

2 ej.
164



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DEL SISTEMA RESPIRATORIO DE LAS
MEMBRANAS DE LA CELULA MADRE Y LA ENDOSPORA DE
Bacillus cereus.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
PRESENTA.

MARIA DE LOS REMEDIOS JOSEFINA RAMIREZ RANGEL

1 9 8 6



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.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
OBJETIVO	12
ABREVIATURAS	13
MATERIALES Y METODOS	14
RESULTADOS	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUCCION

En los organismos eucariontes las enzimas que catalizan el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están localizadas en la mitocondria, en tanto que en los organismos procariontes que carecen de mitocondrias se localizan en la membrana celular. La secuencia de reacciones de transferencia de electrones de las bacterias es muy parecido al de las mitocondrias, sin embargo, se ha visto que el Sistema Respiratorio (SR) bacteriano es considerablemente más complejo que el mitocondrial, no solo en su composición y organización sino que también está sujeto a la regulación genética, cuya expresión puede ser profundamente afectada por diversos factores del medio.

Muchas bacterias poseen SR que están formados por varias cadenas que pueden funcionar independientemente o entrecruzarse formando sistemas ramificados (11). La composición cualitativa y cuantitativa de las deshidrogenasas, quinonas y citocromos es muy variable sin que parezca existir una clara relación estequiométrica entre los elementos individuales. Algunos componentes parecen ser constitutivos mientras que otros están sujetos a inducción o represión por diversos factores ambientales.

En las bacterias esporoformadoras, como es el caso del género Bacillus la expresión del sistema respiratorio y en general del metabolismo oxidativo se encuentra estrechamente vinculado con el proceso morfogénico. A pesar de que desde los años

50's se reconoció el papel determinante del metabolismo oxidativo durante la esporulación, el estudio del SR no se abordó de manera sistemática, así los primeros investigadores en este campo observaron solo la composición del SR de los estados inicial (células vegetativa) y final (espora latente), es decir se ha considerado a la célula esporulante como un todo. Sin embargo, las células esporulantes contienen durante la formación de la endospora dos compartimentos; Célula Madre y Endospora. Gracias al desarrollo de una técnica para el aislamiento de la endospora inmadura de Bacillus cereus dada por Andreoli (1) se han podido analizar varios parámetros bioquímicos de la endospora sin la interferencia del compartimento de la célula madre.

En algunos de esos resultados se ha mostrado que, aún durante el desarrollo temprano, la endospora presenta propiedades distintas a las de la célula madre.

Los trabajos recientes de Escamilla 1984 (8) sugieren que el SR de Bacillus cereus está organizado en al menos dos ramas de citocromos (con el citocromo aas oxidasa terminal sensible a cianuro y el citocromo o, oxidasa terminal resistente a cianuro). Además, en su mismo laboratorio se ha mostrado que la tensión de oxígeno juega un papel importante en la expresión del sistema respiratorio de B. cereus, teniendo que las condiciones de limitación de oxígeno provocan cambios cualitativos en la composición de los citocromos constituyentes de la cadena respiratoria y que las limitaciones de oxígeno cercanas a la anaerobiosis y condiciones francamente anaeróbicas provocan cambios no solo cualitativos sino cuantitativos en la expresión del SR.

En la presente tesis hemos comparado los Sistemas Respiratorios de la Célula Madre y Endospora de Bacillus cereus. Los resultados indican que ambos compartimentos tienen el mismo tipo de citocromos, oxidasas y oxidorreductasas pero las membranas de la endospora son claramente distintas de la de la célula madre en su menor contenido de citocromo a_{a_3} , mayor contenido de citocromo o , menor actividad de ascorbato-TMPD oxidasa y menor sensibilidad a la inhibición con cianuro. Todo lo anterior nos sugiere que la endospora desarrolla un SR mejor adaptado para la respiración a bajas tensiones de O_2 .

GENERALIDADES

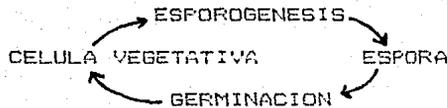
Esporogénesis Bacteriana

La esporulación bacteriana se lleva a cabo en bacterias gram positivas de los género bacilares, Bacillus y Clostridium y de los cocos del género Sporosarcina. Este tipo de bacterias tienen la habilidad, bajo ciertas condiciones de tener una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos los cuales finalizan con la formación de estructuras latentes que se conocen con el nombre de esporas, ésta formación de esporas se presenta como un fenómeno adaptativo en respuesta al agotamiento de la fuente de utilización rápida y/o a la fuente de nitrógeno y en algunos casos a la fuente de fosfatos.

La transición de una célula vegetativa a una espora latente

constituye un ejemplo de diferenciación celular único en el mundo biológico. Mandeldestam y cols. en 1977 (23) observaron que al final de la fase de crecimiento exponencial, cada célula cesa de dividirse y produce en un tiempo de ocho a diez horas una espora intracelular.

Cuando las condiciones ambientales son favorables, una célula vegetativa emerge en pocos minutos de cada la espora. La espora difiere genética, fisiológica y bioquímicamente de la célula vegetativa que le dió origen.



La espora puede permanecer en un estado de latencia durante mucho tiempo y es capaz de transformarse en célula vegetativa por el proceso que se lleva a cabo en tres etapas.

a) Activación.-Proceso reversible durante el cual se capacita a la espora para germinar, cuando las condiciones ambientales son favorables.

b) Germinación.-Proceso irreversible que conduce a la pérdida de todas las características típicas de la espora; se lleva a cabo en pocos minutos, una vez que las esporas han sido activadas. Se acompaña del hinchamiento y ruptura de la cubierta de la espora, con la consecuente pérdida de la resistencia a temperatura y solventes, de la refractilidad, de la liberación de los

componentes de la espora y de un incremento en la actividad metabólica.

c) Expansión.-La germinación es seguida por un proceso de gran actividad biosintética (llamado Expansión) donde se sintetizan proteínas y estructuras típicas de la célula vegetativa.

De acuerdo con lo reportado por V. Vinter 1979 (23) la esporulación no es un evento obligado en el desarrollo de las bacterias, sino el resultado de las condiciones del medio ambiente.

La inducción de la esporulación se puede llevar a cabo por dos caminos:

1. Microciclo.-Cuando la esporulación ocurre en la célula primaria, es decir, las células inician la esporulación eliminando la proliferación vegetativa. Cuando se suspenden esporas germinadas en un medio químicamente definido que carece de una fuente de energía y limitado de fosfatos, se producen células primarias en un lapso de dos horas. Después de aproximadamente seis horas de aireación vigorosa, estas células inician la esporulación siguiendo los procesos morfogénéticos normales. Por tanto, la espora germinada o célula primaria expuesta a un medio insuficiente de nutrientes, para soportar la división, se desarrolla en un tiempo de generación muy largo.

2. Macro ciclo.-Cuando las células esporulan después de una serie de divisiones celulares. Existen, como ya se dijo, condiciones óptimas de esporogénesis para cada especie que incluyen diferentes factores como pH, aireación, temperatura, nutrientes y

caciones presentes en el medio.

Se conocen dos métodos para inducir la esporulación:

1) Método por agotamiento.- Las bacterias se dejan crecer en un medio que contiene los nutrientes esenciales hasta que alguna fuente de carbono, nitrógeno o fosfatos se termine, el tiempo en el cual el crecimiento exponencial cesa es tomado como tiempo de inducción de la esporulación, la eficiencia de la esporulación y grado de sincronía dependen del medio utilizado y de las características del inóculo.

2) Método por reemplazo o resuspensión.- Introducido por Sterlini y Maldestam en 1964 (23), en este método un cultivo de bacterias que están creciendo exponencialmente en un medio rico son transferidas a un medio pobre, este método proporciona un punto más claro en el inicio de la esporulación y una mejor sincronía.

La forma como influyen en el metabolismo de la célula vegetativa, los factores antes mencionados no ha sido totalmente dilucidada pero se ha visto en general, que las fuentes de carbono y nitrógeno rápidamente metabolizables, favorecen el crecimiento vegetativo, mientras que aquellas fuentes que son metabolizadas más lentamente favorecen la esporulación.

Cambios Metabólicos durante la Esporulación

La esporulación normalmente es inducida en respuesta a la necesidad de nutrientes y muchas de las enzimas que aparecen al

inicio del desarrollo de la espora, están correlacionadas con la transición de abundancia a carencia de nutrientes. Algunas de estas enzimas no juegan un papel importante en el desarrollo de la espora, por ejemplo, la amilasa y las enzimas del catabolismo de arginasa (B).

En la fig. 1 vemos que durante el crecimiento logarítmico la fuente de carbono que se utiliza es la glucosa (fermentación), debido a que no existe un ciclo de Krebs funcional hay acumulación de productos finales de la glicólisis; acetato y piruvato, los cuales van son expulsados al medio trayendo como consecuencia una caída en el pH, que llega a su punto mínimo al final del crecimiento. Con el agotamiento de la glucosa, la concentración de los intermediarios de la glicólisis disminuye en una forma imponente, dicha disminución hace que cese la represión catabólica permitiendo la inducción de las enzimas del ciclo de Krebs y del sistema respiratorio, que mediante la fosforilación oxidativa van a generar el ATP necesario para el proceso morfogénico.

Cambios Bioquímicos

Paralelos a los cambios morfológicos, se llevan a cabo una serie de eventos bioquímicos durante la esporogénesis, de los cuales podemos mencionar los siguientes:

- 1) La aparición de componentes que no existían durante el crecimiento y que se encuentran por lo tanto sólo durante la esporulación, siendo aparentemente necesarios para la formación de la espora, ejemplo de estos tenemos el peptidoglicano de la

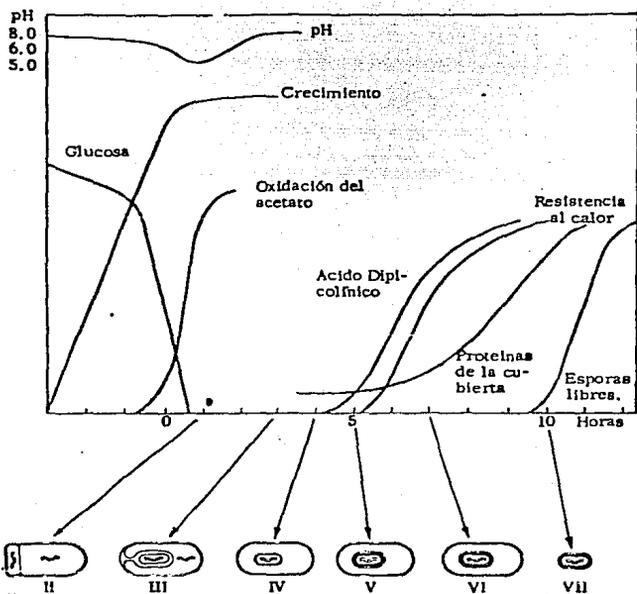


Fig. 1 Secuencia de eventos que ocurren durante la esporulación de un bacilo aeróbico.

corteza y las proteínas de la cubierta.

