de *B. subtilis*. Ocurre cuando una fuente de carbono preferente como la glucosa, fructosa o manosa es rápidamente metabolizable e incrementa la concentración celular de fructosa 1,6-bisfosfato activando la HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) que fosforila a HPr (proteína pequeña, termoestable y rica en histidina) y Crh (proteína homóloga a HPr) en serina 46. La interacción de HPr-Ser-P con CcpA se une a regiones de DNA denominadas sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito); permitiendo que el complejo FBF-HPr-Ser-P-CcpA unido a *cre* en las regiones regulatorias de operones sensibles a RCC, inhiben la iniciación a la transcripción. Fugita Yasaturo, 2009; Forero y Sanchez 2008).

Todos los genes u operones que participan en el catabolismo de carbohidratos son regulados por proteínas de control específico e inductores requeridos para su expresión, de esta manera la represión de los genes empleados en la utilización de carbohidratos alternos asegura que únicamente sea expresada una cantidad mínima de genes, para producir una cierta cantidad de energía y elementos carbonados a partir de una fuente de carbono. Cuando una sola fuente de carbono está disponible, la RCC está presente, siendo consecuencia del metabolismo del carbohidrato que actúa como un dispositivo de autorregulación interna que limita el consumo del carbohidrato y funciona como un sistema economizador de alimento (Forero y Sánchez, 2008).

Las características del metabolismo de *B. subtilis*, pueden permitir que se incorporen otras fuentes de carbono además del succinato. Stülke y Hillen (2000), mencionan que el glicerol externo puede ser captado a través de facilitadores. En bacterias la absorción del glicerol está mediada por el facilitador de difusión del glicerol GlpT, una proteína integral de membrana que cataliza el equilibrio rápido de gradientes de concentración de glicerol a través de la membrana citoplasmática. El glicerol intracelular se convierte en glicerol 3-fosfato por la enzima glicerol cinasa que utiliza ATP como donante fosforilo. Glicerol-3-P no es un sustrato del facilitador de difusión del glicerol y por lo tanto permanece en la célula, donde se metaboliza más. Como resultado, la fuerza motriz para la captación del glicerol es generado por la fosforilación de glicerol mediante la enzima glicerol cinasa (Charrier y cols., 1997).

En *B. subtilis* están presentes los genes *glp* del catabolismo del glicerol organizado por las unidades transcripcionales *glpP*, *glpFK*, *glpD* y *glpTQ*. GlpF y GlpT son acarreadores del glicerol y glicerol-3-fosfato externo, permitiendo el paso a través de la membrana citoplasmática. Dentro de la membrana citoplasmática, la enzima glicerol cinasa (GlpK) fosforila a la molécula glicerol-3-fosfato a través de la deshidrogenasa GlpD generando dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y NAD⁺ los cuales se reintegran a la glucólisis (Fig. 5) (Lewin y cols., 2009). Los electrones que resultan del glicerol-3-fosfato se transfieren a una flavoproteína deshidrogenasa para formar

FADH₂. Esta enzima alimenta a la cadena respiratoria de electrones en una manera similar a la de succinato deshidrogenasa.

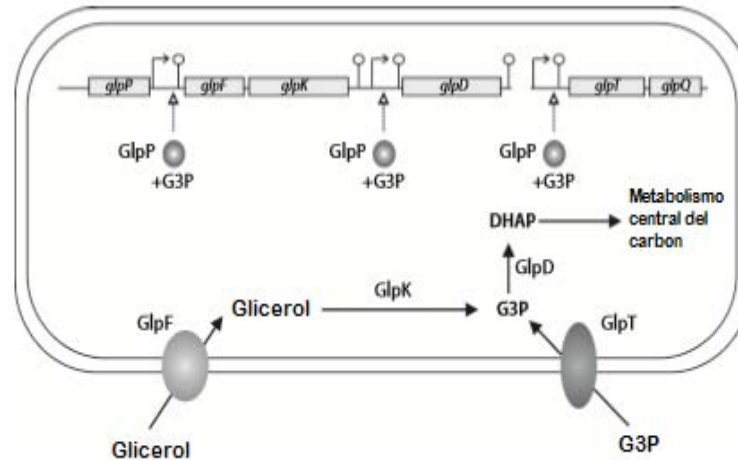


Figura 5. Metabolismo del Glicerol en *B. subtilis*. Descripción general del metabolismo de glicerol en *B. subtilis* y la función celular de las proteínas codificadas por los genes *glp*. La proteína GlpP en el citoplasma se une a G3P y media la regulación de la expresión génica por anti-terminación de la transcripción. GlpF y GlpT son un facilitador de captación de glicerol y una permeasa G3P. DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G3P: glicerol-3-fosfato. Los promotores se indican mediante flechas delgadas dobladas. Terminadores de la transcripción se indican mediante un anillo en un palo. Las flechas sólidas indican las vías metabólicas. Las flechas sin fondo indican un efecto positivo sobre la expresión génica, es decir, anti-terminación de la actividad. Lewin y cols, 2009.

B. subtilis regula la producción de acetato a través de dos vías. La primera vía mediada por la acetil-CoA sintetasa para la interconversión de acetato a acetil-CoA y la segunda vía utilizando acetil fosfato como intermediario de la enzima acetato cinasa para ser catalizada por la fosfotranscetilasa para formar acetil-CoA e incorporarse al ciclo de Krebs (Fig. 6) (Grundy y cols., 1993).

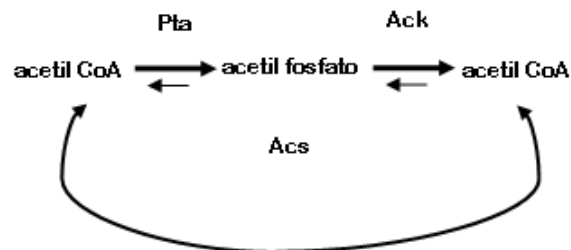


Figura 6. Vía de interconversión de acetato y acetyl-CoA en *B. subtilis*. La utilización de acetato requiere acetil-CoA sintetasa (ACS). La excreción de exceso de etilo se produce por una vía de dos pasos. La conversión de acetil-CoA a acetil fosfato utilizando fosfotranscetilasa (PTA), y el desglose de acetil fosfato de etilo (que resulta en la síntesis de una molécula de ATP), requiere de acetato cinasa (Ack), (Grundy y cols., 1993).

Una gran diversidad de genes y operones activan al complejo CcpA (enzima de control catabólico) y P-Ser-HPr (que actúa como represor o activador de la transcripción). El complejo CcpA activa directamente a los genes *ack* y *pta* e indirectamente al operon *alsSD*, involucrados en la formación de acetato y acetoína, de *B. subtilis* en crecimiento con glucosa. Además de involucrar a numerosos genes que participan en el metabolismo del carbón, también existen genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno y del fosfato, *citZ* codifica para la enzima citrato sintasa, una de las primeras enzimas del ciclo de Krebs. Varios de los genes que codifican para el ciclo de Krebs utilizan transportadores intermediarios y genes involucrados en la respiración (Fugita Yasaturo, 2009; Sonenshein, 2007).

A través de estas vías es posible que la bacteria asimile el acetato exógeno y lo incorpore en su metabolismo a través del ciclo de Krebs para obtener NADH y FADH₂ como donadores de electrones utilizados en la cadena respiratoria.

En *B. subtilis* el sistema de respiración es severamente reprimido por la glucosa. El operon *resABCDE*, es indispensable para la respiración ya que codifica tres proteínas involucradas en la biogénesis del complejo citocromo *c*. Además, se ha encontrado que el gen *cccA* que codifica para el citocromo *c₅₅₀* es reprimido por glucosa a través de la interacción directa con el complejo CcpA/P-Ser-HPr. Por otra parte, el operón *cydABCD*, codifica para la citocromo oxidasa tipo *bd*, que es reprimida por la enzima de control catabólico CcpA (Fugita Yasaturo, 2009).

Henning et al., 1995, aislaron membranas de *B. subtilis* utilizando como fuente de carbono 3% de succinato, y purificaron a la citocromo oxidasa *caa₃* y la *aa₃*. Por otro lado, Wu et al., 2010, evaluaron el efecto del glicerol en la concentración Poly-γ-Acido Glutámico), en la cepa *B. subtilis* NX-2, utilizando concentraciones crecientes de glicerol y encontraron que, a las concentraciones de 10, 20 y 30 (g/l) hay la mayor producción de biomasa.

En este trabajo se pretende evaluar la actividad de los complejos respiratorios de *B. subtilis*, utilizando tres fuentes de carbono distintas, a tres tiempos diferentes del desarrollo del cultivo. De esta manera esperamos conocer cómo los complejos respiratorios se desarrollan en estas condiciones.

Hipótesis.

B. subtilis es una bacteria que puede adaptarse al medio en que se encuentre, por lo que es posible que aún en condiciones aeróbicas, las expresiones de los complejos respiratorios se adecúen ante la presencia de tres fuentes de carbono (succinato, acetato y glicerol), alimentado así directamente la cadena respiratoria vía deshidrogenasas: NADH deshidrogenasa, SDH deshidrogenasa y Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Por tanto, es posible que se observen cambios en la actividad de los complejos respiratorios, bajo las diferentes fuentes de carbono y horas de crecimiento del cultivo.

Objetivos.

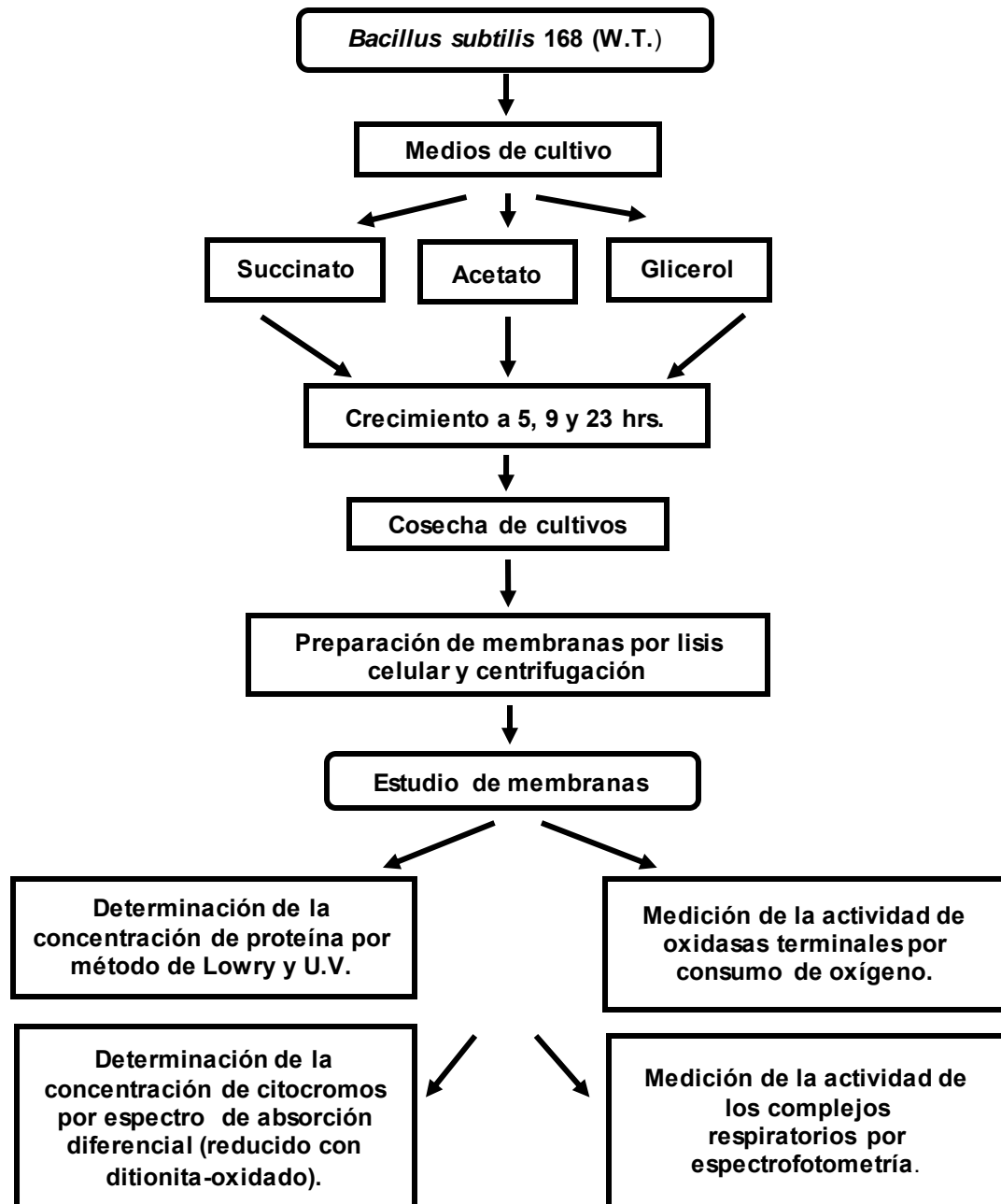
General:

- Comparar la actividad de los complejos respiratorios de *B. subtilis* a 5, 9 y 23 hrs de crecimiento en un medio en el que se probarán tres diferentes fuentes de carbono (succinato, acetato ó glicerol).

Particulares:

- Analizar el crecimiento de la cepa *B. subtilis* WT en las tres diferentes fuentes de carbono y tiempos de cultivo establecidos.
- Aislar a las membranas celulares de la bacteria crecidas en cada cultivo.
- Evaluar las actividades de los complejos respiratorios de las membranas aisladas, por espectrofotometría y oximetría.

Materiales y Métodos.



Preparación de cultivos y crecimiento de la bacteria.

Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* 168 obtenida del *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University). La bacteria se creció en cajas Petri de plástico con medio LB (Luria Bertani) 15 g/L de agar, por 24 hrs a 37°C. Posteriormente una colonia se colocó en 3.5 ml de medio líquido súper rico (MSR) con 3% de succinato ó 3% de acetato de potasio ó 1% de glicerol durante toda la noche a 37°C en agitador orbital a 200 rpm. Se prepararon cultivos de 1 L con medio súper rico MSR en matraces de 2.8 L de capacidad, con cada fuente de carbono y se agregaron los 3.5 ml de bacterias como inóculo, suplementado con 300 µl/L de solución de micronutrientes (para 100 ml: 2.2g MnCl₂, 0.5g ZnSO₄·7H₂O, 0.5g H₃BO₃, 0.016g CuSO₄·5H₂O, 0.025g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.46g Co(NO₃)₂·6H₂O y 0.5 ml H₂SO₄ concentrado). Los medios se cultivaron en periodos de 5, 9 y 23 hrs a 37°C en agitador orbital a 250 rpm, y se midió la Densidad Óptica (D.O.) a 600 nm al finalizar los periodos de crecimiento (Henning y cols., 1995).

Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria con cada una de las fuentes de carbono midiendo la Densidad Óptica (D.O) a 600 nm durante el periodo de 0-9 hrs y 23 hrs de crecimiento.

Con los datos obtenidos se calculó el tiempo de duplicación con las siguientes formulas:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

- μ = velocidad específica de crecimiento en h⁻¹ (masa)
- X_2 = número de bacterias en inicio de la fase exponencial
- X_1 = número de bacterias en fase de latencia
- t_2 = tiempo de inicio de la fase exponencial
- t_1 = tiempo 0 de crecimiento

Cosecha de células y obtención de membranas.

La cosecha se llevó a cabo por centrifugación diferencial en un rotor GSA (Sorvall) a 5000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La pastilla obtenida se lavó con 100 mM de fosfatos de potasio, pH 6.6, y se centrifugó a 10000 rpm en un Rotor SS-34 (Sorvall). La pastilla

de bacterias obtenida se lavó con el mismo amortiguador y se centrifugó nuevamente. Las células de *B. subtilis* se almacenaron en forma de pastillas a -20 °C. La obtención de membranas se realizó siguiendo el protocolo de Henning y cols., 1995 y Hägerhäll y cols., 1992. Las pastillas obtenidas de *B. subtilis* se descongelaron con agua tibia, y se re-suspendieron a una concentración de 30 g/L con amortiguador de 50 mM de fosfatos de potasio a pH 8.0. Se agregó AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) inhibidor de proteasas a una concentración final de 0.1mM. Se añadió lisozima a una concentración final de 0.3 g/L junto con 0.01 g/L de DNAsa y RNAsa. Los cultivos se incubaron durante 15 min a 37 °C a 140 rpm, posteriormente se agregó 10 mM de MgSO₄ y una mezcla de inhibidores de proteasas (5mM ε-aminocaproico y 2 mM EDTA). Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente se agregó EDTA-Na 15 mM final (de una solución stock 0.3 M, pH 7.4), dos minutos más tarde, se añadió 10 mM de MgSO₄.

Las células no lisadas se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes reunidos se centrifugaron nuevamente a 11000 rpm por 42 min. La pastilla obtenida se re-suspendió en 40 ml de amortiguador de 0.1M de fosfatos de potasio pH 6.6, y se centrifugó a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Nuevamente la pastilla obtenida se re-suspendió en un volumen mínimo, y un volumen igual de glicerol; posteriormente se agregó 0.1mM de AEBSF y la mezcla de inhibidores de proteasas mencionada. Las membranas se homogenizaron a 4°C, y se congelaron con nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenarán a -70°C.

Cuantificación de la concentración de proteína total.

Método de Lowry.

La cuantificación de proteína total de las membranas obtenidas se realizó por el método de Lowry y cols, (1951) y Markwell y cols, (1978); modificado para proteínas de membrana.

Se realizó por duplicado una curva patrón con las siguientes cantidades: 0, 10, 20, 40, 80, 150, 200 μ l de solución de 100 μ g/ml de Albúmina Sérica de Bovino (BSA), a cada tubo, posteriormente se agregó 1 ml de una mezcla de dos soluciones: 99% solución "A" (20 g de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH, 2 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1% de SDS) y 1% de solución "B" (4% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), al término se dejó incubando durante 10 min, después se agregaron 100 μ l de Folin-Ciocalteau fenol 1:1 con agua destilada a cada muestra, todas las muestras se dejaron incubar durante 30 minutos.

Las muestras problema (membranas) se colocaron en cantidades de 20, 40 y 80 μ l realizando una dilución 1:100 con agua destilada; finalmente todas las muestras fueron leídas a 750 nm en el espectrofotómetro BioMate3 Thermo, tomando como blanco la concentración 0 μ l de BSA. Con los datos obtenidos se realizó una curva patrón donde se interpolaron las absorbancias de las muestras para obtener el promedio de las concentraciones de proteína μ g/ μ l.

Método espectrofotométrico por U.V.

Se utilizó el método de Glick y Pon, 1995, con una solución 0.6% de SDS. El método consistió en tomar 1 ml de solución 0.6% de SDS como blanco; posteriormente se tomaron 10 μ l de membranas diluidas en 990 μ l de solución 0.6% de SDS. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 280 nm, en el espectro BioMate3 Thermo. La concentración de proteína total de membrana se calculó a partir de la siguiente fórmula reportada por Glick y Pon (1995):

$$0.12 \text{ de Absorbancia de la muestra} = 10 \text{ mg de proteína}$$

Obtención de la concentración de citocromos por espectro de absorción.

Se realizaron espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita-oxidado) de las membranas aisladas, en un intervalo de longitud de onda de 400-650 nm con un

espectrofotómetro de doble haz Aminco DW2, modernización de OLIS, utilizando 2 mg de proteína de membrana disuelta en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

Se realizó una línea base con amortiguador contra aire, en la celdilla de muestra con el amortiguador para calibrar a cero; posteriormente se diluyeron las muestras en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0. Se corrió el espectro de las membranas oxidadas contra aire, a continuación, se agregaron granos de ditionita a la muestra asegurándose de mezclar bien, se corrió nuevamente el espectro reducido con ditionita. Finalmente se realizaron espectros de absorción diferenciales haciendo la resta del espectro reducido con ditionita menos oxidado, para así poder observar los picos de la región alfa en donde se encuentran de los citocromos: citocromo *c* 550 nm, citocromo *b* 560 nm, citocromo *a* 600 nm y citocromo *d* 628 nm, utilizando el Software OLIS.

Para calcular las concentraciones de los citocromos presentes se tomaron los coeficientes de extinción reportados por *de Vrij et al*, 1987 y *Arzaquina et al*, 1999, para *B. subtilis*, donde 19.1 mM⁻¹ cm⁻¹ para **cit c + c₁**, 20 mM⁻¹ cm⁻¹ para **cit b** del complejo *bc*, 16.5 mM⁻¹ cm⁻¹ para **cit a** de la citocromo oxidasa y 17 mM⁻¹ cm⁻¹ para **cit d** de la citocromo oxidasa tipo *bd*. Finalmente, con la ecuación de la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración μM de citocromos y la cantidad relativa expresada en nmoles de cada citocromo por mg de proteína.

Ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon dc$$

Donde:

A= Absorbancia
ε= Coeficiente de extinción molar
d= distancia del paso de luz en cm (1 cm)
c= concentración molar.

Medición de actividades enzimáticas de los cuatro complejos respiratorios de las membranas aisladas.

La actividad enzimática de cuatro complejos respiratorios SDH, NADH-II, *b6c* y *caa3* se realizó utilizando el espectrofotómetro de doble haz Aminco DW2, modernización de OLIS, (usando el modo DUAL, en el que dos haces de luz con diferentes longitudes de onda pasan a través de la muestra). Para cada ensayo se utilizaron 0.3 mg de proteína de muestra y se diluyó en una relación 1:3 de volúmenes con buffer de actividad pH 7, (250 mM de sacarosa, 50 mM de fosfato de potasio monobásico, 50 mM de fosfato de potasio dibásico, 0.01% de Tween-20, 0.2 mM de EDTA y 1 mM de Azida de sodio). La muestra diluida se incubó en hielo durante media hora.

Para medir la actividad de los complejos **SDH** y **NADH-II** se usaron las longitudes de onda de 600 y 750 nm (modo DUAL) en donde se siguió la reducción del DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), se muestra un ejemplo en la Figura 7.

Se ajustó a cero la absorbancia con amortiguador de actividad añadiendo azida de sodio, (igual al amortiguador de actividad + azida de sodio 1 mM), y se agregaron los reactivos en el siguiente orden: 40 μ M DCPIP, 1mM NaCN, membranas de *B. subtilis* (0.3mg de proteína), 50 μ M NADH, 8 μ M rotenona, 40 μ M DCPIP, 5 mM succinato de sodio, 1mM PMS (Phenazine metholsufato mínimo 90% UV), 10 mM malonato, 40 μ M DCPIP (opcional) y 80 μ M DQ (Decil Quinona), en la tabla 1 se muestra la función de cada uno de los reactivos.

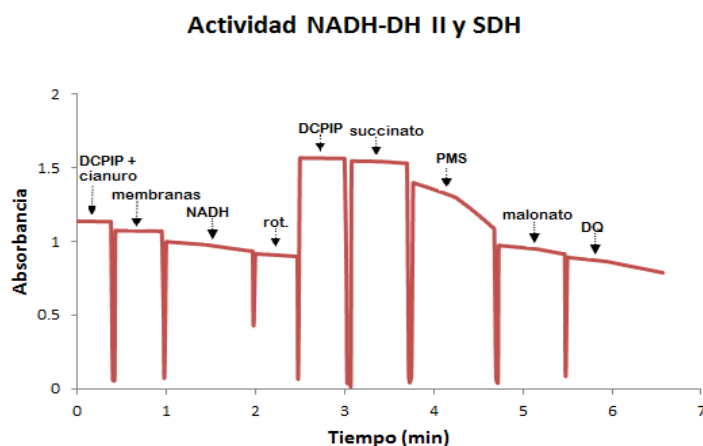


Figura 7. Trazo representativo de la medición de la actividad los complejos NADH-DH II y SDH por espectrofotometría de membranas con succinato crecidas a 23 hrs.

Tabla 1. Reactivos utilizados para medir la actividad de los complejos NADH-DH II y SDH en las membranas de *Bacillus subtilis*.

| Reactivo | Función |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amortiguador de actividad con azida de sodio. | Regulador de pH 7.0 Inhibidor del complejo IV |
| NaCN | Inhibidor de la citocromo c oxidasa (complejo IV) |
| Membranas | Membranas conteniendo a los complejos respiratorios |
| DCPIP (2,6 diclorofenolindofenol) | Aceptor artificial de electrones, cuando esta reducido es de color azul y al oxidarse cambia a incoloro. |
| NADH | Sustrato para NADH deshidrogenasa (complejo I) |
| Rotenona | Inhibidor de NADH deshidrogenasa (complejo I) |
| Succinato | Sustrato para la SDH (complejo II) |
| PMS | Aceptor de electrones soluble que recibe los electrones directamente de la quinona reducida por el complejo II, es una vía más rápida para reducir al DCPIP |
| Malonato | Inhibidor de la SDH (complejo II) |
| DQ (deci quinona oxidada) | Para verificar inhibición del complejo II |

Se tomaron las pendientes resultantes de los siguientes reactivos: NADH, rotenona, PMS y malonato. Finalmente utilizando el coeficiente de extinción del DCPIP ($22\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, de Vrij y cols., 1987) y las pendientes obtenidas del trazo y la ecuación de la ley de Lambert-Beer se calculó la velocidad de reducción (Bénit y cols., 2006).

La actividad de los complejos *b₆c* y *caa₃*, fueron medidos a longitudes de onda de 550 y 540 nm, donde se siguió la óxido-reducción del citocromo c de corazón de caballo (Figura 8).

Se utilizó amortiguador de actividad sin azida de sodio. Para medir la actividad del complejo *b₆c* se agregaron los siguientes reactivos (en orden de adición): 30 μM de citocromo c oxidado (donde se ajustó a cero la absorbancia), 1 mM de NaCN, membranas de *B. subtilis* (0.3mg de proteína), 200 μM de DBH₂ y finalmente 1 μM de Antimicina (Figura 8).

La actividad de la *caa₃* se midió agregando los siguientes reactivos (en orden de adición): 10 μM de citocromo c reducido, 8 μM de rotenona, membranas de *B. subtilis* (0.3mg de proteína) y finalmente 1mM de cianuro de sodio (Figura 8).

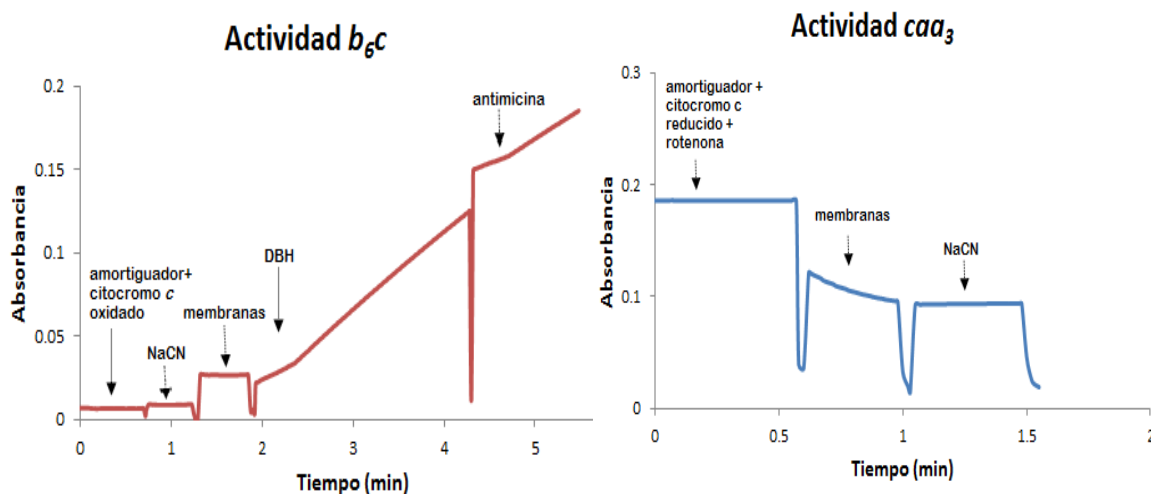


Figura 8. Trazos representativos de la medición de la actividad de los complejo b_6c y caa_3 por espectrofotometría de membranas con succinato crecidas a 23 hrs.

