

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DEL CITOCROMO c EN EL CRECIMIENTO
VEGETATIVO Y LA ESPORULACION DE
Bacillus subtilis.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA
PRESENTA

ADRIANELA HUELGAS TORRES

1988



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 está 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.

INDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCION	1
-Diferenciación celular: esporogenesis.	5
-Respiración	9
MATERIALES Y METODOS	16
RESULTADOS	26
DISCUSION	41
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

ABREVIATURAS

Asc -ascorbato

CAAS - hidrolizado de caseina

Cit - citocromo

CO - monóxido de carbono

CEM - coeficiente de extinción molar

CN⁻ - cianuro

DCPIP - diclorofenolindofenol

HOQNO - 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-oxido

MQ - menaquinona

NADH - Nicotin adeninnucleótido reducido

nm - nanometros

ox - oxidado

PMS - fenazina metosulfato

PMSF - fluoruro de fenilmetil sulfonilo

red - reducido

TCM - amortiguador tris-HCl, cloruro de calcio y magnesio

TMPD - tetrametilparafenilendiamina

RESUMEN

Se estudio la composición y regulación del sistema respiratorio de Bacillus subtilis Marburg 168 y de su mutante carente de citocromo c₅₅₀ (M₁). El mutante fue aislado por su incapacidad para oxidar tetrametilparafenilendiamina (reacción NADH). Durante el crecimiento vegetativo, la cepa silvestre incrementa la concentración de citocromos, sin embargo el cit c₅₅₀ no parece expresarse durante el crecimiento logaritmico y aparece hacia finales del crecimiento manteniendose alto durante la esporulación. Las citocromos oxidasas a₃₃ y g fueron expresadas durante el crecimiento vegetativo y se sobreindujeron durante la aparición del cit c₅₅₀. Esto ocurre con una elevación concomitante de la capacidad respiratoria característica de la esporulación. Las oxidasas a₃₃ y g fueron diferenciadas por su sensibilidad al cianuro y la formación de complejos con monóxido de carbono.

En ausencia de cit c₅₅₀ en el mutante M₁ no parece interferir con la síntesis e incorporación a la membrana del cit a₃₃, sin embargo es notable que en su ausencia (cit c₅₅₀) la capacidad respiratoria disminuye significativamente y se incrementa la resistencia al cianuro, esto probablemente como consecuencia de la no funcionalidad del cit a₃₃. Bajo estas condiciones, la eficiencia en el crecimiento y esporulación no se ven afectados.

INTRODUCCION

Durante el largo tiempo geológico que las bacterias han habitado nuestro planeta han sido expuestas a los más variados y drásticos cambios medioambientales, las a obligado a sufrir adaptaciones que les permitieron no sólo sobrevivir, sino que les proporciono la capacidad para colonizar todo nicho ecológico imaginable: son los organismos más numerosos y más ampliamente distribuidos, los podemos encontrar prácticamente en todos los habitats: aire, suelo, agua, plantas, animales y materia orgánica en descomposición.

Una de las adaptaciones más sobresalientes es la capacidad de algunas especies gram positivas para formar endosporas resistentes a parametros fisicoquimicos extremos lo que permite la sobrevivencia de la célula bacteriana en condiciones definitivamente adversas.

Se conocen un gran número de bacterias que producen endosporas, la mayoría de ellas se encuentran en la familia Bacillaceae, aunque en muchos casos esta agrupación taxonomica es incierta ya que conforme aumenta el estudio de organismos hospederos y ambientes más extremos, se van aislando nuevas especies esporoformadoras cuya clasificación esté en estado de transición.

Dentro de la familia Bacillaceae se reconocen actualmente cinco generos; los más ampliamente estudiados son los generos Bacillus y Clostridium, y más recientemente, se formaron gracias

al avance del conocimiento metabólico, que permite visualizar marcadas diferencias entre los géneros Sarcina, Sporobacillus y Besulfotomaculum.

La endospora es un estadio dentro del ciclo de vida de algunas bacterias; se forma dentro de la célula vegetativa, cuando el número de la población existente no puede ser incrementado. Bajo causas de depauperación nutricional, el organismo sufre una diferenciación y forma una espora interna, que será liberada cuando la célula progenitora se autolise; permaneciendo la espora en estado de criptobiosis, es decir sin actividad metabólica detectable.

Esta célula diferenciada es mucho más resistente, que la forma vegetativa, a los efectos del calor, desecación, congelación, radiación y tóxicos químicos. Esta característica de resistencia aunada a su gran capacidad y plasticidad para desarrollarse en diversos habitats explican la distribución cosmopolita, tanto de formas libres como parasitas.

Aunque algunas de sus especies han sido implicadas como patógenos de animales, la mayoría de los Bacillus son saprófitos no dafinos que juegan un papel importante en la naturaleza como agentes de reciclamiento de nutrientes debido a la facilidad para degradar proteínas y polisacáridos como por la capacidad que tienen algunas especies para fijar nitrógeno.

Esta importante función ecológica la realizan a lo largo de toda la biosfera ya que se les puede encontrar en suelo y agua

en proporciones que varían de acuerdo a de la concentración de materia orgánica disponible. En muestras de suelo tomadas antes de la época de lluvias, la especie más frecuentemente aislada es B. cereus, disminuye su incidencia al término del temporal. En aguas marinas y lacustres, el 16% de las bacterias heterótrofas son Bacillus en tanto que las muestras de sedimento, presentan este tipo de flora casi en un 100% debido al acúmulo de fuentes de carbono y nitrógeno disponible (2,3).

En medios acuáticos muy contaminados las especies más frecuentemente aisladas son B. licheniformis, B. cereus y B. sphaericus, en tanto que en zonas de bajo contenido de contaminantes se pueden aislar B. subtilis, B. firmus y B. brevis (2,3).

A pesar de la plasticidad y adecuación que presenta el grupo Bacillus, cada género tiene necesidades y limitaciones; al igual que los cambios nutricionales determinan el crecimiento de la población, las variaciones en los parámetros tanto físicos como químicos determinan el tamaño de las poblaciones bacterianas y las sucesiones ecológicas de las mismas.

La susceptibilidad que presentan a cambios externos permite su selección y diferenciación taxonómica en condiciones de laboratorio; por su requerimiento de temperatura los hay termófilos, se aplica el término a aquellas especies que crecen arriba de los 55° C. Se han aislado termófilos esporoformadores aerobios de prácticamente todos los ambientes biológicos incluso

de arena de desierto, tierras tropicales y templadas, aguas termales, dulces y saladas así como alimentos y heces fecales. El manual de Bergey en su edición de 1974 enlista seis especies de Bacillus con propiedades termófilas: B. stearothermophilus y B. acidocaldarius son termófilos obligados, ya que no crecen a temperaturas menores a los 40° C, siendo el óptimo de 55 a 75° C, otras especies son consideradas como termófilas facultativas: B. subtilis, B. licheniformes, B. coagulans y B. ptrevis (5).

Estas especies esporoformadoras adaptadas a ambientes termófilos y ácidos poseen un ADN con alta proporción de guanina y citosina (G y C, 62 % / mol.) (7). La formación de tres puentes de hidrógeno entre G y C, probablemente les confiere una mayor resistencia, requiriéndose temperaturas más elevadas para romper los enlaces y desnaturalizar el ADN.

El otro extremo son las bacterias psicrófilas en las que se clasifican a aquellas cepas que, a temperatura de 0° C, crecen dentro de un plazo de dos semanas y no pueden desarrollarse por arriba de los 25° C. Existen especies aerobias psicrófilas dentro del género Bacillus: B. psychrosaccharoliticus, B. insolitus, B. globistorus y B. psychophilus (5).

Parámetro determinante en el desarrollo bacteriano, es el pH del cultivo: en condiciones de laboratorio, pueden ser seguidos los cambios de pH debidos tanto al consumo de sustratos contenidos en el medio, como a la liberación de productos

metabólicos de los organismos.

Aunque los cambios en el pH dependen de las fuentes nutricionales del medio, ya que ello determina el que el organismo utilice una vía metabólica u otra, por tanto el cambio de pH que se registra en un medio que contenga fuentes de carbono fermentable no son los mismos que los obtenidos en un medio no fermentable.

Las variaciones en este parámetro, son determinantes para que la bacteria pueda o no esporular (Escamilla et al, trabajo en preparación).

DIFERENCIACION CÉLULAR:ESPOROGENESIS

El proceso de diferenciación celular hacia la formación de una espora es conocido como esporogénesis; este cambio es considerado como una adaptación de los organismos en respuesta al agotamiento nutricional básicamente. La formación de la espora no es paso necesario en el ciclo de vida de estos organismos, pero en aquellas bacterias genéticamente capaces de formarlas, la diferenciación se desencadena por cambios medioambientales como son la falta de fuentes de carbono y nitrógeno de rápida utilización y por consecuencia el acumulo de productos metabólicos; bajo estas condiciones la tasa de crecimiento

populacional disminuye, utilizando los productos metabólicos presentes en el medio y seguramente las reservas intracelulares para la formación de capas que rodean a la espora.

La esporogénesis es un proceso secuencial y ordenado, que se manifiesta si el organismo contiene la información genética que codifique para este fenotipo y las condiciones del medio son favorables. Cada célula formará una espora, en un lapso de 8 a 10 horas, por medio de la cual la célula asegura su sobrevivencia, el organismo disminuye su metabolismo a niveles no detectables pero conserva la capacidad de germinar y crecer al encontrarse en condiciones favorables.

Durante la esporulación la célula madre y la endospora continúan con un metabolismo activo, reemplazando actividades metabólicas necesarias durante el crecimiento exponencial por las requeridas para concebir una espora latente que contenga sustratos de reserva rápidamente metabolizables y la maquinaria energética y enzimática necesaria para reiniciar el metabolismo y la biosíntesis durante la germinación.

Estos cambios metabólicos integrados secuencialmente involucran una serie de modificaciones cualitativas y cuantitativas en la síntesis de productos metabólicos. Esta síntesis depende de los nutrientes del medio, los residuos de estos y probablemente de las reservas intracelulares.

El crecimiento vegetativo se caracteriza por la preponderancia de un metabolismo glicolítico (17, 19) que da

como resultado la formación de productos metabólicos intermediarios que son liberados al medio de cultivo, al acúmulo de ácidos orgánicos y la disminución de fuentes de carbono y nitrógeno detienen paulatinamente la actividad glicolítica al tiempo que se hacen funcionales las enzimas del ciclo de Krebs y comienza a evidenciarse la actividad respiratoria que permite al esporangio la utilización de los ácidos orgánicos como pirúvico, acético y láctico (14).

El papel del ácido tricarboxílico durante los periodos preesporulantes está bien caracterizado, durante el crecimiento vegetativo algunas de las enzimas que componen este sistema se encuentran en bajas concentraciones, aumentando conforme desaparece la glicolisis. La deficiencia en algunas de las enzimas de esta vía trae como consecuencia la incapacidad para esporular (15, 34).

Observaciones realizadas con microscopía electrónica, han permitido establecer siete etapas características, que exhiben diferencias morfoestructurales marcadas durante la esporogénesis. La célula vegetativa que no ha de dividirse nuevamente es definida como el estadio T₀, en este momento el material genético ha sido duplicado, pero la división celular no concluirá; dentro de cada célula la cromatina se condensa y forma un filamento axial, constituyéndose así el estadio T I de la esporulación. Los cromosomas se separan y uno de ellos migra a un polo de la célula y queda unido a mesosomas; la membrana plasmática crece

y forma invaginaciones, que dan lugar a un septo que delimita dos compartimentos, siendo el de mayor volumen el que constituye la célula madre y el pequeño que ocupa una tercera parte del volumen total del esporangio, corresponde a la preespora (estadio II). La etapa siguiente, estadio III, se caracteriza por el continuo crecimiento de la membrana, el cual es ayudado por los mesosomas contenidos en un extremo de la preespora. El crecimiento membranoso es dirigido al englobamiento de la endospora y culmina con la fusión de los extremos de la membrana, la espora permanece dentro de la célula madre, pero sin depender de ella. En estas condiciones, la célula se encuentra en un estado de transición durante el cual, el proceso iniciado puede hacerse reversible si el medio es enriquecido con nuevas fuentes nutricionales; de esta forma la célula bacteriana continuaría su crecimiento vegetativo, de no ser así la esporulación continuará y no podrá regresar a la fase vegetativa si no hasta concluir la maduración de la espora y posteriormente su germinación.

En el estadio IV se inicia la síntesis de corteza, la adición de nutrientes a partir de esta etapa traerá como consecuencia un retardo en la liberación de la espora madura. Durante la formación de la corteza la apariencia del protoplasma se hace más densa y homogénea, ya que hay un acúmulo de peptidoglucano que es depositado entre las membranas externa e interna de la espora. Durante los estadios V y VI, la espora se convierte en una estructura brillante que puede ser observada

claramente con el microscopio de contraste de fases. Este cambio de apariencia se debe probablemente al ácido dipicolínico sintetizado por el protoplasma y que es transportado al interior de la espora, así como al acúmulo de calcio.

El último estadio (T.VII) consiste en la liberación de la espora madura por la autólisis de la célula madre.

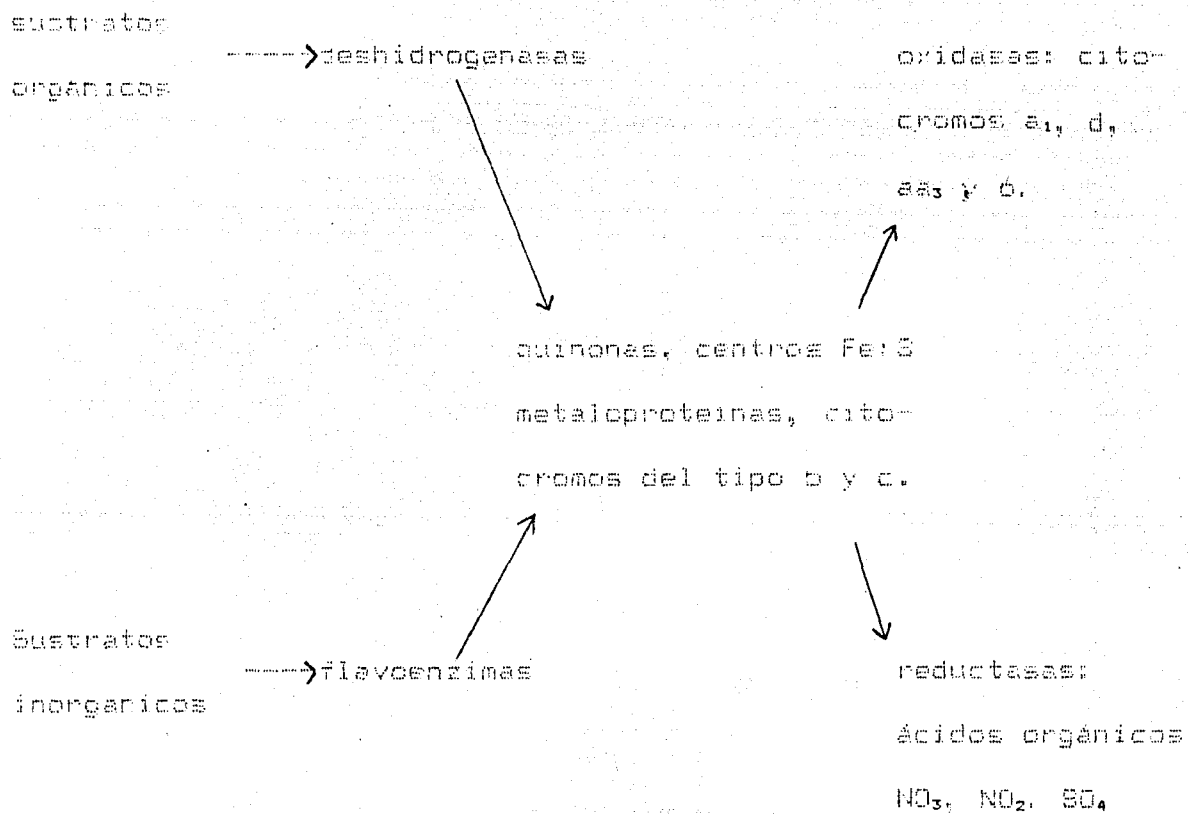
RESPIRACION

La gran diversidad que presentan las bacterias, muestra que no pueden tener patrones metabólicos idénticos, ya que los procesos bioquímicos varían al cambiar uno solo de los parámetros ya mencionados.

