

24/198

'EFECTO DE LA TENSION DE OXIGENO SOBRE  
LA EXPRESION DEL SISTEMA RESPIRATORIO  
DE Bacillus cereus.'

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A

GERARDO ALBERTO ZARCOZA GARCIA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1 9 8 4



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

24/198

'EFECTO DE LA TENSION DE OXIGENO SOBRE  
LA EXPRESION DEL SISTEMA RESPIRATORIO  
DE Bacillus cereus.'

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A

GERARDO ALBERTO ZARZOZA GARCIA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1 9 8 1

## C O N T E N I D O

ABREVIATURAS

INTRODUCCION

GENERALIDADES: SISTEMA RESPIRATORIO Y ESPORULACION BACTERIANA

- A) SISTEMA RESPIRATORIO BACTERIANO
- B) ESPORULACION BACTERIANA
- C) ESTRUCTURA DE LA ESPORA BACTERIANA
- D) PROCESOS METABOLICOS Y BIOQUIMICOS
- E) EVENTOS FISIOLOGICOS

MATERIAL Y METODOS

- A) MEDIOS DE CULTIVO Y CONTROL DE CRECIMIENTO
- B) PREPARACION DE MEMBRANAS
- C) ENSAYOS ENZIMATICOS
  - 1) OXIDASAS:
    - a) NADH-oxidasa
    - b) Succinato oxidasa
    - c) Ascorbato:1MPD o DCFIP oxidasa
  - 2) OXIDORREDUCTASAS
    - a) Succinato:PMS + DCFIP oxidorreductasa
    - b) NADH:DCFIP oxidorreductasa
- D) ANALISIS ESPECTRAL DE CITOCROMOS

## RESULTADOS

A) CULTIVOS CRECIDOS A DIFERENTES TENSIONES DE OXIGENO

Y EN CONDICIONES ANAEROBICAS

B) ACTIVIDADES RESPIRATORIAS Y ANALISIS ESPECTRAL DE

CELULAS VEGETATIVAS Y ESPORULANTES

1) CELULAS ESPORULANTES

a) Oxidasas y Oxidorreductasas

b) Citocromos Asociados a Membranas Esporulantes

2) CELULAS VEGETATIVAS

a) Membranas Microserrulicicas

b) Membranas Anaerobicas

c) Citocromos Formando Complejos con CO

d) Concentración de Citocromos Asociados a Membranas

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

## BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

El estudio de las bacterias es de singular importancia tanto por su distribución como por su interrelación biológica con el medio. Las bacterias son los organismos más numerosos y ampliamente distribuidos; los encontramos prácticamente en todos los habitats; en el aire, agua, suelo, plantas, animales y en materia orgánica en descomposición (1). Su versatilidad biológica les permite subsistir y adaptarse inclusive a condiciones adversas; de esta forma, los encontramos creciendo a temperaturas extremas o en medios donde las fuentes de carbono y nitrógeno son escasas (2), así como en lugares donde las condiciones de oxígeno son limitantes (3). De estos organismos sólo algunos son nocivos al hombre; el resto, no sólo son inofensivos sino necesarios para la existencia de plantas y animales por su función ecológica como organismos desmenuzadores, transformadores de materia orgánica y fijadores de nitrógeno (1).

Al igual que otros organismos, las bacterias son sensibles a las condiciones externas y responden rápidamente a pequeños cambios en el medio. La temperatura, humedad, concentración de iones de hidrógeno y oxígeno son factores de vital importancia para controlar su

distribución, pero el factor más importante es la cantidad de alimento disponible (4). Por su adaptabilidad y capacidad para esporular las bacterias pueden subsistir y reproducirse casi bajo cualquier condición de crecimiento siempre y cuando disponga de fuentes de carbono y nitrógeno (5). Otra característica bacteriana es la respuesta a la presencia de oxígeno en el medio. A diferencia de los organismos eucarióticos algunas especies de bacterias tienen la capacidad de formar Sistemas de Transporte de Electrones (STE) mucho más complejos dependiendo del medio y cantidad de oxígeno disponible, por esto, los tipos y concentraciones de los componentes del sistema dependen en alto grado de las variables del cultivo tales como nutrientes, temperatura, agitación, tensión de oxígeno, etc., así como del estado de desarrollo de la población. La complejidad de estos sistemas reside en la presencia de un mayor número de deshidrogenasas unidas a la membrana las cuales donan los electrones a los componentes del Sistema Respiratorio (SR) para reducir al oxígeno y aceptores terminales alternativos (6,7).

En los sistemas bacterianos la presencia de cadenas respiratorias (CR) alternas es un fenómeno ampliamente distribuido que al parecer proporciona una mayor capacidad adaptativa; por ejemplo, Haemophilus parainfluenzae sufre modificaciones en su STE (8), en respuesta a la disminución del flujo de oxígeno en el medio de cultivo y por el

cambio del aceptor final de electrones; si el aceptor final es el oxígeno a bajas concentraciones, la bacteria induce la síntesis de citocromos b, c, a1, a2(d) y O, en mayor proporción que los encontrados si el flujo de oxígeno fuera superior. En Bacillus stearothermophilus crecido anaerobicamente con nitrato como aceptor final de electrones, el nivel de citocromo oxidasa se ve reducido en comparación al que se presenta en cultivos crecidos aerobicamente (9). La nitrato reductasa de este bacilo es fuertemente inhibida por cianuro (KCN) y azida pero no por el monóxido de carbono (CO). Achromobacter también tiene capacidad de modificar su SR cuando el medio externo es cambiado. Esta última presenta al menos dos oxidasas funcionando simultaneamente; citocromo oxidasa a2, que es poco sensible al cianuro y citocromo o que presenta una mayor sensibilidad a este inhibidor. En E. coli y Azotobacter se ha demostrado que existe un STE ramificado. Se ha encontrado también la presencia de citocromos capaces de combinarse con monóxido de carbono en Bacillus megaterium, Mycobacterium phlei, Micrococcus denitrificans (10).

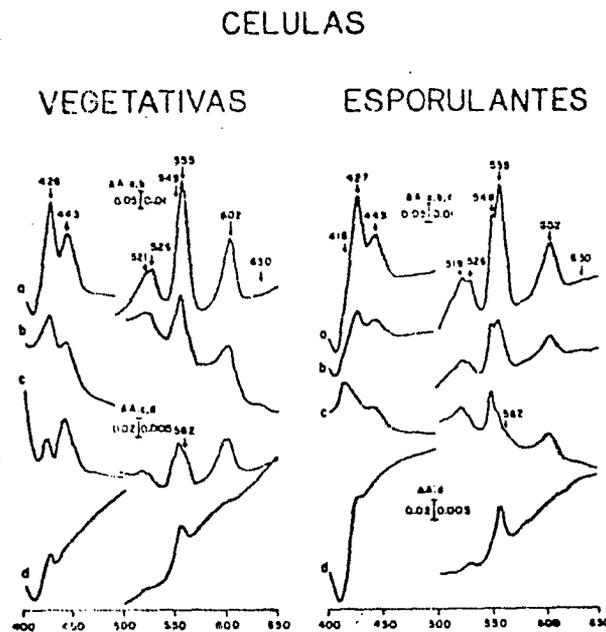
Durante la esporulación se ha encontrado un SR más complejo en B. megaterium (11) y en B. subtilis (5). En el primero, el citocromo a2 (d) y el citocromo o parecen funcionar como oxidasas terminales alternativas al citocromo a + a3 que es muy sensible al cianuro, mientras que el citocromo c se desmascara claramente en los

primeros estadios de la esporulación. En B. subtilis se ha encontrado citocromo c poco sensible al cianuro y citocromo a + a3 actuando como oxidasas terminales. En B. cereus, Halvorson (12) demostró que existe un incremento notable en el consumo de oxígeno una vez que las células dejan de dividirse y alcanzan los primeros estadios de la esporulación, mientras que Land y colaboradores (13) y Felix y Lundsren (14) encontraron un incremento significativo en las actividades de NADH deshidrogenasa así como en los citocromos del SR al finalizar el crecimiento vegetativo. Estos autores demostraron también que la inhibición del transporte de electrones y de la oxidación de NADH por cianuro no afecta significativamente el crecimiento vegetativo, pero si inhibe considerablemente la esporulación. Escamilla y Benito (6) no sólo han corroborado con su investigación el incremento de citocromos durante la esporulación en Bacillus cereus sino que presentan evidencias que demuestran que el SR de este organismo es mucho más complejo que el descrito por Felix y Lundsren (14). Sus resultados demuestran la existencia de citocromos b562 y a2 actuando como oxidasas terminales alternas lo cual explica la baja sensibilidad del transporte de electrones al cianuro.

El presente estudio se desprende del proyecto global de investigación del sistema respiratorio de Bacillus cereus que realizan Escamilla y colaboradores. Por esta razón y con la intención de que

Escamilla y colaboradores. Por esta razón y con la intención de que este trabajo sea mejor entendido e interpretado, a continuación se transcribe el resumen del trabajo publicado por Escamilla y Benito (6).\*

\*En el presente trabajo se revisó la composición y organización del sistema respiratorio de Bacillus cereus en la etapa logarítmica de crecimiento y durante la esporulación. El análisis espectral (figura 1 y 2) mostró que las membranas de ambos tipos de células contienen citocromos b555, c548, a + a3, b562 y a2, esta composición sugiere un sistema de transporte de electrones ramificado (figura 3).



FIGURAS 1 Y 2

Las membranas de células esporulantes manifiestan una gran actividad de NADH oxidorreductasa, NADH oxidasa y ascorbato-N,N,N',N'-tetrametilfenilendiamina oxidasa (TMPD) (tabla I). Excepto la succinato, otros sustratos ensayados no fueron oxidados. Se presentó también altos niveles de citocromos (tabla II).

La desaparición por destrucción selectiva (cercana a la luz ultravioleta) de la quinona endógena del sistema respiratorio dependiente de NADH indicó que los electrones son transportados al oxígeno a través de la única vía constituida por los diferentes citocromos y la quinona (figura 3).

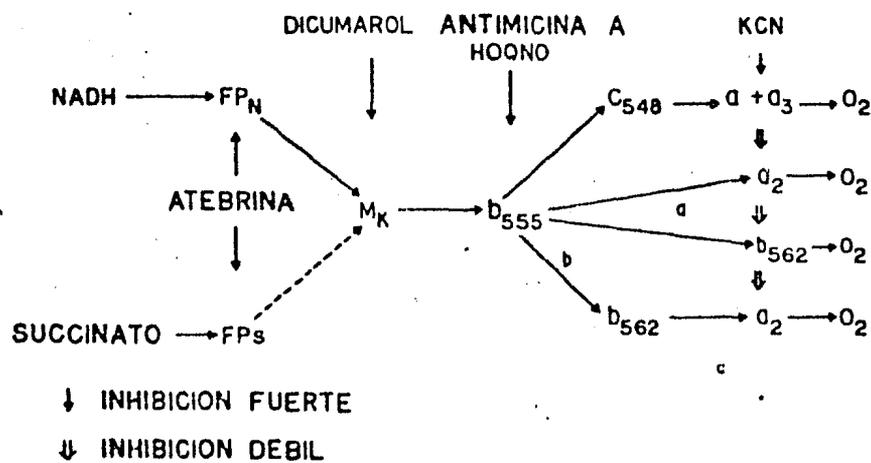


FIGURA 3

Los espectros con CD de membranas reducidas con ditionita (figura 4) exhibieron los picos característicos de los citocromos  $\alpha_3$  (430 y 592 nm y valle a 445 nm),  $\alpha_2$  (643 nm) y  $\alpha$  (417 nm y valle a 430 nm), sin embargo, la reacción cinética de éste último citocromo fue muy baja.