Tabla 2. Reactivos utilizados para medir la actividad de los complejos b_6c y caa_3 en las membranas de *Bacillus subtilis*.

| Reactivo | Función |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Amortiguador de actividad sin azida de sodio. | Regulador de pH 7.0 |
| Citocromo c reducido Abs 0.19-0.2 estable | Sustrato para la citocromo c oxidasa (complejo IV) |
| Rotenona | Inhibidor de la NADH deshidrogenasa (complejo I) |
| Membranas | Membranas conteniendo los complejos respiratorios |
| NaCN | Inhibidor del complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) |
| Citocromo c oxidado | Observación de la actividad del complejo III |
| DBH ₂ | Sustrato para la quinol: citocromo c oxidasa (Complejo III) |
| Antimicina | Inhibidor del complejo bc_1 (complejo III) |

Se tomaron las pendientes resultantes de la adición de los siguientes reactivos: membranas, cianuro de sodio, DBH₂ y antimicina. Para determinar la velocidad de reducción u oxidación del citocromo c se usó el coeficiente de extinción de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del citocromo c, reportado por Bénéit y cols., 2006, la ecuación de la ley de Lambert-Beer y las pendientes obtenidas. En la tabla 2 se muestra la función de los reactivos utilizados para medir la actividad del complejo b_6c y caa_3 .

Medición del consumo de oxígeno.

Se utilizó el equipo de unidad de control del electrodo CB1-D3 y la cámara de oxígeno del electrodo DW1 de la marca Hansatech. Se realizaron dos ensayos diferentes a temperatura ambiente para medir la actividad de las Quinol oxidasas utilizando como sustratos Ascorbato-TMPD y Succinato-Menadiona, en un amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7. El primer ensayo consistió en agregar amortiguador, posteriormente se agregaron las membranas (0.5 mg de proteína) y los reactivos en el siguiente orden: Ascorbato/TMPD (5mM ascorbato, 5 μ M Tetrametil-p-enilendiamina (TMPD), 10 mM azida de sodio (NaN₃) y 5mM NaCN. En el segundo ensayo se agregó de igual manera amortiguador para estabilizar el oxímetro y los reactivos en el siguiente orden: 20mM de Succinato, membranas (0.5mg de proteína) + 200 μ M Menadiona (incubadas por dos minutos), 10mM azida de sodio (NaN₃) y 5mM NaCN como inhibidores. Finalmente se calculó la velocidad de la pendiente de cada reactivo utilizando la concentración de nmoles de oxígeno disueltos en agua a una temperatura de 25°C correspondiente a 253.4 nmol/ml de O₂. Los valores se expresaron en nmoles de O₂ min⁻¹ mg⁻¹ (Assempour y cols., 1998).

Análisis estadístico.

Se realizó el estadístico (t-Student) para ver si hay diferencias significativas en la actividad de los complejos respiratorios en las diferentes fuentes de carbono y en los tres tiempos de crecimiento, además se puso una cuarta gráfica comparativa para observar las diferencias entre los diferentes tiempos de cultivo. Para la realización de las gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

Resultados y discusión.

1. Crecimiento de *Bacillus subtilis* en tres diferentes fuentes de carbono.

B. subtilis utiliza glucosa como fuente principal de carbono para la obtención de energía a partir de rutas metabólicas centrales como la glucólisis, el ciclo de Krebs y un sistema de fosfotransferasa de azúcares (PTS), (Stülke y Hillen, 2000; Blenkle et al, 2003).

En este trabajo se analizó el crecimiento de *B. subtilis* utilizando tres fuentes de carbono distintas a tres tiempos de crecimiento diferentes, con el fin de conocer la expresión de los complejos respiratorios de la bacteria bajo estos parámetros.

El succinato, acetato y glicerol forman parte del metabolismo aerobio de *B. subtilis* los cuales estando en el medio externo pueden incorporarse a través de proteínas acarreadoras, alimentando la cadena transportadora de electrones. Estas características los hacen buenos sustratos para la bacteria (Stülke y Hillen, 2000 Grundy y cols, 1993).

En la figura 10 se muestra el crecimiento de *B. subtilis* ante las diferentes fuentes de carbono utilizadas. En general, se observó una tendencia de crecimiento similar con succinato y glicerol en las tres fases de crecimiento (logarítmico (0-4 hrs), exponencial (4-7 hrs) y estacionario (7-23 hrs) y tiempo de duplicación (en la fase exponencial) similar. Con acetato, el tiempo de duplicación y crecimiento fue mayor durante la fase exponencial (Figura 10, Tabla 3). Grundy y cols., 1993, mencionan que el acetato es una fuente de carbono pobre para *B. subtilis*, debido a la ausencia de la derivación del ciclo del glioxilato (una variante del ciclo de Krebs), por lo que la bacteria en crecimiento con acetato requiere de la adición de una fuente intermediaria del ciclo de Krebs, como es el glutamato. Con lo reportado anteriormente, si queremos obtener tiempo de duplicación menor con esta fuente de carbono y obtener mayor rendimiento celular durante la fase celular, de la bacteria cuando se crece con acetato como fuente de carbono sería recomendable agregar glutamato como fuente de carbono extra para mejorar su crecimiento.

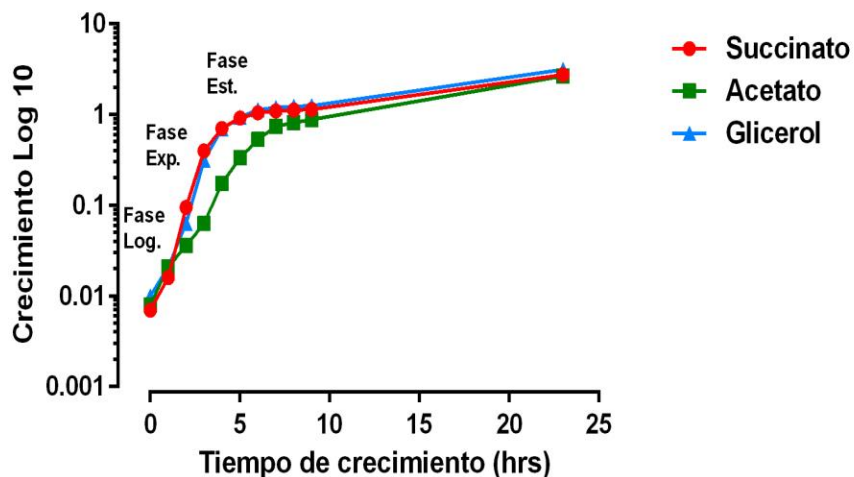


Figura 10. Curva de crecimiento representativa de *B. subtilis* en las tres fuentes de carbono. En cada tiempo se tomó la DO a 600 nm de longitud de onda. En la gráfica se indican las fases de crecimiento en la curva. Fase Est (Estacionaria), Fase Log (Logarítmica) y Fase Exp (Exponencial).

Tabla 3. Tiempo de duplicación en la fase exponencial de *B. subtilis*. Datos obtenidos de una sola curva de crecimiento.

| Fuentes de carbono | Succinato | Acetato | Glicerol |
|-----------------------------|-----------|---------|----------|
| Tiempo de duplicación (min) | 36 | 77 | 39 |

2. Obtención de células de *B. subtilis* crecidas en las tres fuentes de carbono.

Las células de *B. subtilis* se obtuvieron en abundancia a las 23 hrs de cultivo en las tres fuentes de carbono, con un promedio de 15 g/L de células (Tabla 2). En el cultivo de 5 hrs con acetato la cantidad de células obtenidas fue muy baja (2.82 gr), por lo que se crecieron dos litros de bacterias (1 L por separado) en este medio, para así obtener suficientes células para la preparación de membranas.

En la tabla 4, observamos que se obtuvo más cantidad de biomasa en el medio con glicerol, esto concuerda con lo reportado por Mukherjee y Das 2005, que evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono durante el crecimiento y la producción de biosurfactantes en cepas de *B. subtilis* DM3 y DM4, y vieron mayor producción de biomasa en el medio con glicerol.

Estos datos comprueban que el metabolismo de la bacteria difiere en las tres fuentes de carbono y en las hrs de crecimiento del cultivo. En primer lugar, tenemos un crecimiento similar de la bacteria con los medios succinato y glicerol, sin embargo, con acetato la cantidad de biomasa es menor en los tres tiempos medidos comparada con succinato y glicerol.

Tabla 4. Cantidad de células obtenidas en las diferentes fuentes de carbono. Promedio de dos extracciones diferentes.

| Fuentes de carbono | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
|--------------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|
| | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol |
| Peso húmedo (gr/L) | 5.53 | 2.82 | 5.62 | 7.42 | 3.82 | 7.72 | 14.22 | 12.93 | 17.79 |

3. Cantidad de proteína de membrana.

Se realizaron dos métodos de cuantificación de proteína con el fin de comparar los valores de concentración de proteína obtenida por ambos métodos. Para cada una de las muestras se obtuvieron cuantificaciones de proteína similares por ambos métodos (tabla 5), de esta manera corroboramos que nuestras determinaciones son correctas. La concentración de proteína de membrana en las tres fuentes de carbono aumentó conforme a las horas de crecimiento. En los medios con succinato y glicerol las concentraciones de proteína obtenida por los dos métodos fueron similares. Los resultados obtenidos fueron los esperados ya que la cantidad de proteína fue aumentando conforme las horas de crecimiento, aunque en el medio con acetato la cantidad de proteína fue similar a las 5 y 9 hrs de crecimiento y hasta las 23 hrs donde ya se presentó un aumento en la concentración. En las membranas con acetato, se obtuvo una diferencia significativa en la cantidad de proteína de membrana comparada con succinato y glicerol a las 5 y 9 hrs, mientras que a las 23 hrs hubo una mayor diferencia significativa con las membranas con succinato, (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de proteína determinada por los dos métodos espectrofotométricos (Lowry, U.V.) y proteína total (mg) de membrana en 1L de cultivo. Datos promedio de dos extracciones independientes.

| Fuentes de carbono | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | | |
|----------------------------------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-------|
| | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | |
| Volumen total (ml de Membranas) | 5.5 | 5 | 7 | 5 | 5.5 | 5.5 | 7 | 6.5 | 5.5 | |
| Proteína (mg/ml) | Lowry | 5.66 | 5.07 | 5.53 | 10.01 | 4.29 | 6.58 | 16.71 | 9.21 | 10.30 |
| | U.V | 6.79 | 5.53 | 6.70 | 8.33 | 5.26 | 9.33 | 15.08 | 9.74 | 15.67 |
| Proteína (mg totales) | 33.51 | 26.53 | 41.51 | 40.16 | 26.32 | 44.89 | 111.27 | 63.26 | 70.38 | |

4. Espectros de absorción de las membranas aisladas y concentración de citocromos.

A través de los espectros de absorción de las membranas de *B. subtilis*, se determinó el tipo y la cantidad de citocromos presentes durante el desarrollo de la bacteria en las tres fuentes de carbono. Los espectros de absorción de las membranas obtenidas se muestran por fuente de carbono y el tiempo de crecimiento para así apreciar las diferencias que se encontraron en los citocromos los cuales son componentes esenciales de la cadena respiratoria de *B. subtilis*.

En la figura 11 se muestran los espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) en un intervalo de 500 a 650 nm de longitud de onda, los citocromos presentes en las membranas se identificaron por las longitudes de onda de cada uno de ellos (entre paréntesis): cit *c* (550 nm), cit *b* (560 nm), cit *a* (600 nm) y cit *d* (628 nm), (Henning y cols., 1995; Azarkina y cols., 1999).

En la tabla 6 se muestran las longitudes de onda para cada tipo de citocromo y la tabla 7 muestra las concentraciones de cada citocromo por fuente de carbono y tiempo de crecimiento.