El transporte de electrones bacteriano, que es el que nos ocupa, está sujeto a regulación genética cuya expresión es drásticamente afectada por las variables del cultivo lo que hace difícil y complejo su estudio. Muchas de ellas poseen una vía respiratoria ramificada formada por varias cadenas que pueden funcionar de manera independiente o entrecruzarse; tal plasticidad les permite mantener el crecimiento a pesar de grandes variaciones en tensión de oxígeno, disponibilidad de fuentes de carbono y aceptores de electrones alternos. Así, la expresión fenotípica de los componentes respiratorios varía

cuantitativa y cualitativamente para ajustarse a las condiciones
prevalcientes de cultivo.

A pesar de las variaciones que el transporte de electrones
bacteriano presenta, Gelman et al (19) propuso un esquema que
engloba de manera general las posibilidades de composición y
organización de dicho sistema :



Son distinguibles tres sectores; el primero llamado de
entrada está constituido por flavoenzimas o deshidrogenasas,
dependiendo del sustrato en el que se encuentre. En presencia
de sustratos orgánicos, las deshidrogenasas membranales, reducen

directamente al sistema respiratorio; son capaces de deshidrogenar una gran variedad de sustratos tales como aldehidos, ácidos, esteroides, polialcoholes, etc..

El sector intermedio puede ser común ó constituido por vías paralelas, está formado por quinonas, centros Fe:S, metaloproteínas y citocromos.

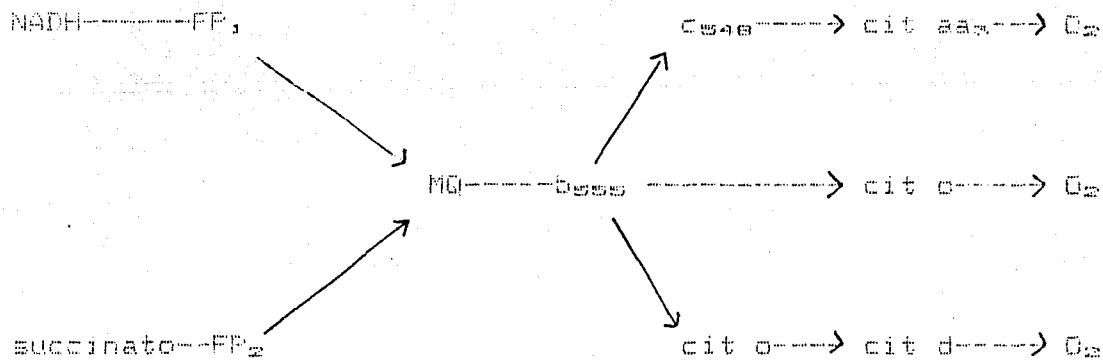
El sector de salida, puede estar formado por varias oxidasas terminales que presentan diferente afinidad por el oxígeno. El que se exprese una u otra de estas oxidasas va a estar determinado por la tensión de oxígeno en el medio de cultivo. Los citocromos a₁ y d, presentan una alta afinidad por el oxígeno, por lo que se ven favorecidos cuando la tensión de dicho gas es baja, en tanto que a tensiones mayores se sintetizan los citocromos a₃ y g. Estas oxidasas pueden ser distinguidas por que presentan diferente sensibilidad al cianuro (10).

Durante la formación y maduración de la espora, se observan modificaciones en los componentes de la cadena de transporte de electrones ya que durante el crecimiento vegetativo no se requiere de una cadena respiratoria terminal típica, se observa que la adición de cianuro al medio de cultivo durante esta etapa no tiene efectos inhibitorios significativos, pero si inhibe fuertemente la esporulación, período durante el cual la vía constituye un requerimiento absoluto.

Felix y Lundgren (13) analizaron la composición del sistema respiratorio de E. cereus durante el crecimiento vegetativo,

exponencial y esporulación, que mostró un marcado incremento en el nivel de citocromos al finalizar el crecimiento vegetativo y permanecieron constantes a lo largo de la esporulación dicho aumento de citocromos coincidió con el consumo de oxígeno al finalizar el crecimiento vegetativo, además mostró un incremento en la actividad respiratoria durante la esporulación (18).

La composición, organización y regulación del sistema respiratorio de *B. cereus* ha sido definida por Escamilla y col. (10) quienes establecieron el esquema que a continuación se muestra:



Es interesante hacer notar la presencia de tres citocromos oxidasas terminales: aa₃, o y d. En los sistemas respiratorios bacterianos son frecuentes las combinaciones del cit aa₃ y el cit o ó de cit o y cit d (29) pero son muy raros los casos en los

que se ha reportado la presencia, en una misma bacteria, de los tres citocromos oxidasas (29). La expresión de los tres citocromos oxidasas de B. cereus obedece los patrones de regulación demostradas para otras bacterias (12). A este respecto podemos concluir que la expresión de cit d es favorecida por toda condición que dificulte el crecimiento como baja tensión de oxígeno, fuentes de carbono de utilización lenta, arrivo a la etapa estacionaria de crecimiento, etc. La expresión de citocromo aa₃ es determinada de manera positiva y cuantitativa, por la tensión de O₂. Finalmente el citocromo g se comporta como una proteína constitutiva, esto es, aunque sus niveles cambian de acuerdo con las condiciones de crecimiento, siempre se expresa en cantidades apreciables (12).

En relación con la genética del sistema respiratorio existe el antecedente de Taber y col (33) quienes aislaron mutantes de B. subtilis con diferentes deficiencias individuales y combinadas en la expresión de citocromos. Uno de estos mutantes, el mas interesante, probó ser deficiente en cit aa₃ y la caracterización fisiológica de este mutante sugirió que la expresión de esta citocromo oxidasa era indispensable para que ocurriera la esporulación. Este juicio quedó impreso en la literatura como un dogma y sin embargo, recientemente se han aislado en nuestro laboratorio, mutantes de Bacillus cereus deficientes en cit aa₃ que son capaces de esporular con rendimientos muy cercanos a la cepa silvestre (Escamilla et al,

trabajo en preparación). La aparente discrepancia entre las mutantes aisladas por Taber en E. subtilis y por Escamilla et al en E. cereus parece radicar en el método de selección empleado. Mientras que Taber utilizó la técnica de tinción por bencidina que no distingue entre los citocromos y por lo tanto, bastante inespecífica, Escamilla et al utilizaron la tinción con la tetrametilanparafenilendiamina (TMPD) que es un reactivo rojo específico de citocromo oxidasa. Apoyando lo anterior, estudios posteriores en los mutantes de Taber (34) han demostrado defectos múltiples en otros citocromos y actividades del ciclo de Krebs, concluyendo que los mutantes aislados por Taber son mutantes regulatorios. La caracterización de los mutantes aislados por Escamilla et al (trabajo en preparación) han demostrado carencia específica de cit aa₃.

Los antecedentes arriba descritos nos impulsaron a reexaminar los resultados obtenidos por Taber y col en E. subtilis, pero esta vez aplicando la técnica del TMPD (reacción NADI) para aislar colonias de E. subtilis con deficiencias en la vía de citocromos formada por cit c---aa₃.

Del mismo modo, el hecho de que no se cuente con un mapa genético de E. cereus y los vehículos genéticos para realizar experimentos de transformación, transducción e ingeniería genética; metodología que ha sido plenamente desarrollada en E. subtilis (38,39). invitan a tratar de aislar tales mutantes en esta última especie para futuro trabajo genético.

En la presente tesis se describe el aislamiento y caracterización de un mutante espontáneo de *B. subtilis* carente de citocromo *c*, que es el aceptor directo de electrones para el TMPD. El mutante en cuestión muestra niveles muy bajos de citocromo oxidasa como era de esperarse para una mutación en uno de los componentes de la vía final formada por *cit c* y *aa₃*. Al mismo tiempo, el mutante *cit c* - denominado en esta tesis como *M₁*, exhibió una mayor resistencia al KCN comparado con la sensibilidad de la cepa silvestre a este inhibidor.

Aunque no se hicieron experimentos cuantitativos, la capacidad de esporulación de el mutante *M₁* no parece estar seriamente afectada. Así, las propiedades fisiológicas de *M₁* hacen pensar que se trata de un mutante específico y diferente a los reportados por Taber y col (34).

MATERIALES Y METODOS

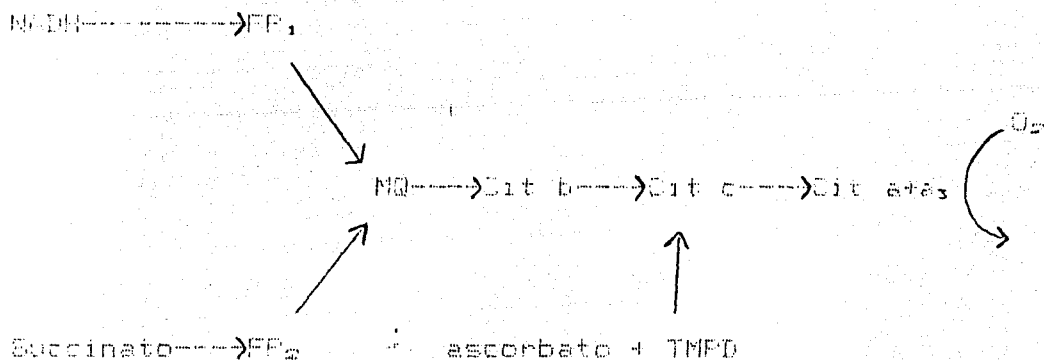
obtención y aislamiento de cepas.

Fue utilizada la cepa de *Bacillus subtilis* 168, auxotrofa para triptofano. La cepa fue obtenida del laboratorio del Dr. Jorge Vázquez Ramos del Departamento de Bioquímica Vegetal De la Facultad de Química de la UNAM.

La cepa liofilizada fue sembrada en medio de hidrolizado de caseína (CAAE) descrito por Sterlini y Maldestam (30), este medio utiliza (g por l), hidrolizado de caseína 8.6; glutamato, 3.6; L-alanina, 2.2; y aspargina, 1.2; al cual se le agrega una mezcla de sales para enriquecerlo (21), así como KH_2PO_4 1.4 g, para controlar el pH dentro de márgenes fisiológicos.

Se realizaron cultivos en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio; después de 24 horas de incubación a 30 °C con agitación continua (250 rpm); se prepararon diluciones de los cultivos hasta 10^{-7} y se sembraron en placa esperando obtener de 100 a 200 colonias por caja, definidas y separadas.

Los cultivos en placa se dejaron envejecer con la finalidad de seleccionar probables mutantes en la vía cit $\text{c} \rightarrow \text{aa}_3$, para lo cual tomamos en consideración la vía respiratoria y los sitios en los cuales la cadena es capaz de aceptar electrones.



En donde se observa que la mezcla de ascorbato+TMPD, es un sustrato que actúa sobre citocromo c como primer sitio aceptor de electrones para este donador.

El TMPD reducido, es de color leuco; al ceder electrones y ser oxidado presenta un virre a color indigo en un lapso de 15 a 45 segundos, cuando el aceptor es el citocromo c. Esta característica permite detectar baja actividad en el flujo de electrones a través de la vía c--- $a+a_3$, causada por deficiencia en el contenido de uno, otro ó ambos citocromos que conforman la vía, dándose como reacción negativa cuando no hay cambio de tonalidad en el tiempo indicado. A esta respuesta se le conoce como reacción NAD1.

TMPD reducido (leuco)----->TMPD oxidado (indigo)

Reacción NAD1

Las colonias reconocidas como NAD1 fueron aisladas y purificadas en placas sembradas por estria continua y picadura en agar nutritivo, se incubaron hasta observar un cambio de color blanco a pardo lo que indica que se encuentran en esporulación, y se asegura que el sistema respiratorio se encuentra desreprimido, y por tanto todos los citocromos existentes en su genotipo se hallan expresados; se les practicó nuevamente la reacción NAD1, para confirmar que fuera negativa.

Matraces de 2000 ml conteniendo 1000 ml con medio CAAS (hidrolizado de caseína) fueron inoculados con la cepa NAD1 y la cepa silvestre. Las células esporulantes fueron recuperadas por centrifugación a 7,500 rpm / 8 minutos, después de 24 horas de incubación.

El análisis espectrofotométrico mostró la carencia de citocromo c en la mutante, en comparación con la cepa original.

Para la obtención de partículas membranales, ambas cepas, silvestre y mutante se crecieron bajo las mismas condiciones.

Los cultivos fueron realizados en un biofermentador con capacidad de 25 l, diseñado y construido por el centro de instrumentos de la UNAM. El biofermentador fue sembrado con un litro de inóculo en fase vegetativa; dicho inóculo fue preparado siguiendo los principios de la técnica de Collier (6), se realizaron de 3 a 5 resiembras a partir de un medio sólido activado en un matraz con 10 ml de medio, después de las transferencias, se siembra en un matraz con 1,000 ml de medio de

CAAS, que se incubó a 30° C en agitación continua (250 rpm). Con este método, las células del inocuo se encuentran en una etapa de crecimiento exponencial que asegura que en el momento de cosechar obtendremos una población homogénea que llegará a los diferentes estadios de esporulación en el mismo periodo.

Periódicamente se obtuvieron muestras a las que se midió el cambio de pH. El crecimiento poblacional fue estimado por el incremento de la absorbancia medido en un espectrofotómetro (Beckman, modelo 35) a 540 nm. Se obtuvieron células esporulantes (T IV) aproximadamente después de 16 horas de iniciado el cultivo; la sincronía y pureza del cultivo se verificaron mediante la observación al microscopio.

El medio de cultivo se eliminó por medio de una centrifuga de flujo continuo (Sharples, modelo T. I). El paquete celular resuspendido y lavado una vez en amortiguador tris-HCl 5 mM, pH 7.4 que contiene MgCl 5 mM y CaCl 5 mM (buffer TCM), las células se recuperaron en una centrifuga Sorval RC 2B a 7,500 rpm /10 minutos.

Ruptura y fraccionamiento celular.

A los paquetes celulares resuspendidos en buffer TCM, se les agregó fenilmetil-sulfonilfluoruro (FMSF) 14.72 µg/ml, y se homogenizaron e incubaron durante 15 minutos.

El rompimiento se realizó en un fraccionador celular (DINO-

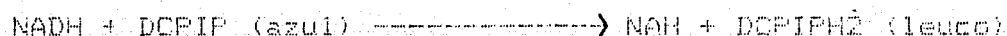
MILL), con perlas de vidrio de 200 μ a 4° C durante 45 a 60 segundos de fricción. El material celular se filtro y centrifugó a 7,500 rpm /10 min se recuperó y centrifugó el sobrenadante en una ultra-centrifuga (Beckman, L 5- 50 B) a 40,000 rpm /40 min; se lavaron una vez los sedimentos y se resuspendieron en buffer TCM.

