

24
109

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de las oxidasas terminales (citocromo
aa₃ y citocromo c) del sistema respiratorio de
Bacillus cereus.

Tesis que para obtener el título de Biólogo
PRESENTA
Víctor Linares Castro.

1986



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.

INDICE

RESUMEN -----	1
INTRODUCCION -----	2
GENERALIDADES DE LA ESPORULACION -----	8
MATERIALES Y METODOS -----	19
RESULTADOS -----	28
DISCUSION -----	42
CONCLUSIONES -----	49
ABREVIATURAS -----	50
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA -----	51

RESUMEN

Se estudió la actividad independiente de las citocromo oxidasas terminales que forman parte del sistema respiratorio de Bacillus cereus. Dicho estudio se realizó en membranas de la fase esporulante. Cinéticamente fué posible distinguir la actividad de dos oxidasas con distinta afinidad por el oxígeno ($K_m=7.7 \mu M$ y $K_m=2.8 \mu M$). Además la cinética de NADH oxidasa y TMPD oxidasa en presencia de los inhibidores cianuro y/ó monóxido de carbono, sugieren la participación de cuando menos dos vías de transporte de electrones, con diferente sensibilidad al cianuro.

Mediante espectros diferenciales, ditionita + CO menos ditionita, efectuados anteriormente en el laboratorio en el mismo bacilo, se pudo detectar dos citocromos oxidasas, la aa_3 y la o .

De B. cereus, se aisló un mutante que carece de citocromo oxidasa aa_3 (como se pudo apreciar en los espectros diferenciales) al cual se le denominó PYM. Con la cinética de NADH oxidasa en presencia de cianuro practicado en la cepa PYM, se pudo detectar la actividad de la citocromo oxidasa o , sin la interferencia de la vía principal (aa_3) para el transporte de electrones.

INTRODUCCION

Las bacterias están ampliamente distribuidas en el planeta debido a que han habitado en él durante las tres cuartas partes de su existencia y de ahí su gran diversidad. A las bacterias se les encuentra en estanques, ríos, agua de mar, en alimentos, en el tracto digestivo del hombre y de otros animales (6*). La diversidad bacteriana abarca prácticamente todos los nichos ecológicos, crecen en temperaturas extremas que van desde por debajo de los cero grados hasta temperaturas superiores a los cien grados. Los nutrientes que utilizan son muy diversos pueden ser tan simples como el CO_2 y N_2 que utilizan como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, ó bien usar mezclas complejas (13, 8).

Sólo algunas especies bacterianas son nocivas al hombre y a ciertos vegetales y animales de importancia económica, las demás son inofensivas y algunas son benéficas incluso de vital importancia para la existencia de plantas y animales por su función ecológica, como ocurre con las bacterias fijadoras de N_2 y las degradadoras y transformadoras de materia orgánica (6*).

Existen especies bacterianas aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas. El sistema respiratorio bacteriano varía de una especie a otra, aunque en términos generales es semejante al sistema respiratorio mitocondrial de eucariotes (9). Algunas especies bacterianas en cultivo tienen la capacidad de formar sistemas respiratorios mucho más complejos, de tal forma que los tipos y concentraciones de los componentes del sistema dependen de las variables del cultivo,

tales como nutrientes, flujo de O₂, temperatura, agitación, etc. y del estado de desarrollo de la población.

La capacidad de formación de sistemas respiratorios complejos, es una estrategia de muchas especies bacterianas por la que obtienen energía bajo diversas situaciones ambientales, siempre y cuando dispongan de fuentes de carbono y nitrógeno (30). Existen muchas especies bacterianas cuyos sistemas respiratorios están formados por varias cadenas que pueden funcionar independientemente ó entrecruzarse y formar sistemas ramificados. Así las bacterias son capaces de adaptarse a las variaciones del medio ambiente capacidad que es debida en gran parte al sistema respiratorio. Si la tensión de O₂ en el medio es baja, la bacteria favorece la síntesis de los citocromos a₁ y a₂ que cinéticamente se distinguen por su alta afinidad por el O₂, mientras que a tensiones mayores los citocromos a₃ y o funcionan óptimamente como oxidasas.

Hasta aquí se han indicado algunas diferencias generales importantes del sistema respiratorio bacteriano, cuya función principal es proporcionar energía al organismo. Sin embargo, dicho sistema no existía en los organismos unicelulares más antiguos, tales como bacterias, las cuales con mucha seguridad eran heterótrofas; es decir no fabricaban sus propios alimentos, sino que los tomaban ya elaborados de la gran cantidad de materia orgánica disuelta en los mares primitivos, y que se había formado abióticamente (1* y 3*). Estas substancias, por ejemplo los carbohidratos, incorporados al interior de las primeras células, eran utilizadas para obtener energía aprovechable biológicamente por medio de la fermentación

anaerobia, un proceso que es poco eficiente desde el punto de vista energético (3*). Con el transcurso del tiempo, las sustancias alimenticias fueron escaseando, por lo que dichos microorganismos requerían de un sistema que aportara energía más eficientemente. Así que en el transcurso de la evolución fueron apareciendo microorganismos fotosintéticos, entre los cuales las algas verde-azúles y bacterias fotosintéticas, eran capaces de incorporar al dióxido de carbono (CO_2) presente en la atmósfera a compuestos reducidos de origen metabólico utilizando para ello el ácido sulfhídrico (H_2S) atmosférico (en bacterias fotosintéticas) y al agua mediante procesos fotosintéticos (en algas verde-azúles) (1* y 3*). En la fotosíntesis de las algas verde-azúles, se liberaba oxígeno con la consecuente transformación de la atmósfera de reductora a oxidante. Dicha transformación atmosférica, provocó que muchas especies microbianas (incluyendo ciertas especies bacterianas) que no toleraban al oxígeno libre desaparecieran, otras se retiraron a microambientes anaerobios (1*), como son los lodos marinos; sin embargo, algunas especies microbianas, probablemente descendientes de bacterias fotosintéticas, desarrollaron o readaptaron su sistema fotosintético en un sistema respiratorio ya que son muy parecidos ambos sistemas (1*).

A pesar del desarrollo evolutivo y de las grandes diferencias encontradas en el sistema respiratorio de muchas especies bacterianas, todavía se puede generalizar dicho sistema, en el cual ocurre una serie de reacciones de oxidación-reducción que produce energía (ATP); dichas reacciones suceden con

transferencia de electrones desde un dador electrónico (el agente reductor) a un aceptor electrónico (el agente oxidante) (4*). En algunas reacciones de oxidación-reducción, la transferencia de electrones se realiza mediante transferencia de hidrógeno.

Con referencia al parrafo anterior, es posible describir un esquema general del sistema respiratorio bacteriano (fig. 1), en donde se agrupan las posibilidades de su organización con base en las características de diversos grupos bacterianos, en que se consideran tres sectores: El sector de entrada constituido por múltiples deshidrogenasas y flavoenzimas; un sector intermedio que puede ser común ó formado por vías paralelas, constituido por quinonas, centros de fierro- azufre, citocromos del tipo b y c y otras metaloproteínas; y el sector de salida que puede estar formado hasta por cuatro citocromos diferentes (a_1 , a_2 , a_3 y o) cuando el aceptor final es el O_2 , en ausencia de éste, puede utilizar diversos aceptores inorgánicos y orgánicos tales como nitrito, nitrato y sulfato; en cada caso habrá una reductasa específica y en muchos casos un citocromo de tipo b ó c que enlaza a la reductasa con el sector intermedio del sistema. Por tanto se puede decir que la presencia de sistemas respiratorios alternos es un fenómeno muy comunmente distribuido en muchas especies bacterianas, como ejemplos se tienen a Escherichia coli, Azotobacter vinelandii, Pseudomonas putida, y P. aeruginosa (14).

Por otra parte, durante la esporogénesis se han encontrado modificaciones, tanto cualitativas como cuantitativas, en la cadena de transporte de electrones (CTE) de las distintas especies de bacilos. Por ejemplo, en Bacillus megaterium, se ha



Fig. 1. Posibilidad de composición y organización de los Sistemas Respiratorios Bacterianos. De acuerdo al esquema propuesto por N. S. Gel'man (13).

descrito (15) durante el crecimiento exponencial la ausencia de citocromo c y su aparición durante los primeros estadios de esporulación, aparecen en este proceso cadenas alternas poco sensibles al cianuro (CN⁻). En B. subtilis también se ha demostrado la presencia de citocromo o (30), el cual puede funcionar como oxidasa terminal. En B. cereus Halvorson (15) encontró que existe un incremento notable en el consumo de oxígeno una vez que las células dejan de dividirse y alcanzan los primeros estadios de esporulación. Felix y Lundgren (12) demostraron un marcado incremento en el nivel de citocromos al finalizar el crecimiento vegetativo, esos niveles permanecieron a lo largo de la esporulación. Además estos investigadores, encontraron, que la inhibición del transporte de electrones, por la adición del CN⁻ al medio de cultivo, tenía poca influencia en el crecimiento vegetativo pero inhibía fuertemente la esporulación. Estos resultados apoyan la idea, de que durante el crecimiento vegetativo, no es indispensable la cadena respiratoria típica, la cual es absolutamente necesaria para la esporulación.

A pesar que se ha intentado obtener ó desarrollar inhibidores respiratorios específicos de cada una de las oxidasas bacterianas no ha sido posible. El CN⁻ que es un inhibidor clásico de la citocromo c oxidasa (citocromo aa₃ mitocondrial) también inhibe fuertemente a la oxidasa aa₃ bacteriana. Diferentes trabajos (1, 21) sugieren que el CN⁻ actúa con menor potencia sobre las oxidasas terminales alternativas al citocromo aa₃ (citocromos o, d y a₁). Por otro lado se ha sugerido que las

citocromo oxidasas bacterianas tienen diferente afinidad por el O_2 y el monóxido de carbono (CO) (3, 6, 21, 24).

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis es el de analizar las cinéticas de inhibición para el CN^- y CO y la cinética de afinidad para el O_2 y tratar de distinguir la actividad independiente de las oxidasas terminales que forman parte del sistema respiratorio de Bacillus cereus.

GENERALIDADES DE LA ESPORULACION

La esporulación bacteriana se halla ampliamente distribuida, se encuentra en las bacterias de los géneros Sporosarcina, bacterias filamentosas del género Thermoactinomyces y las bacterias del género Desulphatumaculum. Como se sabe, la formación de endosporas no está restringida a un grupo de organismos íntimamente relacionados, siendo enorme la diversidad fisiológica de las bacterias de estos géneros; algunas son anaerobias (Clostridium) mientras que otras son aerobias ó anaerobias facultativas (Bacillus), algunas tienen requerimientos nutricionales simples, mientras que otras requieren sustancias muy elaboradas (como en el caso de especies parásitas). Las especies mencionadas forman una sola espora por cada célula. Se han encontrado otro tipo de microorganismos que forman más de una espora por cada célula; éstos microorganismos no están perfectamente bien caracterizados desde el punto de vista taxonómico, y generalmente se encuentran asociados a organismos hospederos constituyendo un mutualismo, entre ellos se encuentra un organismo designado Metabacterium polyspora que puede formar de dos a cinco esporas endógenas. Los organismos hospederos generalmente son los artrópodos y anfibios.

El inicio de la esporulación, se da normalmente después de la fase de crecimiento logarítmico, cuando se ha agotado la fuente de carbono fermentable, cesa la glicólisis y el esporangio depende totalmente para su desarrollo del metabolismo oxidativo, alcanzan sus actividades máximas el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. De esta forma se produce la espora, la cual en

condiciones ambientales favorables emergerá como célula vegetativa después del proceso de germinación.

Si el microorganismo es genéticamente capaz de esporular y las condiciones favorecen el proceso, entonces se lleva a cabo la esporulación, produciendo una endospora en el lapso aproximado de 8 a 10 horas.

El proceso de esporulación se ha estudiado en el microscópio electrónico y se han observado los cambios morfológicos, que conducen a la formación de la espora, que son similares en todas las especies de Bacillus y Clostridium. Este proceso se ha dividido en siete estadios morfológicos que se muestran en la figura 2.

El Estadio 0 se refiere a la célula vegetativa. Esta contiene dos ó más copias duplicadas del cromosoma que se ven como cuerpos discretos, compactos y aparentemente esféricos. La síntesis del ácido desoxirribonucleico cesa, pero los cuerpos de cromatina continúan cambiando en distribución y en forma hasta que constituyen un filamento axial dentro de cada célula; este cambio representa el Estadio I de la esporulación. Esta etapa es seguida por el crecimiento e invaginación de la membrana en uno de los polos de la célula, y la formación el septo esporangial que delimita dos compartimentos a) el de la célula madre, que ocupa dos terceras partes del volumen total del esporangio, y b) el de la forespora ó prespora, que ocupa el resto del volumen, a esto se denomina Estadio II; durante este evento empieza a sintetizarse un peptidoglicano que asegura la formación del septo; una vez que éste se ha formado, el peptidoglicano es

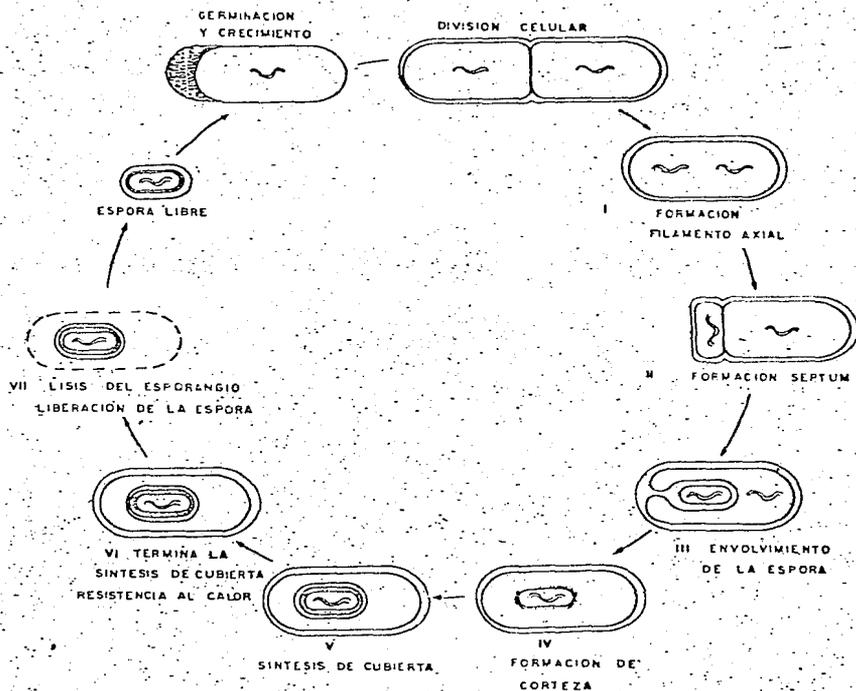


Fig. 2. Ciclo de vida de una bacteria esporulante y estadios morfológicos.

digerido por la bacteria que continúa al Estadio III, en el cual la célula más grande engloba a la más pequeña mediante el crecimiento continuo de la membrana, se forma así un protoplasto rodeado por dos membranas, las cuales estarán orientadas en oposición. El Estadio IV marca el inicio de la formación de la corteza, en donde el peptidoglicano cortical se sitúa entre las membranas interna y externa de la prespora y forma la corteza. La corteza es un componente específico de la espora, desaparece durante la germinación y no se encuentra en las células vegetativas. Se ha demostrado que en la corteza se deposita ácido dipicolínico (ADP), polímero de peptidoglicano y calcio. Este estadio es seguido por la terminación de las cubiertas de proteína, acumulación de ADP, la incorporación de calcio, el desarrollo final de la corteza y la terminación de la espora (Estadio V), que llega a ser un cuerpo brillante. La espora madura dentro del esporangio representa el Estadio VI; hasta aquí termina la diferenciación. El Estadio VII es en sí la liberación de la espora madura.