Tabla 6. Longitud de onda de los picos de los citocromos observados en los espectros de absorción para cada tipo de membrana a los 3 diferentes tiempos de crecimiento. ND: No Detectado.

| Fuentes de carbono | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
|--------------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|
| | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol |
| <i>Cit c</i> | 554 nm | 551 nm | 551 nm | 551 nm | 554 nm | 554 nm | 550 nm | 550 nm | 550 nm |
| <i>Cit b</i> | 557 nm | 553 nm | 558 nm | 558 nm | 558 nm | 560 nm | 558 nm | 558 nm | 558 nm |
| <i>Cit a</i> | 600 nm | 597 nm | 600 nm | 600 nm | 600 nm | 600 nm | 600 nm | 600 nm | 600 nm |
| <i>Cit d</i> | 628 nm | ND | 628 nm | ND | ND | 627 nm | ND | ND | ND |

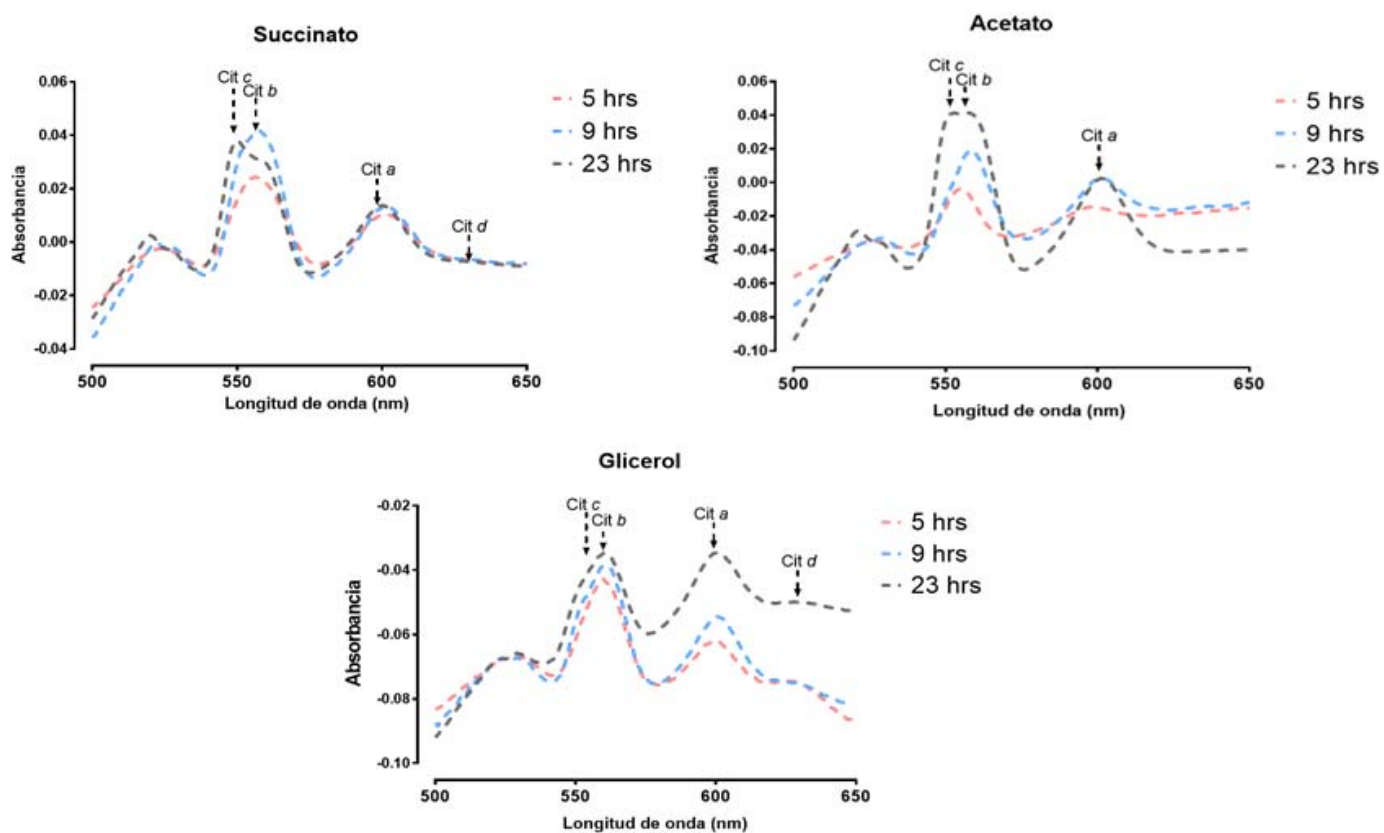


Figura 11. Espectros de absorción diferenciales (reducido con ditionita menos oxidado) de las membranas aisladas en el rango de 500 a 650 nm de longitud de onda. Se utilizaron 2 mg de proteína de las membranas para cada una de las muestras. Los picos de los citocromos fueron los siguientes: *c* (550nm), *b* (560nm), *a* (600nm) y *d* (628nm) (Henning et al., 1995; Azarkina et al., 1999).

Con succinato, la concentración y altura de los picos de los citocromos *b* y *a* fue mayor a las 9 hrs, y la concentración del citocromo *c* fue mayor a las 23 hrs. Durante las 5 hrs se detectó la presencia de un citocromo *d* (Tabla 6, Figura 7). En el medio con acetato la altura de los picos de los citocromos *c* y *b* fue mayor a las 23 hrs, al igual que la concentración de los citocromos *c*, *b* y *a*. A las 9 hrs hubo mayor concentración de citocromos *b* y *a* en las membranas con acetato. En estas membranas no se detectó la presencia del citocromo tipo *d*. Finalmente en el medio con glicerol observamos mayor concentración de los citocromos *c*, *b* y *d* a las 9 hrs (Tabla 7, Figura 11).

Los citocromos tipo *c* fueron los más notables en las membranas con glicerol y acetato a las 5 hrs de crecimiento a 551 nm de longitud de onda (Figura 11). En las membranas con succinato, el pico del citocromo *c* se encontró a 554 nm, característico del citocromo *c* del complejo *b₆c* (Figura 11, Tabla 6), reportado por de Vrij, W y cols., (1987). La concentración de citocromo *c* fue similar en los medios con succinato y glicerol, pero fue tres veces mayor en el medio con acetato (Tabla 7). Por otra parte, también se detectó la presencia del citocromo tipo *b* en las membranas crecidas a 5 hrs, con succinato un pico a 557 nm y con glicerol a 558 nm y para las membranas con acetato el pico se detectó a 553 nm (Figura 8, Tabla 5). Estos citocromos pueden ser el citocromo *b₂* del complejo SDH, y citocromo *b₁* del mismo complejo, o del citocromo *b* del complejo *b₆c* (reportado por Hägerhäll, C y cols., 1992; de Vrij, W y cols., 1987). Henning, W y cols., (1995) reportan el pico del citocromo *a* en 600 nm corresponde a la citocromo oxidasa *aa₃*. En las membranas crecidas a 5 hrs con succinato y glicerol el pico lo encontramos a 600 nm, mientras que con las membranas con acetato lo encontramos cercano a 600 nm (Figura 8).

En la tabla 7, podemos observar que las concentraciones de los citocromos *b* y *a* crecidas a 5 hrs son mayores en las membranas con glicerol y la concentración más baja la presentaron las membranas con succinato. Cabe señalar que a este tiempo encontramos también la presencia

del citocromo *d* a 628 nm en las membranas con succinato y glicerol, identificado como la oxidasa *bd* (Azarkina, N y cols., 1999).

A las 9 hrs, se observó un aumento en la concentración de los citocromos *c*, *b* y *a* en las tres fuentes de carbono (Tabla 7). La concentración más alta del citocromo *c* se obtuvo en las membranas con succinato, encontramos el pico a 551 nm, correspondiente al citocromo *c*-551 (*cccB*) que es una lipoproteína, cuya función se ha sugerido que es un sustrato de un citocromo *c* oxidasa alterna y distinta al tipo *caa₃* (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002; Kay y cols., 1997). Por otro lado, en las membranas con acetato y glicerol el pico lo encontramos a 554 nm (Figura 11, Tabla 6) perteneciente a QcrC, subunidad del complejo *b₆c* (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002; de Vrij, W y cols., 1987). El citocromo tipo *b* en las membranas con succinato y acetato lo encontramos cercano a 558 nm atribuible a la SDH, la concentración más alta de este citocromo se obtuvo en las membranas con acetato (Tabla 7). En las membranas crecidas con glicerol se identificó un citocromo tipo *b* a 560 nm que puede ser atribuido al citocromo *b* de la oxidasa terminal tipo *bd*; ya que en estas membranas se observó un pico a 627 nm que puede ser el citocromo *d* de la oxidasa terminal *bd* (Azarkina, N y cols., 1999). La concentración del citocromo *a* fue similar en las membranas con succinato y acetato y menor en las membranas con glicerol. En las tres fuentes de carbono el pico del citocromo *a* se encontró a 600 nm (Tabla 6, Figura 11). Conforme la bacteria va entrando a la fase estacionaria podemos ver aumento de la concentración de los citocromos en cada fuente de carbono. En las tres fuentes de carbono encontramos el citocromo *c* a 550 nm correspondiente al citocromo *caa₃* (Tabla 6), sin embargo, la concentración fue más alta con acetato seguido del medio con succinato y finalmente glicerol (Tabla 7). Este último medio presentó menor concentración de citocromo *c* y *b* a las 23 hrs con respecto a las concentraciones obtenidas a las 9 hrs (Tabla 7). Los citocromos *b* se encontraron a 558 nm en las tres fuentes de carbono (Tabla 6), nuevamente atribuible a la SDH, la concentración más alta de este citocromo fue con acetato. Esto puede deberse a que el acetato

puede ser regulado mediante la vía acetil-CoA sintetasa para la interconversión de acetato a acetil-CoA e incorporarse al ciclo de Krebs para poder reducir a la SDH en la cadena respiratoria (Grundy y cols., 1993).

A las 23 hrs encontramos al citocromo *a* a 600 nm en las tres fuentes de carbono (Tabla 6). Debido a que no encontramos los mismos picos de absorción en las membranas, estos datos nos sugieren que la expresión de los citocromos se adapta a las horas de crecimiento y las fuentes de carbono.

Tabla 7. Concentración relativa de citocromos expresados en nmoles de cit/mg de proteína. Datos promedio de dos extracciones independientes. ND: No Detectado.

| Fuentes de carbono | | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
|---------------------------|--------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|
| | | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol |
| nmoles de cit/mg proteína | <i>Cit c</i> | 0.218 | 0.600 | 0.220 | 0.910 | 0.780 | 0.605 | 1.150 | 1.510 | 0.575 |
| | <i>Cit b</i> | 0.255 | 0.430 | 0.530 | 0.759 | 1.115 | 0.730 | 0.933 | 1.510 | 0.635 |
| | <i>Cit a</i> | 0.096 | 0.140 | 0.240 | 0.405 | 0.445 | 0.270 | 0.546 | 0.740 | 0.370 |
| | <i>Cit d</i> | 0.017 | ND | 0.148 | ND | ND | 0.130 | ND | ND | ND |

Se obtuvo el cociente de hemos con los datos de la tabla 6 con el fin de obtener las proporciones de citocromos y ver qué complejos respiratorios podrían estar presentes en cada una de las membranas en los tres tiempos de crecimiento (Tabla 7).

Tabla 8. Cociente de hemos, calculados a partir de los nmoles/mg de proteína obtenidos en los citocromos. ND: No Detectado.

| Fuentes de carbono | | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
|--------------------|------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|---------|----------|
| | | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol |
| Cociente de hemos | <i>b:c</i> | 1.16 | 0.71 | 2.40 | 0.83 | 1.42 | 1.20 | 0.81 | 1.00 | 1.10 |
| | <i>a:c</i> | 0.43 | 0.23 | 1.09 | 0.44 | 0.57 | 0.44 | 0.47 | 0.49 | 0.64 |
| | <i>b:a</i> | 2.65 | 3.07 | 2.20 | 1.87 | 2.50 | 2.70 | 1.70 | 2.04 | 1.71 |
| | <i>b:d</i> | 15 | ND | 3.58 | ND | ND | 5.61 | ND | ND | ND |

Podemos observar que en las membranas crecidas a 5 hrs la proporción de $b:c$ fue >1 en las membranas con glicerol y <1 en las membranas con acetato (Tabla 8). La relación $b:c$ nos sugiere la presencia de los complejos b_6c y SDH (Hägerhäll y cols., 1992; Yu y cols., 1995)

Por otro lado, los picos alfa de los citocromos a las 5 hrs de crecimiento son diferentes en las tres fuentes de carbono. El pico más alto de los citocromos c y b se presenta en las membranas crecidas con glicerol, a continuación, las membranas con succinato y finalmente acetato, mismos que se mantienen a las 9 hrs de crecimiento (Figura 11). La relación de hemos ($b:c$) a las 9 hrs de crecimiento la proporción fue ligeramente más alta en las membranas con acetato comparada con glicerol y succinato. A las 23 hrs de crecimiento en las tres fuentes de carbono los picos de los citocromos son diferentes (Figura 11), sin embargo, la proporción de $b:c$ se mantuvo en las membranas con succinato y disminuyó ligeramente en las membranas con acetato y glicerol (Tabla 8). En la misma, podemos observar que la proporción de $a:c$ se mantuvo constante en casi todas las membranas en las tres hrs de crecimiento, excepto por las membranas con glicerol a las 5 hrs en donde se presenta la mayor proporción de $a:c$ indicativos de la presencia del complejo caa_3 (Henning, W y cols., 1995).

La proporción de hemos $b:a$ nos podría indicar la presencia del complejo SDH (Hägerhäll, C y cols., 1992), y de las quinol oxidasas aa_3 , bd y bb . Como se puede ver en la tabla 8, la proporción de hemos $b:a$ fue mayor en todas las membranas comparada con $b:c$ y $a:c$. Durante el crecimiento a las 5 hrs, la proporción de $b:a$ fue mayor en las membranas con acetato, luego succinato y finalmente glicerol. En las membranas con succinato y glicerol encontramos un pico de absorción a 628 nm atribuible a la quinol oxidasas bd , con la proporción más alta de $b:d$ en las membranas con succinato comparado con glicerol; en estas últimas membranas observamos que el pico a 628 nm se mantuvo hasta las 9 hrs de crecimiento (Figura 11, Tabla 6). Esta información puede ser comparable al trabajo realizado por Azarkina, N y cols., (1999), donde encuentran a la quinol

oxidasa *bd* y *bb* en la mutante LUH27 de *B. subtilis* (que carece de la citocromo oxidasa *caa₃* y la quinol oxidasa *aa₃*) crecida con glucosa como fuente de carbono.

5. Actividad de los complejos respiratorios por espectrofotometría.

5.1 Complejo NADH-DH II.

El complejo NADH deshidrogenasa es un componente clave en la cadena respiratoria, ya que es la primera enzima de la misma. El NADH se oxida por dos enzimas alternativas, NADH: quinol oxidoreductasa, que transloca protones y conserva la energía redox en un gradiente de protones y NADH deshidrogenasa tipo II, la cual no transloca protones. La NADH deshidrogenasa es regulada de manera diferente a partir de las enzimas del ciclo de Krebs (Molenaar y cols., 2000). En crecimiento con fuentes de carbono, el NADH es el donador de electrones más importante para la cadena respiratoria (Gyan y cols., 2006; Bongaerts et al., 1995); sin embargo, se ha visto que, en bacterias crecidas con diferentes fuentes de carbono, la regulación del complejo NADH-DH II es diferente de acuerdo a las fuentes de carbono utilizadas por la bacteria (Sakurai y cols., 2011; Bongaerts et al., 1995).

