

## 7 INTRODUCCIÓN

Las bacterias tienen la capacidad de crecer bajo un amplio rango de condiciones, pudiéndose encontrar en diversos tipos de hábitats extremos; desde manantiales calientes, profundidades tanto de mares como de la corteza terrestre, cristales de halito, nódulos de manganeso marino, esmalte de rocas, rocas de desierto e incluso condiciones extremas parecidas a las encontradas en el espacio exterior (Fajardo *et al*, 2006). En la actualidad, las bacterias se pueden utilizar, entre otras cosas, para producir desinfectantes, anulando, regulando y/o deteniendo el crecimiento de ciertas bacterias en el control biológico (Valderrama, 2008). Se les ha dado un uso también en la industria farmacéutica, en la agroindustria como es la producción de inoculantes para fijar nitrógeno en leguminosas y endófitos en caña de azúcar, o en la industria de alimentos produciendo queso, mantequilla, yogurt e incluso en otro tipo de alimentos fomentando una mejor digestión (Hagedon, 1994). Actualmente, se les atribuye un gran potencial para la purificación de aguas residuales por medio de la degradación de compuestos orgánicos y tóxicos como los pentaclorofenoles (Vélez, 2007). Intervienen en el reciclaje de muchos elementos ya que participan en ciclos bioquímicos más importantes como el la fotosíntesis y la nitrificación, así como ya se mencionó en la fijación biológico de nitrógeno (Duvigneaud, 1977). Debido a que las bacterias tienen una notable capacidad para degradar una gran variedad de compuestos orgánicos, éstas son utilizadas para el reciclado de basura y en la biorremediación (Fajardo, 2006).

En la actualidad las bacterias son herramientas básicas en diversas áreas de la biología y la medicina, de igual forma son vitales en la genética y otras ramas como la bioquímica molecular, ya que poseen una gran capacidad de manipulación y altas cualidades de adaptación. Pueden crecer proto-tróficamente o auxotróficamente teniendo los nutrientes necesarios. Además es relativamente sencillo modificar su ADN y observar los fenotipos correspondientes, permitiendo así a la ciencia determinar diversas funciones enzimáticas, rutas metabólicas ó la producción de diferentes compuestos (Brock, 2005). El poder trabajar con microorganismos tan simples, permite conocer y comprender las diferentes reacciones metabólicas y los productos derivados de éstos y tratar de extrapolarlos a otras especies bacterianas más complejas, incluso quizás a organismos superiores.

Aun hoy en día, existe la dificultad de cultivar muchas bacterias *in vitro* debido a las condiciones tan extremas en las que se desarrollan, cuestión por la que se cree que muchas bacterias aun no han sido aisladas y por tanto identificadas adecuadamente. El advenimiento de técnicas moleculares de

alto desempeño y la secuenciación masiva de DNA de reciente generación ha permitido secuenciar el DNA de comunidades bacterianas complejas en lo que se conoce como el metagenoma, un método de obtener la información genética de organismos que no pueden ser cultivados en las condiciones del laboratorio.

Dentro del dominio *Bacteria* se encuentra el grupo formador de esporas *Bacillus* que de acuerdo a las condiciones en las que se presente, será la configuración que asuma ya sea de bacteria vegetativa o latente. Entre algunos de los factores que afectan la esporulación, que es considerado un proceso complejo y de alto costo energético, se distinguen factores como: temperatura, toxicidad, concentración de nutrientes, oxígeno molecular, pH, desecación, rayos ultravioleta (UV), entre otros (Roth, 1975). Se ha encontrado que los factores en cuestión no son independientes sino que se encuentran interrelacionados por lo que al evaluar el efecto individual de cada factor no se puede elucidar por separado del efecto de los demás (Kinaysi, 1948).

*B. subtilis* ha sido adoptado como un “organismo modelo” debido a la facilidad de manipulación genética, y a su capacidad de esporulación (Fajardo *et al*, 2006), este bacilo es considerado como el equivalente Gram positivo del organismos modelo y Gram negativo *Escherichia coli*. Muchos de los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de crecer en ambientes extremos como baja concentración de oxígeno y/o baja/nula presión atmosférica, debido a que este bacilo puede alternar y regular genéticamente, expresando ó inhibiendo su sistema respiratorio dependiendo de las condiciones a las que es expuesto en la etapa de crecimiento (Rick, 2004). Como es el caso en donde las bacterias pueden realizar la respiración en ausencia de oxígeno, utilizando al nitrato como último aceptor de electrones, por medio de reductasas (Nakano, 2001).

