

03088



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Instituto de Biotecnología

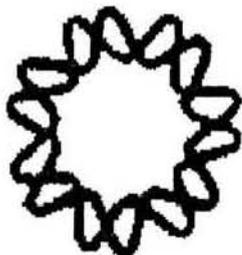
**Caracterización del proceso de
fermentación de *Bacillus subtilis*
bajo respiración anaerobia de nitratos**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA:

José Joel Espinosa de los Monteros Fernández



Cuernavaca, Morelos

2005

m343967



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHUALT

SECRETARIO: DR. ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ

VOCAL: DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES

VOCAL: DR. GERARDO ESCAMILLA MARBAN

VOCAL: DR. MARIO SOBERON CHAVEZ

SUPLENTE: DR. LEOBARDO SERRANO CARREON

SUPLENTE: DR. HUMBERTO BUSTAMENTE SANTILLAN

AGRADECIMIENTOS

A mi Esposa Nena por haberme apoyado y acompañado al través del tiempo que duro el desarrollo del presente proyecto.

A mi hija Hallie para que el día de mañana se desarrolle satisfactoriamente en las actividades que emprenda.

A Alfredo por que sin su apoyo, dedicación, consejo, impulso, etc., no hubiera sido posible concluir este reto, y en especial a su querida familia con quienes hemos compartido momentos muy felices.

A mis Padres Joel Espinosa de los Monteros Castañeda y Mercedes Fernández Aguilar por haberme guiado y apoyado en mi vida.

A mi país que me ha apoyado en todo lo emprendido y con el cual tengo una inmensa deuda que tengo que responder recíprocamente.

Para mis hermanos Pily, Eric y Pepe gracias por estar siempre pendientes del desarrollo de esta empresa.

Un especial reconocimiento a todos los miembros del laboratorio del Dr. Bolivar que me ayudaron y compartieron muchos momentos tan agradables y a quienes siempre recuerdo con cariño.

A la comunidad del IBT por ser tan buenos y pensar en grande.

A Chata y sus hijos por compartir conmigo siempre momentos de toda índole y que forman parte de mi vida.

Al CONACYT y al Instituto Tecnológico de Veracruz por su apoyo económico, sin el cual ni soñar en poder lograr esta meta, en especial al personal de UNIDA.

**Este trabajo fue realizado en el
Departamento de Ingeniería
Celular y Biocatálisis del
Instituto de Biotecnología – UNAM,
bajo la asesoría y supervisión de los
*Drs. Alfredo Martínez Jiménez y
Fernando Valle Baheza***

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE..... | 3 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 7 |
| 1.0 RESUMEN | 8 |
| 1.1 ABSTRACT | 10 |
| 2.0 INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 3.0 HIPOTESIS | 16 |
| 4.0 OBJETIVOS..... | 16 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 16 |
| 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 16 |
| 5.0 ANTECEDENTES | 17 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Bacillus subtilis</i> | 17 |
| 5.2 CONSIDERACIONES METABÓLICAS DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>B. subtilis</i> | 18 |
| 5.3 ESPORULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS..... | 19 |
| 5.4 SISTEMAS ANAEROBIOS Y SU CLASIFICACIÓN..... | 22 |
| 5.4.1 Sistemas fermentativos. Fermentación ácido-mixta y butanodiol..... | 22 |
| 5.5 SISTEMAS RESPIRATORIOS..... | 26 |
| 5.5.1 Cadena respiratoria..... | 26 |
| 5.6 DESNITRIFICACIÓN..... | 29 |
| 5.6.1 Reducción anaerobia del nitrito a amonio..... | 30 |
| 5.7 CONTROL DEL METABOLISMO ANAEROBIO..... | 32 |
| 5.7.1 En <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 5.7.2 En <i>Bacillus subtilis</i> | 35 |
| 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 37 |
| 6.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA..... | 37 |
| 6.2 CEPA, MEDIOS DE CULTIVO Y PREPARACION DE INÓCULOS..... | 37 |
| 6.3 ESTUDIOS EN FERMENTADORES..... | 38 |
| 6.4 FERMENTACIONES ALIMENTADAS..... | 39 |
| 6.5 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN..... | 39 |

| | |
|--|-----|
| 6.6 DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO. | 40 |
| 6.7 CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS Y ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA. | 40 |
| 7.0 RESULTADOS Y DISCUSION | 41 |
| 7.1 UTILIZACIÓN DEL ELECTRODO DE OXIDO-REDUCCIÓN EN LOS CULTIVOS ANAEROBIOS DE <i>B. subtilis</i> | 41 |
| 7.1.1 APORTACIONES..... | 46 |
| 7.2 CRECIMIENTO AERÓBICO Y ANAERÓBICO DE <i>B. subtilis</i> EN EL MEDIO DE CULTIVO SCHAEFFER Y SCHAEFFER-GLUCOSA..... | 47 |
| 7.2.1 APORTACIONES..... | 53 |
| 7.3 CULTIVO DE <i>Bacillus subtilis</i> EN CONDICIONES ANAEROBIAS EN MEDIO SCHAEFFER-NITRATO..... | 54 |
| 7.3.1 APORTACIONES..... | 55 |
| 7.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO Y GLUCOSA. | 57 |
| 7.5 UTILIZACIÓN DE CULTIVO ALIMENTADO EN EL CRECIMIENTO DE <i>B.</i> <i>subtilis</i> EN CONDICIONES ANAEROBIAS. | 73 |
| 7.5.1 APORTACIONES..... | 75 |
| 7.6 RELACIONES ESTEQUIOMETRICAS Y DETERMINACION DE FLUJOS METABOLICOS..... | 81 |
| 7.6.1 APORTACIONES..... | 89 |
| 9.0 PERSPECTIVAS. | 92 |
| 10.0 BIBLIOGRAFÍA | 93 |
| 11.0 APÉNDICES. | 99 |
| 11.1 PRESENTACIÓN DE ARTÍCULO..... | 99 |
| 11.2. GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO ANAEROBIO EN <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> | 106 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 4.3.1</i> Proceso de esporulación en <i>B. subtilis</i> . | 21 |
| <i>Figura 4.4.1</i> Fermentación ácido mixta en <i>Escherichia coli</i> . | 24 |
| <i>Figura 4.4.2</i> Fermentación butanodiol. | 25 |
| <i>Figura 4.5.1</i> Cadena respiratoria de <i>B. subtilis</i> . | 29 |
| <i>Fig 5.6.1</i> Reacciones que ocurren en la reducción de nitrato a amonio. Nar es la enzima nitrato reductasa y Nir nitrito reductasa. | 32 |
| <i>Figura 7.1.1</i> Evolución del potencial oxido-reducción en medio Schaeffer-Glucosa al burbujear nitrógeno gaseoso a un flujo de 100 ml/min. | 43 |
| <i>Figura 7.1.2</i> Adaptación de <i>B. subtilis</i> a diferentes formas de establecer la condición anaeróbica inicial. Burbujear nitrógeno por 40 minutos (triángulos llenos biomasa y vacíos redox) y 5 horas (círculos llenos biomasa y vacíos redox). | 44 |
| <i>Figura 7.2.2</i> Cinética de crecimiento, consumo de glucosa, formación de acético, velocidad de evolución de CO ₂ (CER) y actividad específica de β-galactosidasa en condiciones aeróbicas en el medio Schaeffer-glucosa. | 51 |
| <i>Fig. 7.2.3</i> Cinética de crecimiento, potencial oxido-reducción, consumo de glucosa y formación de láctico en condiciones anaeróbicas en medio Schaeffer-glucosa. | 52 |
| <i>Figura 7.3.1</i> Cinética de crecimiento, consumo de nitrato y acumulación de nitrito, potencial oxido-reducción, formación de acético y CO ₂ total en condiciones anaeróbicas en medio Schaeffer-nitrato. | 56 |
| <i>Figura 7.4.1</i> Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO ₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 4 mM) | 62 |
| <i>Figura 7.4.2</i> Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO ₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 8 mM) | 63 |
| <i>Figura 7.4.3</i> Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO ₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 12 mM) | 64 |
| <i>Figura 7.4.4</i> Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO ₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 16 mM) | 65 |
| <i>Figura 7.4.5</i> Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO ₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por <i>Bacillus subtilis</i> en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 20 mM) | 66 |

- Figura 7.4.6** Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por *Bacillus subtilis* en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 24 mM) 67
- Fig. 7.4.7.** Metabolismo de la glucosa en condiciones aerobias (A), microaerofílicas (limitación de oxígeno) (B), Fermentativas (C) y de respiración de nitratos (D) 71
- Figura 7.5.1** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.20 g/h) y nitrato (0.30 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa. 76
- Figura 7.5.2** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.5 g/h) y nitrato (0.38 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa. 77
- Figura 7.5.3** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (0.8 g/h) y nitrato (0.321g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa. 78
- Figura 7.5.4** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.26 g/h) y nitrato (0.33 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa. 79
- Figura 7.5.5** Cinética de crecimiento de *B. subtilis* cepa JJI BSR1 en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.20 g/h) y nitrato (0.30 g/h) durante la fase estacionaria. Determinación de la actividad específica β -galactosidasa. 80
- Figura 7.6.1** Cinética empleada en la estimación de flujos metabólicos (experimento A). *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaeróbicas de respiración de nitratos. 83
- Figura 7.6.2** Cinética empleada en la estimación de flujos metabólicos (experimento B). *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaeróbicas de respiración de nitratos. 84

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| <i>Tabla 7.4.1</i> Parámetros de los cultivos por lote de <i>Bacillus subtilis</i> usando diferentes concentraciones de nitrato a la concentración de glucosa de 22.2 mmol. | 61 |
| <i>Tabla 7.4.2</i> Variación del potencial de oxido reducción en función de la formación de biomasa durante el crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> | 61 |
| <i>Tabla 7.5.1</i> Efecto de la variación en la alimentación de glucosa y nitrato sobre la esporulación y actividad β -galactosidasa de <i>Bacillus subtilis</i> BSR6. | 74 |
| <i>Tabla 7.6.1</i> Distribución de productos de las cinéticas presentadas en las figuras 7.6.1 y 7.6.2..... | 85 |
| <i>Tabla 7.6.2</i> Flujos metabólicos (milimoles del compuesto y de carbono contenido en el compuesto/ gramo de células) para <i>B. subtilis</i> bajo respiración de nitratos. | 87 |

1.0 RESUMEN

Bacillus subtilis es el microorganismo Gram + mas ampliamente estudiado. Sin embargo, por mucho tiempo se postuló que era un microorganismo estrictamente aerobio y por tanto existen relativamente pocos estudios en condiciones anaeróbicas e inexistentes en condiciones controladas en fermentadores. Desde el punto de vista cinético, estequiométrico y energético no se conoce a detalle como crece y que vías de fermentación son activas en presencia de nitrato como aceptor de electrones, así mismo no se sabe si esporula o sí inicia este proceso en estas condiciones, motivo por el cual se inicio el presente estudio.

En este trabajo se encontró que *Bacillus subtilis* crece ineficientemente por fermentación, aproximadamente 30 veces menos en comparación con el crecimiento obtenido en condiciones aeróbicas con el medio rico ampliamente usado para estudios de esporulación y producción de proteasas (medio Schaeffer) suplementado con glucosa. Sin embargo el crecimiento es mayor en condiciones anaerobias bajo respiración de nitratos.

La respiración de nitratos fue utilizada para caracterizar fisiológicamente el funcionamiento y la capacidad de *Bacillus subtilis* para crecer, esporular y evaluar el nivel de expresión de la fusión transcripcional del promotor de *aprE* con *lacZ*, bajo condiciones anaerobias, empleando medio Schaeffer-glucosa y cultivos lote y lote alimentado. El promotor de *aprE* controla la expresión de la proteasa alcalina conocida como subtilisina y es empleado como un marcador del inicio del proceso de esporulación en *B. subtilis*. La enzima β -galactosidasa (LacZ) fue utilizada como reportero de este promotor. Se establecieron como condiciones anaeróbicas, con la ayuda de la medición en línea del potencial de oxidoreducción, el burbujeo de nitrógeno gaseoso por al menos 5 h antes de la inoculación a un flujo de 100 ml/min y de 500 ml/min durante los cultivos. En estas condiciones se encontró que el nitrato es convertido en amonio, teniendo como intermediario la reducción de nitrato a nitrito. Es decir, se indujeron las actividades de nitrato y nitrito reductasa en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrato y glucosa.

Cuando el nitrato se agregó en diferentes concentraciones, se observaron diferentes perfiles metabólicos durante la fase de crecimiento. Si el nitrato no es limitante, se observa una acumulación de ácido acético y acetoina, sugiriendo una limitación en la generación de coenzimas reducidas. Por el contrario, si existe una limitación de nitrato, teniendo glucosa en exceso, tanto el ácido láctico como el butanodiol son acumulados, sugiriendo un exceso en la producción de coenzimas reducidas. La producción de biomasa se incrementó conforme se aumentó la concentración de nitrato, y en comparación con experimentos control en condiciones aerobias, se detectó una disminución de tan solo el 32% en la velocidad de crecimiento.

Bajo condiciones no limitantes de nitrato se observó una velocidad de consumo de glucosa similar a la obtenida en condiciones aerobias. Los balances de oxido-reducción, carbono e hidrógeno indican que los componentes del medio Schaeffer fueron utilizados para la generación de células, la glucosa fue catabolizada a productos de fermentación para la producción de energía y las coenzimas reducidas producidas se utilizan en una forma acoplada a la reducción del nitrato a amonio. El ciclo de Krebs se mantiene inactivo, debido a que *B. subtilis* toma los nutrientes (aminoácidos, vitaminas y micronutrientes) del medio Schaeffer para el anabolismo y la glucosa es utilizada como fuente de energía. A partir de la glucosa, la producción de ácido acético suministra casi el 50 % de la energía producida, la ruta de la acetoina-butanodiol y la reducción del nitrato a nitrito proporcionan un 25 % cada una.

El empleo de cultivos alimentados, al través del suministro continuo de glucosa y nitrato, permitió el desarrollo de una fase estacionaria. Aún en estas condiciones, la frecuencia de esporulación resultó bastante reducida (menos del 1%), no obstante la producción de β -galactosidasa fue similar a la encontrada en cultivos aerobios. Estos hechos indican que en condiciones anaerobias y respirando nitratos *B. subtilis* inicia el proceso de esporulación, pero no lo completa de manera eficiente.

1.1 ABSTRACT

Bacillus subtilis is the best known Gram + microorganism. However, for a long time it was believed, it was an strict aerobic microorganism and quite few studies were done on anaerobic conditios and unavailable under controled (bioreactor) conditions. From a kinetic, stequeometric and energetic point of view it is not knowm how it grows and what fermentation pathways are use when nitrate is used as an electron acceptor, also it is not known if it can sporulate or if at last it can begin the formation of spores under this conditions, these are the reasons why this study was started.

The growth of *Bacillus subtilis* under fermentation conditions is very low, about 30 times less than that observed in aerobic cultures, when a rich medium widely used for studies for sporulation and protease production (Schaeffer's medium) plus glucose was used. However growth was increased in anaerobic conditions under nitrate respiration.

Nitrate respiration was used in order to understand physiologically how *Bacillus subtilis* grows, sporulate and determine the expression of the *lacZ* transcriptional fusion on the *aprE* promoter under anaerobic conditions in Schaeffer-glucose medium with batch and fed-batch cultures. *AprE* promoter control alkaline protease "subtilisin" expression and is employed as a marker for the sporulation process initiation in *B. subtilis*. β -galactosidase (LacZ) reporter of the promoter was used to determine the begining of the sporulation process. Anaerobic conditions were stablished using on line redox measurements, nitrogen gas was sparged for at least 5 h before inoculation at 100 ml/min flow rate and during the experiments a 500 ml/min flow rate was employed. Under these conditions, it was found that nitrate is transformed into ammonia, having nitrite as an intermediary. Nitrate and nitrite reductases were activated when glucose and nitrate were present in anaerobic conditions.

When nitrate was added at variable concentrations, differences in metabolic patterns were observed. If nitrate is not limited, then acetic acid and acetoin were accumulated, suggesting a limitation on the production of reduced cofactors. Conversely, if nitrate was limited and glucose was in excess, then lactic acid and butanediol were accumulated suggesting and excess of reducing cofactors production. Biomass production was boosted

as nitrate concentration was increased, and in comparison with aerobic cultures, only a 32% decrease in growth rate was obtained.

Under non-limiting nitrate conditions, glucose uptake rate was as high as that observed aerobically. Carbon, oxidation/reduction and hydrogen balances showed that the components of the Schaeffer's medium were used for biomass production and the glucose was catabolized to fermentation products accumulation in order to obtain energy. Reduced coenzymes produced are employed for nitrate reduction to ammonia. Krebs cycle remains inactive because *B. subtilis* uses the nutrients (aminoacids, vitamins and micronutrients) necessary for anabolism from Schaeffer's medium and glucose is used as the energy source. Acetic acid production from glucose supply almost 50 % of energy produced, meanwhile acetoin-butanediol from glucose and nitrate respiration pathways contribute 25 % each one.

The use of fed-batch cultures, through the continuous addition of glucose and nitrate allowed the development of a stationary phase. Even in these conditions, sporulation frequency was very low (less than 1%), however β -galactosidase production was similar to that found in aerobic cultures. These results show that in anaerobic conditions under nitrate respiration *B. subtilis* initiate sporulation process, but can not complete it.

2.0 INTRODUCCIÓN

Se ha calculado que la vida se originó en la tierra hace aproximadamente 4000 millones de años y durante los primeros 1000 millones de éstos, el planeta se encontró en condiciones anaerobias. El oxígeno molecular actualmente es encontrado en cantidades apreciables en áreas que están en contacto directo con el aire o donde existen organismos que puedan llevar a cabo fotosíntesis oxigénica. Todo el tiempo que la tierra estuvo en condiciones anaeróbicas y la gran cantidad de nichos que se han encontrado en esa condición, han hecho que la diversidad actual de organismos con la capacidad de crecer en estos ambientes sea muy grande. Así mismo, los microorganismos que se han adaptado a estas condiciones, han desarrollado a la par una amplia variedad de posibilidades metabólicas para sobrevivir y reproducirse en diferentes nichos.

Debido a sus características, *Bacillus subtilis*, microorganismo cuyo hábitat natural es el suelo, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55 °C), presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999).

Muchos factores físicos y químicos influyen en el fenotipo de un microorganismo en un determinado hábitat. Este fenotipo está controlado por diversos mecanismos que pueden ser: en el ámbito genético por inducción y represión; a nivel enzimático por activación o inhibición; a nivel catalítico por las propiedades bioquímicas de las enzimas; así como por el tipo y concentración de sustratos y productos en el medio. Entre estos factores, la concentración de oxígeno es especialmente importante. Por ejemplo, los organismos aeróbicos presentes en el suelo consumen rápidamente el oxígeno disuelto, de tal forma que las capas más internas del suelo son prácticamente anaeróbicas. Además, muchos ambientes acuáticos a cierta profundidad, el rumen e intestino de animales, y los

biodigestores para el tratamiento de aguas, entre otros representan nichos en los cuales prevalecen condiciones anaerobias.

En base a su capacidad para crecer en presencia o ausencia de oxígeno, los organismos se dividen en tres grupos (Schmitz *et al.*, 1999): a) aerobios que pueden utilizar otros aceptores finales de electrones diferentes al oxígeno, tales como el nitrato y el nitrito, entre otros. El transporte de electrones desde NADH hasta estos aceptores esta acoplado a la fosforilación de ADP; b) facultativos; y c) anaerobios estrictos.

La solubilidad del oxígeno en el agua es baja. En el equilibrio con aire a 1.013 bar (1 atmósfera de presión) y 37°C, el agua pura contiene 7 mg/l de oxígeno disuelto, lo cual equivale a 220 micro-moles en un litro (220 μM). La disponibilidad de oxígeno depende de su velocidad de transporte, la cual es función del gradiente de concentración desde la interfase (o sitio de mayor concentración) hasta el sitio de reacción. En condiciones limitantes de oxígeno la medición de este transporte es difícil de lograr, por lo que se ha usado a la concentración en el seno del medio que rodea a las células como un indicio de una condición anaerobia, obviamente estos resultados varían de autor a autor, ya que finalmente depende de las condiciones experimentales empleadas. Algunos autores versados en el tema, han definido que la transición de una condición aerobia a una de respiración anaerobia, medida por el inicio en el incremento de la expresión de genes como los de la nitrato reductasa respiratoria (*narGHJ*), se da a una concentración de oxígeno alrededor de 22 μM y alcanzan su máxima expresión conforme esta concentración disminuye (Tseng *et al.*, 1996), es decir a un orden de magnitud menor al de saturación en las condiciones arriba indicadas. Mediante un estudio de microarreglos recientemente se ha determinado que, varios cientos de genes son inducidos o reprimidos a diferentes niveles de expresión en *B. subtilis* con el cambio gradual hacia condiciones menores en oxígeno (Ye *et al.*, 2000).

Por mucho tiempo se considero a *B. subtilis* como un microorganismo aerobio estricto, a pesar de que se conocía que podía reducir los nitratos (Slepecky y Hemphill 1992), y que puede crecer en condiciones de limitación de oxígeno formando productos de fermentación

(Moes *et al.*, 1985). Estos últimos autores encontraron que a concentraciones limitantes de oxígeno disuelto ligeramente superiores a $3.13\mu\text{M}$ (0.1 ppm; aproximadamente dos ordenes de magnitud por debajo del valor de saturación a 1 atmósfera y 37°C) *B. subtilis* excreta acetoina y por abajo de ese valor butanediol. Sin embargo, no fue hasta hace apenas una década que se comenzaron a hacer estudios, principalmente enfocados a aspectos genéticos y moleculares en condiciones anaerobias con *B. subtilis*. (Cruz-Ramos *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1995). Esto fue motivado, en parte, por el hecho de que conforme se llevaba a cabo la secuenciación de su ADN, se encontraron genes con similitud a aquellos de otros microorganismos que pueden vivir en condiciones anaerobias (Presecan *et al.*, 1997).

Por otro lado, el ciclo del nitrógeno está formado por el cambio de su forma elemental y estable en la atmósfera, a las formas combinadas encontradas en suelos, aguas y sistemas biológicos y de aquí nuevamente a la atmósfera. En este devenir del nitrógeno es que los procesos asimilatorios, respiratorios y des-asimilatorios tienen un equilibrio. El cambio de electrones se da en el rango de valencia de -3 hasta $+5$, es decir de ocho electrones. En este ciclo, prospera una amplia diversidad de organismos, unos oxidan el nitrógeno, otros lo reducen, a veces lo hacen simultáneamente. Antes que el oxígeno existiera en la atmósfera, ya se encontraban formas combinadas del nitrógeno en la naturaleza y por lo tanto se piensa que formas de vida anaeróbica existieron primero que la vida aeróbica (Richardson, 2000).

El ciclo de vida de *B. subtilis*, estudiado en el laboratorio, comprende una fase vegetativa muy similar al crecimiento de otras bacterias, sin embargo bajo condiciones de limitación de nutrientes, de densidad de población o de respuesta a condiciones de estrés, se generan una serie de señales que modulan el inicio de la esporulación (Lazazzera, 2000). Otro aspecto interesante es que en general no todas las células inician, ni dan lugar a la formación de esporas (Grossman, 1995). Parte de la población queda en un estado aún no estudiado. El primer evento morfológico del proceso de esporulación que puede observarse con el microscopio, es la formación de un septo asimétrico en uno de los polos de la célula. Este estadio se observa dos horas después de terminado el crecimiento exponencial (T_2). Esta etapa se conoce también como estado de transición. Otra característica importante de

está fase es que la síntesis de las proteasas extracelulares, incluyendo a la proteasa alcalina denominada subtilisina (AprE), y otras enzimas hidrolíticas se encuentran a su máximo. Como se mencionó anteriormente, las investigaciones tendientes a entender los mecanismos moleculares que permiten el crecimiento de *B. subtilis* en condiciones anaerobias de fermentación y de respiración de nitratos se han iniciado en los últimos años. Sin embargo, dado que estos estudios han sido enfocados desde un punto de vista genético, existen aún muchas preguntas sin contestar tales como:

¿Cuál es el rendimiento de células que se obtienen a partir de una cantidad determinada de fuente de carbono y nitrato?

¿Cuál es la velocidad de crecimiento?

¿Que productos del metabolismo se secretan al medio?

¿Cuál es el nivel de esporulación bajo estas condiciones?

¿Se inicia el proceso de esporulación?

¿Qué valor alcanza la velocidad de consumo de sustrato?

¿Por qué se ha reportado que *B. subtilis* no crece fermentando?

Etc.

Las respuestas a estas preguntas son el objetivo del presente proyecto.

Para este propósito se utilizó nitrato como aceptor final de electrones y glucosa como fuente de poder reductor, permitiendo evaluar la cinética de crecimiento de *B. subtilis* en condiciones anaeróbicas y la producción de metabolitos en condiciones controladas en fermentador de 1 litro. Así mismo la expresión del gen *aprE* se utilizó como uno de los eventos que marcan el inicio del proceso de esporulación.

3.0 HIPOTESIS

Bacillus subtilis es un microorganismo autóctono del suelo quien ha logrado permanecer en el gracias a sus propiedades metabólicas. Este microorganismo por lo tanto debe ser capaz de crecer, producir enzimas hidrolíticas y esporular en condiciones anaerobias.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar como es que se lleva a cabo la cinética del metabolismo, la esporulación y la expresión del gen *aprE* de *B. subtilis* bajo condiciones anaerobias en reactores por lote y lote alimentado.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Evaluar la esporulación, parámetros cinéticos del metabolismo y evaluar el nivel de expresión del gen *aprE*, por medio de una fusión transcripcional con el gen reportero *lacZ* en condiciones de fermentación de la glucosa y comparar con aquellos observados en condiciones aerobias.

Evaluar la esporulación, parámetros cinéticos del metabolismo y expresión del gen *aprE* en condiciones de respiración de nitratos y utilizando a la glucosa como fuente del poder reductor.

Estudiar la cinética de los cambios en el metabolismo al variar la proporción glucosa/nitrato y su efecto sobre la esporulación y expresión del gen *aprE* en cultivos por lote.

Estudiar la cinética de crecimiento y su efecto sobre la esporulación y expresión del gen *aprE* en cultivos alimentados, utilizando la información generada en el inciso anterior.

Evaluar la expresión del gen *aprE* en condiciones de respiración de nitratos empleando una cepa que se ha modificado con la finalidad de aumentar dicha expresión en las mejores condiciones estudiadas.

5.0 ANTECEDENTES

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Bacillus subtilis*.

B. subtilis es un microorganismo autóctono del suelo que a diferencia de *Escherichia coli*, prospera en la naturaleza, donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats y los cuales ha colonizado eficientemente debido a sus cualidades, entre las cuales podemos mencionar; el tener un programa genético que le permite formar esporas, crecer en un amplio rango de temperaturas, la capacidad de moverse, mostrar velocidades de crecimiento altas, producir enzimas hidrolíticas extracelulares y una variedad de antibióticos. Es una de las 40 especies reconocidas del género *Bacillus*, su identificación es sencilla: forma esporas termoresistentes, es catalasa y Voges-Proskauer positivo, su crecimiento en agar anaeróbico (agar nutritivo) es negativo y la hidrólisis del almidón es positiva (Slepecky y Hemphill, 1992). Se ha propuesto una subdivisión sobre la base de diferencias en la composición química de la pared celular, su distribución geográfica y a la frecuencia de transformación homo y heterogámica. *B. subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. (NRRL NRS-744, ATCC 6051, cepa Marburg) y *B. subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. (NRRL B-23049), las cepas derivadas de la 168 y otras similares se agrupan junto con la especie tipo en el primer grupo y las derivadas de la cepa W23 y relacionadas en el segundo. La cepa 168 es ampliamente usada en la academia y en la industria para la obtención de productos comerciales (Ferrari, *et al.*, 1993), además esta cepa es competente natural, es decir que en ciertas condiciones incorpora ADN foráneo de manera natural (Anagnostopoulos y Spizizen, 1960), lo cual facilita la manipulación genética, las estrategias de biología molecular con esta cepa y fue utilizada para secuenciar el genoma de *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997). Por tanto en el presente trabajo se trabajó con una cepa derivada de la 168. Estos microorganismos son bacilos móviles, células individuales o en pequeñas cadenas, temperatura de crecimiento de 15 a 55 °C, reducen el nitrato a nitrito, e hidrolizan almidón y caseína (Nakamura, *et al.*, 1999). En medios complejos con glucosa o nitrato se observa un crecimiento anaeróbico restringido (Sneath, 1986).

5.2 CONSIDERACIONES METABÓLICAS DURANTE EL CRECIMIENTO DE *B. subtilis*.

Durante el crecimiento de *B. subtilis* en glucosa, sin limitación de oxígeno, se produce ácido acético como subproducto. Esto sucede como respuesta a un exceso en el flujo de entrada de glucosa y por tanto a un incremento en el flujo glicolítico a ácido pirúvico, el cual la célula es incapaz de utilizar en su totalidad para biosíntesis en el ciclo de Krebs (Phalakornkule, *et al.*, 2000; Blencke, *et al.*, 2003). Este fenómeno ocurre cuando existe glucosa en el medio en concentraciones suficientes para controlar, por medio de la proteína CcpA (proteína de control catabólica), regiones reguladoras CRE (elementos de respuesta catabólicos) en los promotores de algunos genes entre los cuales están *ackA* y *pta* (acetato cinasa y fosfotransacetilasa) de la vía de producción de ácido acético e incluyendo también algunos genes de las rutas del catabolismo de la glucosa (Prescan-Siedel *et al.*, 1999). En estudios empleando modelos de flujos metabólicos desarrollados para la cepa 168 de *B. subtilis*, se encontró que en cultivo continuo limitado por glucosa, el flujo de carbono (milimoles de carbono/gCélula-h) al través de la ruta de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y la síntesis de las enzimas que componen el ciclo, se incrementa conforme aumenta la velocidad de crecimiento, siendo drásticamente reprimidas solamente a velocidades de crecimiento muy altas como las que se observan en el crecimiento por lote (0.6 h^{-1}) y conforme la concentración de glucosa se incrementa (Goel *et al.*, 1993). La proteína CcpA también está involucrada en la fuerte represión que ocurre en casi todos los genes necesarios para el ciclo de Krebs (Tobisch, *et al.*, 1999).

