

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Exposición de *Rhizobium etli* CE3 a un ambiente oxidativo y el efecto sobre su crecimiento y las actividades de las enzimas aconitasa y piruvato carboxilasa”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

Karla García y García.

Cuernavaca, Morelos.

Junio, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Jaime Mora Celis, titular del Programa de Ingeniería Metabólica en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.

QuickTime™ and a  
TIFF (uncompressed) decompressor  
are needed to see this picture.

Mi agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente tuvieron que ver con la realización de este trabajo:

Programa de Ingeniería Metabólica del CIFN:

I.Q. Gisela Araíza  
M. en C. Rafael Díaz  
Dr. Michael Dunn  
Dr. Sergio Encarnación  
Q. Yolanda Mora  
Q.I. Humberto Peralta  
Q.F.B. Hermenegildo Taboada  
Dra. Carmen Vargas

...y a todo el personal del laboratorio.

Sinodales:

M. en C. Manuel Mandujano  
M. en C. Gerardo Ortiz  
Dr. Jaime Mora  
M. en C. Gumercindo de la Cruz  
Dra. Tzasná Hernández

A mis queridos padres, por su ejemplo, apoyo, amor y paciencia.

Yolanda y Carlos García

A mis compañeros, por todos esos momentos.

Alma García, Angélica Fabre, Bárbara Romano, Griselda Pratz, Mauricio Hernández, Ramón López, Ricardo Mendoza, Rocío Rosas, Vanessa González.

A mis amigas de toda la vida, a pesar del tiempo y la distancia.

Hiromi Fukumitsu, Viviana Gómez,

A mis nuevos amigos, por haberlos conocido.

Elizabeth Soto, José Luis Ramos.

A tí muy especialmente, por todo el cariño.

Rafael Díaz



## CONTENIDO

1.-Resumen	1
2.-Introducción	2
2.1.-Importancia del nitrógeno	2
2.2.-Ciclo del nitrógeno	2
2.3.-Fijación de nitrógeno	3
2.3.1.-Fijación biológica de nitrógeno	4
2.4.-Proceso simbiótico	6
2.5.-Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	9
2.6.-Estrés oxidativo	12
3.-Antecedentes	18
4.-Objetivos	20
4.1.-Objetivo general	20
4.2.-Objetivos específicos	20
5.-Material y métodos	21
5.1.-Cepa de estudio	21
5.2.-Medios de cultivo	21
5.3.-Controles de esterilidad	22
5.4.-Subcultivos en medio mínimo	22
5.5.-Determinación de oxígeno	23
5.6.-Determinación de proteína	23
5.7.-Detección de actividad aconitasa	24
5.8.-Detección de actividad piruvato carboxilasa	25
6.-Resultados	28
6.1.-Subcultivos de <i>Rhizobium etli</i> CE3 en medio mínimo con diferentes condiciones de oxidación	28
6.2.-Actividad de la enzima aconitasa de <i>Rhizobium etli</i> CE3 en subcultivos de medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm (4 h) y 10 mM a 200 rpm (8 y12 h)	33

6.3.-Crecimiento de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33
6.4.-Actividad de la enzima aconitasa de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34
6.5.-Actividad de la enzima piruvato carboxilasa de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35
7.-Discusión	37
7.1.-Metabolismo tipo fermentativo de <i>Rhizobium etli</i> CE3	37
7.2.-Aumento de la concentración de O <sub>2</sub> y de la fuente de carbono en el medio de cultivo de <i>Rhizobium etli</i> CE3	38
7.3.-Sistema de tres subcultivos cortos	41
7.4.-Crecimiento de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	42
7.5.-Actividad de la enzima aconitasa de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43
7.6.-Actividad de la enzima piruvato carboxilasa de <i>Rhizobium etli</i> CE3 expuesto a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43
8.-Conclusiones	45
9.-Bibliografía	46
10.-Apéndice	52



## 1.-RESUMEN

*Rhizobium etli* CE3 es una bacteria del suelo perteneciente a la familia Rhizobiaceae, del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias. Establece simbiosis exclusivamente con la leguminosa *Phaseolus vulgaris*, alojándose en las células radiculares de la planta. Cuando las células de la raíz son invadidas, forman un órgano especial llamado nódulo, que es en donde la bacteria puede fijar el nitrógeno que después es destinado como nutriente para la planta.

*Rhizobium etli* es microaeróbica, por lo que la concentración de oxígeno ambiental o intracelular es crucial para esta bacteria. La presencia de O<sub>2</sub> genera especies reactivas que son potencialmente dañinas para el metabolismo celular, de modo que en situación de estrés oxidativo la sobrevivencia de la bacteria se ve amenazada.