En la tesis de licenciatura de Paredes-Juárez, 2008 se detectó que una cepa de *B. subtilis* conteniendo varias copias del gen *vgb* de *Vitreoscilla stercoraria* (hemoglobina bacteriana), tenía una mayor afinidad por el oxígeno comparado con la cepa silvestre. Sin embargo, estos resultados no han sido comprobados por lo que en este trabajo se propuso evaluar las ventajas adaptativas de esta cepa bajo diferentes concentraciones de oxígeno y presión atmosférica.

La evolución dirigida no requiere de un conocimiento específico previo acerca de la relación estructura – función ya que básicamente emplea procesos azarosos para crear librerías de mutantes a partir de las cuales, por medio de diferentes métodos de selección y monitoreo, se escogen aquellas que a juicio del investigador sean de mayor interés.

Las técnicas que se han desarrollado han probado en repetidas ocasiones su efectividad y de ésta manera se han obtenido bacterias que expresan proteínas termoestables, anticuerpos con mayor o menor especificidad, etc. que se han empleado en muchos campos tales como la industria farmacéutica, alimentaria o incluso en proyectos de biorremediación.

## 7.1 ANTECEDENTES

### 7.1.1 *B.subtilis*; FILOGENIA Y CARACTERÍSTICAS

Las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* se caracterizan por poseer una estructura en forma de bastón y presentan la tinción Gram-positiva. Este género pertenece a la División Firmicutes, dominio *Bacteria* de la clasificación propuesta por Woese, 1977 basándose en el parentesco de organismos a través del RNA 16s en donde se agrupan tres dominios; *Archea*, *Eucaria* y *Bacteria*. Se supone que los primeros organismos procariotas en poblar nuestro planeta posiblemente tenían un ancestro común a los dominios; *Bacteria* y *Archea* (Woese, 1990). *B. subtilis* es un microorganismo, catalasa-positiva y aerobio facultativo, comúnmente encontrado en el suelo (Nicholson *et al.* 2000).

*B.subtilis* está considerado como un saprófito y no patógeno para el humano, sin embargo, es capaz de contaminar algunos alimentos. Aunque raramente causa intoxicación alimenticia, sus esporas tienen la capacidad de sobrevivir a altas temperaturas lo que provoca que sea complicada su eliminación (Brock, 2005). Esta facultad para formar endosporas de gran resistencia, le proporciona una gran ventaja para subsistir en condiciones extremas, incluso como las que se encuentran en el espacio exterior. Esta cualidad le otorga a estas células una clasificación entre las más resistentes del planeta (Fajardo *et al.*, 2006). Normalmente estas bacterias crecen en un pH alrededor de 7 y 7.4, y de 12 °C a 45°C; pero tiene la capacidad de adaptarse a las condiciones que estén a su alrededor, reflejando la configuración correspondiente, ya sea en su forma vegetativa o latente.

En la naturaleza aquellos organismos más comunes, son los que utilizan el oxígeno como ultimo aceptor de electrones y se denominan aerobios. Los electrones de sus orbitales externos no están apareados y la diferencia en los potenciales de oxido-reducción con el

NADH (1.14 Voltios), genera la liberación de una gran cantidad de energía, la cual sirve para traslocar protones a través de la membrana celular y formar ATP (Vélez, 2006).

Cuando el oxígeno se agota del medio, el ambiente se denomina anaerobio, en el cual dependiendo de la capacidad metabólica de cada organismo. Entre algunos de los posibles aceptores finales de electrones se encuentran los nitratos, sulfatos y el metano entre otros. Los anaerobios estrictos (obligados) no toleran en absoluto el oxígeno y mueren en su presencia. Puesto que no pueden producir energía por respiración, estos organismos recurren a otras rutas como las vías fermentativas o de respiración anaeróbica. Los microaerófilos son lo que se desarrollan en niveles bajos de oxígeno (2-10%) (Vélez, 2006). La naturaleza de las respuestas bacterianas al oxígeno es más evidente si se estudia en medios sólidos o líquidos que contengan agentes reductores (Prescott, 2005).