Estudios del TCA en *B. subtilis*, utilizando glucosa-piruvato y nitrato en medio complejo y en condiciones anaerobias, han mostrado una drástica disminución en la actividad de varias enzimas del ciclo (Nakano *et al.*, 1998). Como alternativa metabólica se produce ácido acético, con la ventaja adicional de generar un ATP por cada molécula de acetato formada (Nakano *et al.*, 1998, Cruz-Ramos *et al.*, 2000). En *E. coli* en condiciones anaerobias y con glucosa, el TCA es transformado a una forma no cíclica, consistiendo de una rama oxidativa y otra reductiva, cuyo fin es proveer de los intermediarios necesarios para la biosíntesis de proteínas (Prohl, *et al.*, 1998).

Por medio de la velocidad de crecimiento, de balances estequiométricos, de consumo de glucosa y la acumulación de los metabolitos formados en condiciones anaerobias, es posible calcular las velocidades específicas (flujo metabólico) y el porcentaje de la fuente de carbono que es catabolizada por la glicólisis y el ciclo de las pentosas, este procedimiento fue inicialmente propuesto por Papoutsakis y Meyer (1985). Haciendo uso de esta metodología, Bulthuis *et al.* (1991) cultivando a *Bacillus licheniformis* en condiciones anaeróbicas, por lotes o en continuo, encontraron que hasta un 52 % de la glucosa es metabolizada por la vía de pentosas.

5.3 ESPORULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS.

B. subtilis presenta un control temporal al terminar el crecimiento exponencial, lo que le permite llevar a cabo una serie de cambios tanto estructurales como metabólicos que culminan con la formación de esporas. La secuencia de eventos morfológicos que culminan con la formación de una spora libre, consta de siete estadios y se muestra en la figura 4.3.1 (Grossman, 1995). Cuando se utiliza el medio de cultivo Schaeffer, la formación de una spora tarda de 8 a 10 horas. El estadio cero se inicia con una respuesta al agotamiento de nutrientes y a la producción de péptidos que sensan y responden a una alta concentración celular (Schneider *et al.*, 2002). En el estadio II se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y termina con la formación de un septo en un polo de la célula, en el estadio siguiente(III) ocurre el engullimiento de la preespora, del IV al VII formación de la corteza, formación de la cubierta, maduración y lisis (Errington, 1993). La duración de cada etapa es de aproximadamente de una hora (Stragier, 1991, Errington, 1993). Durante esta serie de eventos se forman dentro de un mismo cuerpo dos células; la célula madre y la preespora, las cuales mantienen una comunicación para poder en conjunto y de una forma metabólica ordenada, formar la spora. La transición de un estado al otro es gobernada por seis proteínas reguladoras llamadas factores sigma, que se unen a la ARN polimerasa y determina que promotores se reconocerán. Estos factores son: el factor sigma que ocurre durante el crecimiento vegetativo, σ_A , y cinco factores que se activan en cascada durante la esporulación, llamados σ_H , σ_F , σ_E , σ_G y σ_K (Stragier, 1991, Losick y Stragier, 1992, Kroos y Cutting, 1994). En el estadio cero y debido a las señales antes mencionadas se activa, vía fosforilación, el regulador transcripcional codificado en *SpoOA*. El mecanismo por el cual

SpoOA es fosforilado involucra una transferencia secuencial de fosfato inorgánico al través de una serie de reacciones conocidas como sistema "FOSFORRELEVADOR". Al través de σ_A , SpoOA se produce durante el crecimiento vegetativo en bajas concentraciones, sin embargo al tiempo σ_H (producto de *SpoOH*) amplifica la señal para incrementar la producción de *SpoOA* y otros genes como *SpoOF* y *KinA*. El fosforrelevador consiste básicamente de cuatro reacciones; inicialmente en respuesta a una señal, KinA se autofosforila y el resto del fosforrelevador consiste de tres reacciones subsecuentes en que se transfiere el fosfato, primero de KinA-P a SpoOF para producir SpoOF-P, de este a SpoB para producir SpoB-P y finalmente de este a SpoOA para producir SpoOA-P. El gen *KinB* es otro gen de por lo menos tres que codifican para una proteína con actividad similar a KinA. Además existen tres fosfatasas que inhiben la actividad del fosforrelevador; la fosfatasa SpoOE es específica para SpoOA-P, la RapA lo es para SpoOF-P al igual que RapB y sus funciones pudieran ser prolongar el estado de transición y así acumular suficiente SpoOA y estimular etapas posteriores o bien inhibir la acumulación de SpoA-P y contribuir a la inactivación del fosforrelevador en etapas posteriores del proceso de esporulación. *AbrB* es un gen que participa en la regulación de una variedad de procesos que están asociados con el final de la fase exponencial de crecimiento y principalmente inhibe esta expresión. SpoOA-P es el producto final del fosforrelevador y el más importante ya que activa y reprime la transcripción de muchos genes asociados a la esporulación, incluyéndose el mismo (Sonenshein, 2000).

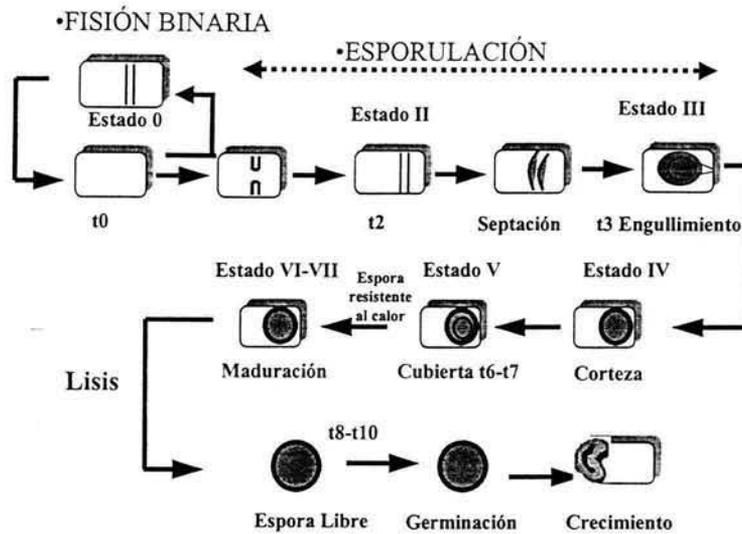


Figura 4.3.1 Proceso de esporulación en *B. subtilis*.

Se sabe que la síntesis de diversas enzimas catabólicas en *B. subtilis* están sujetas a represión metabólica por glucosa, como son la síntesis de enzimas hidrolíticas extracelulares, y las del ciclo de Krebs (Tobisch *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 1997). El proceso de formación de esporas también es reprimido por glucosa (Schaeffer *et al.*, 1965). La transcripción de las enzimas del ciclo de Krebs se induce durante la esporulación (Grossman, 1995) y son requeridas ya que permiten obtener la energía necesaria y los intermediarios esenciales para la esporulación, (Ireton *et al.*, 1995; Jin y Sonenstein, 1994).

Las enzimas extracelulares le sirven a *B. subtilis* para degradar y utilizar otros sustratos que puedan existir en su hábitat. Las proteasas forman parte de estas enzimas, las mayoritarias son la proteasa alcalina denominada subtilisina (AprE) y la proteasa neutra (NprE). Estudios sobre su regulación transcripcional sugieren que se lleva a cabo a través de la acción concertada de múltiples elementos de control, como son las proteínas AbrB, Hpr, DegU/DegS y SinR, entre otras. (Jan, 2000; Ferrari *et al.*, 1993).

5.4 SISTEMAS ANAEROBIOS Y SU CLASIFICACIÓN.

El oxígeno es el aceptor de electrones mas utilizado en la naturaleza, sin embargo y debido a su poca solubilidad en medios acuosos se agota fácilmente y el ambiente tiende a volverse anaerobio. Una vez que el oxígeno se ha consumido, una serie de procesos de oxidación anaeróbica sigue en secuencia. Dicha secuencia está influenciada por la presencia de diversos aceptores finales de electrones. Después de la desaparición del oxígeno, sigue la reducción de nitratos, la reducción de sulfatos y la formación de metano.

Aparte del oxígeno, otras formas de respiración involucran al Fe(III), U(VI), Cr(VI), Mn(VI), Co(III), (TcIII), entre otros (Lovly y Coates, 2000). Se ha propuesto una clasificación de los ambientes, estos son óxicos a una concentración de oxígeno mayor de 10^{-6} molar y anóxicos a una concentración menor de este valor (Zehnder y Stumm, 1988).

Los organismos anerobias se dividen en (Schmitz *et al.*, 1999):

- 1.- Organismos aerobios que pueden utilizar otros aceptores finales de electrones diferente al oxígeno, tales como el nitrato y el nitrito. De forma análoga a la cadena respiratoria en presencia de oxígeno, el transporte de electrones desde el NADH a estos aceptores está acoplado a la fosforilación oxidativa
- 2.- Organismos facultativos, crecen como aerobios en presencia de oxígeno y en su ausencia llevan a cabo procesos fermentativos. Las enterobacterias son representantes de este grupo.
- 3.- Anaerobios estrictos, no tienen cadena respiratoria y el oxígeno generalmente les es tóxico.

5.4.1 Sistemas fermentativos. Fermentación ácido-mixta y butanodiol

Se define como fermentación al proceso que se da cuando el sustrato es catabolizado y algún intermediario de la ruta sirve a su vez como aceptor del poder reductor producido, dando como producto final una nueva molécula y energía en forma de ATP producido por fosforilación a nivel de sustrato (Bock y Sawers 1996). Las enterobacterias, levaduras, bacterias lácticas y muchos otros microorganismos pueden fermentar azúcares como la

glucosa o la lactosa, incluso parcialmente en presencia de oxígeno (Jansen *et al.*, 1984; Zeng y Dekwer, 1996).

Los productos acumulados durante a fermentación ácido-mixta con enterobacterias son: etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido succínico, CO₂ e hidrógeno. Estos productos se generan a partir de varias rutas metabólicas que tienen como precursor al ácido pirúvico (Figura 4.4.1). La vía del butanodiol se presenta en microorganismos de los géneros *Klesiella*, *Serratia* y *Bacillus*, entre otros. Se lleva a cabo en tres reacciones a partir del ácido pirúvico, teniendo como intermediarios al acetolactato y la acetoina (Figura 4.4.2).

Los diversos productos de estas vías forzosamente deben lograr un balance redox (Bock y Sawers, 1996). Está reportado que cuando hay limitación de oxígeno, *B. subtilis* lleva a cabo la fermentación ácido mixta y formación de butanodiol a partir de ácido pirúvico, el cual es convertido por la piruvato deshidrogenasa en acetilCoA (Nakano *et al.*, 1997). El crecimiento de *B. subtilis* cuando fermenta glucosa es muy poco, y se ha encontrado que se incrementa la capacidad fermentativa y el crecimiento cuando se adicionan simultáneamente piruvato y glucosa, obteniéndose etanol, butanodiol, acetoina, lactato y acetato (Nakano *et al.*, 1997). Clements, *et al.* (2002) postulan que en dichas condiciones el ácido pirúvico posiblemente es utilizado como un aceptor de electrones.

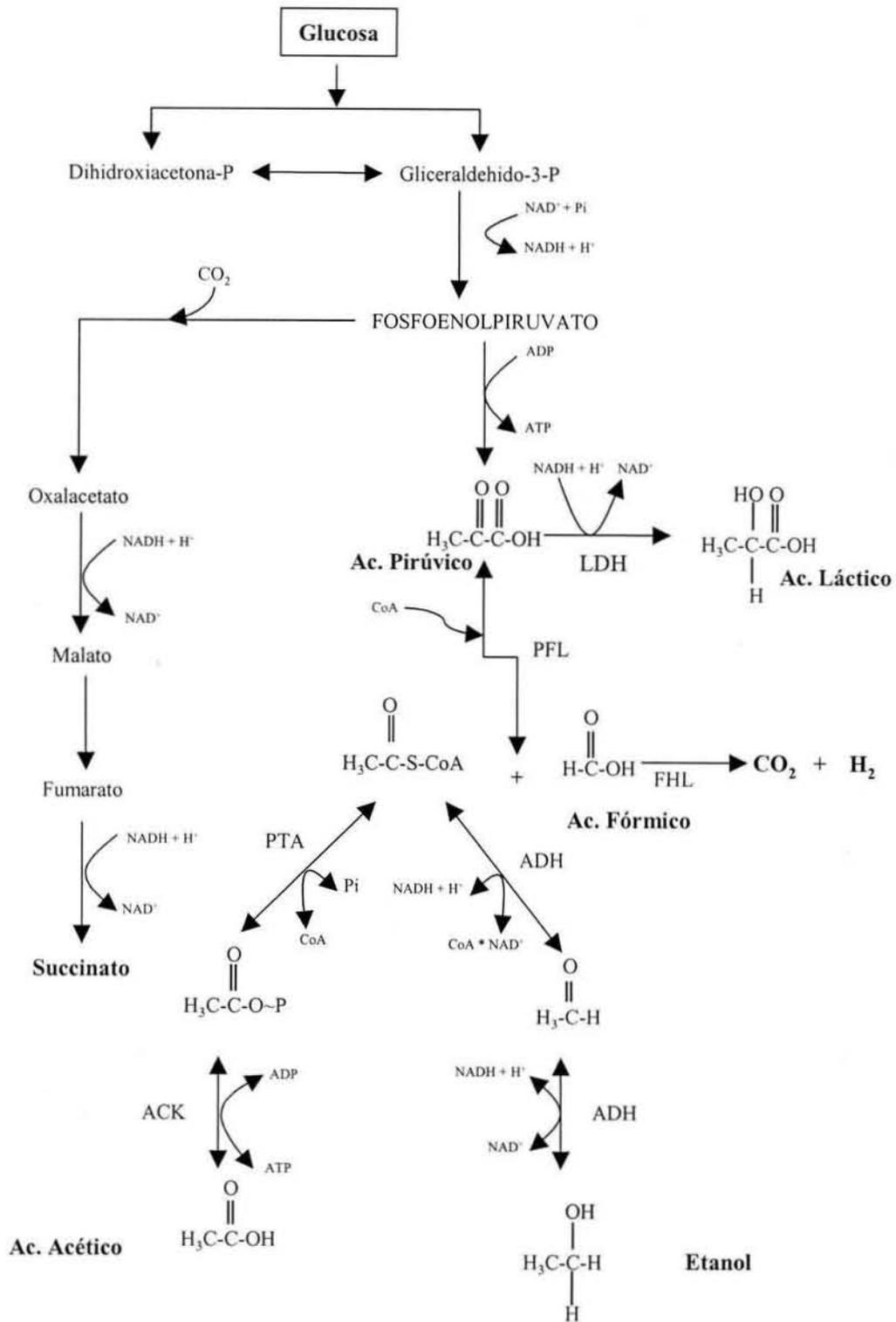
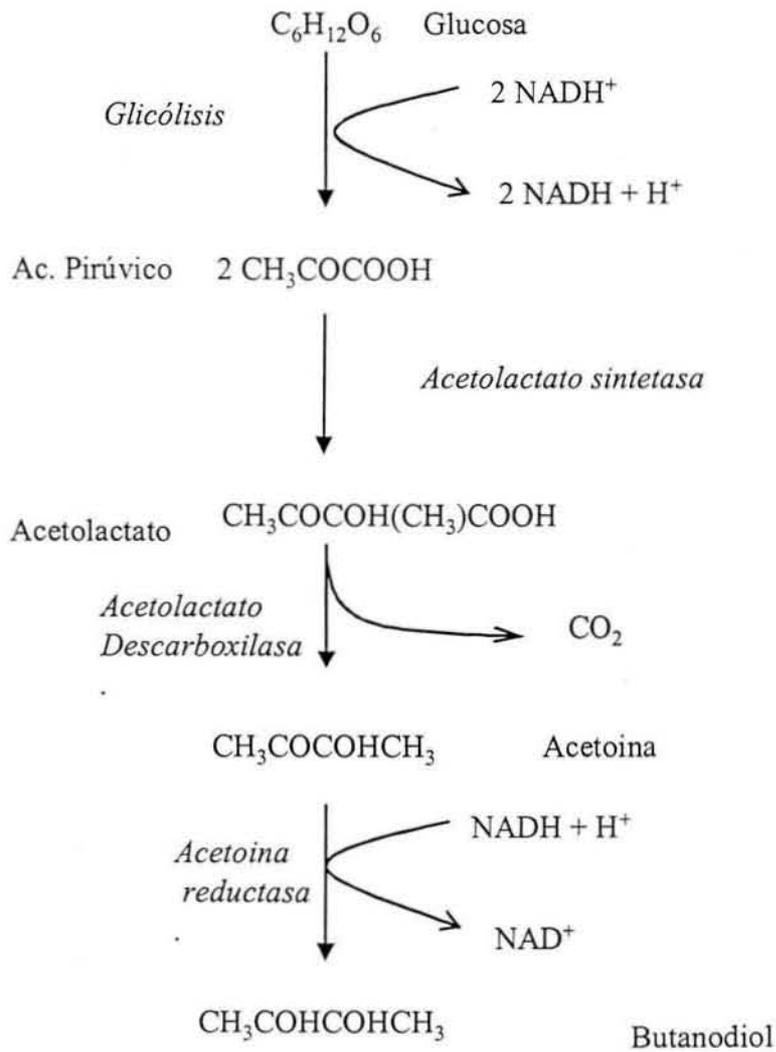


Figura 4.4.1 Fermentación ácido mixta en *Escherichia coli*.

Figura 4.4.2 Fermentación butanodiol.



5.5 SISTEMAS RESPIRATORIOS

La respiración del oxígeno es un proceso fundamental para la vida de animales y plantas. La reducción del oxígeno, entre todos los aceptores finales de electrones, tiene la mayor diferencia de potencial redox (Gennis y Stewart, 1996). La energía liberada en estas reacciones, sirve para translocar protones al través de la membrana celular y formar ATP. En los microorganismos y a diferentes condiciones de cultivo la cifra de deshidrogenasas y oxidasas terminales cambia, esto hace que el número de protones translocados y la eficiencia energética de la respiración cambie. Cuando no existe oxígeno en cantidad suficiente otros aceptores finales de electrones como el nitrato y el fosfato son susceptibles de emplearse, requiriéndose de enzimas específicas para llevar a cabo este proceso, las cuales pueden estar acopladas a la cadena respiratoria (Richardson, 1999).

5.5.1 Cadena respiratoria

La cadena respiratoria esta constituida por una agrupación de proteínas en la membrana citoplasmática y/o mitocondrial, las cuales translocan protones provenientes del catabolismo y transfieren la energía de coenzimas reducidas, en forma escalonada, hacia un aceptor final de electrones, el cual es reducido, reciclando de esta forma las coenzimas. Los protones translocados son empleados en reacciones bioquímicas (p. Ej. transporte de sustratos y productos) y en la generación de energía en forma de ATP.

El inicio de la serie de reacciones en la cadena respiratoria es función del compuesto que va a servir de donador de electrones, por ejemplo NADH, intermediarios del ciclo de Krebs, etc., después continúan aquellas en las que se utilizan compuestos tales como citocromos, coenzima Q, etc., los cuales son usados para transportar los electrones, hasta finalmente llegar a la oxidasa terminal. La cadena respiratoria mejor estudiada de bacterias es la de *E. coli*. Tiene dos NADH-deshidrogenasas codificadas en los genes *nuoA-N* y *ndh* y dos oxidasas terminales para el oxígeno codificadas en *cyoABCD* y *cydAB*; el uso preferencial de cada una de estas proteínas, la cantidad de protones translocados al través de la membrana y por lo tanto la eficiencia en la generación de ATP está regulada por la transferencia del oxígeno y no por la concentración de éste (Alexeeva *et al.*, 2002). La deshidrogenasa NuoA-N es una verdadera bomba de protones que transloca dos protones por electrón, mientras que la deshidrogenasa Ndh no transloca protones. En condiciones

limitantes de oxígeno, la deshidrogenasa NuoA-N es producida principalmente, mientras que en condiciones no limitantes de oxígeno, la deshidrogenasa mayoritaria es Ndh. En las oxidasas terminales se translocan 2 y 1 protones por electrón para la oxidasas CyoABCD y CydAB, respectivamente (Unden y Bongaerts, 1997). La oxidasas CydAB tiene una mayor afinidad por el oxígeno y menor eficiencia energética ya que transloca solo un protón por electrón transferido, mientras que la oxidasas CyoABCD transloca dos protones por electrón. La eficiencia de la cadena respiratoria pareciera mayor en condiciones de limitación de oxígeno ($P/O=2$; se forman dos moléculas de ATP en la ATPasa por cada átomo de oxígeno que se reduce en la cadena respiratoria), que en condiciones sin limitaciones ($P/O=1 \frac{1}{3}$), sin embargo hay que tomar en cuenta que el ciclo de Krebs generador de coenzimas reducidas es regulado por la disponibilidad de oxígeno y el piruvato proveniente del catabolismo es desviado a la acumulación de productos de fermentación, por lo que esta disminución del funcionamiento del ciclo de Krebs es lo que hace que la eficiencia respiratoria global sea menor.

La disponibilidad de oxígeno tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión de las diversas oxidasas terminales y en el proceso de fermentación ácido-mixta. Durante el crecimiento aeróbico, las bacterias consumen rápidamente el oxígeno en las oxidasas terminales que se encuentran en la cara interna de la membrana celular. Un calculo hecho por Arras *et al.*, muestra que el paso del oxígeno al través de la membrana por difusión es lo suficientemente rápido para que pueda llegar hasta la cadena respiratoria a una cantidad en el medio menor de un micromol (Arras *et al.*, 1998), lo cual indica que el oxígeno es capaz de llegar al sitio de reacción a concentraciones extracelulares muy bajas. La respuesta en el metabolismo a concentraciones bajas de oxígeno es función de la presencia de otros aceptores de electrones como el nitrato, dimetilsulfoxido, etc. (Tseng, *et al.*, 1996). Estudios en los que se han hecho mediciones de oxígeno disuelto han mostrado que la respiración con oxígeno, respiración anaerobia y fermentación funcionan a concentraciones mayores de 5 micromolar, menores de 5 micromolar y menores de 1 micromolar de oxígeno, respectivamente (Unden *et al.*, 2002). Por lo tanto, la formación de las enzimas que intervienen tanto en la respiración anaerobia como en la fermentación tienen que

inducirse primero en función de la concentración de oxígeno y del estado de oxidación y reducción del medio.

En *B. subtilis* la estructura de la cadena respiratoria es compleja (Fig. 4.5.1), diversas deshidrogenasas transfieren electrones desde los sustratos a las menaquinonas (Azarkina *et al.*, 1999) y de estas continúan dos ramas, una con quinol oxidasa y la otra con citocromo oxidasa como acarreadores de los electrones. Existen cuatro oxidasas terminales que son; el citocromo caa_3 , el citocromo aa_3 , el citocromo bd y una molécula aun no identificada YthAB que aparece en los datos del genoma secuenciado (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). En medio de cultivo complejo y en condiciones aerobias una de las quinol oxidasas terminales, ya sea la citocromo oxidasa aa_3 o la citocromo bd , son esenciales para el crecimiento aeróbico, siendo la aa_3 la oxidasa más importante en el crecimiento. Mientras que en la fase estacionaria y para la formación de esporas se requiere ya sea de la rama citocromo oxidasa con el citocromo caa_3 o de la citocromo oxidasa aa_3 , las cuales funcionan como bombas de protones (Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). En la fase estacionaria la proporción observada de protones bombeados fue de $1.2 H^+/e^-$ y cuando se adiciono cianuro que es un inhibidor del citocromo aa_3 , el valor disminuyo a 0.9, demostrando que el citocromo bd no es una bomba de protones, por lo tanto la proporción ATP/O máxima es de $1 \frac{1}{3}$ en condiciones aerobias. Este valor es igual al observado en el crecimiento de *E. coli* sin limitación de oxígeno. En condiciones de respiración de nitrato la relación ATP/O debiera ser la misma debido a que la nitrato reductasa respiratoria debe funcionar como una bomba de protones, tal y como sucede en *E. coli* (Uden *et al.*, 2002).

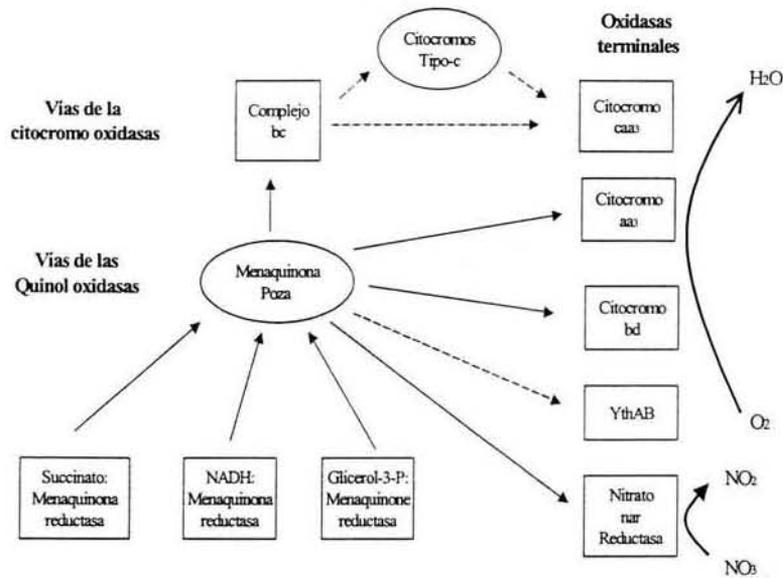


Figura 4.5.1 Cadena respiratoria de *B. subtilis*. Las líneas punteadas representan vías tentativas.

5.6 DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso por el cual el nitrato es transformado, en una serie de reacciones, en óxidos de nitrógeno y finalmente en nitrógeno molecular, también incluye el proceso de conversión de nitrato a nitrito y posteriormente a amonio. Muchas de las enzimas que intervienen en este proceso se encuentran asociadas a la cadena respiratoria y son capaces de utilizarse en el bombeo de protones, ayudando a la conservación de energía (Ferguson, 1998). Diversos grupos de microorganismos pueden desnitrificar, mecanismo que se ha estudiado principalmente en bacterias Gram negativas, sin embargo algunas bacterias Gram positivas lo llevan a cabo, incluidas diversas especies del género *Bacillus* (Shapleigh, 1999), arqueas y hongos (Zumft, 1997). La primera reacción es la reducción del nitrato a nitrito, catalizada por la nitrato reductasa, de la cual se conocen en bacterias tres clases de proteínas diferentes:

1.- La nitrato reductasa asimilatoria, la cual es utilizada con fines biosintéticos en condiciones aerobias y es reprimida por amonio. En *B. subtilis* esta proteína está codificada en los genes *nasBC* (Nakano y Zuber, 1998).

2.- La nitrato reductasa respiratoria, que es inducida a su máxima expresión en condiciones anaerobias y en presencia de nitrato (Stewart *et al.*, 2002), es una enzima oligomérica la cual se encuentra codificadas en el operón *NarGHIIJ*, está unida a la membrana y participa en la generación del gradiente de protones, el sitio activo está localizado en la cara citoplasmática de la membrana, no es reprimida por amonio, pero sí por oxígeno (Richardson *et al.*, 2001). En la secuenciación del genoma de *B. subtilis* se encontró un operón policistronico *narGHIIJ*, el cual guarda una alta conservación, en la secuencia de los aminoácidos, con la nitrato reductasa de *E. coli*, principalmente con NarGH (Hoffmann *et al.*, 1995). En *E. coli*, existe una segunda nitrato reductasa unida a membrana codificada en el operón *narZYWV*, que se expresa a niveles crípticos y que funciona en la transición de condiciones aerobias a anaerobias (Blasco, *et al.*, 2001).

3.- Por último, la nitrato reductasa Nap, se encuentra codificadas en el operón *NapFDAGHBC*, la unión de esta proteína a la membrana es más débil que la de Nar, se encuentra en el espacio periplásmico, su papel es posiblemente reciclar un exceso de poder reductor o en condiciones limitantes de nitrato funcionar a expensas de la generación de un gradiente de protones debido a su menor valor de K_m (Richardson, 2000). Recientemente se ha postulado que, en *E. coli* algunas proteínas del operón desempeñan actividades para la generación de energía (Brondijk *et al.*, 2002).

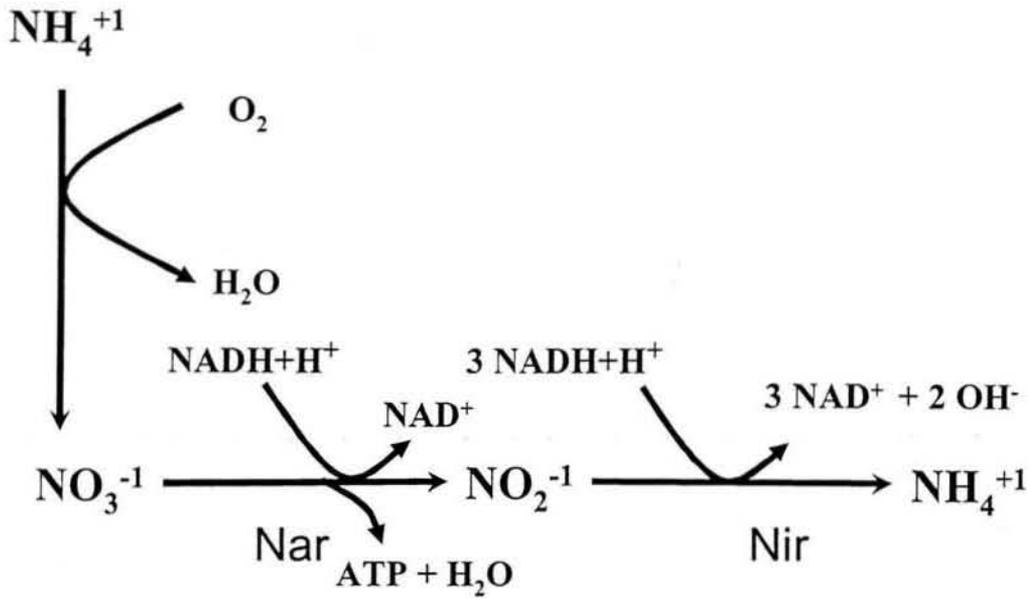
5.6.1 Reducción anaerobia del nitrito a amonio.