En este trabajo se estudiaron algunos aspectos fisiológicos de *Rhizobium etli* CE3 cultivado en condiciones de estrés oxidativo; específicamente, el efecto que tal estrés provocó sobre el crecimiento bacteriano y sobre la actividad de las enzimas aconitasa y piruvato carboxilasa.

Se observó que cuando *R. etli* fue cultivado en medio mínimo con exceso de succinato, alta concentración de oxígeno, y/o adicionando peróxido de hidrógeno al medio, el crecimiento de la bacteria disminuyó y la bacteria cambió de metabolismo aeróbico a fermentativo. Este fenómeno está relacionado con una limitación en la síntesis de las vitaminas biotina y tiamina, ya que cuando estas fueron adicionadas al medio de cultivo, la cepa no resultó afectada. También se observó que en situación de estrés oxidativo provocado por las condiciones de cultivo mencionadas, la actividad enzimática de la aconitasa disminuyó momentáneamente, pero el daño fue reversible; mientras que, la actividad de la enzima piruvato carboxilasa resultó afectada negativamente y esto permitió

corroborar la limitación de síntesis de biotina en la bacteria ya que la vitamina es cofactor de esta enzima.

## **2.-INTRODUCCION**

### **2.1.- Importancia del nitrógeno.**

El nitrógeno es un gas inerte cuyo volumen ocupa cerca del 80% en la atmósfera. Es un elemento esencial para los seres vivos junto con otros elementos como: oxígeno, carbono e hidrógeno. El nitrógeno es fundamental en la estructura de aminoácidos y una gran variedad de macromoléculas entre las que se encuentran proteínas, ácidos nucleicos y muchos otros compuestos biológicos. Sin embargo, a pesar de que este elemento es abundante en la atmósfera, no puede ser aprovechado directamente por la mayoría de los organismos porque se encuentra en forma de nitrógeno molecular o dinitrógeno ( $N_2$ ) y el enlace que une ambos átomos es sumamente estable y difícil de romper. La mayoría de los organismos solo pueden asimilarlo cuando los dos átomos del nitrógeno molecular son separados y combinados con otros elementos, es decir fijado. Las plantas obtienen la mayoría del nitrógeno fijado que necesitan como nutriente, en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ) o amonio ( $NH_4^+$ ) presentes en el suelo. Las plantas deben competir con gran variedad de microorganismos del suelo que también lo requieren, por eso es que el nitrógeno, en el suelo, es un factor limitante (Brill, 1977).

### **2.2-Ciclo del nitrógeno.**

La reserva global de nitrógeno se encuentra distribuída en tres grandes rubros: atmósfera, suelo y biomasa. El intercambio entre estos sitios de reserva constituyen el ciclo del nitrógeno (figura 1):

El nitrógeno presente en el suelo es fijado principalmente en forma de  $NO_3^-$  y entra a la biomasa cuando es adquirido por plantas y microorganismos. En las plantas el  $NO_3^-$  es convertido en nitrógeno orgánico (aminoácidos y otras macromoléculas) mediante el proceso de asimilación. El nitrógeno es integrado a la cadena alimenticia cuando las plantas son consumidas por los animales;

después, el nitrógeno retorna al suelo a través de los desechos de animales o cuando estos mueren y son degradados.

Durante la degradación, microorganismos del suelo convierten el nitrógeno orgánico en  $\text{NH}_4^+$ , esto es amonificación. Parte del amonio se volatiliza, pero la mayoría es convertido primero a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego a  $\text{NO}_3^-$  por microorganismos del suelo, lo que se denomina nitrificación. El nitrato en el suelo es asimilado por plantas pero también por microorganismos que lo reducen a  $\text{N}_2$  que retorna a la atmósfera, o lo que es lo mismo, desnitrificación (Arp, 2000; Hopkins, 1995).