### 7.1.2 PRESIÓN

La presión es una magnitud física que se caracteriza por ser una fuerza aplicada en cierta área ( $P = F/A$ ). Sus unidades son pascales según el Sistema Internacional de Unidades (SI), en donde cada uno de estos pascales es equivalente a un Newton sobre metro cuadrado. ( $N/m^2$ ). Diferentes unidades de conversión se describen en la tabla 1. (The International System of Units, 2010).

Tabla 1 Muestra las equivalencias de la presión en diferentes unidades.

	Pascal	Bar	N/mm <sup>2</sup>	kp/m <sup>2</sup>	kp/cm <sup>2</sup>	Atm	Torr
<b>1 Pa (N/m<sup>2</sup>)=</b>	1	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	0,102	0,102×10 <sup>-4</sup>	0,987×10 <sup>-5</sup>	0,0075
<b>1 bar (daN/cm<sup>2</sup>) =</b>	100000	1	0,1	1020	1,02	0,987	750
<b>1 N/mm<sup>2</sup> =</b>	10 <sup>6</sup>	10	1	1,02×10 <sup>5</sup>	10,2	9,87	7500
<b>1 kp/m<sup>2</sup> =</b>	9,81	9,81×10 <sup>-5</sup>	9,81×10 <sup>-6</sup>	1	10 <sup>-4</sup>	0,968×10 <sup>-4</sup>	0,0736
<b>1 kp/cm<sup>2</sup> =</b>	98100	0,981	0,0981	10000	1	0,968	736
<b>1 atm (760 Torr) =</b>	101325	1,013	0,1013	10330	1,033	1	760
<b>1 Torr (mmHg) =</b>	133	0,00133	1,33×10 <sup>-4</sup>	13,6	0,00136	0,00132	1

Según lo reportado por Téllez (2001), se han utilizado altas presiones hidrostáticas para la preservación de comida ya que no afecta el sabor del producto a diferencia del efecto de la temperatura. También se ha usado para fármacos, sin embargo, no se ha tenido éxito para imposibilitar el desarrollo de algunas bacterias. Las esporas de *B. subtilis* pueden soportar tratamientos con presiones mayores a 1,000 MPa, por más de 40 minutos a temperaturas menores de 10°C (Wuytack, 1998). Sin embargo, en otras esporas se observa una inactivación a presiones moderadas (200-500MPa) debido a que la presión puede inducir la germinación en muchas especies lo que provoca una pérdida a la resistencia de altas presiones y al calor. La germinación inducida por la presión es dependiente de la temperatura (siendo ausente a 10°C y sobresaliente a 40-50°C). Según Gould y Sale (2002), la germinación por presión es debido a la activación de enzimas involucradas en la germinación induciendo un cambio estructural de las mismas. Es posible que de igual forma el cambio de presión en el ambiente afecte la permeabilidad de la cubierta de la espora (Gould-Sale, 2002). En *B. coagulans* se ha observado una inducción en la germinación a 45°C entre 100-600MPa mientras que su inactivación máxima es aproximadamente a 300MPa y desciende al incremento de la temperatura. En el trabajo reportado por Wuytack 1998, se demostró que las esporas germinadas a altas presiones no completan rigurosamente el proceso de germinación lo que les permite retener parte de sus propiedades de resistencia, dándoles propiedades de resistencia a las células vegetativas. Cuando se usan altas presiones para esterilizar en la industria de los alimentos (con el fin de eliminar esporas), se afecta la función de muchas enzimas en donde se muestran reversibles a bajas presiones (<200MPa) pero irreversibles a altas (>300Pa) presiones, la desnaturalización de proteínas de membrana y modificaciones en la permeabilidad de la membrana, son cuestiones importantes para el crecimiento de las bacterias. Por otro lado la alta presión hidrostática produce cambios morfológicos en las células vegetativas como la compresión de gas de las vacuolas que alrededor de 0.6 MPa pueden colapsarse (Téllez, 2001), alargamiento de las células, formación de filamentos, separación de la membrana celular de la pared celular, contracción de la pared celular con la formación de poros, modificaciones del citoesqueleto y organelos intracelulares, liberación de constituyentes celulares fuera de la célula y cambios bioquímicos y genéticos al inactivar enzimas involucradas en la replicación y transcripción del ADN. (Téllez, 2001).