E. coli y otros microorganismos reducen el nitrato a nitrito y este a su vez es reducido a amonio (Cole y Brown, 1980). Este proceso se lleva a cabo en condiciones anaerobias y no debe confundirse con la asimilación aeróbica del nitrato y con la nitrificación que es el proceso opuesto en condiciones aerobias, ver Fig.5.6.1. *E. coli* tiene dos reductasas de nitrito. La primera es una proteína denominada Nir, codificada en el operón *nirBCD*, es soluble y utiliza como donador de electrones al NADH, su máxima expresión se encuentra

a concentraciones no limitantes de nitrato. La otra enzima, NrfA, es una enzima membranal, codificada en el operón *nrfABCDEFG*, que utiliza formato como agente reductor y es capaz de llevar a cabo la generación de un gradiente de protones, su expresión máxima se encuentra bajo condiciones de limitación de nitrato (Wang y Gunsalus, 1999).

En condiciones anaerobias y en presencia de nitrato, *E. coli* reduce el flujo de carbono al ciclo de Krebs para usarlo exclusivamente con fines biosintéticos, las coenzimas reducidas generadas se utilizan en la conversión del nitrato a amonio y en este proceso se obtiene energía por el bombeo de protones en la cadena respiratoria con la deshidrogenasa NuoA-N y con la nitrato reductasa para obtener 2 moles de ATP por mol de nitrato convertido a amonio (Richardson *et al.*, 2001). En *B. subtilis* el nitrito producido por la nitrato reductasa es convertido en amonio por la nitrito reductasa asimilatoria NasDE, la cual es una enzima que se encuentra localizada en el citoplasma (Nakano y Zuber, 1998). Las evidencias experimentales sugieren que en condiciones de respiración de nitratos *B. subtilis* solo puede producir 4/3 de ATP por nitrato convertido en nitrito o en amonio, este es igual al que se tiene en condiciones aerobias ya que la deshidrogenasa que transporta los electrones a las menaquinonas no bombea protones, solo ocurre en la reducción del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa o en la reducción del oxígeno en las oxidasas terminales *caa₃* y *aa₃*.

NITRIFICACIÓN



REDUCCION ANAEROBIA DE NITRATO A AMONIO

Fig 5.6.1 Reacciones que ocurren en la reducción de nitrato a amonio. Nar es la enzima nitrato reductasa y Nir nitrito reductasa.

5.7 CONTROL DEL METABOLISMO ANAEROBIO

El cambio de una condición aeróbica a una anaeróbica se da en forma gradual. El determinar la disponibilidad de algún aceptor final de electrones o en su ausencia utilizar la fermentación, el poder desplazarse a otros sitios con condiciones más favorables son aspectos que requieren de un adecuado sistema de control que permita responder rápidamente a las células con respecto al metabolismo necesario para funcionar.

5.7.1 En *Escherichia coli*

En *E. coli* se han encontrado diversas moléculas que intervienen en el control genético del cambio del metabolismo aerobio a anaerobio, entre ellas resalta la proteína Fnr, que se considera la llave maestra que controla la actividad de muchos de los genes que se requieren en condiciones anaeróbicas (Spiro y Guest, 1987). Primero; se ha propuesto que

FNR detecta el estado redox por medio de una caja [4Fe-4S] por subunidad en la cual participan cuatro cisteínas, de las cuales tres se encuentran en el extremo N terminal. Segundo; una secuencia de residuos en el dominio central interacciona con la RNA polimerasa. Tercero; tiene un dominio que posiblemente este involucrado en el proceso de dimerización de unidades, que es la forma en que es activa. Y cuarto; en el extremo carbono terminal tiene una secuencia de aminoácidos que le permite interactuar con su sitio de unión con el DNA en la región promotora y que tiene una secuencia consenso TTGAT-N₄-ATCAA (la caja FNR) (Baker *et al.*, 1998). En presencia de oxígeno, la caja cúbica [4Fe-4S]²⁺, que es sumamente lábil a este, es convertida a la forma cuadrada planar [2Fe-2S]²⁺, esto inactiva a la proteína, ya que pierde su capacidad de interactuar con la caja FNR. Si la presencia de oxígeno se prolonga, la caja [2Fe-2S]²⁺ resulta destruida, quedando solamente la apoproteína (Bauer *et al.*, 1999).

Otro sistema de proteínas que interviene, ArcB-ArcA, es un sistema de dos componentes, los cuales modulan la expresión de diversos genes y operones a cambios en el estado redox del medio (Georgellis *et al.*, 2001). ArcB es una cinasa membranal y el elemento quimiorreceptor, mientras la proteína ArcA es el actuador de la respuesta, el cual modula la expresión de diversos genes y operones a cambios en el estado redox del medio. Bajo condiciones anaeróbicas, la cinasa ArcB se autofosforila y transfiere el fosfato a ArcA, el cual es un regulador transcripcional que controla numerosos genes del metabolismo respiratorio y fermentativo. La forma oxidada de los acarreadores quinonas en la cadena respiratoria actúa como una señal directa que inhibe la autofosforilación de ArcB durante la presencia ilimitada de oxígeno. De esta forma el sistema Arc transduce la señal desde la membrana hasta la expresión genética (Georgellis *et al.*, 2001). ArcB es una proteína que tiene un dominio PAS, módulos receptores y transmisores y un dominio transfosforilasa que tiene histidina (Hpt). Los dominios PAS son importantes en la señalización ya que detectan la presencia de luz, redox, oxígeno y niveles de energía entre otros, son regiones que contienen de 100 a 120 aminoácidos, ejemplos de estas proteínas son: KinA, del sistema fosforrelvador del proceso de esporulación, FixL, que regula la expresión anaeróbica de los genes Nif en *Rhizobium* y el propio ArcB (Bauer *et al.*, 1999). Se considera a este sistema como el regulador del metabolismo aerobio.

La expresión genética respiratoria también es regulada por el nitrato y el nitrito, que después del oxígeno son los aceptores de electrones preferidos. El control es ejercido por medio de dos moléculas quimiorreceptoras, que son NarX y NarQ, las cuales transmiten el mensaje al través de dos actuadores transcripcionales NarL y NarP, que reconocen un sitio consenso TACYYMT (Y=C o T, M=A o C) en los genes que controlan. El patrón de expresión es inducción de NarGHII, NirB, NapF, etc. y represión del operon *frd*, que codifica para la fumarato reductasa (Darwin *et al.*, 1998). Estudios hechos en quimiostato han mostrado que el nitrato es un inductor de por lo menos dos ordenes de magnitud mas fuerte que el nitrito para *nirB* y *nrfA*, igualmente es mas potente inductor para *NarG*. La nitrito reductasa *nrfA* se supone tiene un papel fisiológico solo cuando la concentración de nitrato o nitrito es limitante (menor de 1 y 2 mM para nitrato y nitrito respectivamente)(Wang y Gunsalus, 2000). La respuesta fenotípica de las células es ajustada sobre un rango de señalización dependiendo de la accesibilidad de aceptores alternos. Así parece haber un balance entre el consumo de nitrato que se convierte a nitrito, pudiendo este ultimo alcanzar una concentración tóxica o ser convertido inmediatamente a amonio intracelularmente y excretado al medio de cultivo por difusión (Soupenev *et al.*, 1998; Meir-Wagner *et al.*, 2001).

Cuando no existe la posibilidad de utilizar un aceptor final de electrones, *E. coli* tiene que convertir el piruvato en productos de fermentación (fermentación ácido mixta) y reciclar las coenzimas producidas en glicólisis excretando los productos acumulados. El ácido pirúvico es convertido a acetilCoA aeróbicamente al través del complejo piruvato deshidrogenasa, con la producción de un coenzima reducida, mientras que en condiciones anaeróbicas el piruvato es convertido en una molécula de ácido fórmico y una molécula de acetilCoA, por la piruvato-formato liasa, sin que se produzcan coenzimas reducidas. En la respiración anaerobia del nitrato y fumarato, la piruvato deshidrogenasa se encuentra activa al igual que la piruvato formato liasa y se sospecha que la actividad de ambas enzimas esta regulada por el estado de oxido reducción que se tenga en el medio (De Graef *et al.*, 1999). Cambiando las condiciones de oxido reducción se ha observado un cambio en los patrones de fermentación que indican una modificación en los flujos metabólicos, estabilidad y/o actividad de las enzimas de las diversas rutas (Riondet *et al.*, 2000).

La piruvato formato liasa esta sujeta a un control metabólico complejo y es inducida su síntesis al través de FNR y ArcA en condiciones anaerobias. A pH ácido el formato producido es convertido en hidrógeno y CO₂ El formato producido subsecuentemente y a pH ácido es convertido en hidrógeno y CO₂ por la enzima formato-hidrogeno liasa. La acetilCoA puede convertirse en etanol con el gasto de dos coenzimas reducidas con la enzima alcohol deshidrogenasa, o puede transformarse en ácido acético en dos reacciones subsecuentes mediado primero por la piruvato transacetilasa, el acetilfosfato generado es convertido en acético y una molécula de ATP por la acetato cinasa. El balance redox de estas reacciones es ajustado de acuerdo al sustrato que se este fermentando, en presencia de glucosa se favorecería la equimolaridad de los dos compuestos. Otra posibilidad en el destino del piruvico es la producción de ácido láctico por medio de la lactato deshidrogenasa, cabe mencionar que mutantes en el gen que la codifica, no presentan una defecto en su crecimiento anaerobio, por lo que se especula que se ha conservado simplemente por dar mas flexibilidad metabólica a *E. coli* y a que en su excreción se translocan protones (Brock y Sawers, 1993). El papel de la proporción de concentraciones NADH/NAD en elicitar el gen *adhE* se ha demostrado usando fusiones de este con el gen reportero *LacZ*, bloqueando la cadena respiratoria aeróbicamente y limitando la síntesis de NAD anaerobicamente (Leonardo *et al.*, 1996).

5.7.2 En *Bacillus subtilis*.

En *B. subtilis* se ha observado que muchos genes se inducen o se reprimen en el cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas (Ye *et al.*, 2000). Se ha encontrado que la regulación se lleva a cabo por proteínas como es el caso de Fnr de *B. subtilis*, la cual es muy semejante a aquella de *E. coli*. Sin embargo el mecanismo de control es diferente, ya que es positivamente regulada en respuesta a una baja concentración de oxígeno. Fnr activa varios genes entre los cuales están *narGHIJ*, *narK*, *nirC*, *lctEP* y *alsSD* (nitrato reductasa, transportador de nitrito, formación de lactato y acetoina respectivamente) (Cruz-Ramos *et al.*, 1995; Marino *et al.*, 2001). Los genes *fnr* y *narK* están estructuralmente situados en un operón policistronico hacia arriba del operon *narGHIJ* en un locus denominado *nar*, que también incluye el gen *arfM* y el marco de lectura abierto *ywiC*. FNR de *B. subtilis* tiene

una similitud del 20 y 24 % de residuos idénticos con FNR y Cap de *E. coli*. (Ramos *et al.*, 1995). La regulación transcripcional de *fnr* (*fnr-narK*) es ejercida en dos sitios, una dependiente de FNR en el promotor del operón junto con *narK* y la otra mediada por *resD* y *resE* en el promotor interno. *resD-resE* son dos genes que codifican para proteínas que tienen similitud a los sistemas de dos componentes y que son requeridos para la activación transcripcional de *fnr* en condiciones de limitación de oxígeno (Nakano *et al.*, 1996). La función de ResD está directamente relacionada a funciones respiratorias (Sun *et al.*, 1996). La fermentación láctica (*lctE*) en *B. subtilis* es activada por *resD-resE*, *fnr* y *arfM* (Nakano *et al.*, 1997, Cruz *et al.* 2000; Marino *et al.*, 2001) y su expresión es significativamente reducida en presencia de nitrato. *arfM* es otro regulador en la cascada de reacciones que regulan el metabolismo anaerobio y que ejerce control sobre la expresión de *lctEP* y *alsSD*, su expresión es regulada a su vez por FNR. La formación de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs en condiciones de respiración de nitratos se encuentran reprimidas y otras solo parcialmente, este control no es ejercido por Fnr, ResD-ResE y tampoco involucra a CcpA y CcpB (Nakano, *et al.*, 1998).

La regulación de la nitrito reductasa ha sido muy controvertida ya que se han usado diferentes cepas (168, derivadas y JH642) y condiciones en su estudio. Hoffman, *et al.* (1998) mostraron que la cepa JH642 es capaz de crecer anaeróticamente con nitrito como aceptor final de electrones, sin embargo no mostraron una dependencia de FNR para la expresión de la nitrito reductasa. Cuando usaron nitrato, ellos reportan que inmediatamente a la aparición de nitrito por la acción de la nitrato reductasa, se inicia la conversión a amonio por la nitrito reductasa. Nakano *et al.* (1998) también mostraron que la cepa JH642 podía crecer en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrito. Clements *et al.* (2002) no observaron crecimiento de una cepa derivada de la 168 en condiciones anaerobias utilizando nitrito.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA.

Esta determinación se hizo tomando la densidad óptica de los cultivos a 600 nanómetros y comparando contra una curva de calibración de peso seco de *B. subtilis*. Para la determinación del peso seco se tomaron alícuotas de cultivos a diversas edades y se pasaron al través de membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.22 micras, previamente secas y taradas. Se utilizó el peso promedio de duplicados de cada muestra, las cuales previamente se secaron en estufa a 90 °C hasta obtener un peso constante. Con los datos obtenidos se encontró un valor de conversión de biomasa a densidad óptica de 0.35 g/l por unidad de densidad óptica ($r^2 = 0.99$).

6.2 CEPA, MEDIOS DE CULTIVO Y PREPARACION DE INÓCULOS.

En la mayoría de los experimentos reportados en este trabajo, se usó la cepa de *B. subtilis* BSR6 ($\Delta nprE$, Δamy , *hisA*, *glyB*, *aprE::lacZ*, *Cm^R*; Jan *et al.*, 2000). BSR6 es una derivada de la cepa 168 y tiene una fusión transcripcional *aprE-lacZ* integrada en el locus *amyE* de *B. subtilis* (*amyE::pTTGACA cat*). En algunos experimentos se utilizó una cepa modificada de BSR6, la JJ1, en la cual a diferencia de BSR1 se le cambiaron cuatro bases de la caja -35 de *aprE* y obtener la secuencia TTGACA. Las cepa se mantuvo en crioviales conteniendo glicerol al 12 % y congelados a una temperatura de -70 °C, provenientes de cultivos jóvenes de una densidad óptica de 1.0 crecidos en medio de cultivo líquido Luria (5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 10 g de NaCl por litro). Para los estudios en fermentadores se utilizó el medio Schaeffer (Schaeffer *et al.*, 1965; conteniendo por litro: 8 g de caldo nutritivo, 1 g de KCl, 0.12 g de MgSO₄.7H₂O, 0.1 milimoles de MnCl₂; 1 milimol de Na₂SO₄ y 0.001 milimoles de FeSO₄; a pH 7). A este medio se le añadió glucosa, nitrato o ambos según se describe en la sección de resultados. Para la preparación de inóculos, se tomó una asada de un tubo de conservación congelado y se transfirió a un criovial de ensayo conteniendo 3 mililitros de caldo Luria. Después de 12 horas de

incubación, un mililitro se transfirió a su vez a un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml de caldo Luria y se dejó crecer en una agitadora hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 (aproximadamente 2 h) y se empleó una porción de estas células para inocular los fermentadores. Tanto el tubo como el matraz se incubaron a 37°C y 300 rpm.

6.3 ESTUDIOS EN FERMENTADORES.

Los cultivos tanto aerobios como anaerobios fueron iniciados con un inóculo del 2 % en un fermentador (Multigen; New Brunswick Scientific, Co., N.J.), provisto con cuatro mamparas, un impulsor de turbina tipo Rushton, con un volumen de operación de un litro y operado a una temperatura de 37°C y 500 rpm. El pH se controló automáticamente a 7.0 mediante la adición de NaOH 0.5 M o 0.35 M H₃PO₄ según fuera necesario. El oxígeno disuelto se midió empleando un electrodo polarográfico (Ingold). La espuma se controló mediante la adición manual de una solución de aceite de silicón grado alimenticio al 0.5% (Dow Corning). En los cultivos aerobios se usó un flujo constante de aire de 1 v.v.m. y nunca se observó una disminución por debajo del 20 % de oxígeno disuelto.

El potencial de oxidación-reducción se midió empleando un electrodo redox (Ingold), el cual se calibró usando el procedimiento recomendado por el fabricante y que consiste en utilizar dos estándares de potencial conocido y que fueron de +220 y +468 mV (Ingold, 1982), esto se hizo al iniciar las cinéticas. Se tuvo especial cuidado de limpiar el electrodo después de cada estudio a fin de evitar el depósito de proteína sobre la membrana del sensor. Para los cultivos anaerobios y con la finalidad de tener una condición inicial estándar de anaerobiosis, se inició un burbujeo en el fermentador de 100 ml/min de nitrógeno gaseoso 5 horas antes de la inoculación y de 500 ml/min durante el cultivo. La lectura en el fermentador se ajustó a un valor inicial de cero milivolts ya que se observó una diferencia de hasta 30 mV (de -70 hasta -100 mV) en la lectura inicial.

Los análisis de bióxido de carbono y oxígeno fueron llevados a cabo a la salida del fermentador utilizando un espectrómetro de masas. Para su calibración se usó un estándar de concentración conocida de CO₂ y el contenido del 21% de oxígeno del aire. La

producción de CO₂ y el consumo de oxígeno se hicieron determinando la velocidad producción de bioxido de carbono (CER) y la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), lo cual se logró utilizando un balance de masa en el fermentador.

6.4 FERMENTACIONES ALIMENTADAS.

Como se muestra en los resultados, para poder lograr una fase estacionaria sin lisis celular, fue necesario suministrar tanto al aceptor final de electrones (nitrato), como la fuente de carbono (glucosa) una vez terminada la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos alimentados se iniciaron por lote a una concentración de glucosa y nitrato de 22 mM y 16 mM respectivamente (relación molar glucosa / nitrato de 1.4). La alimentación se inició antes de que la glucosa y el nitrato se terminaran (una concentración de glucosa arriba de 1 g/l). La solución de alimentación contenía una concentración de glucosa de 0.46 M y de nitrato de 0.336 M y se adiciono a un flujo de 0.24 ml/min.

6.5 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN.

Las muestras obtenidas de las fermentaciones se centrifugaron, se separó el sobrenadante, el cual se congeló hasta su análisis. La glucosa se midió con una analizador enzimático (Ektachem DT60 II multiple analyzer, Kodak, Rochester, NY). El acetato, lactato, acetoina, succinato y butanodiol fueron analizadas por HPLC. Se utilizó para la separación la columna Aminex HPX-87H (300x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 60°C y usando una solución de H₂SO₄ 5.0 mM como fase móvil (0.5 ml/min). Los compuestos fueron determinados por medio de un detector de índice de refracción Waters 410 (Waters, Millipore Co., Milford, MA). Se elaboraron curvas de calibración de cada uno de ellos en un rango de concentración de 0.1 a 1.0 g/l. El tiempo de elusión fue de 16.43 minutos para el succínico, seguido del láctico a los 17.12, acético a los 20.18, acetoina a los 23.77 y por ultimo el butanodiol a los 25.3. El medio de cultivo Schaeffer tuvo en promedio una concentración inicial de ácido láctico de 0.45 g/l, por lo cual la determinación inicial de ácido láctico se substrajo de las mediciones.

6.6 DETERMINACIÓN DE NITRATO Y NITRITO.

El nitrato y el nitrito se determinaron utilizando tiras reactivas Merkoquant. Estas se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se introdujeron en un refractómetro RQ flex (Merk, Darmstadt, Germany). Para el nitrato la curva de calibración se hizo en un rango de 5 a 250 mg/l, mientras que la de nitrito, en el rango de 5 a 20 mg/l.

La muestra a analizar se centrifugó y se utilizó el sobrenadante para la determinación usando el mismo medio Schaeffer como diluyente en caso de ser necesario, esto se hizo al mismo tiempo de realizada la fermentación. La calibración se verificó mediante la reacción del mismo medio sin inocular (estándar) y se efectuó en diversas ocasiones dependiendo del uso, ya que el equipo funciona con pilas y hay un desajuste con la vida de éstas.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS Y ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

La determinación de esporas se realizó tomando una muestra del cultivo a analizar y añadiéndola a un tubo Eppendorf de 500 μ l el cual a su vez se coloca en un baño a una temperatura de 80 °C, durante 10 minutos. Inmediatamente después se hacen diluciones decimales y se siembran alícuotas de estas en cajas de Petri con medio Luria (10 microlitros y cuadruplicados de cada dilución). Las cajas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias pequeñas que permitieran la enumeración.

La expresión del gen *aprE* fue llevada a cabo usando el gen reportero *lacZ* y la actividad β -galactosidasa se determinó tomando una muestra del cultivo, la cual se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos, descartando el sobrenadante y congelando el paquete celular hasta su análisis. El procedimiento es el descrito por Martínez (1997), y el cual consiste en permeabilizar las células y utilizar un sustrato que al ser hidrolizado por la enzima origina un producto cromóforo que se puede detectar en el espectrofotómetro. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de ONPG/min a 28°C, y se reportó como Unidades por mg de biomasa seca.

7.0 RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 UTILIZACIÓN DEL ELECTRODO DE OXIDO-REDUCCIÓN EN LOS CULTIVOS ANAEROBIOS DE *B. subtilis*.

Una forma sencilla de establecer condiciones anaerobias es simplemente llenar los matraces con medio de cultivo, burbujear un gas inerte, por ejemplo nitrógeno gaseoso durante 15 minutos y sellarlos después de la inoculación. Los primeros experimentos llevados a cabo en este trabajo bajo estas condiciones, tanto en matraz como en fermentador, mostraron gran variación en la duración de la fase de adaptación e incluso la inducción de la enzima nitrito reductasa (acumulación de nitrito, sin su conversión a amonio), lo cual probablemente se debió a la presencia de cantidades residuales y variables de oxígeno, lo que influye en la inducción y represión de genes y la cantidad de energía necesaria para biosíntesis de enzimas requeridas en condiciones anaeróbicas. Los electrodos de oxígeno disuelto, del tipo polarográfico, no pueden utilizarse para delimitar una condición de ausencia de oxígeno o de muy baja concentración, debido a que presentan limitaciones en la sensibilidad de sus mediciones por debajo del 1% o 0.07 ppm a 37°C (Ingold, 1982). El oxígeno es el elemento que mas influye en el valor del potencial redox cuando esta presente, su disminución tiene como consecuencia que el valor redox sea propiedad de la naturaleza fisicoquímica de las sustancias presentes en la solución, pequeñas cantidades de oxígeno hacen que el valor redox cambie a valores positivos y de una forma inmediata (un oxidante fuerte). Para poder tener una condición estándar de anaerobiosis, se decidió utilizar un sensor redox para determinar el nivel del potencial de oxido-reducción en el medio durante el transcurso de los cultivos anaerobios (Wimpenny, 1969). Como se muestra en la figura 7.1.1 al burbujear N₂ al fermentador conteniendo únicamente medio de cultivo, en respuesta al desplazamiento que ocurre de sustancias oxidadas (oxígeno), el potencial redox decrece a una velocidad alta (aprox. 70 mV/h) durante la primera hora, sin embargo durante las horas subsecuentes la dinámica de recambio se reduce y se obtiene una lectura estable después de cinco horas (se establece un equilibrio entre el gas que se burbujea y los componentes (concentración) del medio. Se determinó el tiempo de respuesta del electrodo redox, es decir el tiempo que requiere el sensor y la respuesta que se detectó por medio del amplificador para pasar de un valor de potencial redox a otro diferente usando estándares

de referencia con valores conocidos (+220 y +468 mV). El tiempo de respuesta fue de menos de 1 minuto, indicando que la dinámica mostrada en la figura 7.1.1 depende principalmente del desplazamiento de las sustancias oxidadas (oxígeno). Este fenómeno muestra que, en las condiciones usadas en este trabajo, son necesarias al menos 5 horas para obtener una lectura estable con el electrodo redox al pasar de una condición aerobia a una anaerobia.

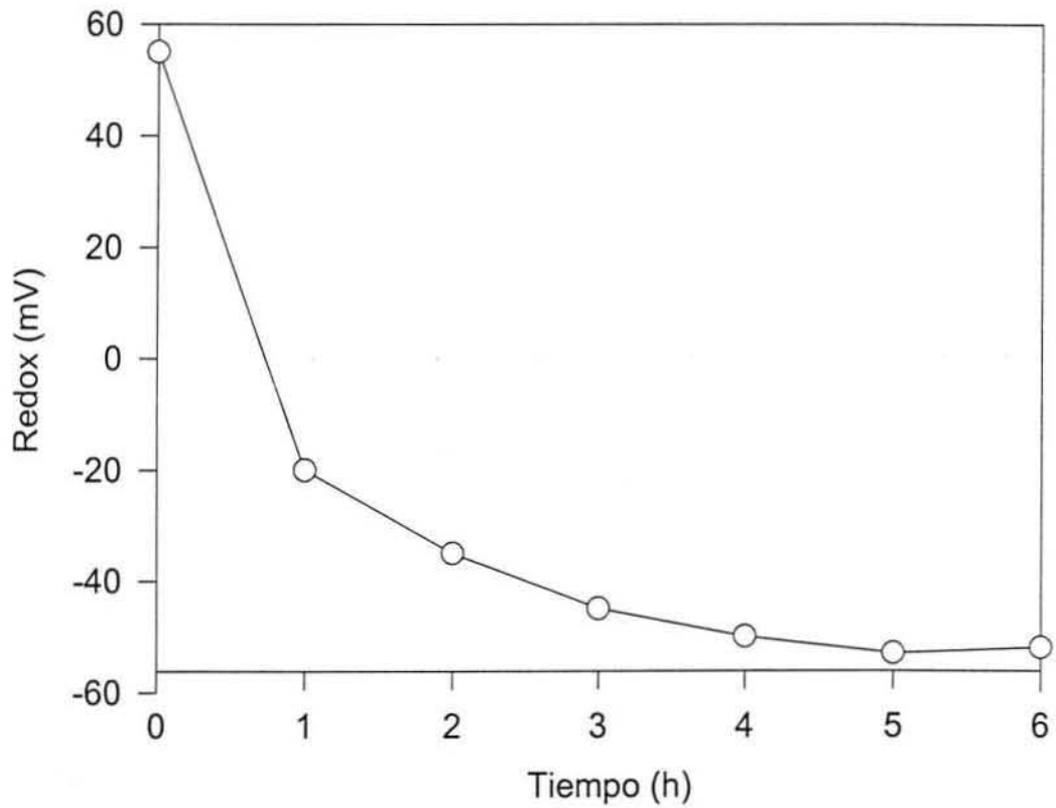


Figura 7.1.1 Evolución del potencial oxido-reducción en medio Schaeffer-Glucosa al burbujear nitrógeno gaseoso a un flujo de 100 ml/min.

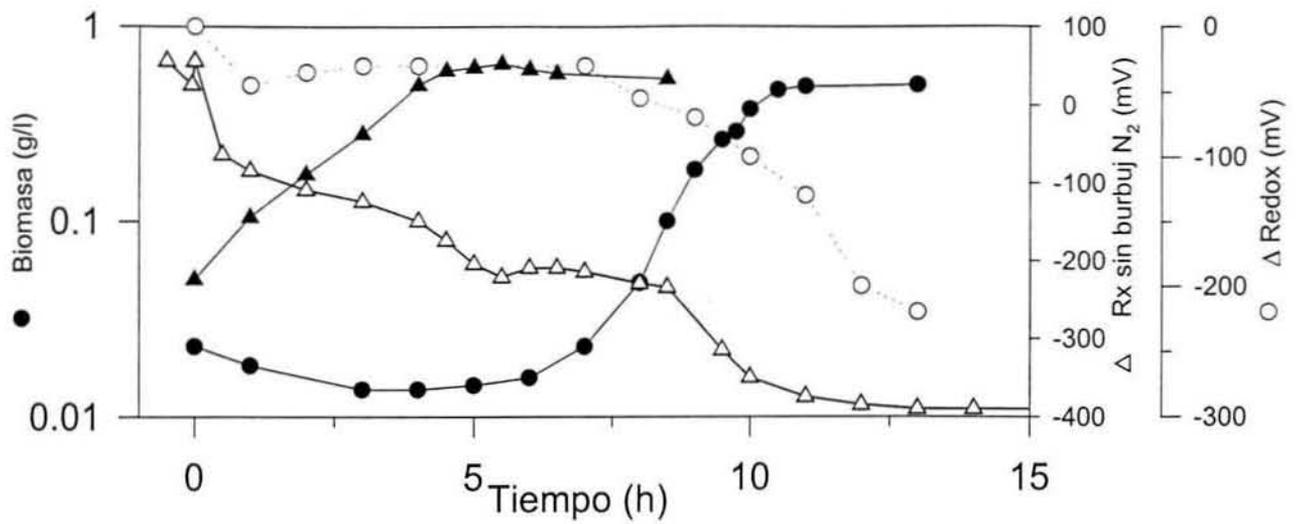


Figura 7.1.2 Adaptación de *B. subtilis* a diferentes formas de establecer la condición anaeróbica inicial. Burbujear nitrógeno por 40 minutos (triángulos llenos biomasa y vacíos redox) y 5 horas (círculos llenos biomasa y vacíos redox).

Por lo expuesto en el párrafo anterior se decidió estandarizar este procedimiento en todos los cultivos anaeróbicos llevados a cabo en esta tesis, es decir burbujear por 5 horas N_2 a un flujo de 100 ml/min y para asegurar una condición anaeróbica durante el transcurso de los cultivos el N_2 se burbujeo a 500 ml/min. No obstante el procedimiento implementado, los valores de redox después de las cinco horas iniciales de burbujeo y antes de la inoculación mostraron una variación de 40 mV (-60 a -100 mV), esto es normal y ha sido mostrado con anterioridad (Hwang y Sinskey 1991), por lo cual se decidió ajustar arbitrariamente el valor de potencial redox, después de burbujear N_2 por 5 horas y antes de inocular, a un valor de referencia de 0 mV, de manera que en los resultados se presentan los valores del cambio que hubo durante los cultivos respecto a este valor de referencia.