Estructura de la Endospora

Ultraestructuralmente la espora bacteriana está formada por diferentes capas (fig. 3). La más externa que rodea a la espora, llamada exosporium, es una capa delgada que rodea por fuera a la cubierta de la espora; presenta una estructura ordenada, con fragmentos hexagonales que semejan una configuración cristalina. Por debajo del exosporium se encuentran

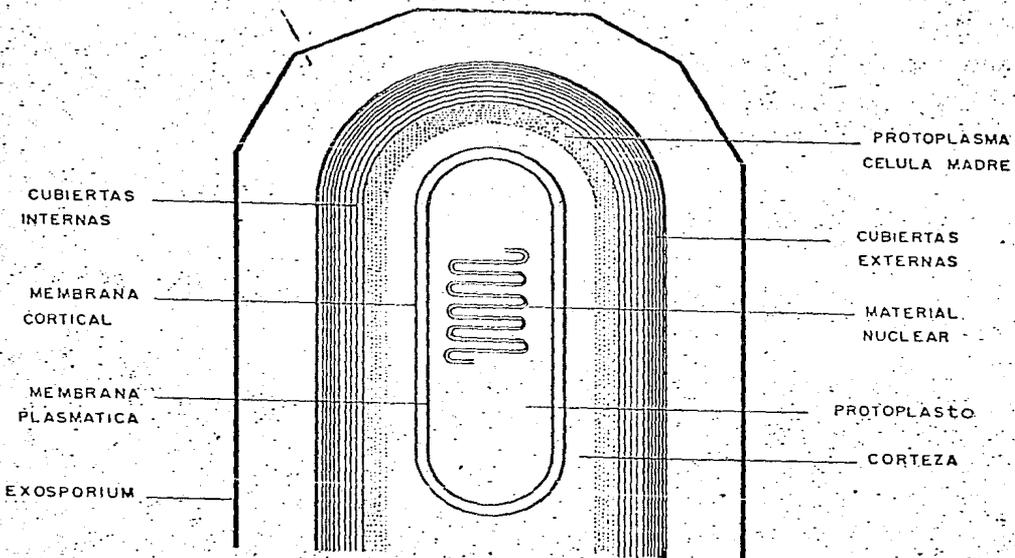


Fig. 3. Representación esquemática de la ultraestructura de una espora bacteriana típica.

las capas de la cubierta de la espora, constituidas por un 90% de proteína. Por debajo de esta capa, se encuentra una membrana delgada que separa la cubierta de la espora de la corteza de la espora, que es una área de baja densidad electrónica compuesta de capas concéntricas que ocupa aproximadamente la mitad del volumen de la espora. La pared del protoplasto se encuentra ubicada debajo de la corteza, inmediatamente por fuera de la membrana del protoplasto. La corteza se hidroliza por enzimas liticas durante la germinación en que la pared celular germinal persiste y llega a ser la pared celular de la espora germinada.

Inducción de la Esporogénesis

La expresión fenotípica del genoma de la espora depende de los factores externos. La esporulación normalmente empieza después que se ha detenido el crecimiento exponencial por agotamiento de los nutrientes de rápida utilización en el medio. La inducción de la esporulación puede ocurrir igual en una célula primaria, por ejemplo en una célula formada inmediatamente después del aumento de masa de la espora sin ninguna división celular; a este proceso se le llama microciclo de esporulación. El macrociclo, es cuando las células esporulan después de una serie de divisiones celulares.

En cada especie existen condiciones óptimas para la esporogénesis que involucran factores tales como pH, aereación, temperatura, nutrientes y cationes del medio. En el medio de cultivo la esporulación se inicia por el agotamiento del carbono

y nitrógeno, y algunas veces por el agotamiento de fosfatos. La esporogénesis, ocurre masivamente al término del crecimiento vegetativo ó a baja frecuencia en cultivos en crecimiento exponencial, condición en que es fuertemente influenciada por las fuentes de carbono y nitrógeno aprovechables. Los compuestos nitrogenados metabolizables generalmente reprimen la esporogénesis y en combinación con glucosa los estimula. En general, las fuentes de carbono que son rápidamente metabolizables favorecen el crecimiento vegetativo, mientras aquellas que son más lentamente metabolizables estimulan la formación de la espora.

Cambios Metabólicos y Bioquímicos Asociados con la Esporulación

El desarrollo morfológico de la espora es acompañada por cambios bioquímicos mayores, así el metabolismo de la célula cambia a medida que las fuentes de carbono y de energía del medio se van agotando. El pH durante el crecimiento vegetativo en presencia de glucosa, disminuye drásticamente hasta valores de 5.3 a 5.5 debido a la acumulación de productos metabólicos intermedios, principalmente ácidos orgánicos tales como pirúvico, láctico y acético. Esta disminución del pH coincide con el inicio de la esporulación, en donde se utilizan los ácidos orgánicos con la consecuente elevación del pH. La variación del pH no es necesaria para el inicio de la esporulación, ya que

algunos organismos que crecen en glutamato ó en extracto de levadura no sufren cambios en el pH y esporulan normalmente. La actividad y concentración de algunas enzimas, tales como las involucradas en la glucólisis, lisina descarboxilasa ó isocitrato deshidrogenasa, disminuyen al iniciarse la esporulación y aumentan las enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) como la aconitasa, así mismo se incrementan las proteasas, citocromos, etc. Los citocromos proveen de energía (ATP) que sostiene la esporulación, por lo que los mutantes de algún citocromo dejan de esporular. De acuerdo con los trabajos realizados por Halvorson y Murrell (2*) los cambios enzimáticos que tienen lugar durante la esporulación pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos (fig. 4). Durante el crecimiento logarítmico las células contienen las enzimas necesarias para un desarrollo normal. Al tiempo t_0 se inicia la esporulación; las proteasas, los sistemas antibióticos y de lisis de la pared se inducen (círculos abiertos), en tanto que muchas enzimas vegetativas disminuyen su actividad. Esta disminución puede ser de dos tipos: el primero aparentemente involucra la inactivación de enzimas (triángulos cerrados) como la lisina descarboxilasa, isocitrato deshidrogenasa, treonina deshidratasa y fosfofructocinasa (PFK). El segundo tipo incluye las enzimas que disminuyen su actividad lentamente ó permanecen constantes durante la esporulación (triángulos abiertos).

En los tiempos t_1 a t_4 , se incluye la fase temprana y tardía en donde aparecen otras enzimas en las células esporulantes. En la fase temprana (t_1 a t_2) se tienen algunas enzimas del ciclo de Krebs y otras enzimas que oxidan ácidos;

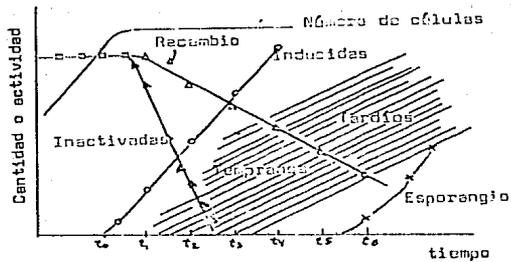


Fig. 7. Cambios en los niveles enzimáticos durante la esporulación.

mientras que en la fase tardía (t_3 a t_4) se encuentran diversas enzimas responsables de la formación de los componentes de la espora, como del ADP. Seis horas después cesa el crecimiento y aparece el esporangio.

Categoría de Relevancia de los Eventos Bioquímicos Durante la Esporulación

1) Eventos que son Esenciales y Específicos de la Esporulación.

Son los eventos bioquímicos responsables de la producción y localización del septo de la espora en el Estado II y el subsecuente englobamiento del protoplasto de la espora (Estado II-III) son supuestamente eventos esenciales y específicos de la esporulación.

La enzima diaminopimelato ligasa, la cual esta involucrada en la formación de la corteza de Bacillus sphaericus y la(s) proteína(s) de la cubierta de la espora son ciertamente específicas de la esporulación, aunque se han aislado mutantes que no producen corteza pero que pueden producir esporas al término de la diferenciación (5*).

2) Eventos que son Específicos de la Esporulación y Distribuidos.

Los eventos de esta categoría no se requieren para la esporulación normal, debido a que los mutantes con estos defectos esporulan normalmente. Algunos ejemplos en esta categoría de eventos son la producción de metaloproteasas al comienzo de la esporulación y del ácido dipicolínico y la alanina deshidrogenasa

a en los últimos estadios. El ácido dipicolínico y la alanina deshidrogenasa pueden requerirse para la germinación de la espora, y así ser distintos de otros eventos en este grupo.

3)Eventos que son Esenciales pero no Específicos de la Esporulación.

Esta categoría incluye todos aquellos eventos que se requieren para la esporulación y que también pueden ocurrir durante el crecimiento vegetativo. Los citocromos y las enzimas del ciclo del TCA, son necesarios para mantener el suministro adecuado de energía durante la esporulación.

4)Eventos Irrelevantes.

La producción de arginasa y amilasa al comienzo de la esporulación es ocasionada por el grado nutricional bajo, condición que se usa para obtener esporulación. Esas enzimas no están completamente relacionadas con el proceso de diferenciación.

Regulación Fisiológica de la Esporulación

La iniciación de la esporulación es reprimida por la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno fácilmente metabolizables. Cuando uno u otro de estos compuestos llegan a ser limitantes en el medio de cultivo, la esporulación puede iniciarse igual que en la presencia de un exceso del otro. Bajo ciertas condiciones la limitación del fosfato puede también inducir la esporulación. La probabilidad de que una célula

vegetativa quede comprometida a esporular depende de las fuentes de carbono y nitrógeno. La probabilidad es baja con fuentes ricas de carbono y nitrógeno; sin embargo, si uno u otro es reemplazado por un compuesto más lentamente metabolizable la probabilidad de que la esporulación se inicie se incrementa y en algunos casos, por ejemplo al crecerlas en medio mínimo de sales con glucosa como fuente de carbono e histidina como fuente de nitrógeno, alcanza la unidad. Estas observaciones sugieren que la esporulación es reprimida por catabolitos que contienen nitrógeno.

Los principales mecanismos involucrados en la regulación de la esporulación, son la represión de la síntesis de enzimas, la inducción y la represión por catabolitos y la inhibición por retroalimentación.

1) Represión. La represión de la síntesis de enzimas es de gran utilidad. Pues evita la síntesis de enzimas que en ese momento no se requieren, y así evita la célula gastos energéticos extras.

2) Inducción y Represión por Catabolitos. En la represión por catabolitos se requiere que haya una acumulación de los mismos a partir de glucosa y, además, una concentración elevada de moléculas de alta energía. El uso de este mecanismo de control coincide con los datos que se tienen del control de la esporulación. De esta forma, cuando se agotan los nutrientes del medio, el control de represión por catabolitos cesa y las enzimas específicas de la esporulación pueden inducirse.

3) Inhibición por Retroalimentación. Se sabe que la poza de algunos metabolitos se incrementa después de que ha terminado

el crecimiento, pero las razones de esto no han sido dilucidadas. El crecimiento se detiene por el agotamiento de fuentes fácilmente metabolizables y esto redundaría en la disminución de la poza. Sin embargo, se sabe que las hidrolasas se incrementan en este momento, por lo que se cree que la poza aumenta como respuesta a un aumento en el recambio de los polímeros celulares. Esto podría tener el siguiente efecto: el incremento en la concentración celular de aminoácidos y nucleótidos reprime la síntesis de enzimas biosintéticas e inhibe, por consiguiente, la síntesis posterior de los productos finales por retroalimentación, que permitirá a la célula mediante las enzimas inducidas necesarias y las no inhibidas en el microorganismo en crecimiento desarrollar la espora. El beneficio principal para la célula esporulante sería un uso eficiente de la energía total de la célula.

Las enzimas alostéricas tienen otras ventajas durante la esporulación. Se afecta la actividad basal de muchas enzimas del metabolismo de carbohidratos por metabolitos que específicamente no corresponden a los productos finales, pero que están en relación con la carga energética de la célula; por ejemplo la PFK, es inhibida por el ATP. Por lo tanto, la regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis dependen de las reacciones productoras de energía.

Transformación de Esporas a Células Vegetativas

Existen tres procesos secuenciales para la transformación de una espora a una célula vegetativa: a) activación; b) germinación y c) aumento de masa.

a) Activación

Capacita a la célula para germinar cuando las condiciones son adecuadas. La activación es un proceso reversible, la cual puede darse por calentamiento subletal, exposición a pH bajos ó a sustancias reductores.

Germinación

Es un proceso irreversible en el cual ocurren varios eventos después de la exposición de las esporas activadas a estimulantes específicos. Esto es acompañado por hinchamiento y la pérdida de propiedades fisiológicas típicas de la espora. Así, se pierden la resistencia a los cambios ambientales bruscos, y la refractividad; se incrementa la permeabilidad, hay liberación de los componentes de la espora (ácido dipicolínico, calcio, péptidos de la espora), no hay síntesis de proteínas ó de ácidos nucleicos y se incrementa la actividad metabólica. Colectivamente el proceso es degradativo por lo que las enzimas involucradas ya se encuentran listas en la espora.