La mayoría de las bacterias pueden crecer a 20-30MPa, en caso de realizarlo entre 40-50MPa se les denomina barófilas y si es que se son incapaces de desarrollarse entre 30-40MPa son barófbas. Se les denomina como euribáricos a los que crecen en un amplio rango entre 1-50MPa y barodúricos a los que pueden sobrevivir pero no crecer entre 50-200MPa. Estas condiciones además de variar entre especies también pueden cambiar con respecto a cada cepa (Téllez, 2001). La mayor inactivación sobre los microorganismos se refleja en la etapa logarítmica del crecimiento, siendo los Gram negativos más sensibles a las altas presiones, luego las levaduras, posteriormente se encuentran los hongos, las Gram positivas y por último las esporas y virus (dependiendo del virus), (Téllez, 2001).

### 7.1.3 VACÍO

Se define como la ausencia casi en su totalidad ó total de materia en un espacio delimitado. En caso de ser casi completa la ausencia como se muestra en el espacio interestelar, la densidad de partículas es bastante baja siendo menor a la presión de gases encontrados en la atmósfera. Por ende se considera inversamente proporcional a la presión de gas residual (Ribas, 2008). Es posible provocar el vacío de manera artificial dándole usos científicos, tecnológicos e industriales (Talavera, 1990). En el espacio prevalecen presiones menores a  $10^{-14}$  Pa y éstas aumentan directamente proporcional con el tamaño del cuerpo. En la Tierra las presiones aproximadamente se encuentran entre  $10^{-4}$  - $10^{-6}$  en el hemisferio sur de la Tierra. Actualmente la desecación producida por el vacío funciona para esterilizar material de laboratorio, sin embargo se ha visto que la endospora *B.subtilis* tiene la capacidad para resistir de 55-75% estas condiciones. Las bacterias vegetativas no corren con la misma suerte debido al daño generado al DNA, alterando la permeabilidad de la membrana, inhibiendo o modificando actividad enzimática y produciendo cambios en las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos etc.) con consecuencias letales. (Nicholson, 2000).

### 7.1.4 RESPIRACIÓN MICROBIANA

El dominio *Bacteria* tiene un amplio rango de tipos y rutas metabólicas. A partir del tipo y distribución de clases metabólicos que presenten, estos microorganismos pueden clasificarse y definirse de manera taxonómica aunque no concuerden con clasificaciones genéticas modernas. Se puede clasificar en tres secciones el metabolismo microbiano:

origen del carbono, la fuente de energía y los donadores de electrones. Otra forma de clasificarlos es a partir del receptor de electrones empleado para la respiración. (Ziling, 1991).

En las clasificaciones de los organismos basadas en su fuente de carbono podemos encontrar a los heterótrofos, los cuales usan compuestos orgánicos y por otro lado los autótrofos que obtienen su carbono celular por la fijación del dióxido de carbono (ej. cianobacterias fotosintéticas, bacterias verdes del azufre y algunas bacterias púrpura). Para la clasificación basada según la fuente de energía, es posible encontrar que las bacterias pueden ser: fotótrofas si obtienen la luz por fotosíntesis ó quimiótrofas si obtienen energía de reacciones químicas, en donde si es a expensas del oxígeno se denomina respiración aeróbica y en caso de tener otros receptores de electrones alternativos (normalmente inorgánicos como nitratos, sulfatos o dióxidos de carbono), se denomina respiración anaeróbica (Nakano, 2001). Por último, la clasificación de acuerdo a los donadores de electrones encontramos a las bacterias litótrofas, si los donadores de electrones son compuestos inorgánicos y organótrofas, si es que éstos son orgánicos.

La respiración es un proceso de transferencia de electrones (obtenidos de un sustrato reducido), dichos electrones son transportados a un receptor final por reacciones de oxidoreducción (redox). La energía liberada puede sintetizar ATP y así utilizarse para el metabolismo celular. Una ruta alterna a estas vías metabólicas, es la fermentación (proceso anaeróbico de oxidación incompleta), en donde el producto final es un compuesto orgánico que reducido es el receptor final de electrones como el lactato o el etanol entre otros. Los organismos anaerobios facultativos pueden elegir entre la fermentación y diversos receptores terminales de electrones dependiendo de las condiciones ambientales en las cuales se encuentren (Rick, 2000).