Para corroborar el efecto que tiene el burbujeo de N_2 , durante el tiempo estipulado en el párrafo anterior, sobre la adaptación de *B. subtilis* a la condición “anaeróbica”, se llevaron a cabo dos cinéticas de crecimiento, en una de ellas previamente se burbujeo N_2 durante 40 minutos y en la otra durante 5 h y se usó el electrodo redox para verificar el potencial de oxido reducción. Al parecer una concentración remanente de oxígeno permite el crecimiento y adaptación inmediata de los microorganismos cuando se burbujeo N_2 por 40 minutos (Figura 7.1.2). En cambio cuando se burbujeo N_2 por 5 h (100 ml/min) antes de la inoculación y a 500 ml/min durante el cultivo, se obtuvo una fase de adaptación de *B. subtilis* de siete horas a esta condición, para después crecer a una velocidad similar a la obtenida en la otra condición (0.82 vs 0.83 h^{-1} , respectivamente). También puede observarse que la lectura redox se reduce ligeramente como respuesta a la inoculación, se mantiene constante durante la fase de adaptación y se reduce de manera proporcional a la concentración de células generadas durante la fase de crecimiento. Este mismo comportamiento se observó en todos los cultivos anaerobios llevados a cabo en este trabajo.

Se ha observado que la transferencia de un inoculo de *B. subtilis* de condiciones aerobias a anaerobias provoca que la fase de adaptación del cultivo tenga una duración impredecible. Esto se debe a que el oxígeno es muy poco soluble en agua (7-9 mg/litro a saturación), y para poder eliminarlo del sistema por burbujeo de nitrógeno, se requiere de mucho tiempo, dependiendo de la forma en que esto se efectuó. Hoffman, *et al.*, (1995) usaron después de

la esterilización una atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno y como indicador de anaerobiosis a la resazurina (la cual no presenta color al bajar el potencial por debajo de -110 mV; Breznak y Costilow, 1994), esto se hizo con la finalidad de tener en sus experimentos la certeza de una condición anaeróbica. Ellos observaron que la fase de retardo tuvo una duración de entre 24 y 36 horas y que la presencia de pequeñas cantidades residuales de oxígeno son suficientes para generar condiciones microaerofílicas resultando en un crecimiento inmediato de *B. subtilis*, por lo que es importante establecer adecuadamente las condiciones de anaerobiosis.

La condición inicial de anaerobiosis establecida en nuestro trabajo resulto buena, ya que la fase de adaptación tuvo en promedio una duración de 5.75 ± 2.3 horas (2-8.5) en los experimentos con nitrato y glucosa. Una diferencia con el trabajo de Hoffman, *et al.* (1995) radica en que nosotros empleamos nitrógeno comercial, el cual contiene aproximadamente 100 partes por millón de oxígeno (el aire tiene 210,000 partes por millón). Al parecer esa pequeñísima concentración ocasionó que no se obtuvieran fases de retardo tan extensas y variables como las observadas por ellos. La única fase de adaptación mas larga (15 horas) fue para una cinética en medio Schaeffer con solo nitrato (ver sección 6.3). Se encontró una proporcionalidad entre la disminución en el valor redox respecto al incremento en la concentración de biomasa, sin embargo cuando *B. subtilis* deja de crecer o se lisa (ver resultados en la sección 7.3 y 7.4) el cambio del redox sigue patrones difíciles de explicar.

7.1.1 APORTACIONES.

Se encontró que el empleo de un electrodo de oxido-reducción resulta adecuado para establecer una condición anaerobia estándar inicial, que permite conocer la duración aproximada de la fase de retardo. Se pudo determinar una proporcionalidad entre la formación de biomasa y el cambio en el valor redox.

7.2 CRECIMIENTO AERÓBICO Y ANAERÓBICO DE *B. subtilis* EN EL MEDIO DE CULTIVO SCHAEFFER Y SCHAEFFER-GLUCOSA.

Con la finalidad de comparar el efecto de la adición de glucosa se efectuaron cinéticas de crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias de *B. subtilis* en el medio de cultivo Schaeffer sin (Fig. 7.2.1) y con glucosa (Fig. 7.2.2). La velocidad de crecimiento máxima medida en condiciones aerobias y sin glucosa fue de 1.41 h^{-1} mientras que la concentración de biomasa alcanzada al principio de la fase estacionaria fue de 0.88 g/l , el único producto de fermentación detectado fue el ácido acético (0.28 g/l), el cual eventualmente se consumió durante la fase estacionaria. La velocidad de producción de CO_2 incrementó proporcionalmente con el aumento de biomasa, se mantuvo aproximadamente constante durante la etapa de consumo de acético, para finalmente reducirse a un valor basal durante la fase estacionaria. La síntesis de β -galactosidasa (reportero de *aprE*) se inició al final del crecimiento, incrementó esencialmente en la siguiente hora, y aumenta hasta $600 \text{ U/mg}_{\text{Biomasa}}$ durante las siguientes cuatro horas, decayendo posteriormente. La esporulación, determinada a las 18 horas después de terminada la fase de crecimiento exponencial (tiempo normalmente utilizado para cuantificar la formación de esporas en estas condiciones), nos asegura que el número de esporas es máximo, y el cual fue del 32%. Los resultados se resumen en la Tabla 7.2.1, siendo similares a los obtenidos por otros en nuestro laboratorio.

Al añadir glucosa (4 g/l) al medio de cultivo en condiciones aerobias (Figura 7.2.2), se observó una mayor formación de biomasa (2.77 g/l al inicio de la fase estacionaria). También se detectó una mayor formación de acético (hasta 1.3 g/l) durante las primeras tres horas del cultivo, el cual permanece aproximadamente constante, hasta que es consumido una vez que se agotó la glucosa. *B. subtilis* presentó dos velocidades de crecimiento en estas condiciones: la primera (1.76 h^{-1}), mayor a la que se consiguió sin glucosa; y la segunda (0.52 h^{-1}) después de que el acético se acumuló por arriba de 1 g/l y hasta que se agotó la glucosa, esto es debido a la naturaleza compleja del medio de cultivo. La velocidad de formación de CO_2 también fue proporcional al crecimiento y se redujo drásticamente cuando se consumió toda la glucosa. Como era de esperarse, la producción de β -galactosidasa se inició al agotarse la glucosa e iniciar la fase estacionaria, y fue

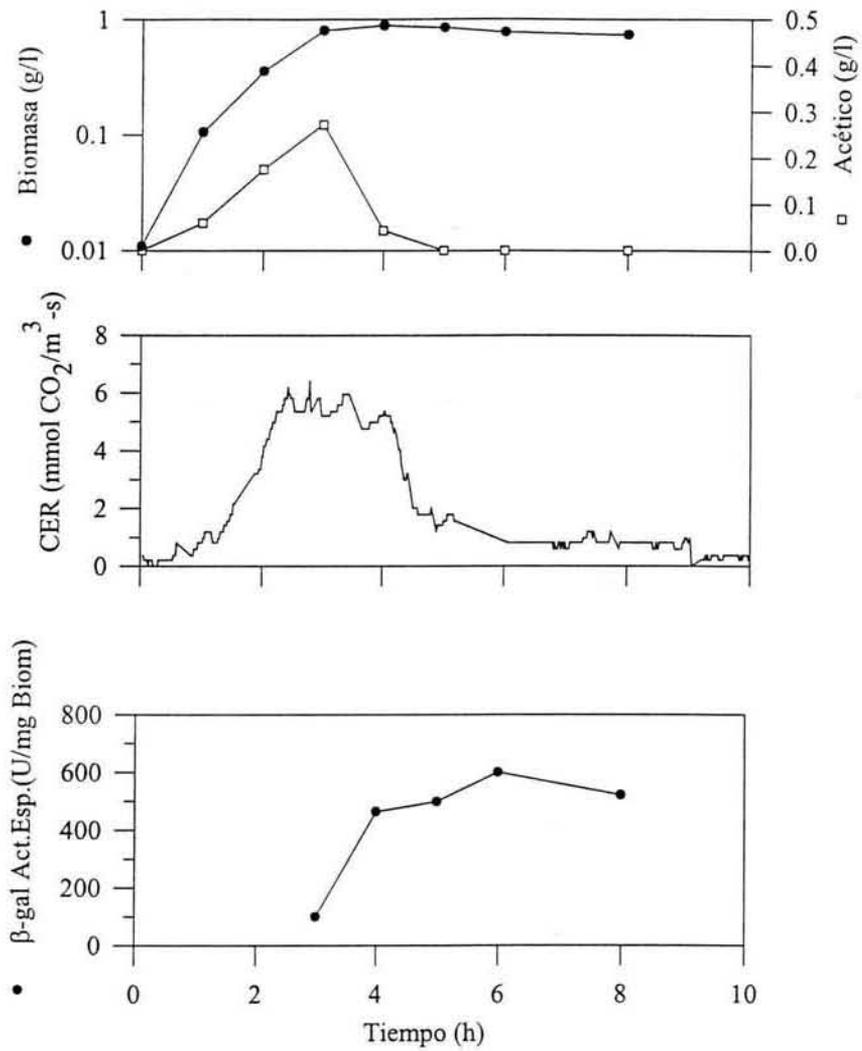
aproximadamente la mitad de la formada en el medio sin glucosa (330 U/mg_{Biomasa}). De manera similar la esporulación (14%), también se redujo a la mitad con respecto al cultivo sin glucosa, ambos fenómenos se pueden deber al efecto represivo que ejerce la glucosa sobre el proceso de esporulación (Schaeffer *et al.*, 1965). Por esta razón, el medio Schaeffer es el seleccionado para estudiar el proceso de esporulación.

Se encontró que *B. subtilis* no crece en las condiciones anaerobias en el medio Schaeffer sin glucosa (usadas en este trabajo). No se esperaba que creciera bajo condiciones anaerobias en el medio Schaeffer-glucosa ya que no existía ningún reporte al respecto. Los estudios sobre la regulación de la fermentación se han hecho por lo general en medios mínimos y complejos conteniendo glucosa y ácido pirúvico, ya que no han observado crecimiento con solo glucosa (Nakano *et al.*, 1997, Cruz Ramos *et al.*, 2000). Sin embargo *B. subtilis* fue capaz de crecer poco en comparación a las condiciones aerobias (Figura 7.2.3), observándose una fase de adaptación larga de 7 horas y reducciones del 86% (0.25 h⁻¹) y 96% (0.1 g/l) en la velocidad de crecimiento y la cantidad de biomasa alcanzada, respectivamente. La poca glucosa que se consumió fue convertida eficientemente en ácido láctico (>90% de conversión de glucosa en láctico). No se detectó la producción de bióxido de carbono ni de acético. La actividad de β-galactosidasa fue prácticamente nula y no se pudo detectar la presencia de esporas resistentes al calor, estos resultados se corroboraron en una segunda cinética. Al parecer la fermentación láctica es el último recurso que tiene *B. subtilis* para reciclar el poder reductor (NADH+H⁺) generado en la glicólisis al metabolizar la glucosa. En este sentido, la disminución en la velocidad de crecimiento (y la biomasa generada) se puede atribuir a que en esta vía no se genera tanta energía en comparación, por ejemplo con el ATP generado al catabolizar el piruvato a acetato, así mismo se sugiere que la limitación energética no es capaz de sustentar la producción de β-galactosidasa y formación de esporas durante la fase estacionaria. El empleo de un medio conteniendo piruvato y glucosa a concentraciones de 50mM ("fermentación") y que no han sido variadas, ni analizados las cinéticas, para mostrar su efecto sobre el metabolismo pone en riesgo las conclusiones que emanan de estas investigaciones.

Tabla 7.2.1 Resultados obtenidos en el crecimiento de *Bacillus subtilis* en condiciones tanto aerobias como anaerobias en el medio de cultivo Schaeffer con y sin glucosa.

| Medio | Condición | ^a Fase de retardo (h) | ^b μ (h^{-1}) | ^c X _{MAX} (g/l) | Producto | ^d β -gal (U/mg _{BIOMASa}) | ^e Esporulación (%) |
|----------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------|--|-------------------------------|
| Schaeffer | Aeróbico | 0 | 1.41 | 0.88 | Acético | 600 | 32 |
| Schaeffer + fGlucosa | Aeróbico | 0 | 1.76 | 2.77 | Acético | 329 | 14 |
| | | | 0.52 ^g | | | | |
| Schaeffer | Anaeróbico | - | 0 | 0 | Ninguno | 0 | 0 |
| Schaeffer + fGlucosa | Anaeróbico | 7 | 0.25 | 0.10 | Láctico | 10 | 0 |

^aDuración de la fase de retardo, ^bvelocidad específica de crecimiento, ^cbiomasa máxima observada, ^dactividad de β -Galactosidasa específica alcanzada a las 4 horas después de terminada la fase de crecimiento exponencial, ^ecuantificación de esporas a las 18 horas después de terminada la fase de crecimiento exponencial, ^fconcentración de glucosa de 4 g/l, ^gvelocidad de crecimiento específica durante la segunda fase de crecimiento.



gura 7.2.1 Cinéticas de crecimiento, formación de acético, velocidad de evolución de CO₂ (CER) y actividad específica de β-galactosidasa en condiciones aeróbicas en medio Schaeffer.

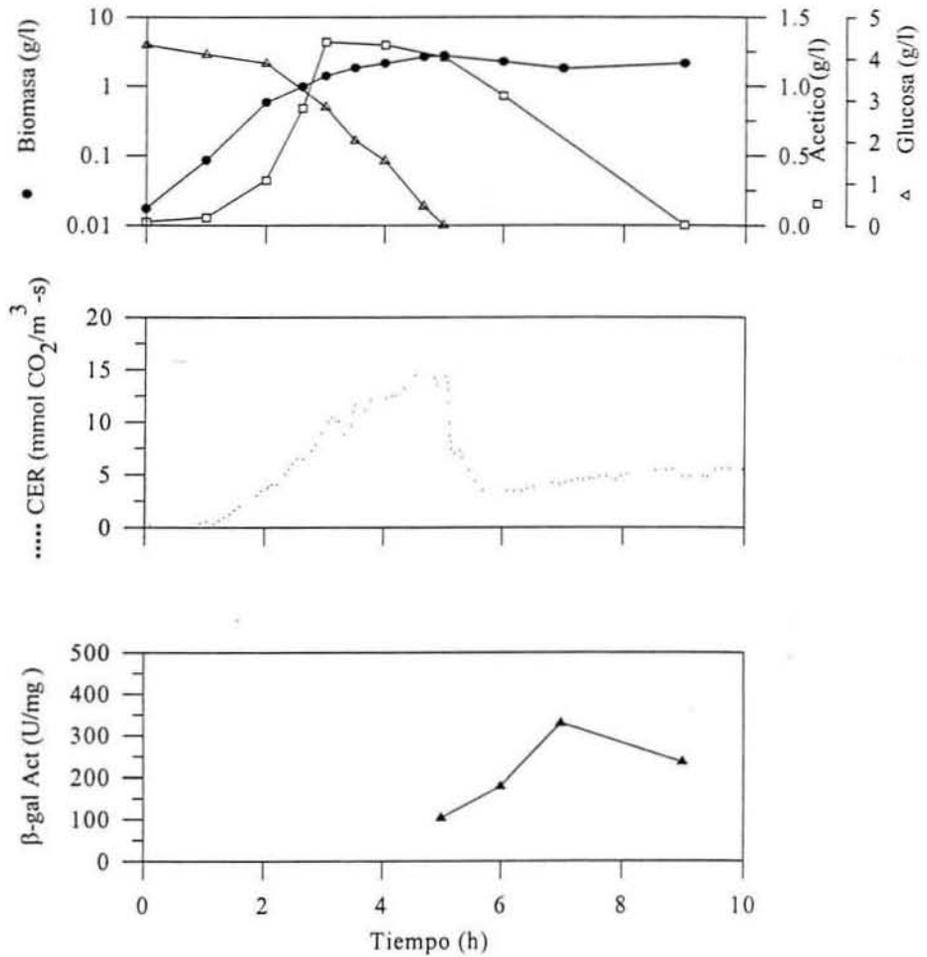


Figura 7.2.2 Cinética de crecimiento, consumo de glucosa, formación de acético, velocidad de evolución de CO₂ (CER) y actividad específica de β-galactosidasa en condiciones aeróbicas en el medio Schaeffer-glucosa.

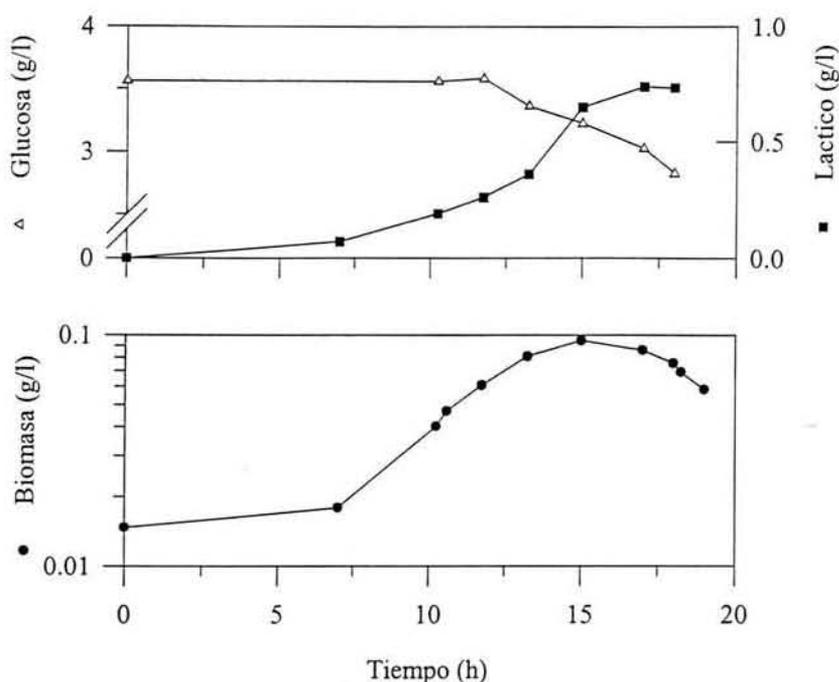


Fig. 7.2.3 Cinética de crecimiento, potencial oxido-reducción, consumo de glucosa y formación de láctico en condiciones anaeróbicas en medio Schaeffer-glucosa.

Los resultados conseguidos indican las razones por las cuales por mucho tiempo se considero a *B. subtilis* como un microorganismo aerobio estricto (Priest 1993). Las pruebas en condiciones anaeróbicas incluyen:

- 1.- La evaluación del crecimiento en caldo nutritivo; como se demostró en estas condiciones *B. subtilis* no puede crecer.
- 2.- La valoración en el mismo medio suplementado con glucosa para realizar la prueba de fermentación (Durham); tal como se encontró, el crecimiento es reducido y lento, y dado que se presenta una fermentación láctica no se detecta la producción de gas (la cual se toma como indicativa para clasificar a los microorganismos como fermentativos).

Con medio Schaeffer demostramos crecimiento en condiciones anaerobias con glucosa. Sin embargo, recientemente otros autores han observaron crecimiento cuando se suplementan

los medios minerales o ricos con glucosa y piruvato, respectivamente (Clements *et al.* 2002; Cruz Ramos *et al.* 1998; Nakano *et al.* 1997). Nakano *et al.* (1997), postulan que *B. subtilis* no induce la síntesis de algunas enzimas de la glicólisis y por lo tanto no forma eficientemente piruvato, sin embargo nosotros encontramos que más del 90% de la glucosa es convertida en láctico y en consecuencia en piruvato. Cruz Ramos *et al.* (1998) obtuvieron una variedad de productos de fermentación empleando glucosa y piruvato. Clements *et al.* 2002 argumenta que el piruvato es usado como aceptor final de electrones, nuestros resultados indican que en condiciones de fermentación la conversión de pirúvico en láctico es usado para reciclar las coenzimas reducidas (ver figura 4.4.1). A partir de estas hipótesis y los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere que el efecto observado al adicionar ácido pirúvico, para promover el crecimiento en condiciones anaeróbicas (sin la adición de aceptores finales de electrones), se puede deber a que el piruvato regula el balance cofactores (NAD(P)/NAD(P)H) y por tanto puede funcionar como aceptor del exceso de coenzimas reducidas generadas, por ejemplo en la vía de pentosas. Además, todos los trabajos en los que se ha evaluado el desempeño de *B. subtilis* en anaerobiosis han sido realizados con cepas que tienen alguna auxotrofia, generalmente a triptófano. No obstante, resultados recientes en nuestro laboratorio (Hernández-Bustos, 2003) han revelado que las cepas protótrofas de *B. subtilis* tienen la capacidad de crecer poco y lento (hasta 0.6 g/l de células con un tiempo de duplicación de 17 h), en medio mineral-glucosa (sin adicionar piruvato), y producir lactato con eficiencias de conversión de glucosa en lactato mayores al 80%, tanto durante la fase de crecimiento como en la estacionaria. El empleo de un medio conteniendo piruvato y glucosa a concentraciones de 50mM (“fermentación”) y que no han sido variadas, ni analizados las cinéticas, para mostrar su efecto sobre el metabolismo pone en riesgo las conclusiones que emanan de estas investigaciones.

7.2.1 APORTACIONES.

1.- Se mostró por primera vez que *B. subtilis* es capaz de crecer lentamente en el medio Schaeffer-glucosa bajo condiciones anaeróbicas en comparación a lo visto en condiciones aerobias y después de una fase de adaptación larga. La glucosa es convertida en ácido láctico.

- 2.- Estos resultados permiten explicar el porque por muchos años se le considero a este microorganismo el ejemplo clásico de uno aerobio estricto.
- 3- Se postula que el empleo de glucosa y pirúvato es inadecuado para estudiar el proceso fermentativo de *B. subtilis* dado que este funciona como aceptor de electrones.

7.3 CULTIVO DE *Bacillus subtilis* EN CONDICIONES ANAEROBIAS EN MEDIO SCHAEFFER-NITRATO

Cuando se suministró nitrato (4 mmol; aceptor final de electrones en la cadena respiratoria que permite reciclar coenzimas reducidas y obtener ATP) en condiciones anaerobias al medio de cultivo Schaeffer (sin glucosa), el crecimiento inició después de una larga fase de adaptación de 15 horas (Figura 7.3.1). La velocidad específica de crecimiento fue de 0.72 h^{-1} , aproximadamente la mitad de la observada en condiciones aerobias, pero casi tres veces mayor que aquella detectada en el medio Schaeffer-glucosa en condiciones anaerobias, lo cual muestra la ventaja de tener un aceptor final de electrones sobre un proceso netamente fermentativo (fermentación láctica). Aproximadamente la mitad del nitrato suministrado fue consumido durante la fase de crecimiento y el resto durante las primeras cuatro horas de la fase estacionaria, una vez agotado el nitrato la cinética se detiene a pesar de que aun hay fuente de carbono y que corrobora que en el medio Schaeffer no hay crecimiento fermentativo. La cantidad de biomasa formada fue de solo 0.09 g/l. El nitrato fue convertido en nitrito, indicando la presencia de actividad de la nitrato reductasa, el nitrito se acumuló, conforme el nitrato fue consumido, durante las fases de crecimiento y estacionaria. Después de agotarse el nitrato, y el nitrito llegar a su máxima acumulación, se presentó una reducida lisis celular. La acumulación observada de nitrito se puede deber a una limitación en la producción de coenzimas reducidas necesarias para la conversión del nitrito a amonio, o bien la imposibilidad de inducir la formación de la nitrito reductasa. Posiblemente un incremento en la concentración de nitrato seria suficiente para continuar el crecimiento e inducir la síntesis de nitrito reductasa. Así mismo, se acumulo una pequeña cantidad de acético durante ambas fases y una fracción de este fue consumido una vez que se agotó el nitrato, la fuente de carbono son las sustancias presentes en el medio de cultivo complejo Schaeffer, muy seguramente aminoácidos. Bajo estas circunstancias la

producción de ácido acético, a partir de pirúvico, tiene una ventaja sobre otros metabolitos, ya que le permite a *B. subtilis* generar ATP, NADH+H⁺ y acumular un producto (el cual eventualmente puede ser metabolizado en condiciones aerobias). Durante la fase de crecimiento el valor del redox disminuyó en 60 mV, se redujo otros 30 mV durante la fase estacionaria y posteriormente subió durante la lisis celular. Concomitante a la acumulación de acético se produjo CO₂, el cual puede provenir de la descarboxilación de aminoácidos o del pirúvico producido como intermediario. No se detectó la producción de esporas resistentes a calor y la actividad β-galactosidasa resultó muy baja (26 U/mg biomasa).

7.3.1 APORTACIONES.

1.- Al adicionar nitrato al medio Schaeffer (4 mmol), se adiciona un aceptor final de electrones y en estas condiciones se incrementa la velocidad de crecimiento específica con respecto a una condición fermentativa y menor a aquella observada en condiciones aerobias. Sin embargo el nitrito producido se acumula y no es convertido a amonio. Al finalizar el nitrato se detienen todas las reacciones de idéntica forma como en el medio Schaeffer. Se observa una producción de acético por la presencia de nitrato (aceptor de electrones). No hay energía suficiente para inducir el proceso de esporulación.

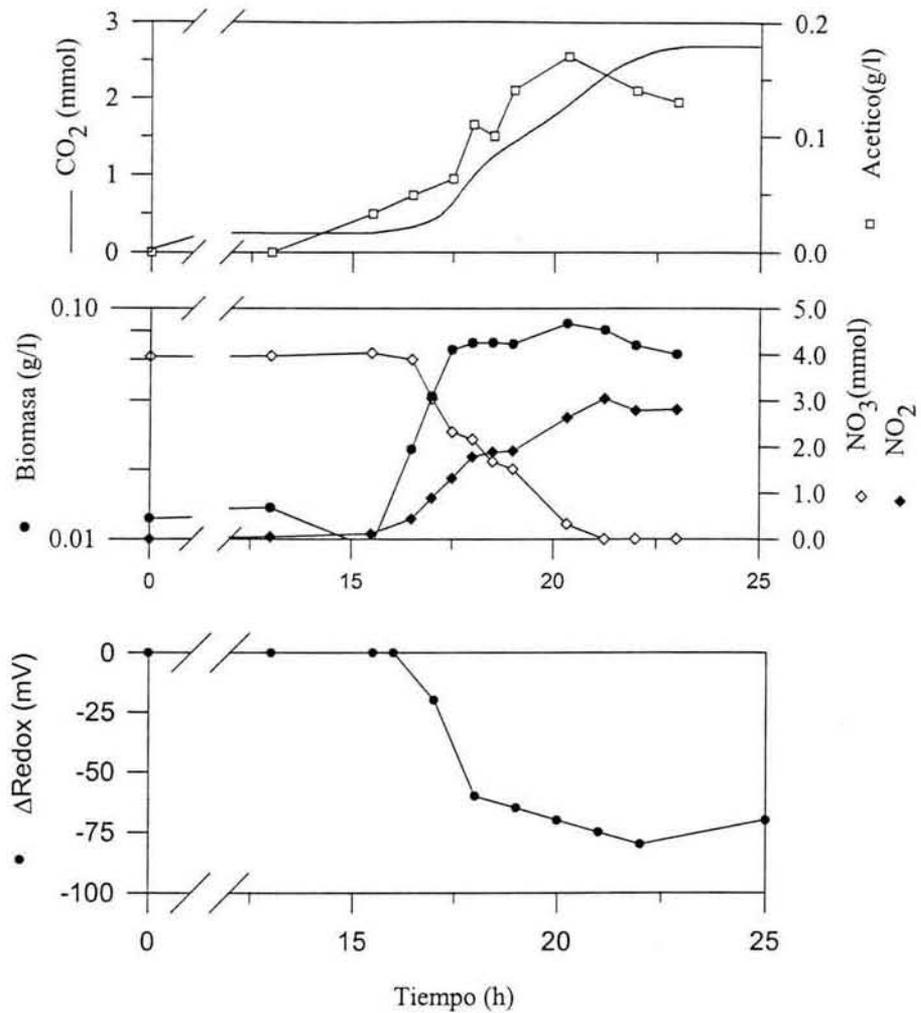
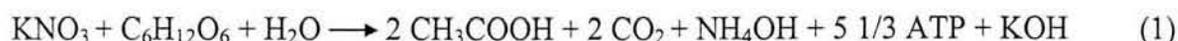


Figura 7.3.1 Cinética de crecimiento, consumo de nitrato y acumulación de nitrito, potencial oxido-reducción, formación de acético y CO₂ total en condiciones anaeróbicas en medio Schaeffer-nitrato.

7.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO Y GLUCOSA.

En las cinéticas anaerobias *B. subtilis* en medio Schaeffer, con solo nitrato, se acumula ácido acético y con glucosa láctico. En condiciones aerobias se produce ácido acético y cuando existe una limitación de oxígeno se produce butanodiol (teniendo como intermediario acetoina) y en la fermentación ácido-mixta se producen adicionalmente ácido succínico y etanol. Entonces había que estudiar el efecto de la concentración de nitrato y glucosa juntos (donador y aceptor final de electrones) para determinar que metabolitos se producen bajo limitación y exceso de nitrato. Se estudió el efecto de la concentración de nitrato en condiciones anaeróbicas sobre el crecimiento y el metabolismo de *B. subtilis*. Se decidieron utilizar 22.4 mM (4 g/l) de glucosa en todos los cultivos, variando la concentración de nitrato de 4 a 24 mM, es decir con relaciones molares de glucosa/nitrato en el intervalo de 2.8 a 0.92. Desde el punto de vista estequiométrico, para las relaciones iguales o mayores a 1 se obtendría el máximo de ATP y poder reductor por mol de glucosa utilizada, mediante la producción de acético tal y como se muestra en la siguiente ecuación:



El otro caso extremo lo constituye la condición de generación mínima de ATP y NADH, esta situación se presenta por la producción de acetoina:



En la Tabla 6.4.1 se muestra el resumen de resultados de estos cultivos (en las figuras 7.4.1 a la 7.4.6 se muestran las cinéticas de los mismos). En todos los cultivos el inicio del crecimiento se refleja en disminuciones en el potencial de oxidación-reducción. Esta disminución es proporcional al crecimiento (Tabla 7.4.2), obteniéndose un valor promedio de 124 +/- 24 mV por cada (g/l) de biomasa formada. Este cambio se da porque el producto de la oxidación de la glucosa, CO₂, sale del sistema y el nitrato es reducido a amonio principalmente. Esta medición permitiría seguir el curso de la fermentación (Dahod, 1982) y resulta interesante porque pudiera usarse en el control de la cinética, por ejemplo adición

de mas sustratos, lo que realmente es difícil hacer fuera de línea (hay que cuantificarlos). De igual forma la evolución de bióxido de carbono es proporcional al crecimiento y consumo de glucosa. En los cultivos conteniendo 4, 8, 12 y 16 mmol de nitrato, cuando éste o el nitrito acumulado se agotan, ocurre un cambio metabólico de conversión de glucosa en ácido láctico, en lugar de acético, y por tanto la evolución de CO₂ decrece, tal como sucedió en la cinética en que solo se adiciono glucosa.