Aumento de Masa

La germinación es seguida por un período de actividad biosintética llamado aumento de masa. Durante esta fase, se sintetizan de novo las proteínas características de las células vegetativas que transforman a la espora en una célula vegetativa.

MATERIALES Y METODOS

Para el presente estudio, se utilizó una cepa de Bacillus cereus que fué aislada y caracterizada por Andreoli y colaboradores (1) y donada por la California State University de Los Angeles, USA. Además de una mutante de la misma bacteria, obtenida en el laboratorio y denominada como PYM, la cual carece de citocromo a_{a_3} . Ambas cepas se mantienen en viales con agar nutritivo a cuatro grados centígrados.

A) Medios de Cultivo y Control de Crecimiento

Tanto el bacilo silvestre como el mutante se crecieron bajo las mismas condiciones. El medio de cultivo empleado fué el medio G modificado, descrito por Hanson et al (16), que tiene la siguiente composición:

- 0.1% extracto de levadura
- 0.1% sacarosa (azúcar refinada)
- 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% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.0005% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Los cultivos se realizaron en un biofermentador New Brunswick modelo Magnaferm 14, que contenía 12 litros de medio ó un biofermentador con capacidad de 25 litros, diseñado y construido por el Centro de instrumentos de la UNAM. Para ambos casos se utilizaron las mismas condiciones de cultivo: 30°C, 250 rpm y un flujo de aire de 8 a 12 litros/minuto. El inicio del cultivo, fué un inóculo de 0.1 partes del volumen contenido en el biofermentador. Para iniciar el inóculo, se sigue la técnica de Collier (4), que se efectuó de la siguiente forma: se tomó con una asa bacteriológica de uno de los viales que contenían a la cepa del bacilo (silvestre ó mutante) una muestra y se inoculó en 50 ml de medio G contenidos en un matríz de 250 ml, se dejó en agitación a 250 rpm y 30°C hasta que se observó crecimiento (medio opalescente), de este matríz se tomo 1 ml de cultivo y se transfirió a otro matríz que contenía la misma cantidad de medio G, se procedió de la misma forma en 4 ocasiones más a intervalos de 3 horas aproximadamente; esta técnica se siguió con el fin de homogenizar y sincronizar el crecimiento del bacilo.

Se tomaron 5 ml de la última transferencia y se pasaron a un matríz de 2 litros que contenía 300 ml de medio G, que después de la aparición del crecimiento se inoculó en el biofermentador (12 litros de capacidad) acompañado de 120 ml de sulfato de manganeso, 12 gramos de sacarosa y 12 gramos de extracto de levadura, cada uno disuelto por separado en 250 ml de agua destilada, todo esto se efectuó en condiciones estériles. Esto

mismo se hizo para el biofermentador de 25 litros pero con las cantidades correspondientes.

Bajo estas condiciones de cultivo, después de 3:30 a 4:00 horas de establecido el cultivo se alcanza la etapa estacionaria. La esporulación inicia al finalizar el crecimiento logarítmico y se considera que ocurre 30 minutos después de que se presenta el pH mínimo en el cultivo pues durante el crecimiento se acidifica el medio.

El crecimiento en el biofermentador fué seguido por la medición de la turbidez del cultivo por medio de un espectrofotómetro (Beckman modelo 35) a 540 nm, el pH fué medido en un potenciómetro y los cultivos fueron observados periódicamente en un microscopio de contraste de fases para evaluar la sincronía e identificar las etapas de esporulación.

En este estudio se utilizó el estadio III de esporulación en la cepa silvestre. En la cepa PYM se utilizó la etapa logarítmica y 12 horas de crecimiento. Las células fueron colectadas por centrifugación a 5,100 x g por medio de una centrifuga Sharples, modelo T1 de flujo continuo, posteriormente se resuspendieron y se lavaron tres veces en amortiguador TCM compuesto por Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 que contiene MgCl₂ 5 mM y CaCl₂ 5 mM a 10 000 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall RC 2B.

Ruptura y Fraccionamiento Celular

Se resuspendieron entre 60 y 80 gramos de células (peso húmedo) en 200 ml de amortiguador TCM y se rompieron en el

fraccionador celular (Ribi Cell, modelo RF-1 Ivan Sorvall Inc.) a una presión de 30,000 libras/pulg.² a 4°C. El homogenado obtenido se incubó a temperatura ambiente y agitación suave durante 15 minutos en presencia de unos pocos cristales de ADNasa (Sigma DN 100) con objeto de romper la viscosidad producida por el ADN liberado. Se procedió a centrifugar el homogenado a 10,000 x g por 10 minutos con el fin de eliminar las células enteras, el sobrenadante se centrifugó durante 45 minutos a 140,000 x g en una centrifuga (Beckman, L5-50B) con el objeto de sedimentar las membranas, las cuales fueron lavadas con amortiguador TCM bajo las mismas condiciones. Finalmente, las membranas fueron resuspendidas en 6 a 10 ml de amortiguador TCM al 50% con glicerol, se utilizaron inmediatamente ó se guardaron en nitrógeno líquido. La concentración de proteína en las membranas se determinó mediante el método de Lowry (20).

Enzayos Enzimáticos

1) Oxidasas: Las actividades basales fueron medidas por el método polarográfico utilizando un oxímetro Yellow Springs modelo 53. El medio de reacción con volumen final de 2 ó 3 ml contenía fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 para los ensayos de NADH y succinato oxidasa y con pH de 6.8 para los ensayos de TMPD (N,N,N',N'-Tetrametil-para-feniléndiamina) oxidasa y membranas equivalentes a 0.5 a 3.5 mg de proteína. Considerando la altitud de la Ciudad de México, la mezcla de reacción disponía de 400 ngr átomos de oxígeno por ml de medio. Las actividades basales se midieron a 30°C, dichas actividades se expresaron como nano gramo

atomo de oxígeno por minuto por miligramo de proteína ($\text{ngat O}_2(\text{min} \times \text{mg prot})^{-1}$). Estos valores fueron corregidos únicamente en los casos en que se presentó autooxidación de los reactivos detectada por la presencia de color. Sólo la mezcla de reacción para succinato fué preincubada 5 minutos antes de medir dicha actividad.

Los inhibidores utilizados para medir NADH y TMPD oxidasa fueron cianuro de potasio y monóxido de carbono, los cuales se utilizaron juntos ó por separado, variando el tiempo de exposición ó su concentración.

2) Cinética para Oxígeno: El efecto causado por la concentración de oxígeno sobre la velocidad de reacción de la NADH-oxidasa fué medida por dos técnicas distintas; a) se parte de la mezcla de reacción saturada de aire y b) se parte del estado anóxico. La técnica (a) consiste en calibrar el oxímetro con la mezcla de reacción saturada con aire e iniciar la reacción con el sustrato (NADH 50 mM) se deja que mediante la reacción se llegue a la anaerobiosis. La sensibilidad del registrador (Honeywell Electronic 195) y su velocidad de registro se aumentó a intervalos durante el curso de la reacción, hasta alcanzar una amplificación de 100x con una velocidad de 1.0 pul/10 segundos. Se calculó la velocidad de consumo de O_2 a partir de la pendiente (tangente) trazada para cada paso de amplificación y la concentración de O_2 se calculó en esos puntos de acuerdo a la amplificación usada. En la segunda técnica usada (b), se llevó la mezcla de reacción hasta la anaerobiosis por medio de burbujéo de

N_2 de alta pureza y el poco oxígeno no desplazado se autoconsumió al adicionar NADH. Cuando el registrador a la máxima sensibilidad marca un trazo estable, la mezcla esta totalmente anaeróbica, entonces se inicia la reacción añadiendo cantidades determinadas de agua saturada de aire por agitación prolongada, considerando que la concentración de O_2 en el agua saturada de aire es $200 \mu M$. La cantidad de agua añadida no fué mayor del 10% del volumen total para evitar una dilución alta de la mezcla. Las correcciones para los cambios pequeños de volumen se hicieron para evitar errores. Se empleó el método gráfico de Hofstee para la obtención de los valores de la K_m reportados.

3) Oxidorreductasas

a) Succinato: PMS+DCPIP-oxidoreductasa.

El ensayo se hizo a $30^\circ C$, de acuerdo con la técnica descrita por Arrigoni y Singer (2) en un volumen de 3ml que contenía succinato disódico 20 mM, fosfato de potasio 50 mM a pH 7.4, membranas equivalentes a 0.1 a 1.0 mg de proteína, metasulfato de fenazina (PMS) 1.1 mM, diclorofenolindofenol (DCPIP) 0.08 mM, que se llevó al volumen final de 3 ml con agua destilada. Se incubó la mezcla de ensayo durante 3 minutos antes de la adición de los colorantes. La reducción del DCPIP se siguió en un espectrofotómetro PYE Unicam SP 1 800, a 600 nm. La actividad se registró por 2 minutos y se adicionó CN^- 0.1 mM. Para determinar la actividad dependiente de CN^- se cuantificó el cambio producido en la pendiente después de la adición del inhibidor. El coeficiente de extinción molecular utilizado para

el DCPIP fué de $21 \text{ (mM} \times \text{cm)}^{-1}$ y la actividad se expresa como nanomoles de DCPIP reducido por minuto por miligramo de proteína ($\text{nmol}(\text{min} \times \text{mg prot})^{-1}$).

b) NADH:DCPIP-oxidorreductasa

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Lang et al. (18) en 1 ml de mezcla de reacción que contenía fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, CN^- 0.1 mM, NADH 0.2 mM, DCPIP 0.08 mM y membranas equivalentes a 0.1 a 1.0 mg de proteína. La reacción se inició con la adición de DCPIP y su reducción fué seguida a 600 nm usando el mismo coeficiente de extinción molecular y las mismas unidades para expresar la actividad como el caso antes mencionado.

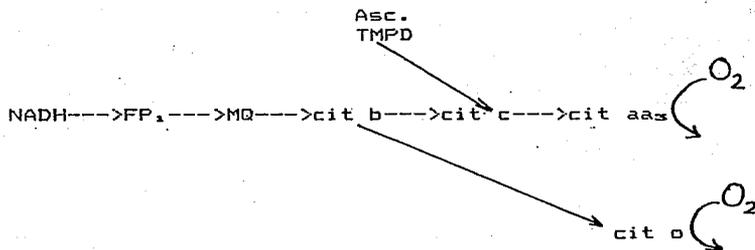
D) Analisis Espectrales de los Citocromos

Los espectros de absorción de los pigmentos respiratorios asociados con las membranas celulares fueron determinados con un espectrofotómetro Aminco DW 2a. Se utilizaron celdas de vidrio de 1.0 cm de paso de luz para determinación a temperatura ambiente, mientras que los espectros de baja temperatura (nitrógeno líquido = 77°K) fueron hechos en celdas de 2mm de paso de luz. En ambos casos las membranas contenían glicerol al 50% (v/v). Los espectros reducidos menos oxidados se registraron utilizando como reductor unos cristales de hidrosulfito de sodio (ditonita); las membranas se oxidaron con algunos cristales de persulfato de amonio. Únicamente a temperatura de nitrógeno

líquido las muestras son congeladas inmediatamente después de adicionar el reductor y oxidante (muestras "Steady State"). Para estimar la concentración de citocromos (cit) se utilizaron los espectros diferenciales ditionita reducido menos persulfato oxidado y ditionita- CO menos ditionita obtenidos a temperatura ambiente. Los pares de longitudes de onda y coeficientes de extinción molecular en cada caso fueron: cit a_{23} , $E(603-630 \text{ nm})=24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cit b, $E(563-575 \text{ nm})=22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cit c, $E(550-540 \text{ nm})=19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cit a_2 , $E(630-615 \text{ nm})=8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cit $a_3\text{-CO}$, $E(590-605 \text{ nm})=10.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; cit o- CO , $E(415-430 \text{ nm})=160 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (12, 18, 25, 30).

E) Método de selección para Mutantes de Citocromo a_{23}

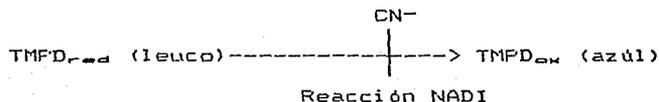
Para aislar el mutante en citocromo a_{23} , tuvimos primeramente que considerar en parte un sistema respiratorio como el que se ilustra a continuación:



en donde observamos que el TMPD reducido cede electrones cuasiespecíficamente a nivel de cit c y vira de color leuco a azul, por lo que en ausencia de este viraje se detectarían las

colonias del bacilo deficientes en cit c y/o aas.

Al viraje de color leuco a azul se le conoce como reacción NADI, la cual se muestra a continuación:



El bacilo fué sembrado en cajas de petri con agar base más medio G (glucosa al 0.005%) e incubado por 36 horas para permitir que esporulen y se desreprima el sistema respiratorio. A las colonias formadas en las cajas de petri se les practicó la reacción NADI, para poder detectar al mutante.

Las colonias NADI⁻ fueron aisladas en condiciones de esterilidad y analizadas espectrofotométricamente, con lo que se detectó que el bacilo carecía de cit aas.

F) Nutrientes y Reactivos. Para los medios nutritivos se utilizaron los productos de la marca BIOXON. La desoxirribonucleasa I, el PMS, el NADH, el TMPD y Tris base se obtuvieron de Sigma Chemical. Para los demás casos se utilizó de forma indistinta la marca Merck ó Backer de grado rectivo.

G) El mutante se sembró en tres distintos medios: Medio G modificado (antes mencionado), casaaminoácidos (hidrolizado de caseína) (26) y caldo nutritivo (8 gr/lit de agua).

RESULTADOS

Mediante las condiciones de cultivo aquí empleadas, se alcanzó una sincronía de un 90%, por lo que las etapas con las que se trabajó son muy confiables. En la figura 5, se presenta una gráfica de crecimiento de B. cereus silvestre (o) y mutante carente de citocromo oxidasa aa_3 denominado PYM (x) en medio G modificado, en la que se aprecia que tanto la cepa silvestre como la PYM crecen a la misma velocidad, pero sólo la silvestre sigue creciendo hasta llegar aproximadamente al doble de la población de PYM. El pH del medio para ambos bacilos se acidifica, pero sólo el pH del bacilo silvestre se recupera, en cambio el medio del bacilo PYM llega hasta valores menores de 5.5 los cuales permanecen constantes. La esporulación se inicia media hora después del pH mínimo, comienza con el estadio t_0 y los siguientes estadios de esporulación t_1 , t_2 , t_3 , etc. se, obtienen a los 60, 120, 180, etc., minutos después de que se detectó t_0 y pueden seguirse mediante la observación al microscopio de contraste de fases; estos estadios sólo se obtienen en la cepa silvestre.