Las bacterias pueden realizar fotosíntesis en donde hay fijación del dióxido de carbono, mediante la bacterioclorofila, esta característica es muy importante a nivel ambiental y se puede encontrar en bacterias de casi todos los tipos metabólicos.

En el caso de *B.subtilis* al ser un microorganismo facultativo puede alternar su sistema respiratorio permitiendo su desarrollo en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Al

detectar las condiciones del entorno, las bacterias pueden realizar cambios genéticos dirigidos hacia una ruta metabólica específica (Rick, 2004).

### 7.1.5 CRECIMIENTO MICROBIANO

Se define como el incremento en el número de células en un ambiente determinado a un periodo de tiempo. El crecimiento no se refiere al incremento de tamaño en los microorganismos sino al de la población. Existen diversas formas de “crecimiento” como: fisión, fragmentación y gemación.

La bipartición es donde las bacterias replican su material genético y sintetizan componentes celulares e incrementan su tamaño hasta dividirse en dos nuevos organismos. Este proceso conocido como ciclo celular, define el tiempo generacional, lo que depende de los factores ambientales a los que está expuesto. El crecimiento microbiano se determina por medio de gráficas que reflejan el número de células vías por unidad de volumen o cuenta viable que por ende será el monto de los ciclos celulares de la población. Debido a que las células tienen ciclos celulares en diferentes puntos del proceso, se denominan asincrónicos que suelen ser los más comunes en la naturaleza.

Las bacterias crecen siguiendo un patrón geométrico en donde el número de individuos se duplica al cabo de cierto tiempo (tiempo de generación (g)). Por lo que el cálculo del número de bacterias (N) se puede determinar al cabo de un número de generaciones (n) (tiempo requerido para que una célula se divida en dos) usando la ecuación siguiente:

$$N_t = N_0 2^n$$

Donde  $N_t$  es el número de células en el momento “t”,  $N_0$  es el número de células inicial y “n” el número de generaciones (Caso, 2008). Se puede calcular el número de generaciones de la siguiente forma:

$$n = t / g$$

Donde t es el tiempo transcurrido y g es el tiempo de duplicación (tiempo de generación).

Los tiempos de generación de bacterias creciendo en ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de 0 a 20 min). Esto lleva a que una célula ( $N_0 = 1$ ) creciendo con un (tiempo de duplicación)  $g = 20$  min, llegue a poder producir  $4.7 \times 10^{21}$  células en 24 horas (Caso, 2008). Las bacterias requieren de factores tanto físicos como químicos para



desarrollarse como: temperaturas, gases, pH y nutrientes, en donde estos últimos pueden catalogarse como “macronutrientes” en caso de necesitarse en mayores concentraciones como el Carbono y el Nitrógeno y “micronutrientes” si son necesarios en pequeñas cantidades como Cromo, Cobre, Cobalto entre otros (Caso, 2008). Otro factor que influye es la actividad del agua (Aw), ya que a partir de su disponibilidad en el medio, las bacterias desarrollaran diferentes capacidades para multiplicarse. Pueden recibir valores entre 0 y 1, siendo más cercano a cero una menor disponibilidad de agua para las bacterias, reflejándose en una menor multiplicación y viceversa (Facultad de farmacia, 2010).

Si la bacteria crece en un medio líquido, las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos, formando una suspensión de células libres. En cambio cuando se les hace crecer en medios sólidos, se pueden determinar colonias ó “UFC” (unidad formadora de colonias) que están determinadas como aquellas células vivas y aisladas que se encuentran en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y producen una colonia en un lapso breve de tiempo. Cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas o de enzimas (Valderrama, 2008).

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos.

El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos “iguales”. Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes como ya fue mencionado, para que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares (Valderrama, 2008).

#### **7.1.6 MEDIDA DE CRECIMIENTO**

Hay muchas formas para medir el crecimiento microbiano como recuento directo, medida de la masa de las células, recuento de viables, medida del número de partículas, medida de parámetros bioquímicos y medida de la actividad metabólica.

Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser.

Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo (densidad de las células). La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio.

Recuento de células viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o una muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de microorganismos viables contando el número de colonias formadas (UFC) puesto que cada una de éstas deriva de una UFC. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC.