A diferencia de los cultivos aeróbicos, no se presentó una fase estacionaria prolongada. La duración de ésta dependió de la concentración de glucosa residual, por lo que resultó mas extensa para las concentraciones de nitratos de 4 a 12 mmol (4.5, 4 y 3 horas) y para concentraciones de nitratos mayores disminuyo desde 2 horas (16 mmol) hasta inexistencia (24 mmol). Posteriormente, al agotarse el nitrato y/o nitrito y/o la glucosa en todos los cultivos se observó lisis celular debido a que los productos del metabolismo ya no pueden ser utilizados a diferencia de lo que se observo en condiciones aerobias donde el ácido acético es consumido en la fase estacionaria para producir la energía necesaria para iniciar el proceso de esporulación y su culminación. Estos resultados son contrarios a los observados por Marino *et al.* (2001), quienes muestran en sus resultados una fase estacionaria bien definida utilizando la cepa JH642 en medio mínimo y suplementado con glucosa (50 mM) y nitrato o nitrito (10mM), que es una relación glucosa/nitrato(ito) de 5, sin embargo ellos no analizan los productos obtenidos y el destino final del nitrato(ito). Bajo las condiciones que ellos emplearon la cantidad de nitrato era limitante por lo que el cultivo pudiera haber crecido en una fermentación láctica, estos resultados no los podemos explicar.

Conforme la concentración de nitrato se incrementó, el consumo de glucosa también aumentó hasta alcanzar una concentración de 16 mmol de nitrato (relación molar glucosa/nitrato de 1.4) en que la glucosa se agoto. La cantidad de biomasa también se incrementó desde un valor de 0.5 g/l hasta 1.04 g/l para las concentraciones de nitrato utilizadas de 16 a 24 mmol. Igualmente a lo observado en el medio Schaeffer-Glucosa en condiciones aerobias se pudo observar la presencia de dos fases de crecimiento para concentraciones de nitrato superiores a 4 mmol. La velocidad específica de crecimiento

inicial fue de 1.0 h^{-1} en promedio ($\pm 0.08 \text{ h}^{-1}$), esto es solo una reducción del 32% con respecto a la velocidad detectada en condiciones aerobias. Posteriormente hay una reducción en la velocidad de crecimiento hasta un valor de 0.28 h^{-1} ($\pm 0.05 \text{ h}^{-1}$) para las concentraciones de nitrato de 8 a 24 mmol. Esta disminución en la velocidad de crecimiento se debe a la naturaleza compleja del medio, es decir primero se usan los componentes mas fáciles de utilizar y posteriormente los de menor preferencia. Estos resultados no han sido reportados antes, principalmente porque otros autores nunca han trabajado en fermentadores y específicamente con control de pH. Al inicio de las cinéticas se produce ácido y se acumula nitrito, por lo tanto el medio se acidifica y cuando el nitrito se convierte en amonio, el medio se alcaliniza fuertemente lo cual puede afectar significativamente el comportamiento de los microorganismos.

En las condiciones experimentales que se trabajo se observó indirectamente que la enzima nitrito reductasa se indujo cuando hay una acumulación inicial de nitrito, el cual es posteriormente convertido en amonio, a excepción de las cinéticas de 20 y 24 mmol en que al final se observo una cantidad residual de nitrito que no pudo ser convertida en amonio por haberse agotado la glucosa(Tabla 6.4.1). Hoffman *et al.* (1998) reportaron que la actividad de la nitrito reductasa se iniciaba inmediatamente después de la aparición de nitrito, sin embargo al revisar sus cinéticas se observa una conversión de nitrato a nitrito hasta una concentración de 6 mmol que contradice lo reportado. Si la utilización de nitrito hubiera sido posterior a la reducción total del nitrato, es probable que se hubieran presentado problemas por la toxicidad del nitrito acumulado. Clements *et al.* (2002) mostraron que *B. subtilis* no puede crecer cuando se utiliza nitrito como aceptor final de electrones en condiciones anaerobias, a diferencia de lo mostrado por Cruz Ramos *et al.* (1998) y Marino *et al.* (2001), posiblemente esta diferencia se deba a que estos últimos usaron una mezcla de glucosa y piruvato. Mas aun Cruz Ramos *et al.* (1998) observaron el mismo perfil de productos en condiciones de respiración de nitratos que en fermentación (glucosa-piruvato) y sin embargo encontraron que la actividad de la piruvato deshidrogenasa se reducía cuando se adicionaba nitrato a un cultivo creciendo en presencia de glucosa y piruvato. Estos resultados son confusos y se pueden deber al uso de mezclas de glucosa y piruvato y a la forma de iniciar el crecimiento en condiciones anaeróbicas o a

no tener un control de pH. En nuestro caso desde un principio de las investigaciones exploramos que pasaba con el nitrito producido a partir de nitrato y vimos que se comenzaba a convertir en amonio aun cuando había nitrato presente. Una falla en la inducción de la nitrito reductasa lleva a una acumulación de nitrito. Lo único que se sabe, en la regulación de la nitrito reductasa, es que necesita haber nitrito, producto de la reducción de nitrato. Es difícil concebir que el nitrito pueda actuar como un activador a nivel de DNA. Estos resultados sugieren que aun no se han encontrado todos los sistemas de control de la expresión del metabolismo de nitrato a amonio. Esta deducción tiene sustento en la información que se tiene de cómo se mantiene este control en *E.coli*. La acumulación final de productos depende de la concentración de nitrato que se haya utilizado (Tabla 6.4.1). Conforme la concentración de nitrato se fue incrementando, la formación de ácido láctico decreció y la acumulación de ácido acético aumentó. Estos resultados son parecidos a los obtenidos con glucosa o nitrato independientemente, acumulación de ácido láctico o acético. Se detecto una acumulación de butanodiol, que en un principio se incremento (hasta 16 mmol de nitrato) y posteriormente disminuyó, acumulándose en su lugar el intermediario de la vía, acetoina. Se detectaron pequeñas cantidades de ácido succínico (0.15 g/l), pero no de etanol, resultado que esta de acuerdo a lo encontrado por Cruz *et.al.* 2000 y en controversia a lo reportado por Nakano *et.al.* 1997. La disminución en la duración de la fase estacionaria y la lisis celular que se presenta resultan en una formación de esporas y de actividad β -galactosidasa prácticamente nula (Tabla 7.4.1).

Tabla 7.4.1 Parámetros de los cultivos por lote de *Bacillus subtilis* usando diferentes concentraciones de nitrato a la concentración de glucosa de 22.2 mmol.

| Parámetro | Unidades | Nitrato (mM) | | | | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
| Relación Glc/nitrato | mol/mol | 5.56 | 2.78 | 1.85 | 1.39 | 1.11 | 0.93 |
| μ 1 ^a etapa | h ⁻¹ | 1.02 | 0.96 | 1.16 | 0.92 | 1.00 | 0.98 |
| μ 2 ^a etapa | h ⁻¹ | ---- | 0.26 | 0.20 | 0.30 | 0.31 | 0.34 |
| Biomasa | g/l | 0.50 | 0.71 | 0.86 | 0.95 | 1.16 | 0.99 |
| Glucosa Consumida | mM | 10.1 | 13.0 | 17.3 | 21.3 | 21.3 | 22.0 |
| Nitrato Consumido | mM | 4.01 | 8.00 | 11.7 | 16.3 | 18.7 | 16.8 |
| Nitrito Residual | mM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | 0.04 |
| Lactato | mM | 8.60 | 3.90 | 3.33 | 1.86 | 2.05 | 1.12 |
| Acetato | mM | 6.30 | 11.67 | 17.42 | 21.80 | 20.65 | 19.01 |
| Butanodiol | mM | 2.9 | 4.0 | 4.0 | 4.4 | 0.0 | 0.6 |
| Acetoina | mM | 0 | 0 | 0 | 2.1 | 9.8 | 9.3 |
| Esporulación | % | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0.01 | 0.001 |
| Actividad β -Gal | U/mg | 26 | 14 | 8 | 38 | 31 | 23 |

Tabla 7.4.2 Variación del potencial de oxido reducción en función de la formación de biomasa durante el crecimiento de *Bacillus subtilis*.

| Relación glucosa/nitrato (mol/mol) | Variación Redox /Biomasa (mV /(g/l)) |
|---------------------------------------|---|
| 2.8 | 128 |
| 1.8 | 140 |
| 1.4 | 93 |
| 1.1 | 152 |
| 0.92 | 108 |
| PROMEDIO (Desv.Est.) | 124 (24) |

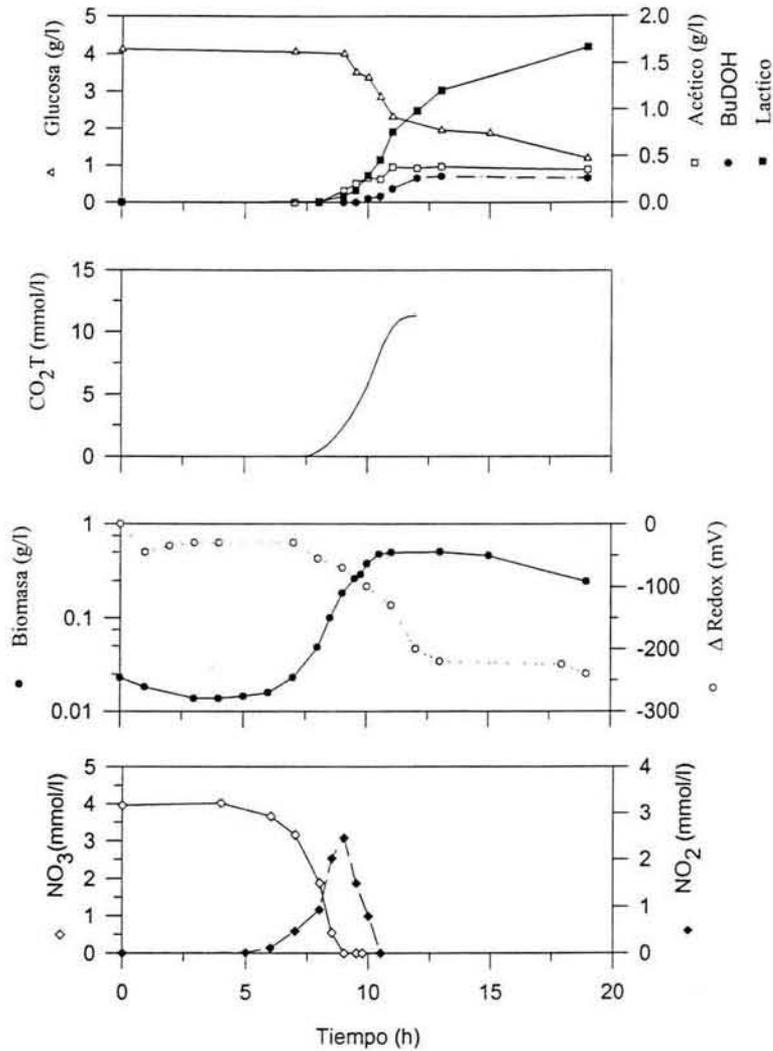


Figura 7.4.1 *Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por Bacillus subtilis en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 4 mM)*

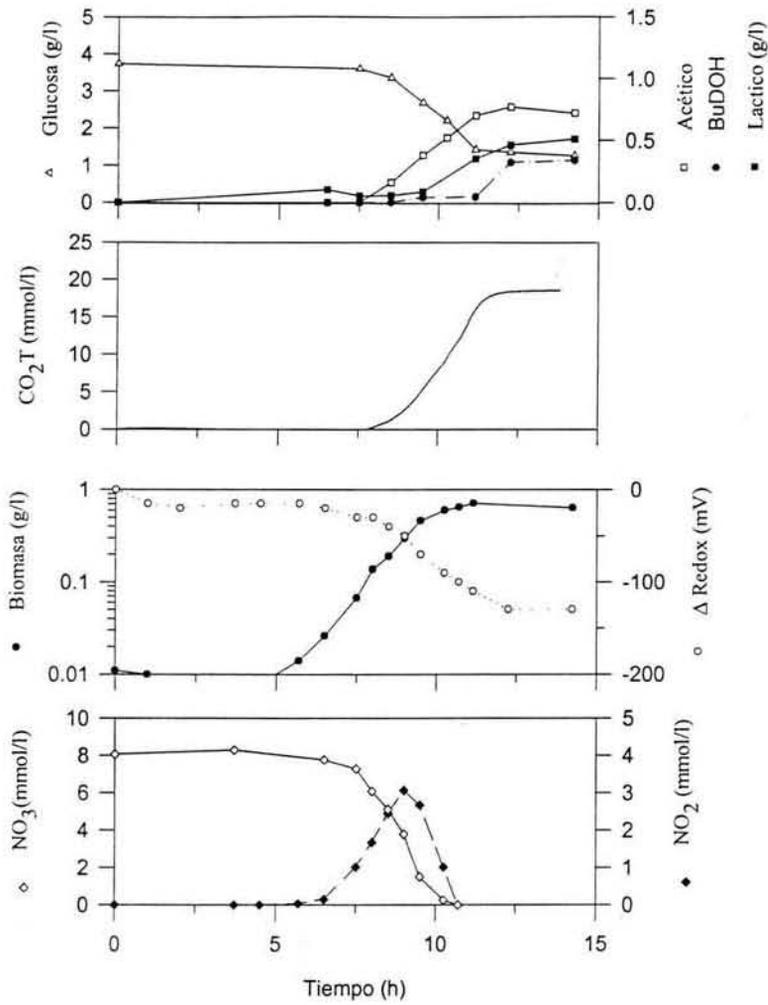


Figura 7.4.2 *Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por Bacillus subtilis en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 8 mM)*

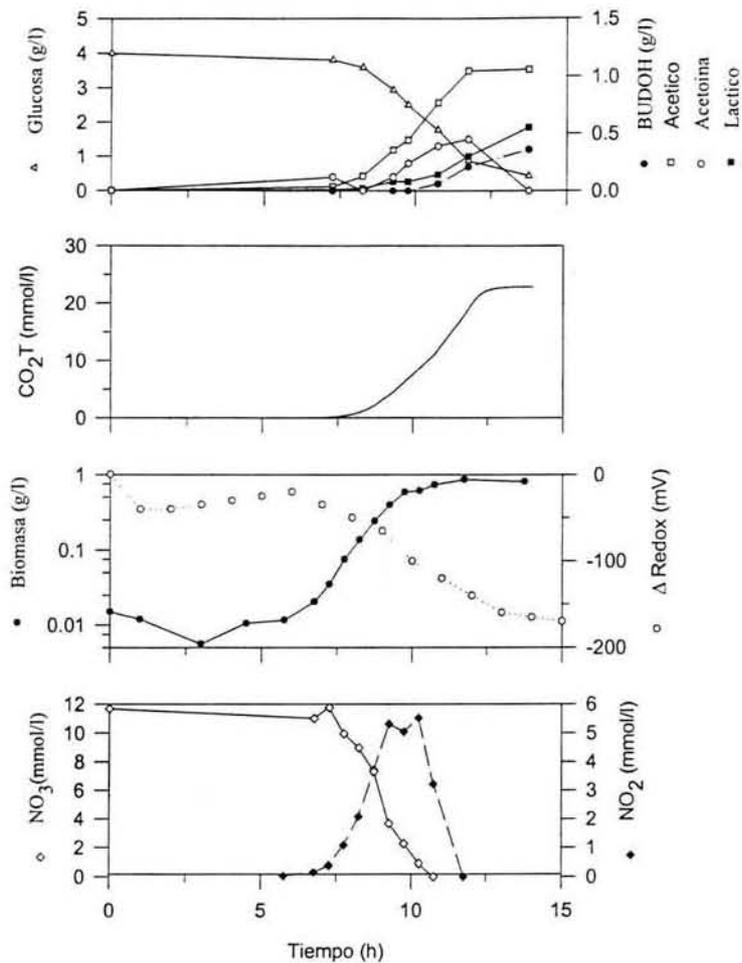


Figura 7.4.3 Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por *Bacillus subtilis* en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 12 mM)

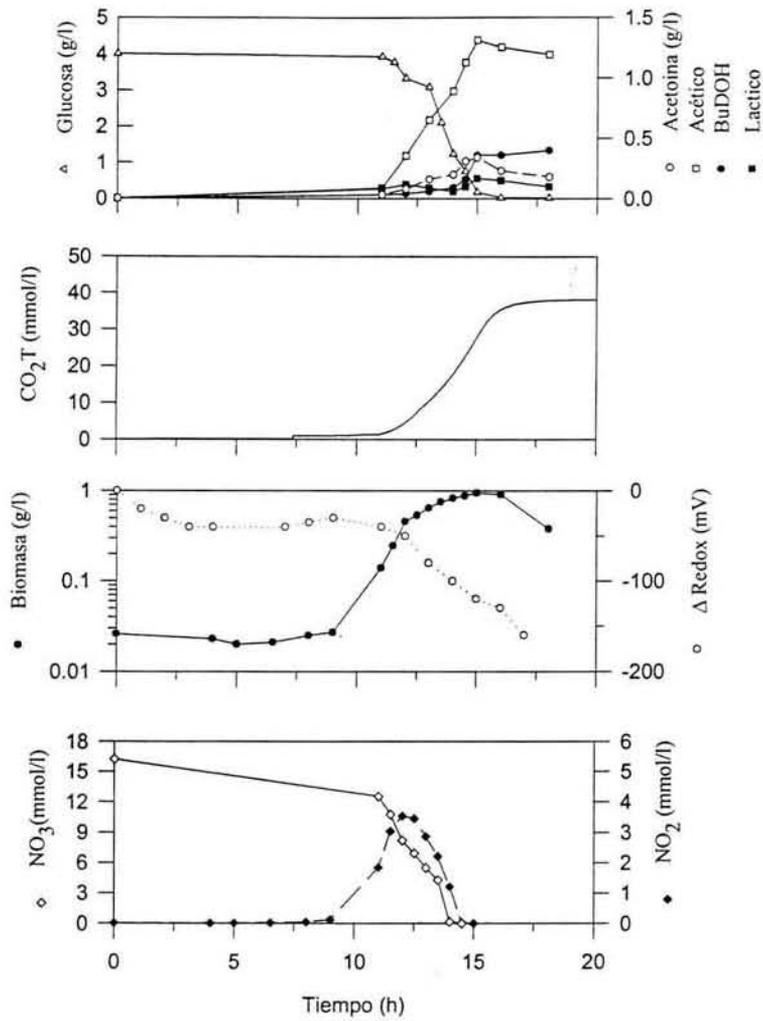


Figura 7.4.4 Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por *Bacillus subtilis* en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 16 mM)

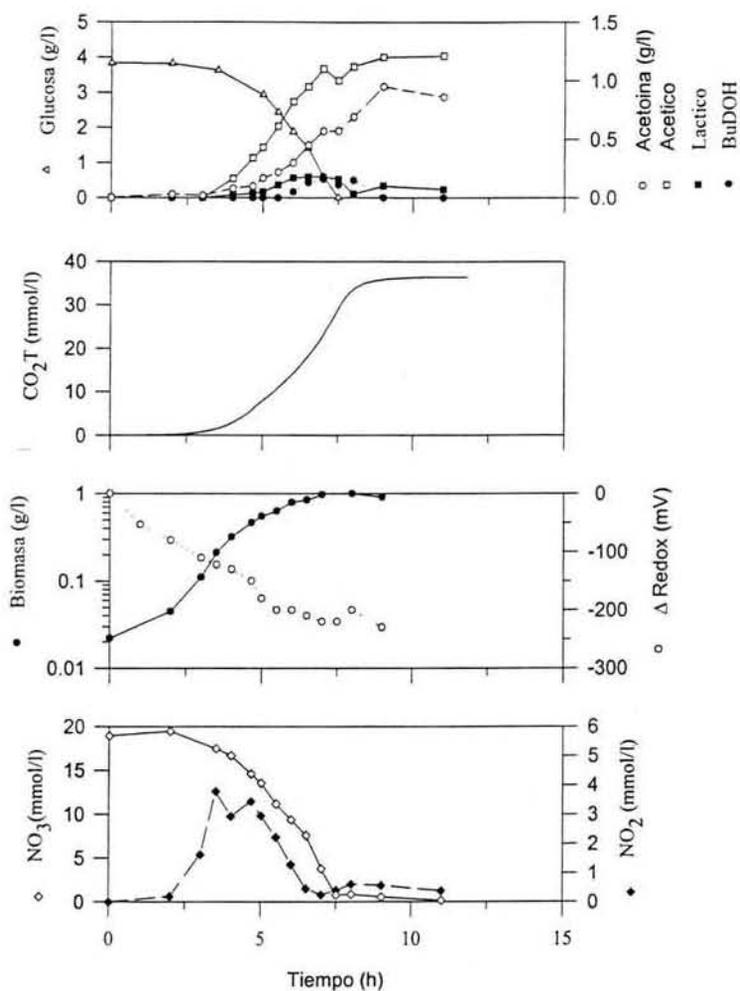


Figura 7.4.5 Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO₂ total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por *Bacillus subtilis* en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 20 mM)

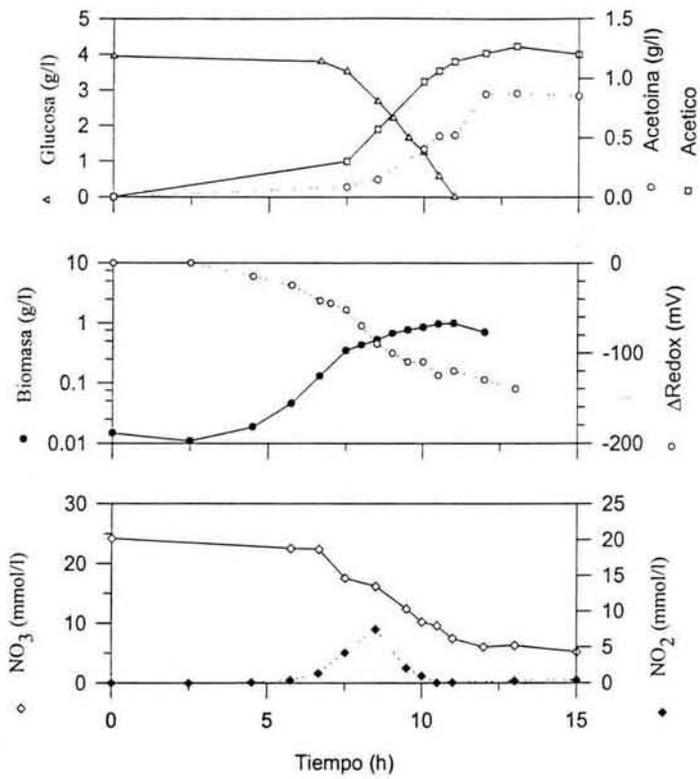


Figura 7.4.6 *Cinética de crecimiento, formación de productos, variación del valor redox, CO_2 total, consumo de nitrato y conversión a nitrito por *Bacillus subtilis* en cultivo por lote en condiciones anaeróbicas en el medio Schaeffer glucosa-nitrato (22 y 24 mM)*

Cuando ambos el donador de electrones (glucosa) y el aceptor de electrones (nitrato) se adicionan al medio de cultivo, se incrementa la velocidad específica de crecimiento y la producción de biomasa. La velocidad de crecimiento que se presenta en estas condiciones, con respecto a las condiciones aeróbicas es menor, y se sugiere que se debe principalmente a la disminución en la eficiencia energética de la respiración anaerobia y a que la glucosa es metabolizada a productos de fermentación. La segunda etapa que se observó a una menor velocidad de crecimiento, se puede deber a que se agotaron los compuestos (por ejemplo algún aminoácido) de más fácil asimilación en el medio complejo. La formación de biomasa se incrementó y alcanzó valores similares a los obtenidos en condiciones aerobias en el medio Schaeffer, lo cual indica que al menos en estas condiciones los nutrientes del medio no limitaban el crecimiento de *B. subtilis*, sino la generación de energía proveniente del catabolismo de la glucosa y la respiración de nitrato a amonio. Cuando cualquiera de los compuestos que funcionan como donadores y aceptores de electrones se terminan, el crecimiento se detiene, hay una breve fase estacionaria que depende de la presencia de glucosa y comienza la lisis celular. La velocidad específica de consumo de glucosa observada en la segunda fase de crecimiento fue del orden de $6.7 \text{ mmol/g}_{\text{Biomasa}}\text{-h}$, la cual es similar a aquella encontrada en cultivos continuos o alimentados a altas velocidades de crecimiento (Sauer *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 1998). Esto indica que la actividad glicolítica en estas condiciones es alta, hecho que se había postulado como posible causa de la limitación para el crecimiento fermentativo de *B. subtilis* (Nakano, *et. al.* 1997)

Conforme se incrementó la concentración de nitrato, a una concentración fija de glucosa, se favoreció la producción de ácido acético y a medida que se terminaba el nitrato, se acumulaba ácido láctico. A bajas concentraciones de nitrato, las coenzimas reducidas formadas ya no pueden usarse en la reducción de nitrito a amonio y por lo tanto la relación de coenzimas reducidas a oxidadas se incrementa, lo cual favorece la producción de ácido láctico. El butanodiol también se sintetiza cuando la concentración de nitrato está limitada. Cuando no se presenta esta limitación, las coenzimas reducidas se reciclan en la reducción de nitrato en amonio y se observa una acumulación preferente de acético y acetoina. Estos resultados permiten sugerir que muchos de los estudios que se han llevado cabo a nivel genético y de regulación deben ser revalorados en vista de no haber tomado en cuenta la

posible limitación del nitrato. En las condiciones encontradas se sugiere que la relación glucosa/nitrato que debe utilizarse es del orden de 1.39 molar para mantener el sistema en una condición estequiométrica que permita la respiración de nitratos y sin la acumulación de nitrito. Condiciones diferentes de la proporción de concentraciones glucosa/nitrato, como por ejemplo la empleada por Cruz-Ramos *et al.* (2000) de 5.56, resultan inadecuadas para evaluar la respiración nitratos, ya que en esas condiciones se encontró que se favorece la fermentación láctica, la cual resulta indispensable en el crecimiento anaeróbico de *B. subtilis* bajo esas condiciones. Los resultados de los perfiles de productos son contrarios a los mostrados por Cruz-Ramos, quien observo el mismo perfil de productos en condiciones de respiración de nitratos, nitritos y fermentación (glucosa-piruvato). Esto se debe a que el piruvato adicionada junto a la glucosa también sirve como aceptor de las coenzimas reducidas y hace que las conclusiones resultan erróneas.

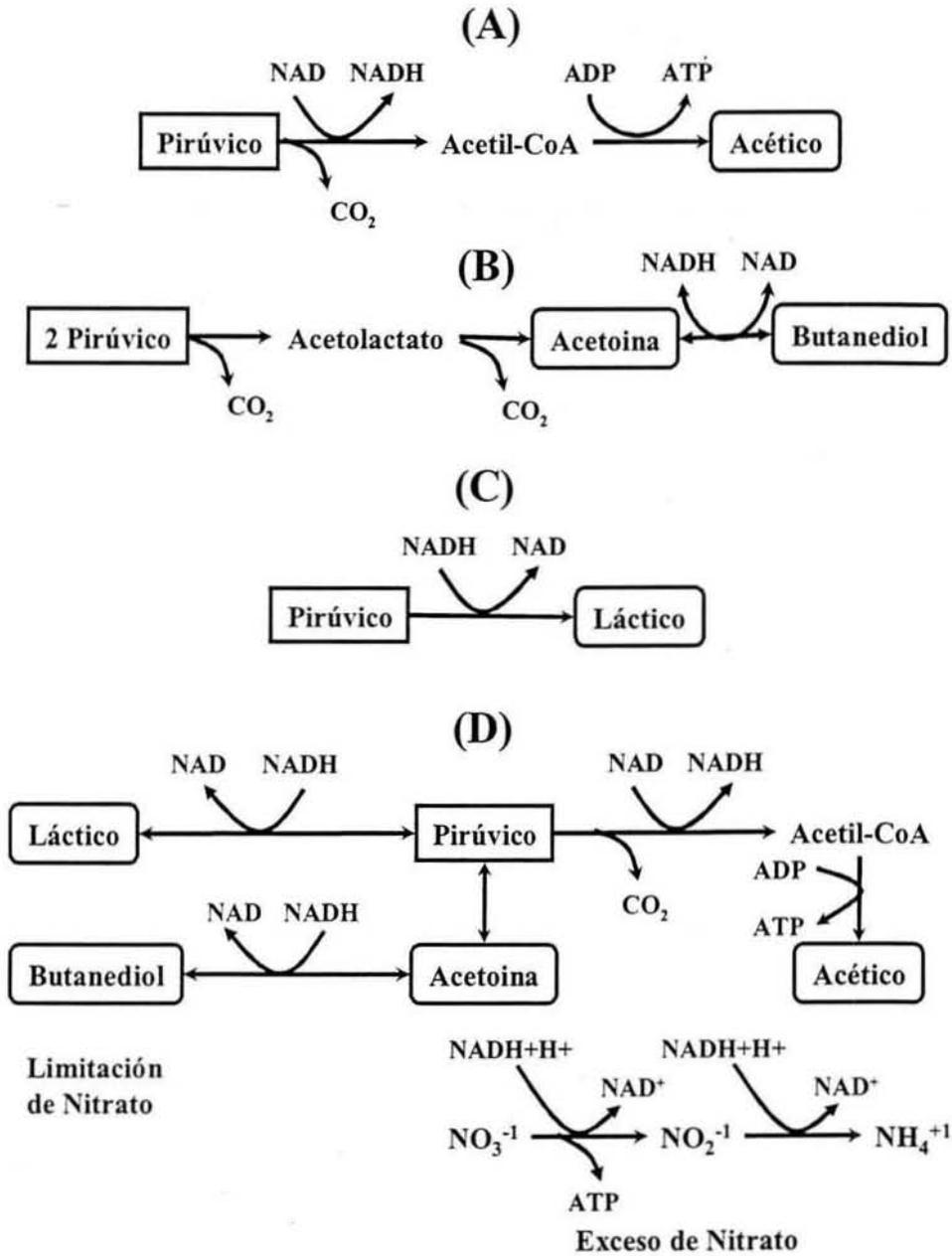
Al parecer la ruta de síntesis de acetoina, que transforma al ácido pirúvico en acetoina y butanodiol, le sirve a las células para poder regular la utilización del poder reductor producido, sin la necesidad de cambiar abruptamente de una producción de ácido acético a ácido láctico. Esto es en forma pausada pasar de la producción de acetoina a butanodiol cuando comienza a haber un exceso de coenzimas reducidas y en caso de persistir esta acumulación, inducir la síntesis de ácido láctico e inactivar la síntesis de acético. También esta ruta es importante porque se acumulan metabolitos de naturaleza neutra. Contrariamente a lo reportado por Cruz-Ramos *et al.* (2000) nosotros no observamos acumulación de butanodiol en condiciones de fermentación y mucho menos una reducción en su acumulación debido a la adición de nitrato. Ellos no detectaron una acumulación de acetoina ya que las condiciones que emplearon (glucosa-piruvato) y una relación de concentraciones glucosa/nitrato de 5 no permite observar los resultados que reportamos.