El contenido de proteínas fue determinado por el método de Lowry (25).

Ensayos enzimáticos.

Deshidrogenasas.- La actividad de las deshidrogenasas presentes en las membranas celulares se determinó espectrofotométricamente. En este método se utilizó un compuesto colorido que vira a leuco cuando se pone en contacto con las membranas y un sustrato reductor. La velocidad de viraje va a ser proporcional a la actividad de la enzima deshidrogenasa en cuestión.

NADH-deshidrogenasa.- Este ensayo se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Lang et al (24), en la cual se efectúa la reacción enzimática:



Se usó un volumen total de 1 ml en el cual se tiene KH_2PO_4 50 mM a pH 7.4; KCN 0.1 mM; dicloro fenclindoleno (DCPIP) 0.08 mM; NADH 0.5 mM y membranas.

La reacción se inicia al agregar DCPIP y su reducción se sigue espectrofotométricamente a 600 nm. El coeficiente de extinción molar (CEM) usado para el DCPIP fue de 21 (mM cm)^{-1} .

Succinato-deshidrogenasa.- Este ensayo se realizó usando la técnica dada por Arrigoni y Singer (1). La mezcla de reacción contenía succinato disódico 0.06 M, KH_2PO_4 50 mM; fenazina metosulfato (PMS) 1.1 mM; DCPIP 0.08 mM; KCN 0.1 mM y membranas.

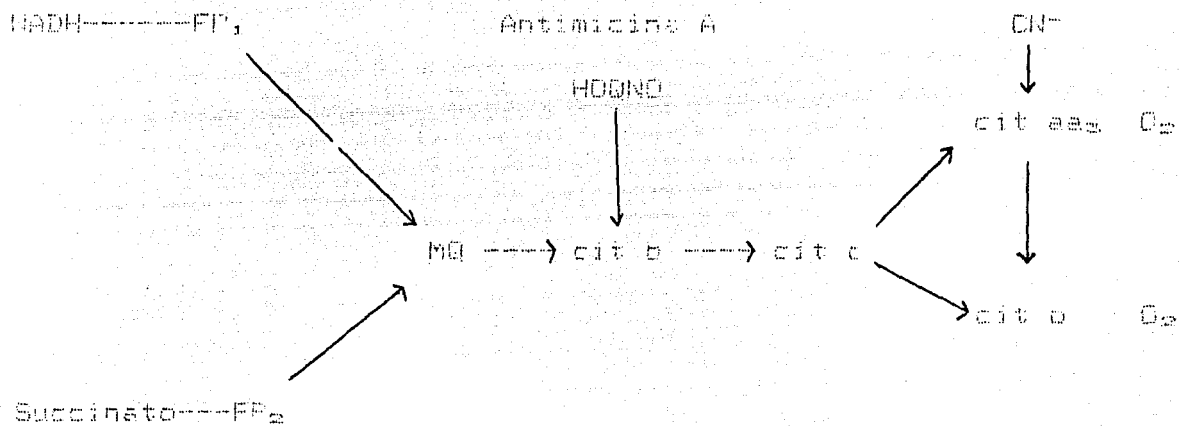
La reducción de DCPIP se siguió espectrofotométricamente a 600 nm. El CEM del DCPIP fue de 21 (mM cm)^{-1} .

Oxidasasa.- Las actividades de las oxidasas fueron determinadas, al medir la velocidad con la cual las membranas consumen oxígeno cuando son activadas por la adición de los diferentes sustratos. Se utilizó la técnica polarográfica basada en el electrodo de Clark, el cual es directamente sensible a la concentración de oxígeno.

La reacción se lleva a cabo en una cuvea incubada a 30°C conteniendo 3 ml de mezcla compuesta de buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.4; membranas celulares (2 mg de proteína) a la que se le agregan los sustratos NADH 0.5 mM o succinato 20 mM (concentraciones finales).

Citocromo c-oxidasa.- En este caso fue utilizado un donador artificial de electrones, ascorbato de sodio 0.8 mM y tetrametilparafenilendiamina (TMPT) 8.0 mM.

Para realizar los ensayos de inhibición se consideró el lugar sobre el cual se ha reportado que actúa cada uno de ellos:



Se utilizaron solventes que no tuvieran efecto sobre las actividades de las enzimas respiratorias, siendo preparados de la siguiente manera: atebrina y KCN en amortiguador de fosfatos 0.5 mM pH 7.4; antimicina A y 2-heptil-4-dihidroquinolina-N-óxido (HQNO) en dimetil sulfoxido (DMSO).

Fotoinactivación de la menaquinona.

La menaquinona de ambas cepas, silvestre y mutante, fue destruida por medio de irradiación con luz ultravioleta de 360

nm., 10 ml) de membranas conteniendo 10 mg de proteína por ml se colocaron en una caja de petri de 10 cm de diámetro, de esta manera se formó una capa fina de membranas con la finalidad de que la inactivación fuera lo más homogénea posible; esta caja de ensayo se coloca sobre una base de hielo, evitando variaciones en la temperatura. La lámpara de ultravioleta (Cromato-vue, modelo cc-20, Ultraviolet Products Inc.) fue colocada sobre las membranas, a una distancia de 10 cm.

Las actividades basales fueron medidas antes de comenzar la irradiación. De la suspensión experimental se tomaron muestras a diferentes tiempos de irradiación en las cuales se cuantificó la actividad remanente de deshidrogenasas y oxidasas.

Análisis espectral de citocromos.

Los espectros diferenciales fueron realizados en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM aminco DW 2c). Fueron corridos espectros reducidos menos oxidados tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas (nitrógeno líquido, 77 K); para llevar las membranas hasta una reducción total, fueron añadidos a las membranas algunos cristales de hidrosulfito de sodio (ditionita), que es utilizada como referencia, para comparar las membranas reducidas con diferentes sustratos con las siguientes concentraciones finales: NADH 0.5 mM, succinato 20 mM, ascorbato+TMPD; para todos los casos la celda de referencia fue

preparada con las membranas oxidadas al añadir cristales de persulfato de amonio.

Para la obtención de los espectros diferenciales específicos para citocromos a_1 y a_3 , la cubeta de referencia es preparada adicionando cristales de ditionita y 0.01 ml de antiespumante; la celda de muestra, preparada de igual forma es además burbujeada con monóxido de carbono por un periodo de 1 a 10 minutos.

Las concentraciones de los citocromos fueron estimadas utilizando los espectros diferenciales ditionita (reducido) menos persulfato (oxidado) a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes pares de longitud de onda para cada citocromo y sus coeficientes de extinción molar: citocromo a_3 , E (603-630 nm) = $16.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sone, 1986); cit b, E (563-575 nm) = $20 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (De Vriej et al, 1984); cit c, E (550-540 nm) = $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; a -CO, E (590 - 605) = 8.1 mM^{-1} (Yoshida y Fee, 1984); cit a -CO, E (415-430 nm) = $145 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kita et al, 1984).

Espectros dinámicos.

Fueron realizados espectros diferenciales anaeróbico menos aeróbico, utilizando como reductor NADH. Dentro de la celda muestra, las membranas más NADH fueron preincubadas durante 20 minutos, llegando hasta anaerobiosis antes de congelar. Mientras

que las membranas de referencia (aeróbicas) preparadas de igual forma, fueron vigorosamente agitadas (vortex) durante 20 segundos y colocadas inmediatamente en la celda congelada.

Para ver la respuesta a la inhibición con KCN las celdas fueron preparadas del mismo modo que las descritas anteriormente, pero fue agregado KCN en concentraciones crecientes de 100 μ M a 5 mM (concentraciones finales).

RESULTADOS

Fue obtenida una cepa mutante carente de citocromo c (aparentemente csso), seleccionada por presentar un fenotipo NADH; lo cual indica una deficiencia de la capacidad de transporte de electrones en la vía respiratoria situada entre citocromo c y las citocromo oxidasas terminales.

La sospecha de la mutación en dicho sector fue confirmada espectroscópicamente. En la figura 1 se muestran los espectros diferenciales (ditionita-red menos persulfato-ox) evocados tanto en la cepa silvestre como en la mutante citocromo c a la que nos referiremos como M₁, en donde se observa la ausencia de picos a 418, 520 y 550 nm característicos del citocromo c.

Niveles de citocromos durante crecimiento-esporulación.
Debido a que la expresión cuali y cuantitativa de citocromos está vinculada a las condiciones de crecimiento y edad del cultivo (12) se juzgó necesario estudiar la expresión de citocromos en la cepa silvestre durante el crecimiento y esporulación del cultivo y compararla con el mutante M₁.

En la figura 2, se presentan los espectros (reducido menos oxidado, baja temperatura, 77 K) de muestras tomadas a lo largo del crecimiento del cultivo. Al inicio de la fase exponencial, se observan dos picos, el primero de ellos absorbe a 558 nm corresponde al citocromo b, siendo cinco veces mayor que el pico de citocromo aa₃ que absorbe a 603 nm; conforme aumenta la

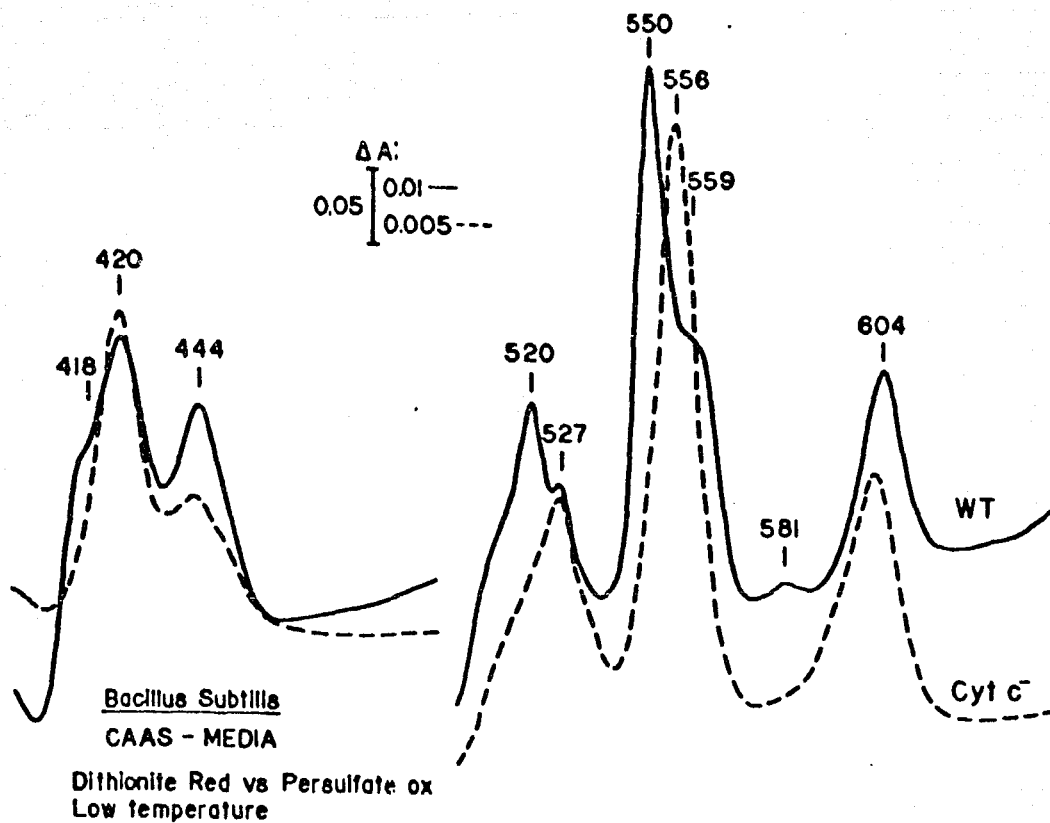


Figura 1. Espectros diferenciales (reducido menos oxidado) de células silvestres y células citocromo c^- , crecidas en medio CAAS, incubadas a 30°C por 24 horas.

La mutante citocromo c^- (trazo discontinuo) no presenta picos de absorción a 520 y 550 nm, correspondientes a citocromos del tipo c. Se usó ditionita como reductor y persulfato de amonio como oxidante.

B. subtilis w. l.

Niveles de citocromos durante
crecimiento- esporulación

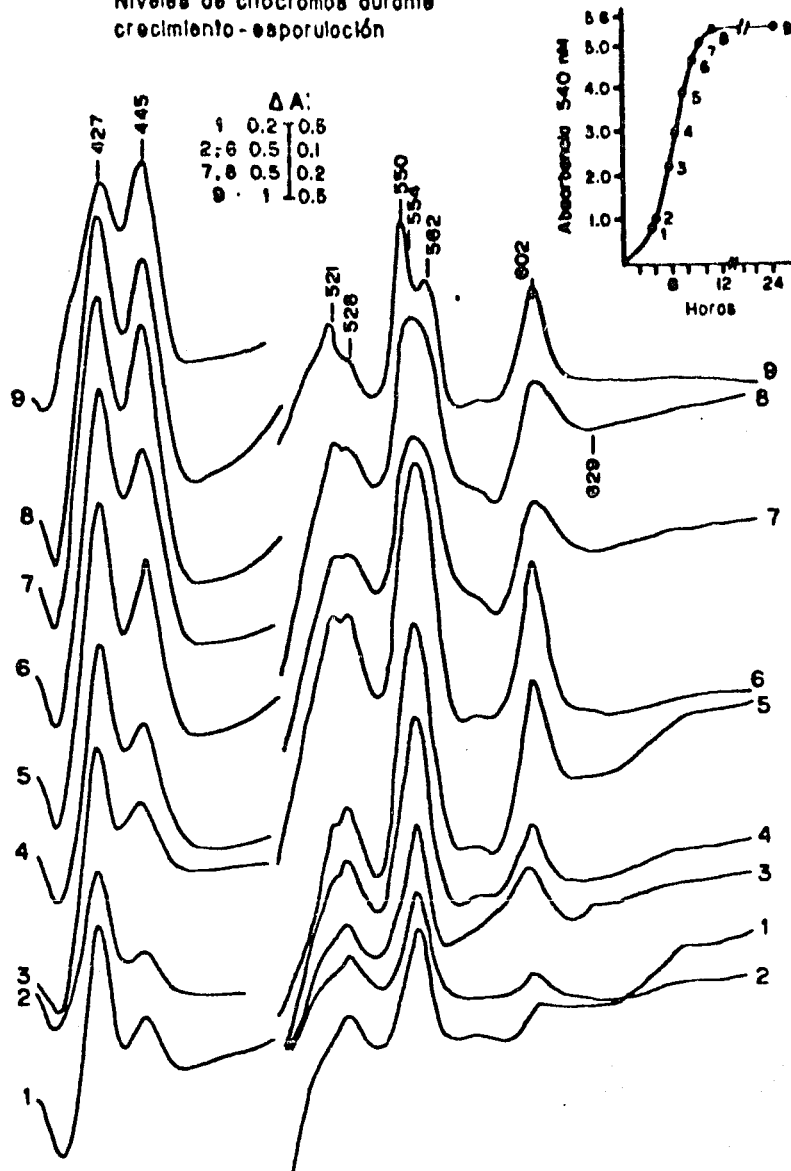


Figura 2. Espectros diferenciales (ditionita-red menos persulfato-ox ,baja temperatura, 77 K) de células de la cepa silvestre cosechadas a lo largo del crecimiento. Los trazos correspondientes a la fase exponencial (trazos 1 al 5) muestran los citocromos b_{558} y aa_3 a 603 nm. Durante la fase estacionaria (trazos 6 al 8) el pico de absorción a 558 nm se ensancha por la síntesis del citocromo c_{550} . El trazo 9 correspondiente a las células esporulantes muestra las máximas concentraciones de citocromos expresados por la cepa.

densidad óptica del cultivo y este se acerca a la fase estacionaria, la relación numérica entre los dos picos se hace menor, existiendo una diferencia de sólo 0.3 veces al terminar el crecimiento, en esta fase, el pico de b_{568} que se presentaba perfectamente definido al inicio del cultivo sufre un ensanchamiento en su parte superior, debida a la síntesis de citocromo c_{550} que va a definirse como un pico a 550 nm independiente del de cit b , cuando la célula forma una endospora (estado T5). En este momento (figura 2, trazo 9) la concentración de citocromo c_{550} es 0.5 veces mayor que la de cit b , y 0.7 veces mayor que la de cit aa_3 . Así la expresión de cit aa_1 y sobre todo la del cit g es máxima durante las etapas tardías del crecimiento y esporulación. Ya que los espectros de M, mostrados en la figura 1 fueron realizados con células cosechadas en la etapa estacionaria (11 horas de crecimiento) podemos afirmar que la carencia de citocromo g en M, es genotípica.