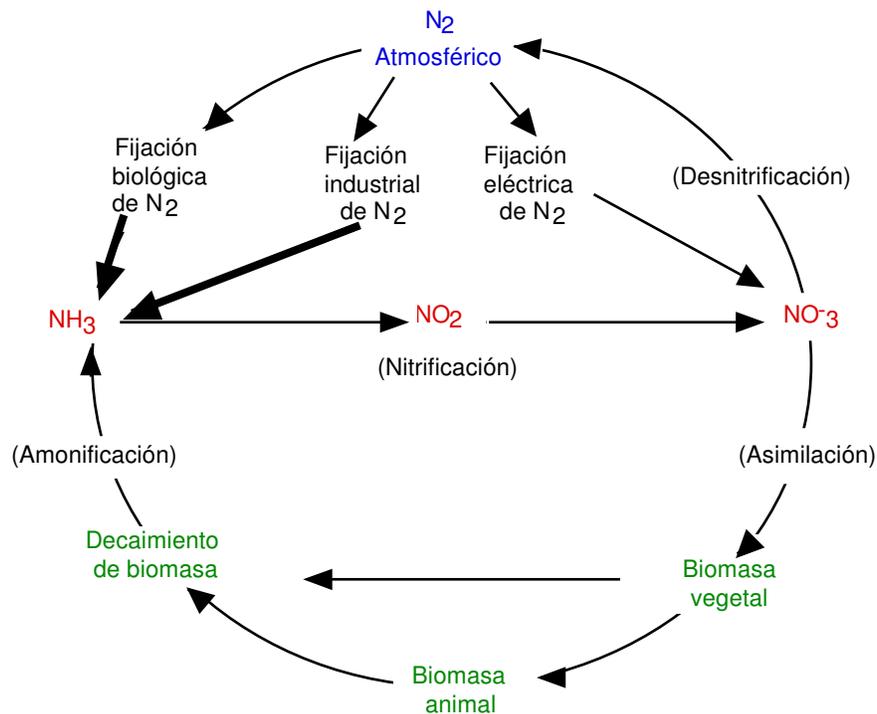


Figura 1.-Ciclo del nitrógeno. Se indican las tres grandes reservas globales de nitrógeno: en azul, atmósfera; en rojo, suelo y en verde, biomasa (Modificado de Hopkins, 1995).

### 2.3.-Fijación de nitrógeno.

La reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  es conocida como fijación de nitrógeno. El nitrógeno puede ser fijado industrialmente o naturalmente.

Alrededor del 15% del nitrógeno fijado globalmente se debe a un proceso industrial conocido como de Haber y Bosch, donde el dinitrógeno es combinado con hidrógeno con ayuda de alta temperatura (300-400 °C) y presión (35-100 MPa). El producto de reacción es amoníaco ( $NH_3$ ), que es utilizado como fertilizante. Sin embargo la fijación de nitrógeno mediante este proceso tiene algunos inconvenientes, ya que es altamente costosa porque se requieren combustibles fósiles no renovables. Además el uso desmedido de fertilizantes obtenidos industrialmente, acarrea problemas como la volatilización del amonio o nitrificación de cuerpos acuíferos y freáticos (Brill, 1977).

Dentro de la fijación natural de nitrógeno, está la fijación debida a eventos atmosféricos (cerca del 10% de todo el nitrógeno fijado) como son los relámpagos y la radiación ultravioleta, que poseen la energía suficiente para romper el enlace del nitrógeno molecular. Otra forma natural de fijación de nitrógeno es la biológica (75% de la fijación global), la cual es realizada exclusivamente por varios organismos procariontes ya que solo ellos poseen el complejo enzimático nitrogenasa capaz de catalizar la reducción de dinitrógeno a amonio (Hopkins, 1995).

### **2.3.1-Fijación biológica de nitrógeno.**

Los procariontes fijadores de nitrógeno incluyen bacterias de vida libre como son *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Rhodospirillum*, etc; cianobacterias como *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia* y *Calothrix*. Entre los organismos que forman asociaciones simbióticas están *Frankia* (bacteria filamentosa del grupo de los actinomicetos),  $\beta$ -proteobacterias como *Burkholderia* y *Rastolnia* que nodulan leguminosas, y bacterias de la familia Rhizobiaceae como *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* que

establecen simbiosis principalmente con miembros de la familia Leguminosae (Sprent, 1994).

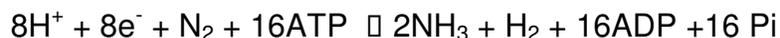
Los organismos fijadores de nitrógeno, poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa que cataliza la reducción del dinitrógeno a amonio (figura 2).

La nitrogenasa es un complejo proteico multimérico conformado por dos proteínas de distinto tamaño. La proteína menor es dimérica cuyas subunidades son

idénticas (codificadas por el gen *nifH*) que van de 24-36 kDa dependiendo de la especie bacteriana; se le conoce como proteína Fe porque contiene un centro  $Fe_4S_4$ . La proteína mayor es un tetrámero que consiste de dos pares de subunidades idénticas (codificadas por los genes *nifD* y *nifK*) con masa total de aproximadamente 220 kDa; también se le conoce como proteína MoFe porque contiene dos iones molibdeno en forma de cofactor hierro-molibdeno-azufre; esta proteína también contiene grupos  $Fe_4S_4$  (Mylona *et al*, 1995).