La ausencia de una fase estacionaria prolongada parece ser la causa de la limitada producción de actividad de β -galactosidasa y de la insignificante esporulación, sin embargo en presencia de glucosa es posible obtener una fase estacionaria de corta duración. La lisis celular que se presentó en estas condiciones es resultado de una ausencia de fuente de energía (glucosa) o del agotamiento del aceptor final de electrones, ambos son necesarios

para mantener el metabolismo energético de la célula. En condiciones aerobias se ha documentaron la predisposición de *B. subtilis* de lisarse por el efecto combinado del agotamiento de glucosa y la presencia de iones divalentes (Jolliffe, *et. al.* 1981; Martínez *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos de los incisos 7.2, 7.3 y 7.4 nos permiten construir un esquema (Fig.7.4.7) en el cual se muestra el metabolismo de *B. subtilis* como un microorganismo anaerobio facultativo que puede respirar tanto nitrato como oxígeno.

Fig.7.4.7. Metabolismo de la glucosa en condiciones aerobias (A), microaerofílicas (limitación de oxígeno) (B), Fermentativas (C) y de respiración de nitratos (D)



7.4.1 APORTACIONES.

- 1.- Se observo que *B. subtilis* es capaz de crecer tan rápido bajo respiración de nitratos como en condiciones aerobias.
- 2.- Se observo que los principales productos finales del metabolismo en anaerobiosis son; ácido acético, ácido láctico, acetoina y butanodiol. Cuando hay una limitación de nitrato se produce ácido láctico. Cuando no esta limitado, se produce acético y butanodiol y a una limitación incipiente de nitrato, se acumula acetoina en lugar de butanodiol.
- 3.- El nitrato es convertido en nitrito, después de una acumulación de este se induce la expresión de la enzima nitrito reductasa, que convierte el nitrito en amonio.
- 4.- Cuando se termina el nitrato y la glucosa no se presenta una fase estacionaria como la observada en condiciones aerobias, motivo por el cual tanto la formación de esporas, como la actividad de α -galactosidasa son prácticamente inexistentes.
- 5.- Se sugiere que la relación glucosa/nitrato que debe utilizarse es del orden de 1.39 molar para mantener el sistema en una condición estequiométrica que permita la respiración de nitratos y sin la acumulación de nitrito, de otra forma los resultados pueden tener un significado difícil de explicar, ya que el metabolismo esta cambiando.

7.5 UTILIZACIÓN DE CULTIVO ALIMENTADO EN EL CRECIMIENTO DE *B. subtilis* EN CONDICIONES ANAEROBIAS.

En los experimentos por lote en anaerobiosis se observó que no se desarrollaba una fase estacionaria como en los cultivos aerobios, eventualmente las células se lisaban y la esporulación era prácticamente nula. Uno de los objetivos planteados es obtener información, en condiciones anaerobias, sobre los niveles de esporulación y expresión de *lacZ* controlada por el promotor *aprE*, el cual se activa durante la fase estacionaria, para lo cual era necesario evitar la lisis y mantener a las células en fase estacionaria por al menos 24 horas. Como indican los resultados obtenidos con los cultivos lote, para lograr el progreso de la fase estacionaria se necesitaba mantener la respiración activa. Para alcanzar este fin, se decidió alimentar un flujo constante de una solución conteniendo al donador de electrones (glucosa) y al aceptor final de los mismos (nitrato).

La solución conteniendo una concentración de glucosa de 0.46 M y de nitrato de 0.336 M (relación molar glucosa/nitrato de 1.4) fue alimentada a un flujo de 0.24 ml/min. Se escogió la relación 1.4 porque en los cultivos por lote se observó que en esta relación las células crecen respirando nitrato y no fermentando la glucosa a láctico. Asumiendo la generación de 1 g/l de células (ver tabla 6.4.1), el flujo fue seleccionado para abastecer la velocidad específica de consumo de glucosa que se obtuvo para tener un crecimiento balanceado [$1.2 \text{ (g}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{Cel}}\cdot\text{h})} / 0.18 \text{ (g}_{\text{Glc}}/\text{mmol}_{\text{Glc}}) = 6.7 \text{ (mmol}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{Cel}}\cdot\text{h})}$]. La alimentación se inició antes de que la glucosa y el nitrato se terminaran (una concentración de glucosa arriba de 1 g/l). En la figura. 7.5.1 se presenta la cinética de este experimento, como puede observarse la concentración de nitrato, nitrito y glucosa permanecieron a valores muy cercanos a cero durante la fase estacionaria (10 a 40 h), lo cual indica que se logró un acoplamiento en la respiración de nitrato a amonio (no hubo acumulación de nitrito) y la conversión de glucosa a ácido acético, acetoina y butanodiol. Aunque la cantidad de esporas se incrementó significativamente (5.6×10^6), el porcentaje de esporulación fue de solo 0.29%. La actividad de β -galactosidasa, relacionada a la expresión del gen *aprE* fue tan alta (280

U/mg_{Cel}), en términos específicos, como aquella observada en condiciones aeróbicas en medio Schaeffer-glucosa (329 U/mg_{Cel}; Figura 7.2.2).

Tomando esta fermentación como base y con la finalidad de intentar mejorar la esporulación e incrementar la actividad enzimática de β-galactosidasa, se aumento y disminuyo el flujo másico de alimentación en ± 30 % y posteriormente en un +10%. Los resultados de estas cinéticas se pueden ver en las Figs. 7.5.2 a la Fig. 7.5.4 y se resumen en la Tabla 7.5.1 . Como puede observarse al aumentar y disminuir el flujo de alimentación de glucosa y nitrato en 30% se observo un decremento en la producción de enzima y esporas. Esto se debe a que a diferencia a lo observado en la cinética tomada como base y a pesar de presentarse una fase estacionaria no hubo un acoplamiento con respecto a la respiración (aumento en la concentración de nitritos y/o glucosa). Al emplear un flujo de alimentación incrementado en un 10 % con respecto a la cinética basal, se observo (Tabla 6.5) una reducción del 30% en actividad enzimática y de un orden de magnitud en esporulación.

Tabla 7.5.1 Efecto de la variación en la alimentación de glucosa y nitrato sobre la esporulación y actividad β-galactosidasa de *Bacillus subtilis* BSR6.

| Velocidad de alimentación* | Esporas máximas Número/ml | Actividad β-gal. específica max. (U/mg Biomasa) |
|----------------------------|------------------------------|--|
| BASE | 1.8 X 10 ⁶ | 279 |
| 30 % MAYOR | ND | 41 |
| 10 % MAYOR | 3.0 X 10 ⁵ | 195 |
| 30 % MENOR | 700 | 26 |
| MEJOR CULTIVO POR LOTE | 14,000 | 38 |
| AEROBIO | 2.2 X 10 ⁷ | 600 |

*Con respecto a la alimentación de (1.20 g/h) y nitrato (0.30 g/h) como base.

ND.- No detectadas.

La expresión de este gen en condiciones aerobias tiene lugar en el medio de cultivo Schaeffer durante el inicio del proceso de esporulación y este resultado en condiciones anaerobias sugiere que dicho proceso también se induce en condiciones anaeróbicas. Sin embargo sería necesario estudiar genes de las diferentes etapas del proceso de esporulación, a fin de determinar en que etapa se detiene la formación de esporas. La producción de enzimas por *B. subtilis* en condiciones anaerobias ha sido poco explorada y los resultados presentados muestran en principio su factibilidad. Con la finalidad de estudiar la producción de enzima β -galactosidasa en condiciones anaerobias, se realizaron dos cinéticas con la cepa JJ1, que es una cepa con una actividad enzimática incrementada (el promotor de *aprE* fue mutagenizado para cambiar la región -35 a la secuencia consenso TTGACA). Las condiciones empleadas fueron iguales a la empleada en la cinética basal (glucosa 1.20 g/h y nitrato 0.30 g/h) (Jan J 2000). Los resultados se muestran en la Fig. 7.5.5. Un incremento de 22 veces en la actividad enzimática (6575 U/mg en promedio) con respecto a la cepa BSR6 fue observado.

7.5.1 APORTACIONES.

1.- El empleo de cultivos alimentados, permitió encontrar una forma de operación del bioreactor en que se desarrollo una fase estacionaria en que la concentración de glucosa es mínima y el metabolismo esta dirigido a producir la máxima cantidad de energía (ac. acético, butanodiol/acetoina y amonio). La actividad de la enzima β -galactosidasa (AprE se encuentra funcional) observada en esta operación resulto tan alta como la determinada en aerobiosis, lo que sugiere que el *B. subtilis* inicia el proceso de esporulación, pero que se detiene en alguna etapa subsiguiente.

2.- La inducción de enzimas hidrolíticas en esta forma de operación, ejemplificada por la actividad de β -galactosidasa y por el empleo de dos cepas, una de las cuales es sobreproductora, sugiere que es posible pensar en la producción de enzimas en condiciones anaerobias.

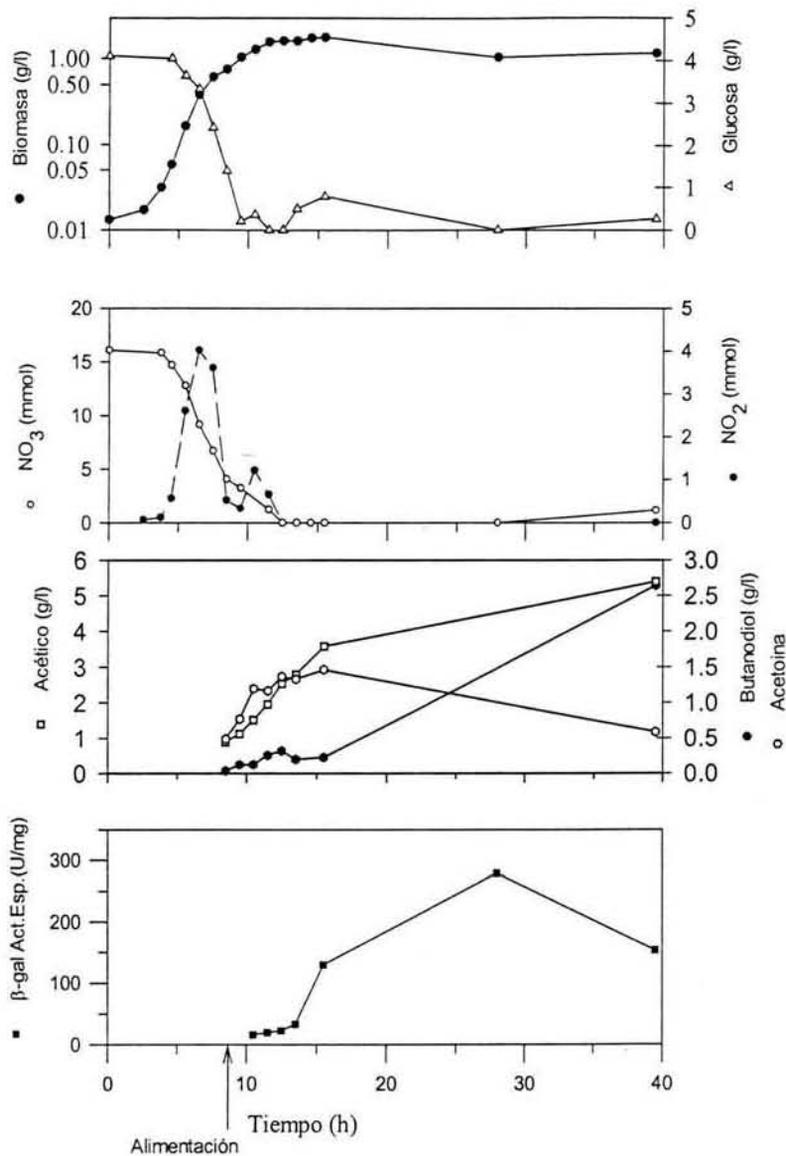


Figura 7.5.1 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.20 g/h) y nitrato (0.30 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa.

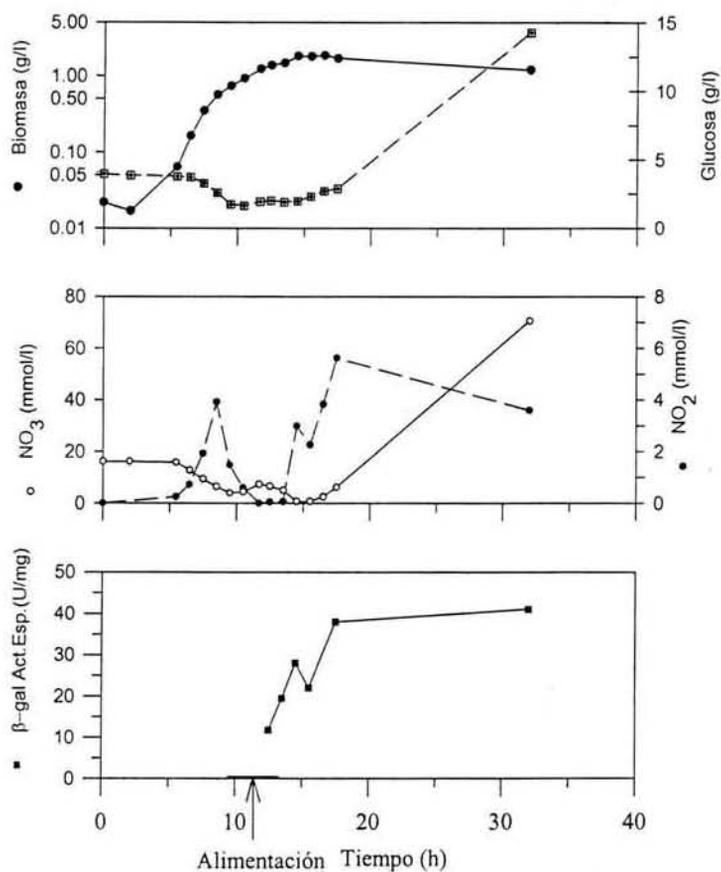


Figura 7.5.2 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.5 g/h) y nitrato (0.38 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β-galactosidasa.

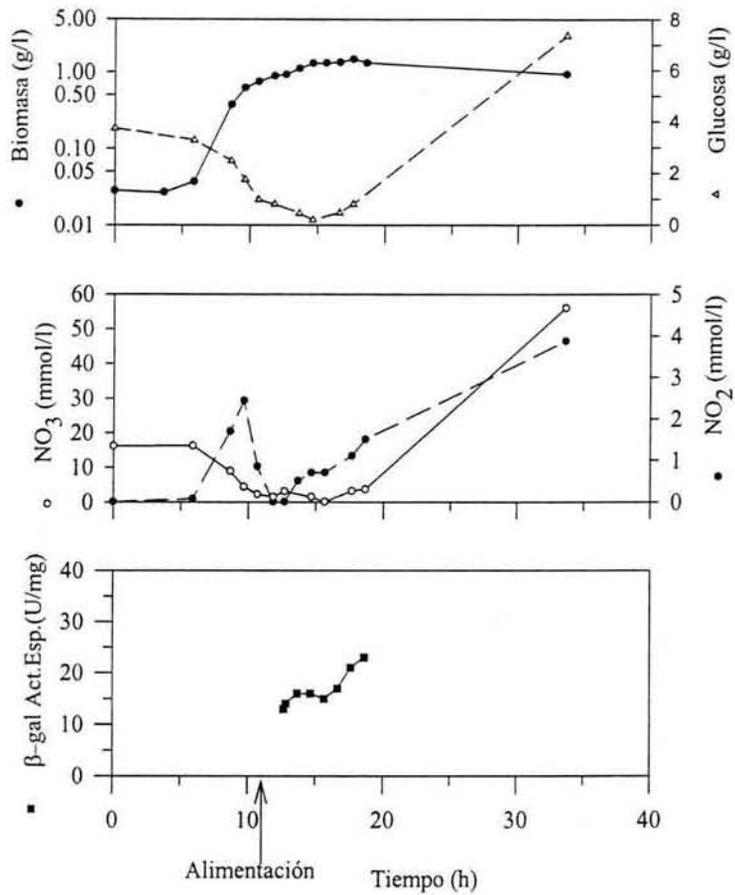


Figura 7.5.3 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (0.8 g/h) y nitrato (0.321g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β-galactosidasa.

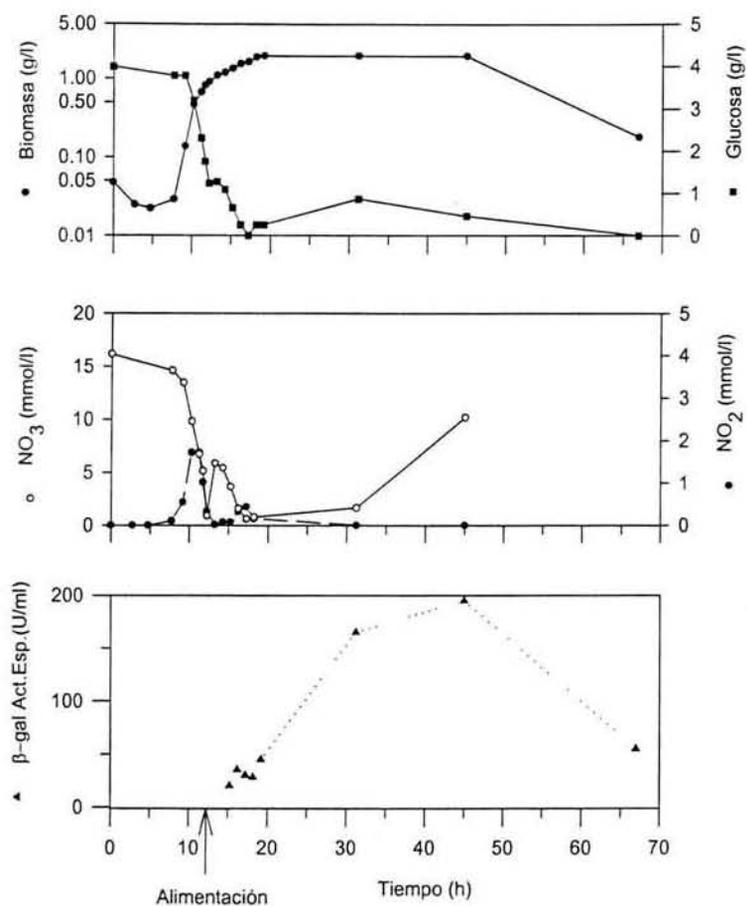


Figura 7.5.4 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.26 g/h) y nitrato (0.33 g/h) durante la fase estacionaria. Consumo de nitrato y nitrito, glucosa y actividad específica β -galactosidasa.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

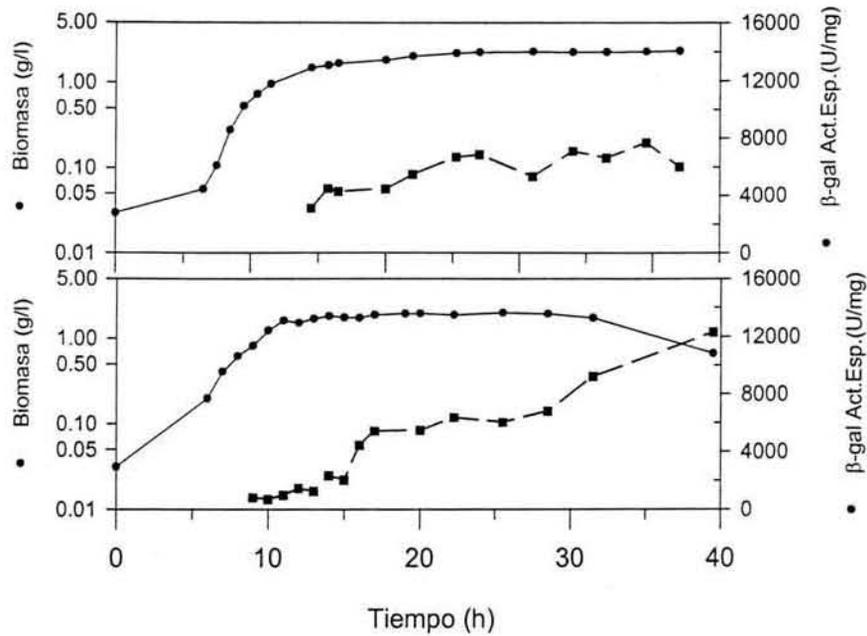


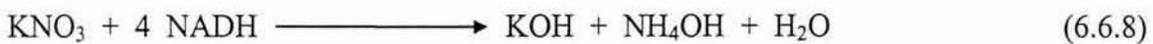
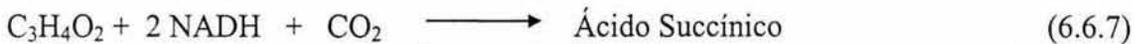
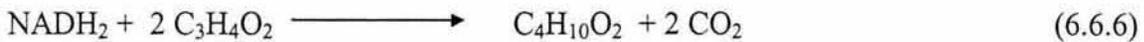
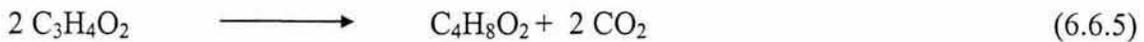
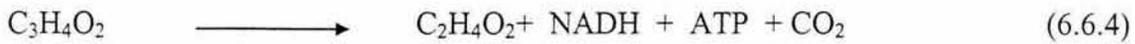
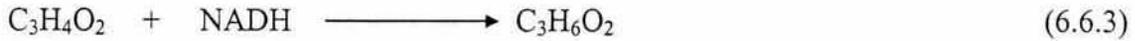
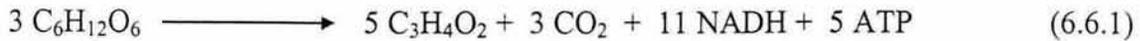
Figura 7.5.5 Cinética de crecimiento de *B. subtilis* cepa JJ1 BSR1 en cultivo-anaerobio alimentado con glucosa (1.20 g/h) y nitrato (0.30 g/h) durante la fase estacionaria. Determinación de la actividad específica β -galactosidasa.

7.6 RELACIONES ESTEQUIOMETRICAS Y DETERMINACION DE FLUJOS METABOLICOS.

Con la finalidad de tener un conocimiento cinético y energético mas preciso sobre el metabolismo en condiciones de respiración de nitratos se hicieron determinaciones de los flujos metabólicos (mmol/g biomasa-h) a partir de cinéticas de cultivos lote diseñados *ex-profeso*. En estos cultivos la concentración de glucosa y nitrato se incrementó a 8 y 2 g/l respectivamente (relación molar 1.4), con la finalidad de poder llevara cabo un mayor número de mediciones durante el crecimiento logarítmico.

Las ecuaciones empleadas para los balances (Bulthuis *et al.*, 1991; Papoutsakis *et al.*, 1985) son: (1) representa el catabolismo de la glucosa al través de la ruta de las pentosas, se asumió que el NADPH producido podría ser convertido en NADH (Sauer *et al.*, 1997), o bien utilizado directamente en las reacciones para producción de productos fermentación o para la reducción del nitrato a amonio; (2) representa la ruta de la glicólisis; las ecuaciones de la (3) a la (7) constituyen la conversión de pirúvico a los diversos productos acumulados (láctico, acético, acetoina, butanediol y succínico, respectivamente); la ecuación (8) es la conversión de nitrato a amonio. Posteriormente se presentan los balances de coenzimas reducidas. Los términos del lado izquierdo representan las coenzimas reducidas o consumidas durante el catabolismo de la glucosa: $C_6H_{12}O_6$ es la glucosa total consumida; [A] es la glucosa catabolizada por la ruta de las pentosas, el resto es catabolizada por la vía de la glicólisis; los otros términos representan las coenzimas producidas o consumidas en la acumulación de productos (acético, láctico, butanediol y succínico, respectivamente); y los términos del lado derecho de la ecuación son la utilización de coenzimas reducidas en la reducción del nitrato y el nitrito a amonio. A partir del balance de coenzimas reducidas es posible calcular la cantidad de glucosa catabolizada por la vía de las pentosas. El siguiente balance corresponde al CO_2 , es decir el producido a partir de los productos acumulados, el cual se compara con el CO_2 medido experimentalmente y por lo tanto representa una comprobación de los balances antes efectuados. Finalmente se presenta el balance para calcular el rendimiento en ATP (se utilizó una eficiencia en la fosforilación oxidativa

(ATP/NADH) de 1.3 para la cadena respiratoria con la enzima nitrato reductasa de *B. subtilis* y la producción o consumo de ATP en las ecuaciones 1, 2 y 4).



BALANCE NADH

$$2 [\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \text{ catabolizada}] + 5/3 \text{ A} + \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 - 2 \text{ C}_4\text{H}_6\text{O}_4 \\ = 4 \text{ NO}_3 - 3\text{NO}_2$$

BALANCE DE CO₂

$$\text{CO}_2 \text{ Total} = \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2 (\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + \text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2) - \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \text{ proveniente de pentosas}$$

PRODUCCION DE ATP

$$\text{ATP Total} = \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 + \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + 2 \text{ C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \\ + 2 (\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2) + 1.3 \text{ NO}_3 \text{ (consumido)}$$

En la Fig. 7.6.1 y 7.6.2 se muestran las cinéticas de estos cultivos y en la tabla 7.6.1 se muestra la acumulación de productos.

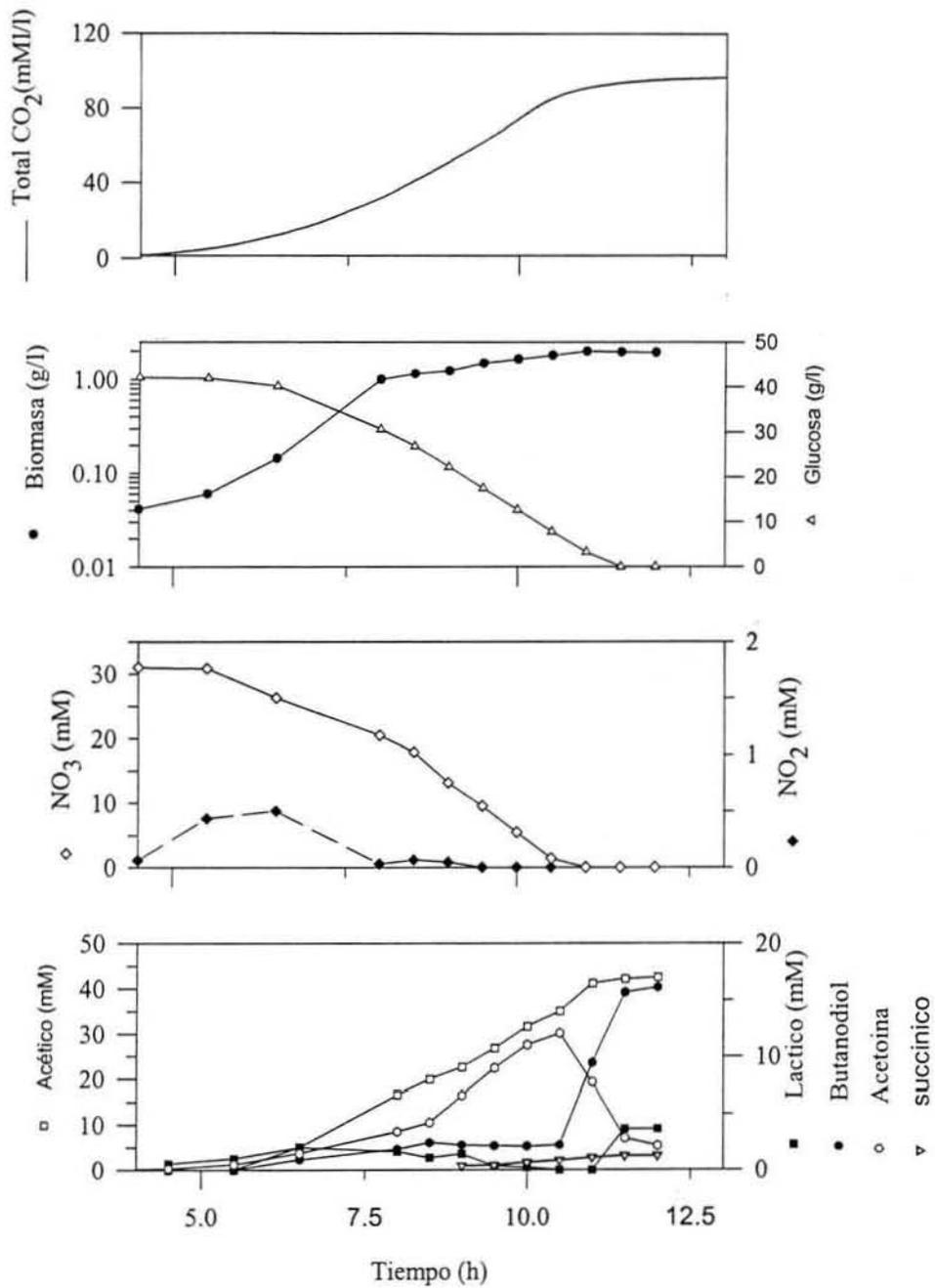


Figura 7.6.1 Cinética empleada en la estimación de flujos metabólicos (experimento A). *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaeróbicas de respiración de nitratos.