En la figura 3 aparecen los espectros diferenciales para los tres diferentes tipos de membranas estudiadas. El trazo correspondiente a la WT-T5 (silvestre en estado 5 de esporulación), es el característico de la cepa, con la concentración máxima de citocromos que pueden ser expresados por ella.

Aparecen los picos típicos para los citocromos b_{525} (426, 527 y 555 nm), c_{550} (417, 517 y 550 nm) y cit aa_3 (443 y 603)

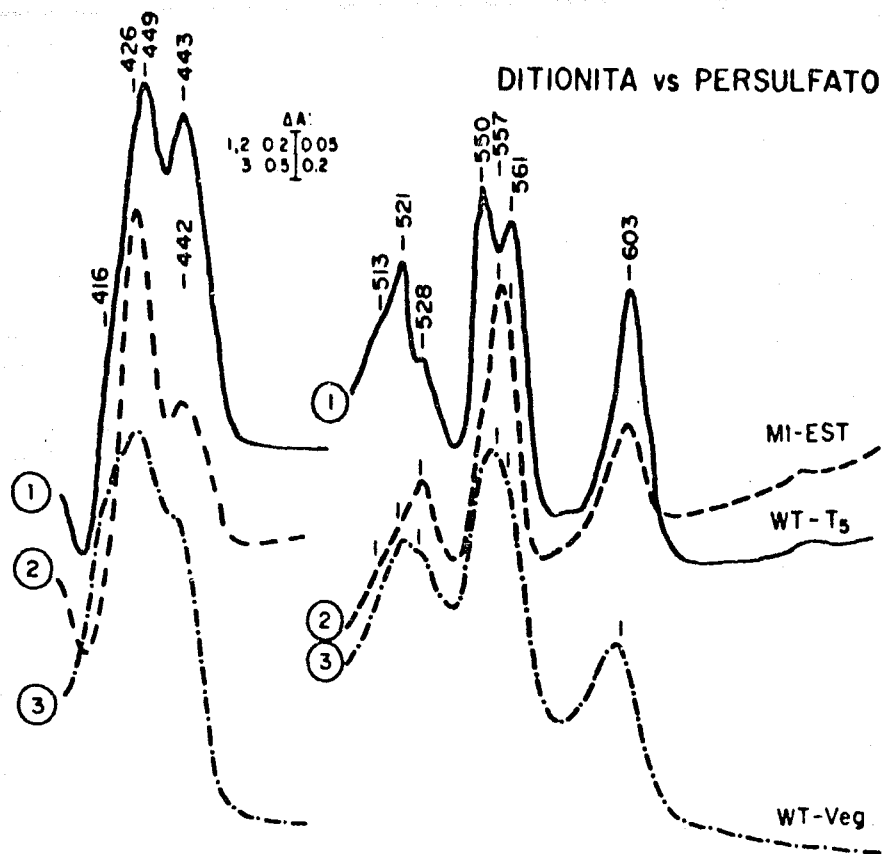


Figura 3. Espectros diferenciales (red menos ox) a baja temperatura de membranas WT-T₅, WT-veg y M₁-est. Las membranas (5 mg de proteína para silvestres y 10 mg de proteína en M₁) fueron reducidas con cristales de ditionita en la celda muestra; la referencia fue oxidada agregando cristales de persulfato de amonio, congelandolas inmediatamente.

El espectro evocado en las membranas WT-T₅ muestra un pico definido a 550 nm; el trazo 3 presenta un pico ancho a 557 nm por la mezcla de los citocromos b y c reducidos. El trazo discontinuo, M₁-est presenta un pico de absorción a 557 nm perfectamente definido. Nótese la diferencia entre WT-T₅ y M₁-est a 550 nm. (cit c₅₅₀).

En el trazo correspondiente a la cepa M₁-est presenta los picos de reducción correspondientes a cit b₅₅₂ y el cit a₆₀₃, sin que se vea reducción a 550 nm, apareciendo solamente un hombro entre 550 y 554 nm por la reducción del cit c₅₅₀. El último trazo de la figura caracteriza los citocromos de preparaciones membranales de células WT-vegetativas, no hay una expresión total de citocromos y solo se aprecia un pico definido a 603 nm, cit a₆₀₃; en tanto que los citocromos b y c forman un pico de absorción ancho que abarca de 550 a 560 nm.

Al emplear diferentes donadores de electrones, tanto fisiológicos (NADH Y succinato) como artificiales (ditionita, ascorbato y ascorbato+TMPD), se alcanzaron diferentes niveles de reducción para cada citocromo dependiendo del sustrato empleado, lo que permitió diferenciar picos de absorción correspondientes a todos y cada uno de los citocromos contenidos en las membranas.

Los ensayos realizados con NADH fueron los que presentaron la mayor reducción para todos los citocromos (figura 4) en donde se destacan los picos de absorción de los citocromos c₅₅₀ y a₆₀₃ a 603 nm en la WT-T5, en donde se muestra también la clara diferenciación de los picos a 560 y 562 nm, que no se observa en ningún otro tipo de preparaciones membranales, ni con ningún otro sustrato. En membranas vegetativas este donador de electrones reduce cit c₅₅₀ diferenciándolo del b₅₅₂, que está seguida de un pequeño hombro a 562 nm.

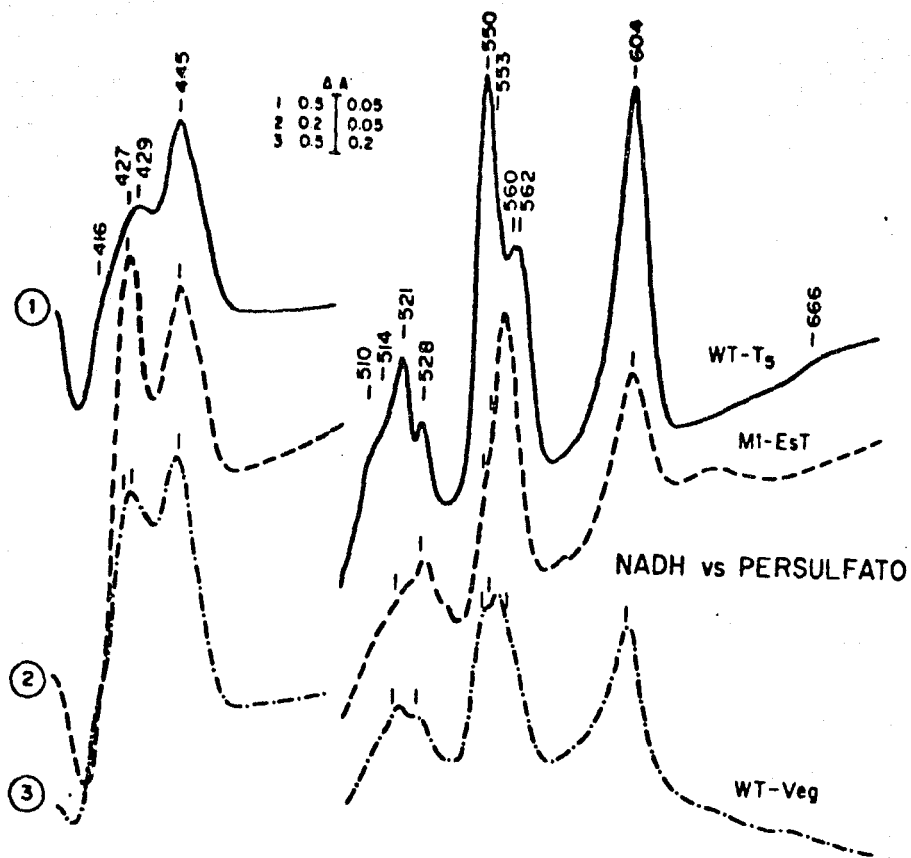


Figura 4. Espectros diferenciales (NADH-red menos ox) a baja temperatura, de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las celdas fueron preparadas como se indica en métodos: la concentración de proteína empleada para las membranas silvestres fue de 5 mg y de 10 mg para la M₁.

El espectro continuo (WT-T5) muestra la reducción de dos citocromos del tipo b que absorben a 560 nm y 562 nm (cit o).

Las membranas M_1 al ser tratadas con NADH, presentaron un patrón de reducción muy parecido al evocado por la ditionita. La comparación entre la WT-veg y la M_1 -est hace notar la total carencia de cit c_{550} de la cepa mutante, en donde sólo aparece un hombro por la reducción de cit c_{554} .

Las reducciones obtenidas cuando el sustrato fue succinato (figura 5) fueron en general muy pobres. La WT-T5 fue reducida en los citocromos c_{550} , b_{562} y a_{63} , sin que se apesie el pico para b_{555} , lo cual no ocurre en los ensayos para la WT-veg y M_1 -est, en donde además de aparecer el pico de absorción a 555 nm diferenciado del pico de c_{550} en el caso de las vegetativas y simétrico en la M_1 -est, en ambas la reducción de a_{63} es sumamente pobre, se puede estimar que fue de solamente un 30 % en vegetativas con respecto a la WT-T5 y del 20 % en el caso de la M_1 -est.

Esta reducción pobre evocada por succinato es debida a la baja capacidad donadora de electrones que tiene la deshidrogenasa succinica en el genero Bacillus (Konings 1975 , Escamilla et al 1984).

Cuando fue empleado el ascorbato como donador de electrones, (figura 6) las reducciones que se presentaron fueron las de los citocromos g y los citocromos que actuan como oxidases terminales, cit a_{63} y cit g que absorbe a 562 nm. Cuando se trataron las membranas M_1 -est con este sustrato, el pico a 555 nm que con otros reductores se definía perfectamente, se presenta

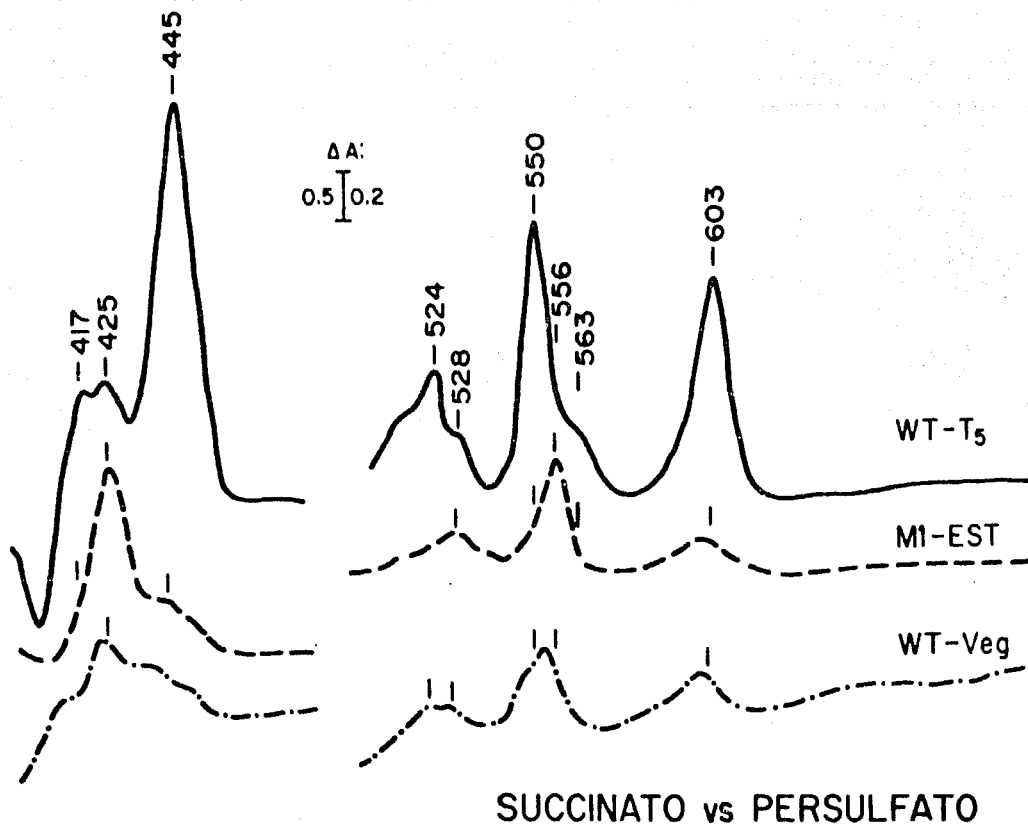


Figura 5. Espectros diferenciales (succinato-red menos ox) a baja temperatura de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las membranas (5 mg de proteína en las silvestres y 10 en la M₁) fueron mezcladas con succinato 20 mM obteniendose reducciones muy pobres en todos los casos.

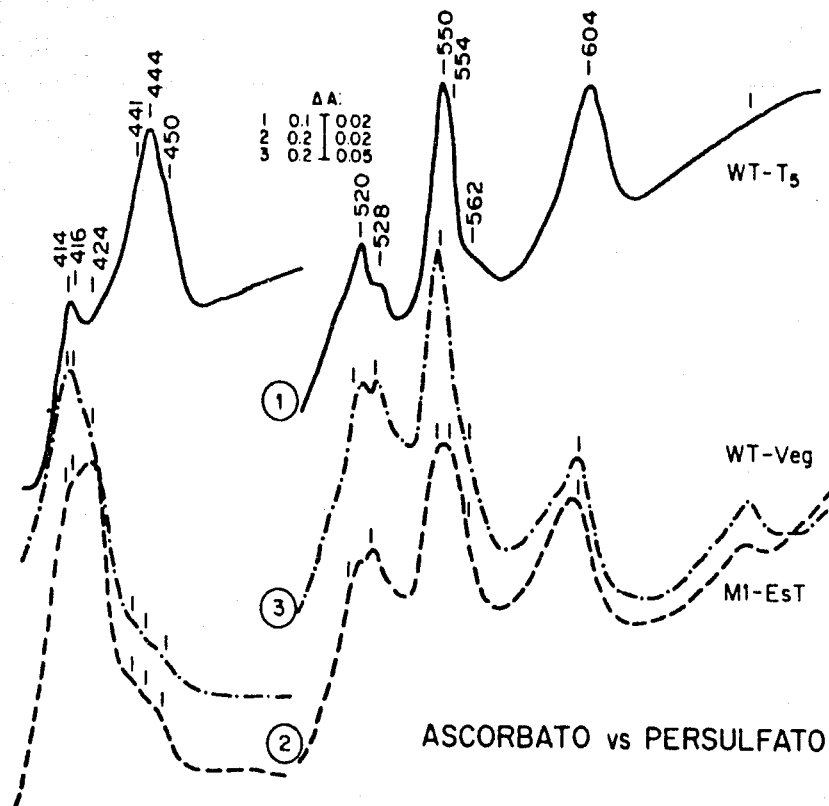


Figura 6. Espectros diferenciales (ascorbato-red menos ox) a baja temperatura de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las membranas (5 mg de proteína para las silvestres y 10 mg en la M₁) fueron mezcladas con 25 μ l de ascorbato 0.8 M, observándose una reducción muy pobre del citocromo b ya que los electrones son donados directamente a citocromo c.

solo como un ensanchamiento en la parte superior.