La reducción de dinitrógeno a amonio por la nitrogenasa es un proceso complejo que requiere de ATP, electrones (obtenidos por la oxidación de la fuente carbonada suministrada por la planta), acceso a nitrógeno atmosférico, cofactores como Fe, Mg y Mo, además de un ambiente microaeróbico (Paracer y Ahmadjian, 2000).

La reacción total por medio de la cual el  $N_2$  es reducido a  $NH_3$  por la nitrogenasa es la siguiente:



La reacción sucede en un proceso de dos pasos. En el primero, la proteína Fe es reducida por un donador electrónico que es usualmente la proteína ferredoxina; la ferredoxina es una proteína pequeña (14-24 kDa) que contiene un

grupo Fe-S; los electrones son transportados por el hierro que puede estar en estado reducido ferroso ( $\text{Fe}_2^+$ ) o en estado oxidado férrico ( $\text{Fe}_3^+$ ). En el segundo paso, la proteína Fe transfiere los electrones a la proteína MoFe que cataliza la reducción total de dinitrógeno e hidrógeno. Se requiere de ATP que participa con la proteína Fe reducida y tiene que ver en la transferencia de electrones entre la proteína Fe y la proteína MoFe (Hopkins, 1995; Mylona *et al*, 1995).

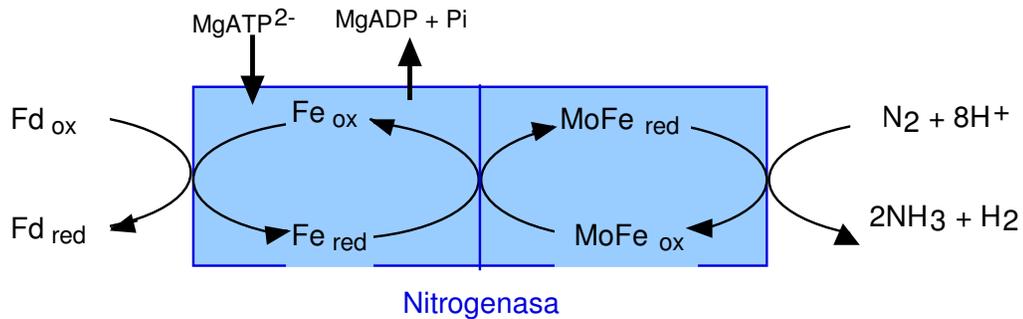


Figura 2.- Esquema general de la reacción catalizada por la nitrogenasa. El flujo de electrones es de izquierda a derecha. El principal donador electrónico es la ferredoxina (Fd), que recibe electrones del sustrato respiratorio suministrado por la planta (Hopkins, 1995).

Un factor crítico que limita la fijación biológica de nitrógeno, es que el complejo nitrogenasa es sensible a oxígeno molecular ya que las proteínas Fe y MoFe son rápida e irreversiblemente inactivadas por el oxígeno. Para mantener el nivel apropiado de oxígeno, las raíces de las plantas que establecen simbiosis con las rhizobia desarrollan estructuras llamadas nódulos, además de la participación de la proteína leghemoglobina que puede unir  $\text{O}_2$  y que es sintetizada por la planta (Mylona *et al.*, 1995).

#### 2.4.-Proceso simbiótico.

La interacción simbiótica entre las rhizobia y plantas leguminosas es de particular interés debido a la formación de un órgano especializado para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, el nódulo. Para que el nódulo pueda formarse se requiere de la cooperación de ambos organismos. A continuación se describen las etapas en las que se desarrolla un nódulo (figura 3).

•**Excreción de moléculas señal.** La planta excreta a la rizósfera gran variedad de compuestos como carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, flavonoides y muchas otras moléculas. El proceso simbiótico inicia cuando la planta excreta isoflavonoides, un tipo de flavonoides exclusivos de las leguminosas, que actúan como moléculas señal al inducir la expresión de genes rhizobiales (conocidos como genes *nod*) requeridos para la nodulación (Perret *et al.*, 2000).

En la bacteria, la proteína NodD es el sensor de la señal vegetal y actúa como regulador transcripcional que media la activación de otros genes *nod* los cuales codifican enzimas que sintetizan moléculas denominadas factores Nod. Estos factores pertenecen a una familia de lipoquitooligosacáridos (LQOs) compuestos de 4 o 5 residuos  $\beta$  N-acetil glucosamina unidos y en los cuales el grupo acetil del azúcar terminal está sustituido por una cadena acilo. Existen diferentes tipos de factores Nod cuyas diferencias radican en la variación de la longitud del oligómero de quitina, cambios en la cadena acilo y en la presencia de distintos sustituyentes como acetato, sulfato, azúcares, etc. La variedad de factores Nod hace que estos sean los principales determinantes de especificidad del hospedero, ya que un factor Nod específico es reconocido por una leguminosa en particular (Perret *et al.*, 2000).