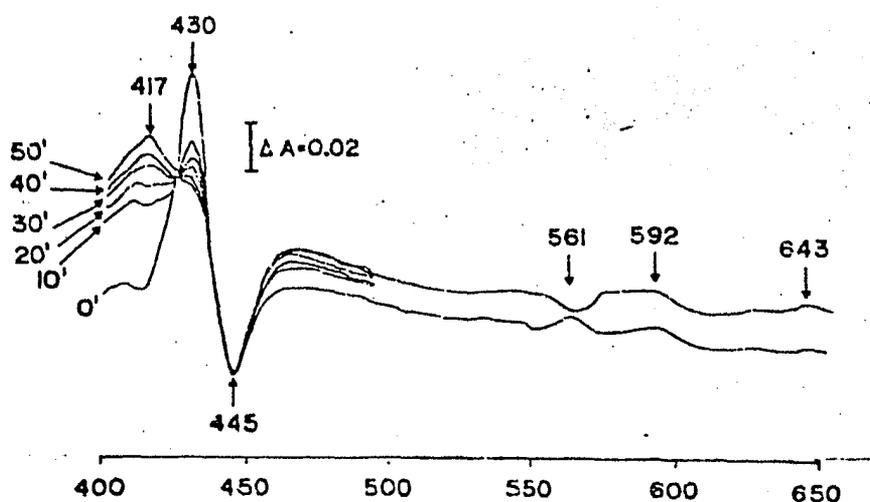
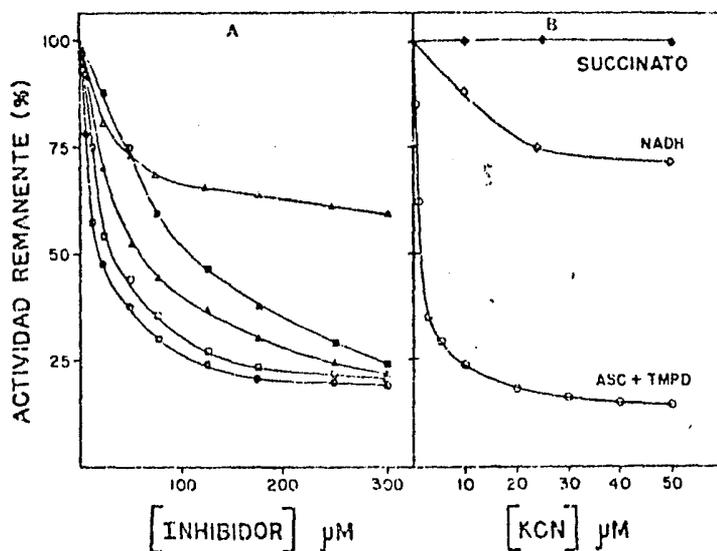


FIGURA 4

El cianuro, fue un pobre inhibidor de NADH oxidasa y succinato oxidasa, pero fue altamente efectivo en TMPD oxidasa ( $K_i=2.5$  micromolar) (figura 5A). La atebrina, dicumarol, antimicina A y 2-heptil-4-hidroxiquinolina N oxidasa (HOQNO) fueron considerablemente mejores inhibidores que el cianuro en la NADH oxidasa (figura 5B).

Los espectros diferenciales con cianuro sugieren que el citocromo b562 y a2 pueden ser componentes involucrados en la vía resistente al cianuro mientras que, los citocromos c548 y a + a3 parecen formar parte de la ramificación sensible al cianuro\* (figura 3). \*



FIGURAS 5A Y 5B

El sistema respiratorio de B. cereus crecido en condiciones normales ha sido estudiado y caracterizado durante la etapa logarítmica de crecimiento y en la fase esporulante por Lang, Felix y Lundgren (13) y más recientemente por Escamilla y Benito (6) pero, poca atención se ha prestado al crecimiento de este organismo sometido

a diferentes tensiones de oxígeno e inclusive a condiciones 'casi' anaerobicas; por esto, el objetivo de la presente tesis ha sido el estudio del efecto de la tensión de oxígeno en la formación de la cadena respiratoria de este bacilo.

En el presente estudio se aportan evidencias que vienen a apoyar y complementar la tesis de que Bacillus cereus posee un sistema respiratorio complejo el cual es capaz de responder y modificarse si las condiciones para su crecimiento son cambiadas.

\* NOTA: El resumen fue traducido del trabajo publicado por Escamilla y Benito (6) y aumentado con las tablas y figuras del mismo estudio.

---

ENZIMA (Act. Especifica)*	ETAPA CELULAR**		RELACION EN LA ACTIVIDAD:
	Ves.	Esp. T3	Esp. T3 / Ves.

---

OXIDORREDUCTASAS:

Succinato:PMS-DCPIP	148	202	1.36
NADH:DCPIP	55	342	6.20

OXIDASAS:

Succinato	18	18	1.00
NADH	43	296	6.88
Ascorbato+TMPD	35	346	9.99

---

Tabla I.- Actividades respiratorias presentes en membranas de Bacillus cereus crecidas normalmente.

\* Las actividades específicas están expresadas como nmol (minuto . mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidorreductasas y como nAtO<sub>2</sub>(minuto . mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidasas.

\*\* Las células vegetativas fueron cosechadas a A540= 1.25 y las esporulantes (T3) a las 3.5 horas después de iniciada la esporulación. La preparación de membranas se describe en métodos.

CITOCROMOS	S U S T R A T O S					
	NADH		ASC:TMPD		SUCC.	
	CELULAS		CELULAS		CELULAS	
	VEG.	ESP.	VEG.	ESP.	VEG.	ESP.
b555	51	-51	30	-30	Menos del	
c548	90	-81	90	-81	10% en todos	
a + a3	70	-75	70	-75	los citocromos	

Tabla II.- Niveles de reducción de citocromos en % evocado por diferentes sustratos en etapa vegetativa y esporulante.

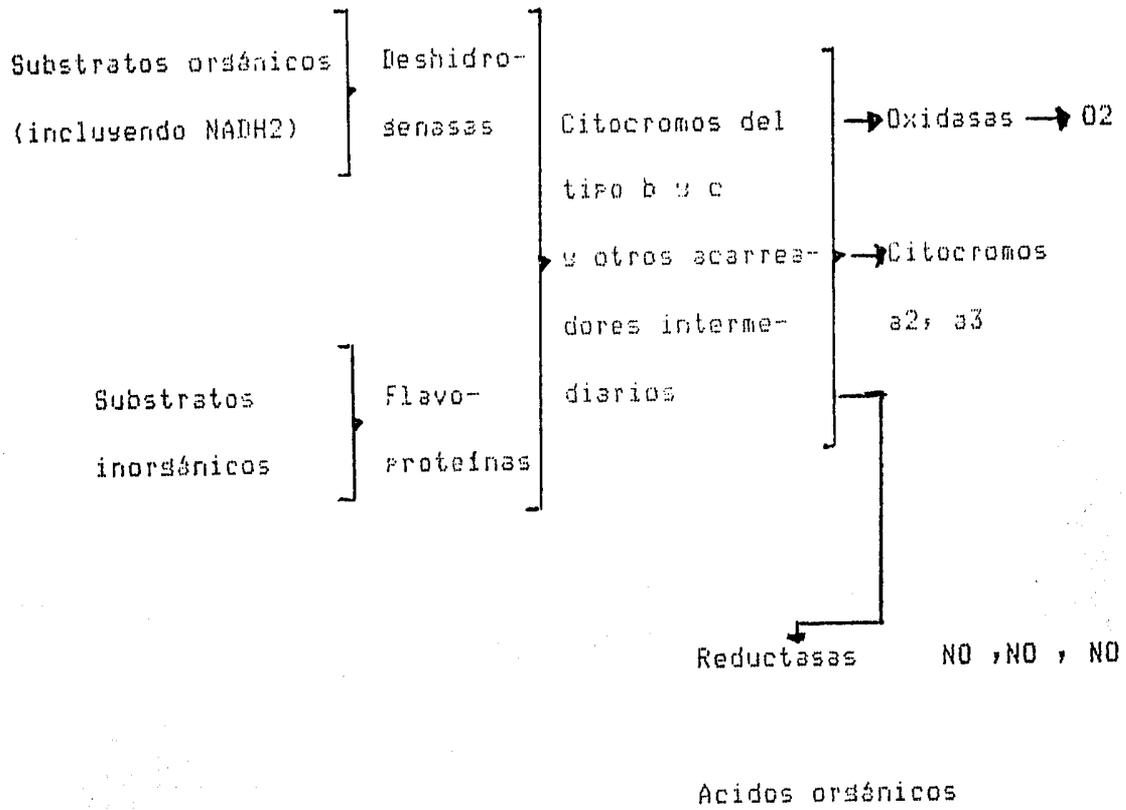
\* Los niveles de reducción fueron calculados de los espectros de "Steady State".

GENERALIDADES: SISTEMA RESPIRATORIO Y ESPORULACION BACTERIANA.

#### SISTEMA RESPIRATORIO BACTERIANO

La mayoría de las bacterias poseen CR, esto es, disponen de un sistema capaz de transportar al través de la membrana los electrones donados por el sustrato hasta el aceptor final (19) el cual variará dependiendo del tipo de bacteria; en organismos aerobicos el aceptor final es el oxígeno mientras que en los anaerobicos facultativos puede ser el oxígeno, nitrato o sulfato (10).

A pesar de que existe una gran similitud en la CR de la mayoría de las bacterias (3), L. Smith propuso un modelo general de SR considerando que hay una gran variación de los componentes de la CR tales como sustratos y aceptores terminales que son difíciles de combinar en un solo esquema (10). El modelo es el siguiente:



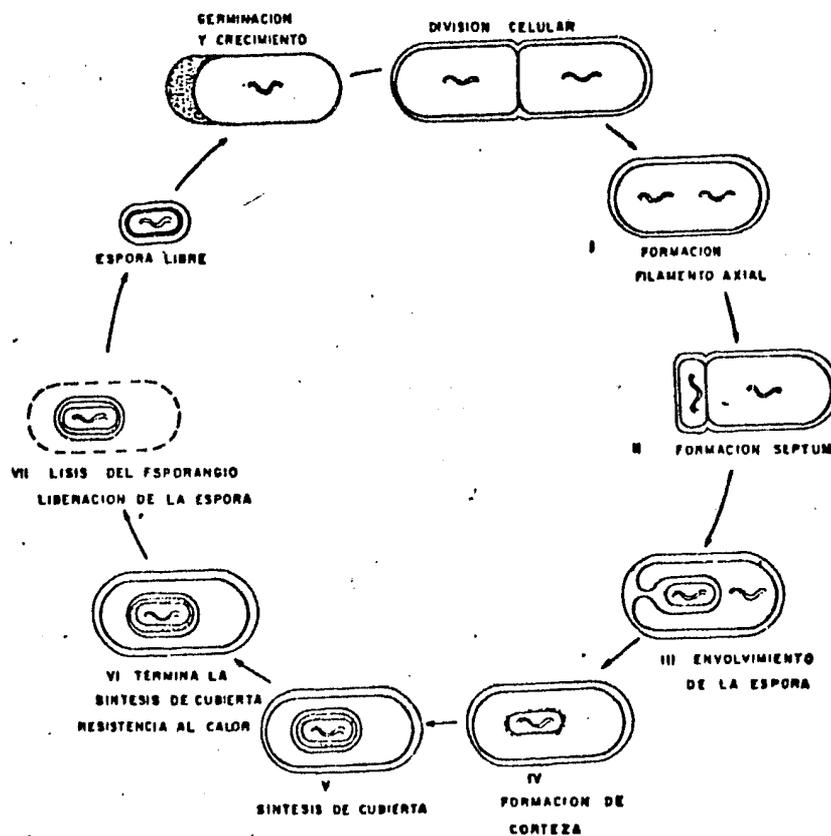
Al comparar los modelos de SR para las diferentes especies de bacterias incluyendose las de este estudio nos percatamos que todos coinciden de alguna forma en el modelo general descrito por L. Smith. (10).

#### B) ESPORULACION BACTERIANA

La esporulación constituye un caso especial de adaptación celular a la disponibilidad de nutrientes en el medio ambiente(24). Este

proceso generalmente ocurre al final de la etapa de crecimiento exponencial. La esporogénesis es un proceso secuencial que se presenta siempre y cuando tenga la capacidad genética y las condiciones ambientales propicias en el cual cada célula en lugar de dividirse producirá una espora intracelular (endospora) en tiempo de 8 a 10 horas (6,12).

En la siguiente figura se representa esquemáticamente las siete etapas morfológicas en que ha sido dividido el proceso de la esporulación (24).