Conforme la bacteria va creciendo, la actividad de NADH-DH II va aumentando en las membranas con succinato y glicerol, sin embargo, en las membranas con acetato la actividad es similar a las 5 y 23 hrs, con una disminución ligera a las 9 hrs (Tabla 9, Figura 12). A este respecto, encontramos datos comparables al nivel de expresión de gen de la enzima, de *Acetobacter aceti* en donde la expresión del gen *ndh* para el complejo NADH-DH II fue menor con acetato como fuente de carbono en comparación con glucosa (Sakurai y cols., 2011).

La actividad del complejo NADH-DH II (Figura 12), a las 5 hrs de crecimiento fue mayor en las membranas con glicerol seguido de las membranas con succinato y finalmente acetato. En las membranas crecidas a 5 hrs con los medios succinato y glicerol se presentaron diferencias significativas ($p < 0.01$).

La actividad de la NADH-DH II a las 9 hrs fue significativamente diferente en las tres fuentes de carbono. Al entrar a la fase estacionaria, la actividad fue mayor en las membranas con succinato (Tabla 9, Figura 12). A las 23 hrs del cultivo, se observaron diferencias significativas de la actividad de NADH-DH II entre las tres fuentes de carbono, por lo que podríamos decir que la enzima va adquiriendo adaptación, principalmente en las membranas con succinato (Figura 12). Esto es comparable con el crecimiento aeróbico de la bacteria *E. coli* con succinato, acetato y glucosa, en donde los equivalentes reductores como NADH, son suministrados a la cadena respiratoria, suponiendo una completa oxidación de los sustratos utilizados (Bongaerts et al., 1995).

Tabla 9. Actividad del complejo NADH-DH II en *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Fuente de carbono | Actividad de la enzima NADH-DH II (nmol de DCPIP red min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína) | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| | 5 hrs. | 9 hrs. | 23 hrs. |
| Succinato | 36.56±1.70 (n=6) | 53.85±2.63 (n=6) | 130.8±3.42 (n=6) |
| Acetato | 35.30±5.09 (n=6) | 24.82±1.76 (n=6) | 36.27±1.60 (n=6) |
| Glicerol | 49.40±5.08 (n=8) | 76.49±3.48 (n=6) | 73.42±0.97 (n=6) |

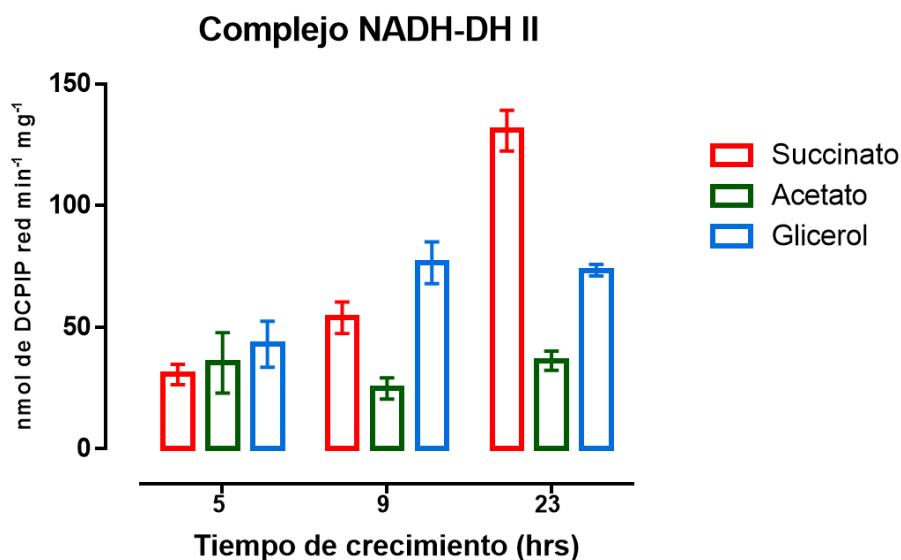


Figura 12. Actividad del complejo NADH-DH II expresada en nmoles de DCPIP red min⁻¹ mg⁻¹ en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento. Datos de dos extracciones independientes, tres mediciones para cada extracción.

En un estudio realizado por Molenaar y cols., (2000), en la bacteria *Corynebacterium glutamicum*, durante crecimiento exponencial en diversas fuentes de carbono, se encontró que la actividad de la NADH-DH II puede estar relacionada con el grado de reducción del sustrato. En este caso la actividad más alta se encontró en las células crecidas con manitol y una oxidación completa de este sustrato genera un equivalente reductor extra de NADH en comparación a la oxidación de la glucosa o acetato, donde la actividad es más baja. Este efecto generado en las diferentes fuentes de carbono en la actividad de la enzima en *C. glutamicum* puede estar ocurriendo en nuestras membranas crecidas a 23 hrs ya que la actividad más alta se presentó en las membranas crecidas con succinato generando un equivalente reductor extra de NADH (en la glucólisis) en comparación a las membranas con glicerol y acetato. Lo que también podría estar ocurriendo a las 9 y 5 hrs en las membranas con glicerol donde la actividad es más alta comparada con succinato y acetato (Tabla 9, Figura 12).

5.2. Complejo SDH.

En el artículo de Park y cols., (1995), se menciona que a partir de mediciones de la actividad enzimática de SDH en células crecidas bajo diferentes condiciones, se presentan niveles elevados de la enzima en condiciones aeróbicas con glucosa como fuente de carbono. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que nuestras condiciones de crecimiento fueron aeróbicas, aunque no utilizamos glucosa como fuente de carbono encontramos un aumento considerable de la actividad de la enzima en nuestras fuentes de carbono. Sin embargo, observamos que la actividad del complejo SDH fue menor en las membranas con glicerol y mayor en las membranas con acetato (Figura 13). Por lo tanto, suponemos que hay una preferencia por la fuente de carbono utilizada.

A diferencia de la actividad de la NADH-DH II, la actividad del complejo SDH fue mayor en las membranas con acetato en los tres tiempos de crecimiento (Tabla 10, Figura 13). El acetato se incorporó al ciclo de Krebs a través de la acetil-CoA sintetasa para la interconversión de acetato a acetil-CoA y llegar al succinato a través del ciclo de Krebs, generando tres moléculas de NADH. A las 5 hrs de crecimiento la actividad fue similar en las membranas con succinato y glicerol, sin embargo, en esta última fuente de carbono la actividad disminuyó a las 9 hrs de crecimiento, mientras que en las membranas con succinato y acetato hay un aumento de más del 50 % en la actividad (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad del complejo SDH en *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Fuente de carbono | Actividad de la enzima SDH (nmol de DCPIP red min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína) | | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | 5 hrs. | 9 hrs. | 23 hrs. |
| Succinato | 37.11±4.16 (n=6) | 67.22±0.64 (n=6) | 234.4±15.64 (n=6) |
| Acetato | 89.92±5.83 (n=6) | 220.7±10.69 (n=6) | 281.7±21.79 (n=6) |
| Glicerol | 22.05±2.12 (n=6) | 13.98±1.18 (n=6) | 40.43±1.11 (n=6) |

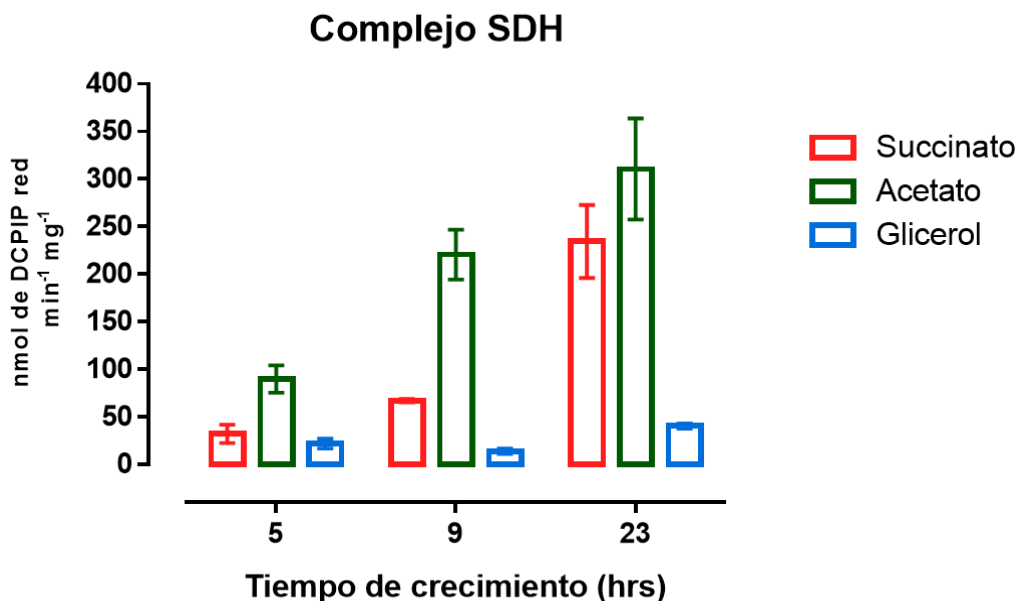


Figura 13. Actividad del complejo SDH expresada en nmoles de DCPIP red min⁻¹ mg⁻¹ en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento. Datos de dos extracciones independientes, tres mediciones para cada extracción.

A partir de las 5 y 9 hrs de crecimiento se pueden apreciar diferencias significativas entre las membranas de bacterias crecidas con acetato contra succinato y glicerol. Al entrar a la fase estacionaria la actividad de las membranas con succinato aumentó de manera similar a las membranas con acetato, sin embargo, en las membranas con glicerol la actividad aumentó con respecto a los tiempos anteriores, pero siguió siendo más baja que las otras dos fuentes de carbono (Tabla 10, Figura 13).

Retomando los espectros de absorción la proporción de *b:a* fue mayor en las membranas con acetato, luego succinato y finalmente glicerol, lo que concuerda con la actividad del complejo SDH, y presentó la misma tendencia a 9 y 23 hrs de crecimiento.

A nivel de regulación de la expresión del operón *sdhCDAB* de la succinato deshidrogenasa de *E. coli*, Park y cols., (1995) midieron la actividad de la expresión de *sdhC-lacZ* en células crecidas aeróbica y anaeróbicamente con diferentes fuentes de carbono. La mayor expresión se obtuvo en la cepa WT en condiciones aeróbicas en el medio con acetato, seguido de fumarato y una disminución de la expresión de *sdhC-lacZ* en los medios con succinato y glicerol siendo iguales los valores. Estos datos son parecidos a los obtenidos por nosotros, la actividad de la SDH fue mayor con acetato seguido de succinato y finalmente glicerol en los tres tiempos de crecimiento (Figura 13).

5.3. Complejo *b_{6c}*.

En este trabajo, observamos que el complejo *b_{6c}*, presentó una actividad baja comparándola con la actividad de los complejos NADH-DH II y SHD (Tablas 9 y 10). A las 5 hrs de crecimiento se mostró una actividad similar en las tres fuentes de carbono habiendo diferencias significativas ($P < 0.005$) en los medios de acetato y glicerol (Figura 14). Durante el crecimiento exponencial (9 hrs) la actividad se incrementó al doble, sin diferencias significativas entre las tres fuentes de carbono. A las 23 hrs de crecimiento si se obtuvieron diferencias significativas entre fuentes de

carbono. La actividad aumentó en las membranas de glicerol y acetato, siendo este último el de mayor actividad (Figura 14). Por otro lado, en las membranas con succinato se obtuvo la misma actividad a las 9 y 23 hrs de crecimiento (Figura 14).

Tabla 11. Actividad del complejo b_6c en *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Fuente de carbono | Actividad de la enzima b_6c (nmol de Citocromo c red $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| | 5 hrs. | 9 hrs. | 23 hrs. |
| Succinato | 3.23±0.14 (n=6) | 9.21±0.89 (n=6) | 9.32±0.53 (n=6) |
| Acetato | 3.61±0.10 (n=6) | 8.88±0.88 (n=6) | 12.43±0.82 (n=6) |
| Glicerol | 2.68±0.14 (n=6) | 7.38±0.61 (n=6) | 9.53±0.29 (n=6) |

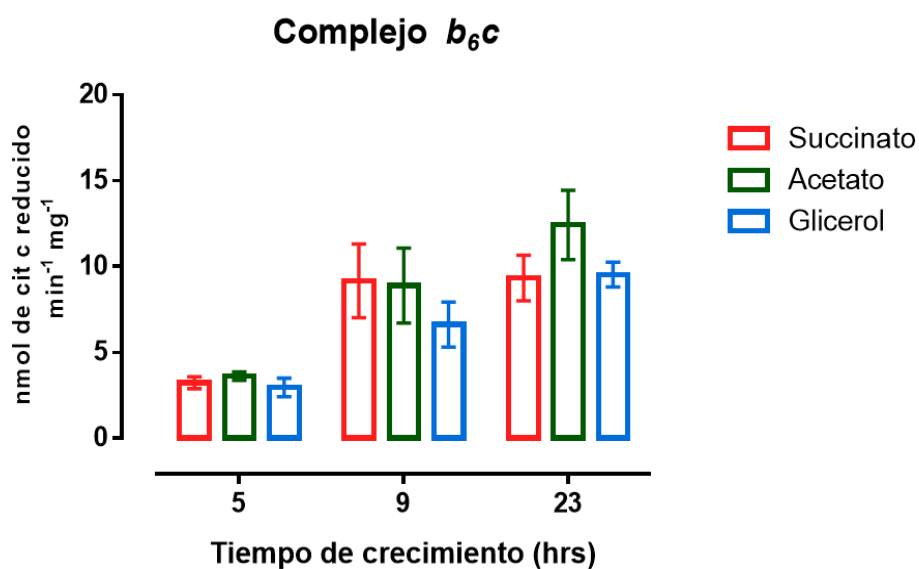


Figura 14. Actividad del complejo b_6c en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento. Actividad expresada en nmoles de citocromo c red $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Datos de dos extracciones independientes. Tres mediciones para cada extracción.