Primeramente se analizarán los resultados de la cepa silvestre, y en los casos necesarios se mencionará a la cepa PYM ó a las dos cepas.

Cinética de Afinidad por el Oxígeno

En la introducción se dijo que las oxidasas terminales pueden distinguirse por su mayor ó menor sensibilidad a los

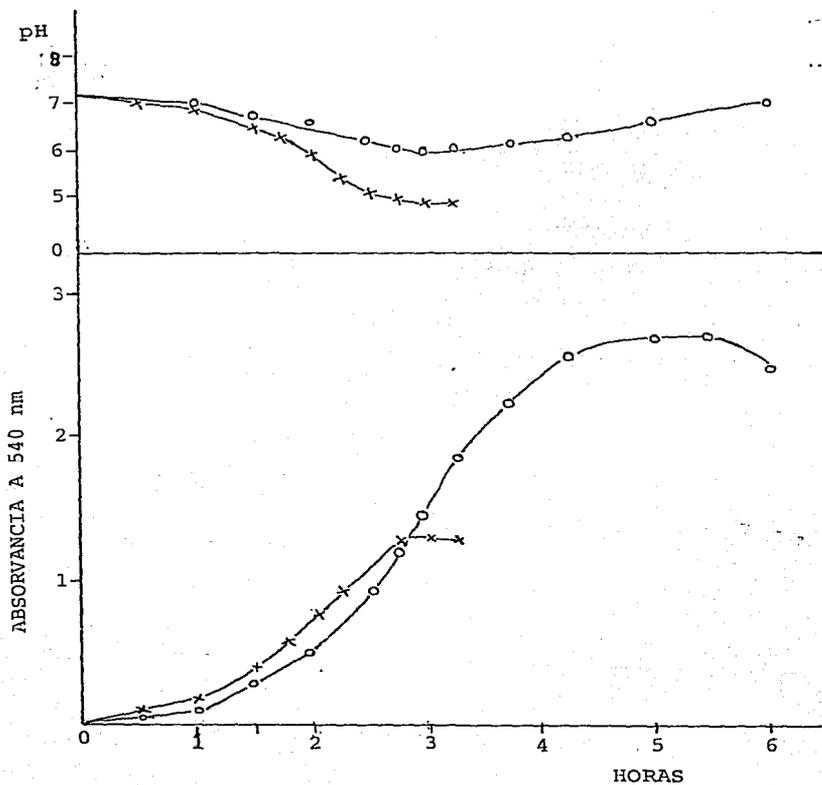


Fig. 5. pH del medio (arriba) y curva de crecimiento (abajo) de las cepas de *B. cereus silvestre* (○) y PYM (×) en medio G modificado.

inhibidores, así en la figura 6, se observa que también se les puede distinguir por su diferente afinidad por el oxígeno. Se han determinado en varias especies la K_m de las citocromos oxidasas, encontrándose valores que van de $10^{-6}M$ a $10^{-9}M$ (22, 23 y 28) y se ha visto que los valores de afinidad se pueden correlacionar con la composición de citocromos oxidasas en cada especie. Por ejemplo en el caso de E. coli (24) que contiene citocromos c_1 y a_2 , se pueden distinguir dos pendientes en la cinética para O_2 , en donde la primera de baja afinidad corresponde a citocromo c_1 y la segunda de alta afinidad a citocromo a_2 con K_m 2×10^{-7} y 2.4×10^{-9} respectivamente.

En nuestro caso, para medir las constantes de afinidad para el oxígeno se requiere de ciertas condiciones para alcanzar la sensibilidad en el oxímetro, como un registrador de intervalo amplio y una membrana de respuesta rápida.

Logramos detectar en forma reproducible concentraciones tan bajas de O_2 como $0.2 \mu M$, utilizando un oxímetro con un registrador de amplia capacidad de intervalo (Honeywell modelo Electronic 195) y membranas Yellow Spring de alta sensibilidad.

Para la velocidad de respiración estimulada por NADH contra la concentración de O_2 disuelto en membranas de la fase esporulante se presenta la figura 6. Técnicamente fué posible detectar concentraciones de O_2 de 0.2 a $200 \mu M$ que produjeron en la cinética dos pendientes; la de mayor afinidad con K_m de $2.8 \mu M$ y la de menor afinidad con k_m de $7.7 \mu M$ para O_2 . Esto confirma los antecedentes del laboratorio en donde se detectó la cinética dos pendientes, la de mayor afinidad con K_m de $0.9 \mu M$ y la de menor afinidad con K_m de $8.0 \mu M$ para O_2 . Existe una diferencia

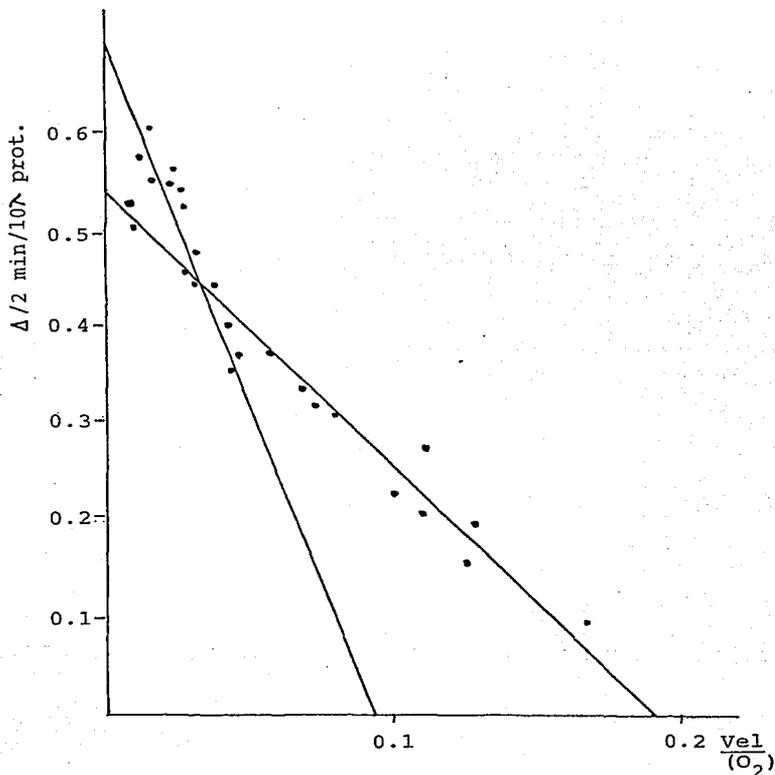


Fig. 6. Representación mediante el método de Hofstee de la velocidad de respiración en membranas de las células del Estadio III de esporulación versus la concentración de oxígeno utilizando NADH como sustrato. Las membranas (0.21 mg de proteína) se pusieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos a 30°C. La concentración de oxígeno se dió mediante las dos técnicas descritas en materiales y métodos. Las células se crecieron en medio G.

notable en la Km de mayor afinidad de 0.9 a 2.8 μM lo cual puede atribuirse a fallas técnicas, si se considera que se trabaja en los límites de la máxima sensibilidad del aparato. En todo caso lo importante es que se puede distinguir el funcionamiento de cuando menos dos oxidasas terminales por su diferente afinidad por el O_2 .

Inhibición por CN^-

De acuerdo a los resultados anteriores, sabemos que los citocromos oxidasas tienen diferente afinidad por O_2 , y que las actividades respiratorias estimuladas por NADH ó por la mezcla de ascorbato + TMPD pueden ser suprimidas, aunque no completamente, por diferentes inhibidores (8) como son Antimicina A; 6, 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido (HOQNO); Dicumarol y CN^- . Por lo que al analizar la cinética de inhibición para CN^- , el cual es un inhibidor clásico de la citocromo c oxidasa se obtuvo un efecto inhibitorio pobre sobre NADH-oxidasa, ya que alrededor del 60% de la actividad fué resistente a altas concentraciones de CN^- hasta 1.0 mM. La curva dosis respuesta para NADH-oxidasa fué claramente bifásica lo cual sugiere la participación de cuando menos dos vías alternas de transporte de electrones que tienen una notoria diferencia de sensibilidad al CN^- . En tanto que la respiración estimulada por la mezcla de ascorbato + TMPD fué muy sensible a la inhibición, con un valor de $K_i = 0.96 \mu\text{M}$ para CN^- (fig.7) con lo que cabe considerar que los electrones del TMPD son donados cuasiespecíficamente sobre el citocromo c, con ésto

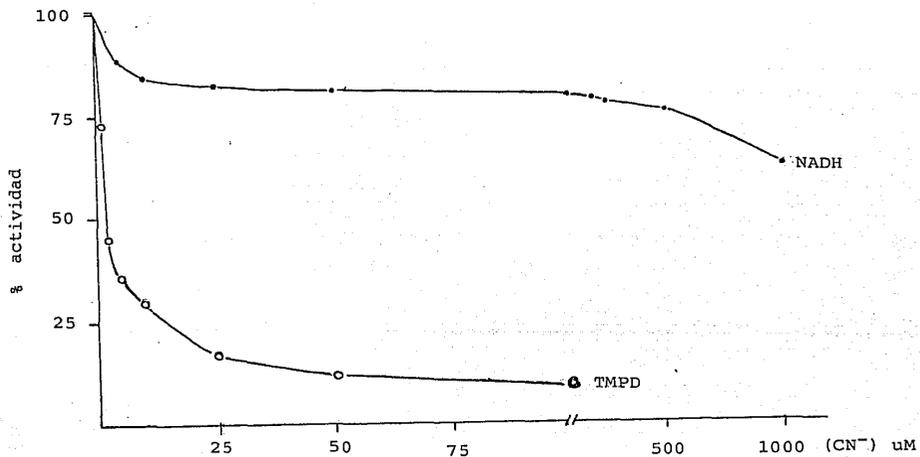


Fig. 7. Efecto del inhibidor respiratorio cianuro de potasio (KCN) sobre las actividades de NADH y ascorbato + TMPD-oxidasa de membranas del Estado III de esporulación. Las membranas (0.2 mg de protefina) se pusieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos a 30°C, conteniendo las concentraciones indicadas del inhibidor. La reacción se inició con NADH 50 mM ó ascorbato 0.3M + TMPD 2.0 mM. Las células se crecieron en medio G.

se puede concluir que la vía sensible al CN^- es citocromo c \rightarrow citocromo aa_3 , y que la oxidasa o será más resistente al CN^- en la respiración estimulada por NADH.

Inhibición por CO

La actividad respiratoria estimulada por NADH ó por la mezcla de ascorbato + TMPD puede ser inhibida por las concentraciones crecientes de CO. De acuerdo a la figura 8, el efecto sobre la NADH-oxidasa causada por el inhibidor respiratorio CO, a bajas concentraciones de este inhibidor la actividad respiratoria decae rápidamente aunque el efecto no es tan pronunciado como el que acusa la ascorbato + TMPD-oxidasa. Sin embargo la máxima inhibición obtenida para NADH-oxidasa (48% de inhibición con 93% de CO) y ascorbato + TMPD-oxidasa (49% de inhibición con 80% de CO) es prácticamente la misma.

Los resultados de la figura 8, muestran que la curva dosis-respuesta para NADH y/o para TMPD-oxidasa fué claramente bifásica, sugiriendo que existen cuando menos dos vías de transporte de electrones, una de ellas sensible al CO. Los resultados de la curva dosis-respuesta para ascorbato + TMPD-oxidasa son muy sorprendentes, puesto que, al reducirse únicamente citocromo c \rightarrow citocromo aa_3 se esperaba mayor inhibición cercana al 100%, por el momento no tenemos ninguna explicación para este hecho.

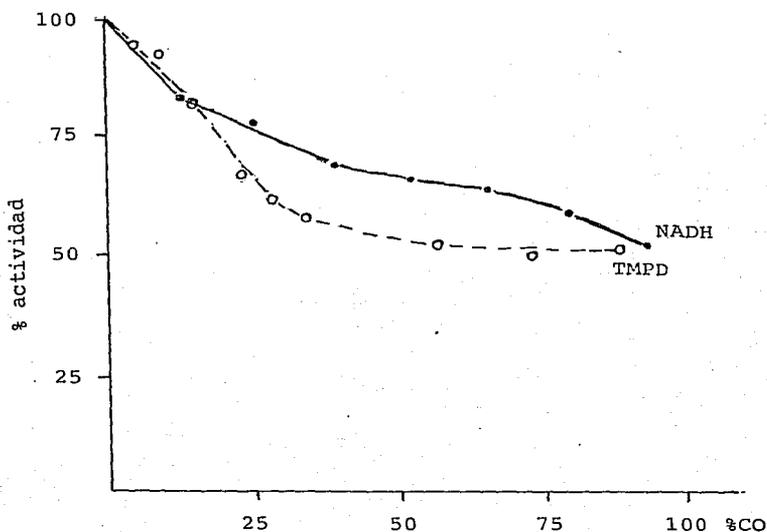


Fig. 8. Efecto del inhibidor respiratorio monóxido de carbono (CO) sobre NADH y ascorbato + TMPD-oxidasa de membranas del Estado III de esporulación. Las membranas (0.8 y 0.9 mg de proteína respectivamente) se pusieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos a 30°C, conteniendo las concentraciones indicadas del inhibidor respiratorio. La reacción se inició con NADH 50 mM ó ascorbato 0.3M + TMPD 2.0---mM. Las células se crecieron en medio G.

Broberg y Smith (3) sugirieron que la reacción entre el citocromo c y el CO ocurre lentamente, de acuerdo con este resultado decidimos explorar si al aumentar el tiempo de incubación de las membranas con CO, aumentaría la inhibición. Como se puede observar en la figura 9 esto no ocurrió y la inhibición después de 20 minutos en presencia de CO no aumentó significativamente en relación a los valores iniciales.

Efecto Combinado de Cianuro y Monóxido de Carbono Sobre la Respiración Estimulada por NADH ó por Ascorbato + TMPD

Monóxido de Carbono Sobre Cianuro.

En los siguientes experimentos decidimos probar si la inhibición producida por CO era aditiva a la inhibición producida por CN^- . Se diseñaron 2 tipos de experimentos, en un caso se mantuvo fija la concentración de CN^- (2.5 y 10 μM para ascorbato + TMPD y NADH-oxidasa respectivamente) y se incrementó la concentración de CO; en el segundo grupo de experimentos el tratamiento se hizo a la inversa, se mantuvo fija la concentración de CO (80% para ascorbato + TMPD y NADH-oxidasa) y se incrementó la concentración de CN^- .