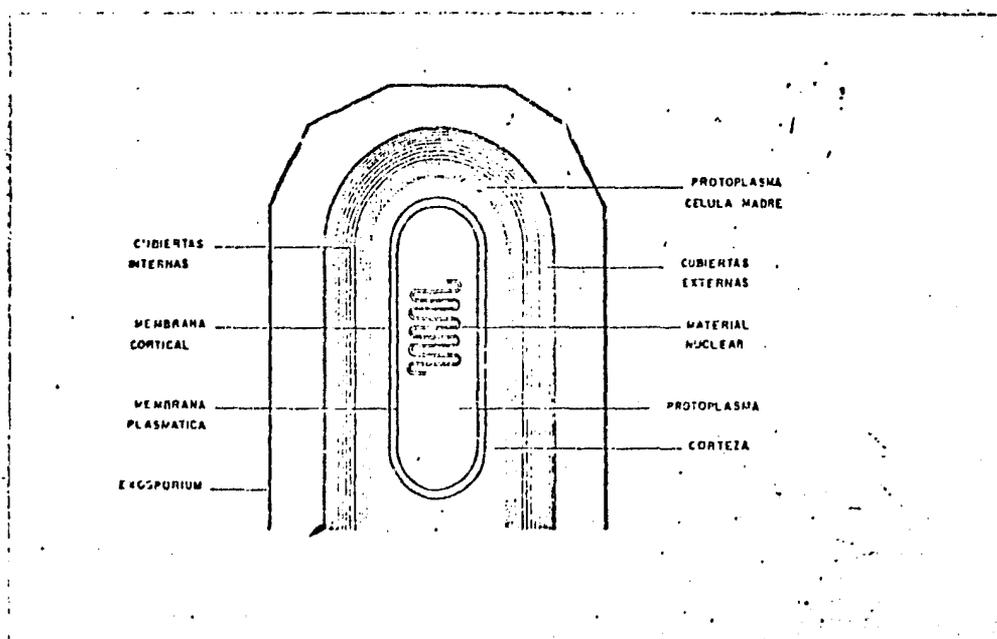
El estadio 0 representa a la célula vegetativa conteniendo dos cuerpos de cromatina en estado de división mientras que la espora contiene sólo uno.

Al final de la fase vegetativa e inicio de la esporulante (estadio I) los cuerpos de cromatina continúan cambiando hasta constituir un filamento axial dentro de cada célula. A la formación de este filamento y la compartimentalización de ADN viene la invaginación de la membrana celular que dará origen al septo preesporal. Del filamento axial formado, una parte será destinada al compartimento correspondiente a la célula madre que ocupa dos terceras partes del esporangio y la otra corresponderá al de la preespora que ocupa el volumen restante. El estadio III lo vemos representado por el englobamiento de la preespora debido al continuo crecimiento de la membrana en la cual las superficies membranales que normalmente estaban en contacto con el exterior de la célula, ahora se ponen en contacto con el citoplasma de la preespora, por lo cual, la polaridad de la membrana preesporal externa está invertida en relación a la polaridad de la membrana citoplasmática (15). La etapa IV marca el inicio de la formación de la corteza en la superficie de la membrana; se incorporan los ácidos diaminopimélicos (constituyentes de la corteza) y la cisteína (constituyente de las cubiertas de la espora). Esta etapa es seguida por la terminación de las cubiertas proteínicas

de la espora y la síntesis de ácido dipicolínico (DPA) que es transportado al igual que el calcio al interior de la espora. Con el desarrollo final de la corteza la mayoría de las células esporulantes llevan a cabo un blanqueamiento (termorresistencia) de la preespora y consecuentemente la maduración de la misma (etapa V y VI). Finalmente, en el estadio VII se manifiesta la liberación de la espora madura mediante la autólisis del esporangio ocasionado por enzimas líticas. La secuencia de eventos que tiene lugar después del estadio VI tiene una duración aproximada de 7 horas en Bacillus cereus bajo condiciones normales de crecimiento (medio modificado G) (16, 24).

C) ESTRUCTURA DE LA ESPORA BACTERIANA

La siguiente figura corresponde a un modelo de espora bacteriana con sus respectivos componentes.



En la parte exterior se aprecia al microscopio electrónico la estructura llamada exosporio que es una cubierta delgada de configuración variable formadora de las cubiertas multilamelares de naturaleza protéica. Las proteínas del exosporio son resistentes a la acción de proteasas susiriendo una función protectora de ésta estructura. Por debajo de las cubiertas y separadas por una delgada membrana se encuentra la corteza ocupando aproximadamente el 50% del volumen de la espora y compuesta en su mayor parte por polímeros de peptidoglicano. El protoplasto o citoplasma de la espora aislado de la corteza por la membrana plasmática contiene el material genético de la espora y la mayor cantidad de calcio y DPA que se acumulan durante la esporulación (7, 24).

#### D) PROCESOS METABOLICOS Y BIOQUIMICOS

La esporulación más que una etapa obligada en varias especies de bacilos es una respuesta al agotamiento de algún nutriente de rápida utilización en el medio; generalmente glucosa y la fuente de nitrógeno (6, 24).

Durante la etapa de crecimiento vegetativo las células utilizan

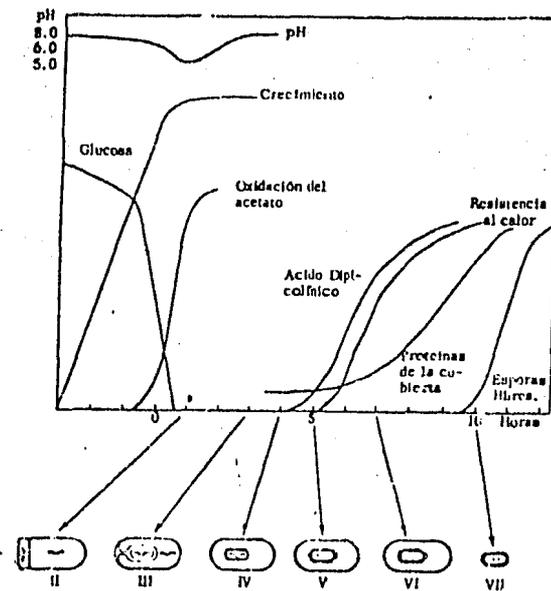
casi exclusivamente la vía glucolítica para catabolizar los carbohidratos disponibles principalmente la glucosa. Como consecuencia de este proceso las células excretan al medio productos metabólicos intermedios (ácido pirúvico, acético y láctico) provocando la disminución del pH del cultivo (7).

En el transcurso del crecimiento exponencial las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) se encuentran reprimidas y por ende no funcionales (16).

Los ácidos acumulados durante el crecimiento vegetativo empiezan a ser utilizados al inicio de la esporogénesis conduciendo a la recuperación del pH del medio casi a su valor inicial. Paralelamente, el Ciclo de Krebs se hace funcional aumentando la presencia de las enzimas citrato sintetasa, aconitasa fumarasa y la enzima mólica (24). La síntesis y degradación del ácido poli-beta-hidroxibutírico presente en el interior de las células esporulantes, la degradación de las proteínas de los diferentes tipos de ARN y la síntesis de nuevas moléculas también se llevan a cabo durante la esporulación. En esta fase ocurre un incremento notable en la actividad de NADH Oxidasa en comparación a la actividad respiratoria durante la etapa vegetativa (7).

E) EVENTOS FISIOLÓGICOS

La secuencia de eventos que ocurren durante la esporulación se representa gráficamente en la siguiente figura:



La esporulación se inicia principalmente con el agotamiento de sus fuentes de carbono y de nitrógeno. Al inicio de la fase esporulante se presentan las enzimas del Ciclo de Krebs y las enzimas catabolizadoras de la arginina, la purina nucleosido fosforilasa y algunas exoenzimas (proteasas, ribonucleasas, amilasa) ausentes durante

el crecimiento exponencial. En la etapa propiamente esporulante (13) se inicia la acumulación de calcio, síntesis de ácido dipicolínico (hora y media después de iniciada la incorporación del calcio), síntesis de las proteínas de las cubiertas multilamelares, síntesis del peptidoglucano cortical y seguramente otras enzimas que participan en la esporulación pero no han sido estudiadas (17).

## MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se empleó una cepa de Bacillus cereus aislada y caracterizada por Andreoli y colaboradores (15) y donada por California State University, Los Angeles, USA. La cepa se mantiene en viales de agar nutriente a temperatura de 4°C.

## A) MEDIOS DE CULTIVO Y CONTROL DE CRECIMIENTO.

El procedimiento para la obtención del bacilo fue prácticamente el mismo para los cultivos aerobios, "cuasi" anaerobios y anaerobios salvo el flujo de aire aplicado a cada uno de ellos.

El control y las condiciones de crecimiento para los cultivos aerobios y microaerofilicos fue el siguiente: se prepararon y esterilizaron 13 litros de medio modificado G (20) que tiene la siguiente composición:

0.1% Extracto de levadura

0.1% Sacarosa (azúcar refinada)

0.2%  $(NH_4)_2 SO_4$

0.05%  $K_2HPO_4$

0.02%  $Mg SO_4$

0.005% Mn SO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O

0.0025% Ca Cl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O

0.0005% Cu SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

0.00005% Fe SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

0.00002% Co SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

0.0005% Zn SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

de esta cantidad 12 litros fueron destinados al biofermentador (Biofermentadores New Brunswick Scientific Co. y Centro de Instrumentos, UNAM.) para el crecimiento masivo de la bacteria, el resto, fue repartido en cantidad de 50 y 500 ml; 10 matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio y un matr az de 2 litros con los restantes 500 ml.

Los pasos secuenciales para el crecimiento del cultivo fueron los siguientes: de la cepa del bacilo mantenida en visles se tomó una asa y se inoculó un matr az conteniendo 50 ml de medio, se dejó en agitación a 200 rpm y temperatura de 30<sup>o</sup> C , de este matr az, aproximadamente 3 horas después cuando se observó crecimiento (opalescencia del medio), se tomó 1 ml del cultivo y se transfirió a otro de los matraces de 250 ml con medio, el procedimiento se repitió de la misma manera en 4 ocasiones más a intervalos de 3 horas aproximadamente con la intención de homogeneizar y sincronizar el crecimiento del organismo de acuerdo a la técnica de cultivo activo de

Collier (21). De la última transferencia se tomó 5 ml de muestra y se pasó al matríz de 2 litros conteniendo 500 ml de medio, posteriormente y cuando se apreció crecimiento el biofermentador fue inoculado con el contenido total del matríz de 2 litros acompañado de 120 ml de solución de sulfato de manganeso, 12 g de sacarosa y 12 g de extracto de levadura disueltos en 250 ml de agua destilada cada uno, preparados y esterilizados por separado. Para cuando el biofermentador fue inoculado éste ya mantenía el medio modificado G (los 12 litros) a una temperatura de 30°C, agitación de 200 rpm y presión de 20 psi, el flujo de aire varió de 8, 4 y 2 litros por minuto dependiendo del tipo de cultivo. Los cultivos microaerofílicos sólo disponían del oxígeno que se introducía al biofermentador a presión atmosférica a través de un conducto comunicado y abierto al exterior.

El crecimiento fue seguido espectrofotométricamente midiendo la turbidez del cultivo a 540 nm (Espectrofotómetro Beckman Modelo 35), el pH en un potenciómetro y la respiración en un oxímetro YSI. Los cultivos fueron examinados periódicamente al microscopio de contraste de fases para evaluar el estado de crecimiento y el grado de sincronía. En la etapa adecuada para cada experimento las células fueron cosechadas por centrifugación a 5100 x g en una centrífuga de flujo continuo (Sharples, Modelo T 1) posteriormente resuspendidas y lavadas tres veces en Buffer Tris HCl 0.2 M, pH 7.4 adicionado de Ca

C12 5 mM (Buffer TMC) a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C en una Centrifuga Sorvall RC 2B. (20)

El mismo procedimiento se siguió para el crecimiento anaerobico con la salvedad de que el medio de cultivo fue cambiado por otro más rico en nutrientes:

Tripticasa (BBL)	29 g/lit
Extracto de levadura	10 g/lit
Sacarosa	5 g/lit
Fe Cl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	7 mg/lit
Mn Cl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	15 mg/lit
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15 mg/lit
Nitrato de potasio	1 g/lit

El pH fue ajustado frecuentemente a 7.4 para evitar lisis en el cultivo. El oxígeno presente en el biofermentador fue desplazado con flujo continuo de nitrógeno de alta pureza para garantizar un ambiente y crecimiento totalmente anaerobico. El nitrato de potasio se usó como aceptor final de electrones en sustitución del oxígeno.

## B) PREPARACION DE MEMBRANAS

Las células obtenidas fueron resuspendidas en 100 ml de buffer TMC y se rompieron en un fraccionador celular (Ribi Cell, Modelo RM-1 Ivan Sorvall Inc.) a 30,000 psi y 4°C. El producto obtenido se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave en presencia de unos pocos cristales de ADNasa I (Sisma DN-100) con la finalidad de eliminar la viscosidad producida por el ADN liberado, luego se añadió 100 ml de buffer Tris-HCl y se centrifugó a 10,000 x g durante diez minutos, de aquí, el precipitado se desechó y el sobrenadante (que es donde se encuentran las membranas) se centrifugó a 40,000 x g durante 45 minutos para sedimentar las membranas (BECKMAN, LS-50B Ultracentrifuga). El paquete se lavó tres veces siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, las membranas se resuspendieron en 5 a 8 ml de buffer K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 7.2 y se almacenaron en nitrógeno líquido para su utilización posterior. La proteína de la membrana fue determinada por el método de Lowry (22).