Para medir la actividad del complejo b_6c utilizamos como sustrato DBH₂ (Decil ubiquinol). Este sustrato se utiliza para medir la actividad del complejo bc_1 en mitocondrias de levadura (Gutierrez-Cirlos y Trumpower, 2002). Sin embargo, para *B. subtilis* no es el sustrato adecuado ya que el

DBH₂ es una benzoquinona y no una naftoquinona. La actividad del complejo de levadura es alrededor de 150 nmol de citocromo *c* red min⁻¹ mg⁻¹ (datos obtenidos en el laboratorio).

En nuestro laboratorio se han realizado estudios para encontrar un buen sustrato para medir la actividad de complejo *b₆c* utilizando diferentes naftoquinonas sintéticas realizando una comparación contra el DBH₂. Hasta el momento se encontraron dos naftoquinonas: Juglona y Naftazarina que lograron estimular la actividad del complejo *bc* (García, 2010). Se sugiere utilizarlas para continuar con estos estudios.

5.4. Complejo *caa₃*.

La citocromo *c* oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular en una transferencia de cuatro electrones y cuatro protones en una reacción paso a paso para utilizar la energía libre de esta reacción y generar un gradiente de protones a través de la membrana (H. Richter y Ludwing, 2009).

La citocromo oxidasa *caa₃* de *B. subtilis* pertenece a la súper familia citocromo oxidasa. La diferencia clave en el citocromo *caa₃* radica en la adición de un dominio, homólogo al citocromo *c* mitocondrial, que se fusiona con el extremo C-terminal de su subunidad II (Assempour y cols., 1998).

Durante la fase de crecimiento logarítmico (5 hrs) la actividad del complejo *caa₃* fue nula en las tres fuentes de carbono (), al medir la actividad enzimática no se observó pendiente representativa de la actividad de la enzima. Conforme va creciendo el cultivo (9 hrs), se observó mayor actividad en las membranas con succinato, no así en las membranas con acetato y glicerol (Tabla 12, Figura 15). Y finalmente en la fase estacionaria (23 hrs), se presentó una mayor actividad en las membranas con succinato y acetato sin diferencias significativas entre ambas. En cambio, en las membranas con glicerol la actividad permaneció baja, pero aumentó 50% con respecto a lo obtenido a las 9 hrs (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad del complejo *caa₃* en *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Fuente de carbono | Actividad de la enzima <i>caa₃</i> (nmol de Citocromo c red min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína) | | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| | 5 hrs. | 9 hrs. | 23 hrs. |
| Succinato | 0.33±0.06 (n=6) | 8.28±0.48 (n=6) | 23.73±0.99 (n=6) |
| Acetato | 0.30±0.10 (n=6) | 2.75±0.27 (n=6) | 23.10±1.45 (n=6) |
| Glicerol | 0.23±0.03 (n=6) | 1.76±0.22 (n=6) | 3.73±0.34 (n=6) |

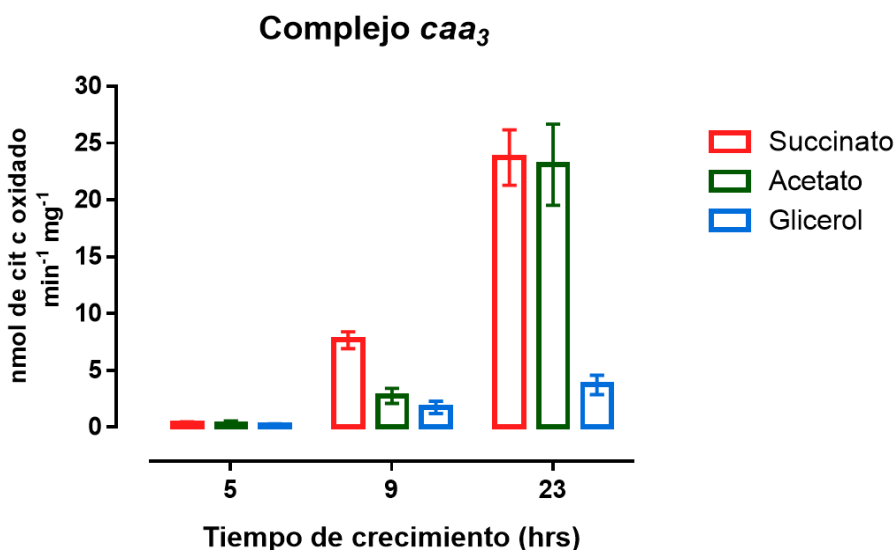


Figura 15. Actividad del complejo *caa₃* en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento. Actividad expresada en nmoles de citocromo c red min⁻¹ mg⁻¹. Datos de dos extracciones independientes. Tres mediciones para cada extracción.

Cabe la posibilidad de que otras oxidasas terminales se estén expresando en las membranas con glicerol en los tres tiempos de crecimiento. Debido a la presencia del citocromo *d* en las membranas con succinato y glicerol 5 y 9 hrs y un pequeño hombro a las 23hrs (Tabla 12, Figura 15), podemos intuir que se esté expresando la quinol oxidasa tipo *bd* más que la *caa₃*, debido a que hay más proporción de citocromos *b:d* sobre *a:c* (Tabla 12). Por lo tanto, podríamos decir que succinato y glicerol como fuentes de carbono favorecen más la expresión de la quinol oxidasa *bd* que del citocromo oxidasa *caa₃*. Estos resultados son interesantes pues no hemos encontrado trabajos en donde se documente la expresión de esta quinol oxidasa utilizando otras fuentes de

carbono, ya que los reportes que hay utilizan glucosa como fuente de carbono (Winsted y cols., 1998; Azarkina, N y cols., 1999).

Finalmente apreciamos una mayor actividad del complejo a partir de las 9 hrs y 23 hrs de crecimiento en las membranas con succinato y en las membranas con acetato a las 23 hrs. Las actividades fueron similares en ambas fuentes de carbono, lo que concordó con los espectros de absorción ya que la proporción de a:c es similar en ambas (Tabla 12, Figura 15). Estos datos concuerdan con lo reportado por Henning y cols., (1995), donde purifican al citocromo oxidasa *caa₃* y *aa₃* en membranas de *B. subtilis* utilizando succinato como fuente de carbono. Lo interesante es que la actividad con succinato y acetato fueron iguales, pensamos que esto puede deberse a que ambos sustratos provienen de ciclo de Krebs.

6. Actividad de Succinato y Ascorbato-TMPD Oxidasas.

Como se mencionó, la cadena transportadora de electrones de *B. subtilis* tiene dos ramas de acarreadores de los electrones: una con la citocromo oxidasa *caa₃* y otra con quinol oxidasas (*aa₃*, *bd'* y *la bb'*) como aceptores terminales de electrones (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000; Arzakina y cols., 1999).

En este trabajo se evaluó la actividad de las oxidasas terminales utilizando como sustratos Succinato + Menadiona (Análogo de la menaquinona y precursor de la biosíntesis de la menaquinona) y Ascorbato TMPD como donador artificial de electrones para la citocromo *caa₃*, e inhibidores como el azida de sodio para la *caa₃* y el cianuro que se une al citocromo *a₃* y al citocromo c del citocromo *caa₃*.

6.1. Succinato-Oxidasa.

En el ensayo con succinato+menadiona se observó aumento en el consumo de oxígeno en las membranas con acetato a las tres horas de crecimiento del cultivo, la mayor actividad se obtuvo a las 9 hrs, algo similar ocurre en las membranas con succinato donde el consumo de oxígeno

fue menor (alrededor del 50% más bajo) en las tres etapas de crecimiento comparado con las membranas con acetato, y de igual manera el mayor consumo se presentó durante las 9 hrs de crecimiento (Tabla 13, Figura 16). Por otro lado, en las membranas con glicerol observamos que el consumo de oxígeno fue bajo, no habiendo diferencias significativas entre las 9 y 23 hrs de crecimiento.

Estos resultados son similares a lo que obtuvimos en las mediciones del complejo SDH por espectrofotometría (Figura 13), con la misma tendencia en las fuentes de carbono siendo mayor acetato>succinato y >glicerol.

Tabla 13. Actividad de Succinato-Oxidasa de *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Condiciones del ensayo | nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
| | succinato | acetato | glicerol | succinato | acetato | glicerol | succinato | acetato | glicerol |
| Succinato + menadiona | 10.23±1.17 (n=6) | 23.85±2.09 (n=6) | 5.76±1.75 (n=6) | 18.74±0.41 (n=6) | 45.46±6.63 (n=6) | 7.81±2.22 (n=6) | 14.15±2.77 (n=6) | 32.85±5.24 (n=6) | 7.96±0.68 (n=6) |
| Azida de sodio | 7.64±2.13 (n=6) | 21.16±2.82 (n=6) | 3.05±1.03 (n=6) | 15.8±1.30 (n=6) | 45.67±4.80 (n=6) | 6.68±1.24 (n=6) | 11.26±2.65 (n=6) | 27.6±5.85 (n=6) | 6.56±0.82 (n=6) |
| Cianuro | 12.55±1.49 (n=6) | 29.19±4.34 (n=6) | 5.71±0.66 (n=6) | 17.16±0.98 (n=6) | 41.36±2.59 (n=6) | 9.77±2.93 (n=6) | 11.48±1.84 (n=6) | 29.30±4.29 (n=6) | 6.77±1.18 (n=6) |

Bisschop y Konings, (1976), midieron la actividad de la NADH y SDH deshidrogenasas con y sin menadiona en la bacteria *B. subtilis AroD* deficiente de menaquinona y *B. subtilis W23*, en ambas bacterias observaron que tanto el consumo de oxígeno de la NADH y SDH deshidrogenasas se ve estimulado al agregar Menadiona. La actividad de la NADH oxidasa fue mayor (1632 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) a la SDH (49 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína). Este último valor coincide con lo que obtuvimos en las membranas con acetato al agregar Succinato+Menadiona (45 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) a las 9 hrs de crecimiento. Bisschop y Konings, (1976), realizaron las mediciones de las membranas en fase logarítmica, utilizando D-L-malato como fuente de carbono.

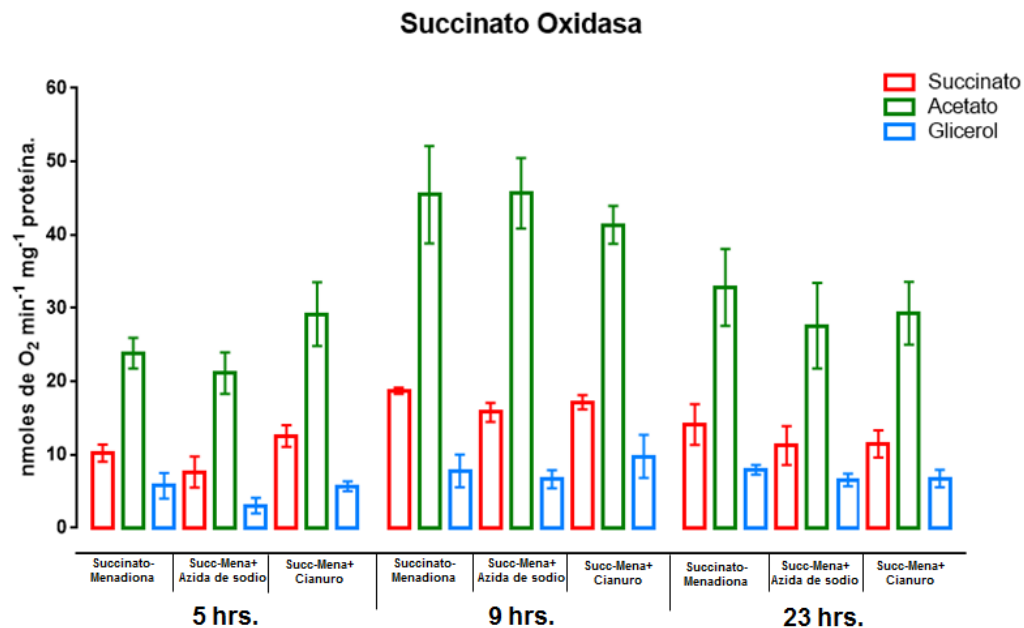


Figura 16. Actividad de la Succinato-Oxidasa en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento, expresada en $\text{nmol de O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Datos de dos extracciones independientes. Tres mediciones para cada extracción.

En la figura 16 vemos que la actividad de succinato oxidasa resultó más alta en la mayoría de los casos con cianuro comparado con azida de sodio. En las membranas con acetato observamos mayor actividad en los tres tiempos de crecimiento. Al usar estos dos inhibidores vemos que con azida de sodio hay una ligera inhibición en casi todas las membranas, excepto en acetato 9 hrs en donde se presentó la única inhibición con cianuro (Tabla 13, Figura 16).

Finalmente, a las 23 hrs de crecimiento el consumo de oxígeno disminuyó en las membranas con succinato y acetato comparado con las 9 hrs de crecimiento, aunque de nuevo, las membranas con acetato son las que siguen tuvieron mayor consumo de oxígeno comparado con succinato y glicerol (Tabla 12).

Con estos resultados podemos ver la existencia de otras oxidasa terminales en las membranas aisladas. Si comparamos lo observado en los espectros de absorción podríamos decir que en las membranas con succinato y glicerol se estén expresando la quinol oxidasa tipo *bd* y posiblemente la *bb'* ya que en estas membranas encontramos el pico del *cit d*. Se ha reportado la quinol oxidasa tipo *bd* en *E. coli* crecida con glucosa, *P. aeruginosa* crecida con succinato y *G. oxydans* como

insensible al cianuro, lo cual concuerda con nuestros resultados (Miura y cols., 2013; Cunningham y cols., 1997),

Cabe destacar que el mayor consumo de oxígeno en los tres tiempos de crecimiento se obtuvo con las membranas con acetato, aunque en estas membranas no observamos la presencia del *cit d* por lo que pensamos que la quinol oxidasa tipo *bb'* pueda estarse expresando.