2) Cambios que resultan de la baja de nutrientes, condición con la que se induce la esporulación, pero que no están conectados en sí mismos con el proceso morfogenético, por ejemplo la elevación de las enzimas amilasa y arginasa, Escamilla 1978 (8).

Control Genético de la Esporulación

Es claro que los eventos morfológicos y bioquímicos que conducen a la formación de una spora madura se hallen bajo control genético. Se han podido aislar dos tipos de mutantes inducidos por tratamiento con calor, luz ultravioleta y diversos mutágenos químicos: mutantes asporógenos (Sp⁻) que son incapaces de producir esporas latentes y los mutantes oligosporógenos (Osp) que producen esporas a bajas frecuencias bajo condiciones normales de esporulación, en este tipo de análisis genético se ha indicado que los genes que afectan la esporulación están dispersos por todo el cromosoma, no existiendo un área del genoma que contenga agrupada la información necesaria para la esporulación, separada del genoma necesario para el crecimiento vegetativo Piggot y Coote 1977. (23).

El análisis de los productos de la expresión génica, apoyan la idea de que un buen número de genes específicos de la esporulación participan en la formación de la spora, por lo que se concluye que la esporogénesis está acompañada de una extensiva degradación y resíntesis de RNA y proteínas, en ambos casos la síntesis es de "novo".

Formación de la Espora

La fig 2 representa los cambios morfológicos que suceden en las bacterias esporoformadoras, proceso que se lleva a cabo bajo condiciones óptimas en 8 a 10 horas Fitz James y Young 1969 (23) han dividido este proceso en siete estadios.

El inicio de la esporulación se define como el fin del crecimiento logarítmico, en una población de bacterias esporoformadoras. El estadio I está caracterizado por el arreglo del DNA en un filamento axial de cromatina, parte del cual será destinado a la espora. En el estadio II se invagina la membrana citoplasmática formando el septo esporangial, que se localiza asimétricamente dando lugar a dos compartimentos de diferente tamaño, el grande (la célula madre) y el chico (la preespora). En el estadio III el continuo crecimiento de la membrana de la célula madre, obliga a la preespora a desplazarse hacia el interior de esta membrana en crecimiento, la cual finalmente se encuentra con una polaridad invertida sobre el protoplasto de la preespora. Durante el estado IV, los peptidoglicanos corticales son depositados entre la membrana interna y externa de la preespora. La síntesis de ácidos diaminopimélico componente de la corteza y la cisteína constituyente de la cubierta, se depositan sobre la membrana externa. Este estado es seguido por: la terminación de las cubiertas de proteína, la acumulación del ácido

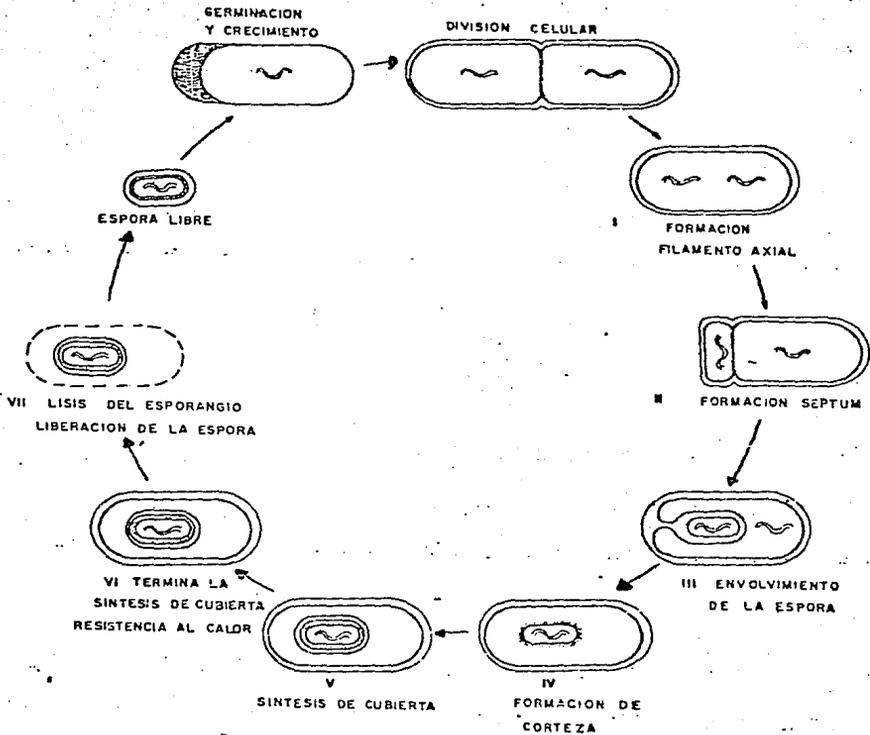


FIGURA 2 ESTADIOS MORFOLOGICOS DURANTE LA ESPOROGENESIS.

dipicolínico, la incorporación e inmovilización del calcio y finalmente la síntesis de la corteza son eventos que ocurren durante el estadio V. La refractibilidad y termorresistencia aparecen durante el estadio VI, se dice que es esta la fase de maduración de la preespora. El estado VII consiste en la liberación de la endospora vía autólisis del esporangio. Se ha visto que existe un punto donde este proceso se hace irreversible, y que coincide con la terminación del estado III.

Estructura de la Endospora

La espora incluye un protoplasto, que contiene reservas rápidamente metabolizables, sustratos y casi toda la maquinaria necesaria para el metabolismo y biosíntesis. El estado hipometabólico y las propiedades de resistencia, son conseguidas como el resultado de la síntesis de una serie de integumentos que rodean y aíslan al protoplasto. Compuestos de bajo peso molecular y proteínas del protoplasto de la espora contribuyen a la estabilidad o estado de latencia y las extraordinarias propiedades de resistencia de la espora.

Se ha podido observar bajo el microscopio electrónico que la espora está constituida por diferentes capas (fig 3). La más externa es una capa delgada y transparente llamada exosporio, presenta una proyección semejante a un filamento; por ser una estructura que solo algunas especies poseen, no es tan obvia y es difícil de decidir si las capas más externas de la espora son funcional y estructuralmente equivalentes. Esta estructura ha sido bien caracterizada en esporas de B. cereus T, el exosporio

aislado contiene 20 % de polisacáridos, 12,5% de lípidos neutros, 5.5 de fosfolípidos y 20 % de cenizas. En E. cereus está estructura aparece después del englobamiento y al final del revestimiento interior del esporangio Aronson y Fitz James 1976 (23).

La cubierta de la espora está constituyede un 30 a un 60 % del peso seco de la espora, cerca del 50 % de su volumen y contiene más del 80 % de las proteínas de la espora Kornberg, Spudich, 1976 (23). La morfología y la composición química de las capas de la cubiertas varían entre especies y han sido descritas en una revisión Aranson y Fitz James 1976 (23). La cubierta de la espora está constituida de varias láminas de proteína, cada lámina mide cerca de 2.0 a 2.5 nm de grosor. Debajo de ésta, hay una membrana delgada, la cual separa la cubierta de la espora de un área de baja densidad electrónica, compuesta de capas concéntricas que son llamadas en su conjunto corteza y que constituyen aproximadamente la mitad del volumen de la espora. Esta estructura es un componente específico de la espora que desaparece durante la germinación, por lo tanto, está ausente en las células vegetativas, aunque la composición química de los peptidoglicanos corticales es muy similar a la pared celular de las células vegetativas.

Por abajo de la corteza se encuentra la pared del protoplasto, inmediatamente rodeando la membrana del mismo. La corteza es hidrolizada por enzimas líticas durante la germinación. Por último, el protoplasto está constituido por tres proteínas básicas de bajo peso molecular que comprenden del 40 al 50 % de las proteínas presentes en el mismo, las cuales son rápidamente

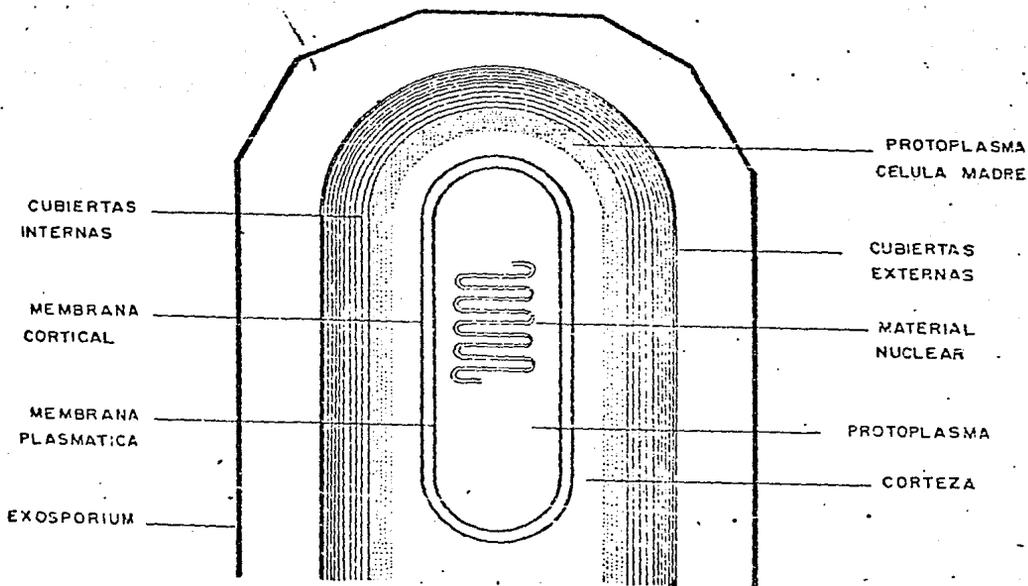


FIG. 3 COMPONENTES PRESENTES EN LA ESPORA BACTERIANA.

degradadas por medio de enzimas proteolíticas que reconocen secuencias de aminoácidos específicas. Los peptidos junto con las proteasas responsables de su hidrólisis, proveen de una reserva de aminoácidos rápidamente movilizables en la espora latente, que es utilizada para sostener la síntesis de proteínas y el metabolismo energético durante la fase temprana de la germinación, hasta que las enzimas requeridas para la biosíntesis de aminoácidos sean formadas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es comparar el Sistema Respiratorio de las Membranas de la Célula Madre y Endosporas durante la esporulación de Bacillus cereus.