En el crecimiento microbiano se identifican tres fases principalmente que pueden expresarse mediante la Figura 1. La primera cuestión a la que se enfrenta una población bacteriana es la de adaptarse al medio en el cual se le intenta crecer. Mientras más concentración de nutrientes se presenten en dicho medio, mas rápido será el crecimiento a diferencia de aquel que carezca de los mismos, donde el crecimiento no sólo será más lentos sino que no se manifestará ni alcanzará un desarrollo de manera plena. La fase de adaptación recién mencionada se le denomina como “fase *lag*” en la que a partir de las condiciones a las que se encuentren, estas variarán el periodo de adaptación al medio. Esta fase es por lo general un proceso de lento crecimiento. Una vez adaptadas las bacterias al medio, desarrollan un crecimiento rápido y exponencial con una tasa alta de biosíntesis de proteínas. Entre algunas de estas proteínas dentro de esta categoría se encuentran las de membrana y los ribosomas. A esta segunda fase del crecimiento se denomina “exponencial” o fase *log*, donde el crecimiento se sigue desarrollando exponencialmente mientras existan nutrientes disponibles. Existen fórmulas para evaluar la velocidad en la que se desarrolla el crecimiento dando valores de “g” y “k” al tiempo de generación y a su tasa de crecimiento, respectivamente. Por medio de modelos matemáticos es posible analizar de manera cuantitativa el comportamiento microbiano en un determinado ambiente o sistema particular, considerando la acción simultánea de diversos factores limitantes

(extrínsecos ó intrínsecos). Se utilizan condiciones constantes para determinar los parámetros cinéticos en el crecimiento y así el incremento ya sea por unidad de tiempo de masa celular ó de número de células etc. es un valor constante y similar en cada situación (Vélez, 2006). En la fase exponencial (*log*) el cultivo se comporta como una reacción autocatalítica (en donde se observa un aumento de componentes y constituyentes por un mismo factor en la unidad de tiempo) con el que se calcula "k" que es característico para cada bacteria dependiendo del medio y las condiciones en las que se encuentre. Para conocer este valor se tiene que conocer la velocidad de crecimiento microbiano en la fase exponencial. Con las siguientes ecuaciones se obtienen los valores de k y g.

$$k = n / t = [ (\log N_t - \log N_0) / (0.301 * t) ]$$

Donde: k = Constante de velocidad de crecimiento,  $N_0$  = Numero inicial de células  
 $N_t$  = Población en un tiempo "t", t = Tiempo evaluado

$$g = 1 / k$$

k = Constante de velocidad de crecimiento; g = Tiempo medio de generación o tiempo medio de duplicación.

El tiempo medio de generación/duplicación (g), como ya se había mencionado es el período que requieren las células de una población microbiana para crecer y dividirse. El tiempo es aproximadamente el mismo en una población característica y este cambia en la fase estacionaria con la competencia y acumulación de productos tóxicos (aumento del tiempo de duplicación). Las poblaciones con un valor de "g" más elevado están creciendo más lentamente y esto se puede constatar por la constante de velocidad de crecimiento (k) (Vélez, 2006).

La tercera fase denominada estacionaria se caracteriza porque el desarrollo del crecimiento microbiano se detiene en una constante debido al agotamiento de nutrientes como se mencionó antes. Una de las características de esta fase es que las bacterias comienzan a arrestar el ciclo celular y a producir metabolitos secundarios no esenciales, por lo que consecuentemente disminuyen su actividad metabólica. Al comenzar el estrés y la competencia existen modificaciones genéticas que provocan una inducción a ciertos genes responsables de la reparación del material genético, transporte de nutrientes y metabolismo de antioxidantes, en este periodo el número de células que se divide es igual al que muere. La fase final es por último la fase de muerte que es cuando comienzan a morir los

microorganismos y sin división celular, por ende se observa una reducción del número de bacterias viables (Freeman, 1986).