C) ENSAYOS ENZIMATICOS

1) OXIDASAS:

Las actividades fueron determinadas por el método polarográfico empleando el oxímetro modelo 52 (Yellow Springs Instruments). Las actividades de oxidasas se expresaron como nanoátomos de oxígeno consumido por minuto por miligramo de proteína [  $\text{nAtO}_2(\text{min. mg proteína})^{-1}$  ]. En los casos en que se presentó autooxidación de los reactivos (colorantes) los valores fueron corregidos.

La mezcla y método para el ensayo tenía el siguiente contenido llegando a un volumen final de 3 ml en la cubeta del oxímetro:

a) NADHoxidasa

	Cant. Agregada	Conc. Final
a) Buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2 M pH 7.6	0.75 ml	0.05 M
b) Membranas (0.2 a 0.5 mg)	0.1 ml	
c) $\text{H}_2\text{O}$ destilada		

Se colocó el electrodo y se registró basal

d) NADH 50 mM	0.2 ml	0.5 mM
---------------	--------	--------

Se registró durante tres minutos la actividad

e) KCN 3 mM	0.1 ml	0.1 mM
-------------	--------	--------

b) Succinato oxidasa

a) Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 M pH 7.6	0.75 ml	0.05 M
--	---------	--------

b) Membranas (1 a 1.5 mg)	0.1 ml	---
---------------------------	--------	-----

c) Succinato 0.6 M	0.1 ml	0.21 M
--------------------	--------	--------

d) H <sub>2</sub> O destilada	1.05 ml	---
-------------------------------	---------	-----

e) KCN 3 mM	0.1 ml	0.1 mM
-------------	--------	--------

Se incubó cinco minutos sin electrodo para activar, después se colocó el electrodo y se midió la actividad durante diez minutos.

NOTA: Se corrió un control al principio sin succinato para conocer la actividad basal (reacción química).

c) Ascorbato: TMPD o DCPIP oxidasa

a) Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 M pH 7.6	0.75 ml	0.05 M
b) Ascorbato 0.3 M	0.05 ml	7.5 mM
c) DCPIP 9.0 mM o TMPD 2.0 mM	0.05 ml	0.2 mM
d) H <sub>2</sub> O destilado	1.15 ml	---

Se registró dos minutos la basal y se inició la reacción con membranas.

e) Membranas (0.2 a 0.5 mg)	0.1 ml	---
f) KCN 3 mM	0.1 ml	0.1 mM

## 2) OXIDORREDUCTASA

### a) Succinato:PMS+DCPIP oxidoreductasa

El ensayo se realizó de acuerdo al reportado por Lang y colaboradores (13) en una mezcla de tres mililitros a 30° C conteniendo: buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.6, membranas (aproximadamente 0.4 mg de proteína), succinato disódico 20 mM, metasulfato de fenazina (PMS) 0.08 mM (Baker) llevados a un volumen final de 3 ml con agua destilada. La mezcla de ensayo se incubó durante tres minutos antes de la adición de los colorantes. La reducción del DCPIP se siguió espectrofotométricamente a 600 nm (Espectrofotómetro Unicam SP 1800). Se registró la actividad durante tres

minutos y se adicionó KCN 0.1 mM. La actividad dependiente de cianuro se cuantificó por el cambio producido en la pendiente después de la adición del mismo.

La actividad se expresó como nanomolas de DCPIP reducido por minuto por miligramo de proteína [ $\text{nmol}(\text{min} \cdot \text{mg de proteína})^{-1}$ ].

El coeficiente de extinción molar utilizado para el DCPIP fue 21  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

b) NADH:DCPIP oxidoreductasa.

El ensayo fue realizado de acuerdo a lo reportado por Lang y colaboradores (13). La mezcla de ensayo contenía buffer de fosfato de potasio 50 mM a pH 7.6; membranas, NADH 1.4 mM, DCPIP 0.08 mM y agua destilada hasta volumen final de 3 ml. La mezcla se incubó durante tres minutos. La reacción se inició con DCPIP. La adición de cianuro y la reducción de DCPIP se llevaron a cabo igual que el ensayo anterior.

D) ANALISIS ESPECTRAL DE CITOCROMOS.

Los pigmentos respiratorios asociados con las membranas aisladas de células vegetativas y esporulantes fueron identificados por espectros diferenciales de reducido VS oxidado a temperatura ambiente y de nitrógeno líquido (77°K) en un espectrofotómetro de doble rayo (Aminco DW 2). Las cubetas empleadas para la determinación a temperatura ambiente tenían un paso de luz de 1.0 cm, mientras que las usadas a temperatura de nitrógeno líquido el paso de luz fue de 2.0 mm. En ambos casos las membranas fueron resuspendidas en glicerol al 50% (v/v). Los espectros reducidos VS oxidado se registraron utilizando como reductores NADH 5 mM, succinato 30 mM, ascorbato 10 mM +DCPIP o TMPD 0.3 mM o ditionita (algunos cristales). El reductor se añade a la celda experimental y ambas celdas (muestra y referencia) son congeladas en nitrógeno líquido antes de iniciar la lectura espectrofotométrica.

## RESULTADOS

Para conocer el efecto de la tensión de oxígeno sobre el Sistema Respiratorio (SR) de B. cereus fue necesario hacer crecer éste organismo bajo diferentes condiciones de flujo de aire. Se tomó como referencia los resultados de Escamilla y Benito (6) en su estudio sobre el mismo organismo crecido a 8 litros de aire por minuto (cultivo normal). A partir de esta información el trabajo a realizar fue la obtención de cultivos a diferentes tensiones de oxígeno hasta lograr el crecimiento del bacilo en condiciones anaerobias. Los cultivos aerobios fueron crecidos a 4 y 2 litros de aire por minuto mientras que los microaerofílicos fueron sometidos a la "mínima tensión de oxígeno", esto es, a la cantidad de oxígeno disponible en el medio de cultivo que se introdujo a presión atmosférica al biofermentador a través de un conducto comunicado y abierto al exterior. El aire introducido fue mezclado en el cultivo por medio de agitación a 200 rpm. Para la obtención de cultivos anaerobios, el oxígeno fue desplazado por flujo continuo de nitrógeno de alta pureza.

Los cultivos normales fueron cosechados en el estadio T3 con una sincronía de esporulación del 90% y en el caso de células vegetativas

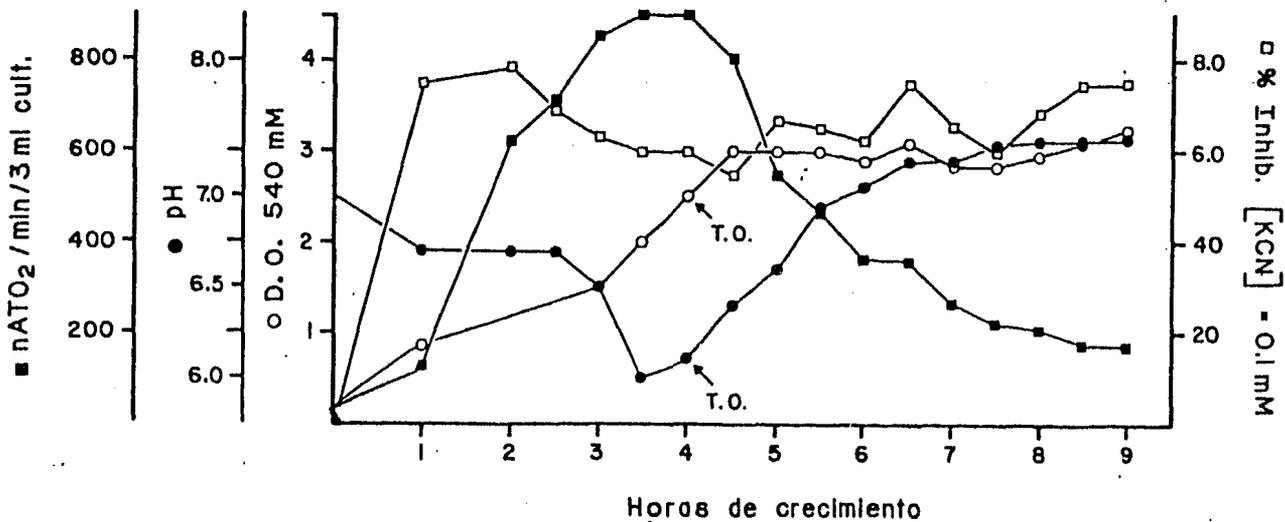
a una densidad óptica de 1.0 ( $A_{540}=1.0$ ). Por lo que respecta a los cultivos microaerofílicos y anaerobios éstos nunca llegaron a esporular cosechándose siempre en la etapa vegetativa ( $A_{540}=1.0$ ). Sin embargo, los cultivos del bacillus a tensiones de oxígeno de 4 y 2 litros de oxígeno por minuto sí alcanzaron la etapa esporulante, aunque les llevo más tiempo que el empleado en cultivos normales. Su cosecha fue en la etapa T5 de esporulación.

Las células obtenidas a 4 litros de aereación no presentaron diferencias significativas en sus características intrínsecas comparandolas con células normales, en cambio los cultivos crecidos a tensión de aire de 2 litros por minuto sí manifiestan diferencias de tipo cuantitativo en los componentes del SR. La manifestación obvia de las diferencias cualitativas y cuantitativas se presentan en la células crecidas en condiciones microaerofílicas y anaerobias.

A) CULTIVOS CRECIDOS A DIFERENTES TENSIONES DE OXIGENO Y EN

CONDICIONES ANAEROBICAS

La siguiente figura representa una gráfica típica de crecimiento y esporulación de B. cereus en medio modificado G bajo condiciones normales: temperatura 30°C, agitación 200 rpm, presión 20 psi y 8 litros de aire por minuto.



A medida que se incrementa la población la demanda de oxígeno aumenta y el pH del medio disminuye debido a los ácidos excretados por las células. El efecto inhibitorio por KCN resulta más efectivo

durante la esporulación que en la etapa vegetativa. Al alcanzarse el estadio T<sub>0</sub> de la esporosénesis (cuatro horas después de la inoculación) el crecimiento celular prácticamente se estabiliza y el consumo de oxígeno disminuye. Por otro lado, el pH se ve restituido casi a su valor original en virtud de que en ésta etapa los productos metabólicos intermediarios (ácidos) empiezan a ser utilizados por las células. Los estadios subsecuentes de esporulación (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, etc.) se obtienen aproximadamente cada hora a partir del T<sub>0</sub> detectado media hora después del pH mínimo registrado y mediante la observación al microscópio de contraste de fases.

La obtención de células crecidas a baja tensión de aire (4 y 2 litros por minuto) prácticamente no presenta problemas; se observó que la restricción de oxígeno a la que fueron sometidas no es limitante para que alcancen la fase esporulante. Sin embargo, el tiempo de crecimiento y esporulación en ambos casos se incrementa; a 4 litros las células alcanzan el estadio T<sub>5</sub> aproximadamente a las 17 horas después de la inoculación, mientras que, a 2 litros de aereación por minuto algunas células se lisan, no obstante, las restantes esporulan bien alcanzando T<sub>5</sub> a las 20 horas de haberse iniciado el crecimiento.

Considerando que no existen diferencias entre las células a 8 y 4

litros de aire por minuto, salvo las descritas anteriormente, se optó por el análisis comparativo de las células que manifiestan alguna diferencia en el comportamiento de su SR.

Si bien la restricción en el flujo de oxígeno a 2 litros por minuto no es limitante para la esporulación, esto no quiere decir que la cadena respiratoria no sufra cambios en sus componentes como lo veremos más adelante cuando analicemos su comportamiento y respuesta a la baja tensión de oxígeno.

Ahora, si revisamos los cultivos microaerofílicos podemos anotar las siguientes limitantes y aclarar que estas células presentan diferencias notables en la formación del SR. Los organismos crecidos bajo estas condiciones presentan dos restricciones principalmente; nunca alcanzan la etapa esporulante y, como consecuencia de lo anterior, no utilizan los ácidos liberados como productos secundarios del metabolismo celular. Debido a que no hay esporulación, los ácidos liberados durante el crecimiento vegetativo no son utilizados y empiezan a ser acumulados en el medio. Debido a ésta acumulación el pH disminuye paulatinamente convirtiéndose en un factor limitante de crecimiento, por esto, es necesario recuperar continuamente el pH a su valor inicial con la adición de fosfato de potasio dibásico al medio de cultivo para evitar que el crecimiento sea reprimido o que se lisen

las células. Este tipo de cultivos alcanzan una densidad óptica estable aproximadamente a las 12 horas de crecimiento; después de este tiempo se puede apreciar lisis.