ABREVIATURAS

Ascorbato-TMPD	Ascorbato-tetra metil fenil diamina
Buffer-TCM	Buffer-tris HCl 50mM+ CaCl ₂ 5mM+ MgCl ₂
cit	citocromo
CN-	Cianuro
DCPIP	2,6 Diclorofenol indofenol
D.O.	Densidad optica
DNAasa	Desoxiribonucleasa bovina
E	Coeficiente de Extinción Molar
fluorescamina	(4-fenil furán 2-(3H).1 ¹ falatán-3-3 diona)
MCM	Membranas de la Célula Madre
M End	Membranas de las endosporas
ME	Membranas de las Esporas Libres
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido
PMS	Fenil meta sulfato
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SR	Sistema Respiratorio

MATERIALES Y METODOS

En este estudio se utilizó una cepa de Bacillus cereus, aislada por el método descrito por Andreoli y cols. en 1973 (1).

La obtención de cultivos sincrónicos de la bacteria se llevo cabo en medio G modificado (2), cuya composición es la siguiente: 0.2 % de extracto de levadura (fuente de nitrógeno); 0.2 % de sacarosa (fuente de carbono); 0.2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.05 % K_2HPO_4 ; 0.02 % MgSO_4 ; 0.005 % $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.0025 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.0005 % $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.00005 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.00002 % $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.0005 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ estos componentes se disuelven en agua destilada y se esterilizan durante 15 min. a 121°C y una presión de $2\text{Kg}/\text{cm}^2$.

Las células se cultivaron en un fermentador con capacidad de 25 litros, construido por el Centro de Instrumentos de la UNAM. Para lograr el crecimiento óptimo de la bacteria, es necesario mantener ciertas condiciones en el cultivo: aereación; 14 litros/ min; temperatura: 30°C y agitación de 250 rpm. Para iniciar los cultivos se prepara un litro de inóculo, mediante el método de Collier y cols. (5) que consiste en hacer una serie de transferencias a partir de viales con medio sólido que contienen a la cepa, (previamente activada por 12 horas a 30°C). Para realizar dichas transferencias, se inocula un matraz que contiene 10 ml del medio, con una asada de bacterias y se incuba durante 3-4 horas a 30° en agitación, hasta obtener una densidad optica aproximadamente de 1.0 (densidad necesaria para llegar a la fase logarítmica mediadel cultivo), después de este tiempo se

transfieren 0.2 ml a otro matraz con 10 ml. de medio, el cual se incuba en las condiciones antes mencionadas; de la misma manera se hacen tres transferencias más, por último se realiza una dilución de 10^{-3} y se transfieren 0.2 ml a un matraz que contiene un litro de medio que es usado 12 horas después (tiempo que tarda en llegar nuevamente a la fase logarítmica media) para inocular el fermentador que contiene 20 litros de medio.

El crecimiento en el fermentador se siguió espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 540 nm y el pH, para así determinar el inicio de la esporulación que se obtiene a los 30 min después de haber alcanzado el pH mínimo (6.0) (fig.6) además de observar preparaciones para poder evaluar el grado de sincronía y detectar posibles contaminaciones en los cultivos.

Las células se colectaron en una centrifuga de flujo continuo (Sharples modelo TI) en la etapa de esporulación deseada y fueron lavadas tres veces con buffer TCM mediante centrifugación a 7500 rpm/ 10 min a 4°C (en una centrifuga Sorvall RC-2E).

Ruptura Celular y Purificación de las Endosporas

Las células colectadas en el estadio de esporulación indicado, se resuspenden en 200 ml de buffer TCM + Sacarosa al 30 % y son incubadas con PMSF (1.7 ug/ml) y como se muestra en la figura 4, se rompen en un fraccionador celular (prensa) Ribi (Modelo RM-1 Ivan Sorvall Inc. USA) a una presión de 30 000 lb/pulg² y a 4°C. El homogenado resultante es incubado a temperatura ambiente durante 15 min con unos pocos cristales de

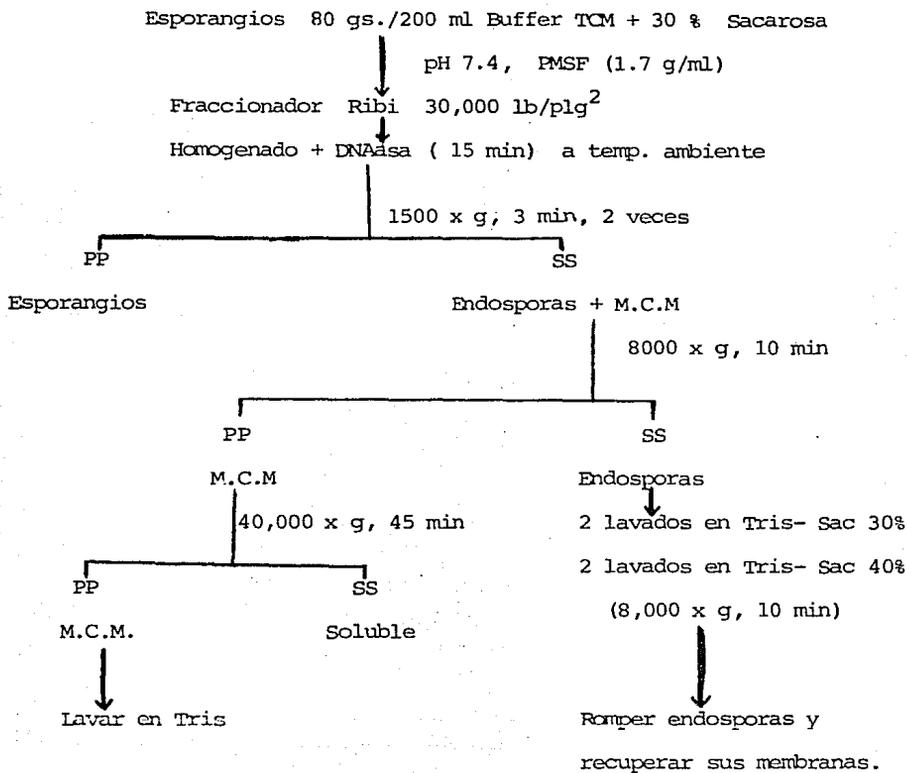


FIG 4 Esquema que muestra los pasos empleados en la liberación y purificación de las endosporas de los diferentes estadios de esporulación de B. cereus.

DNAasa, con agitación suave, con el objeto de eliminar la viscosidad producida por el DNA liberado. Este homogenado es lavado dos veces con el mismo buffer a baja velocidad, para poder separar los esporangios no rotos, el sobrenadante resultante contiene las membranas de la célula madre y las endosporas, que para separarlos se centrifuga a 8 000 x g/5 min. así las membranas de la célula madre (sobrenadante) son recuperadas y lavadas a alta velocidad, en tanto que, las endosporas (precipitado) son purificadas mediante lavados sucesivos usando buffer TCM + 30 % de sacarosa y centrifugado a 8 000 x g/10 min y por último se hacen dos lavados en gradiente con el buffer TCM + sacarosa al 40 % centrifugado a 8 000 x g/5 min.

De este paquete de endosporas se toma una alícuota para medir las actividades respiratorias con las membranas integrales, el resto es resuspendido en 50 ml de buffer y para obtener sus membranas, se rompen en el mismo fraccionador celular. La recuperación de estas membranas se realiza en la misma forma que las membranas de la célula madre.

Las esporas maduras fueron colectadas inmediatamente después de haber sido liberadas del esporangio (7 horas después de iniciarse la esporulación), lavadas de la misma manera que las células esporulantes y resuspendidas en el buffer TCM. Para poder obtener las membranas de las esporas son pasadas dos veces por el fraccionador a 50 000 lb/pulg², sus membranas son recuperadas como se procedió para las membranas de la célula madre.

Ensayos enzimáticos

Dos tipos de actividades respiratorias fueron ensayadas en membranas de los dos compartimentos del esporangio. El mecanismo de éstos ensayos se basa en las reacciones indicadas en 11a fig. 5.

1.- Oxidasas, se determinan midiendo la velocidad de consumo de oxígeno de las membranas, involucrando a la secuencia de los componentes de la cadena respiratoria.

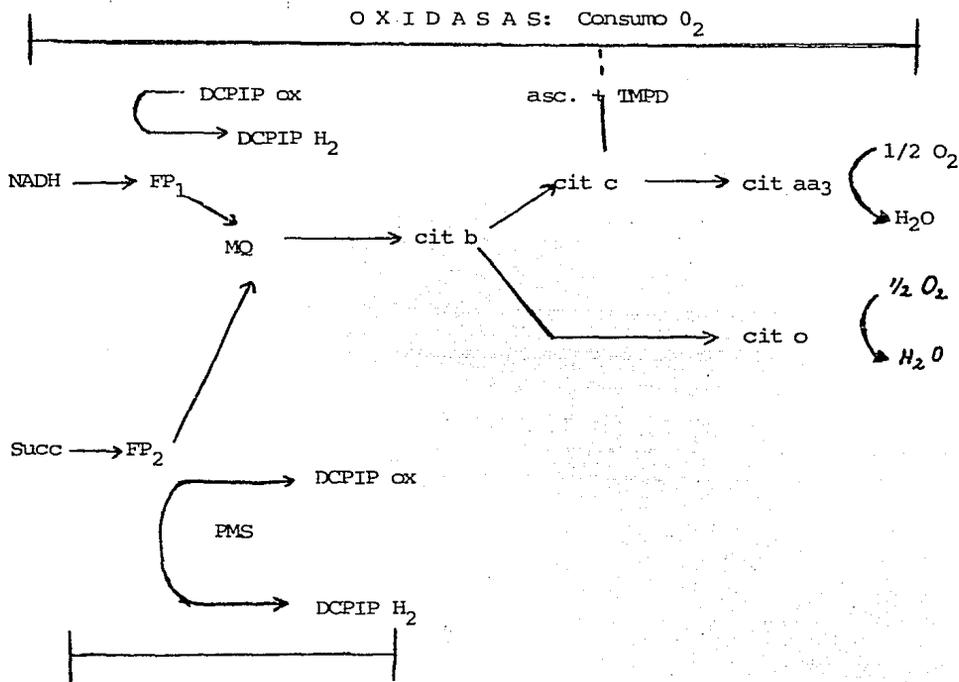
2.- Oxidorreductasas, se determinan a partir de la actividad de la primera enzima de la cadena de transporte de electrones, usando como aceptor alternativo de electrones al DCP/IP y en el caso de la succinato deshidrogenasa, al PMS como acarreador de los mismos.

OXIDASAS

Succinato y NADH oxidasas.- Las actividades fueron medidas por el método polarográfico, utilizando un oxímetro Yellow Spring modelo 53. El medio de reacción (2ml) contiene buffer TCM-sacarosa 0.25 M a pH 7.4, membranas (1.5 mg de proteína). La muestra se preincuba durante 3 min. a 30°C antes de iniciar la reacción con los sustratos; NADH 0.5 mM ó succinato 20 mM (concentraciones finales).