La bacteria libera factores Nod en la rizósfera, induciendo una rápida y transitoria despolarización en la membrana plasmática de los pelos radiculares (debido a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida por salida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ ), así como la desintegración del citoesqueleto de actina y la inhibición del crecimiento del pelo radicular. Como efectos tardíos, los factores Nod causan deformación del pelo radicular y la división de células corticales en la leguminosa (Downie y Walker, 1999).

•**Inicio de la infección.** Para que el proceso de infección inicie, tienen que estar en estrecho contacto la superficie celular bacteriana y el extremo del pelo radicular; esto se logra a través de unas proteínas de unión carbohidrato-específicas producidas por la planta, llamadas lectinas, las cuales se unen a un ligando particular en la superficie de la bacteria. Luego la bacteria penetra la pared celular y entra en contacto con la membrana plasmática; el pelo radicular se curva y lejos de su punta, nueva pared celular vegetal es depositada hacia una nueva estructura tubular denominada hilo de infección que crece como una intrusión hacia el córtex de la raíz. El hilo de infección está rodeado por pared celular excepto en la punta, mediante la cual el hilo se va extendiendo y ramificando hasta acceder a las células del córtex. Contenidas en el hilo de infección están las rizobias rodeadas de polisacárido en el cual crecen y dividen (Hirsch *et al.*, 2001).

•**Formación del nódulo.** El nódulo se forma cuando las células corticales de la raíz comienzan a dividirse, posiblemente inducidas por los factores Nod. El hilo de infección se extiende intercelularmente a través del nódulo dispersando y liberando a las bacterias. En este momento las bacterias aún están separadas del citoplasma vegetal a través de la membrana y pared de las células vegetales, además de que las bacterias todavía poseen una cápsula lipopolisacárida. Posteriormente, las bacterias son liberadas en el citoplasma vegetal por medio de una vesícula originada a partir del hilo de infección, para ser luego endocitadas por las células hospederas. Las células infectadas ya no continúan dividiéndose pero se alargan, incrementando el tamaño del nódulo (Taté *et al.*, 1994; Hirsch y LaRue, 1997).

•**Desarrollo de simbiosomas.** Cuando las bacterias son liberadas del hilo de infección a las células corticales, tienen cambios morfológicos y fisiológicos (pierden motilidad, su pared celular adelgaza, adoptan distintas formas, etc.) diferenciándose en bacteroides. Los bacteroides son rodeados individualmente o en grupos por una membrana originada a partir de la membrana plasmática vegetal, denominada membrana peribacteroidal. Al conjunto de bacteroide,

espacio peribacteroidal y membrana peribacteroidal se le llama simbiosoma (Brewin *et al.*, 1992; Cermola *et al.*, 2000).

El simbiosoma es la estructura gracias a la cual se dan las condiciones necesarias para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, debido a que proporciona un ambiente con poco oxígeno donde la nitrogenasa puede estar activa y también controla el intercambio de metabolitos entre la planta y el bacteroide (Verma, 1992).

•**Senescencia del nódulo.** Conforme aumenta el número de bacteroides empaquetados en un mismo simbiosoma, la superficie de intercambio metabólico y de oxígeno entre la célula hospedera y los bacteroides se reduce y no es suficiente para sostener las mínimas funciones vitales. La viabilidad de los bacteroides disminuye

dejando de fijar nitrógeno y acumulando grandes cantidades de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. Sin amonio, las proteasas presentes en la membrana peribacteroidal favorecen la degradación de los bacteroides. Las bacterias que han permanecido en el hilo de infección son liberadas al suelo (Cermola *et al.*, 2000; Mylona *et al.*, 1995).