Otro tipo de células que manifiestan diferencias tanto cualitativas como cuantitativas son aquellas crecidas en condiciones anaerobias.

Los primeros experimentos de crecimiento anaerobio se llevaron a cabo en medio modificado B en ausencia de oxígeno y con ácido fórmico como aceptor final de electrones en sustitución del oxígeno. Los resultados obtenidos por una serie de experimentos indicaron que las condiciones del cultivo no eran las adecuadas para permitir el crecimiento anaerobio. A partir de estas observaciones se modificó el medio de cultivo por otro más rico en nutrientes. Las nuevas condiciones eran: un medio con nitratos como oxidante; nitrógeno para desplazar el oxígeno y supresión del uso del fumarato. El tiempo aproximado de crecimiento de cultivos anaerobios es de 13 horas sin llegar nunca a la etapa esporulante.

Al microscopio se observa movimiento de los bacilos debido quizá a la presencia de un flagelo desarrollado por las células crecidas en este ambiente. Sería oportuno el estudio de este comportamiento en

futuros trabajos.

## B) ACTIVIDADES RESPIRATORIAS Y ANALISIS ESPECTRAL DE CELULAS

### VEGETATIVAS Y ESPORULANTES

El análisis previo de células vegetativas y esporulantes crecidas normalmente nos permite realizar los siguientes análisis y comparaciones. Por un lado las células que fueron reprimidas en el flujo de oxígeno durante su crecimiento y alcanzaron a esporular, y por otro, aquellas que no llegaron a la esporógenesis como son las crecidas en ambiente microaerofílico y las anaerobias.

#### 1) CELULAS ESPORULANTES

Se indicó en un principio que las células crecidas a 4 litros de oxígeno por minuto por no presentar diferencias significativas en relación a las obtenidas en condiciones normales quedaban fuera del análisis comparativo considerándose únicamente a las células esporulantes crecidas a tensión de oxígeno de 2 litros por minuto.

## a) Oxidasas y Oxidorreductasas

La tabla III representa los valores de las actividades respiratorias de membranas de células esporulantes crecidas en medio G a tensión de oxígeno de 8 y 2 litros de aire por minuto.

La comparación de los valores nos indican que las actividades específicas de las membranas esporulantes T5 de cultivos crecidos a 2 litros de aire son más parecidas a las actividades de membranas vegetativas que a las de esporulantes de células normales. De esta forma vemos que la actividad de la NADH oxidasa de células esporulantes de 8 litros es 8.2 veces mayor que la encontrada en células esporulantes de 2 litros de aire, en tanto que, la actividad registrada por la succinato oxidasa del primer tipo de membranas es 1.8 veces mayor que las segundas y la mezcla artificial de ascorbato + TMPD manifiesta de igual manera una mayor actividad en células normales (10.5 veces mayor). El mismo comportamiento se registra para NADH:DCPIP oxidorreductasa, no así para la succinato:PMS + DCPIP que presenta una baja actividad en las membranas esporulantes T5 comparadas con las membranas de cultivos a 8 litros de aire.

La diferencia en la actividad enzimática nos sugiere que existe

una menor concentración de los componentes de la cadena respiratoria conforme se disminuye el flujo de oxígeno en los cultivos. Este dato se corrobora si analizamos los espectros diferenciales correspondientes y vemos que existe la misma composición de citocromos desde el punto de vista cualitativo pero hay una marcada diferencia cuantitativa entre ellos.

La baja actividad de membranas a 2 litros podría considerarse como consecuencia lógica debido a la reducción de flujo de oxígeno durante el crecimiento que viene a afectar seriamente la formación del SR, además de la participación de diferentes factores no controlados cuando se realizaron estos experimentos. A decir de los problemas podemos señalar los siguientes: el registrador del flujo de aire (fluxómetro) no detecta con exactitud la tensión de oxígeno a que son sometidos los cultivos y en especial aquellos que fueron restringidos en la aplicación de éste. Por otro lado, los biofermentadores utilizados en la obtención de células no cuentan con los dispositivos adecuados para registrar no la cantidad de aire aplicado sino la cantidad de oxígeno disponible introducido a través del flujo del primero. Este es quizá el factor que más influencia tuvo en el crecimiento y por ende en la actividad respiratoria por lo siguiente: el oxígeno presente en el aire equivalente al 20% de la mezcla total fue constante durante todo el tiempo, mientras que la demanda por éste

aumentó conforme creció la población, así, la cantidad de oxígeno presente fue distribuido de manera proporcional a los organismos, correspondiendo cada vez menos a medida que transcurrió el tiempo y la población creció. Por lo tanto, no podemos asegurar que los cultivos fueron crecidos con la misma cantidad de oxígeno durante todo el tiempo. A pesar de lo anterior, el manejo de los resultados obtenidos no altera ni modifica la interpretación que de estos se haga ya que todos los tipos de cultivos estuvieron sometidos a las consecuencias y efectos descritos anteriormente.

Consideramos que los resultados aquí plasmados serían los mismos si el control de oxígeno fuera más estricto, salvo la mayor definición y exactitud de los resultados obtenidos en cada experimento.

Para futuros trabajos ya se cuenta con equipo acondicionado para el control de oxígeno por medio de un electrodo que detecta la cantidad de oxígeno presente a la vez que indica y regula el flujo de aire que entra al biofermentador, superándose de esta manera los obstáculos presentados.

b) Citocromos Asociados a Membranas Esporulantes

La figura 6 representa los espectros diferenciales reducidos con ditionita, NADH, ascorbato + TMPD y succinato de membranas esporulantes de cultivos crecidos a 2 litros de aire por minuto.

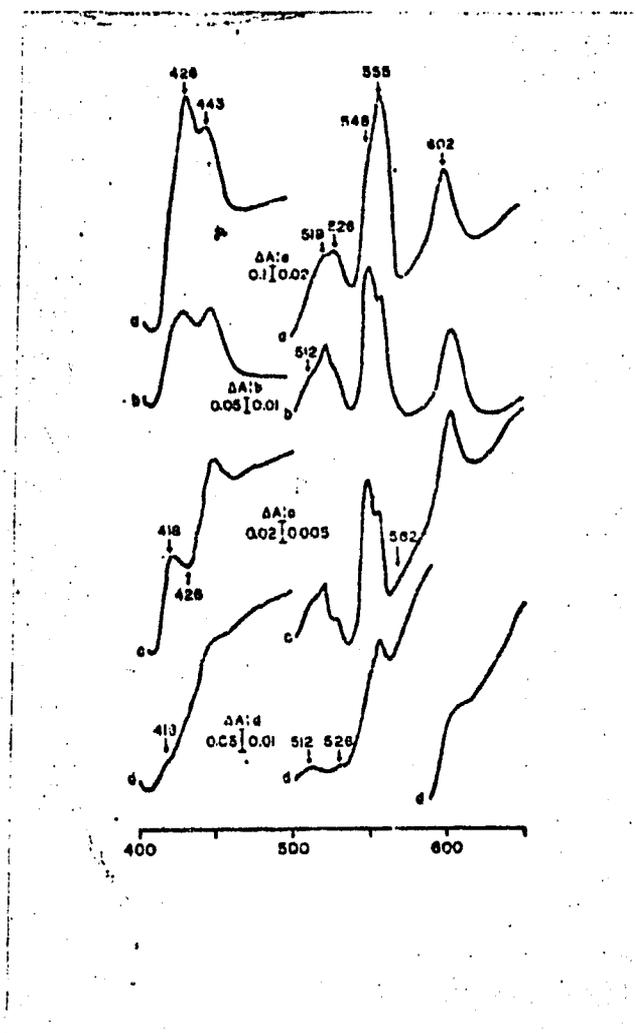


FIGURA 6

El siguiente análisis se hace comparativo entre éstas membranas y

las obtenidas normalmente en etapa esporulante.

La reducción completa de la cadena respiratoria con ditionita no exhibe ninguna diferencia notable entre los componentes del sistema de ambos tipos de membranas esporulantes. En todos los casos se presentan picos a 426, 526 y 555 nm correspondiente a citocromo b y otro a 443 nm que se relaciona con el citocromo a<sub>3</sub>. En la región ALFA aparece citocromo c representado por los picos a 519 y 548 nm que se manifiestan como hombros no muy bien definidos. El citocromo a + a<sub>3</sub> es reducido perfectamente (pico a 602 nm).

Los espectros diferenciales reducidos con NADH, succinato y ascorbato:DCPIP tampoco presenta grandes diferencias cualitativas en la presencia de citocromos, en cambio, la capacidad reductora de NADH en membranas crecidas a 2 litros de oxígeno manifiesta diferencias cuantitativas en la reducción de algunos citocromos, por ejemplo, el citocromo a<sub>3</sub> (443 nm) se incrementa mientras que b (426 nm) disminuye exhibiendo al mismo tiempo un ligero hombro a 416 nm que corresponde a citocromo c y otro hombro con mayor definición a 512 nm. El pico de citocromo c a 520 nm aumenta notablemente mientras que, en cultivos normales casi no se presenta. El tamaño de los picos de citocromo c y b (548 y 555 nm respectivamente) se invierten y se aprecia un ligero hombro a 564 nm que se relaciona con citocromo o. La reducción de

membranas normales con ascorbato + TMPD desenmascara claramente óste citocromo a 562 nm.

El análisis del espectro diferencial de membranas esporulantes de cultivos a 2 litros de oxígeno reducidos con ascorbato:DCPIP nos exhibe perfectamente la presencia de citocromo c (416 nm) y la formación de un valle a 426 nm en lugar del pico para citocromo b, por otro lado, aparece citocromo a3 (445 nm) y un hombro a 450 nm cuyo componente desconocemos. La reducción de los citocromos que se localizan en la región 500-650 nm del espectro, se comporta de manera similar con ascorbato:DCPIP que con NADH; se presentan picos en el mismo orden y comportamiento. La reducción con succinato no presenta variación si comparamos los espectros de membranas normales con las de cultivos crecidos a tensión de 2 litros de oxígeno por minuto. La diferencias notables entre ambos espectros son: en membranas de 2 litros de oxígeno aparece citocromo c (418 nm) y citocromo a3 (443 nm) formando ligeros hombros mientras que el citocromo b a 426 nm queda enmascarado. En el espectro comparativo el pico de citocromo b (426 nm) se observa claramente pero no se aprecia ni citocromo c ni a3 en el mismo rango de absorción del anterior. En la región de 500-650 nm ambos espectros presentan un pico a 512 nm (de composición desconocida) y otro a 526 nm que corresponde a citocromo b con la observación de que, el pico a 512 nm es mayor en células a 2 litros de

aire y el citocromo b se deja ver mejor en células normales.

Analizando los diferentes reductores empleados en membranas a 2 litros de aire observamos que: a primera vista y comparandolo con el espectro reducido con ditionita (figura a) se observa que la reducción de la cadena con NADH y ascorbato + TMPD incrementa los picos correspondientes al citocromo c (443, 519 y 548 nm) y reduce con menor efectividad al citocromo b (426, 526 y 555 nm), en cambio, la reducción de la oxidasa terminal a + a<sub>3</sub> no se ve modificada grandemente. Una observación más es la presencia de un hombro a 512 nm en los espectros b y c (NADH y ascorbato + TMPD respectivamente) así como un pico a 416 y valle a 426 nm referido a citocromo c y un hombro a 562 nm relacionado con citocromo o en el espectro c.

La incubación de las membranas por períodos de 40 minutos y reducidos con NADH nos permite observar con mayor claridad el citocromo c a 416 nm así como el resto de la cadena del SR (no se muestra).

La capacidad reductora con succinato es muy pobre desenmascarando a pesar de eso, la presencia de citocromo c a 416 y un pico a 512 nm, así como, citocromo b y a + a<sub>3</sub>.

La formación y niveles de reducción de los citocromos de las membranas analizadas responden hasta este momento al modelo de Cadena Respiratoria postulado por Escamilla y Benito (6) donde se plantea la presencia no sólo del citocromo  $a + a_3$  como única oxidasa terminal sino la participación del citocromo b 562 que dona los electrones directamente al oxígeno teniendo función homóloga al citocromo oxidasa  $a + a_3$ .

Otra oxidasa terminal es el citocromo  $a_2$  que se manifiesta bajo las condiciones que a continuación revisaremos.

## 2) CELULAS VEGETATIVAS

Las células crecidas en condiciones de anaerobiosis y microaerofílicas presentan diferencias harto elocuentes comparadas con las normales no sólo en que no alcanzan la fase esporulante sino en la composición de su SR.

A pesar de que ambos tipos de membranas provienen de células vegetativas es pertinente hacer algunas aclaraciones que nos lleven a una mejor diferenciación y entendimiento en cuanto a su comportamiento y respuesta a las condiciones en que fueron obtenidas.