Citocromo c oxidasa.- Esta actividad fué medida en el mismo oxímetro usando ascorbato+TMPD como donador de electrones para el citocromo c. En éste caso se usó el mismo buffer pero a pH 6.8 (la actividad fué corregida por el pequeño consumo de oxígeno que ocurre en ausencia de membranas).

La actividad enzimática en éstos casos se expresa como nanoátomos de O_2 consumido por min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.



OXIDORREDUCTASAS : REDUCCION DE DCPIP A 660 nm.

FIG 5 Esquema que muestra que muestra el mecanismo enzimático de las actividades respiratorias que se miden en las membranas de los dos compartimentos del esporangio.

OXIDORREDUCTASAS

SUCCINATO- DH. El ensayo se realiza de acuerdo con lo descrito por Arrigoni y Singer en 1962 (3), en cubetas de 3.0 ml a temperatura ambiente la reducción del DCPIP se sigue espectrofotométricamente a 600 nm.

La mezcla de ensayo contiene:

Reactivo	Adición	Final
Succinato 0.6 M pH 7.0	0.1 ml	20 mM
Buffer KH_2PO_4 0.2 M pH 7.4	0.75 ml	50 mM
Agua destilada	1.7 ml	---
Cianuro 10 mM	0.1 ml	
Membranas (5mg/ml)	0.50 ml	
Se incuba durante 3 minutos para activar la enzima		
PMS 33 mM	0.1 ml	1.1 mM
DCPIP 2.0×10^{-3}	0.1 ml	8×10^{-8} mM

La actividad específica se expresa como nmol de $\text{DCPIP}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, con un coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

NADH- DH Este ensayo se realiza de acuerdo a lo descrito por D.R. Lang et.al. 1972 (2), en cubetas de 1.0 ml.

La mezcla de ensayo contiene:

Reactivo	Adición	Final
Buffer KH_2PO_4 0.2 M pH 7.4	0.25 ml	50 mM
KCN 10 mM	0.01 ml	0.1 mM
DCPIP 2.0×10^{-3}	0.025 ml	8×10^{-5} mM
H_2O	0.68 ml	---
NADH 10 mM	0.02 ml	2×10^{-4} mM

La actividad específica se expresa como nmol de $\text{DCPIP}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, con un coeficiente de extinción molar de $7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de Proteína.

La determinación de proteína de nuestros ensayos se realizó bajo el método de Lowry (16); en los casos en que se trabajó con esporas enteras se hizo la determinación adicionando 0.1 ml de SDS 2% tanto en la muestra como en la curva patrón antes de adicionar las soluciones de color.

Análisis Espectral de los Citocromos.

El análisis espectral de los citocromos de las fracciones membranales se llevó a cabo en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM Aminco DW 2c) a temperatura ambiente (cubetas de 1 ml). Las membranas fueron resuspendidas en buffer TCM al 50% glicerol. Los espectros reducidos menos oxidados se registraron usando como reductores NADH 0.5 mM, succinato 20 mM, ascorbato 10 mM + TMPD 0.3 mM o ditionita (algunos cristales) y como oxidante algunos cristales de persulfato de amonio. Los registros se hicieron, para el caso de los espectros a temperatura ambiente, después de adicionar el sustrato reductor a la muestra y el persulfato a la referencia, y para el caso de los espectros a temperatura de nitrógeno líquido después de congelar la muestra (Steady State).

Por otra parte, para poder observar los picos y valles formados por los complejos de los citocromos O-CO y a_3 , a la cubeta de referencia se le adicionan algunos granulos de ditionita más 0.01 ml de antiespumante (Anti-foam A Sigma Spray Reagent.) y la cubeta de muestra se prepara con ditionita, más el antiespumante y es burbujeada con monóxido de carbono durante 3 min.

La concentración de los citocromos fué estimada de los espectros obtenidos a temperatura ambiente (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato ó ditionita más CO menos ditionita). Los pares de longitud de onda y coeficientes de extinción molar en cada caso fueron: cit a₃₃ E(603-630 nm)= 24mM⁻¹ cm⁻¹ ; cit b₅₅₅ E(562-575 nm)= 22 mM⁻¹ cm⁻¹; cit c₅₅₀ E(550-540 nm)= 19 mM⁻¹ cm⁻¹; cit a₃₃-CO E (495-495 nm)=10.1 mM cm⁻¹; cit o-CO E (415-430 nm) 160 mM⁻¹ cm⁻¹.

RESULTADOS

El cultivo del bacilo se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en material y métodos, en la figura 6 se presenta la curva de crecimiento donde se observa que a las 2:30 horas de haber iniciado el cultivo, el medio alcanza el pH mínimo (6.0) iniciándose aproximadamente a los 30 min siguientes la esporulación, es decir, el estadio 0, a partir de este momento los siguientes estadios se obtienen a los 60, 120, 180 min etc. después de haberse iniciado la esporulación. En la misma gráfica representado por la curva de D.O se ve que las células han dejado de dividirse al mismo tiempo que se inicia la esporulación. Es importante notar que en D.O cercanas a 3.0 se presentan fluctuaciones en las lecturas debido a que en el medio las células se agregan, sin embargo estos agregados nos permiten afirmar que: por una parte la sincronía de los cultivos es mayor del 90% y que las células se están desarrollando adecuadamente. Además, siempre se realizan observaciones en el microscopio de contraste de fases para poder predecir el momento de cosecha de las células.

Debido a que las preparaciones de endosporas aisladas no han sido debidamente caracterizadas, no existe en la actualidad una lista de enzimas marcadoras o características que permitan distinguir entre las membranas de la célula madre y las membranas de la endospora, condición que juzgamos indispensable para valorar la pureza de nuestras preparaciones membranales obtenidas por el método descrito, por lo tanto, debido a la ausencia de marcadores endógenos, se decidió introducir modificaciones químicas a

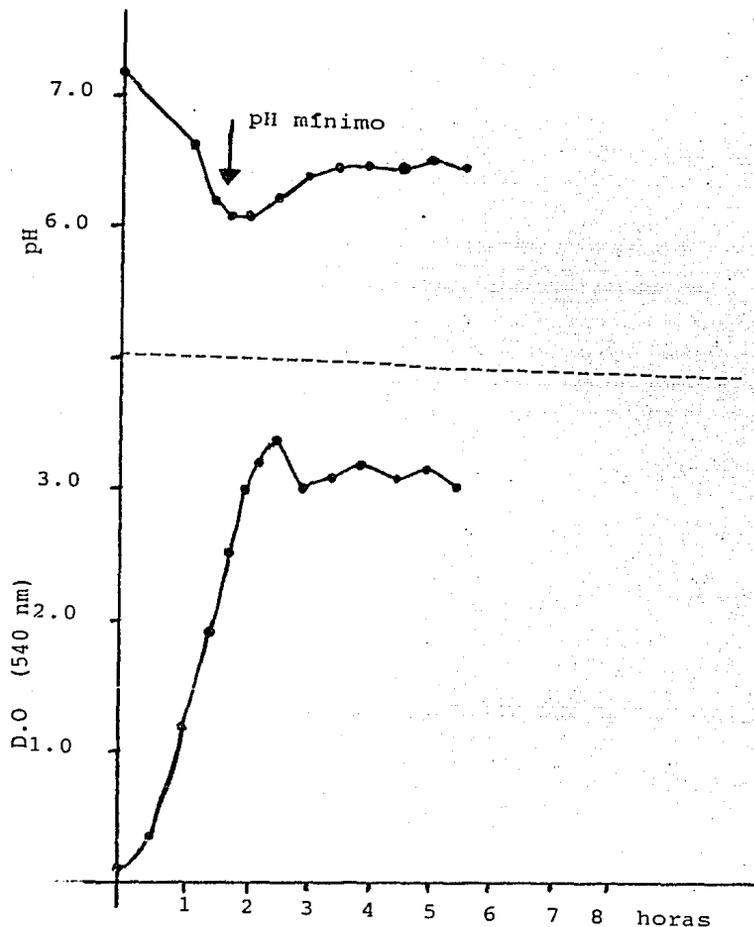


FIG. 6 Curva de crecimiento de Bacillus cereus. Las células son crecidas en medio G modificado y se considera el inicio de la esporulación a los 30 min después de que se ha alcanzado el pH mínimo. (ver materiales y métodos).

Las membranas de la célula madre (la más externa del esporangio) que no alcanzaron a las membranas de la endospora y de esta manera, después de la purificación determinar el porcentaje de contaminación valorando la cantidad de membrana marcada presente en la preparación de endosporas aisladas.

Basados en la bibliografía se trabajó con un marcador fluorescente reportado como impermeable a la membrana interna de la mitocondria, la fluorescamina (21). Al hacer estos experimentos se observa que cuando se marcan los esporangios completos y se separan las endosporas, gran parte de la marca fluorescente se encuentra en éstas últimas al observar las preparaciones con un microscopio de fluorescencia.

Por otra parte, se trabajó con cantidades creciente de fluorescamina con células vegetativas, con el fin de saber si esta sustancia podría tener algún efecto sobre la actividad respiratoria. Los resultados demostraron que no hay cambios en la actividad.

Los resultados preliminares de la caracterización del SR de las membranas de la célula madre y de las endosporas obtenidas por el método descrito, nos demuestran que es posible distinguir ambas membranas por las características de su sistema respiratorio de tal manera que no es necesario realizar este tipo de modificaciones químicas para distinguir entre ambas membranas. La ausencia de membranas contaminantes quedó demostrada también mediante la observación de las membranas integras bajo el microscopio electrónico como se puede observar en la figura de la preparación (fig 7) , las endosporas lucen integras y no se

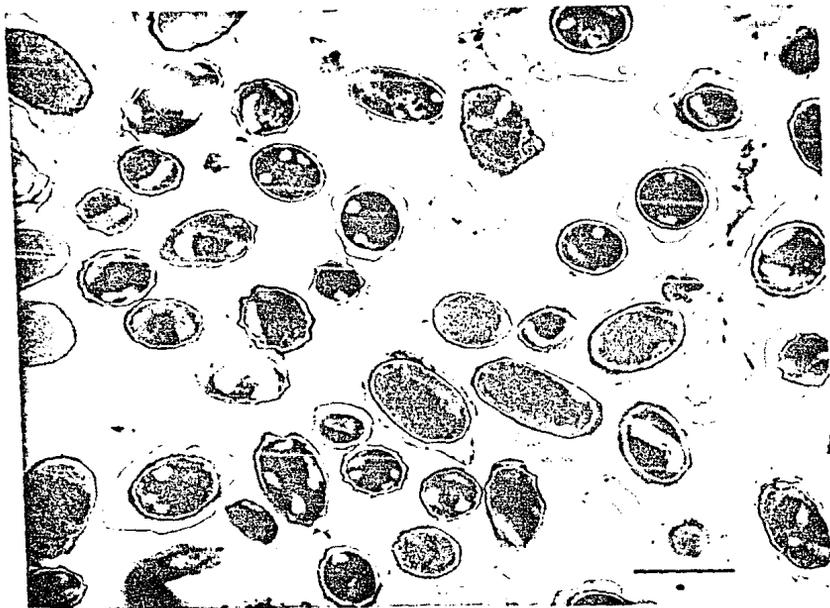


FIG. 7 Fotografía en el microscopio electrónico de las endosporas aisladas (estado IV a V) preparadas por la técnica de ruptura controlada (1) y purificadas por centrifugación diferencial (ver materiales y métodos). Se observa un buen grado de integridad de las endosporas con el fondo prácticamente limpio de restos de membrana del esporangio, las fracciones membranales que se observan pertenecen a exosporium de la endospora.

detecta contaminación por pared celular o membranas de la célula madre, los pocos restos membranales que aparecen en el fondo, pertenecen a restos de exosporio, cuya membrana en su apariencia difusa, es muy diferente a las bien definidas membranas de la célula madre o las rígidas estructuras de la pared celular.