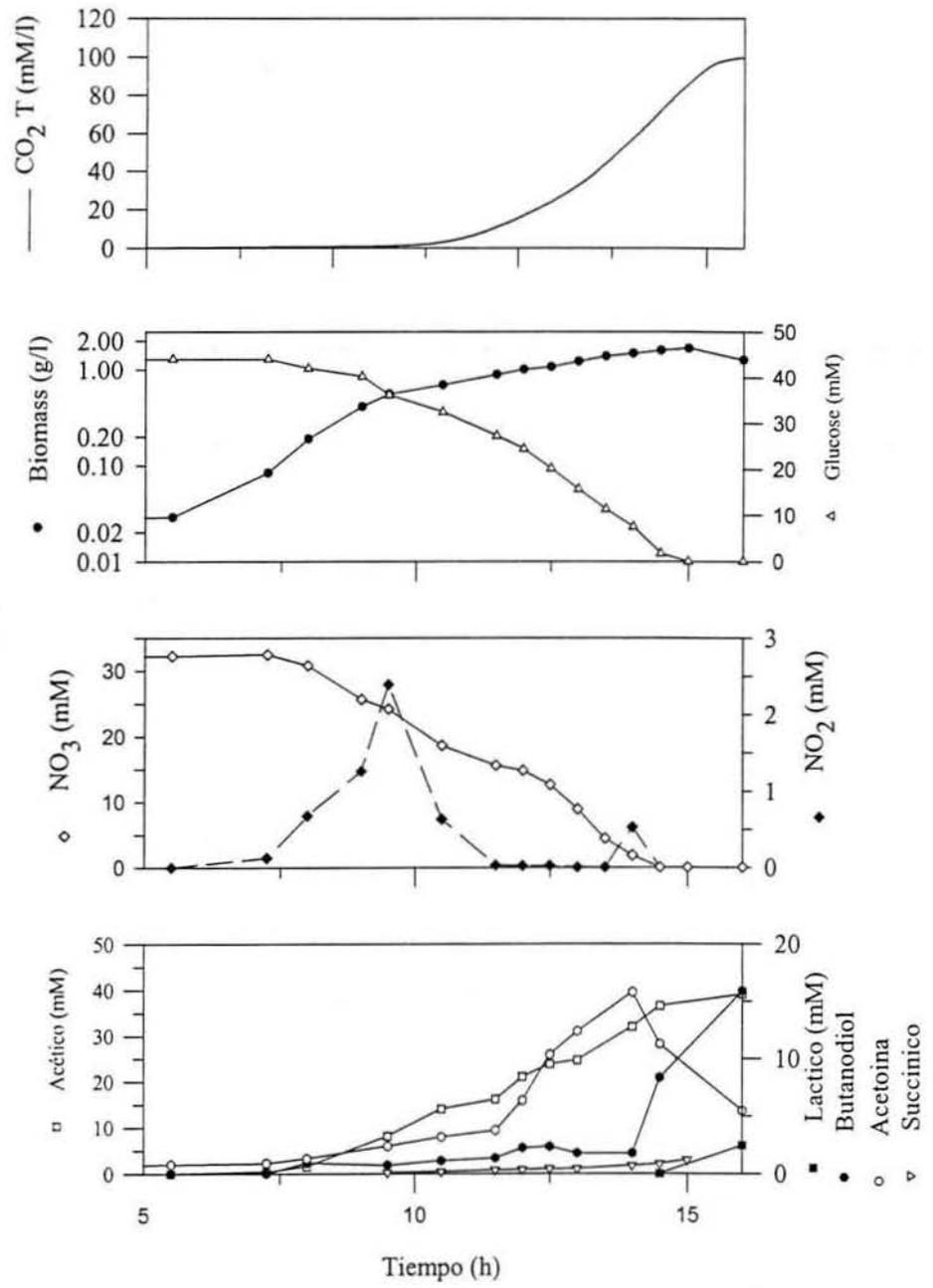


Figura 7.6.2 Cinética empleada en la estimación de flujos metabólicos (experimento B). *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaeróbicas de respiración de nitratos.

Tabla 7.6.1 Distribución de productos de las cinéticas presentadas en las figuras 7.6.1 y 7.6.2.

| Producto (mmol) | A | B |
|--------------------------|-------|-------|
| Acético | 39,00 | 40,30 |
| Butanodiol | 15,90 | 17,80 |
| Acetoina | 5,45 | 2,16 |
| Láctico | 2,44 | 2,56 |
| Succínico | 1,19 | 1,10 |
| CO ₂ (calc)* | 93,00 | 91,80 |
| CO ₂ medido | 94,14 | 98,26 |
| NO ₃ Reducido | 32,26 | 32,00 |
| NO ₂ | 0 | 0 |

*Calculado por la ecuación (10). A y B son dos experimentos independientes.

La cantidad de CO₂ representa el 36 % de todo el carbono proveniente de la glucosa, seguido de un 30 y 31 % para el ácido acético y el conjunto acetoina-butanodiol, respectivamente, también se observaron pequeñas cantidades de succínico, de tal manera que se recuperó el 98% del carbono proveniente de la glucosa consumida en los productos cuantificados. Mientras que la cantidad de CO₂ cuantificada tuvo una variación de $\pm 4.2\%$ con respecto a la cantidad total de CO₂ calculada a partir de las concentraciones de los productos (ecuación 10). Cabe recordar que en la sección 7.2 se mostró que *B. subtilis* no es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas en medio Schaeffer sin glucosa y que al adicionar glucosa el medio se obtiene poco crecimiento y producción de láctico. En conjunto estos resultados indican, de nuevo, que los componentes del medio Schaeffer (aminoácidos, vitaminas, etc.) son utilizados para formar la masa celular y que la glucosa es empleada para generar poder reductor, productos y energía en anaerobiosis. Además la energía extra obtenida de la reducción del nitrato a amonio permite que se pueda generar una mayor cantidad de biomasa cuando se utiliza nitrato como aceptor final de electrones en comparación con la poca biomasa que se obtiene en condiciones de fermentación. Así mismo en ausencia de nitratos, *B. subtilis* convierte glucosa en láctico con rendimientos mayores al 80% del teórico (figura 7.2.3; Hernández-Bustos 2003), lo cual indica que la generación de 2 ATP por mol de glucosa (obtenidos a nivel de fosforilación de sustrato) no

son suficientes para sostener un mayor y prolongado crecimiento de *B. subtilis*, y que la generación de ATP adicional por la conversión del pirúvico en acético y la reducción del nitrato favorecen el su crecimiento en condiciones anaeróbicas.

Utilizando el balance de coenzimas (ecuación 9), se calculó que un porcentaje de la glucosa en las condiciones de estudio es catabolizada por la ruta de las pentosas. Los balances de oxido-reducción y de hidrógeno fueron 0.99 ± 0.05 y 1.011 ± 0.01 respectivamente, lo cual indica una excelente consistencia de los resultados obtenidos. Los valores calculados para el rendimiento de ATP para la biomasa y la glucosa fueron 10.6 ± 0.88 g de biomasa / Mol ATP y $3.8 \pm 0,1$ Mol ATP / Mol glucosa. Estos resultados son similares a los obtenidos para otros microorganismos en condiciones anaerobias (Shuler y Kargi, 1991). Se encontró que en la vía del ácido acético la generación de ATP representa el 47%, mientras que en la producción de acetoina-butanodiol y la respiración del nitrato la generación representa el 26 y el 25 % respectivamente, indicando la importancia relativa de cada vía.

En la Tabla 7.6.2 se muestran los flujos metabólicos que se obtuvieron a partir de los datos cinéticos del consumo de glucosa y formación de productos. El flujo de formación de ácido acético es mayor que el del conjunto acetoina-butanodiol, pero cuando estos se comparan sobre la base de la cantidad de carbono convertido a productos, estos flujos son similares, lo cual sugiere que existe un control en la partición del carbono para dividirlo proporcionalmente. Son escasos los reportes sobre la producción de butanodiol por *B. subtilis*, ya que no se le considera un buen productor de este metabolito, lo cual se puede explicar por la amplia acumulación de ácido acético ya que reduce el rendimiento de butanodiol. Basados en este hechos, la interrupción de la vía para la producción de acético en *B. subtilis* conduciría a la obtención de cepas que potencialmente canalizarían la mayor parte de la glucosa hacia la formación de acetoina-butanediol en cultivos anaerobios con relaciones glucosa/nitrato iguales o menores a 1.4. Por otro lado, el flujo metabólico de de producción de diol (acetoina y butanodiol) fue la mitad de aquella observada en *Enterobacter aerogenes*, el cual es un microorganismo considerado como buen productor de butanodiol, mientras que el rendimiento fue de 0.23 g diol/g de glucosa y que representa el 62 % del reportado para *E. aerogenes* (Byun *et al.*, 1994). El consumo de glucosa en

condiciones anaerobias es tan rápido como aquel observado en condiciones aerobias a altas velocidades de dilución (Sauer *et al.*, 1997; Goel *et al.*, 1993; Martínez 1997) y por lo tanto no representa una limitación para el crecimiento anaerobio.

Tabla 7.6.2 Flujos metabólicos (milimoles del compuesto y de carbono contenido en el compuesto/ gramo de células) para *B. subtilis* bajo respiración de nitratos.

| Sustancia | (mmol/g _{Cel} -h) | (mmolC/g _{Cel} -h) |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| q _{glucosa} | 6.65 | 39.91 |
| q _{Acético} | 5.48 | 10.96 |
| q _{Diol} ^a | 3.18 | 12.74 |
| q _{CO₂} | 14.90 | 14.90 |
| q _{NO₃} | 5.18 | |

^aButanodiol y acetoina

Tanto en los experimentos donde se alimento glucosa-nitrato (sección 7.5), como en las corridas para determinar los flujos metabólicos, se observó un incremento en la concentración de biomasa con respecto a aquellos obtenidos por lote, este hecho refuerza la hipótesis de que la generación de biomasa para *B. subtilis* en condiciones anaeróbicas esta limitada por la obtención de energía y que por tanto la generación de masa celular depende de la presencia de glucosa y nitrato.

En las cinéticas por lote, los balances de carbono no concordaban suponiendo a la glicólisis como la única ruta catabólica de la glucosa. Dos evidencias se tuvieron para decir que la

ruta de las pentosas estaba funcionando en condiciones anaeróbicas, esto es el balance de las coenzimas y la comparación del balance de CO₂ de las rutas metabólicas con la evolución de este determinada experimentalmente. Más aún el metabolismo esta dividido en el metabolismo catabólico que depende de la utilización de la glucosa y la respiración, y el metabolismo anabólico que depende de los ingredientes del medio Schaeffer. La consistencia obtenida en los balances de carbono, coenzimas, ATP, de oxido-reducción y de hidrógeno, permiten sugerir que el ciclo de Krebs no está activo, lo cual está en concordancia con lo mostrado anteriormente por Nakano *et al.* (1998). En *E. coli* se ha encontrado que la represión del ciclo de Krebs en condiciones de respiración anaerobia de nitratos se debe a las condiciones anaeróbicas y principalmente a la represión que ejerce la glucosa (Prohl *et al.*, 1998).

Adicionalmente, existe la posibilidad de que en condiciones fermentativas haya una producción de coenzimas que no pueden reciclarse y que llevan a *B. subtilis* a detener tempranamente su crecimiento en estas condiciones. Si comparamos el crecimiento fermentativo de *E. coli* con *B. subtilis* veremos que *E. coli* tiene la enzima piruvato-formato liasa que le permite convertir el pirúvico en acetilCoA, sin producir coenzimas reducidas, en cambio *B. subtilis* solo puede convertirlo en acetilCoA con la formación de una mol de coenzima reducida. *E. coli* y otros microorganismos pueden deshacerse del poder reductor en diversas formas, por ejemplo al través de una hidrogenasa o bien produciendo compuestos en los cuales puedan reciclar estas coenzimas reducidas (etanol), en cambio *B. subtilis* puede utilizar las coenzimas reducidas en la producción de butanodiol, sin embargo sobra al menos una molécula. Los productos mayoritarios observados en las vías fermentativas de *B. subtilis* son ácido acético, acetoina-butanodiol y ácido láctico, la primera produce coenzimas reducidas, la segunda vía tiene un balance de una o dos coenzimas producidas en exceso por cada dos moléculas de ácido pirúvico producido y solo en la formación de ácido láctico puede haber un balance redox (siempre y cuando no se utilice la ruta de las pentosas).

Finalmente, en el suelo el amonio es convertido en nitrato por los microorganismos nitrificantes en condiciones aerobias, este compuesto puede ser desnitrificado en estratos

mas profundos y el nitrógeno molecular salir del suelo, otra posibilidad es que los microorganismos (entre ellos *B. subtilis*) utilicen el nitrato en condiciones anaerobias, lo cual les representa una ventaja para proliferar en el suelo. Se requieren de cuatro coenzimas reducidas para la reducción de una molécula de nitrato a amonio en condiciones anaeróbicas (el inverso de la nitrificación). *E. coli* no puede crecer con nitrato como fuente de nitrógeno en condiciones aerobias, en cambio *B. subtilis* si puede. El poder reductor que genera *B. subtilis* lo puede emplear para acoplarlo a la reducción del nitrato, lo cual le resulta favorable y nos permite plantear que este comportamiento fisiológico es una, entre otras posibles razones por las cuales *B. subtilis* es exitoso para permanecer y sobrevivir en el suelo. Recientemente Blencke, *et al.* (2003) mostraron que tanto en presencia o ausencia de glucosa en condiciones aerobias los genes que codifican para las enzimas de la ruta de las pentosas son expresados, lo cual esta en concordancia con los resultados obtenidos en condiciones anaerobias en nuestro trabajo. Estos investigadores hacen notar que estos genes son necesarios para generar NADPH para el anabolismo y precursores para la formación de triptófano y nucleótidos, por lo cual la actividad constitutiva de esta ruta de las pentosas resulta favorable para su crecimiento. En el suelo la hemicelulosa de los vegetales es hidrolizada en pentosas, las cuales sirven de fuente de carbono y energía a los microorganismos del suelo que tienen la capacidad de utilizarlas, como es el caso de *B. subtilis* (Stulke y Hillen, 2000) y que también le representan una ventaja para su sobrevivencia.

7.6.1 APORTACIONES.

1.- Se obtuvo una descripción cinética y energética de cómo *Bacillus subtilis* es capaz de crecer en condiciones de respiración de nitratos.

8.0 CONCLUSIONES.

1.- Se corroboró que el empleo de un sensor de oxido-reducción es adecuado para utilizarse en condiciones en las que concentración de oxígeno son muy bajas y permitió definir una condición inicial estándar en los cultivos anaerobios llevadas a cabo. También se comprobó que los cambios en el potencial de oxido-reducción correlacionan con el crecimiento de *B. subtilis* en condiciones anaerobias con respiración de nitratos.

2.- *B. subtilis* crece lentamente y poco en medio rico (Schaeffer) en anaerobiosis, fermentando, en estas condiciones, la glucosa eficientemente en ácido láctico. Sin embargo, el crecimiento y la velocidad de formación de biomasa se incrementan cuando se utiliza nitrato como aceptor final de electrones y se produce un cambio en el perfil de formación de productos.

4.- El crecimiento anaeróbico es tan rápido bajo respiración de nitratos como en condiciones aerobias y necesitan estar presentes tanto el aceptor final de electrones (nitrato) como un donador (Glucosa).

El empleo de una proporción molar de 1.4 glucosa / nitrato, permite que las coenzimas reducidas se utilicen en la conversión de nitrato a nitrito, después de una acumulación de éste último se induce la nitrito reductasa que convierte el nitrito en amonio y los metabolitos que principalmente se acumulan son acético y acetoina. Una limitación de nitrato lleva a la formación de butanodiol en lugar de acetoina.

La producción de acético en condiciones de respiración de nitratos representa la vía más importante de obtención de energía, esta le permite producir ATP y poder reductor.

5.- Cuando se termina el nitrato y la glucosa, no se presenta una fase estacionaria como la observada en condiciones aerobias, sino lisis celular motivo por el cual tanto la formación de esporas, como la actividad de β -galactosidasa son prácticamente inexistentes.

6.- El empleo de cultivos alimentados con nitrato-glucosa, permitió establecer una fase estacionaria. En estas condiciones la actividad específica de β -galactosidasa (expresión de *aprE*) es tan alta como la determinada en aerobiosis, sin embargo el nivel de esporulación es menor al 0.1%. Estos hechos sugieren que *B. subtilis* inicia el proceso de esporulación pero no logra completar el mismo. La inducción de *aprE*, en dos cepas con diferentes niveles de expresión, indican que es posible la producción de subtilisina u otras enzimas hidrolíticas, tanto en birreactores como en el suelo, en condiciones anaerobias con respiración de nitratos.

9.0 PERSPECTIVAS.

- 1.- Debido a que el metabolismo anaerobio de *Bacillus subtilis* parece sencillo, se podría utilizar en la producción de algunos metabolitos como; ácido acético, ácido láctico, etanol, butanodiol, etc.
- 2.- Evaluar que otras fuentes de carbono pueden ser metabolizados en condiciones de respiración de nitratos, por ejemplo: almidón, xilosa, arabinosa, etc.
- 3.- Estudiar la producción de enzimas hidrolíticas en condiciones anaerobias.
- 4.- Empleando fusiones transcripcionales con β -galactosidasa con genes involucrados en el proceso de desarrollo, evaluar en que punto se detiene el proceso de esporulación.
- 5.- Evaluar el empleo de la ruta de las pentosas por medios bioquímicos en condiciones anaeróbicas.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

10.0 BIBLIOGRAFÍA

- Alexeeva S, KJ Hellingwerf, MJ Teixeira-de-Mattos 2002. Quantitative assessment of oxygen availability: perceived aerobiosis and its effect on flux distribution in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:1402-1406.
- Anagnostopoulos C, J Spizizen 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81:741-745.
- Arras T, J Schirawski, G Uden 1998. Availability of O₂ as a substrate in the cytoplasm of bacteria under aerobic and microaerobic conditions. *J. Bact.* 180: 2133-2136.
- Azarkina N, S Siletsky, V Borisov, C von Wachenfeldt 1999. A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 274:32810-32817.
- Baker SC, SJ Ferguson, B Ludwig, MD Page, OMH Richter, RJM vanSpanning 1998 Molecular genetics of the genus *Paracoccus* metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1046-1078.
- Bauer, CE, Elsen S, Bird TH 1999 Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu Rev Microbiol* 53:495-523.
- Blasco F, B Guigliarelli, A Magalon, M Asso, G Giordano, RA Rothery 2001. The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:179-193.
- Blencke HM, G Homuth, H Ludwig, U Mader, M Hecker, J Stulke 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Met. Eng.* 5:133-149.
- Bock A, G Sawers 1996. Fermentation Cap. 18 pag. 262-280. En *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2a edición. Ed. FC Neidhart, American Society of Microbiology, Washington, EUA.
- Breznak JA, RN Costilow 1994. Physicochemical factors in growth Cap.6 pag. 137-154. En *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Ed. P Gerhardt. American Society of Microbiology, Washington, EUA.
- Brock A, G Sawers 1996 Fermentations Cap. 18 pag. 262-280. En *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2a edición. Edit. FC Neidhart, American Society of Microbiology, Washington, USA.
- Brondijk THC, D Fiegen, DJ Richardson, JA Cole 2002. Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation. *Mol Microbiol.* 44:245-255.
- Bulthuis BA, C Rommens, GM Koningstein, AH Stouthamer 1991. Formation of fermentation products and extracellular protease producing- during anaerobic growth of *Bacillus licheniformis* in chemostat and batch culture. *A. van Leeuwenhoek* 60:355-371.
- Byun TG, Zeng AP, Deckwer WD 1994. Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate *Bioproc. Eng.* 11 : 167-175
- Clements L, BS Miller, UL Streips 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:284-286.

- Cole JA, CM Brown 1980. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:65-72.
- Cruz-Ramos H, L Boursier, I Moszer, F Kunst, A Danchin, P Glaser 1995. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J.* 14: 5984-5994.
- Cruz-Ramos H, T Hoffmann, M Marino, H Nedjari, E Presecan-Siedel, O Dreesen, P Glaser, D Jahn 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182:3072-3080.
- Darwin AJ, EC Ziegelhoffer, PJ Kiley, V Stewart 1998. Fnr, NarP, and NarL regulation of *Escherichia coli* K-12 napF (periplasmic nitrate reductase) operon transcription in vitro. *J. Bacteriol.* 180:4192-4198.
- De Graef M, S Alexeeva, JL Snoep, MJ Teixeira DE Mattos 1999 The steady state interal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolite adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:2351-2357.
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57: 1-33.
- Ferguson ST 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opinion Chem. Biol.* 2:182-193.
- Ferrari E, AS Jarnagin, BF Schmidt 1993. Commercial production of extracellular enzymes. Cap. 62 pag. 917-937 En *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, ed. AL Sonenshein, Pub. ASM, Washington, EUA.
- Gennis RB, V Stewart 1996. Respiration Cap17 pag.217-254 En *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2a edición. Ed. FC Neidhart, American Society of Microbiology, Washington, EUA.
- Georgellis D, O Kwon, ECC Lin 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two component system in bacteria. *Science* 292:2314-2315.
- Goel A, J Ferronco, J Jeong, MM Ataii 1993. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 42:686-696.
- Grossman AD 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Ann. Rev. Genetics* 29:477-508
- Hernández Bustos CI 2003. "Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa" tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Zacatepec.
- Hoffman T, B Troup , A Szabo , C Hungerer , D Jahh 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:219-225.
- Ingold. 1982. Redox measurement. Principles and problems. Urdorf/Suiza.
Ingold. O₂ Measurement System, Urdorf/Suiza.
- Ireton, K, J Shengfang, .D Grossman, AL Sonensheim 1995. Krebs Cycle function is required for activation of the SpoOA transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2845-2849.
- Jolliffe LK, RJ Doyle, UN Streips. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25: 753-756.
- Kwang C, AJ Sinskey. The role of oxidation-reduction potencial in monitoring growth of cultured mammalian cells. . En Spier RE, Griffiths JE, Meignier B Eds. Production of biologicals from animal and vegetal in culture. Butterworth-Heinemann. Oxford, Inglaterra.

- Jan J 2000. "Diseño y construcción de cepas de *Bacillus subtilis* sobre productoras de proteínas heterólogas" tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jan J, F Valle, F Bolivar, E Merino 2000. Characterization of the 5' subtilisin (*aprE*) regulatory region from *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 183:9-14.
- Jansen NB, MC Flickingler, GT Tsao 1984. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnol. Bioeng. 26:362-369.
- Jin S, AL Sonenstein 1994. Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. J. Bact. 176: 4669-4679.
- Jin S, PA Levin, K Matsuno, AD Grossman, AL Sonenshein 1997. Deletion of the *Bacillus subtilis* *isocitrate* dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. J. Bacteriol. 179:4725-4732.
- Kroos L, S Cutting 1994 Intracellular and intercompartmental communication during *Bacillus subtilis* sporulation. En Regulation of bacterial differentiation, Cap. 8, pag. 115-180. Edit. P Piggot, et. al, American Society for Microbiology, Washington.
- Kunst F, N Ogasawara, I Moszer, AM Albertini, G Alloni, V Azevedo, et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 390: 249-256.
- Lazazzera, BA 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. Curr. Opinion Microbiol. 3:177-182.
- Leonardo MR, Y Dailly, DP Clark 1996 Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli*. J Bacteriol 178:6013-6018.
- Losick, R. and P. Stragier 1992 Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. Nature 355: 601-604.
- Lovly y Coates, 2000
- Marino M, H Cruz-Ramos, T Hoffman, P Glaser, D Jahn 2001. Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*). J. Bacteriol. 183:6815-6821.
- Martínez A, OT Ramírez, F Valle 1997. Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:40-45.
- Martínez A 1997. Estrategias de fermentación para la producción de β -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis* tesis de Doctorado en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Meir-Wagner J, L Nolden, M Jacoby, R Siewe, R Kramer, A Burkowski 2002 Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* role of *Amt* and *AmtB*. Microbiol 147:135-143.
- Moes J, M Griot, J Keller, E Heinzle, IJ Dunn, JR Bourne 1985. A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. Biotechnol. Bioeng. 27: 482-489.
- Nakamura LK, MS Roberts, FM Cohan 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1211-1215.
- Nakano MM, YP Dailly, P Zuber, DP Clark 1997. Characterization of anaerobic fermentation growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. J. Bacteriol. 179:6749-6755.
- Nakano MM, P Zuber, AL Sonenshein 1998. Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. J. Bacteriol. 180:3304-3311.

- Nakano MM, P Zuber 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.* 52:165-190.
- Nakano MM, T Hoffman, Y Zhu, D Jahn 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* *nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J. Bacteriol.* 180:5344-5350.
- Nakano MM, Y Zhu, M LaCelle, X Zhang, FM Hulett 2000. Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 37:1198-1207.
- Nakano MM, Y Zhu 2001. Involvement of ResE fosfatasa activity in down-regulation of ResD-controlled genes in *Bacillus subtilis* during aerobic growth. *J. Bacteriol.* 183:1938-1944.
- Papoutsakis ET, CL Meyer 1985. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27 : 50-66.
- Phalakornkule C, B Fry, T Zhu, K Kopesel, MM Attai, MM Domach 2000. ¹³C NMR Evidence for pyruvate kinase flux attenuation underlying suppressed acid formation in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 16:169-175.
- Presecan E, I Moszer, L Bousier, H Cruz-Ramos, V De la Fuente, MF Hullo, C Lelong, S Schleich, A Sekowska, BH Song, G Villani, F Kunst, A Danchin, P Glaser 1997. The *Bacillus subtilis* genome from *gerBC* (311°) to *licR* (334°). *Microbiol.* 143:3313-3328.
- Prescan-Siedel E, A Galinier, R Longin, J Deutscher, A Danchin, P Glaser, I Martin-Verstraete 1999. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:6889-6897.
- Priest FG. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics, ASM, Washington, pp 3-16.
- Prohl C, B wackwitz, D Vlad, G Uden 1998. Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 170:1-7.
- Richardson DJ, NJ Watmough 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 3:207-219.
- Richardson DJ 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology.* 146:551-571.
- Richardson DJ, BC Berks, DA Russell, S Spiro, CJ Taylor 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:165-178.
- Riondet C, R Cachon, Y Wache, G Alcaraz, C Divies 2000 Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:620-626.
- Sauer U, V Hatzimanikatis, J Bailey, M Hochulli, T. Szyperski, K Wuthrich 1997. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol.* 15:548-452.
- Schaeffer P, J Millet, J Aubert 1965. Catabolite repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54:704-711.
- Schmitz RA, D Rolf, U Deppenmeier, G Gottschalk 1999. The anaerobic way of life. En *The Prokaryotes on line*. Ed. M Dworkin. Springer-Verlag, New York, EUA.
- Schneider KB, TM Palmer, AD Grossman 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184:410-419.
- Shapleigh, JP 1999. The denitrifying prokaryotes En *The Prokaryotes on line*. Ed. M Dworkin Springer-Verlag, New York, EUA.
- Shuler ML, F Kargi 1991. Stoichiometry of microbial growth and product formation. p. 199-210. En *Bioprocess engineering basic concepts*. Ed. Shuler ML y F Kargi. Prentice Hall, New Jersey, EUA:

- Slepecky RA, HE Hemphill 1992. The Genus *Bacillus*—Nonmedical Cap. Pag. En The Prokaryotes 2a. Edición. Ed. Dworkin M, Schleifer KH y Stackebrandt, Springer Verlag, New York, EUA.
- Sneath, PHA 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Sec. 13, pag. 1104-1140. en Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.2 edit. JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore EUA.
- Sonenshein AL 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis* Curr Opinion Microbiol 3:561-566.
- Soupe E, L He, D Yan, S Kustu 1998 Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:7030-7034.
- Spiro S, JR Guest 1987. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 75:399-428.
- Stewart V, Y Lu, AJ Darwin 2002. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 184:1314-1323.
- Stragier P 1991. Dances with sigmas. The EMBO J. 10: 3559-3566.
- Stulke J, W Hillen 2000 Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. Annu rev Microbiol. 54:849-880.
- Sun G, E Sharkova, R Chesnut, S Birkey, MF Duggan, A Sorokin, P Pujic, SD Ehrlich, MF Hulett 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 178:1374-1385.
- Tobisch S, D Zuhlke, J Bernhardt, J Stulke, M Hecker 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181:6996-7004.
- Tseng CP, J Albrecht, RP Gunsalus 1996. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyoABCDE* and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:1094-1098.
- Uden G, J Bongaerts 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim. Biophys. Acta. 1320:217-234.
- Uden G, S Achebanch, G Holiighaus, HQ Tran, b Wackwitz, Y Zeuner 2002. Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4(3):263-268.
- Wang H, RP Gunsalus 1999. The *nrfB* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. J. Bacteriol. 182:5813-5822.
- Wimpenny JW (1969) The effect of Eh on regulatory processes in facultative anaerobes. Biotechnol Bioeng 11: 623-629.
- Winstedt L, C von Wachenfeldt 2000. Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome aa₃ or cytochrome bd, is required for aerobic growth. J. Bacteriol. 182:6557-6564.
- Ye RW, W Tao, L Bedzyk, T Young, M Chen, L Li 2000. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. J. Bacteriol. 182:4458-4465.
- Zehnder AJB, W Stumm 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats cap. 1 pag. 1-38 ed. AJB Zehnder, John Wiley and Sons. New York, EUA.
- Zeng A, Deckwer WD 1996. Bioreactor techniques under microaerobic conditions. from molecular level to pilot plant reactors. Chem. Eng. Sci. 51 :2305-2314

Zumft WG 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:533-616.