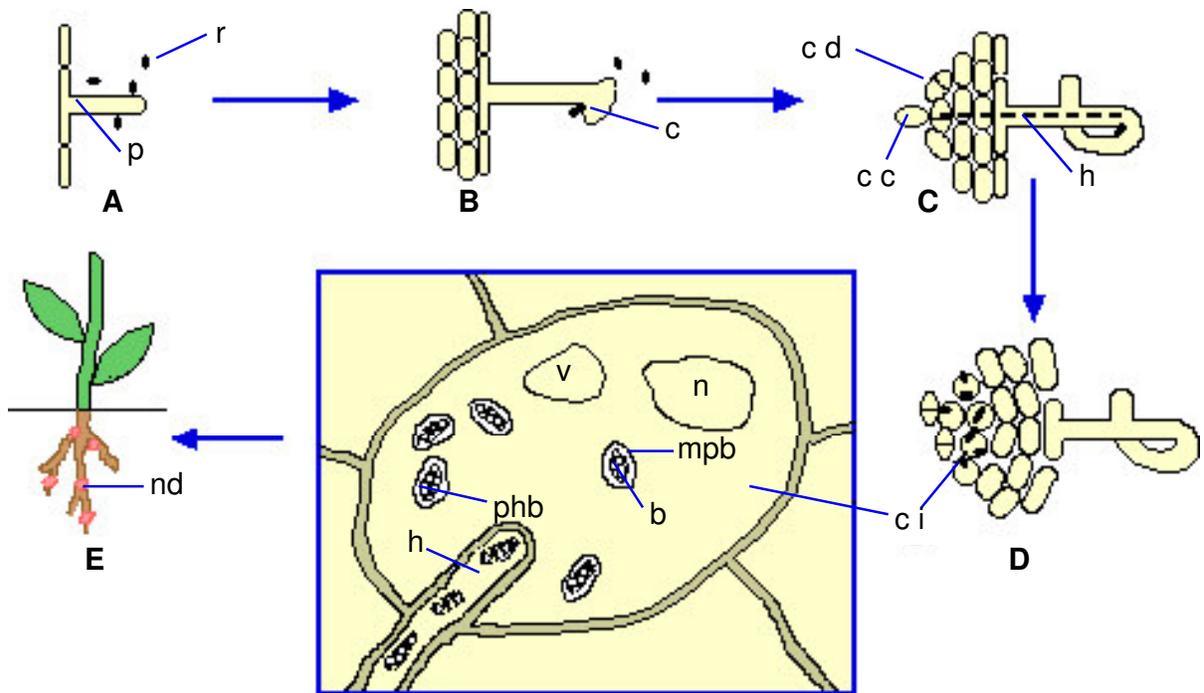


Figura 3.- Proceso simbiótico: A, unión de las rhizobia al pelo radicular; B, curvamiento del pelo radicular; C, formación del hilo de infección; D, infección celular; E, desarrollo de nódulos. *b*, bacteroide; *c*, centro de infección; *cc*, células corticales; *cd*, células en división; *ci*, células infectadas; *h*, hilo de infección; *mpb*, membrana peribacteroidal; *n*, núcleo; *nd*, nódulos; *p*, pelo radicular; *phb*, gránulos de poli-β-hidroxitirato; *r*, *Rhizobium*; *v*, vacuola (modificado de Paracer y Ahmadjian, 2000).

## 2.5.-Ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El ciclo de los ácidos tricarbónicos o TCA (figura 4) genera energía y precursores para la síntesis de vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Para el caso de las rhizobia, el ciclo puede explicarse de la siguiente manera (Dunn, 1998):

La entrada al ciclo TCA comienza a partir de la generación de acetil CoA a través del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), esta enzima utiliza como cofactor a la vitamina tiamina; después se puede dividir el ciclo en dos partes, tricarbónica y dicarbónica.

**La parte tricarboxílica de este ciclo consiste de tres reacciones:**

- La conversión de oxaloacetato más acetil CoA en citrato a través de la enzima citrato sintasa.
- La isomerización reversible del citrato e isocitrato, catalizada por la enzima aconitasa.
- La oxidación de isocitrato a 2-oxoglutarato, catalizada por la isocitrato deshidrogenasa.

**La parte dicarboxílica del ciclo consta de cinco reacciones:**

- El 2-oxoglutarato es convertido en succinil CoA a través de una descarboxilación oxidativa por medio del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa.
- El succinil CoA es hidrolizado a succinato mediante una reacción catalizada por la succinil CoA sintetasa.
- El succinato es deshidrogenado a fumarato por la succinato deshidrogenasa.
- El fumarato es convertido a L-malato por medio de la enzima fumarasa.
- Finalmente, el oxaloacetato inicial es generado nuevamente por la malato deshidrogenasa a partir de malato.

Otra parte importante del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son las vías anapleróticas que restituyen moléculas intermediarias; algunas enzimas y cofactores importantes de estas vías son:

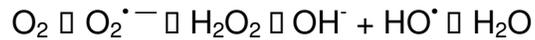
•La enzima málica, que cataliza la descarboxilación oxidativa del malato a piruvato. En rhizobia existen enzima málica dependiente de NAD y enzima dependiente de NADP, siendo esta última la de mayor actividad. El malato es suministrado por la planta y a baja cantidad, así es mayor el flujo de malato en el TCA favoreciendo la provisión de NADPH a la nitrogenasa y evitando la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). Cuando la cantidad de malato aumenta, el PHB se acumula y se inhibe la actividad del ciclo TCA (Dunn, 1998).