Actividades Respiratorias en las Membranas de la Célula Madre y Endosporas del estado IV de Esporulación

En la tabla I se muestran las actividades respiratorias de las membranas de la célula madre y endospora del estado IV de esporulación. Estas actividades se compararon después de usar los sustratos fisiológicos (NADH y Succinato) y un sustrato artificial (mezcla de Ascorbato + TMPD). Los resultados muestran que en todos los casos estas actividades fueron mayores en el compartimento de la célula madre. Se observa además en la tabla I, que el NADH es el mejor donador fisiológico de electrones, mientras que el succinato es el sustrato con más baja actividad. Las membranas de las endosporas tienen aproximadamente el 70 % de la actividad presente en la membrana de la célula madre. Cuando se usa la mezcla de Ascorbato + TMPD la diferencia de actividad entre ambos compartimentos es muy grande ya que la endospora presenta solo el 20 % de la actividad encontrada en la célula madre. Por otro lado la relación de Asc. + TMPD/ NADH en las membranas de la célula madre es de 0,8 mientras que en la endospora es de 0.25.

Las actividades específicas de la NADH y succinato deshidrogenasas se duplican en las membranas de la célula madre, en comparación con las presentes en las endosporas en el estadio men-

TABLA I Actividades respiratorias asociadas a las membranas de la célula madre y endosporas del estado IV de esporulación de Bacillus cereus.

OXIDASAS	Actividad Especifica*		Relación a/b
	(a) Célula Madre	(b) Endosporas	
NADH	254	175	0.68
Ascorbato + TMPD	205	43	0.20
Succinato	18	12	0.66

Relación $\frac{\text{ASC} + \text{TMPD}}{\text{NADH}}$	0.80	0.25	

OXIDORREDUCTASAS			
NADH	208	105	0.51
Succinato	169	74	0.44

* Actividad específica expresada en $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para las oxidorreductasas y en $\text{ngatomo de O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para las oxidasas.

cionado.

Posteriormente se decidió medir las actividades durante todo el proceso de desarrollo de la endospora en los dos compartimentos. Los resultados se muestran en la figura 8, donde se observa por una parte que las actividades de NADH y Succinato dehidrogenasa en las membranas de la célula madre durante todo el proceso de maduración, son un poco mayores que las actividades en las endospora, así mismo se observa que ambas actividades específicas declinan lentamente hasta alcanzar un valor del 60 a 70 % de la actividad presente en el inicio de la maduración ($t_{2.5}$). La gráfica demuestra también, que las membranas de las endosporas maduras colectadas en el estadio $t_{4.5}$, contienen el 40 % de los niveles de actividad presentes en las endosporas jóvenes ($t_{1.5}$).

En la parte inferior de la misma gráfica se muestra que las actividades de la TMPDH₂ oxidasa y la NADH oxidasa son similares y decrecen lentamente durante la maduración. Se observa que la actividad de la TMPDH₂ oxidasa en las endosporas es de 3 a 4 veces menor que la presente en las membranas de la célula madre, pero que en ambas membranas decrece ésta actividad lentamente durante el desarrollo.

Mientras que la actividad de la NADH oxidasa en la membrana de la célula madre cae lentamente, en la endospora se presenta una caída rápida encontrándose que para el estado $t_{4.5}$ solo existe un 20 % de la actividad presente en las endosporas jóvenes. Por último la actividad de la succinato oxidasa en ambos compartimentos permanece constante y baja durante la maduración

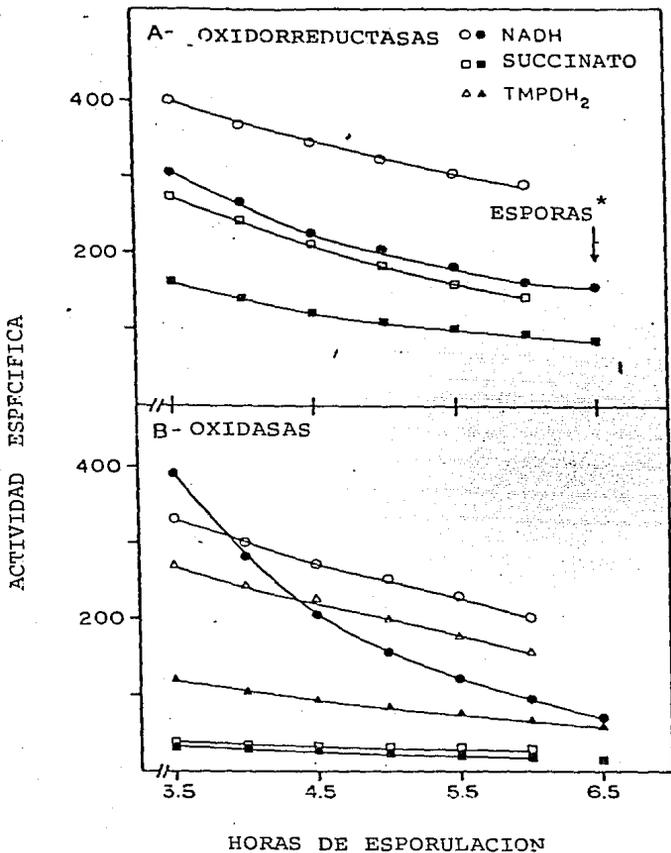


FIG. 8 Gráfica de las actividades respiratorias asociadas a las membranas de la célula madre (símbolos abiertos) y de la endospora (símbolos cerrados) durante los estados de maduración (III-VI) de la esporulación de Bacillus cereus. Arriba: Actividad específica de oxidorreductasas expresada en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Abajo: Actividad específica de oxidasas expresada en $\text{ngato mo O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

* Esporas Libres.

de la endospora.

Citocromos Asociados a las Membranas de la Célula Madre y Membranas de la Endospora del Estadio T IV de Esporulación

En la fig. 9 se muestran los espectros diferenciales obtenidos a temperatura de nitrógeno líquido de las membranas de la célula madre (trazo continuo) y de las membranas de la endosporas, trazo punteado). En la parte superior, espectro reducido con ditionita menos oxidado, aparecen los picos típicos de absorción para los citocromos b_{555} (427, 555, 526); citocromo c_{520} (416, 521, 548) y citocromo a_{430} (443, 603). En ambos tipos de membranas los niveles de reducción de los citocromos b y c son muy parecidos, pero la reducción del citocromo a_{430} es mayor en la membrana de la célula madre en el estadio IV, por otra parte, se aprecia una clara diferencia a nivel del citocromo o cuyo pico de absorción está a los 562 nm. Apareciendo como un en las membranas de la endospora, mientras que en las membranas de la célula madre no se detecta la presencia de este citocromo.

En la parte inferior de esta figura se presentan los espectros obtenidos después de haber reducido con ditionita, pero al problema se le burbujea monóxido de carbono con el fin de formar los complejos correspondientes con los citocromos o-CO (pico 416 valle 431) y a_{430} (picos 430, 592 valle 444). El complejo o-CO se encuentra en mayor cantidad en las endosporas y el complejo a_{430} -CO en la endospora se encuentra en menor cantidad

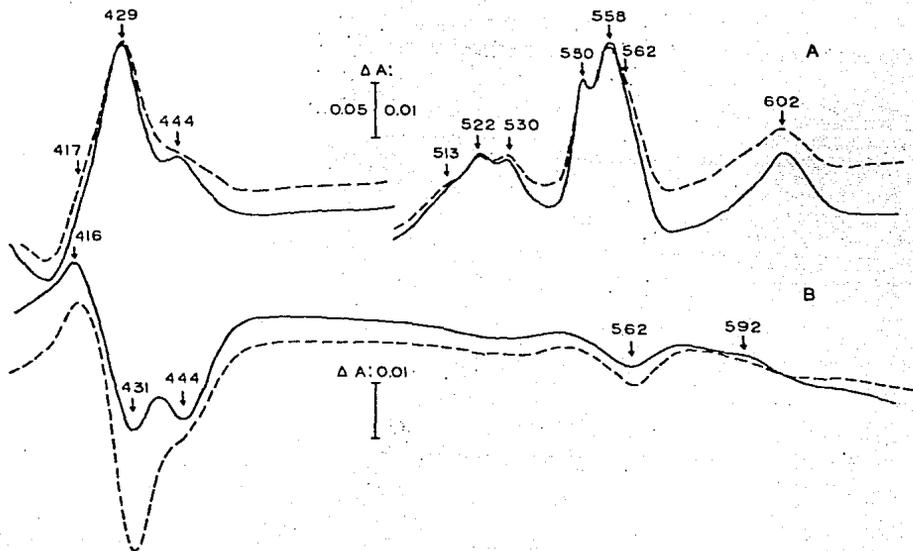


FIG. 9 Espectros diferenciales de las membranas de la célula madre (línea continua) y de las membranas de la endospora (línea punteada) del estado IV de esporulación.

Arriba: Espectros reducidos con ditionita menos oxidado con -- agitación vigorosa registrados a temperatura de N_2 líquido.

Abajo: Espectros reducidos con ditionita y burbujeado con CO -- menos reducido con ditionita (ver materiales y métodos) registrados a temperatura ambiente.

Las suspensiones de las membranas contienen 6.0 mg de proteína para todos los casos.

que en la célula madre.

Los espectros reducidos con Áscorbato+THPD o con NADH se muestran en la fig. 10. Los resultados muestran las mismas diferencias en los patrones de reducción de los citocromos. La célula madre presenta mayor reducción del citocromo a_{335} pero menor reducción del citocromo a .