6.2. Ascorbato-TMPD Oxidasa.

El citocromo oxidasa *caa₃* utiliza TMPD eficientemente como donador artificial de electrones y todo el flujo en este ensayo es acarreado por el citocromo *c* endógeno, una vez reducido por el Ascorbato, (Henning y cols., 1995).

En este ensayo pudimos observar que durante las 5 hrs de crecimiento la velocidad de consumo de oxígeno fue baja, a partir de las 9 hrs de crecimiento aumentó la velocidad del consumo de oxígeno en las tres fuentes, pero en mayor medida en las membranas con succinato y para acetato y glicerol la velocidad fue similar (Tabla 13). A las 23 hrs el consumo de oxígeno aumentó en las membranas con succinato y acetato siendo mayor en esta última fuente de carbono, mientras en las membranas con glicerol no hubo aumento en el consumo de oxígeno (Figura 17).

Tabla 13. Actividad de Ascorbato-TMPD Oxidasa de *Bacillus subtilis* en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

| Condiciones del ensayo | nmol O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|
| | 5 hrs | | | 9 hrs | | | 23 hrs | | |
| | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol | Succinato | Acetato | Glicerol |
| Ascorbato-TMPD | 5.03±0.97 | 5.19±0.74 | 4.22±0.94 | 16.07±3.29 | 9.05±2.83 | 8.90±1.28 | 23.05±3.18 | 36.21±3.02 | 8.13±0.87 |
| | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) |
| Azida de sodio | 5.25±0.78 | 5.34±0.84 | 4.47±0.99 | 12.83±2.02 | 7.59±2.55 | 9.46±1.39 | 18.28±1.93 | 22.68±2.12 | 6.69±1.33 |
| | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) |
| Cianuro | 14.74±1.37 | 17.84±5.33 | 10.61±1.87 | 14.69±1.91 | 21.75±4.15 | 24.92±3.2 | 17.49±1.30 | 27.88±1.58 | 14.29±2.4 |
| | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) | (n=6) |

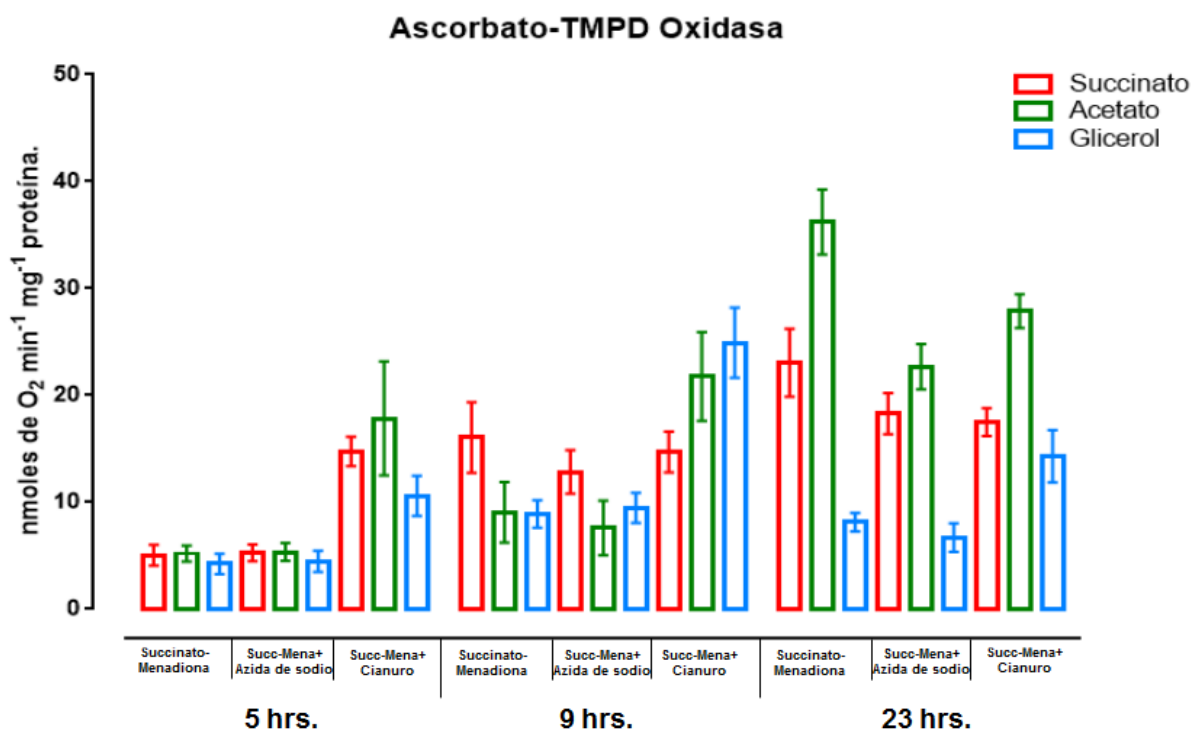


Figura 17. Actividad de la Ascorbato-TMPD Oxidasa en las tres fuentes de carbono a los tres tiempos de crecimiento, expresada en nmoles de O₂ min⁻¹ mg⁻¹. Datos de dos extracciones independientes. Tres mediciones para cada extracción.

Estos resultados concuerdan con la medición del hemo *a-a₃* por espectrofotometría para las membranas con glicerol, ya que la concentración de este citocromo es pequeña. Con estos datos podemos reforzar más nuestra teoría sobre la presencia de otra quinol oxidasa principalmente la tipo de *bd*, y que en estas membranas principalmente hay poca *caa₃*, mientras que en acetato y glicerol hay más cantidad durante las 23 hrs de crecimiento (Tabla 11, Tabla 13).

Comparado con el ensayo Succinato-Menadiona, en Ascorbato-TMPD vimos que no hay inhibición a las 5 hrs de crecimiento con azida de sodio en las tres fuentes de carbono (Tabla 13), a partir de las 9 hrs ya observamos una ligera inhibición en las membranas con succinato y acetato, la cual se mantuvo hasta las 23 hrs de crecimiento. En este tiempo de crecimiento, hubo una mayor inhibición en las membranas con acetato comparada con succinato y glicerol. Estos datos nos indican que en acetato la citocromo *caa₃* es la oxidasa predominante lo que concuerda con los valores de actividad del complejo obtenidos por espectrofotometría (Figura 12).

Al igual que el ensayo Succinato-Menadiona, en el consumo de oxígeno aumentó al agregar cianuro incluso fue mayor la pendiente que al agregar Ascorbato-TMPD (Tabla 13). Esto nos llamó la atención pues el trabajo realizado por Sousa y cols., 2013, encontraron una inhibición del 100% al agregar cianuro de potasio al medir la actividad con Ascorbato-TMPD. Es posible que nuestras diferencias se deban a que ellos incubaron las membranas previamente con el inhibidor durante 10 minutos antes de realizar la medición del consumo de oxígeno y en nuestro caso nosotros no realizamos el ensayo de esa manera, ya que nosotros agregamos el inhibidor directo a las membranas durante la medición en el oxímetro.

Con los resultados vistos hasta el momento, podemos decir que dependiendo de las condiciones de crecimiento, en particular la naturaleza de los sustratos de carbono, *B. subtilis* ajusta su metabolismo energético en el proceso denominado Represión Catabólica por Carbono; este proceso en bacterias Gram positivas no parece ser utilizado solo en el control de la expresión de operones catabólicos, sino también para coordinar las funciones metabólicas de la célula en respuesta a la disponibilidad de los elementos esenciales necesarios para el crecimiento celular (Monedero y cols., 2001).

En la figura 18, se muestran esquemas representativos de la cadena respiratoria de *B. subtilis* en donde se aprecia el comportamiento de los complejos respiratorios con cada una de las fuentes de carbono, durante los tres tiempos de crecimiento, los valores indicados en flechas representan la actividad obtenida de los complejos en nmoles de sustrato usado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Como se puede ver el metabolismo difiere ampliamente a partir de la absorción del sustrato, la actividad de las membranas con succinato y acetato fueron de manera similar en la mayoría de los casos. Con glicerol la actividad se redujo significativamente.

La respuesta a la represión catabólica por carbono en la cadena transportadora de electrones en regulación por varias vías distintas en respuesta a la fuente de carbono se ha reportado en

mitocondrias de *S. cerevisiae* encontrando niveles reprimidos de citocromos en células cultivadas con galactosa (Jin y cols., 2007).

Enzimas que participan en la excreción de carbono son estimuladas por la presencia de glucosa. En *B. subtilis*, enzimas del ciclo de Krebs o proteínas de la cadena respiratoria como la succinato deshidrogenasa, citocromo *c₅₅₀* y *c₅₅₁*, y citocromo c oxidasa *caa₃*, son reprimidos en presencia de glucosa (Melin y cols., 1989; Monedero y cols., 2001). Bajo condiciones aeróbicas de crecimiento, cuando una fuente de carbono rápidamente metabolizable está presente, la fosforilación oxidativa se minimiza bajo las condiciones de represión de la síntesis de enzimas del ciclo de Krebs y proteínas de la cadena respiratoria, la presencia de carbohidratos rápidamente metabolizables puede estimular la expresión de genes glucolíticos, obteniendo suficiente energía de la glucólisis, (Monedero y cols., 2001).

7. Modelos de la cadena respiratoria de *B. subtilis* en las diferentes condiciones de crecimiento.

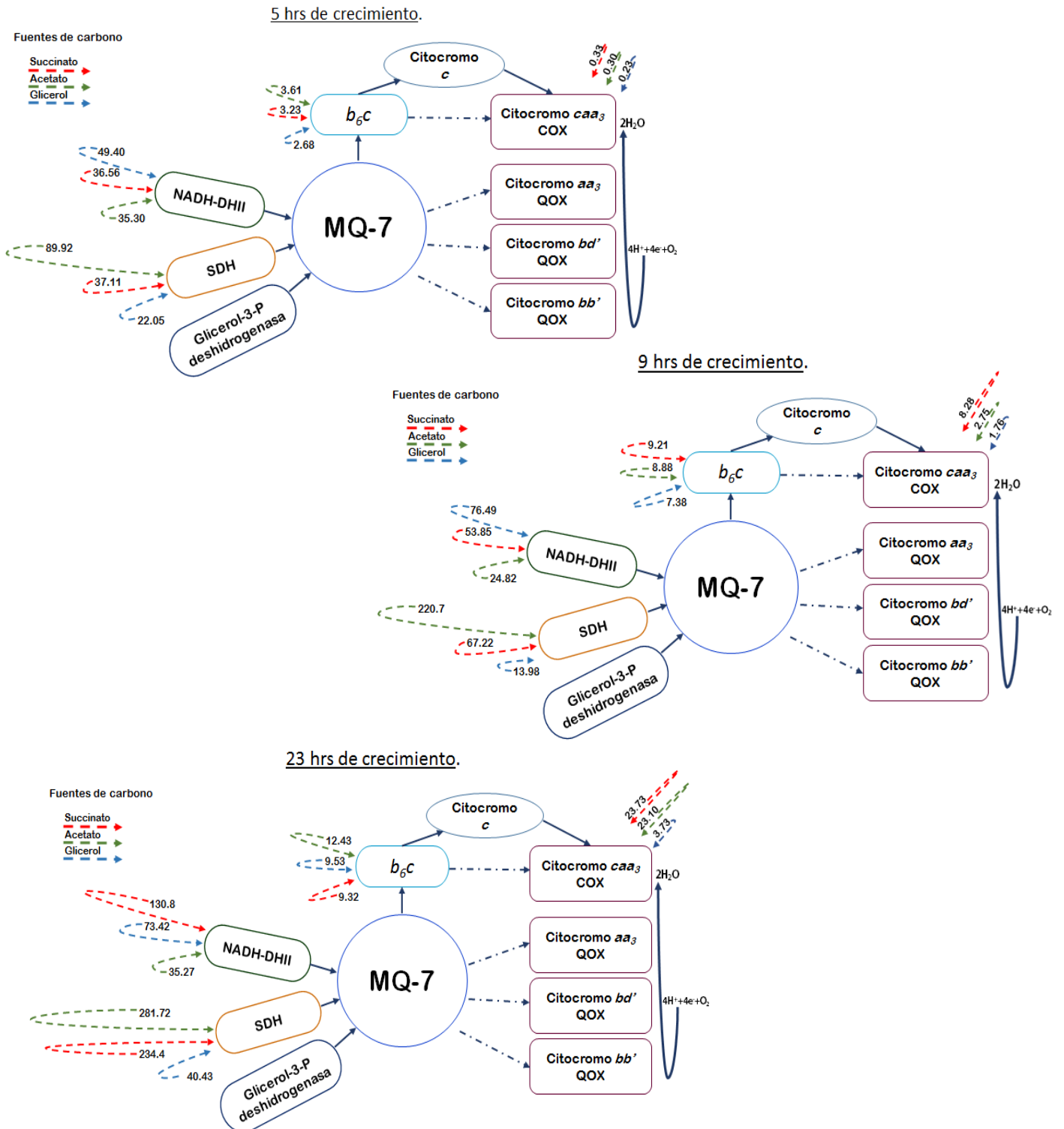


Figura 18. Caracterización de la actividad de los complejos respiratorios de *B. subtilis* en tres tiempos de crecimiento, con tres fuentes de carbono. Las líneas de colores representan las fuentes de carbono, los números representan los valores obtenidos de la actividad del complejo en nmol de sustrato utilizado $\text{m}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Conclusiones.