•La enzima piruvato carboxilasa (PC) convierte el piruvato a oxaloacetato por medio de una carboxilación dependiente de biotina, de modo que la

disponibilidad de esta vitamina es determinante para que la apoenzima sea activada. En *Rhizobium etli*, esta enzima es expresada constitutivamente (Dunn *et al.*, 1996 y 1997).

- Vitaminas solubles en agua como biotina, tiamina y riboflavina son importantes en promover el crecimiento de cepas de *Rhizobium*. En el caso de *R. etli* como se mencionó líneas arriba, la importancia de las vitaminas biotina y tiamina radica en que son cofactores de las enzimas PC y PDH. En *Rhizobium meliloti*, que nodula raíces de alfalfa (*Medicago sativa*) la presencia de estas vitaminas ya sea sintetizadas por la bacteria o tomadas del medio promueven la colonización del hospedero; la biotina por ejemplo, es cofactor de varias enzimas que intervienen en el metabolismo del carbono. El efecto de otras vitaminas como tiamina y riboflavina puede relacionarse con la conversión de piruvato y CoA en acetil CoA y CO<sub>2</sub>, utilizándolos para la formación de membrana en bacterias que se están dividiendo (Streit *et al.*, 1996).



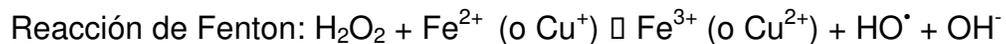


Estas especies generalmente están en balance con moléculas antioxidantes, de modo que no resultan letales para las células. El estrés oxidativo ocurre cuando este balance se rompe y los niveles de ERO exceden la capacidad antioxidante de las células, causando daños en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y membranas (Scandalios, 2002; Woodmansee e Imlay, 2002).

Las ERO pueden originarse como parte del metabolismo celular o bien por factores ambientales:

- El  $\text{O}_2$  se difunde dentro de las células y ahí es convertido a  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por acción de flavoproteínas (Storz e Imlay, 1999).

- El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  no es altamente reactivo por sí mismo pero actúa sobre los grupos hierro-azufre de las proteínas, oxidándolas y liberando hierro; ese hierro férrico libre favorece la reacción de Fenton que genera radicales hidroxilo causantes de daño a macromoléculas biológicas. Luego, el superóxido puede ser convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (Sod) (Scandalios, 2002; Storz e Imlay, 1999; Woodmansee e Imlay, 2002).



- El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede oxidar residuos cys y tioles en proteínas, previniendo la función catalítica de las enzimas. El peróxido de hidrógeno, puede ser convertido a  $\text{H}_2\text{O}$  por acción de la catalasa o bien puede reaccionar con iones metálicos y formar el radical hidroxilo (Scandalios, 2002).

- El  $\text{HO}^{\cdot}$  es altamente reactivo y dañino para la célula porque actúa directamente sobre las moléculas biológicas. Inicia la oxidación de ácidos grasos

en lípidos de membrana en un proceso conocido como peroxidación lipídica. También daña ácidos nucleicos rompiendo la doble cadena y cambiando la estructura de las bases. Este radical hidroxilo puede ser producido por la reacción de Fenton (Scandalios, 2002; Woodmansee e Imlay, 2002).

•El  $\text{OONO}^\cdot$ , peroxinitrito, es considerado también como especie reactiva del oxígeno; se forma cuando el superóxido se combina con el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ). El peroxinitrito ocasiona peroxidación lipídica y daños a proteínas de membrana (Storz e Imlay, 1999).

Un ejemplo concreto del daño que pueden causar algunos ERO en la célula, es el caso de la enzima dihidroxiácido deshidratasa de *Escherichia coli* (que interviene en la biosíntesis de aminoácidos). Esta enzima tiene un grupo [4Fe-4S] que es esencial para su actividad catalítica y se inactiva en presencia de  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  hiperbárico,  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a la desintegración del grupo activo por pérdida de un átomo de hierro. Aunque el daño es por estrés oxidativo, es reversible por la síntesis de una nueva apoproteína (<sup>a</sup>Flint *et al.*, 1993 y <sup>b</sup>Flint *et al.*, 1993).

Entonces, uno de los principales blancos del estrés oxidativo son los grupos Fe-S de las proteínas. Estos grupos son muy importantes para la actividad catalítica y no sirven únicamente para la transferencia o almacén de electrones, también pueden servir como sensores de moléculas reductoras u oxidantes. La oxidación de estos grupos puede tener como consecuencia el desensamblaje total del grupo, lo que es generalmente irreversible; o bien la oxidación de un solo electrón, la cual es reparada rápidamente (<sup>a</sup>Flint *et al.*, 1993 y <sup>b</sup>Flint *et al.*, 1993).