Los resultados del análisis espectrofotométrico que hasta el momento se han presentado solo son cualitativos, debido a que, los espectros obtenidos a temperatura de nitrógeno líquido (77°K) no son adecuados para hacer un análisis cuantitativo, ya que la baja temperatura disminuye la distribución de energía vibracional de las moléculas lo que da por resultado una exageración de la concentración real de los citocromos. Con el fin de calcular las concentraciones reales de cada uno de los citocromos se realizaron los mismos espectros pero a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la tabla II. En la misma se observa que la endospora contiene solo la mitad de la concentración de citocromo a_{335} presente en la membrana de la célula madre, y en el caso del complejo del citocromo a -CO la concentración en la endospora es aproximadamente el doble, en cuanto a los citocromos c_{340} y a_{520} el contenido de la célula madre es un 33 % y 47 % mayor en la célula madre que en la endospora. La concentración del citocromo b_{550} en los dos compartimentos es la misma.

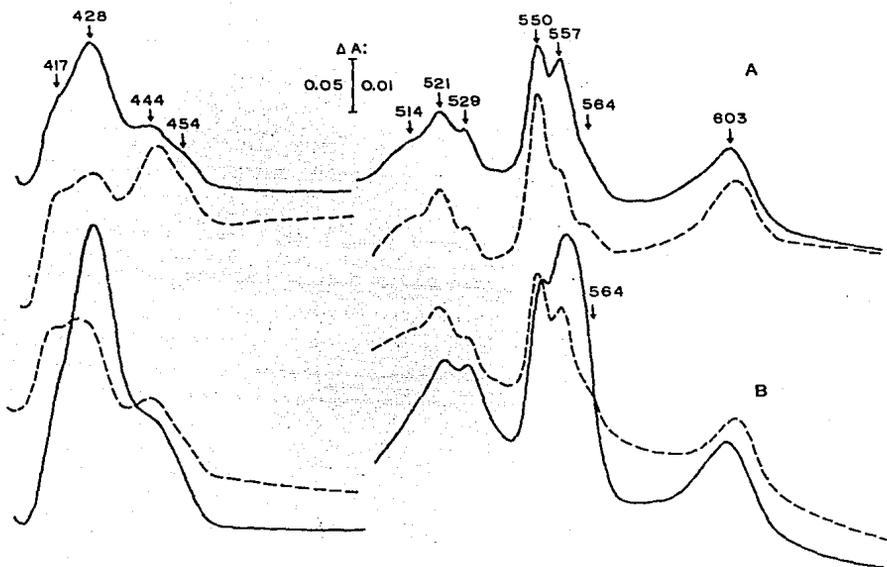


FIG 10 Espectros diferenciales de las membranas de la célula madre (A) y endosporas (B) del estado IV de esporulación reducidos con NADH menos oxidado con persulfato (líneas -- continuas), y reducidos con Ascorbato + TMPD (líneas punte adas)..

La suspensión de las membranas de la célula madre contiene 3.5 mg de proteína y la suspensión de la endospora contiene 4.5 mg de proteína. Los espectros se trazan a temperatura de N₂ líquido.

TABLA II Concentración de citocromos asociados a las membranas de la célula madre y endosporas de Bacillus cereus del estado IV de esporulación.

a) nmol mg de proteína

Citocromo	Célula Madre	Endospora	Relación END/MCM
b ₅₅₅	0.35	0.35	1.02
c ₅₅₀	0.35	0.27	0.77
aa ₃	0.13	0.07	0.53
a ₃ -CO	0.16	0.10	0.62
O-Co	0.07	0.12	1.71

^a Concentración de citocromos calculada de los espectros reducido menos oxidado. Los pares de longitud de onda y los coeficientes de extinción molecular usados son citados en materiales y métodos.

Cinética de Inhibición con Cianuro en las Membranas de la Célula Madre y Endosporas del estadio T IV de Esporulación

Trabajos anteriores (9) muestran que B. cereus presenta un sistema respiratorio ramificado. Los inhibidores como la atebrina, dicumarol, antimicina A y el HQNO muestran una inhibición monofásica y casi total mientras que el cianuro tiene una cinética diferente dando dos pendientes de inhibición, una a concentraciones menores de $10 \mu\text{M}$ correspondiente a la oxidasa sensible ($\text{cit } c \rightarrow \text{cit } a_{aa}$) y la otra permanece presente aún a concentraciones mayores de 1.0 mM correspondiente a la oxidasa insensible ($\text{cit } o$).

Los resultados de ambos compartimentos, muestran una diferencia en sus patrones de reducción fig. 10, así como diferente concentración de sus oxidasas terminales, tabla III. De acuerdo a nuestros podría esperarse una diferente cinética de inhibición con CN^- en las membranas de ambos compartimentos para la respiración estimulada por NADH o en su respiración endógena.

En la fig. 11 se muestra la cinética de inhibición por CN^- de los compartimentos para la respiración. En la sección A, se observa que la respiración endógena de las membranas de la endospora es significativamente más resistente al cianuro que la actividad endógena en las membranas del esporangio completo. En la misma figura en la sección B, se muestra que la actividad de la NADH oxidasa de las membranas de la endospora y membranas de la célula madre, tienen la misma cinética que la respiración endógena. La actividad de la Ascorbato-TMPD oxidasa en presencia

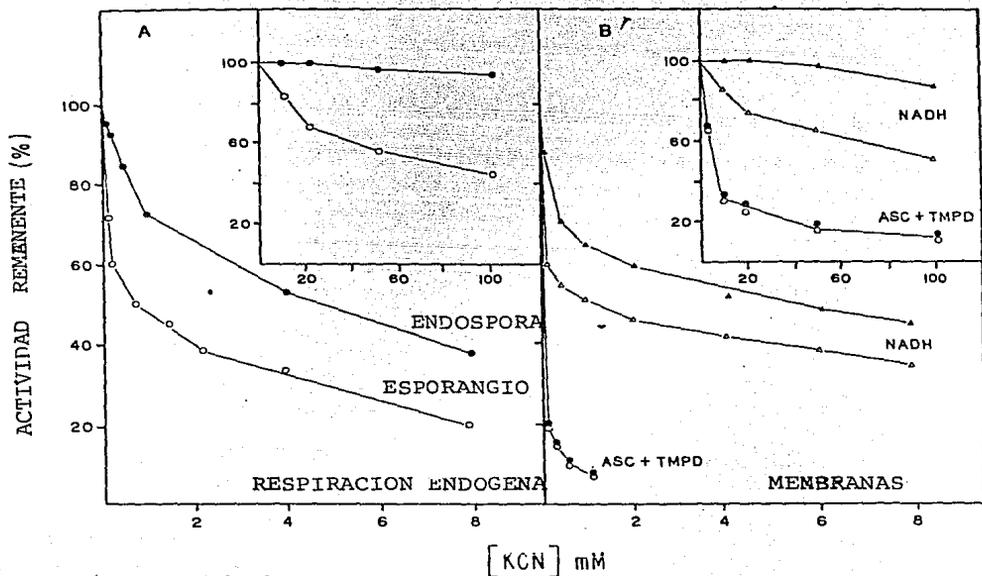


FIG. 11 Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad endógena en el esporangio completo y endosporas -- aisladas del estado IV de esporulación Sección A y sobre la respiración estimulada por NADH ($\blacktriangle, \triangle$) y Ascorbato + TMPD (\bullet, \circ) en las membranas de la célula madre (símbolos abiertos) y endospora (símbolos cerrados) Sección B. El consumo de O_2 se mide en 3.0 ml de buffer TCM + Sacarosa 0.25 M.

TABLA III Tabla comparativa de las actividades respiratorias y concentración de citocromos de las membranas de la endospora inmadura (estado III) y membranas de esporas maduras de B. cereus.

	^a Actividad específica		Relación END/ ESP
	Endospora	Espora	
OXIDORREDUCTASAS			
NADH	300	140	0.46
Succinato	160	75	0.45
OXIDASAS			
NADH	390	19	0.05
Succinato	35	14	0.42
Ascorbato+ TMPD	120	55	0.45
CITOCROMOS ^b			
aa ₃	0.07	0.06	0.85
b ₅₅₅	0.36	0.27	0.75
c ₅₅₀	0.27	0.22	0.81
0-CO	0.12	0.10	0.83
a ₃ -CO	0.10	0.08	0.85

^aActividades específicas de oxidorreductasas representada como nmol DCPIPH₂ min⁻¹ mg de proteína⁻¹ y para oxidasas representada como ng atomo min⁻¹ mg proteína⁻¹.

^b La concentración de citocromos se estimó como se describe en materiales y métodos.

de este inhibidor en ambos compartimentos es la misma, por lo que se supone que la respuesta de las curvas con NADH y endógena no puede ser debida a diferencias en la sensibilidad del citocromo aa_3 .

Actividades Respiratorias y Concentración de Citocromos en las membranas de las Endosporas del Estadio T III y Esporas Libres de B. cereus

En la figura 8 se observa que durante los estadios de maduración de las esporas de B. cereus, las oxidasas (succinato y Ascorbato + TMPD) y las deshidrogenasas (succinato y NADH) en los dos compartimentos declinan lentamente. Esta respuesta es la misma cuando se mide la NADH oxidasa en las membranas de la célula madre, en tanto que en la endospora esta última actividad disminuye significativamente más rápido, lo que sugiere que un mecanismo de inactivación específica podría estar funcionando durante la maduración de la espora. Debido a estos resultados se compararon las actividades respiratorias presentes en las membranas de las endosporas del estadio T III y de las esporas maduras. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla III, donde se observa que las actividades de deshidrogenasas succinato y NADH, succinato y ascorbato-TMPD oxidasas representan aproximadamente el 50 % de la presente en la endospora del estadio inmaduro. Las actividades de succinato y Ascorbato + TMPD oxidasa solo se conservan de un 40 -50 % de la actividad de la endospora joven.

Es importante señalar que existe una notable diferencia de actividad de la NADH oxidasa entre la espora joven y la espora madura, pues esta última solo contiene el 5 % de la actividad de la endospora inmadura. Con el objeto de corroborar la diferencia de actividades en las membranas de la espora madura se trazaron sus espectros diferenciales. En la fig 12 se observa que el espectro reducido con ditionita menos oxidado y en el reducido + CO menos reducido se presentan todos los picos de absorción de los citocromos encontrados en las membranas de la endospora joven. En la tabla III se presenta la cuantificación de estos citocromos, nótese que la espora madura contiene del 75-80 % de la concentración de los citocromos presentes en las membranas de la endospora joven. Para explicar la caída de la actividad de la NADH oxidasa en la espora madura, se realizó el espectro reducido con NADH menos oxidado (fig 12 Steady-State) de estas membranas donde claramente se observa que el nivel de reducción de los citocromos es muy bajo y que a medida que se incrementa el tiempo de incubación la reducción de sus citocromos se incrementa lentamente, en contraste con los citocromos de las membranas de la célula madre y de las endosporas bajo la condición steady-state sus citocromos alcanzan el máximo nivel de reducción en corto tiempo. Los resultados se presentan en la fig. 10.