En las reducciones realizadas con ascorbato+TMPD (figura 7) se presentan el cit c_{520} y el aa_3 de las membranas WT-15 totalmente reducidos, desapareciendo nuevamente el b_{522} . En el caso de la WT-veg hay reducción tanto del c_{520} como del b_{522} apareciendo dos picos definidos, que son seguidos por el hombro correspondiente a la absorcion del cit b_{562} . En los espectros evocados por la reduccion de membranas M_1 solamente se aprecian los citocromos b_{522} y aa_3 , sin que exista evidencia de citocromo c en el trazo.

Las membranas de la cepa silvestre en las diferentes edades muestran elevada reduccion de cit aa_3 , formando picos que sobrepasan o igualan los picos correspondientes a los citocromos b y c. Este comportamiento no se observa en la M_1 -est, en estas membranas la reduccion de cit aa_3 mantiene una relacion constante con respecto al resto de los picos de absorcion.

Identificación de citocromos oxidasas. Los citocromos que encontramos en la parte terminal de la cadena respiratoria, son conocidos como oxidasas, ya que reaccionan con oxigeno; estos citocromos son capaces de formar complejos con monóxido de carbono, cuando las preparaciones membranales son reducidas con ditionita o sustratos naturales y burbujeadas vigorosamente con dicho gas.

La formación de los complejo cit-CO presentan diferente

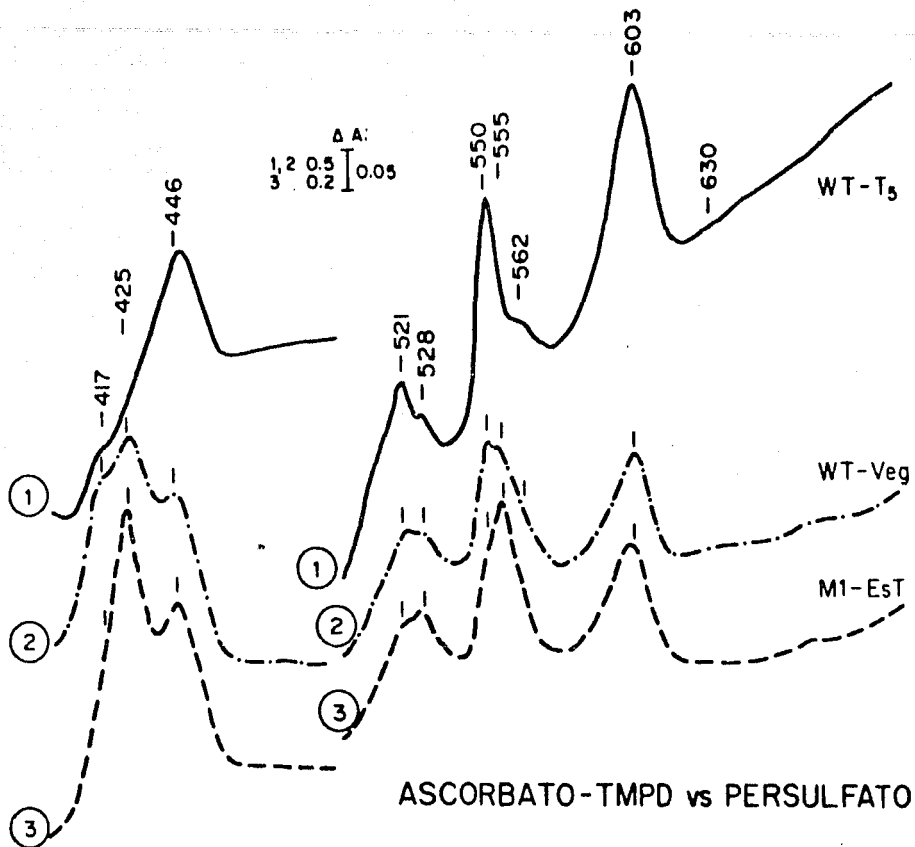


Figura 7. Espectros diferenciales (asc+TMPD-red menos ox) a baja temperatura de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. La reducción de los citocromos fue producida agregando 50 μ l de la mezcla ascorbato 0,8 M y TMPD 8,0 mM.

velocidad de formación; dicha velocidad depende de la afinidad que existe entre el grupo hemo de cada tipo de citocromo y el monóxido de carbono. El primer citocromo en acomplejarse es el a_2 que es identificado en la región del Soret por la formación de picos a 430 y 591 nm y valles a 445 y 603 nm. El segundo complejo, es el formado por el cit a , requiriéndose para su formación una mayor exposición de las membranas al monóxido (4, 10, 31) identificándose en los espectros por la presencia de un pico de absorción a 416 nm y los valles a 430 y 560 nm (figura 8).

Concentración de citocromos. Las concentraciones de citocromos fueron estimadas a partir de los espectros diferenciales (temperatura ambiente) reducido menos oxidado y reducido-CO menos reducido en donde el agente reductor empleado fue hidrosulfito de sodio (ditionita) y el oxidante el persulfato de amonio. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Las preparaciones de células vegetativas presentan en general no sólo concentraciones menores de citocromos que las preparaciones obtenidas de células esporulantes; sino que también exhiben actividades respiratorias inferiores.

En nuestras preparaciones encontramos diferencias significativas entre las preparaciones de la WT-T5 y la WT-veg siguiendo el comportamiento descrito en el acúmulo de C_{550} , E_{525} y a_2 -CO; sin embargo la concentración de cit a_2 no sigue la

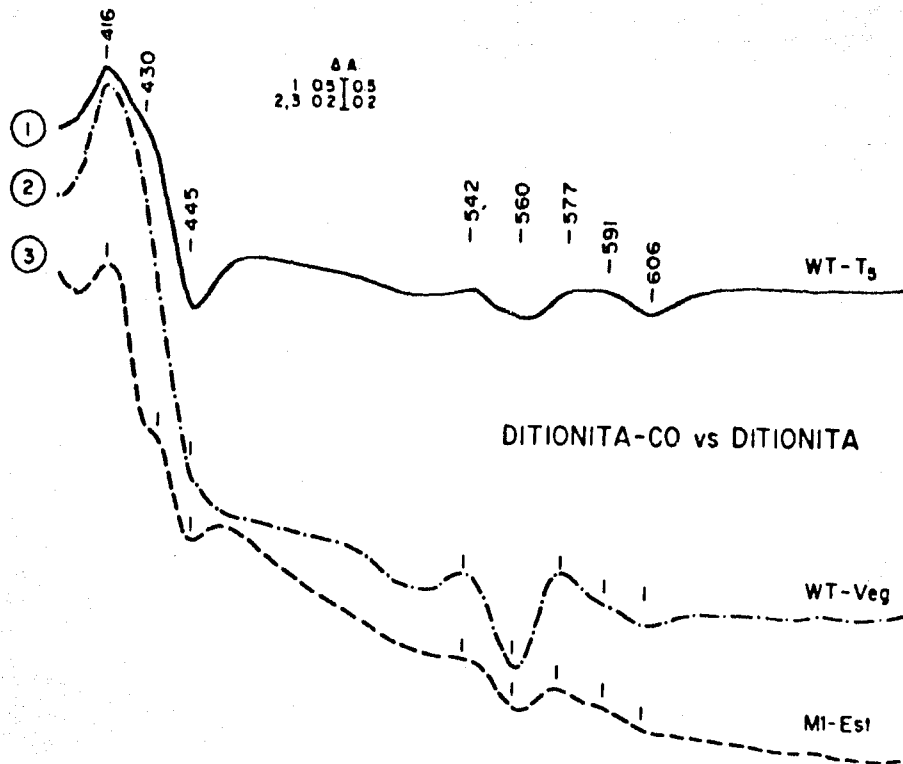


Figura 8. Espectros diferenciales con monóxido de carbono (ditionita-reducido-CO menos ditionita-reducido) a temperatura ambiente de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las membranas (9 mg de proteína para todos los casos) fueron reducidos con algunos granos de ditionita; la celda muestra fue burbujeada con monóxido de carbono como se indica en métodos. En los tres casos se aprecian los picos y valles de absorción característicos de los complejos cit a₃-CO (picos 430 y 590 nm, valles a 445 y 603 nm) y cit o-CO (pico 416 nm, valles a 430 y 560 nm).

TABLA 1

CONCENTRACION DE CITOCROMOS ASOCIADOS A PREPARACIONES
MEMBRANALES DE B. subtilis WT-T5, WT-veg y M₁-est.

citocromo	Tipo de membranas		
	WT-T5	WT-veg	M ₁ -est
c ₅₅₀	0.62	0.42	ND
b	0.55	0.47	0.36
a+a ₃	0.11	0.35	0.14
a ₃ -CO	0.33	0.11	0.13
O-CO	0.04	0.03	0.05

Las concentraciones de citocromos fueron calculadas de los espectros diferenciales (ditionita-red menos persulfato-ox) corridos a temperatura ambiente.

Para los complejos de a₃-CO y O-CO se usaron los espectros de monóxido de carbono. La concentración de citocromos se expresa como nmol por mg de proteína membranal.

Los coeficientes de extinción molecular y pares de longitud de onda empleados se señalan en métodos.

regia, encontrándose la mayor concentración de él en las células vegetativas y las más bajas en las esporulantes.

El citocromo ~~c₅₅₀~~ registró las más altas concentraciones en las preparaciones silvestres, la M₁-est no presenta este citocromo y se reporta como no detectado.

Actividades respiratorias asociadas a membranas de células WT-T5, WT-veg y M₁. Oxidasas y oxidorreductasas. En la tabla 2 se muestran las actividades específicas de los diferentes tipos de membranas. Al comparar las preparaciones WT-T5 y M₁ en su capacidad para oxidar los sustratos se observaron diferencias significativas para cada uno de los ensayos encontrándose que la actividad de la NADH-oxidasa en la WT-T5 es 1.6 veces mayor que la expresada por la cepa M₁, que coincide con los valores de la oxidorreductasa correspondiente.

Sorprende el hecho de que en la cepa M₁ a pesar de carecer de cit c y por tanto de actividad en la citc~~---₅₅₀~~, los valores para la actividad de NADH-oxidasa (M₁= 154.2 nmol min⁻¹ mg⁻¹) no son muy lejanos de los presentes en la cepa silvestre en el estado 5 (WT-T5= 242.00 nmol min⁻¹ mg⁻¹). Esto indica que la actividad transportadora de electrones en M₁ es eficientemente derivada hacia la otra oxidasa alternativa, el cit c. Mas aún la actividad de NADH-oxidasa en M₁ tiene un valor superior a la expresión de esta actividad alcanzada en la etapa vegetativa de la cepa silvestre (WT-veg= 90.41).

TABLA 2

ACTIVIDADES RESPIRATORIAS ASOCIADAS A PREPARACIONES

MEMBRANALES DE *B. subtilis* WT-T5, WT-veg y M₁- est.

Enzima	Tipo de membranas		
Oxidasas:	WT-T5	WT-veg	M ₁ -est.
NADH	242.0	90.4	154.2
Asc+TMPD	281.0	254.8	35.2
Succinato	-----	21.8	29.2
Oxidorreductasas:			
NADH:DCPIP	222.0	85.2	157.2
succinato:			
PMS-DCPIP	38.1	86.6	176.0

Las células vegetativas fueron cosechadas en A₅₄₀=2.4; las de estado 5 de esporulación, cinco horas después de terminado el crecimiento y las M₁ durante la etapa estacionaria.

Las actividades específicas para las oxidorreductasas están expresadas como nmol (min. mg proteína)⁻¹ y como ng átomo O₂ (min. mg proteína)⁻¹ para las oxidasas.

La actividad succinato-oxidasa para los diferentes tipos de membranas fueron bajas con respecto a las actividades registradas al utilizar NADH o ascorbato-TMPD; el caso más drástico fue el observado en las membranas de células esporulantes, en donde no fue posible registrar actividad. Las dos preparaciones restantes si presentan actividad para oxidar succinato utilizando oxígeno como aceptor final, sin embargo, coincidiendo con los datos reportados por Konings (23) para B. subtilis y con otros autores para B. cereus y B. thuringiensis (11, 16), la actividad de la succinato oxidorreductasa alcanza valores más altos para cada caso en comparación con las oxidasas.

La actividad citocromo c-oxidasa, en general, se presenta con valores altos ya que el sustrato empleado, ascorbato-TMPD, dona los electrones al cit c₅₅₀ de donde son transferidos a las oxidasas terminales.

Las membranas silvestres T5 y vegetativas alcanzan valores que sobrepasan la actividad de la NADH-oxidasa; en tanto que la cepa M₁, seleccionada por presentar un fenotipo NAD⁻ que denota incapacidad como aceptor de electrones a partir de asc-TMPD, exhibió una muy baja actividad para este sustrato, alcanzando solamente un 13 % de la actividad presente en las membranas WT-T5, en donde el cit c₅₅₀ es el más abundante.

Efecto de inhibidores respiratorios. Anteriormente se comentó que las oxidasas terminales bacterianas podrían distinguirse

por una diferente sensibilidad al KCN. Así, la citocromo oxidasa aa_3 es la más sensible, mientras que la inhibición de la oxidasa g y específicamente la inhibición de la oxidasa d requieren de concentraciones de KCN considerablemente mayores (Escamilla y Benito, 1984). Al considerar que el mutante M₁ carece de cit g y por tanto de la función de la vía más sensible, era interesante comparar la cinética de inhibición por cianuro en esta cepa y la silvestre.

Para realizar las cinéticas de inhibición por cianuro, hay que considerar que el sistema respiratorio puede estimularse con NADH (NADH-oxidasa) o con la mezcla artificial de asc+TMPD (TMPD-oxidasa). Debido a que la actividad de la NADH-deshidrogenasa es el paso limitante en la secuencia de transporte de electrones (Escamilla y Benito, 1984) y que los electrones donados por NADH tendrán acceso a todas las oxidasas terminales, entonces el KCN no estará titulando la actividad de la vía sensible sino que, titulará la sensibilidad de la actividad combinada de la vía sensible más la no sensible y de esta manera, el KCN actuará como un interruptor que al cancelar el flujo de electrones por una vía sensible, activa su transporte por la vía no sensible. En contraste con lo anterior, el TMPD dona electrones al citocromo g y con esto activa de manera cuasi específica el transporte de electrones hacia la citocromo oxidasa aa_3 que, por ser el componente más sensible a KCN, deberá resultar de una inhibición significativamente mayor a la obtenida cuando

el NADH es el sustrato oxidable.

En la figura 9 se puede apreciar que el KCN inhibe de manera parcial la actividad de NADH-oxidasa en las membranas de WT-veg, WT-T5 y M₁-est. Este efecto parcial es debido, como ya se comentó, al hecho de que el KCN a bajas concentraciones cancela el flujo de e⁻ por la vía sensible sin afectar el transporte por la vía poco sensible. Desde el punto de vista cuantitativo es claro que las membranas de WT-veg son significativamente más sensibles que las membranas del mutante M₁, y esto debido a que M₁ carece de la función de la vía de alta sensibilidad cit c₁-aa₂.