La primera y principal diferencia consiste en que mientras unas fueron crecidas en presencia de oxígeno (microaerofílicas) las otras fueron obtenidas en condiciones anaerobias y en medio de nutrientes diferentes (ver método).

Las características de estas membranas serán analizadas y comparadas con las del tipo vegetativo de células normales.

La tabla IV presenta las actividades respiratorias de membranas a 8 litros y microaerofílicas mientras que la tabla V corresponde a membranas anaerobias. La primera apreciación es la respuesta respiratoria a la presencia de oxígeno en los cultivos: la lógica sigue conservándose, pues la actividad respiratoria de membranas anaerobias es menor a las microaerofílicas a la vez éstas son menores a las de 2 litros y obviamente a las normales. Si revisamos las columnas correspondientes a la actividad específica de células normales dividida entre la actividad específica de cada una de las otras membranas obtenemos los valores correspondientes a la cantidad de veces que es mayor la actividad respiratoria de membranas normales. Así, observamos que las membranas vegetativas normales es 2.54 y 1.90 veces mayor para NADH y ascorbato + TMPD oxidasas respectivamente en relación a las microaerofílicas, en tanto que, comparadas con las anaerobias es 4.09 y 6.66 en el mismo orden y 7 veces más con

succinato oxidasa.

La baja actividad de la ascorbato + TMPD oxidasa puede ser atribuida a la casi total ausencia del citocromo c, pues como vimos en algún momento éste reductor dona directamente los electrones al citocromo mencionado; por otro lado, la NADH oxidasa es pobre en su actividad ya que no cuenta con un sistema acarreador de electrones tan completo como el disponible en membranas normales. Ahora, la succinato oxidasa que tiene una baja actividad reductora, aquí, se ve prácticamente eliminada en su función.

Si las oxidasas se ven limitadas en su función enzimática, entonces, las oxidorreductasas corren el mismo riesgo en tanto que existe una relación intrínseca entre ambas actividades respiratorias, por ejemplo, en membranas normales vemos que las actividades de las oxidasas (al menos la NADH) se incrementan respondiendo a la gran actividad de las oxidorreductasas y en las microaerofílicas y anaerobias disminuye en respuesta a la poca actividad específica de los componentes del sistema ya que la cadena respiratoria se ve modificada seriamente.

Veamos espectrofotométricamente los cambios que se han mencionado.

a) Membranas Microaerofilicas

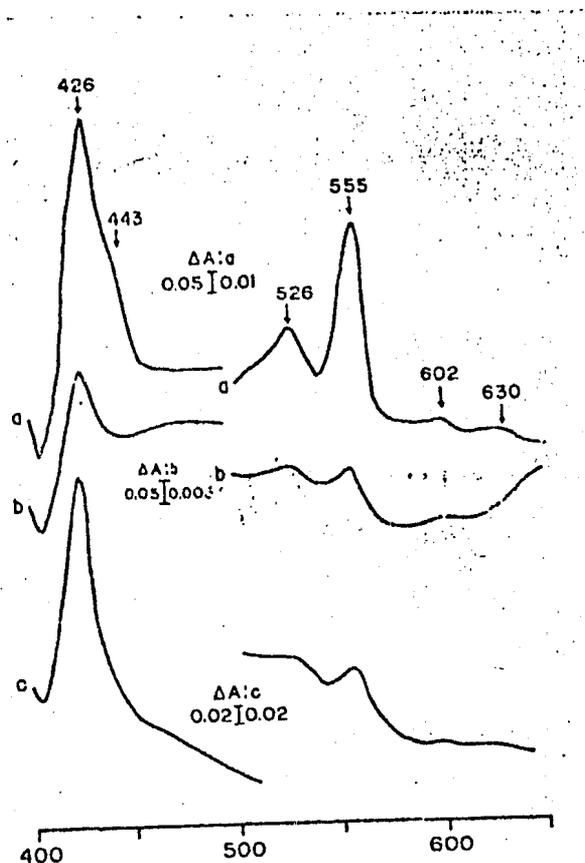


FIGURA 7

Tres son los cambios manifestados claramente en éste tipo de membranas; primero, se incrementa el citocromo b y casi desaparece c; segundo, disminuye drásticamente la presencia de citocromo oxidasa a + a3 ya que ésta es una oxidasa de células aeróbicas que al desarrollarse en un medio microaerofílico su presencia y función pasa a un segundo plano y; tercero, se manifiesta un citocromo afín por el oxígeno capaz de captar la poca cantidad de éste en el medio. Este citocromo es lo que se ha considerado como la tercera oxidasa terminal del SR de *Bacillus cereus*; citocromo a2.

Los espectros reducidos con ditionita, NADH y ascorbato + TMPD o DCPIP dejan ver gráficamente lo señalado con anterioridad, salvo la reducción con succinato que manifiesta una débil capacidad reductora de la cadena (no aparece en la figura).

Cuando inhibimos la actividad respiratoria con KCN 1.0 mM nos percatamos que ésta no se detiene completamente; la actividad de NADH 2.5 mM disminuye totalmente a altas concentraciones de KCN al igual que TMPD 2 mM suscribiendo y apoyando la tesis de que el citocromo a + a3 no es la única oxidasa terminal en el sistema e indicando que hay vías alternas de flujo de electrones con diferente sensibilidad al cianuro siendo éstas las que hemos mencionado con anticipación; citocromo b 562 y citocromo a2, aunque no está completamente definido

cómo éstos citocromos responden a la inhibición por cianuro.

b) Membranas anaerobicas

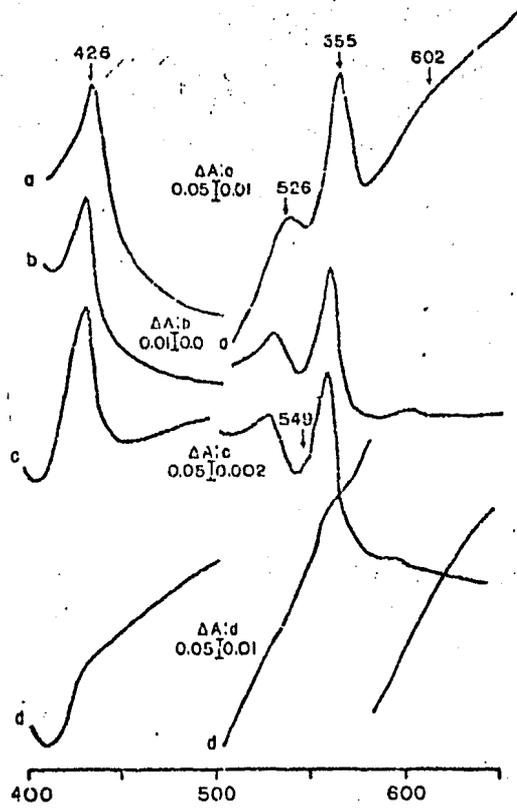


FIGURA 8

La respuesta de éstas células a las condiciones de crecimiento es rotunda; sólo sintetiza citocromo b y muy sobreamente citocromo a + a3. La formación del SR con estos componentes se debe a que las condiciones de crecimiento fueron en extremo estrictas y limitantes a pesar de que disponía de un medio de cultivo exasgeradamente rico en nutrientes acompañado de nitrato como aceptor final de electrones.

### c) Citocromos Formando Complejos con CO

En los espectros de membranas anaerobicas y microaerofilicas (a y b respectivamente) reducidos con ditionita + CO VS reducidos con ditionita a temperatura ambiente podemos identificar la presencia de los citocromos b 562 y a2.

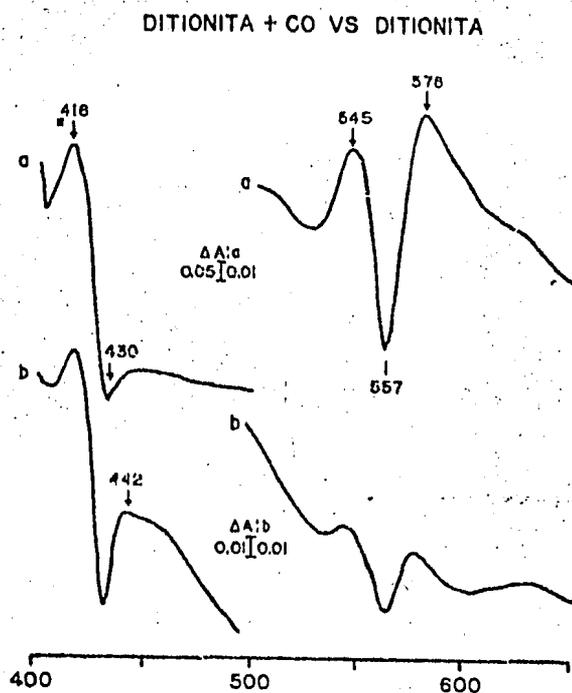


FIGURA 9

La incubación con asitación de la membranas reducidas con ditionita en ambiente saturado de CO revela claramente la presencia de los dos diferentes citocromos unidos a monóxido de carbono. Cuando las membranas fueron sometidas a periodos de incubación de 9 y 15 minutos apareció un pico a 416 nm acompañado de un valle a 430 nm, sugiriendo la presencia del citocromo b 562 unido a CO.

Con respecto a citocromo a2 cabe aclarar que la reacción con monóxido de carbono provoca un cambio en el pico de reducción ampliando la longitud de onda (23), por esto, la presencia de a2 la localizamos en el pico alrededor de los 643 nm y no en el rango de absorción de 630 nm como se presenta generalmente en los cultivos microaerofílicos.

#### d) Concentración de Citocromos Asociados a Membranas

La concentración individual de citocromos asociados en membranas vegetativas de células microaerofílicas y anaerobias fue calculada de los espectros diferenciales reducido con ditionita VS oxidado y reducidos con ditionita + CO VS reducidos con ditionita. Los valores obtenidos fueron comparados con los reportados por Escamilla y Benito (6) tabla VI.

Se reporta que la concentración de citocromos de membranas esporulantes es mayor a la de vegetativas (ambas de células normales) con incrementos que van de 1.76 a 4.33. Ahora, si revisamos la concentración de citocromos de membranas vegetativas tanto de células normales como de microaerofílicas y anaerobias nos percatamos que la concentración de citocromos presentes en los dos últimos tipos de

membranas es mayor a las normales: la presencia de citocromo b555 es 2.0 y 1.5 veces mayor en membranas microaerofílicas y anaerobias respectivamente, en tanto que, citocromo 0-CO (b 562) es 5.4 y 4.4 en el mismo orden. Por lo que respecta a citocromo a2 y los restantes no se tiene relación porque, a2 aparece en trazas y los otros no se presentan o se manifiestan en pequeña proporción ( figuras 7,8 y 9).

ENZIMA (Act. Especifica)**	TENSION DE OXIGENO Y ETAPA CELULAR *				
	8 LTS/MIN		RELACION DE ACT.	2 LTS/MIN	
	Ves.	Esp. T3	Esp. T3/Ves.	Esp. T5	RELACION DE ACT. Esp. T3/T5
<b>OXIDASA:</b>					
Succinato	18	18	1.00	10	1.8
NADH	43	296	6.88	36	8.2
Ascorbato + TMPD***	35	346	9.88	33	10.5
<b>OXIDORREDUCTASAS:</b>					
Succinato:PMS+DCPIP	148	202	1.36	26	7.8
NADH:DCPIP	55	342	6.36	52	6.6

Tabla III.- Actividad respiratoria en membranas de Bacillus cereus crecidas a 8 y 2 litros de aire por minuto.

\* Las células esporulantes normales fueron cosechadas en la etapa T3 y en la etapa T5 las crecidas a 2 litros de aire por minuto. La preparación de las membranas se describe en métodos.

\*\* La actividad específica de las membranas está expresada en nmol (min x mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidorreductasas y como nAtO<sub>2</sub> (min x mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidasas.

\*\*\* Se usó TMPD en membranas celulares de 8 litros/minuto de aire y DCPIP en membranas de cultivos crecidos a 2 litros de aire por minuto.

70  
>

---

ENZIMA (Act. Especifica)**	TENSION DE OXIGENO Y ETAPA CELULAR %				
	8 LTS/MIN		RELACION DE ACT.	MICROAERO- FILICAS	RELACION DE ACT.
	Ves.	Esp.T3	$\frac{\text{Esp.T3}}{\text{Ves.}}$	Ves.	$\frac{\text{Ves.Norm}}{\text{Ves.Micro}}$
<hr/>					
OXIDASA:					
Succinato	18	18	1.00	-----	-----
NADH	43	296	6.88	16.93	2.54
Asc.:TMPD o DCPIP***	35	346	9.88	18.40	1.90
OXIDORREDUCTASAS:					
Succ.:TMPD + DCPIP	148	202	1.36	7.00	21.14
NADH:DCPIP	55	342	6.36	6.50	8.46

---

Tabla IV.- Actividades respiratorias en membranas de Bacillus cereus Crecidas en condiciones microaerofilicas.