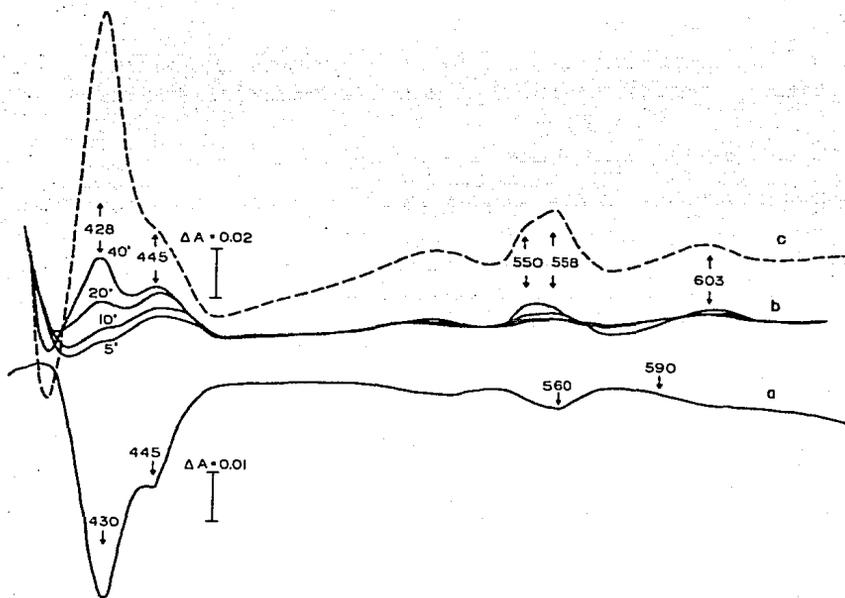


FIG 12 Reducción de los citocromos evocada por la reducción con ditionita y NADH en las membranas de la espóra madura de *B. cereus*. Espectro reducido con ditionita + CO menos ditionita menos ditionita en temperatura ambiente trazo (a), espectro reducido con NADH menos oxidado con agitación vigorosa, se observa la secuencia de reducción de los citocromos después de incubar a diferentes tiempos (2, 5, 10, 20. min) trazo (b), espectro reducido con ditionita menos oxidado trazo (c).

Reactivación de la Actividad de la NADH Oxidasa y
Elevación de los Niveles de Reducción de los Citocromos en las
Membranas de la Espora Madura

En la tabla I se muestra que en las membranas de la célula madre existe el doble de la actividad de la NADH oxidasa de la presente en las membranas de la endospora y que esta diferencia se hace aún mayor en las membranas de la espora madura tabla III. Por otra parte, en las figs. 9 y 10 se muestra que la actividad de la NADH deshidrogenasa presente en los tres tipos de membranas es la suficiente para que existan buenos niveles de reducción de los citocromos con este sustrato. En las membranas de la espora madura reducen pobremente los citocromos fig. 12 al contrario de lo que sucede con las membranas del esporangio completo de estadios jóvenes y de su endospora fig. 10.

Si en la espora madura existen las deshidrogenasas y los citocromos, el único componente de la cadena respiratoria que podría estar influyendo en la caída de la actividad de la NADH oxidasa es la menaquinona. Para probarlo se adicionó un poco de menadiona (compuesto análogo a la menaquinona) a las membranas de la espora madura y se midió la actividad de esta oxidasa, encontrándose un incremento significativo en la actividad. Después de adicionar concentraciones crecientes de menadiona se observa que la actividad se restaura rápidamente, aún a bajas concentraciones y que alcanza un nivel máximo similar al de las membranas de la célula madre y endosporas de estadio III de

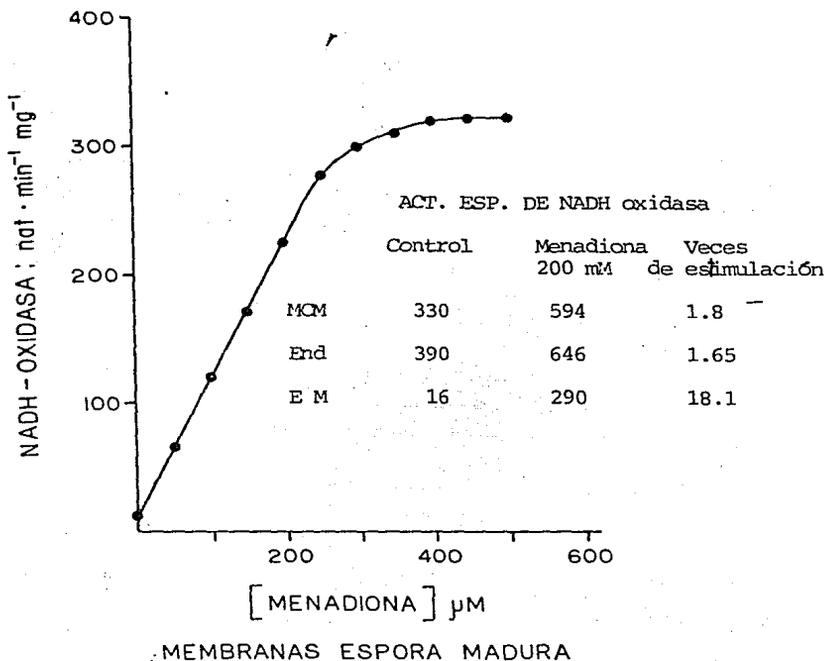


FIG 13 Efecto de la concentración de menadiona sobre la respiración - dependiente de NADH 0.5 mM en las membranas de la espora madura (la - actividad se mide en cubetas de 3 ml).

Los números muestran la estimulación de la actividad ejercida por la - adición de 200 mM de menadiona sobre la célula madre (MCM) y endosporas (End) del estado IV de esporulación y de las membranas en la espora - madura (EM).

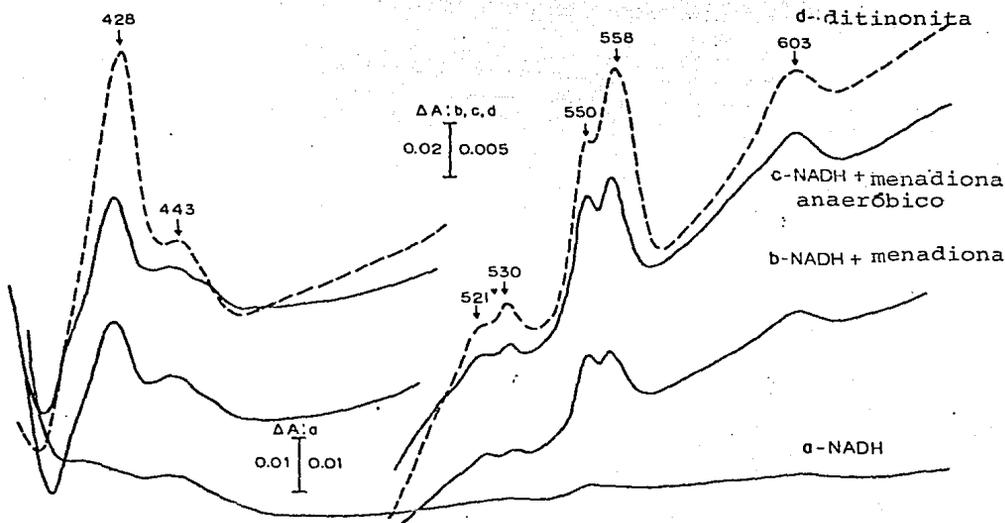


Fig. 14 Se presentan los espectros reducidos con NADH menos oxidados de las membranas de la endospora (a) .A la cubeta de muestra se le adiciona menadiona trazo (b) y por último - se dejo incubar la muestra anterior hasta alcanzar el estado anaeróbico trazo (c) donde se muestra que los picos en estos casos va aumentando progresivamente hasta alcanzar casi el nivel dado por la reduccion con ditionita (d).

esporulación fig. 13.

La fig. 14 presenta los espectros reducidos con NADH menos oxidados de las membranas de la endospora adicionadas con menadiona, donde se observa un incremento considerable de la reducción de todos sus citocromos en comparación del control fig. 14 (a) realizado en ausencia de menadiona. La misma cubeta experimental se deja incubar durante 15 min. con el fin de llegar al estado anaeróbico (b) encontrando que los citocromos presentan un nivel de reducción similar al alcanzado por la reducción con ditionita (c).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Dado que el objetivo de este trabajo fué comparar el Sistema Respiratorio de las membranas de la célula madre de -- Bacillus cereus, fue importante conocer el grado de pureza en la preparación de las membranas de la endosporas, para poder afirmar cualquier resultado que en este estudio se encontrara. Por lo que se probó un marcador de membrana como lo es la fluorescamina, que según los reportes de la bibliografía es reportada como impermeable a la membrana interna de la mitocondria (21); se observaó que la membrana bacteriana es permeable a dicho compuesto, ya que al marcar las células del estadio T IV de esporulación y observarlas al microscopio de fluorescencia, tanto la membrana de la célula madre como la endospora se encontraron marcadas, por lo que este compuesto no nos fue útil para conocer el grado de pureza en la purificación de endosporas obtenidas de los diferentes estadios de esporulación. Dado este resultado el método usado para estar seguros de la pureza de nuestras preparaciones, fué observarlas al microscopio electrónico, donde fue claro que no había una contaminación importante de membrana de la célula madre en las preparaciones de las endosporas aisladas por este método, por lo que se consideró que los resultados de este estudio son confiables.

Durante el desarrollo de éste trabajo se encontró que las membranas de la célula madre y endosporas de estadio IV de esporulación presentan el mismo arreglo en su S.R., pero difieren en la concentración de sus citocromos y actividades

respiratorias.

En la fig. 15 se muestra un resumen de éstas diferencias. Las membranas de la endospora son claramente distintas de las membranas de la célula madre en su bajo contenido de cit aas, baja actividad de TMPDH₂-oxidasa, pero al mismo tiempo alto contenido de citocromo o (fig. 9 y tabla II), y como consecuencia se observa un comportamiento cinético distinto hacia el cianuro entre las membranas de ambos compartimentos. Como se mostró en la fig. 10, la respiración endógena de las endosporas intactas y la respiración dependiente de NADH de éstas membranas son mayores que en las membranas de la célula madre y del esporangio completo, lo que sugiere que el camino resistente al cianuro tiene una mayor contribución en la actividad respiratoria de las endosporas que en el compartimento de la célula madre. En un trabajo anterior realizado por Hogarth (13), se encontró que en las células del estadio V de esporulación de Bacillus megaterium el contenido de citocromo c es menor en la endospora y que a su vez presenta mayor contenido en citocromo o, no habiendo una diferencia aparente en el contenido de citocromo aas, así que se podría pensar que las diferencias en la concentración de los citocromos c y aas en ambas especies, están directamente relacionadas con la baja actividad de la TMPD oxidasa y su resistencia al cianuro.