Con base en los experimentos realizados, observamos que el desarrollo de *B. subtilis* depende de las condiciones de crecimiento, y los nutrientes a los que esté sometida la bacteria, las fuentes de carbono fueron esenciales para obtener un desarrollo óptimo.

Durante el transcurso de crecimiento de la bacteria vimos un mayor rendimiento de células y concentración de proteína en los medios con succinato y glicerol en las tres fases de crecimiento, siendo acetato la fuente de carbono en la cual se obtuvo menor cantidad de células y por ende proteína.

En los espectros de absorción, observamos que la concentración de citocromos fue variable dependiendo de la fuente de carbono y hrs de crecimiento. La mayor concentración de citocromos se presentó a las 23 hrs en los medios con succinato y acetato, y a las 9 hrs en el medio con glicerol, detectando la presencia del citocromo tipo *d* a las 5 hrs en los medios con succinato y glicerol y a las 9 hrs en el medio con glicerol.

Al medir la actividad de los complejos respiratorios y actividad de oxidasas, vimos cómo es que *B. subtilis* ajusta su metabolismo dependiendo de la fuente de carbono. En los complejos respiratorios la actividad de la NADH-DH II no se encontraron diferencias significativas en las tres fuentes de carbono a las 5 hrs, durante las 9 y 23 hrs la actividad del complejo fue mayor en los medios con succinato y glicerol; para el complejo SDH la actividad más alta se obtuvo en el medio con acetato; mientras que en el complejo *b₆c* la actividad fue mayor en los medios con succinato y acetato durante las 5 y 9 hrs de crecimiento y con acetato a las 23 hrs y finalmente la actividad del complejo *caa₃* fue casi nula durante las 5 hrs de crecimiento, hasta las 9 hrs se presentó un incremento de actividad en el medio con succinato y a las 23 hrs en los medios con succinato y acetato.

En cuanto a la actividad de las oxidasas, la Succinato-Oxidasa, incrementó el consumo de oxígeno al agregar Menadiona como sustrato a las 9 hrs de crecimiento en las tres fuentes de carbono disparándose en las membranas con acetato, no se observaron inhibiciones significativas al agregar azida de sodio y cianuro. En la actividad de Ascorbato-TMPD oxidasa el consumo de oxígeno fue mayor a las 23 hrs con succinato y acetato, en este caso si se observó una ligera inhibición con azida de sodio, no así con cianuro en donde aumento el consumo de oxígeno. Al no haber una inhibición significativa en ambos ensayos, podríamos decir que posiblemente se estén expresando otro tipo de quinol oxidasas como la *bd'* y *bb'* insensibles a estos dos inhibidores por lo que sería interesante realizar otro tipo de experimento en el cual se utilicen otros inhibidores específicos de las quinol oxidasas tipo *bd* y *bb'* para corroborar si estas oxidasas terminales se están expresando en las tres fuentes de carbono, así como el uso de mutantes que carezcan de la citocromo oxidasa *caa₃* y de la quinol oxidasa *aa₃* crecidas en las diferentes fuentes de carbono en los tres tiempos de crecimiento.

Bacillus subtilis se adapta a la fuente de carbono presente. De acuerdo al metabolismo de la bacteria se observó que el succinato y acetato son las fuentes de energía más eficientes para la bacteria.

Perspectivas.

Es necesario analizar estas membranas por medio de electroforesis nativa, para determinar la asociación de los complejos respiratorios en las tres fuentes de carbono y a los diferentes tiempos de crecimiento. Además, sería interesante poder realizar estudios a nivel de expresión de genes mediante un análisis de RNA con estas membranas para así poder determinar que genes de la cadena respiratoria se expresan en las diferentes fuentes de carbono.

Bibliografía.

Arzaquina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von, W.C., Hedertedt, L., and Konstantinov, A.A. (1999). A cythochrome bb'- type quinol oxidase in *Bacillus subtilis*. *Journal of biological chemistry*, 274(46) 32810:32817.

Assempour, M., and Hill, B.C. (1997). Cyanide binding to different redox states of the cytochrome *caa3* complex from *Bacillus subtilis*; a member of the cytochrome oxidase super-family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1320(2):175-187.

Assempour, M., Lim, D., and Hill, B.C. (1998). Electron Transfer Kinetics during the Reduction and Turnover of the Cytochrome *caa3* Complex from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*. 37(28):9991-9998.

Benit, P., Goncalves, S., Philipe, D.E., Briere, J.J., Martin, G., and Rustin, P. (2006). Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clinical Chimica Acta*. 374:81-86.

Bisschop, Arnold., and Konings, Wil.N. (1976). Reconstitution of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase activity with Menadione in Membrane Vesicles from the Menaquinone-Deficient *Bacillus subtilis AroD*. *Europe Journal Biochemistry*. 67:357-365.

Bongaerts, J., Zoske, S., Weidner, U., and Uden, G. (1995). Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase genes (*nuoA-N*) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators. *Molecular Microbiology*. 16(3):521-534.

Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol letters*. 209(2):141-8.

Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J., and Claiborne, A. (1997). "Cloning and sequencing of two enterococcal glpK genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue." *J Biol Chem* 272(22); 14166-74.

Castillo, R.F. (2005). *Biología ambiental*. Editorial Tébar. Madrid, España. Pp. 91-94.

Clements L.D, Miller B.S. and Streips U.N. (2002). Comparative growth analysis of the Facultative Anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes*, and *Escherichia coli*. *Systematic and applied Microbiology*. 25:284-286.

Cole, S.T., Eiglmeier, K., Ahmed, S., Honore, N., Elmes, L., Anderson, W.F., and Weiner, J.H. (1988). "Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the glpABC operon encoding the anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12." *Journal of Bacteriology* 1988; 170(6); 2448-56.

de Vrij. W., van den Burg, B., and Konings, W.N. (1987). Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *European Journal of Chemistry*. 166:589-595.

Cunningham. L., Pitt. M., and Williams. H.D. (1997). The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases. *Molecular Microbiology*. 24(3):579-591.

Forero. A. y Sánchez. S. (2008). *Represión Catabólica por Carbono en Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. *BioTecnología*. 12(2) 24:48.

Fujita Yasaturo. (2009). Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience Biotechnology Biochemical*. 73(2): 245-249.

García García Ana Paula. (2010). Caracterización de la actividad del complejo tipo *bc* de *Bacillus subtilis* con diferentes quinonas. Tesis Profesional Para obtener el título de Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla, Estado de México.

García Montes de Oca, L.Y.J. Chagolla-López, A. González de la Vara, L. Cabello-Avelar, T. Gómez-Lorejo, C y Gutiérrez Cirlos, E.B. (2012). The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. *Journal Bioenergetic and Biomembranes* 44:473-486.

Glick. B.S., and Pon. L.A. (1995). Isolation of Highly Purified Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*. Vol. 260:213-223.

Grundy. F.J., Waters. D.A., Allen. G.H., and Henkin. T.M. (1993). A. Regulation of the *Bacillus subtilis* Acetate Kinase Gene by CcpA. *Journal of Bacteriology*. 175 (22): 7348-7355.

Grundy. F.J., Waters. D.A., Allen. G.H., Takova. T., and Henkin. T.M. (1993). B. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 10(2).259-571.

Gyan. S., Shiohira. Y., Sato. I., Takeuchi. M., and Sato. T. (2006). Regulatory Loop between Redox Sensing of the NADH/NAD⁺ Ratio by Rex (YdiH) and Oxidation of NADH by NADH Dehydrogenase Ndh IN *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacterology*. 188(20):7062-7071.

Hägerhäll. C., Aasa. R. von Wanchenfeldt. C., and Hederstedt. L. (1992). Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate: menaquinone oxidoreductase (complex II). *Biochemistry* 31(32):589-595.

Härtig, E., and Jahn, D. (2012). Chapter Five. Regulation of the Anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Microbial Physiology*. 61: 195-216.

Richter, H., O-M, and Ludwing, B. (2009). Electron transfer and energy transduction in the terminal part of the respiratory chain. Lessons from bacterial model systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787:626-634.

Henning, W., Vo, L., Albanese, J., and Hill, BC. (1995). High-yield purification of cytochrome *aa3* and cythrome *cca3* oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes. *Journal Biochemistry* 309(Pt I):279-283.

Jin. C., Barrientos. A., Epstein. C.B., Butow. R.A, and Tzagoloff. A. (2007). *SIT4* Regulation of Mig1p-mediated catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 581(29):5658-5663.

Lambert P. (2011). *Basic Bacteriology*. En Elliot Tom, Casey Ana, Lambert Peter y Sandoe Jonathan (Eds). *Medical Microbiology and Infection*. 5th Edición. Wiley- Blackwell. West Sussex, UK. pp: 3-4.

Lewin. A., Doung. Su-Xiao., and Hederstedt L. (2009). Positively regulated glycerol/G3P-Dependent *Bacillus subtilis* gene expression system based on anti-termination. *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology*. 17:61-70.

Lowry. O.H., Rosebroug. N.J., Farr. A.L., Randall. R.J. (1951). Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1):265-275.

Kay. K., Noguchi. S., and Sone. N. (1997). Over-expression and post-translational modification of *Thermophilic Bacillus* Cytochrome *c-551* in *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84(3):190-194.

Markwell. M.A., Haas. S.M., Bieber. L.L., Tolbert. N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87(1):206-210.

Melin. L., Rutberg. L., and von Gabain. A. (1989). Transcriptional and Posttranscriptional control of the *Bacillus subtilis* Succinate dehydrogenase operon. *Journal of Bacteriology*. 2110-2115.

Miura. H., Mogi. T., Ano. Y., Migita L. C.T., Matsutani. M., Yakushi. T., Kita. K., and Matsuchita. K. (2013). Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter oxydans* is a unique terminal oxidase subfamily of cytochrome *bd*. *The Journal of Biochemistry*. 153(6):535-545.

Molenaar. D., Van Der Rest M.E., Dryshc. A., and Yücel. R. (2000). Functions of the Membrane-Associated and Cytoplasmic Malate Dehydrogenases in the Citric Acid Cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*. 182(24):6884-6891.

Monedero. V., Boël. G., and Deutscher. J. (2001). Catabolite regulation of the Cytochrome *c₅₅₀*-Encoding *Bacillus subtilis* *cccA* gene. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3(3):433-438.

Mukherjee Ashis. K., and Das Kishore. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology* 54:479-489.

Park. S.J., Tseng. C.P., and Gunsalus. R.P. (1995). Regulation of succinato dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Molecular Microbiology* 15(3): 473-482.

Poole. R. K., and Cook. G.M. (2000). Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Advances in Microbial Physiology*. 43: 165-224.

Priest F.G. (1993). Systematics and Ecology of *Bacillus*. En: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, y R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* y otras bacterias Gram positivas. American Society for Microbiology, Washington, D.C.p.199–212.

Sakurai. K., Arai. H., Ishii. M., and Igarashi Y. (2011). Transcriptome response to different carbon sources in *Acetobacter aceti*. *Microbiology*. 157:899-910.

Sone. N., Hägerhäll. C., and Sakamoto. J. (2004). Respiration in Archea and Bacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. 16:35-62.

Sonenshein A.L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 5:917-927.

Stülke. J., and Hillen. W. (2000). Regulation of carbon in *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology*. 54:849-80.

Sousa Pedro M.F., Videira Marco A.M., Santos Filipe A.S., Hood Brian L., Conrads Thomas P., and Melo Ana M.P. (2013). The *bc:caa₃* supercomplexes from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: A megacomplex organization?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 537(1):153-60.

Taber, H.W. (1993). Cadenas Respiratorias. En: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, y R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* y otras bacterias gram positivas. American Society for Microbiology, Washington, D.C.p.199–212.

Toledo Cuevas E.M. (1997). Las oxidasas respiratorias: Las enzimas que utilizan la mayor parte del oxígeno que los seres vivos respiran. *Revista Latinoamericana Microbiología*. 39: 167-186.

Varela G. y Grotiuz G. (2006). Fisiología y metabolismo bacteriano. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2^{da} Ed. Universidad de la República Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay. pp. 43-50.

von Wanchenfeldt C. and Hederstedt L. (1992). Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes. *FEMS Microbiology Letters*. 100:91-100.

Winstedt L, Yoshida Ken-Ichi, Fujita and von Wachenfeldt C. (1998). Cytochrome *bd* Biosynthesis in *Bacillus subtilis*: Characterization of the *cydABCD* Operon. *Journal of Bacteriology*. 180(24):6571-6580.

von Wachenfeldt C. and Henderstedt L. (2002). Respiratory Cytochromes, Other Heme Proteins, and Heme Biosynthesis. In: Sonenshein A, L. Hoch J, A. Losick R. (EDS). *Bacillus subtilis* and Its Closets Relatives: from Genes to cells. ASM Press, Washington, D.C. pp. 163-179.

Winstedt L., and von Wachenfeldt C. (2000). Terminal Oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: One Quinol oxidase, Cytochrome *aa₃* or Cytochrome *bd*, is Required for Aerobic Growth. *Journal of Bacteriology*. 182:6557-6564.

Wu, Q., Xu, H., Liang J. Yao J. (2010). Contribution of Glycerol on Production of Poly(γ -Glutamic Acid) in *Bacillus subtilis* NX-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160:386-392.

Wu. W., Chang C.K., Varotsis C., Babcock G.T., Puustinen, A, and Wikström, M. (1992). Structure of the Heme o Prosthetic Group from the Terminal Quinol Oxidase of *Escherichia coli*. *Journal American Chemical Society*. 114(4): 1182-1187.

Yagi Takao. (1991). Bacterial NADH-Quinone Oxidoreductases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 23(2):211-225.

Yeh J.I., Chinte U. and Du S. (2008). Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences. PNAS*. 105(9):3280-3285.

Yu J., Hederstedt L, and Piggot P.J. (1995). The Cytochrome *bc* Complex (Menaquinone: Cytochrome *c* Reductase) in *Bacillus subtilis* Has a Nontraditional Subunit Organization. *Journal of Bacteriology*. 123:6751-6760.