11.0 APÉNDICES.

11.1 PRESENTACIÓN DE ARTÍCULO.

En el manuscrito se presentan los resultados obtenidos en cultivos por lote, aerobios y anaerobios, en los cuales se varió la concentración del nitrato, a una concentración fija de glucosa en medio complejo, así como los obtenidos con los cultivos alimentados (J. Espinosa- de-los Monteros, A. Martínez y F. Valle. 2001. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:379-384.

J. Espinosa-de-los-Monteros · A. Martinez · F. Valle

Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor

Received: 19 December 2000 / Received revision: 30 April 2001 / Accepted: 2 June 2001 / Published online: 23 August 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract Cultures using nitrate as the terminal electron acceptor were conducted in Schaeffer's medium to evaluate the growth performance and metabolic profiles of *Bacillus subtilis*, and its potential to express the *aprE* (subtilisin) gene under anoxic conditions. Nitrate was converted to ammonia through nitrite reduction; and different product profiles were observed during the growth phase when nitrate was added at various concentrations (4–24 mM) to Schaeffer's medium containing glucose (4 g l⁻¹). If nitrate was not limiting, then acetic acid and acetoin were accumulated, suggesting a limitation of reduced cofactors but, if nitrate became limiting, then lactic acid and butanediol were accumulated, suggesting an excess of reduced cofactors. Due to a strong lysis at the onset of the end of the growth phase, sporulation frequency and *aprE* expression were negligible in anaerobic batch cultures. Fed-batch fermentation allowed the development of a stationary phase through a continuous supply of glucose and nitrate. In this case, sporulation frequency was almost null, but interestingly *aprE* expression was similar to that found in aerobic cultures.

Introduction

Bacillus subtilis is a host commonly used for the industrial production of degradative enzymes, such as subtilisin (Zukowski 1992). Subtilisin is coded by the *aprE*

gene and its production is triggered at the onset of the stationary phase. *aprE-lacZ* translation fusions have been used extensively to characterize *aprE* expression under aerobic conditions (Ferrari et al. 1986, 1993; Martinez et al. 1997).

In the absence of oxygen, *B. subtilis* can use nitrate as the final electron acceptor for respiration (Priest 1993). Until now, most of the work related to its anaerobic physiology has dealt with cloning, sequencing, characterization, and regulation of *B. subtilis* genes involved in the respiratory nitrate reductase system (Nakano et al. 1997; Nakano and Zuber 1998). However, there is a lack of studies quantifying metabolic profiles, kinetic parameters of cellular growth, and sporulation-related events, such as the production of degradative enzymes under conditions of anaerobic nitrate respiration.

To evaluate the physiological performance of *B. subtilis* during anaerobic growth, including product-formation profiles and kinetic parameters, we studied the effect of different initial nitrate concentrations in pH-controlled batch cultures. To avoid cellular lysis and to allow the development of the stationary phase in anaerobic cultures, nitrate and glucose were fed at the end of the exponential growth. *aprE* gene expression was assessed in these cultures as β -galactosidase enzyme activity, using an *aprE-lacZ* translation fusion integrated into the *amyE* locus of *B. subtilis*.

Materials and methods

Microorganism, inocula development and media

B. subtilis strain BSR6 ($\Delta nprE$, $\Delta amyE$, *hisA*, *glyB*, *aprE::lacZ*, *Cm^R*; Jan et al. 2000) containing an *aprE-lacZ* translation fusion integrated into the *amyE* locus was used in all experiments. Stock cultures were maintained in frozen vials at -70 °C containing 12% glycerol. For fermentor cultures, Schaeffer's sporulation medium at pH 7 (Schaeffer et al. 1965) was used and supplemented with glucose, nitrate, or both, as indicated in the Results. A loop of cells taken from frozen stock was transferred to a test tube with 3 ml Luria broth. After 12 h, 1 ml was transferred to 125-ml T-flasks containing 25 ml of Luria broth. Inocula were grown to

J. Espinosa-de-los-Monteros · A. Martinez (✉)
Departamento de Microbiología Molecular,
Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México,
A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México
e-mail: alfredo@ibt.unam.mx
Tel.: +52-7-3291601, Fax: +52-7-3172388

J. Espinosa-de-los-Monteros
UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz,
A.P. 1420, Veracruz, Ver. 91860, México

F. Valle
Genencor International Inc., 925 Page Mill Road,
Palo Alto, CA 94304-1013, USA

an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 1.0 (approx. 2 h). Test tubes and flasks were incubated at 37 °C and 300 rpm (G25 incubator; NBS Scientific Co., New Brunswick, N.J.).

Fermentor cultures

All fermentor cultures were initiated with 2% inoculum. Aerobic and anaerobic batch cultures were carried out in a baffled, stirred-tank fermentor at 37 °C and 500 rpm, with a working volume of 1 l (Multigen fermentor; NBS Scientific Co., New Brunswick, N.J.). The fermentor was equipped with one six-blade Rushton impeller. The pH was controlled at 7 by automatic additions of 0.5 M NaOH or 0.35 M H_3PO_4 solutions. Dissolved oxygen was measured with a polarographic oxygen probe (Mettler-Toledo, Wilmington, Mass.). Foam was controlled with 5% (w/v) food-grade silicone. For aerobic cultures, a flow rate of 1 vvm was used and oxygen partial pressure never dropped below 20% of air saturation.

For anaerobic cultures, preliminary tests with the use of the oxygen probe showed that values of 0% in oxygen partial pressure do not assure anaerobic conditions; and a high variability was found in culture performance. As reported (Kjaergaard 1977; Srinivas et al. 1988), redox values are reliable in sensing very low levels of oxygen in liquid cultures. Hence, an evaluation was carried out, sparging nitrogen gas at a flow rate of 100 ml min^{-1} before inoculation; and anaerobic conditions were defined when a stable value was reached using a redox probe (Mettler-Toledo, Wilmington, Mass.). Such conditions were observed after 4 h of nitrogen bubbling and a value of about -90 mV was attained. To increase accuracy in anaerobic conditions, nitrogen was sparged for 5 h before inoculation and throughout incubation.

Fed-batch anaerobic cultures were run at the same conditions used in batch culture, with an initial concentration of 4 g glucose l^{-1} and 16 mM nitrate (i.e. a 1.39 molar ratio). Fed-batch operation was initiated before nitrate and glucose depletion (glucose concentration above 1 g l^{-1}). A solution of glucose and nitrate, with the same molar ratio used for the initial batch stage, was fed at a flow rate of 0.24 ml min^{-1} , using a peristaltic pump (Miniplus 2; Gilson, Nilliers, France). The fed solution was prepared at a concentration of 0.46 M for glucose and 0.34 M for nitrate.

Analytical methods

The OD_{600} was measured with a DU-70 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, Calif.) and was converted to dry cell weight per liter, according to a calibration curve (1 OD_{600} =0.35 g l^{-1}). Samples were centrifuged and frozen until analysis. Glucose was measured with an enzymatic analyzer (Ektachem DT60 II; Kodak, Rochester, N.Y.). Acetate, lactate, acetoin, succinate, and butanediol were measured by HPLC analysis (Martinez et al. 1998). Nitrate and nitrite were determined with Merckoquant test strips and a RQ flex refractometer (Merk, Darmstadt, Germany). Spores resistant to heat were estimated as described by Nickolson and Setlow (1990) and quadruplicate counts of each dilution were done. β -Galactosidase activity was measured and one unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 nmol ONPG min^{-1} at 28 °C (Ferrari et al. 1986).

Results

Aerobic and anaerobic growth of *B. subtilis* in medium with and without glucose

In order to characterize *B. subtilis* anaerobic performance, aerobic and anaerobic cultures were compared using Schaeffer's medium alone and Schaeffer's medium

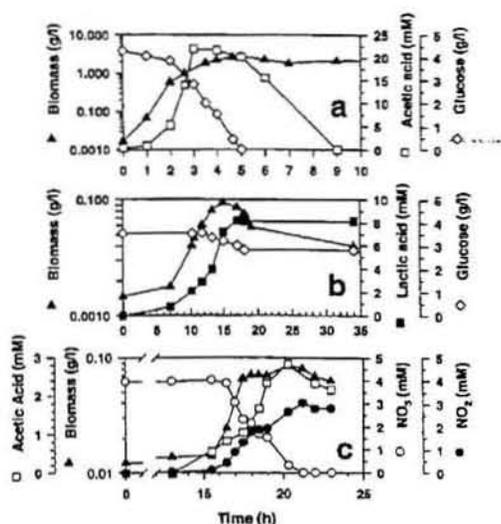


Fig. 1a-c *Bacillus subtilis* batch cultures: a Aerobic culture in Schaeffer's glucose (4 g l^{-1}) medium, b Anaerobic culture in Schaeffer's glucose (4 g l^{-1}) medium, and c Anaerobic culture in Schaeffer's medium with 4 mM nitrate

supplemented with 4 g glucose l^{-1} . The specific growth rate in aerobic batch cultures was 1.41 h^{-1} and the maximum biomass at the onset of the stationary phase was 0.88 g l^{-1} . Acetic acid was the only product detected during growth and eventually it was consumed during the stationary phase. Sporulation frequency and β -galactosidase enzymatic activities related to the expression of *aprE* are shown in Table 1. When glucose was added to Schaeffer's medium under aerobic conditions, increased values of biomass and acetic acid concentrations were attained (Fig. 1a, Table 1). Acetic acid was also consumed during the stationary phase. During the first 2 h of this culture, a growth rate similar to that obtained in Schaeffer's medium was observed and a second growth phase was developed with a lower rate (0.52 h^{-1}). Likely due to a catabolic repression effect of glucose, both sporulation frequency and β -galactosidase activities were approximately half of those observed for the aerobic control experiment (Table 1).

B. subtilis did not grow when it was cultured under anaerobic conditions using Schaeffer's medium (Table 1). Only when an electron donor (glucose) was added (and after a lag phase of 7 h) was growth achieved (Fig. 1b). An 83% and 96% reduction in growth rate and maximum biomass was obtained, respectively, in comparison with aerobic Schaeffer's glucose culture (Table 1). Glucose was partially consumed and lactic acid was the only product detected. In addition, sporulation was absent and only negligible β -galactosidase activity was detected (Table 1).

Table 1 Summary results of batch cultures with *Bacillus subtilis* BSR6 and either Schaeffer's medium alone or Schaeffer's glucose medium under aerobic and anaerobic conditions. β -Gal Specific β -galactosidase activity attained 4 h after the end of exponential growth, glucose added at 4 g l⁻¹, Lag lag phase duration, μ

| Medium | Condition | Lag (h) | μ (h ⁻¹) | X_{max} (g l ⁻¹) | Product | β -Gal (U mg _{Biomass} ⁻¹) | Sporulation (%) |
|-----------------------|--------------|---------|--------------------------|--------------------------------|---------|---|-----------------|
| Schaeffer's | Aerobic | 0 | 1.41 | 0.88 | Acetate | 600 | 32 |
| Schaeffer's + glucose | Aerobic | 0 | 1.47 | 2.77 | Acetate | 329 | 14 |
| | Second stage | | 0.52 | | | | |
| Schaeffer's | Anaerobic | - | 0.0 | 0.0 | None | 0 | 0 |
| Schaeffer's + glucose | Anaerobic | 7 | 0.25 | 0.10 | Lactate | 10 | 0 |

Use of nitrate as final electron acceptor

When Schaeffer's medium was supplemented with nitrate (4 mM) for anaerobic growth, a long lag phase was obtained (15.5 h; Fig. 1c). The specific growth rate during the exponential growth phase (0.72 h⁻¹) was half of that developed under aerobic conditions, but almost three times the value for anaerobic Schaeffer's glucose culture. However, a very low biomass production was attained (0.09 g l⁻¹). Acetic acid and nitrite were accumulated (Fig. 1c). No sporulation was observed and a negligible β -galactosidase activity was detected (26 U mg⁻¹ biomass).

Effect of nitrate concentration on *B. subtilis* growth in the presence of glucose

Cultures were grown to assess *B. subtilis* performance in Schaeffer's medium complemented with glucose (4 g l⁻¹) as an electron donor and with various nitrate concentrations (4–24 mM) as electron acceptor. Kinetic profiles for two nitrate concentrations are shown in Fig. 2; and Table 2 summarizes some parameters of these cultures. The lag phase was reduced to 5–6 h. As nitrate concentration increased, total glucose consumption increased too and, for nitrate concentrations above 12 mM, glucose was totally consumed. Biomass production increased from 0.5 g l⁻¹ to an average of 1.04 g l⁻¹ for nitrate concentrations ranging from 16 mM to 24 mM. Clearly, two growth phases were observed for cultures with nitrate concentrations above 4 mM (Fig. 2). The initial specific growth rate was 1.0 h⁻¹ on average (± 0.08 h⁻¹), i.e. only a 32% reduction with respect to the growth rate obtained in aerobic conditions. Meanwhile, a decline in growth rate was observed for the second phase, with a mean value of 0.28 h⁻¹ (± 0.05 h⁻¹) for cultures with nitrate concentrations of 8–24 mM.

As shown in Table 2, the accumulation of fermentation products is dependent on nitrate and glucose availability. As nitrate concentration increased, lactic acid accumulation decreased. Meanwhile, acetic acid accumulation increased with nitrate concentration. Butanediol accumulation was practically constant from 4 mM to

specific growth rate, *Second stage* specific growth rate during the second exponential stage, *Sporulation* sporulation frequency at 18 h after the end of exponential growth, X_{max} maximum biomass obtained at the end of exponential growth

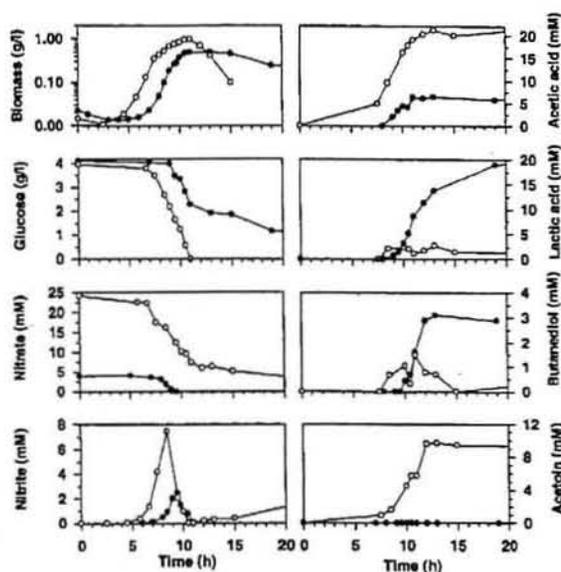


Fig. 2 Examples of *B. subtilis* batch anaerobic cultures in Schaeffer's glucose medium supplemented with different nitrate concentrations. Solid circles 4 mM nitrate, open circles 20 mM nitrate

16 mM nitrate and no significant accumulation was observed above 16 mM. Meanwhile, acetoin accumulation was observed only for concentrations higher than 16 mM. Under nitrate-limiting conditions, or for molar ratios of glucose/nitrate higher than 2.78, molar concentrations of lactate and butanediol were predominant over acetate and acetoin. For all experiments under anaerobic conditions described above, cellular lysis was observed, following exponential growth. Hence sporulation frequency and β -galactosidase activity were practically null in anaerobic batch cultures, compared to those observed under aerobic conditions (see Tables 1, 2).

Table 2 Summary of batch anaerobic cultures parameters with *B. subtilis* BSR6 using different nitrate concentrations and Schaeffer's medium with glucose 22.2 mM. Values shown for glucose, nitrate, nitrite, lactate, acetate, butanediol and acetoin were obtained at the end of exponential growth. β -Gal activity Maximum specific β -galactosidase activity attained after the end of exponen-

tial growth, *Biomass* maximum biomass obtained at the end of exponential growth, μ *1st stage* specific growth rate during the first exponential growth stage, μ *2nd stage* specific growth rate during the second exponential growth stage, *Sporulation* sporulation frequency 18 h after the end of exponential growth

| Parameter | Units | Nitrate (mM) | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|--------------|-------|-------|------|-------|-------|
| | | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
| Glucose/nitrate ratio | mol mol ⁻¹ | 5.56 | 2.78 | 1.85 | 1.39 | 1.11 | 0.93 |
| μ 1st stage | h ⁻¹ | 1.02 | 0.96 | 1.16 | 0.92 | 1.0 | 0.98 |
| μ 2nd stage | h ⁻¹ | — | 0.26 | 0.2 | 0.3 | 0.31 | 0.34 |
| Biomass | g l ⁻¹ | 0.5 | 0.71 | 0.86 | 0.95 | 1.16 | 0.99 |
| Glucose consumed | mM | 10.1 | 13.0 | 17.3 | 21.3 | 21.3 | 22.0 |
| Nitrate consumed | mM | 4.01 | 8.0 | 11.7 | 16.3 | 18.7 | 16.8 |
| Residual nitrite | mM | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.04 |
| Lactate | mM | 8.6 | 3.9 | 3.33 | 1.86 | 2.05 | 1.12 |
| Acetate | mM | 6.3 | 11.67 | 17.42 | 21.8 | 20.65 | 19.01 |
| Butanediol | mM | 2.9 | 4.0 | 4.0 | 4.4 | 0.0 | 0.6 |
| Acetoin | mM | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 9.8 | 9.3 |
| Sporulation | % | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.01 | 0.01 | 0.001 |
| β -Gal activity | U mg ⁻¹ | 26.0 | 14.0 | 8.0 | 38.0 | 31.0 | 23.0 |

Fed-batch cultures

It is known that *B. subtilis* is prone to lysis in aerobic, glucose-depleted cultures (Jolliffe et al. 1981; Martinez et al. 1997). We found that *B. subtilis* also lysed when glucose and/or nitrate were depleted in anaerobic Schaeffer's glucose/nitrate cultures. Hence, to avoid *B. subtilis* lysis in anaerobic conditions, fed-batch cultures were implemented to maintain a stationary phase. Three cultures were conducted and similar results were obtained. A representative one is shown in Fig. 3. A relatively high concentration of biomass was obtained (1.8 g l⁻¹) and a clear stationary phase was developed. Sporulation frequency (0.29%) was 100 times lower than that observed under aerobic conditions; and β -galactosidase specific activity (15 h after the onset of the stationary phase) was very close to that obtained in aerobic batch Schaeffer's glucose medium (280 U mg⁻¹ biomass; Fig. 3).

Discussion

B. subtilis growth is limited in anaerobic conditions if medium is supplemented with only glucose or nitrate

B. subtilis was not able to grow in anaerobic Schaeffer's (complex) medium and the addition of glucose or nitrate was necessary to obtain growth under such conditions. When glucose was added to Schaeffer's medium, fermentation was homolactic and, probably due to an inability to recycle reduced coenzymes, growth was limited. When nitrate was added, an electron acceptor was present and the reduced coenzymes produced could be recycled. The specific growth rate was half the value of that obtained in aerobic condition and acetic acid was produced with the concomitant production of ATP (Nakano et al. 1997). However, biomass production was limited by the amount of fermentable compounds in the medium.

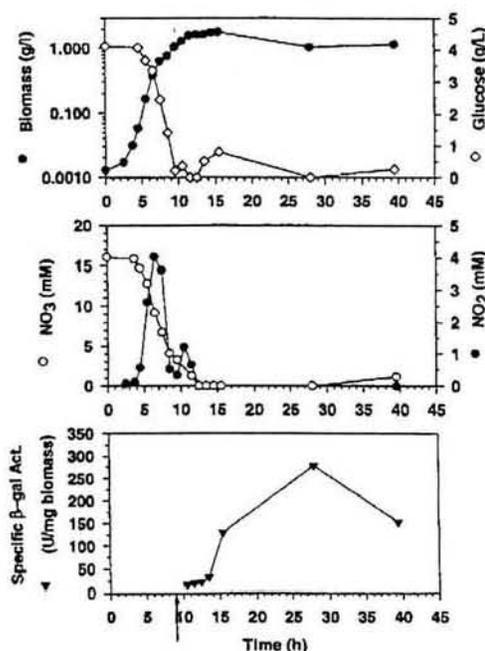


Fig. 3 Anaerobic fed-batch fermentation of *B. subtilis*. Arrow denotes the time at which feeding was initiated (see Materials and methods for a detailed description). β -gal Act. β -Galactosidase activity

Nitrate availability controls fermentation product profiles with Schaeffer's glucose medium

Fermentation and respiration took place simultaneously when glucose and nitrate were added together to Schaeffer's medium and both the growth rate and biomass production became comparable to values observed

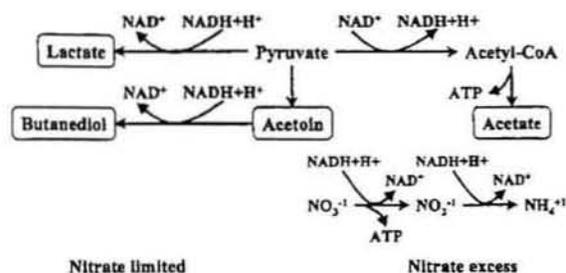


Fig. 4 Pathways showing fermentation products (in rectangles) and cofactor requirements for *B. subtilis* cultures under anaerobic conditions for limiting and non-limiting nitrate concentrations. *Left side*: fermentation products that use reduced NADH for formation. *Right side*: fermentation products that allow the generation of additional reduced NADH and produce ATP during formation. Reduction of nitrate using additional reduced NADH allows the generation of ATP; and reduction of nitrite to ammonia avoids toxic effects

in aerobic condition; and two growth stages developed for *B. subtilis* in anaerobic cultures in the presence of glucose and nitrate. During the rapid growth phase, the specific growth rate was only 32% lower than the aerobic counterpart. As rich nutrients were exhausted, there was a two-thirds decline in the growth rate; and growth stopped when either nitrate or glucose was depleted. Glucose was consumed mainly during the second exponential growth phase, with a mean glucose consumption rate of 7.7 mmol g_{cell}⁻¹ h⁻¹. This value is similar to that found in continuous or fed-batch aerobic cultures at high specific growth rates (Sauer et al. 1997; Martinez et al. 1998), indicating that glycolytic activity is high under nitrate respiration conditions. As shown in Fig. 4, fermentation patterns changed with nitrate availability. When nitrate was limiting, an excess of reduced coenzymes was produced and could not be recycled; and preferentially lactic acid and butanediol were produced. When nitrate was in excess, acetoin and acetate were preferentially accumulated. These results suggest a hierarchy on reduced coenzyme utilization. First, they are used for nitrate and nitrite reduction and, later on, for acetoin reduction to butanediol; and only when nitrate, nitrite, and acetoin become limiting, is lactic acid produced. Acetic acid and acetoin fermentation is energetically better, because more ATP is produced and the maximum amount of reduced coenzymes needed for nitrate reduction to ammonium is obtained. In summary, these results show that the glucose/nitrate ratio needs to be about 1.39 in order to maintain a balanced respiro-fermentative growth (see Table 2). Our sporulation results from batch cultures are in concordance with previous results (Hoffman et al. 1995), which reported that *B. subtilis* lost its ability to sporulate under anaerobic conditions.

Fed-batch cultures avoid lysis and allow the expression of the subtilisin gene

The *aprE* expression is regulated through a complex network (Valle and Ferrari 1989; Ferrari et al. 1993). Con-

comitant with the beginning of the developmental process and spore formation in aerobic conditions and rich media, *aprE* expression is triggered at the onset of the stationary phase (Ferrari et al. 1986, 1993; Martinez et al. 1997).

As reported previously for aerobic cultures (Jolliffe et al. 1981; Martinez et al. 1997), a strong lysis was also observed in anaerobic cultures when either glucose (electron donor) or nitrate (electron acceptor) was depleted. Lysis was present in all batch cultures and was three times faster after glucose depletion than after nitrate depletion. Hence, no cells were available for *aprE* expression. The use of fed-batch techniques allowed the development of a stationary phase and avoided the lysis stage, through the continuous supply of an electron donor and acceptor. The development of a stationary phase, together with a low glucose concentration in the culture medium, probably initiated the developmental process. Under these circumstances, a low frequency of sporulation was observed (0.29%), confirming the limited capacity of *B. subtilis* to sporulate under anaerobic conditions. However, β -galactosidase activity, related to *aprE* expression, was as high as that observed for aerobic culture with the same medium. To our knowledge, this is the first report of *aprE* expression from *B. subtilis* in anaerobic conditions. Hydrolytic enzymes are produced when simple sugars are limited, a situation which can occur naturally under aerobic or anaerobic conditions, although the metabolic energy requirements under anaerobic conditions are difficult to satisfy. Therefore, the continuous addition of nutrients in limited amounts is necessary for the production of these enzymes under anaerobic conditions. Nevertheless, the β -galactosidase values under anaerobic fed batch were similar to values under aerobic conditions with Schaeffer's glucose medium (280 U vs 330 U β -galactosidase mg⁻¹ biomass); and optimization studies can lead to an improvement in *aprE* expression under anaerobic conditions. Furthermore, anaerobic cultures have the advantage of simple and safe operating conditions, with less energy consumption than aerobic cultures. It is likely that other genes that code for degradative enzymes or other heterologous proteins under the control of the *aprE* regulatory region can be expressed using nitrate/glucose, anaerobic, fed-batch cultures; and further work needs to be done in this direction. *B. subtilis* has the capacity to metabolize a wide range of carbon compounds, from simple sugars to polymers, so the production of fermentation products, such as acetoin and butanediol, or derivatives of these, can be done by controlling the anaerobic metabolism. Overall, these results demonstrate the ability and strategies of *B. subtilis* for survival under anaerobic conditions.

Acknowledgements Technical support from M. Enzaldo and G. Hernández is gratefully acknowledged. We are grateful to T. Dodge, G. Gosset, V. Hernández and E. Merino for critical review of this manuscript. CONACYT and ITV financially supported J.E.M.

References

- Ferrari E, Howard SMH, Hoch JA (1986) Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J Bacteriol* 166:173-179
- Ferrari E, Jarnagin AS, Schmidt BF (1993). Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM, Washington, D.C., pp 917-937
- Hoffman T, Troup B, Szabo A, Hungerer C, Jahn D (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett* 131:219-225
- Jan J, Valle F, Bolivar F, Merino E (2000) Characterization of the 5' subtilisin (*aprE*) regulatory region from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 183:9-14
- Jolliffe LK, Doyle RJ, Streips UN (1981) The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25:753-763
- Kjaergaard L (1977) The redox potential, its use and control in biotechnology. In: Ghose TK, Fitcher A, Blockbrough N (eds) *Advances in biochemical engineering*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 131-148
- Martinez A, Ramirez OT, Valle F (1997) Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:40-45
- Martinez A, Ramirez OT, Valle F (1998) Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fedbatch cultures. *Enzyme Microb Technol* 22:520-526
- Nakano MM, Zuber P (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* 52:165-190
- Nakano MM, Dailly YP, Zuber P, Clark DP (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* 179:6749-6755
- Nickolson WL, Setlow P (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM (eds) *Molecular biological methods for Bacillus*. Wiley, London, pp 391-450
- Priest FG (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM, Washington, D.C., pp 3-16
- Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K (1997) Metabolic fluxes in riboflavin-producing *B. subtilis*. *Nat Biotechnol* 15:448-452
- Schaeffer P, Millet J, Aubert JP (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 54:704-711
- Srinivas SP, Rao G, Mutharasan R (1988) Redox potential in anaerobic and microaerobic fermentation. In: Erickson LE, Fung DYC (eds) *Handbook on anaerobic fermentation*. Dekker, New York, pp 147-186
- Valle F, Ferrari E (1989) Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene? In: Smith I, Slepecky RA, Setlow P (eds) *Regulation of prokaryotic development*. ASM, Washington, D.C., pp 131-146
- Zukowski MM (1992) Production of commercially valuable products. In: Doi, RH, McLaughlin M (eds) *Biology of bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp 311-337

11.2. GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO ANAEROBIO EN
Bacillus subtilis

| Gen | Probable función o producto | Homología en <i>Escherichia coli</i> |
|-------------------|--|--------------------------------------|
| <i>aprE</i> | Proteasa alcalina | |
| <i>nprE</i> | Proteasa neutra | |
| <i>lacZ</i> | β -galactosidasa | <i>lacZ</i> |
| <i>spo</i> | genes del proceso de esporulación | |
| <i>resE</i> | Sensor con actividad cinasa: respiración aerobia/anaerobia | |
| <i>resD</i> | Regulador de la respuesta: respiración aerobia/anaerobia | |
| <i>fnr</i> | Regulador anaeróbico | <i>fnr</i> |
| <i>narK, nirC</i> | Proteínas que participa en el transporte de nitrato y nitrito | <i>narK, nirC</i> |
| <i>narGHIJ</i> | Forman parte y participan en la formación de la nitrato reductasa <i>narZYWV</i> | <i>narGHIJ</i> |
| <i>nasDEF</i> | Forman parte y participan en la formación de la nitrito reductasa | <i>nirBD</i> |
| <i>arfM</i> | Modulador de la respiración y | |

fermentación anaerobia

| | | |
|--------------|--|-------------|
| <i>lctEP</i> | Lactato deshidrogenasa y transporte de lactato | <i>ldhA</i> |
|--------------|--|-------------|

| | | |
|--------------|---|--|
| <i>alsSD</i> | Acetolactato sintetasa y descarboxilasa | |
|--------------|---|--|

| | | |
|------------|------------------|------------|
| <i>hmp</i> | Flavohemoglobina | <i>hmp</i> |
|------------|------------------|------------|

| | | |
|------------|---------------------|------------|
| <i>pta</i> | Fosfotransacetilasa | <i>pta</i> |
|------------|---------------------|------------|

| | | |
|------------|----------------|------------|
| <i>ack</i> | Acetato cinasa | <i>ack</i> |
|------------|----------------|------------|