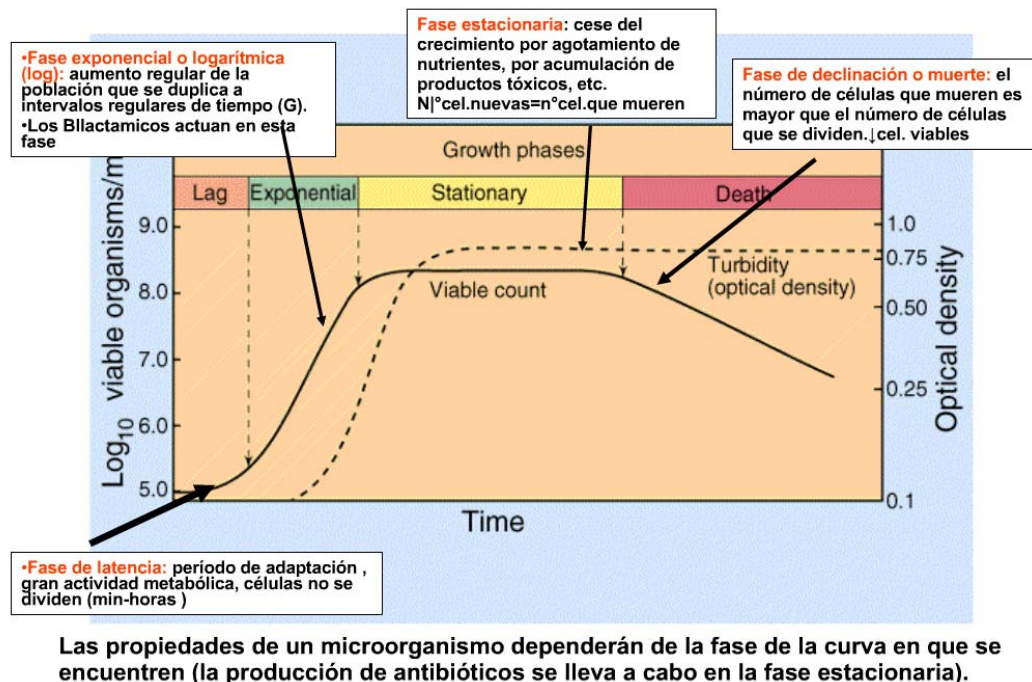


Figura 1 Curva de crecimiento microbiano en la que se pueden distinguir cuatro etapas bien definidas, evaluando los parámetros de medida a través del tiempo. (Valderrama, 2008)

### 7.1.7 GEN *vgb* DE *Vitreoscilla stercoraria*

Las proteínas tipo hemoglobinas, hasta hace algunos años se pensaba que eran exclusivos de organismos eucariotas, sin embargo se han demostrado proteínas similares incluso en bacterias como las de la familia *Beggiata* (Ramandeep *et al*, 2001). *Vitreoscillas* pertenecientes a esta familia son bacterias Gram negativas y aerobios estrictos. Las hemoglobinas encontradas en este género se conocen como VHb (*Vitreoscilla* Hemoglobin b) debido a su cinética de unión al oxígeno. Su función es la de facilitar el flujo de oxígeno a las membranas respiratorias de *Vitreoscilla*, la cual se encuentra en hábitats hipóxicos es sabido que la biosíntesis de VHb es mediada a nivel transcripcional por un promotor sensible al oxígeno que se activa en concentraciones bajas de este gas (Joshi, 1998). VHb se compone por dos subunidades idénticas de 15.7 kDa (complejo homo-dimérico). La VHb interactúa específicamente con el O<sub>2</sub>, reduce la subunidad de la oxidasa del citocromo *bo* terminal y se ha asumido que la globina interactúa con una reductasa que es

funcionalmente análoga al dominio carboxi-terminal de las flavohemoglobinas. (Hernández, 2003). Véase Figura 2.