En los resultados reportados por Andreoli y cols. (2) y por Escamilla y Benito (8), se demostró que durante los estadios vegetativo y esporulante de B. cereus, existen diferencias en la concentración de sus citocromos y de sus actividades respiratorias, estas diferencias se presentan desde los estadios

	CELULA MADRE	ENDOSPORA
NADH-OXIDASA	++++	++++
TMPD_OXIDASA	++++	+
Cit aa ₃	++++	++
Cit 0	++	++++
RESISTENCIA A CN ⁻	++	++++
TENSION DE O ₂	++++	+ ?

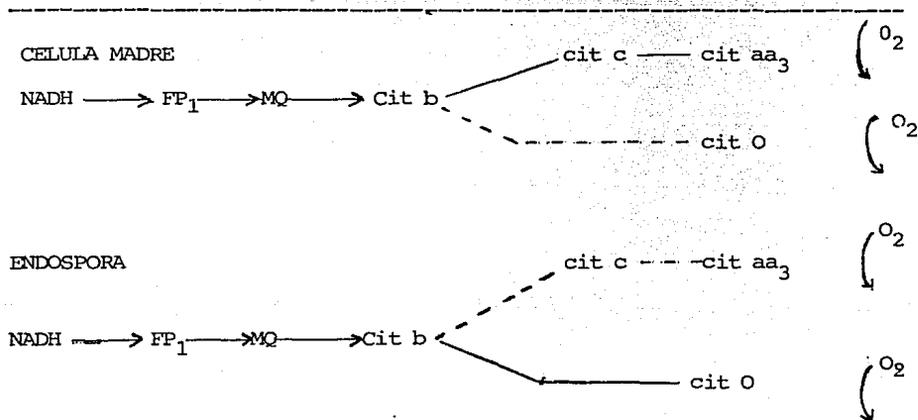


FIG. 15 Resumen de los resultados encontrados al comparar el SR de las membranas de la célula madre y endosporas del estado IV de esporulación de B. cereus.

tempernos de esporulación, lo que nos está hablando de que desde el inicio de la formación de la espora, existe una expresión genética distinta en ambos compartimentos; si además de esto se considera que la membrana externa de la endospora es sintetizada en distinto tiempo, que la de la membrana de la célula madre, entonces ésta podría explicar las deferencias en la concentración de los citocromos y actividades de ambas membrabas.

Por otra parte, se mostró que la actividad de la NADH oxidasa durante el desarrollo de la endospora cae rápidamente (fig.8) y esta actividad en la espora madura sólo alcanza el 5% de la actividad presente en la endospora joven (estadio III).

Setlow y cols. en 1981 (17) observaron que aproximadamente una hora antes de la acumulación de ácido dipicolínico, la relación de NADH/NAD⁺ en la endospora de B.megatorium, cae a valores tan bajos como los encontrados en la espora madura, ésta caída podría ser la causa de la baja en la respiración endógena y actividad de la NADH oxidasa que se observaron en los estadios finales de la maduración de la endospora de B.cereus. Sin embargo, no sólo la respiración endógena de la endospora decrece conforme avanza su maduración, sino que también la actividad de la NADH oxidasa cae más rápido que el resto de las actividades (fig. 8) y ésta caída podría ser la causa de que los citocromos sean tan pobremente reducidos por el NADH en la espora madura (fig.13), apoyando de ésta manera la idea de que el flujo de electrones esté limitado por la baja concentración de quinona en la cadena, lo cual está apoyado por el experimento de la reactivación con la menadiona sobre las

membranas de la espora madura (fig.12) donde se muestra la recuperación de la actividad de NADH oxidasa al adicionar concentraciones crecientes de menadiona.

Durante la maduración de la endospora, varios eventos de demanda energética tienen lugar y como consecuencia de esto un sistema respiratorio completamente activo parece ser necesario durante este periodo como lo sugiere la fuerte inhibición ejercida por el cianuro en las etapas tempranas de desarrollo de la célula esporangial (15). La energía de este proceso parece ser generada dentro de la espora como lo sugieren los altos niveles de NADH y ATP (17,18) y la alta respiración endógena detectada en las endosporas aisladas (2,13,22). Una disminución en la actividad metabólica de la endospora parece ocurrir al rededor de los estados IV y V como lo sugiere la baja de ATP y NADH (17,18) y como se mostró anteriormente por la caída en la respiración endógena. Además en este estado un sistema respiratorio completamente activo en la endospora parece ser innecesario para su futuro desarrollo; sin embargo después de este tiempo mucha de la demanda energética parece ocurrir fuera de la endospora y es aparentemente soportado por la célula madre. En realidad la célula madre mantiene los niveles constantes de ATP (17,18) y como lo sugieren nuestros resultados, un sistema respiratorio activo.

Wilkinson y cols. (22) reportaron que la NADH oxidasa de B.megaterium es súbitamente activada durante los primeros minutos de la germinación en un proceso que ocurre aún en presencia de cloramfenicol, nosotros hemos observado que la adición de menadiona en las membranas de la espora madura induce

un notable incremento en la respiración de la NADH. Si estas conclusiones están relacionadas con la baja actividad de la menaquinona endógena en la membrana de la endospora deberá ser materia de un estudio con más detalle.

Por último y como conclusión final de éste trabajo podemos afirmar que, a diferencia de la membrana de célula madre la membrana de la endospora de Bacillus cereus usa preferentemente la vía insensible a cianuro (fig.15) que le permite estar MEJOR ADAPTADA PARA LA RESPIRACION A BAJA TENSION DE OXIGENO.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Andreoli, A. J., Shuehiro, D., Sakiyama, J., Takemoto, E., Vivanco, J.C. Lara M.C. Klute. 1973. Release and recovery of forespores from Bacillus cereus. J. Bacteriol. 115: 1159-1166.
- 2.-Andreoli, A.J., Saranto, J., Baecker, P.A., Suehiro, S., Escamilla, E. and Steiner, A. 1975. Biochemical properties of forespores isolated from Bacillus cereus. p 418-424. In P. Gerhardt, R.N. Costilow and H.L. Sadoff (ed), Spores VI. Amer. Soc. for Microbiol, Washington, D.C.
- 3.-Arrigoni, D., and T.P. Singer. 1962. Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases. Nature (London) 193: 1256-1258.
- 4.-Benito Mercado Ma. del Carmen 1979. Regulación de la Succinato deshidrogenasa durante el crecimiento y esporulación de Bacillus cereus Tesis Fac. de Química. UNAM.
- 5.-Collier, R. E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in Clostridium roseum, p.10-17. In H.O. Halvorson (ed), Spores. American Institute of Biological Sciences, Washington D.C.
- 6.-Ellar, D. J., and J.A. Postgate. 1974. Characterization of forespores isolated from Bacillus megaterium at different stages development into mature spores; p. 21-40. In A.N. Barker, G. W. Gould and J. Wolf (ed) Spore Research 1973. Academic Press,

London.

7.-Ellar, D.J., Eaton, M.K., Hogarth, C., Wilkinson, B.J., Deans, J., and La Nuze, J. 1975. Comparative biochemistry and function of forespore and mother cell compartments. During sporulation of Bacillus megaterium cells. p.425-433. In P. Gerhardt, R.N. Costilow and H. L. Sadoff (ed) Spore VI, Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D. C.

8.-Escamilla, J.E. and M.C. Benito. 1984. Respiratory system of vegetative and sporulating Bacillus cereus. J. Bacteriol. 160:437-447

9.- Escamilla M.J.E. 1985. Composición, Organización y Regulación del Sistema Respiratorio de Bacillus cereus. Tesis Doctorado (Bioquímica) Fac. de Química UNAM.

10.-Felix, J., and Lundgren. D.G.. 1972. Some membrane Characteristics of Bacillus cereus during growth and sporulation, p. 35-44. In H.O. Halvorson, R Hanson and L.L. Campbell. (ed) Spores V. Amer.Soc. for Microbiol. Washington D.C.

11.-Gel'man, M.S., Lukoyanova, M.A.Ostrovskii, D.N. 1957. The respiratory chain and its organization in the Bacterial membrane. In membranes vol. 6, pp 129-215 (Editor mismos autores), Plenum Press. New York.

12.-Hanson, R.S., 1979. The physiology and diversity of Bacterias endospores. In Developmental Biology of Prokariotes , pp 37-57 Parish J. H (ed). University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

13.-Hogarth, C.,B. J. Wilkinson and D.J.Ellar. 1977. Cyanide-resistant electron transport in sporulating B. megaterium K M.Biophys. Acta 461: 109-123.

14.-Harol, M. Temberg and L.Packer 1978. Chemical Modification of mitochondria. Labeling of Inner Membranes :Methodos in enzimology vol.LVI 613-621.

15.-Lang, D.R.,J. Felix, and D.G. Lundgren. 1972. Development of a membrane bound respiratory system prior to and during sporulation in Bacillus cereus and its relationship to membrane structure. J. Bacteriol. 110:968-977.

16.-Lowry, O.H.,Rosenbrought, N.J., Farr, A, K. y Randall, R,J.1951 J. Biological,Chem. , 193:265.

17.-Setlow, P.1981 Biochemistry of bacterial forespore development and spore germination, p. 13-28. In H.S. Levinson, A. L. Sonenshein and D.J. Tipper (ed) Sporulation and Germination 1980. Amer. Soc. for Microbiol., Washington.

18.-Singh, R. P., B. Setlow, and P. Setlow. 1977. Levels of small molecules and enzymes in the mother cell compartment and the

forespore of sporulating Bacillus megaterium. J. Bacteriol. 130: 1130-1139.

19.-Smith, L. 1978. Bacterial cytochromes and their spectral characterization. Methods Enzymol. 53: 202-213.

20.-Steinberg, W., H.O. Halvorson, A. Keyman, and E. Weinberg. 1965. Timing of synthesis during germination and outgrowth of spores of Bacillus cereus strain T. Nature (London) 208:710-711.

21.-Weigle, M.S., and De Bernardo, and W Leimgraber. 1972. Florescamina: A Reagent of assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the Picomole Range. Since Vol. 178:871-872.

22.-Wilkinson, J., and D. J. Ellar. 1975. Morphogenesis of the membrane-bound electron transport system in sporulating Bacillus megaterium KM. Eur. J. biochem 55:131-139.

23.-Wilkinson, B.J., D.J., Ellar, I. R. Scott, and M.A. Koncewicz. 1977. Rapid, chloramphenicol-resistant, activation of membrane electron transport on germination of Bacillus spores. Nature (London) 266:174-176.

24.-Young, m., and J. Maldestam. 1979. Early events during bacterial endospore formation. Adv. in Microbial Physiol. 20:103-162.