\* Las células vegetativas normales fueron cosechadas a A540 = 1.25 y las microaerofilicas a A540 = 1.00

\*\* Las actividades especificas de las membranas están expresadas en nmol (min x mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidorreductasa y como nAtO2 (minuto x mg de proteína)<sup>-1</sup> para las oxidasas.

\*\*\* Se usó TMPD y DCPIP indistintamente para membranas microaerofilicas.

---

ENZIMA (Act. Especifica)**	TENSION DE OXIGENO Y ETAPA CELULAR %				
	8 LTS/MIN		RELACION DE ACT.	ANAEROBIAS	RELACION DE ACT.
	Ves.	Esp. t3	Esp. T3	Ves.	Ves. Norm
			Ves.		Ves. Ana.
<hr/>					
OXIDASAS:					
Succinato	18	18	1.00	2.57	7.00
NADH	43	296	6.88	10.50	4.09
Asc.:TMPD o DCPIP***	35	346	9.88	5.25	6.66
OXIDORREDUCTASAS:					
Succ.:PMS y DCPIP	148	202	1.36	5.00	29.60
NADH:DCPIP	55	342	6.36	2.20	25.00

---

Tabla V.- Actividades respiratorias en membranas de Bacillus cereus crecidas en condiciones anaerobicas.

\* Las células vegetativas normales fueron cosechadas a A540 = 1.25 y las anaerobicas a A540 = 1.00

\*\* Las actividades especificas de las enzimas están expresadas en nmol (min x mg de proteínas)<sup>-1</sup> para las oxidorreductasas y como nAtO2 (min x mg de proteínas)<sup>-1</sup> para las oxidasas.

\*\*\* Se usó TMPD y DCPIP indistintamente para membranas anaerobicas.

CONCENTRACION DE CITOCROMOS (\*) Y ETAPA CELULAR (\*\*)

CITOCROMOS	8 LTS/MIN		CONCEN- TRACION	MICROAERO- FILICAS	CONCEN- TRACION	ANAERO- BIAS	CONCEN- TRACION
	Ves.	Esp.T3	Esp.T3	Ves.	Ves.Norm.	Ves.	Ves.Norm.
			Ves.		Ves.Micro		Ves.Ana.
a + a3	0.11	0.28	2.50	TRAZAS	----	TRAZAS	----
b555	0.12	0.45	3.75	0.24	2.0	0.18	1.5
c548	0.15	0.65	4.33	TRAZAS	----	TRAZAS	----
a2	T R A Z A S		----	TRAZAS	----	TRAZAS	----
a3-CO	0.14	0.25	2.08	TRAZAS	----	TRAZAS	----
o-CO ***	0.05	0.09	1.76	0.27	5.4	0.22	4.4

Tabla VI.- Citocromos asociados a membranas de Bacillus cereus de células normales, microaerofilicas y anaerobicas. (\*)

\* La concentración de citocromos fue calculada a partir de los espectros diferenciales de reducido con ditionita VS oxidado con persulfato a temperatura ambiente. La concentración de citocromos para los complejos a3-CO y o-CO fue calculada de los espectros diferenciales de reducido con ditionita + CO VS reducido con ditionita. En ambos casos la concentración de citocromos se expresa como nmol x mg de proteína. El coeficiente de extinción molecular para el cálculo de las concentraciones fue tomado de Felix y Lundsren (14).

\*\* La edad de las células se describen en las tablas IV y V.

\*\*\* El citocromo b562 fue medido como o-CO.

(\*) Tomada de Escamilla y Benito (6) y complementada con los resultados de éste trabajo.

-----

CONCENTRACION DE CITOCROMOS (\*) Y ETAPA CELULAR (\*\*)

CITOCROMOS	8 LTS/MIN		CONCEN- TRACION	MICROAERO- FILICAS	CONCEN- TRACION	ANAERO- BIAS	CONCEN- TRACION
	Ves.	Esp.T3	Esp.T3	Ves.	Ves.Norm.	Ves.	Ves.Norm.
			Ves.		Ves.Micro		Ves.Ana.
a + a3	0.11	0.28	2.50	TRAZAS	----	TRAZAS	----
b555	0.12	0.45	3.75	0.24	2.0	0.18	1.5
c548	0.15	0.65	4.33	TRAZAS	----	TRAZAS	----
a2	T R A Z A S		----	TRAZAS	----	TRAZAS	----
a3-CO	0.14	0.25	2.08	TRAZAS	----	TRAZAS	----
o-CO ***	0.05	0.09	1.76	0.27	5.4	0.22	4.4

-----

Tabla VI.- Citocromos asociados a membranas de Bacillus cereus de células normales, microaerofílicas y anaerobias. (\*)

\* La concentración de citocromos fue calculada a partir de los espectros diferenciales de reducido con ditionita VS oxidado con persulfato a temperatura ambiente. La concentración de citocromos para los complejos a3-CO y o-CO fue calculada de los espectros diferenciales de reducido con ditionita + CO VS reducido con ditionita. En ambos casos la concentración de citocromos se expresa como nmol x ms de proteína. El coeficiente de extinción molecular para el cálculo de las concentraciones fue tomado de Felix y Lundersen (14).

\*\* La edad de las células se describen en las tablas IV y V.

\*\*\* El citocromo b562 fue medido como o-CO.

(\*) Tomada de Escamilla y Benito (6) y complementada con los resultados de éste trabajo.

## DISCUSION

Los estudios aquí descritos demuestran que la tensión de oxígeno durante el crecimiento del cultivo juega un importante papel en la expresión del sistema respiratorio de Bacillus cereus.

En este estudio debido a la falta de recursos instrumentales apropiados no fue posible hacer una evaluación estricta y cuantitativa de los efectos de la tensión de oxígeno, sin embargo, los resultados son suficientemente claros para asegurar que la composición cualitativa y cuantitativa de citocromos en el SR cambia de manera dramática a medida que la tensión de oxígeno se aproxima a un ambiente microaerofílico.

Cuando se disminuye el flujo de oxígeno-burbujeo a 4 y 2 litros de aire por minuto (figura 6, tabla III) no se observan cambios cualitativos en la composición de citocromos y oxidorreductasas, pero si es claro que una disponibilidad restringida de oxígeno provoca en primer lugar, una velocidad más lenta de crecimiento debido quizá a que el oxígeno se convierte en el factor limitante de la velocidad de crecimiento. Del mismo modo, podemos observar que los niveles de citocromos y oxidorreductasas se encuentran significativamente

disminuidas sobre todo en aquellos cultivos realizados a flujo-burbujeo de 2 litros/minuto (figura 6, tablas III y IV). Este hallazgo concuerda con los resultados reportados por Tochikubo en Bacillus subtilis (5) quien encontró que la disminución en la tensión de oxígeno en el cultivo causa un decremento en las actividades respiratorias de éste organismo. Sin embargo, la reducción en la tensión de oxígeno no sólo provoca la reducción de las actividades respiratorias, ya que, en el caso de los cultivos microaerofílicos donde la tensión de oxígeno se encuentra muy cercana a la anaerobiosis, claramente se demuestra un efecto diferencial sobre la composición del SR.

En los cultivos microaerofílicos ocurre que, mientras la oxidasa a + a3 prácticamente no se sintetiza, la oxidasa a2 aparece en niveles que nos permite su clara identificación por el pico de absorción formado a 630 nm exhibido en el espectro de reducido con ditionita VS oxidado (figura 7), identificándola también en el espectro reducido con ditionita + CO por su banda de absorción a 643 nm (figuras 4 y 9). Lo anterior es de particular importancia debido a que en los cultivos donde la aereación no es factor importante (8 litros de aire por minuto), el citocromo a2 presenta una débil banda de absorción que hace dudar sobre si realmente está presente. Los cultivos microaerofílicos nos permitieron demostrar fehacientemente la

presencia de la oxidasa a2 en Bacillus cereus (6).

De lo anterior, concluimos que la síntesis de la oxidasa a + a3 y paralelamente la síntesis del citocromo c, que es su donador de electrones directo, son favorecidas por el incremento en la tensión de oxígeno. Por otro lado, la elevada concentración de este gas parece tener efecto inhibitorio sobre la síntesis del citocromo a2, síntesis que se verá favorecida por bajas tensiones de oxígeno. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en otras especies bacterianas (21) que siguen el comportamiento arriba descrito frente a la tensión de oxígeno.

Lo anterior tiene importantes implicaciones en la ecología del microorganismo estudiado en el presente estudio. Esta bacteria va a ser capaz de seguir creciendo a pesar de amplias fluctuaciones en la tensión de oxígeno, simplemente induciendo la síntesis de la oxidasa apropiada a las condiciones de su habitat transitorio. Se ha demostrado que la oxidasa a2 tiene alta afinidad por el oxígeno con Km menores a 0.3 microminimolar con lo cual se asegura la utilización de oxígeno en condiciones en que éste elemento escasea.

En ambiente microaerofílico, la oxidasa a + a3 sería la óptima a utilizar debido a que desde el punto de vista de preservación de

energía es bien conocido que esta oxidasa tiene un canal de protones asociados, y con esto, la posibilidad de formar un gradiente protón motriz, por lo tanto, la presencia de un tercer sitio de fosforilación. Jones (25) ha sugerido que existe una estrecha relación en la composición del SR; capacidad para fosforilar y el habitat en que la bacteria se desarrolla. De acuerdo con éste autor, las especies que crecen en habitats pobres (fuentes de carbono y energía) no se pueden dar el lujo de utilizar SR con baja eficiencia en la fosforilación oxidativa, por ejemplo, E. coli, K. pneumoniae, B. mesenterium, B. licheniformis y B. subtilis, presentan cuatro sitios de fosforilación en su SR: la reacción de transhidrogenasas (sitio I y II) y los sitios de la citocromo oxidasa (sitio III). En cambio, en M. lysodeikticus, A. lwoffii, Ps. ovalis Chester y H. entofa que crecen en medios ricos, pueden utilizar un SR menos eficiente en la preservación de la energía. En estos casos, las bacterias referidas pueden carecer del sitio III y IV de fosforilación.

Se ha sugerido que la oxidasa a2 no tiene sitio de fosforilación asociado, por tanto, su utilización implica la pérdida de importantes cantidades de ATP potencial, pero si pensamos por otro lado que la oxidasa a3 tiene baja afinidad por oxígeno entonces, comprenderemos que la bacteria necesita sacrificar el potencial de fosforilación por

la necesidad absoluta de seguir respirando y creciendo aunque sea a velocidades considerablemente menores que las observadas a mayores concentraciones de oxígeno donde la oxidasa  $a + a3$  es la oxidasa terminal.

La inducción de la oxidasa  $a2$  por la baja tensión de oxígeno es una característica general en las bacterias facultativas, sin embargo, en el caso de bacterias fijadoras de nitrógeno se ha visto un comportamiento contrario. Cuando la tensión de oxígeno se incrementa, la bacteria fijadora de nitrógeno induce la síntesis de la oxidasa  $a2$  con el objeto de mantener las condiciones anaeróbicas en el citoplasma que se requiere para el correcto funcionamiento de la nitrosenasa, sistema enzimático responsable de la fijación del nitrógeno, que es inactivada por el oxígeno.

Entonces, el papel biológico de la oxidasa  $a2$ , si es que se demuestra que no tiene sitio de fosforilación asociado, deberá ser el de una vía de oxidación libre (no contribuye a la formación de ATP) que será inducida durante situaciones de emergencia en donde se requiera, por ejemplo, para seguir respirando a una muy baja tensión de oxígeno como el reportado en el presente estudio, o bien, para eliminar toda cantidad residual de oxígeno que pudiese ser nocivo para el proceso metabólico anaeróbico.

El presente estudio sugiere que la oxidasa  $a_2$  es inducida por baja tensión de oxígeno; sin embargo, hay que recordar que al disminuir la tensión de oxígeno disminuye considerablemente la velocidad de crecimiento. Por tanto, habría que definir cuál de los dos factores es la causa directa de la inducción. Esta pregunta fue recientemente contestada en el laboratorio; ya que se encontró que, cuando E. cereus crece lentamente obligado por un medio que contiene una fuente de carbono de lenta utilización (casaminoácidos) también es inducida la síntesis de citocromo  $a_2$ ; Escamilla-Benito (6). Lo anterior sugiere que la lenta velocidad de crecimiento impuesta por una limitada concentración de oxígeno o una mala fuente de carbono es la causa directa de inducción de la oxidasa  $a_2$ .