En el caso de las membranas WT-T5 el KCN tiene un efecto muy parecido al observado para la mutante M₁, pareciendo a primera vista, que la cepa silvestre en la etapa esporulante carece de vía sensible a KCN, sin embargo, en este caso la capacidad de transporte de electrones de la vía poco sensible es suficiente para satisfacer el transporte de electrones promovido por NADH. Apoyando la tesis anterior, observamos que cuando se usa asc+TMFD (figura 10) como donador de electrones, el cianuro actúa como un inhibidor poderoso que cancela el flujo de electrones a concentraciones relativamente bajas (< 200 M). En el caso de las membranas de WT-T5 este efecto es dramático, se obtiene la total inactivación a concentración de KCN de 200 µM. Esta sensibilidad alta es un reflejo de una gran actividad catalizada por la citocromo oxidasa aa₂, este juicio se apoya en la relación de contenido entre el cit aa₂ y cit c₁ (medido como complejo c₁-

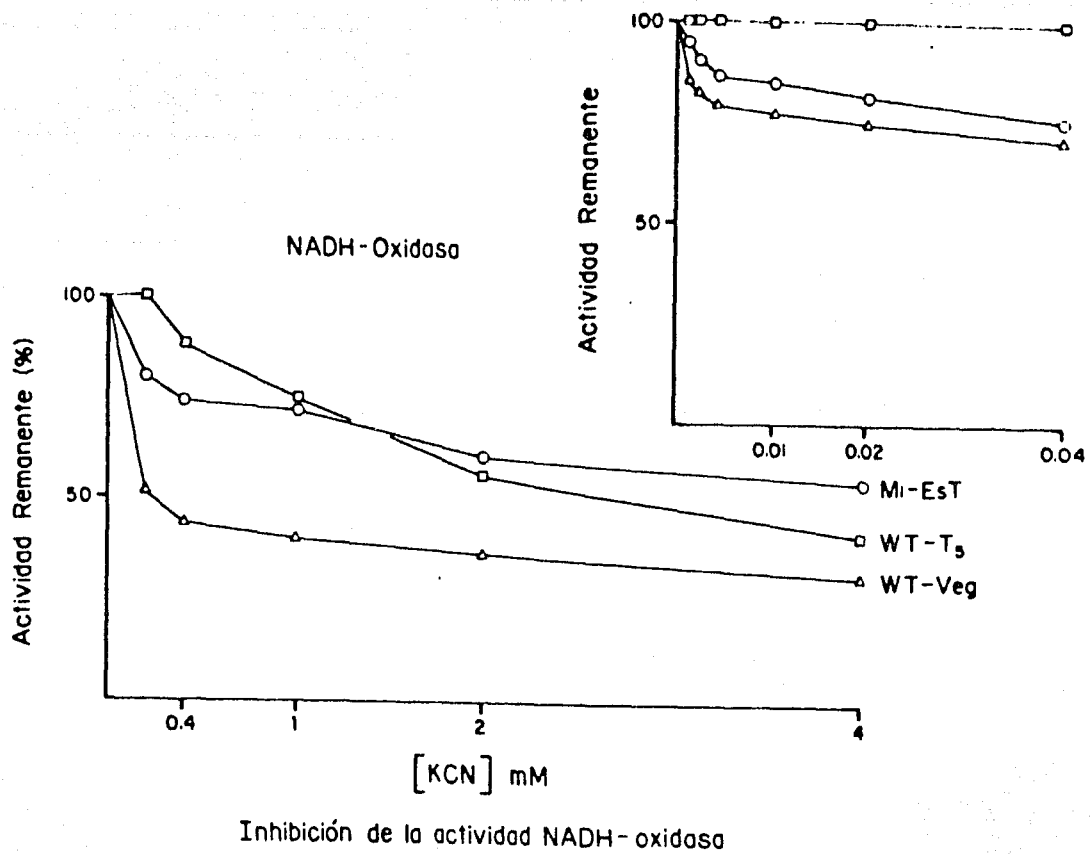
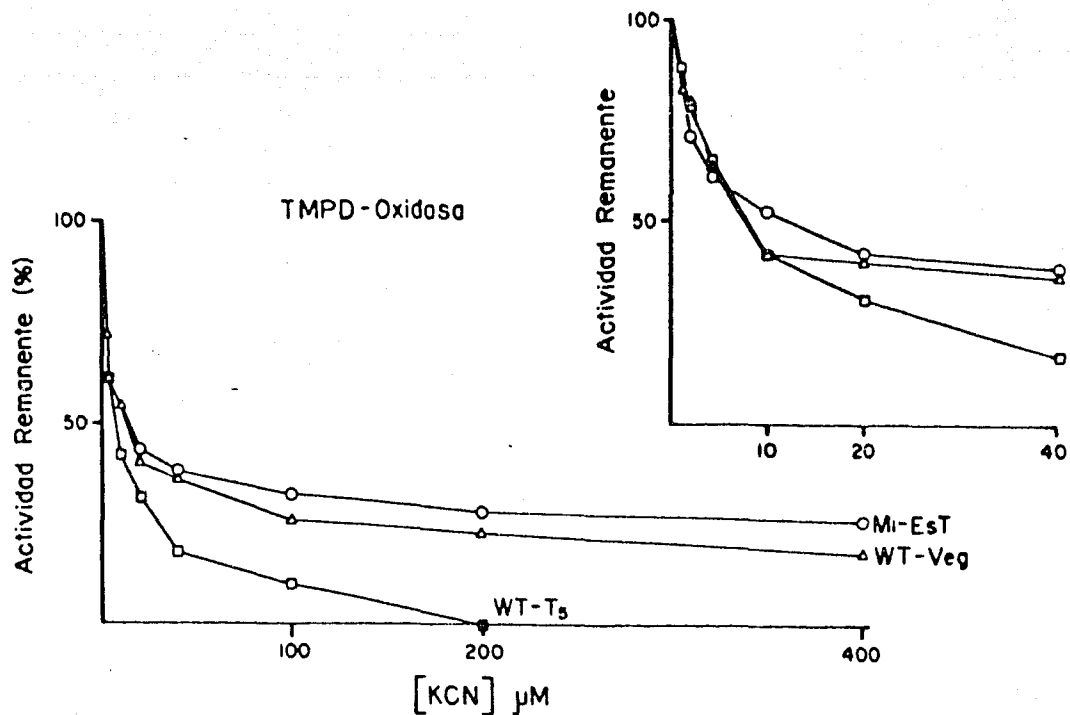


Figura 9. Efecto inhibitorio del cianuro de potasio (KCN) sobre la actividad NADH-oxidasa de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las membranas se pusieron en 2.5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, a 30°C; la reacción para cada ensayo se inició agregando NADH 0.5 mM, adicionando las concentraciones de inhibidor indicadas.

Actividades basales: WT-T5 = 242 n At O₂ /min/mg, WT-veg = 90.4 n At O₂ /min/mg y M₁-est = 154 n At O₂/min /mg.



Inhibición de la actividad TMPD-oxidasa

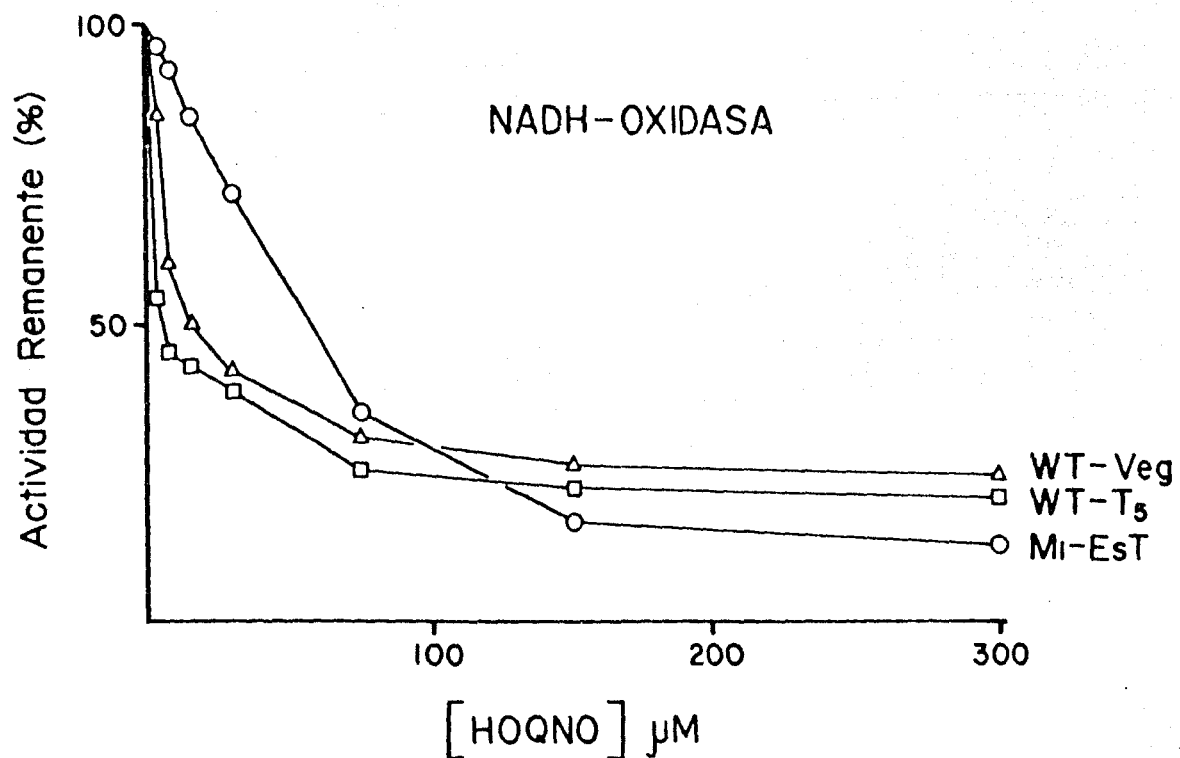
Figura 10. Efecto inhibitorio del cianuro de potasio (KCN) sobre la actividad TMPD-oxidasa de membranas WT-T5, WT-veg y M1-est. Las membranas se pusieron en 2.5 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.8 a 30°C, las reacciones para cada ensayo se iniciaron adicionando 50 μl de ascorbato 0.8 M + TMPD 8.0 mM.

Actividades basales: WT-T5 = 281 n At O_2 /min/mg, WT-veg = 254.8 n At O_2 /min/mg y M1-est = 35.2 n At O_2 /min/mg.

CO y ρ -CO, tabla 1) donde la relación $[\text{a}_2\text{-CO}] / [\rho\text{-CO}] = 8$.

Por otro lado, en el caso de las membranas de WT-veg y M_1 -est el contenido de a_2 es significativamente menor siendo la relación $[\text{a}_2\text{-CO}] / [\rho\text{-CO}] = 3.5$ para WT-veg y 2.5 para M_1 -est.

Así en estos dos casos la respiración catalizada por el cit a_2 representa una proporción menor de la actividad total y esto, se ve reflejado en la inhibición incompleta que ejerce el cianuro, sobreviviendo al rededor del 25 % de la actividad a concentraciones de KCN hasta 400 μM . Es interesante hacer notar que el mutante M_1 a pesar de que no tiene cit ρ es todavía capaz de oxidar la mezcla asc-TMPD. Este resultado esta de acuerdo con experimentos realizados por DeVriej et al (8) con la oxidasa a_2 purificada de *B. subtilis*. En esta preparación el autor demostró que la oxidasa en ausencia del cit ρ es capaz de oxidar asc-TMPD aunque con una eficiencia bastante menor, situación que también ocurre en las membranas de nuestro mutante M_1 pues su actividad especifica sobre asc-TMPD (tabla 2) es de sólo 35.2 n at O_2 (min/mg proteina)⁻¹ comparado con las actividades en WT-veg que es de 254 n at O_2 (min/mg proteina)⁻¹. Otros inhibidores probados fueron la hidroxiquinoleina-N-óxido (HOQNO) y la antimicina A; ambos inhibidores tienen su acción sobre el sitio II, esto es el sector $\text{b} \rightarrow \text{c}$ de la cadena respiratoria. El HOQNO tiene un efecto similar para las tres preparaciones (NADH-oxidasa) y esto debido a que afecta un componente común y que es igualmente limitante en la cinética de



Inhibición de la actividad NADH-oxidasa

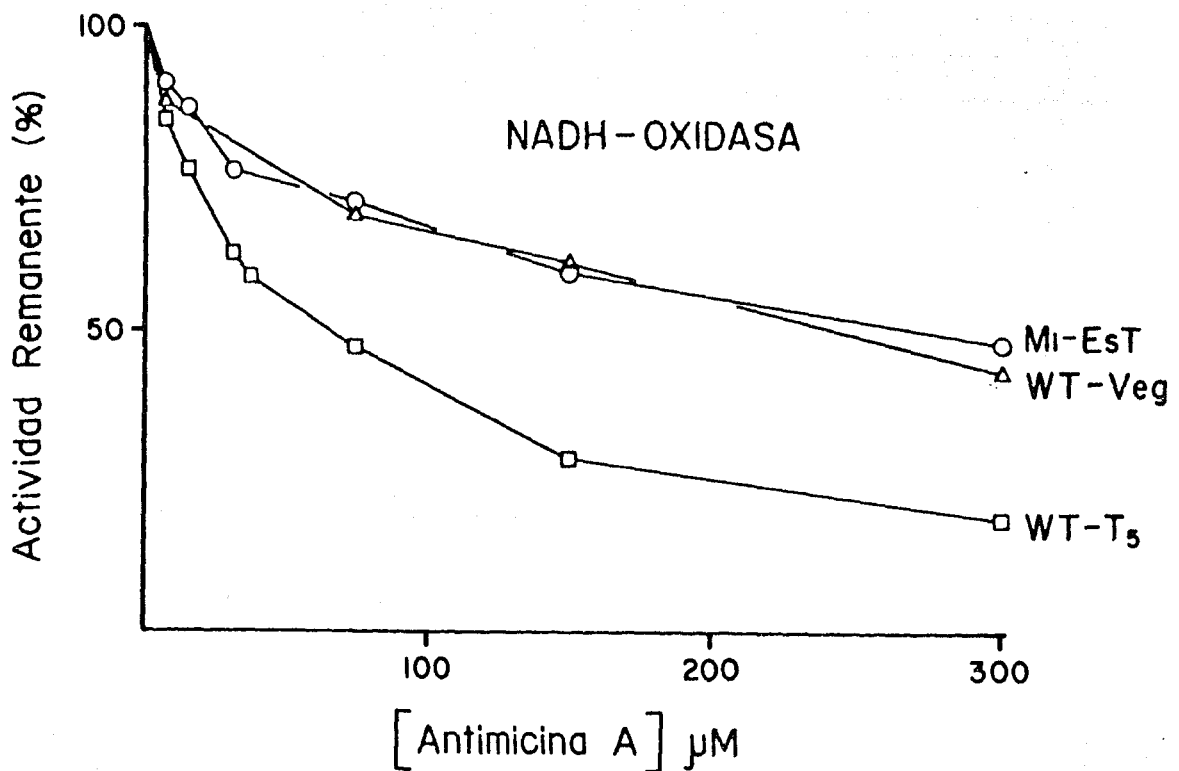
Figura 11. Efecto inhibitorio del HOQNO sobre la actividad NADH-oxidasa de membranas WT-T₅, WT-veg y M₁-est. Las membranas se pusieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 a 30°C; las reacciones para cada ensayo se iniciaron agregando NADH 0.5 mM, adicionando las concentraciones del inhibidor indicadas.