El primer grupo de experimentos se muestra en la figura 10, en donde se observa que la actividad respiratoria estimulada por NADH, con la concentración fija de CN^- decae un 10%, pero esta actividad respiratoria remanente irá decayendo conforme se incremente la concentración de CO (0 \rightarrow 80%). En la misma figura se observa, que la actividad respiratoria estimulada por

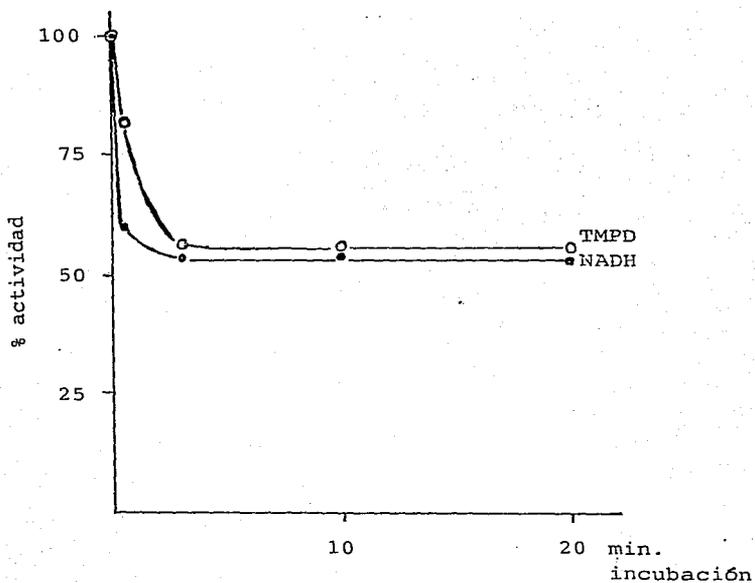


Fig. 9. Efecto del inhibidor respiratorio monóxido de carbono (CO) sobre NADH y ascorbato + TMPD-oxidasa de membranas del Estadio III de esporulación. Las membranas (0.18 mg de proteína en ambos casos) fueron reducidas con NADH 50 mM ó con ascorbato 0.6 M + TMPD 2.0 mM justo antes de burbujear directamente con CO durante los tiempos indicados en la gráfica, inmediatamente después se pusieron en amortiguador de fosfatos (completando 3 ml) a 30°C para registrar dicha actividad. La reacción se inició con NADH 50 mM ó con ascorbato 0.3 M + TMPD 2.0 mM. Las células se crecieron en medio G.

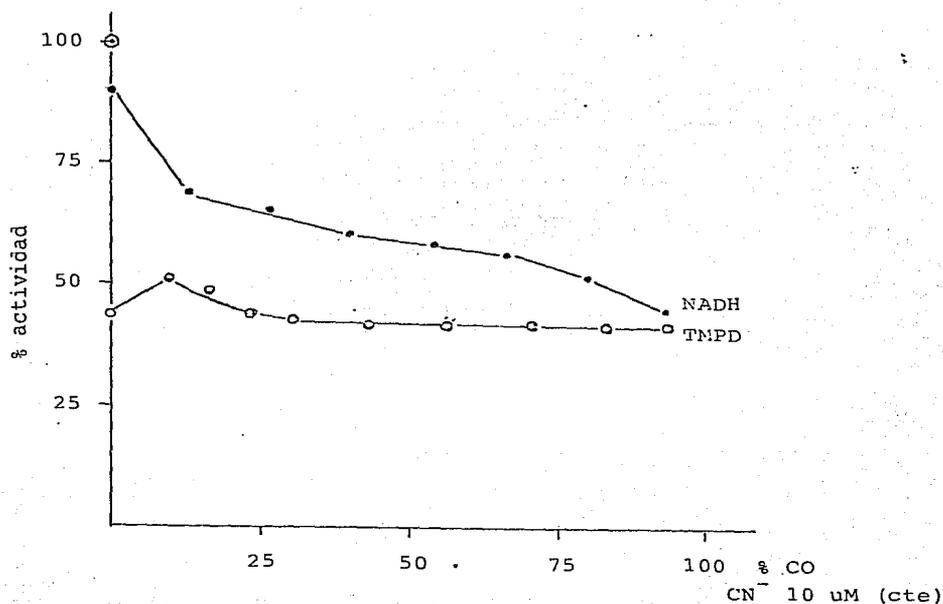


Fig. 10. Efecto de los inhibidores respiratorios cianuro de potasio (KCN) más monóxido de carbono (CO) sobre las actividades de NADH y ascorbato + TMPD-oxidasa. Las membranas (0.4 y 0.12 mg de proteína respectivamente) se pusieron en amortiguador de fosfatos a 30°C con las concentraciones de CO mencionadas más una concentración fija de KCN (10 μ M para NADH-oxidasa y 2.5 μ M para ascorbato + TMPD-oxidasa). La reacción se inició con NADH 50 mM ó ascorbato 0.3 M + TMPD 2.0 mM. Las células se crecieron en medio G.

ascorbato + TMPD decae a 40% cuando se mide en presencia de la concentración fija de CN^- ; esta actividad no decayó más con las concentraciones crecientes de CO (0 ---> 80%).

Con los resultados aquí obtenidos, podemos concluir que la inhibición de la actividad respiratoria por las concentraciones de CO sobre la inhibición inicial por el CN^- es aditiva, únicamente en la respiración estimulada por NADH.

Cianuro Sobre Monóxido de Carbono.

El segundo grupo de experimentos se muestra en la figura 11, en donde la actividad respiratoria estimulada por NADH ó por ascorbato + TMPD en presencia de la concentración fija de CO decae a 55 y 60% respectivamente. La inhibición de la actividad respiratoria en ambos casos aumenta por las concentraciones crecientes de CN^- , acentuándose más en ascorbato + TMPD-oxidasa, en donde con $100 \mu\text{M}$ de CN^- sólo queda el 10% de la actividad respiratoria. La actividad respiratoria residual estimulada por NADH decae de 55 a 30% por las concentraciones de CN^- de 0 ---> $100 \mu\text{M}$. Esta actividad residual permanece prácticamente constante a pesar de incrementar grandemente la concentración de CN^- ($2000 \mu\text{M}$).

La obtención de estos resultados nos permiten concluir que la inhibición de la actividad respiratoria por las concentraciones de CN^- sobre la inhibición inicial por el CO es aditiva tanto para NADH como para ascorbato + TMPD-oxidasa.

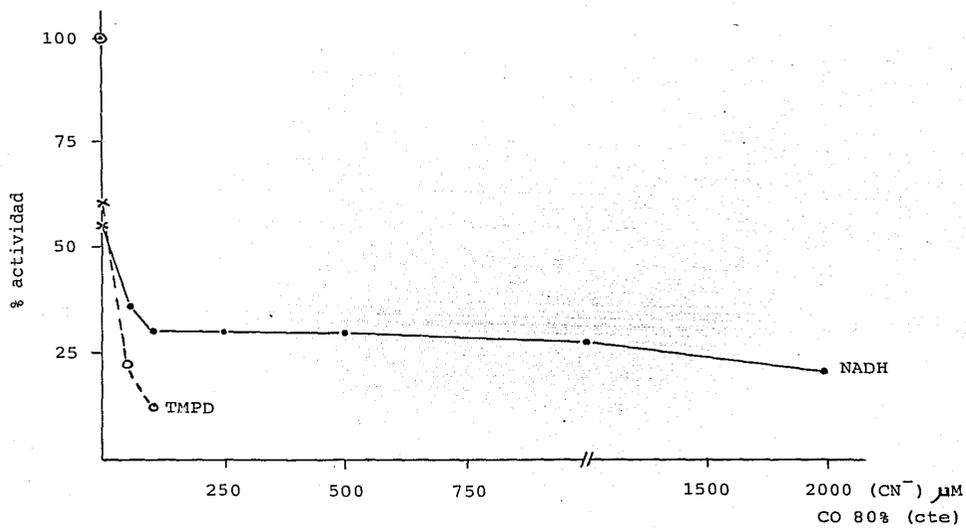


Fig. 11

Con los datos de las figuras 10 y 11 podemos sugerir que los citocromos oxidasas terminales (citocromos aa_3 y c) en B. cereus son susceptibles de ser inhibidos por el CN^- y que sólo el citocromo aa_3 es sensible al CO .

Mutante del Citocromo aa_3

Mediante el análisis de las actividades respiratorias estimuladas por $NADH$ ó por la mezcla de ascorbato + $TMPD$ e inhibidas por cianuro y/ó por monóxido de carbono se sugirió que el sistema respiratorio de B. cereus posee cuando menos dos vías alternas de transporte de electrones.

El mejor camino para demostrar la presencia de dos vías alternas es aislar mutantes que carezcan de una de ellas permitiendo el estudio de una vía sin la interferencia de la otra (ver materiales y métodos).

Como se indicó en materiales y métodos, el aislamiento del mutante fué muy selectivo, utilizando como indicador al $TMPD$ reducido, el cual cede electrones cuasiespecíficamente sobre citocromo c . El $TMPD$ al ser oxidado vira de color leuco a azul por lo que se permite la identificación de aquellas colonias deficientes en citocromo c y/ó aa_3 (reacción NADI, ver materiales y métodos).

B. cereus esta clasificado como NADI negativo (17), sin embargo esta clasificación puede deberse a que se ha basado en colonias vegetativas en donde sabemos que el sistema respiratorio esta apenas expresado es decir se tienen actividades

respiratorias bajas. Cuando las colonias se dejan envejecer, el sistema respiratorio se desreprime resultando NADI positivo y por lo tanto actividades respiratorias altas.

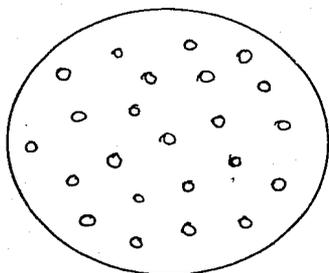
El crecimiento de la bacteria en agar nutritivo al dejar envejecer las colonias para permitir la desrepresión del sistema respiratorio, se vuelve confluyente, impidiendo la detección de colonias aisladas (fig. 12). Para evitar este problema, utilizamos un medio igualmente sólido como el anterior pero pobre en nutrientes, que permitiera crecimiento limitado y evitara confluencias (fig. 12).

Finalmente el mutante espontáneo fué aislado como se describió en materiales y métodos.

Caracterización Espectral del Mutante

Una vez obtenido el mutante PYM, se procedió primero a caracterizar su contenido citocrómico. En la figura 13, se muestran los espectros diferenciales (reducido menos oxidado) de baja temperatura que se obtuvieron con membranas del bacilo mutante PYM crecido durante 12 horas en medio G modificado. Después de reducir con ditionita el contenido citocrómico del mutante PYM fué diferente al de la cepa silvestre (figuras 14 y 15, trazos superior y central) en que no contienen al citocromo a_{83} cuyos picos característicos deberían de aparecer a 443 y 602 nm. En los mismos trazos los demás citocromos de la cepa silvestre también se encuentran en PYM, cuyo picos típicos para citocromos pueden observarse mejor en la figura 13, siendo los

Agar Nutriente:

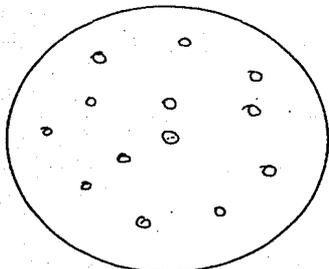


12 hs (veg.)
NADI-negativo
Colonias pequeñas

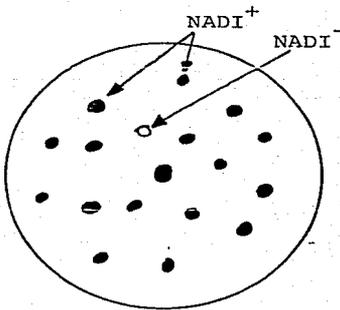


36 hs (SPO)
NADI-positivo
Crecimiento confluyente

Agar base + medio G (glucosa 0.005%)



12 hs (veg.)
NADI-negativo



36 hs (SPO)

Fig.12

respiratorias bajas. Cuando las colonias se dejan envejecer, el sistema respiratorio se desreprime resultando NADI positivo y por lo tanto actividades respiratorias altas.

El crecimiento de la bacteria en agar nutritivo al dejar envejecer las colonias para permitir la desrepresión del sistema respiratorio, se vuelve confluyente, impidiendo la detección de colonias aisladas (fig. 12). Para evitar este problema, utilizamos un medio igualmente sólido como el anterior pero pobre en nutrientes, que permitiera crecimiento limitado y evitara confluencias (fig. 12).

Finalmente el mutante espontáneo fué aislado como se describió en materiales y métodos.

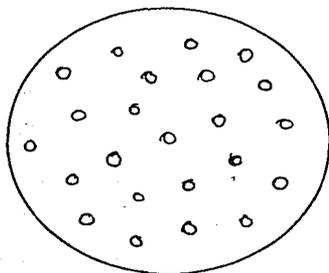
Caracterización Espectral del Mutante

Una vez obtenido el mutante PYM, se procedió primero a caracterizar su contenido citocrómico. En la figura 13, se muestran los espectros diferenciales (reducido menos oxidado) de baja temperatura que se obtuvieron con membranas del bacilo mutante PYM crecido durante 12 horas en medio G modificado. Después de reducir con ditionita el contenido citocrómico del mutante PYM fué diferente al de la cepa silvestre (figuras 14 y 15, trazos superior y central) en que no contienen al citocromo a_{23} cuyos picos característicos deberían de aparecer a 443 y 602 nm. En los mismos trazos los demás citocromos de la cepa silvestre también se encuentran en PYM, cuyo picos típicos para citocromos pueden observarse mejor en la figura 13, siendo los

Fig. 12. En la parte superior de la figura, las células fueron crecidas en agar nutritivo e incubadas durante 12 horas, obteniéndose colonias pequeñas y aisladas. Se les practicó la reacción NADI (ver materiales y métodos) detectándose como colonias NADI⁻, lo cual dilucidaba su estado vegetativo. Se permitió la incubación de estas colonias durante 36 hs para permitir la esporulación y por consiguiente la desrepresión del sistema respiratorio. Se practicó la reacción NADI a estas colonias resultando ser NADI⁺ pero con crecimiento confluyente imposibilitando por consiguiente la detección de colonias aisladas que pudieran contener al mutante (NADI⁻).