Además de la oxidasa  $a_2$  y  $a + a_3$ , los cultivos a 8, 4 y 2 litros de aire por minuto y los microaerofílicos manifiestan la presencia de una tercera oxidasa, la oxidasa o. Este citocromo fue inicialmente detectado por Smith en E. mesenterium (23) y Tochikubo en E. subtilis (5). No se ha demostrado que este citocromo juegue el papel de oxidasa ya que la única evidencia que se tiene, aún para el presente estudio, es su reacción positiva con el CO. Esta reacción aunque sugestiva de un papel de oxidasa terminal no es de ninguna manera concluyente. La incógnita planteada cobra fuerza debido a que aparentemente éste citocromo se comporta como una proteína constitutiva en E. cereus, ya

que lo encontramos presente bajo todas las condiciones de crecimiento ensayadas en nuestro laboratorio, aún en condiciones anaerobias del cultivo (figura 1 y 2 para cultivos normales; figura 6 para 2 litros por minuto y figura 9 para microaerofílicas y anaerobias). Por otro lado, hay que recordar, como fue descrito en los resultados, que la reacción de éste citocromo con CO sólo ocurre bajo condiciones forzadas de incubación, esto es, se requiere largo tiempo de exposición al CO y aparentemente condiciones anaerobias de ensayo. Entonces, la observación hecha en este laboratorio con E. cereus y en otros lugares con B. mesenterium (23) y B. subtilis (5) sugiere que la reacción positiva con CO pudiese ser un artefacto provocado por las condiciones usadas en la reacción. A lo anterior, tenemos que sumar otra observación consistente en que, aquellas bacterias como E. coli para las cuales se ha demostrado que este citocromo juega un papel de oxidasa terminal, su función es altamente sensible al cianuro mientras que por otro lado, los resultados de Hogarth, Wilkinson y Ellar en B. mesenterium (11) y de Escamilla-Benito en E. cereus (6) sugieren que lo que ha sido identificado como oxidasa o, es insensible al cianuro. Si el citocromo o no juega un papel de oxidasa en E. cereus cabría preguntarse ¿cuál sería su papel?. Una posibilidad es considerada por Escamilla-Benito es que sirve de transportador de electrones entre los citocromos b555 y a22 (figura 3), sin embargo, es necesario considerar que aún en condiciones anaerobias, donde no parece existir a2, el

citocromo o está presente en concentraciones apreciables (figura 9) lo que nos permite suponer que el citocromo o pudiese servir en condiciones anaerobias de crecimiento como mediador del transporte de electrones entre citocromo b y alguna reductasa cuya función sería imprescindible en condiciones en que el oxígeno no existiera en el medio.

Finalmente y a manera de conclusión, considero que las contribuciones más importantes del presente estudio son:

a) la demostración de que la tensión de oxígeno juega un papel importante en la expresión del Sistema Respiratorio de Bacillus cereus, b) la demostración de que las condiciones de limitación moderada de oxígeno a 4 y 2 litros de aire-burbujeo provocan cambios cuantitativos en la composición de citocromos constituyentes de la cadena respiratoria y, c) la demostración de que limitaciones de oxígeno cercanas a la anaerobiosis y condiciones anaerobias provocan cambios no sólo cuantitativos sino cualitativos en la expresión del SR.

Es necesario recordar que los cambios aquí descritos sólo pueden ser referidos a concentraciones gruesamente aproximadas de oxígeno, debido a que no se disponía del instrumental necesario para medir y controlar

de manera exacta la concentración de oxígeno. Ante esto, será necesario ampliar el presente estudio y, sobre todo, repetir los experimentos en condiciones en que la concentración y control de oxígeno sean estrictamente determinadas y reproducidas.

Figura 1.- Espectros diferenciales de reducido VS oxidado a baja temperatura de membranas de células vegetativas (A540= 1.25). Los asentes reductores indicados fueron agregados a las membranas celulares (12 mg de proteína/ml) mezclados cuidadosamente y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células de referencia fueron oxidadas con algunos gramos de sulfato de amonio. Los reductores en los trazos a, b, c y d fueron: ditionita de sodio, NADH, ascorbato + TMPD y succinato de sodio respectivamente. Las concentraciones usadas se indican en métodos.

Figura 2.- Espectros diferenciales de reducido VS oxidado a baja temperatura de membranas de células esporulantes T3. Las condiciones usadas son las mismas que las descritas en la figura 5, excepto la proteína usada (5.0 mg/ml). Las curvas a, b, c y d son: ditionita de sodio, NADH, ascorbato + TMPD y succinato respectivamente.

Figura 3.- Sistema aerobico respiratorio postulado para Bacillus cereus. Los componentes respiratorios son los mismos para las células vegetativas y esporulantes. NADH es considerado el mejor donador de electrones mientras que succinato es un sustrato donador inferior (flecha punteada). La citocromo a + a3 es la oxidasa terminal de la vía sensible al cianuro (inhibición fuerte) mientras que las ramificaciones a y b representan dos posibles arreglos para la vía resistente al cianuro (inhibición débil).

Figura 4.- Espectros diferenciales de reducidos con ditionita + CO VS reducido con ditionita a temperatura ambiente de membranas celulares. Algunos gramos de ditionita de sodio fueron agregados a 1.0 ml de una suspensión de membranas (5.0 mg/ml de proteína) mezclándose y aforándose a 3.0 ml con buffer saturado de aire (referencia) o con buffer saturado de monóxido de carbono (muestra). La cubeta muestra fue mantenida en ambiente saturado de CO y los espectros fueron registrados de acuerdo al tiempo indicado en cada trazo.

Figura 5A.- Efecto inhibitorio de la NADH-oxidasa en el sistema respiratorio de membranas de células esporulantes (T3). Las membranas (0.5 mg de proteína) fueron preincubadas a 30 C durante 3 minutos en 3 ml de buffer-TMC más la concentración indicada del inhibidor ensayado. El consumo de oxígeno se inició con la adición de NADH. Los inhibidores probados fueron: HQNO ( ), antimicina A ( ), stebrina ( ), dicumarol ( ) y KCN ( ).

Figura 5B.- Efecto de la concentración de cianuro de potasio en las actividades de las oxidasas de membranas de células esporulantes (T3) de *Bacillus cereus*. Las membranas (0.5 mg de proteína) fueron preincubadas durante 3 minutos a 30 C con la concentración indicada de cianuro de potasio. La reacción fue iniciada con la adición de succinato de sodio (♦) o NADH (◇) o ascorbato + TMPD (○).

Figura 6.- Espectros diferenciales de reducido VS oxidado a baja temperatura de membranas de células esporulantes T5 crecidas a 2 litros de aire/min. Las condiciones usadas son las mismas que se reportan en la figura 1, salvo la proteína usada (16.5 mg/ml). Los reductores en los trazos a, b, c y d fueron: ditionita de sodio, NADH, ascorbato + TMPD y succinato respectivamente.

Figura 7.- Espectros diferenciales de reducido VS oxidado a temperatura de nitrógeno líquido de membranas de células vegetativas (A540= 1.0) crecidas en condiciones microaerofílicas. El procedimiento empleado es el mismo que el reportado en las figuras 1 y 6 con la diferencia de la proteína (16.3 mg/ml). Los trazos correspondientes son a, b y c reducidos con: ditionita de sodio, NADH y ascorbato + TMPD respectivamente.

Figura 8.- Espectro diferencial de reducido VS oxidado a temperatura de nitrógeno líquido de membranas de células vegetativas (A540= 1.0) crecidas anaeróbicamente. La proteína usada fue 35.0 mg/ml y las condiciones se reportan en la figura 7. Los trazos a, b, c y d corresponden a la reducción con ditionita, NADH, ascorbato + TMPD y succinato respectivamente.

Figura 9.- Espectros diferenciales de reducidos con ditionita + CO VS reducidos con ditionita a temperatura ambiente de membranas vegetativas (A540= 1.0) obtenidas en condiciones microaerofílicas y anaerobias. Algunos gramos de ditionita de sodio fueron agregados a 1.0 ml de suspensión de membranas (16.3 y 35.0 mg/ml de proteína para micro y anaerobias respectivamente) mezcladas y diluidas en 3.0 ml de buffer saturado de aire (referencia) o en buffer saturado de CO (muestra). La cubeta muestra fue mantenida en ambiente saturado de monóxido de carbono e incubada a 15 y 10 minutos para los trazos a y b respectivamente. El espectro (a) corresponde a membranas de células anaerobias y (b) para las microaerofílicas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Salle, A.J., Fundamental Principles of Bacteriology. Tata Mc Graw-Hill Publishing Company LTD. New Delhi. 1974.
2. Escamilla, J.E., Contreras, L.M., Ramirez, R., Linares, V., 1974. El Sistema Respiratorio Bacteriano. Departamento de Microbiología. Centro de Investigaciones en Fisiología Celular y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
3. Haddock, B.A. y Jones, C.W. 1977. Bacterial Respiration. Bact. Rev. 41: 47-99.
4. Prescott, S.C., Winslow, Ch-E. A. y Mc Grady, M.H.. Water Bacteriology. John Wiley Sons, Inc. N.Y. 1950.
5. Tochikubo, K. 1971. Changes in Terminal Respiratory Pathway of Bacillus subtilis During Germination, Outgrowth and Vegetative Growth. J. Bacteriol. 108: 652-661.
6. Escamilla, J.E. y Benito, Ma.C. 1984. The Respiratory System of Vegetative and Sporulating Bacillus cereus. En impresión.
7. Benito, Ma.C. 1982. Tesis Maestría. Facultad de Química, UNAM.
8. Sinclair, P.R. y White, D.C. 1970. Effect of Nitrate, Fumarate and Oxygen on The Formation of The Membrane-Bound Electron Transport System of Haemophilus parainfluenzae. J. Bacteriol. 101: 365-372.
9. Downes, R.J. 1966. Nitrate Reductase and Respiratory Adaptation in Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 91: 634-641.
10. Gel'man, N.S., Lukosaneva, M.A. y Ostrovskii, D.N. 1975. The Respiratory Chain and Its Organization in The Bacterial Membrane. In Biomembranes, Vol. 6: 129-215.
11. Hosarth, C., Wilkinson, B.J. y Eller, D.J. 1977. Cyanide Resistant Electron Transport in Sporulating Bacillus megaterium. Biochim. Biophys. Acta 461: 109-123.

12. Halvorson, H.O. 1957. Rapid and Simultaneous Sporulation. *J. Appl. Bacteriol.* 20: 305-314.
13. Lans, D.R., Felix, S. y Lundsren, D.G. 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: 938-977.
14. Felix, S.A. y Lundsren, D.C. 1973. Electron transport system associated with membranes of Bacillus cereus during vegetative growth and sporulation. *J. Bacteriol.* 115: 552-559.
15. Andreoli, A.J., Saranto, J., Baecker, P.A., Suehiro, S., Eccomilla, E. and Steiner, A. 1975. Biochemical properties of forespore isolated from Bacillus cereus, in Spore VI, Gerhardt P., Sadoff H.L. and Costilow, R. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 418-424.
16. Aranda, A. 1981. Tesis Maestría. Facultad de Química, UNAM.
17. Martínez Olmedo, Ma. A. Estudio del transporte de aminoácidos en B. cereus (tesis licenciatura). Facultad de Química, UNAM. 1977.
18. Gould, G.W., Hurst, A. (Editores). The Bacterial Spore. Academic Press Inc. England, 1969.
19. Lheninser, L.A., Bioquímica. Ed. Omega, S.A. 2da. Edición. Barcelona. 1978.
20. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sakiyama, B., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J. C. y Klute, M. 1973. Release and Recovery of Forespores from B. cereus. *J. of Bacteriology*, Vol. 115, 3.
21. Collier, R.E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in Clostridium roseum in H.O., Halvorson Eds. Spore. Amer. Inst. Biol. Sci. Washington, D.C. pp. 10-17.
22. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

23. Smith, L. 1978. Bacterial cytochrome and their spectral characterization. In Methods in Enzymology, Vol. 53, pp. 202-213. Fleischery S. y L. Packer (Ed.), Academic Press Inc., N.Y.
24. Varios autores. Biochem of Bacterial Growth. Mandelstan, J. y Mc Quillen, K. (Ed.) Blackwell Scientific Publication, Oxford London Edinburgh Melbourne 1973.
25. Jones, C.W., Eriey, J.M., Downs, A.J. y Drozd, J.W. 1975. Bacterial Respiration. European J. Biochem. 52; 265-275