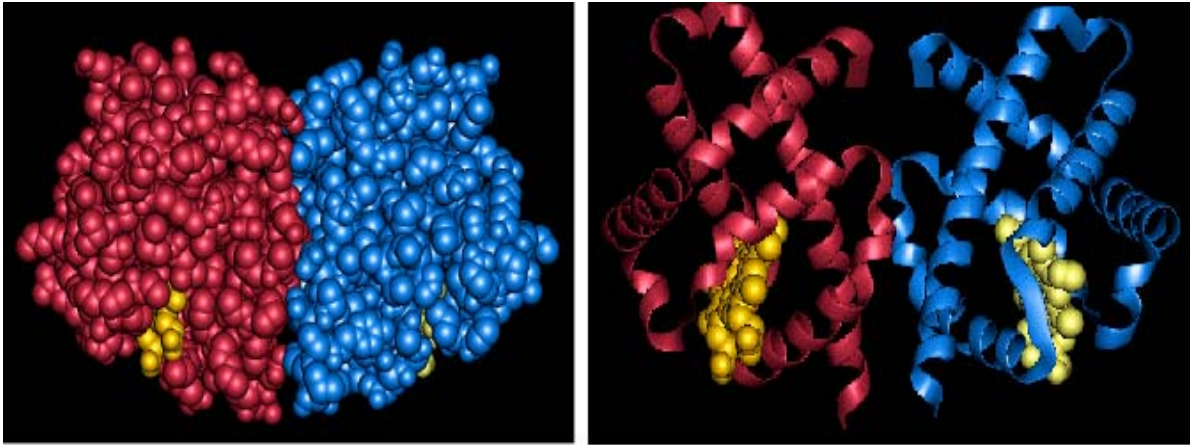


Figura2 Representaciones gráficas de la proteína homodimérica VHb con dos grupos hemo representados en color amarillo en el centro de cada grupo (Tarricone *et al.*, 1997).

Los estudios recientes evidencian dos modelos de la acción de VHb; el primero se conoce como hipótesis de la difusión facilitada, que implica que la presencia de VHb promueve el flujo de oxígeno a una u otra de las oxidasas terminales (citocromos *bo* y *bd*) en condiciones hipóxicas. (Ramandeep *et al*, 2001).

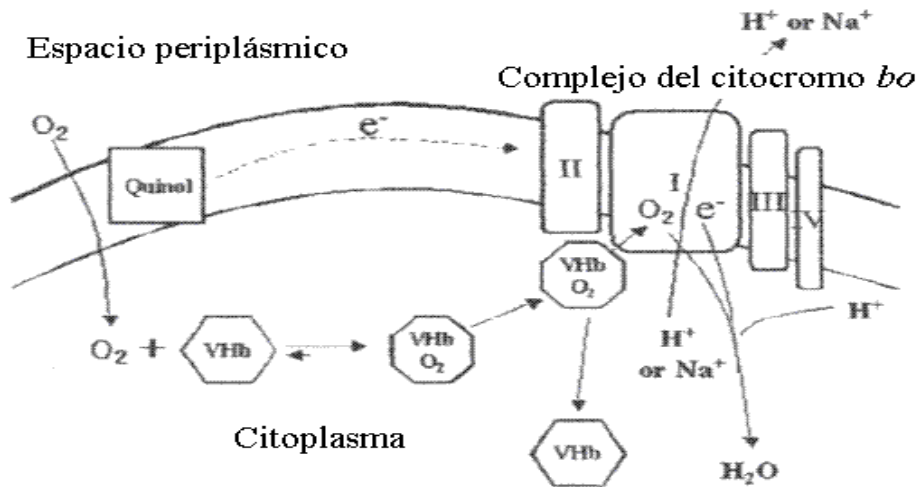


Figura 3 Interacciones entre VHb y la subunidad I del citocromo *bo* (Ramandeep *et al.*, 2001).

VHb estimula la actividad de la oxidasa ubiquinol-1 en las membranas de *Vitreoscilla*; la inclusión del citocromo *bo* en proteoliposomas lleva a que se observe un incremento en el

número de pliegues y se aumente la afinidad y el número de sitios de unión a VHb (Figura 2). Se ha detectado que alrededor de un 40% de la proteína se encuentra en el espacio periplásmico y gracias a esta ubicación es como puede transferir oxígeno del exterior a través de ésta oxidasa terminal (Paredes, 2006). Se cree que la oxi-VHb influencia la actividad de algún componente redox-sensible esencial que podría ser un detector, un regulador o incluso un sitio alostérico de una enzima del ciclo respiratorio. La influencia de la VHb podría propiciar un aumento en la eficiencia de la conservación de la energía. En la otra hipótesis existe la posibilidad de que la VHb tenga más de una función. Aunque no sea totalmente claro aún, se supone que la VHb transporta oxígeno y por ende le da cualidades a las bacterias a diferencia de aquellas en las que no presentan el gen. El VHb lleva el oxígeno directamente a las oxidasas terminales con un consecuente aumento en la producción de ATP (Chen y Bailey 1994; Kalio *et al*, 1994).