En la parte inferior de la misma figura, se utilizó un medio nutritivo más pobre (agar base + medio G, glucosa al 0.005%) con el fin de obtener un crecimiento limitado al permitir la incubación por 36 hs. Se practicó la reacción NADI a estas colonias y las que resultaron ser NADI⁻ fueron aisladas esterilmente y almacenadas en viales con agar nutritivo a 4°C.

Agar Nutriente:

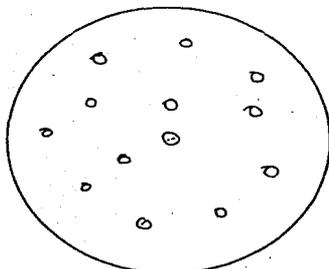


12 hs (veg.)
NADI-negativo
Colonias pequeñas

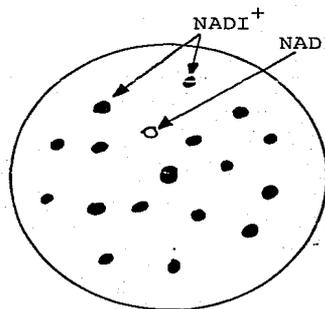


36 hs (SPO)
NADI-positivo
Crecimiento confluyente

Agar base + medio G (glucosa 0.005%)



12 hs (veg.)
NADI-negativo



36 hs (SPO)

Fig.12

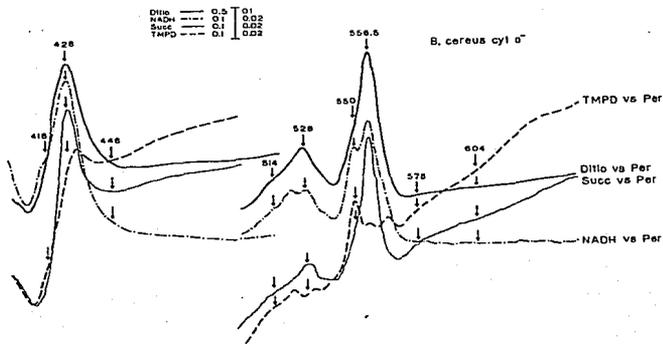


Fig. 13. Espectros diferenciales (reducido menos oxidado) de baja temperatura de membranas de la fase estacionaria tardía (12 hs de cultivo) de *B. cereus* cit a- (PYM). Los agentes reductores indicados en los trazos fueron mezclados con las membranas (4 mg de proteína) y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido. La celda de referencia fué preparada con la misma cantidad de membranas previamente oxidadas con algunos cristales de persulfato de amonio. Las concentraciones de los reductores añadidos se encuentran señaladas en materiales y métodos.

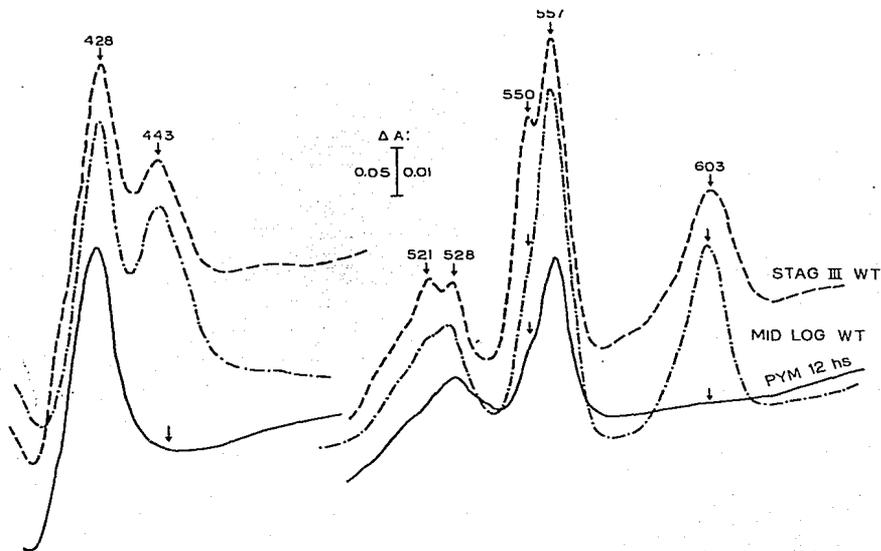


Fig. 14. Espectros diferenciales (reducido menos oxidado) de baja temperatura de membranas de *B. cereus* de la cepa silvestre de la fase esporulante (trazo discontinuo) y vegetativa (trazo discontinuo y punteado), y de la cepa PYM de la fase estacionaria tardía (trazo continuo). Las membranas (5, 12 y 4 mg respectivamente) fueron reducidas con unos granos de ditionita y sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido. La celda de referencia fué preparada con la misma cantidad de membranas previamente oxidadas con algunos cristales de persulfato de amonio.

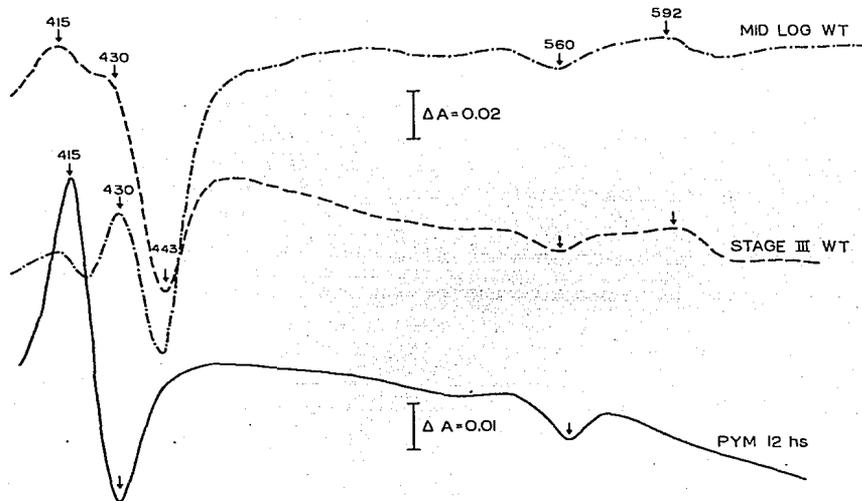


Fig. 15. Espectros diferenciales de monóxido de carbono (ditionita reducido + CO menos ditionita reducido) de membranas de *B. cereus* de la cepa silvestre de la fase esporulante (trazo discontinuo) y vegetativa (trazo discontinuo y punteado), y de la cepa PYM de la fase estacionaria tardía (trazo continuo). Las membranas (5 mg de proteína en los dos primeros casos y 10 mg de proteína en el último caso, contenidos en 1 ml de amortiguador con glicerol al 50%) tanto en la referencia como en la muestra fueron reducidas con algunos granos de ditionita. La celda de referencia fué previamente aerada, mientras que la celda de muestra fué expuesta al CO directamente por burbujeo, durante 5 minutos después de la reducción. Los espectros y preparaciones fueron hechos a temperatura ambiente.

siguientes: b_{555} (426, 527 y 555 nm), c_{548} (417, 519 y 549 nm), también se aprecia asimetría (alrededor de 562 nm) en el gran pico de b_{555} . La zona de asimetría del trazo de ditionita, ó los trazos correspondientes para NADH ó succinato a 562 nm aparece como pico prominente cuando se utiliza como reductor al ascorbato + TMPD, este pico corresponde a un citocromo del tipo b llamado citocromo b (25).

La ausencia del citocromo a_{33} (oxidasa terminal) ocasiona una diferencia en sus actividades respiratorias, pudiendo apreciarse más claramente la actividad de la vía alterna (como se verá posteriormente).

La concentración de cada citocromo presente en las membranas de FYM crecido 12, horas fué estimada a partir de los espectros diferenciales (reducido menos oxidado y reducido + CO menos reducido) efectuados a temperatura ambiente utilizando ditionita (hidrosulfito de sodio) como agente reductor y persulfato de amonio como agente oxidante. En las figuras 14 y 15, se muestran los trazos correspondientes de reducido menos oxidado y reducido + CO menos reducido respectivamente de la cepa FYM comparados con los correspondientes de la cepa silvestre. En la figura 16, se muestran los espectros diferenciales de reducido menos oxidado y reducido + CO menos reducido a temperatura ambiente para la cepa FYM. En los espectros correspondientes a FYM de las figuras 14 y 16 (reducido menos oxidado) se nota la ausencia del citocromo a_{33} (máximas a 443 y 603 nm), tampoco se nota el complejo que se forma entre el citocromo a_{33} -CO en el espectro diferencial de reducido + CO menos reducido (fig. 16)

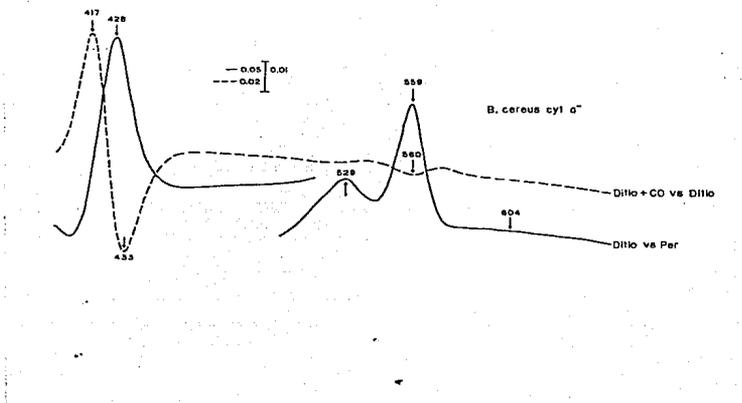


Fig. 16. Espectros diferenciales de ditionita menos persulfato (trazo continuo) y ditionita + CO menos ditionita de membranas de B. cereus cit a- (PYM) de la fase estacionaria tardía (trazo discontinuo). Las membranas (10 mg de proteína en 1 ml de amortiguador al 50% con glicerol) en el primer caso fueron reducidas con algunos granos de ditionita (celda de muestra) y la celda de referencia preparada con la misma cantidad de proteína fué oxidada con algunos cristales de persulfato de amonio. En el segundo caso, las membranas (10 mg de proteína en 1 ml de amortiguador al 50% con glicerol) fueron reducidas con algunos granos de ditionita tanto en la celda de referencia como en la celda de muestra; mientras que en la celda de muestra fué expuesta directamente (burbujeo) a CO durante 5 minutos, la celda de referencia fué previamente aereada. Los espectros y preparaciones fueron hechos a temperatura ambiente.

como el que se observa en la cepa silvestre de la figura 15 (pico 430 y valle a 443 nm), únicamente se observa el complejo puro entre el citocromo o-CO (pico a 415 y valle a 430 nm) en PYM.

La concentración de citocromos de las cepas PYM y silvestre se muestran en la tabla I (parte inferior). La concentración de citocromos de la cepa silvestre en la fase esporulante (Estado III de esporulación) es superior que en la fase logarítmica, lo cual se debe a la desrepresión del sistema respiratorio; en cambio en la cepa PYM la concentración de citocromos es mayor en la fase logarítmica que en la fase estacionaria tardía (12 horas de cultivo), lo cual sugiere una posible degradación celular de estos componentes. Por otra parte, en la comparación de las concentraciones citocrómicas entre las dos cepas, podemos apreciar que la concentración del citocromo b en PYM en la fase logarítmica, es intermedia entre las dos fases de desarrollo (logarítmica y esporulante) de la cepa silvestre; la concentración del citocromo c de PYM en la fase logarítmica, es menor que la detectada en la cepa silvestre en sus dos estados de desarrollo, sin embargo la concentración del citocromo o-CO de PYM en la fase logarítmica es más del doble de la detectada en la cepa silvestre de la fase esporulante. No se detectan en PYM los citocromos a₂₃ ni a₃-CO.

En la tabla I (parte superior) también se muestran las actividades respiratorias basales de las cepas PYM y silvestre. Primeramente se aprecia que la actividad de oxidasas en la cepa PYM es mayor en la fase logarítmica que en la fase estacionaria tardía, lo cual era lógico de esperarse por la degradación de estas citocromos oxidasas como se mencionó anteriormente. La

Tabla I. Las células de la fase logarítmica se cosecharon en $A_{540\text{nm}}^* = 1.25$ en ambas cepas (silvestre y PYM), y las células del Estado III de esporulación, se cosecharon 3.5 horas después de iniciada la esporulación (sólo en la cepa silvestre). Las células de la fase estacionaria tardía en la cepa PYM se cosecharon a las 12 horas de iniciado el cultivo. Las membranas se prepararon como se describe en materiales y métodos.

Las actividades específicas se expresan como $\text{nmol (min. mg protefina)}^{-1}$ para oxidorreductasas y como $\text{ng atomo de O}_2 \text{ (min. mg protefina)}^{-1}$ para oxidasas.

La concentración de citocromos se calculó de los espectros diferenciales (ditiionita-reducido menos persulfato-oxidado) efectuados a temperatura ambiente. Para los complejos de $a_3\text{-CO}$ y $o\text{-CO}$ se usaron los espectros correspondientes de monóxido de carbono. En ambos casos la concentración de citocromos se expresa como $\text{nmol por mg de protefina membranal}$. Se usaron los coeficientes de extinción y pares de longitud de onda señalados en materiales y métodos. Las células se crecieron en medio G.

NOTA: A^* significa la absorvancia.

TABLA I

Actividades Respiratorias y Citocromos: PYM vs Silvestre
cultivados en Medio G

	Mutante PYM		Cepa Silvestre	
	Log	ET*	Log	SPO III
<u>Oxidazas:</u>		n atom (min mg) ⁻¹		
NADH	21	12	43	360
Succinato	23	7	18	18
TMPD	5	3	35	346
<u>Deshidrogenasas:</u>		n mol (min mg) ⁻¹		
NADH: DCPIP	25	42	55	340
Succinato: DCPIP	76	107	148	200
<u>Citocromos:</u>		n mol/mg prot		
cit b	0.27	0.18	0.12	0.45
cit c	0.08	0.05	0.15	0.65
cit o-CO	0.20	0.09	0.05	0.09
cit aa ₃	No Detectable		0.11	0.28
cit a ₃ -CO	No Detectable		0.14	0.25

ET* = Estacionaria Tardia

actividad de NADH y TMPD-oxidasa de la cepa PYM en la fase logarítmica, son menores que las correspondientes a las de la cepa silvestre, únicamente la actividad de succinato-oxidasa de PYM en la fase logarítmica es prácticamente igual a la actividad detectada en la cepa silvestre.