Actividades basales: WT-T₅ = 242 n At O₂ /min/mg, WT-veg = 90.4 n At O₂ /min/mg y M₁-veg = 154 n At O₂ /min/mg.

transporte de electrones de los tre tipos de membranas. El punto de inhibición se encuentra previo a la mutación descrita para M_1 y por tanto afecta la actividad de manera similar.

En el caso de la antimicina A se obtuvo un resultado un tanto inesperado ya que el inhibidor fue significativamente más eficiente sobre las membranas de WT-T5 que contra las membranas WT-veg y M_1 -est. Respecto a este inhibidor sabemos (Jaramillo tesis en preparación) que su sitio de acción es diferente y posterior al sitio que inhibe el HQQNO. De esta manera, es probable que el componente inhibido por antimicina A sea cinéticamente limitante en las membranas WT-T5 y por esta razón sea más sensible a bajas concentraciones del inhibidor.

Fotoinactivación de la menaquinona. El analisis de la cinética con inhibidores respiratorios, reveló que los inhibidores del sitio II son más efectivos que los inhibidores del sitio I (estos datos no se presentan) y que el cianuro sobre la actividad NADH-oxidasa; Estos datos concordaban con el esquema respiratorio propuesto por Miki et al (27) en el cual se considera que los electrones donados por NADH pueden ser cedidos directamente a un citocromo del tipo c, sin requerir de la participación de menaquinona; por otra parte Tohicupo (35) propone que la respiración CN-resistente podía depender de la autooxidación de la NADH-deshidrogenasa (respiración flavina), que deja fuera la participación de menaquinona y citocromos. Sin



Inhibición de la actividad NADH-oxidasa

Figura 12. Efecto inhibitorio de Antimicina A sobre la actividad NADH-oxidasa de membranas WT-T₅, WT-veg y M₁-est. Las membranas fueron puestas en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 a 30°C; las reacciones fueron iniciadas adicionando NADH 0.5 mM y agregando las concentraciones indicadas del inhibidor.

Actividades basales: WT-T₅ = 242 n At O₂ /min/mg, WT-veg = 90.4 n At O₂ /min/mg y M₁-est = 154 n At O₂ /min/mg.

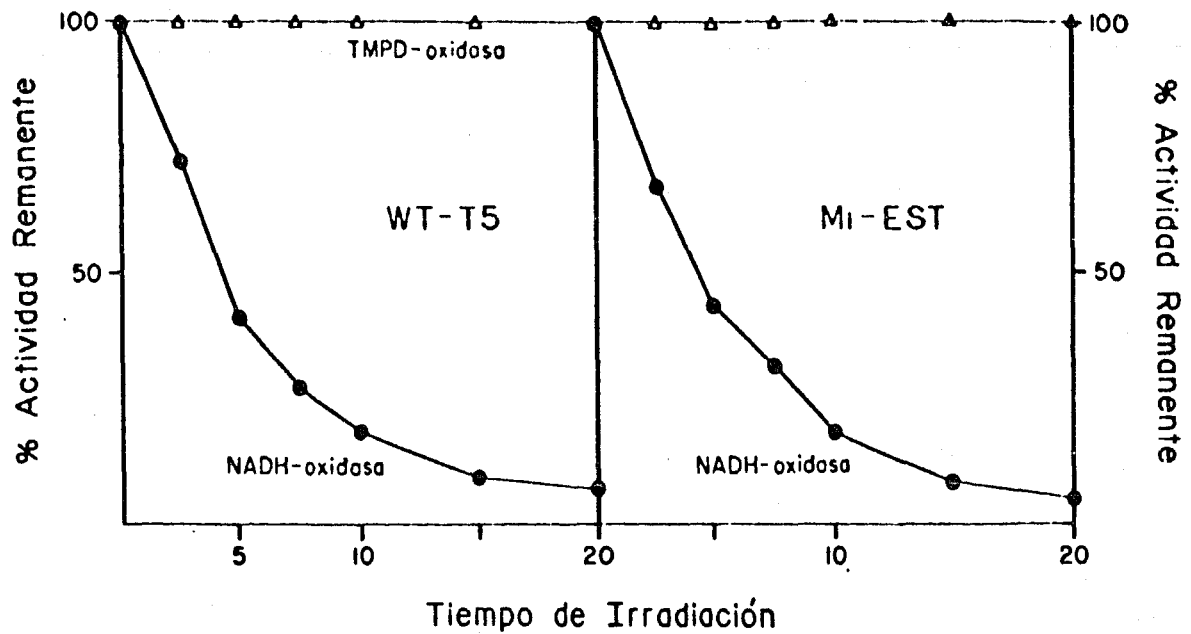


Figura 13. Efecto de la irradiación con luz ultravioleta sobre las actividades NADH y asc-TMPD-oxidasa de membranas WT-T5, WT-veg y M₁-est. Las membranas (10 mg de proteína) fueron irradiadas durante 20 minutos midiendo la actividad remanente de las oxidasas TMPD y NADH en los tiempos indicados.

Las actividades de las oxidoreductasas (NADH y succinato) fueron estimadas antes y después de la irradiación, sin presentar diferencias en los valores resultantes.

embargo estudios realizados en B. cereus (Escamilla, 1984) muestran que la funcionalidad de la menaquinona es indispensable para que se lleva a cabo el transporte de electrones cuando los donadores son sustratos fisiológicos (NADH y succinato).

En nuestros ensayos, al irradiar las membranas con luz ultravioleta, la respiración NADH-dependiente fue totalmente abolida despues de 20 minutos de tratamiento, afectando de igual manera la actividad de succinato-oxidasa.

La irradiación con luz ultravioleta parece tener efecto específico sobre la menaquinona ya que no se manifiesta ningún cambio sobre la actividad de la citocromo c-oxidasa, así como tampoco son alteradas las actividades específicas de las deshidrogenasas.

Espectros dinámicos en presencia de KCN. Los espectros que a continuación se describen fueron diseñados para visualizar por espectroscopia diferencial el efecto que tiene el KCN a concentraciones crecientes sobre la oxidación de los citocromos del sistema respiratorio de B. subtilis. La técnica consiste en llevar las preparaciones a la anaerobiosis con sustrato (NADH) y en ese estado congelar a 77 K la muestra colocada en la celda experimental, así se puede atrapar el estado de máxima reducción (sustrato + anaerobiosis). Por otro lado el contenido de la celda de referencia en el estado anaerobio se congela sólo después de que el medio se hace aeróbico por medio de agitación

vigorosa con un vortex, en ese instante la celda de referencia, ahora aeróbica es congelada a 77 K dejando ver los citocromos en un estado de reducción considerablemente menor al de la celda experimental anaeróbica. Si esta técnica se aplica en presencia de cianuro, entonces podemos ver, en forma de picos, aquellos citocromos que se oxidan (no inhibidos) aun en presencia de cianuro.

En la figura 14, vemos que al aplicar esta técnica a las membranas de WT-T5, en ausencia de cianuro (trazo a) todos los citocromos son oxidados en la celda aeróbica. Podemos distinguir picos a 550 nm (cit c), 553 nm (cit c_1), 560 y 562 (cits e) y 603 nm (cit aa_3).

Cuando el mismo experimento se hace en presencia de KCN 100 μ M (trazo b), el nivel de oxidación de cit c (550 nm) y aa_3 (603 nm) baja de manera significativa, lo que implica que a esta baja concentración el KCN ya tiene un efecto inhibitor importante sobre la vía c_{aa_3} . Es interesante el hecho de que como resultado de la interacción entre el CN y el cit a_3 aparece un nuevo pico a 592 nm, lo que es prueba indiscutible de la interacción entre CN^- y cit a_3 .

Las concentraciones mayores de cianuro (250 μ M, trazo c y 1 mM trazo d) reducen aún más el nivel de oxidación del cit c y el de aa_3 , hasta el punto en que a 1.0 mM prácticamente no hay oxidación del cit c y del aa_3 , quedando evidente el pico de interacción entre CN^- y a_3 a 592 nm.

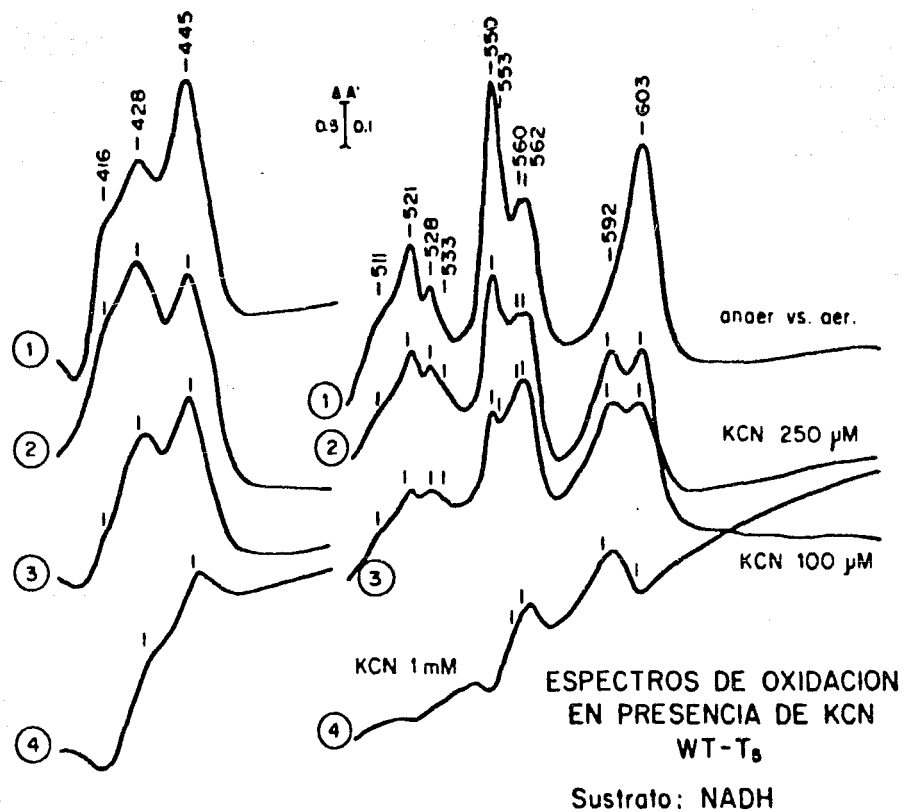


Figura 14. Espectros dinámicos (anaeróbico menos aeróbico) de membranas de *B. subtilis* WT-T5 reducidas por NADH en presencia de cianuro a diferentes concentraciones.

El trazo 1, es el diferencial de NADH (red menos ox) sin KCN, empleado como control para comparar los efectos que tiene el cianuro sobre la oxidación de los citocromos. En los trazos experimentales se aprecia la disminución en la oxidación de los citocromos c y aa₃ principalmente, y la formación de un complejo cit aa₃-KCN que absorbe a 592 nm.

En el caso de cit o (562 nm) su oxidación no se afecta por las concentraciones de KCN de 100 y 250 μ M (trazo b y c) y solo a 1 mM (trazo d) es evidente el bloqueo en su oxidación.

Los datos anteriores permiten concluir que la oxidasa de alta sensibilidad a KCN en B. subtilis es precisamente la oxidasa aa₂ mientras que la oxidasa g requieren concentraciones cercanas a 1.0 mM para ser bloqueada su oxidación. Estos datos están de acuerdo con resultados previos de Escamilla y Benito (1984) en B. cereus.

DISCUSION

Estudios previos en B. subtilis y otras especies del género Bacillus (20, 10) indican que este grupo bacteriano posee un sistema respiratorio complejo formado por vías alternativas de citocromos, las cuales pueden ser distinguidas por su sensibilidad al CN^- . Los resultados descritos en la presente tesis confirman y añaden información sobre la composición, organización y regulación de las vías respiratorias de B. subtilis M-168.

Durante la introducción comente sobre la gran diversidad bioquímica existente entre las bacterias, aún pensando entre especies del mismo género. En el caso del género Bacillus, y específicamente en lo que se refiere a su sistema respiratorio, podemos apuntar diferencias importantes en su composición y expresión genética: Bacillus subtilis (presente tesis) y Bacillus thuringiensis (14) poseen un sistema respiratorio aeróbico formado por dos oxidasas terminales, el cit g y el cit aa₃, la última con gran sensibilidad al KCN . B. cereus por otro lado, representa un caso muy interesante en donde encontramos tres oxidasas terminales, cit g, cit aa₃ y cit g, ésta última, no presente en B. thuringiensis y B. subtilis, posee una alta resistencia al CN^- así como una alta afinidad por el oxígeno (10^{-7} M), siendo precisamente esta gran afinidad lo que define su patrón de regulación ya que se expresa en B. cereus cuando la

tensión de O_2 es muy baja o bien, cuando existen dificultades para crecer (mala fuente de carbono, presencia de inhibidores respiratorios como KCN, etc).

En lo que respecta al citocromo c podemos hacer otra agrupación entre las tres especies en discusión: Los diferentes estudios realizados en estas especies han demostrado la presencia de cuando menos un citocromo del tipo c en todas ellas. Por medio de ensayos espectroscópicos y electroforéticos muestran claramente que en B. subtilis la cadena de transporte de electrones esta compuesta por dos citocromos c que absorben a 550 y 554 nm (9, 26, 27 y esta tesis). Para B. cereus y B. thuringiensis sólo ha sido posible la identificación espectroscópica del cit c_{550} (Escamilla et al 1984, 1986, 1987 y Garcia, 1987). Los ensayos de purificación e identificación en electroforesis por la tinción con 3,3',5,5',-tetrametil bencidina no han permitido establecer la presencia de otro citocromo del tipo c (Contreras, comunicación personal).

Con respecto a la regulación del cit c_{550} , común a las tres especies, existen diferencias importantes: mientras este citocromo es expresado en cantidades significativas durante el crecimiento logarítmico aerobio de B. cereus (14) y B. thuringiensis (16), en el caso de B. subtilis encontramos que su expresión no ocurre o cuando menos está por debajo de la detección espectroscópica, durante el crecimiento vegetativo (fig 2). No es, si no hasta el final del crecimiento y durante

la esporulación que pudimos detectar cantidades considerables de cit C₅₅₀ (figura 2), y esta aparición del cit C₅₅₀ ocurre concomitantemente con una elevación significativa del cit aa₃ (fig 2).

Lo anterior nos indica que la vía formada por cit C₅₅₀ aa₃ se expresa en E. subtilis, de manera preferencial durante la esporulación y con ello es evidente que la respiración se hace mas sensible a CN⁻, especialmente este cambio es claro cuando el sustrato oxidado es la mezcla artificial asc+TMFD que como ya comente, estimula de manera preferencial la utilización de la vía cit C₅₅₀ aa₃. Entonces, durante la etapa vegetativa la respiración es mayormente derivada hacia la citocromo oxidasa o, que siendo mas resistente al CN⁻, es responsable de la mayor resistencia de las células vegetativas (figuras 9 y 10) a este inhibidor.

En años recientes se han descrito una gran variedad de bacterias esporoformadoras aisladas de ambientes extremos y organismos hospederos, creando gran controversia desde el punto de vista taxonómico y entre las relaciones filogenéticas existentes entre las especies agrupadas dentro del género Bacillus. Como características comunes podemos apuntar su propiedad de crecimiento facultativo, esto es, pueden crecer en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (Norris, 1981), formando endosporas cuando las condiciones medioambientales no son favorables para mantener la tasa de crecimiento poblacional,

permitiendo su propagación a otros ambientes menos hostiles. Esta propiedad ha sido la que más ha llamado la atención tanto de microbiólogos como de ecólogos y genetistas, por ser esta característica la que ha permitido una distribución cosmopolita de ellas.