La baja actividad de TMPD-oxidasa detectada para la cepa PYM, es muy aceptable debido a la carencia del citocromo c oxidasa (citocromo aa_3), y aunque la mezcla de escorbato + TMPD reduce directamente a la oxidasa alterna (5), no se detecta esta actividad.

La tabla I (parte central) muestra además las actividades basales de deshidrogenasas en ambas cepas. Se observa primeramente que las actividades de deshidrogenasas en la fase estacionaria tardía de la cepa PYM son mayores que las correspondientes en la fase logarítmica en la misma cepa. Lo contrario sucede con las oxidasas; estas actividades de deshidrogenasas, NADH:DCPIP y succinato:DCPIP oxidorreductasas en la fase estacionaria tardía (12 horas de cultivo), son muy semejantes a las correspondientes de la cepa silvestre en la fase logarítmica.

Las actividades respiratorias de la cepa PYM crecidas en medio G, son más bajas que las detectadas en la cepa silvestre (estado III de esporulación), debido a la ausencia de la citocromo c oxidasa (citocromo aa_3) lo que conduce a una organización diferente de la cadena respiratoria.

Se ha sugerido (31) que en las especies bacterianas esporoformadoras cuando carecen de los citocromos c y aa_3 (vía

sensible al CN^-) no esporulan, lo cual sucedía en nuestro mutante PYM. Al analizar la curva de crecimiento de PYM en medio G modificado, pudimos observar que el pH decae hasta valores menores de 5.5, que es incompatible con el crecimiento y la vida celular, por lo que al controlar el pH, el bacilo esporuló. Esto sugiere que el citocromo *aas* no es indispensable para la esporulación, y su ausencia es suplida por una concentración incrementada del citocromo *o*.

Se utilizaron medios complejos no fermentables (ver materiales y métodos) para cultivar a la cepa PYM, en donde se observó que el crecimiento y la esporulación fué prácticamente igual que en la cepa silvestre; así mismo pudimos observar que el incremento en las actividades del sistema respiratorio de las células crecidas en estos medios, va aparejado con la capacidad de esporular (datos no mostrados).

Al considerar que la cepa PYM carece de citocromo *aas*, podemos obtener una cinética de inhibición por CN^- pura para citocromo *o*. Como se observa en la figura 17, la cinética de inhibición por CN^- sobre NADH y ascorbato + TMPD-oxidasa es más resistente en PYM que en la cepa silvestre correspondiente. En PYM la NADH-oxidasa es prácticamente insensible a concentraciones altas de CN^- (2,000 μM), en cambio ascorbato + TMPD-oxidasa es sensible a bajas concentraciones del inhibidor, pero sin que se inhiba totalmente la actividad respiratoria. Esto sugiere que puede existir otro centro insensible al CN^- que reduce oxígeno.

Con los resultados de la figura 17 se confirma que la mezcla de ascorbato + TMPD reduce directamente al citocromo *o*, de otra forma no se hubiera obtenido actividad de ascorbato + TMPD-

Fig. 17. Efecto del inhibidor respiratorio cianuro de potasio -- (KCN) sobre las actividades de NADH y de ascorbato + TMPD-oxidasa de membranas de las cepas de B. cereus silvestre y PYM. Las membranas (0.2 y 0.8 mg de proteína, que corresponden respectivamente a las cepas silvestre y PYM) se pusieron en amortiguador de fosfatos a 30⁰C conteniendo las concentraciones indicadas -- del inhibidor. La reacción se inició con NADH 50 mM ó ascorbato 0.3 M + TMPD 2.0 mM.

Los símbolos vacíos (Δ) y (○) corresponden a la NADH-oxidasa y ascorbato + TMPD-oxidasa, respectivamente, de la cepa silvestre, mientras que los símbolos llenos (▲) y (●) en orden corresponden a la NADH-oxidasa y ascorbato + TMPD-oxidasa de la cepa PYM.

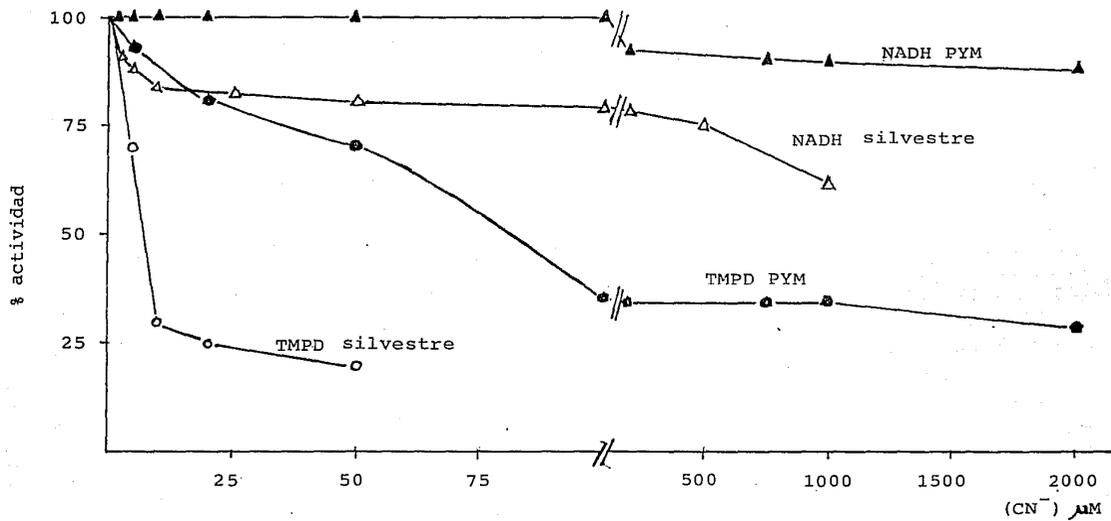


Fig. 17

oxidasa.

Epectros de la Cinética de Aparición del Citocromo o-CO

Como se vió anteriormente en resultados (inhibición por CO en la cepa silvestre), la actividad respiratoria estimulada por ascorbato + TMPD es inhibida de igual forma por los tiempos de exposición de las membranas al CO. La actividad respiratoria remanente (50%) es sostenida por el citocromo o, que es resistente a dicho inhibidor.

La reacción entre las citocromos oxidasas (a_3 y o) con el CO fué evidenciada mediante espectros diferenciales (reducido + CO menos reducido) a temperatura ambiente en membranas esporulantes. Después de reducir a las membranas con ditionita y exponiéndolas a la atmósfera de CO por espacio de un minuto, como se observa en la figura 18 (parte inferior), sólo aparece el citocromo a_3 -CO (picos 430 y 592 y valle 445 nm); conforme la incubación con el inhibidor va siendo mayor, aparece y se va haciendo más evidente el citocromo o-CO disminuyendo el pico correspondiente al citocromo a_3 -CO. Después de 50 minutos de incubación con dicho inhibidor, el pico correspondiente al citocromo o-CO es muy evidente y desaparece el pico correspondiente al otro citocromo oxidasa unida al CO (citocromo a_3), debido a que en esa longitud de onda (430 nm) corresponde al valle del citocromo o-CO, conservándose el valle a 445 nm del citocromo a_3 -CO.

Fig. 18. Espectros diferenciales de monóxido de carbono (ditiionita reducido + CO menos ditiionita reducido) (parte inferior) de membranas de las células esporulantes y espectro diferencial de las mismas membranas reaereadas después de que fueron incubadas con CO durante 50 minutos (parte superior). Las membranas (15 mg de proteína) después de ser reducidas con algunos granos de ditiionita se diluyeron 3 veces con amortiguador saturado con aire (referencia) ó amortiguador saturado con CO (muestra). La celda de muestra fué mantenida (con agitación) bajo atmósfera de CO y se registró su espectro a los tiempos indicados en cada trazo (parte inferior). En la parte superior de la figura, la celda de muestra después de que fué mantenida bajo atmósfera de CO durante 50 minutos se reaereó (por agitación vigorosa) y se registró. Los espectros y preparaciones de las celdas fueron hechos a temperatura ambiente.

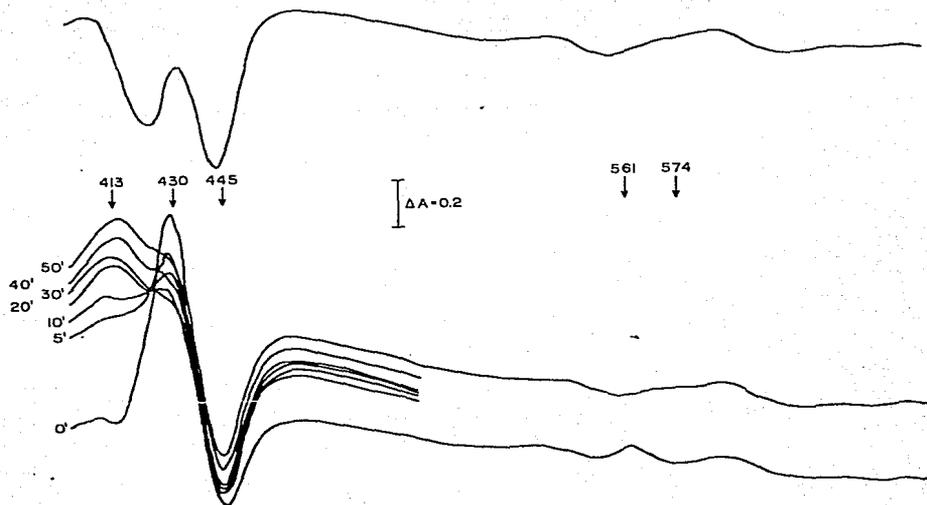


Fig. 18

Tanto a la muestra como a la referencia se reoxidaron (aereación) mediante agitación vigorosa y se registraron espectrofotométricamente. La figura 18 (parte superior), muestra el espectro diferencial bajo las condiciones antes mencionadas, en donde se puede observar la desaparición del pico a 417 nm (citocromo o) conservándose el pico a 430 nm (citocromo a_3 -CO). Esto indica que el oxígeno desplaza al CO unido al citocromo o, pero no desplaza al CO unido al citocromo a_3 .

Estos resultados nos permiten concluir lo siguiente: en presencia de O_2 el CO no se unirá al citocromo o, sólo al a_3 , permitiendo que la respiración sostenida por el primer citocromo no se vea afectada.

Estos resultados nos ayudan a comprender mejor la ausencia de inhibición de la actividad respiratoria sostenida por el citocromo o.

DISCUSION

En el presente trabajo demostramos que es posible detectar por su distinta afinidad al oxígeno cuando menos dos oxidasas terminales, (fig. 6), la de menor afinidad probablemente corresponde al citocromo a_{a_3} con una $K_m=7.7 \mu M$ y la de mayor afinidad probablemente corresponda al citocromo o con una $K_m=2.8 \mu M$. Nuestra conclusión se basa en antecedentes de la literatura (19 y 23) donde los datos de afinidad de citocromo a_{a_3} y citocromo o , por O_2 corresponden a los encontrados en el presente trabajo.

En trabajos anteriores del laboratorio (9, 10 y 11) demostramos la presencia de una tercera citocromo oxidasa en B. cereus que, por sus propiedades espectrales fué identificada como citocromo d . Demostramos que el citocromo d se expresa bajo condiciones en que se deprime las concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo y en condiciones aeróbicas pero en presencia de fuentes de carbono de utilización pobre (casaaminoácidos). Bajo esta última condición la velocidad de crecimiento decae considerablemente en comparación con un cultivo también aerobio, pero utilizando fuentes fermentables de carbono.

De acuerdo con lo anterior los cultivos realizados en esta tesis, utilizando condiciones aerobias y sacarosa como fuente de carbono no son las adecuadas para la expresión del citocromo d . De todas maneras debido a que el citocromo d presenta afinidad por O_2 de 10^{-7} a $10^{-8} M$ (24) no hubiera sido posible detectar esta oxidasa bajo nuestras condiciones de ensayo ya que el oxímetro que se usó a la máxima amplificación detecta concentraciones de O_2 no menores de $0.2 \mu M$.

Los experimentos de inhibición de la NADH y TMPD-oxidasa por CN^- (fig. 7) revelaron, nuevamente la presencia de cuando menos dos oxidasas terminales en R. cereus. Dado que el TMPD_{asa} dona electrones al citocromo c de manera preferencial, entonces tenemos que concluir que la citocromo oxidasa altamente sensible al CN^- debe de corresponder a la citocromo oxidasa aa_3 (vía citocromo c \rightarrow citocromo aa_3). El CN^- a concentraciones menores que $25 \mu\text{M}$ inhibe aproximadamente el 80% de la TMPD-oxidasa y se requieren concentraciones cercanas a 1 mM para eliminar totalmente la actividad. La actividad de NADH (fig. 7) fué considerablemente más resistente al CN^- que la TMPD-oxidasa, solo un 30% de la actividad fué inhibida por concentraciones de hasta 1 mM , la actividad muestra claramente un componente bifásico con una fracción de la actividad sensibles a concentraciones menores que $25 \mu\text{M}$ y el resto de la actividad es afectada a concentraciones sólo mayores que $500 \mu\text{M}$. El comportamiento anterior se puede explicar si consideramos que el TMPD activa preferencialmente a la vía sensible al CN^- mientras que el NADH al donar sus electrones al inicio del sistema es capaz de estimular el funcionamiento de vías sensibles y no sensibles al CN^- .

La inhibición por monóxido de carbono produjo resultados inesperados ya que suponíamos que la actividad estimulada por TMPD, suponiendo que estimula preferencialmente a la vía del citocromo aa_3 , debería de ser totalmente sensible a la inhibición por CO (fig. 8). Sin embargo el CO nunca inhibió más de 50% de la actividad respiratoria estimulada por TMPD. Ni las

concentraciones de CO cercanas al 95% (fig. 8) ni el tiempo largo de incubación (fig. 9) bajo condiciones de saturación con CO ayudaron a incrementar la inhibición por encima del 50% inicial. El efecto inhibitorio de CO sobre el TMPD-oxidasa fué muy parecido, casi paralelo al observado con NADH-oxidasa.

Al Revisar la literatura encontramos un antecedente similar a lo que nos ocurrió con CO y TMPD-oxidasa. Cheah y cols. (5) reportaron que la respiración estimulada por TMPD en Halobacterium cutirubrum es sólo parcialmente inhibida por CO, estos autores concluyen que la baja sensibilidad al CO podría en esas condiciones ser debida a la autooxidación del citocromo c. Para apoyar su planteamiento demuestran que cuando la actividad de TMPD-oxidasa es medida a muy bajas tensiones de O₂, entonces el CO tiene una mayor potencia inhibitoria. Como se verá más adelante, existe otra explicación basada en la baja afinidad del citocromo o por el CO y a la vez una alta afinidad por O₂.