Encontramos especies con capacidad para formar esporas dentro de los generos más diversos por ejemplo Bacillus, Sporosarcina, Clostridium, etc (Norris 1981). Así debido a la gran diversidad de especies esporoformadoras, ahora se juzga difícil considerar esta capacidad como suficiente para considerar a una bacteria dentro del género Bacillus.

Con respecto de las tres especies discutidas, se ha considerado que filogenéticamente, se encuentran más emparentadas B. cereus y B. thuringiensis que B. subtilis. De hecho, durante mucho tiempo se consideró que B. thuringiensis representaba una variedad de B. cereus var alesti. Desde el punto de vista microbiológico B. cereus y B. thuringiensis son muy parecidas en sus requerimientos nutricionales y fisico-químicos para el crecimiento en laboratorio, sin embargo exhiben en su desarrollo silvestre, una diferencia fundamental entre ellas, dado que B. cereus es una bacteria de vida libre con capacidad patógena solo como parásito secundario (oportunista) inespecífico, ya que no presenta mecanismos de invasibilidad para traspasar las barreras primarias de defensa de ningún posible hospedero mientras que B. thuringiensis es un parásito facultativo específico de

lepidópteros y dípteros, para lo cual han tenido que desarrollar una estrategia bioquímica especializada para traspasar las barreras de defensa del organismo hospedero, permitiendo la invasión e infección del homocelo o cavidad del cuerpo.

Es de esperar que la adaptación a la vida parasítica haya dado como consecuencia el desarrollo de patrones metabólicos específicos que permiten la invasividad de tejidos, obteniéndose características que la diferencian fisiológicamente de B. cereus alejan su parentesco filogenético.

La evolución hacia una condición de vida parasítica implica cambios bioquímicos que lleven a ganar la capacidad para infectar y establecerse en un hospedero específico. Hay que considerar que el ambiente que rodea a un parásito está sujeto a pocos cambios en el contenido de nutrientes y tensión de oxígeno, con esto una bacteria parásita como Bacillus thuringiensis no está expuesta a la dramática variación ambiental a la que está sujeta una bacteria de vida libre como B. cereus que durante su crecimiento puede experimentar cambios en la tensión de oxígeno que van desde la anaerobiosis hasta la aerobiosis.

Estos dos estilos de vida muy diferentes van a exigir de B. cereus un mayor potencial adaptativo como sería la capacidad para expresar una oxidasa con alta afinidad por el oxígeno, la oxidasa d, que permite el crecimiento en condiciones microaerofílicas. En cambio, B. thuringiensis que goza de condiciones más constantes y suficientes en la tensión de oxígeno

no requeriría mantener la capacidad genética para expresar citocromo d y probablemente la ha perdido durante su evolución a la vida parasítica.

La presente tesis en B. subtilis complementa información previa descrita para B. thuringiensis (16) y B. cereus (12) sobre la composición, organización y regulación de sus sistemas respiratorios. Los resultados comparativos de las tres especies muestra diferencias importantes en la composición de citocromos y en su regulación durante el crecimiento. Las tres especies muestran diferencias importantes entre si, lo que las hace únicas en cuanto a la composición de citocromos: sólo B. subtilis posee cit c₅₅₄, sólo B. cereus posee cit d y sólo B. thuringiensis carece de ambos citocromos: cit c₅₅₄ y cit d. Es evidente que estas características podrían ser útiles en la distinción de las tres especies, sin embargo estos datos aislados no permiten establecer una cercanía filogenética. Estudios previos sobre la taxonomía de estas tres especies han sugerido que B. cereus y B. thuringiensis estén más cercanamente emparentados que B. subtilis con cualquiera de las dos primeras especies. Esta propocición puede ser aceptada si consideramos que la capacidad del B. thuringiensis para expresar cit d ha sido perdida en el curso de su adaptación a la vida parasítica.

Con respecto al mutante (M₁) aislado y parcialmente caracterizado en la presente tesis, podemos afirmar que se trata de un mutante deficiente en cit c₅₅₀; la mutación en apariencia,

es específica y radica en el gene estructural para el cit c₂₈₀; esta afirmación se basa en el hecho de que sólo se observó la ausencia o cuando menos la disminución dramática de este citocromo sin que en apariencia estuvieran afectados los niveles de los demás citocromos (tabla I). Una mutación de tipo regulatoria, esto es, en un gene o grupo de genes que controlan la síntesis de citocromos causaría la disminución de más de una especie, por ejemplo, eliminación simultánea de los niveles de citocromos b, c y a₂₈. Estudios sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de citocromos han demostrado que actúan de manera coordinada sobre la síntesis de grupos de ellos. Por ejemplo el crecimiento anaeróbico reprime la síntesis de citocromo c y a₂₈ de manera coordinada e incrementa la síntesis de citocromos del tipo b. El crecimiento en fuente de carbono fermentable como la glucosa, que produce represión catabólica debido al incremento de intermediarios de la glucólisis (17) también causa represión general del sistema de citocromos. Cuando la fuente de carbono fermentable se agota, entonces se observa un incremento generalizado en la síntesis de todos los citocromos como ocurre en la transición célula vegetativa a célula esporulante en las especies aeróbicas de Bacillus (14). En otra conclusión, cuando el crecimiento se realiza en medios microaerofílicos (B. cereus) se observa la síntesis incrementada de cit c y la disminución concomitante de citocromos c y a₂₈. El mutante M, bajo todas las condiciones de crecimiento

ensayados y en todos los estadios de crecimiento mostró el patrón de expresión de citocromos esperado pero sólo el cit c₅₅₀ estuvo ausente en toda condición descrita.

Es interesante mencionar que la ausencia del cit c₅₅₀ causa una disminución considerable en la capacidad para oxidar la mezcla de ascorbato-TMPD y esto debido a que el cit c₅₅₀ es necesario para el transporte de electrones catalíticamente eficiente hacia la oxidasa a₂₃. Así en ausencia de cit c₅₅₀ el cit a₂₃ tiene una capacidad residual para oxidar asc-TMPD. Es notable el hecho de que aún en ausencia de cit c₅₅₀ todavía se siguen sintetizando e incorporando a la membrana cantidades cuasi normales de cit a₂₃ (tabla 1). Esto nos sugiere que no hay un requerimiento de cit c₅₅₀ en la síntesis y ensamble a la membrana de cit a₂₃.

La ausencia de cit c₅₅₀ no sólo se ve reflejada en una disminución de la capacidad respiratoria (tabla 2) sino que también provoca un cambio cualitativo en la susceptibilidad de la respiración al inhibidor KCN. La cepa silvestre medida en su actividad de TMPD-oxidasa siempre fue más sensible a cianuro que la misma actividad en la cepa M₁ (Figuras 9 y 10). Este comportamiento se puede explicar si consideramos que la vía formada por cit c₅₅₀ --- a₂₃ no es funcional en el mutante M₁ (por ausencia de cit c₅₅₀) y entonces la actividad residual de TMPD-oxidasa estaría a cargo de el cit g, el cual ha sido demostrado que es significativamente más resistente al KCN (Escamilla et al, 1986).

En cuanto a la propiedad de crecimiento y esporulación del mutante M_1 es claro que la falta de cit c_{550} no afecte de manera significativa el crecimiento y por otro lado los cultivos esporulan normalmente en los tiempos y con los rendimientos esperados. Esto nos dice que la función de la vía cit c_{550} --- aa_3 es eficientemente suplida por la función incrementada de la oxidasa cit c , la oxidasa alternativa de *B. subtilis*. Estos resultados están en contra de lo reportado por el grupo de Taber (33) quien, como ya se comentó, con base en mutantes con defectos generalizados en el sistema de citocromos, llegó a la conclusión de que la oxidasa aa_3 es indispensable para la esporulación. Nuestro mutante M_1 careciendo específicamente de cit c_{550} tampoco tiene actividad de cit aa_3 -oxidasa y sin embargo crece y esporula normalmente. Estos resultados están de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Trabajo en preparación) en cepas mutantes de *B. cereus* con carencia específica de cit aa_3 . Estos mutantes cit aa_3^- de *B. cereus* tienen propiedades semejantes a las descritas en esta tesis para el mutante M_1 de *B. subtilis*.

En lo futuro sería deseable intentar el aislamiento de mutantes de *B. subtilis* con carencia específica de cit aa_3 y presencia de cit c . Este mutante complementaría la información vertida en esta tesis para el mutante M_1 y comprobaría de manera fehaciente el papel de la vía cit c --- cit aa_3 en el crecimiento y esporulación del género *Bacillus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Arrigoni, G. y T.P. Singer. 1962. Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature* (London) 193: 1256-1258.
- 2.- Bonde, G. J. 1975. The genus Bacillus. *Danish Medical Bulletin*. 22: 41-61.
- 3.- Bonde, G. J. 1976. The marine Bacillus. [abstract] *Journal of applied Bacteriology* 41: vii.
- 4.- Broberg, P. L. y L. Smith. 1967. The cytochrome system of Bacillus megaterium KM. The presence and some properties of two CO-binding cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta* 131: 479-489.
- 5.- Buchanan, R. E., y Gibbons, N. E. (Eds.) 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 6.- Collier, R. E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in Clustidium roseum. In *spores*, pp. 10-17. H.O. Halvorson (ed) Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
- 7.- Darland, G., y Brock, T. D. 1971. Bacillus acidocaldarius sp. nov., and acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 67: 9-15.

8.- De Vrij, W., Azzi, A. y Konings, N. 1983. Structural and functional properties of cytochrome c oxidase from Bacillus subtilis W 23. Eur. J. Biochem. 131: 97-103.

9.- De Vrij, W., B. Burg, y W. N. Konings. 1987. Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from Bacillus subtilis. Eur. J. Biochem. 166: 589-595.

10.- Escamilla, J. E. y Benito, M.C..1984. Respiratory system of vegetative and sporulating Bacillus cereus. J. Bacteriol. 160: 473-477.

11.- Escamilla, J. E., Ramirez, R., del Arrenal, P. y Aranda, A.. 1986. The respiratory systems of mother cell and forespore of B. cereus. J. Bacteriol. 167: 544-550.

12.- Escamilla, J. E., Ramirez, R., Zaragoza, G., del Arrenal, F. y Lianres, V.. 1987. Expression of cytochrome oxidases in Bacillus cereus. Effect of oxygen tension and carbon source. J. Gen. Microbiol. 133: 001-007.

13.- Felix, J. A. y D. G. Lundgren. 1973. Electron transport system associated with membranes of Bacillus cereus during vegetative growth and sporulation. J. Bacteriol. 115: 552-559.

14.- Freese, E..1981. Initiation of sporulation and germination (Eight international Spore Conference). Levison, H. A. L.

Sonenshein y D. J. Tipper (ed.). pp 1-10. Amer.Soc. for Microbiol. Washington, D. C.

15.-Fortnagel P., y E.Freese, 1966. Analysis of sporulation mutants II. Mutants bloqued in the citric acid cycle. J. Bacteriol. 93: 1431-1436.

16.- Garcia, M. Tesis de licenciatura, Facultad de Quimica, Universidad Nacional Autónoma de México, 1967

17.- Goldman, M. 1967. Pathways of glucose catabolism in Bacillus cereus. J. Bacteriol. 87: 387-390.

18.- Halvorson, H. O..1957. Rapid and simultaneous sporulation. J. Bacteriol. 115: 552-559.

19.- Gel'man, N. S., Lukoyanova, M. A. y Ostrovskii, D. N.. 1975. The respiratory chain and its organization in the bacterial membrane. In Membranes Vol.6, pp 129-215. (Eds) Gel'man. Plenum Press, New York.

20.- Halvorson, M. H., y J. Blumenthal. 1964. Changes in terminal respiratory pathways of intact cells of B. cereus at various stages of development. J. Bacteriol. 87: 387-390.

21.- Hanson, R. S., V. R. Srinivasan y H. O. Halvorson. 1963. Biochemistry of sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol. 85: 451-460.

22.- Kita, K., Konishi, K. y Annaku, Y..1984. Terminal oxidases of Escherichia coli aerobic respiratory chain. I. Purification and properties of cytochrome b₅₅₈-o complex from cells in the early exponential phase of aerobic growth. J. Biol. Chem. 259: 3368-3374.

23.- Konings, W. N..1975. Localization of membrane proteins in membranes vesicles of Bacillus subtilis. Arch. Biochem. Biophys. 167: 570-580.

24.- Lang, D. F., J. Flix y D. B. Lundgren. 1972. Development of a membrane bound respiratory system prior to and during sporulation in Bacillus cereus and its relationship to membrane structure. J. Bacteriol. 110: 968-977.

25.- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J..1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

26.- Miki, K. y K. Okonuki. 1969. II. Purification and spectral properties of cytochromes c₅₅₀ and c₅₅₄. J. Biochem. 66: 831-843.

27.- Miki, K. y K. Okonuki. 1969. Cytochromes of Bacillus subtilis physicochemical and enzymatic properties of cytochromes c₅₅₀ and c₅₅₄. J. Biochem. 66: 845-854.

28.- Norris, J. R. y Berkeley, R. C. W..1981. The prokaryotes II. Ed. Mortimer P. Stann; Heinz Stolp.. Springer Verlag. New york. 135: 1708-1742

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

30.- Sterlini, J. M. y J. Maldelstam. 1969. Commitment to sporulation in Bacillus subtilis and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* 113: 29-37.

31.- Smith, L. 1978. Bacterial cytochromes and their espectral characterization. In *methods in enzymology*, vol. 53, pp 202-213. Fleischer G. y L. Parcker (ed). Academic Press Inc., New York.

32.- Sone, N. 1986. Cytochrome oxidase from thermophilic bacterium Ps 3. *Meth. Enzymol.* 126: 145-153.

33.- Taber, H. 1974. Isolation and properties of cytochrome a-deficient mutants of Bacillus subtilis. *J. Gen. Microbiol.* 81: 435-444.

34.- Taber, H. y Freese, E.. 1974. Sporulation properties of cytochrome a-deficient mutants of B. subtilis. *J. Bacteriol.* 120: 1004- 1011.

35.- Tochicubo, K. 1971 Changes in terminal respiratory pathways of Bacillus subtilis during germination, autgrowth and vegetative growth. *J. Bacteriol.* 108: 652-661.

- 36.- Weber, M. N. y Breadbent, D., 1975. Electron transport in membranes from spore and vegetative and mother cells of Bacillus subtilis. In spores VI. Gerhardt, F., R. H. Costilow and R. L. Sadoff (ed) . pp 411-417. Amer. Soc. for Microbial. Washington, D. C.,
- 37.- Yoshida, T. y Fee, J. A. 1974. Studies of cytochrome c oxidase activity of the cytochrome c₁-aa₃ complex from Thermus thermophilus. J. Biol. Chem. 259: 1931-1936.
- 38.- Young, F. E., y G. A. Wilson. 1972. Genetics of Bacillus subtilis and other gram-positive sporulating bacilli, pp 77-106. In H. O. Halvorson, R. Hanson, and L.L. Campbell (ed.), Spores V. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
- 39.- Young, F.E., y G. A. Wilson. 1974. Practical guide to techniques for genetic analysis of Bacillus subtilis, pp 69-114. In R. C. King (ed.), Handbook of genetics, vol. I. Plenum Press, New York.