Los experimentos en que se utilizaron CN⁻ y CO combinados (figs. 10 y 11) demuestran que el efecto inhibitorio de CN⁻ es aditivo sobre la inhibición causada por CO (fig. 11) pero, el CO no muestra inhibición aditiva sobre la inactivación previamente causada por CN⁻ (fig. 10). Esto es particularmente cierto en el caso de la actividad de TMPD-oxidasa donde el CO no incrementa la inhibición del 60% causada por CN⁻ 10 µM (fig. 10). En cambio cuando se parte de una preparación de TMPD-oxidasa inhibida al 40% por un 80% de saturación de CO entonces, el CN⁻ lleva la inhibición hasta casi el 90%.

Lo anterior sugiere que en caso de la TMPD-oxidasa el

CN⁻ es capaz de inhibir a las dos oxidasas terminales (90% de inhibición en fig. 10) mientras que el CO sólo inhibe a una oxidasa (40% de inhibición en fig. 11) y entonces el CN⁻ es capaz de inhibir a la segunda oxidasa no sensible al CO.

El planteamiento de que la citocromo oxidasa o sea la responsable de la respiración insensible al CO es reforzado por los resultados que se observan en la figura 18, donde, se demuestra claramente que el citocromo o es poco reactivo con el CO, pues se requieren tiempos largos de exposición y condiciones anóxicas para observar el pico correspondiente, formado por citocromo o y CO (pico 413 nm y valle a 430 nm). Es notable, como se muestra en el trazo superior de la misma figura, que cuando se introduce O₂ (agitación en vortex) después de 50 minutos de reacción con CO en presencia de ditionita, entonces desaparecen rápidamente las señales espectrales del complejo citocromo o-CO (pico 413 nm y valle a 430 nm). Este resultado nos lleva a la conclusión de que el citocromo o tiene baja afinidad por el CO como lo sugiere la necesidad de períodos largos de incubación y condiciones anóxicas para que se forme el complejo y finalmente el hecho de que el O₂ desplaza fácilmente al CO del complejo.

Al considerar estos resultados es claro que la citocromo oxidasa o se mostrara insensible al CO cuando se le ensaya en el oxímetro debido a que en las condiciones utilizadas de ensayo se requiere O₂ en el medio para poder medir la actividad. Los resultados por Broberg y Smith (3) demostraron que la citocromo oxidasa en B. megaterium presenta también muy baja afinidad por CO.

El análisis cinético de las citocromos oxidasas en un sistema respiratorio complejo como el de B. cereus presenta obstáculos por el momento insalvables ya que no se cuenta con inhibidores específicos para cada una de las oxidasas presentes en el sistema. Así, el KCN es capaz de inhibir a diferentes concentraciones a las tres oxidasas terminales y aunque las curvas de inhibición son bifásicas no es posible separar claramente los componentes enzimáticos para cada fase de inhibición. Sabemos que una oxidasa terminal es inhibida a concentraciones de 25 μM de CN^- y la segunda y tercera oxidasas requieren concentraciones mayores.

Para salvar el obstáculo arriba comentado decidimos intentar el aislamiento de mutantes que carecieran de una de las oxidasas terminales. Estratégicamente, utilizando al TMPD como colorante indicador resultó relativamente sencillo aislar mutantes que fueran incapaces de virar al colorante. Los mutantes resultaron como se esperaba, deficientes en la vía de citocromo c ---> citocromo a_{a_3} ; específicamente todos los mutantes aislados resultaron deficientes en citocromo a_{a_3} (figs. 14, 15 y 16).

El análisis preliminar de la cinética de inhibición por CN^- para estos mutantes, demuestran que la citocromo oxidasa a_{a_3} es la responsable de la respiración altamente sensible al CN^- . La actividad de TMPD-oxidasa en los mutantes mostró resistencia elevada a la inhibición por CN^- , si se le compara con la misma actividad de la cepa silvestre (fig. 17). Cabe mencionar que aunque la respiración estimulada por TMPD en el mutante PYM es más resistente que la misma actividad del silvestre, no alcanza los niveles de resistencia que la NADH-oxidasa en la cepa

silvestre. Este resultado podría explicarse con una de las siguientes alternativas: 1) Aunque el citocromo d no es espectralmente detectable bajo las condiciones de cultivo empleadas, podría estar presente en cantidades suficientes para ser responsable de la actividad respiratoria insensible a concentraciones de CN^- mayores que 1 mM. En verdad, hay que recordar que el coeficiente de extinción molecular para el citocromo d reducido es de apenas $8.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor considerablemente menor al coeficiente para los otros citocromos que fluctúa entre 21 y $80 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. De esta manera se requiere de la presencia de concentraciones de citocromo d relativamente elevadas para ser espectralmente detectables. 2) En ausencia de citocromo d se tendría que postular la existencia de otro citocromo no sensible al CN^- , capaz de reaccionar con O_2 . Se ha propuesto que un citocromo c podría estar funcionando como citocromo oxidasa alternativa, autooxidándose con O_2 en condiciones que la citocromo oxidasa este inhibida por CN^- (7).

Ahora que se cuenta con un mutante deficiente en citocromo a_{a_3} , será posible estudiar un sistema respiratorio menos complejo y se requerirá realizar la cinética de inhibición para inhibidores respiratorios de los sitios I, II y III de fosforilación, analizar la cinética por O_2 y la cinética de inhibición por CO en condiciones de baja tensión de O_2 . El mutante será particularmente útil en el estudio de las relaciones que existen entre la composición de citocromos oxidasas y la capacidad para esporular. Aunque Taber (27) aisló mutantes de B. subtilis deficientes en citocromo a que presentaban fenotipos

spo⁻, más tarde se demostró que estos mutantes también presentaban deficiencias en una ó más enzimas del ciclo de Krebs. Al considerar que los mutantes aislados en nuestro laboratorio fueron seleccionados por una técnica específica para la citocromo, c oxidasa y que, los de Taber en cambio fueron seleccionados de manera inespecífica por una reacción que detecta genéricamente hemoproteínas (reacción de bencidina), será pertinente hacer una caracterización de las propiedades de crecimiento y esporulación de los mutantes PYM aislados en nuestro laboratorio. También será pertinente caracterizar a dicho mutante en su contenido citocrómico cuando se le cultive bajo condiciones microaerofílica ó anaeróbicas tanto en medios fermentables como en los no fermentables.

CONCLUSIONES

Mediante los estudios aquí realizados, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

La cinética de afinidad por el oxígeno sugiere la participación de dos citocromos oxidasas terminales, la a_{a_3} y la o .

El fuerte poder inhibitorio del cianuro sobre la TMPD oxidasa, sugiere que la vía sensible a dicho inhibidor es citocromo $c \rightarrow$ citocromo a_{a_3} .

La inhibición de la actividad respiratoria por monóxido de carbono sobre la inhibición inicial por el cianuro es aditiva, en el caso de la respiración estimulada por NADH.

La inhibición de la actividad respiratoria por cianuro sobre la inhibición inicial por monóxido de carbono es aditiva, tanto para NADH como para TMPD oxidasa. Se sugiere que los citocromos oxidasas (citocromo a_{a_3} y o) en B. cereus son sensibles al cianuro.

En presencia de oxígeno el monóxido de carbono no se une al citocromo o , sólo al a_{a_3} , permitiendo que la respiración sostenida por el primer citocromo no se vea afectada.

La ausencia del citocromo a_{a_3} en el mutante PYM, no impide que éste esporule normalmente. Con la ausencia de dicho citocromo en el bacilo se apreció más claramente la actividad de la vía alterna.

ABREVIATURAS

ADN = Acido desoxirribonucleico.

ADP = Acido dipicolinico.

ATC = Acido tricarbóxico.

ATP = Trifosfato de adenosina.

Cit = Citocromo.

CN⁻ = Cianuro.

CO = Monóxido de carbono.

CO₂ = Dióxido de carbono.

CTE = Cadena de transporte de electrones.

DCFIP = 2,6-diclorofenolindofenol.

H₂S = Acido sulfhídrico.

KCN = Cianuro de potasio.

N₂ = Nitrógeno molecular.

NADH = Nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido.

PFK = Fosfofructocinasa.

PMS = Metasulfato de fenazina.

TMPD = N,N,N',N'-Tetrametil-p-feniléndiamina.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Libros

- 1*.- Broda, E. 1978. The Evolution of the Bioenergetic Processes. Pergamon Press, Great Britain.
- 2*.- Gould, G. W. y Hurst, A. 1969. The Bacterial Spore. Academic Press Inc., London.
- 3*.- Lazcano, A. A. 1977. El Origen de la Vida. ANUIES., D. F. México.
- 4*.- Lehninger, L. A. 1978. Bioquímica. Segunda Edición. Omega, Barcelona España.
- 5*.- Rose, H. A. y Morris, G. A. 1979. Microbial Physiology. Academic Press Inc., London.
- 6*.- Salle, A. J. 1974. Fundamental Principles of Bacteriology. Tata Mc. Graw-Hill Publishing Company LTD. New Delhi.

Artículos

- 1.- Andreoli, A. J., Suehiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J., Vivianco, J., Lara, C y Klute, M. C. 1973, Release and recovery of forespores from Bacillus cereus. J. Bacteriol. 115: 1159-1166.
- 2.- Arrigoni, D. y Singer, T. P. 1962. Limitations of phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases. Nature 193 : 1256-1258.

- 3.- Broberg, P. L. y Smith, L. 1967. The cytochrome system of Bacillus megaterium KM. The presence and some properties of two CO-binding cytochromes. Richim. Biophys. Acta, 131: 479-489.
- 4.- Collier, R. E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in Clostridium roseum. In Spores, pp 10-17. H. O. Halvorson (ed) Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
- 5.- Cheah, K. S. 1969. Properties of Electron Transport from Halobacterium cutirubrum. The Respiratory Chain System. Biochim. Biophys. Acta, 180: 320-333.
- 6.- Cypionka, H. y Meyer, O. 1983. Carbon Monoxide-Insensitive Respiratory Chain of Pseudomonas carboxydovorans. J. Bacteriol., 156: 1178-1187.
- 7.- De Urij, W., Azzi, A. y Konings, W.N. 1983. Structural and Functional Properties of Cytochrome c Oxidase from Bacillus subtilis W 23. European J. Biochem., 131: 97-103.
- 8.- Escamilla, J. E., Tesis doctoral, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 1984.
- 9.- Escamilla, J. E., Benito, M. C. Respiratory System of Vegetative and Sporulating Bacillus cereus. J. Bacteriol., 160: 473-477.
- 10.- Escamilla, J. E., Ramírez, R., Del Arrenal, P. y Aranda, A. 1986. Respiratory Systems of the Bacillus cereus Mother Cell and Forespore. J. Bacteriol., 167: 000-000.

- 11.- Esamilla, J. E., Ramirez, R., Del Arenal, P., Zarzoza, G. y Linares, V. Effect of Oxygen Tension and Carbon Source on the Expression of the Bacillus cereus Respiratory System. En revisión (J. Bacteriol.).
- 12.- Felix, J. A., y Lundgren, D. G. 1973. Electron Transport System Associated with Membranes of Bacillus cereus During Vegetative Growth and Sporulation. J. Bacteriol. 115: 552-559.
- 13.- Gel'man, N. S., Lukoyanova, M. A. y Ostrovskij, D. N. 1975. The Respiratory Chain and its Organization in the Bacterial Membrane. En Biomembranes, 6: 129-215.
- 14.- Haddock, B. A. & Jones, C. W. 1977. Bacteriol Respiration. Bact. Rev. 41: 47-99.
- 15.- Halvorson, H. O. 1957. Rapid and simultaneous sporulation. J. Bacteriol. 115: 552-559.
- 16.- Hanson, R. S., Srinivasan, V. R. y Halvorson, H. O. 1963. Biochemistry of sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol. 85: 451-460.
- 17.- Jurtskuk, P. y Muller, W. C. 1975. Bacterial terminal oxidases. Crit. Rev. Microbiol. 3: 399-468.
- 18.- Lang, D. R., Felix, J. y Lundgren, 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: 968-977.
- 19.- Laszlo, D. J. y Taylor, B. L. Aerotaxis in Salmonella

typhimurium Role of electron transport. J. Bacteriol. 145: 990-1001.

20.- Lowry, O. H. Roseborough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-267.

21.- Matsushita, K., Yamada, M. Shinagawa, E. Adachi, O. y Ameyama, M. 1983. Membrane bound Respiratory Chain of Pseudomonas aeruginosa Grown Aerobically. A KCN Insensitive Alternate Chain and Its Energetics, J. Biochem. 93: 1137-1144.

22.- Mc. Feters, G. A., Wilson, D. F. y Strobel, G. A. 1970. Cytochromes in a cyanide-resistant strain of Bacillus cereus. Canadian J. Microbiol. 16: 1221-1226.

23.- Meyer, J. D. y Jones, W. C. 1973. Reactivity with Oxygen of Bacterial Cytochrome Oxidases a₁, a₃ and o. Febs Letters. 33: 101-105.

24.- Rice, C. W. y Hemplfling, W. P. 1978. Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 134: 115-124.

25.- Smith, L. 1978. Bacterial cytochromes y their spectral characterization. En Methodos in Enzymology. 53: 202-213.

Fleischer, S. and Parker, L. (ed). Academic Press Inc., New York.

26.- Sterlini, J. M. y Mandelstam, J. 1969. Commitment to Sporulation in Bacillus subtilis and its Relationship to development of Actinomycin Resistance. J. Biochem. 113: 29-37.

- 27.- Taber, H. 1974. Isolation and Properties of Cytochrome a Deficient Mutants of Bacillus subtilis. J. General Microbiol. 81: 435-444.
- 28.- Taylor, B. L. 1983. How do bacteria find the optimal concentration of oxygen. TIRS. 8: 439-441.
- 29.- Taylor, B. L. 1983. Role of proton motive force in energy transduction in bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 37: 551-573.
- 30.- Tochikubo, K. 1971. Changes in Terminal Respiratory Pathways of Bacillus subtilis During Germination, Outgrowth and Vegetative Growth. J. Bacteriol. 108: 652-661.
- 31.- Young, M. y Mandelstam, J. 1979. Early events during bacterial endospore formation. Adv. in Microbiol. 20: 103-160.