Algunos ejemplos de proteínas que contienen un grupo Fe-S y que son sensibles a estrés oxidativo son: FNR (regulador global en *E. coli*), aconitasas, fosforibosilpirofosfato amidotransferasa de *Bacillus subtilis*, nitrogenasa,

endonucleasa III de *E. coli* y SoxR de *E. coli* entre algunas otras (Beinert y Kiley, 1999).

Como defensa ante estrés oxidativo, la célula expresa enzimas de transcripción y proteínas estructurales que detoxifican y reparan los daños. En *Pseudomonas aeruginosa*, entre los mecanismos de defensa contra ERO están: Fe-Sod, Mn-Sod, catalasas (KatA, KatB y KatC), cuatro alquilhidroperóxido reductasas (AhpA, AhpB, AhpCF y Ohr) y OxyR (Ochsner *et al.*, 2000).

En *E. coli* existen dos sistemas reguladores que controlan familias de operones como respuesta a estrés oxidativo, el sistema SoxRS y el sistema OxyR; además hay metabolitos como NADPH, NADH, tioredoxina y glutatión los cuáles remueven especies reactivas del oxígeno:

•**SoxRS.** *soxR* y *soxS* son genes traslapados que codifican a proteínas de unión a ADN. Bajo estimulación, SoxR cambia su conformación y es capaz de activar a *soxS*. La proteína SoxS regula la expresión de varios genes. Sus genes blanco son alrededor de diez, aquí algunos ejemplos: *sodA*, codifica para la proteína Mn-Sod que brinda protección al ADN contra  $H_2O_2$ ; *nfo*, codifica para la endonucleasa IV que se encarga de reparar ADN; *zwf*, codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa la cual aumenta el nivel de NADPH; *fumC*, codifica para la fumarasa; *acnA*, codifica para una aconitasa dependiente de  $Fe_4-S_4$ ; *fpr*, codifica para una NADPH ferredoxina oxidoreductasa que mantiene los grupos Fe-S en estado reducido y por último SoxS regula negativamente su propia expresión (Lynch y Lin, 1996).

•**OxyR.** Esta proteína es un tetrámero de la familia de LysR (activadores transcripcionales) y también es responsable de la represión de varios otros genes. Puede existir en estado reducido u oxidado; la oxidación involucra residuos de cisteína y es solo en este estado cuando activa la transcripción. Al inducir con  $H_2O_2$  (y  $O_2$ ) se activan alrededor de 30 proteínas, 12 de ellas dentro de los 10

minutos siguientes a la exposición y las otras 18 entre 10 y 30 minutos luego del peróxido. OxyR regula 9 de las proteínas tempranas. Los genes blanco de OxyR son: *katG*, codifica para una hidroxiperoxidasa; *ahpCF*, codifica a una alquilhidroperóxido reductasa; *oxyS*, que codifica un ARN regulador; *gorA*, codifica a una glutatión reductasa; *grxA*, codifica a una glutaredoxina; *trxC*, codifica a una tioredoxina; *fur*, codifica al represor FUR relacionado con la captura de Fe y *dsbG* que codifica para una chaperona disulfuro-isomerasa (Lynch y Lin, 1996; Scandalios, 2002). Recientemente se ha identificado por primera vez en un miembro de la familia Rhizobiaceae, *Rhizobium etli*, al regulador transcripcional OxyR (Vargas *et al.*, 2003).

•**Glutatión.** Como ejemplo de un mecanismo de defensa no enzimático contra ERO está el tripéptido glutatión ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina o  $\gamma$ Glu-Cys-Gly). Este metabolito es el principal tiol en la mayoría de animales, plantas y procariontes (Meister y Anderson, 1983). En plantas, está relacionado con el metabolismo del azufre y como defensa ante xenobióticos, metales pesados y otros contaminantes. Tanto en plantas como en animales, es un importante antioxidante y amortiguador redox (Noctor y Foyer, 1998).

En todos los organismos la vía de síntesis de glutatión probablemente sea la misma e involucre un par de reacciones dependientes de ATP. En la primera reacción se forma  $\gamma$ -glutamilcisteinil ( $\gamma$ EC) a partir de Glu y Cys por la  $\gamma$ -glutamilcisteinil sintetasa y en la segunda reacción Gly es adicionado al sitio C-terminal de  $\gamma$ EC por la GSH sintetasa (Matamoros *et al.*, 1999).

En bacterias como *Escherichia coli*, el glutatión llega a acumularse en concentraciones mayores a 10 mM lo que sugiere que debe tener una función fisiológica importante. Se piensa que proporciona protección contra compuestos tóxicos como el metilglioxal. El glutatión es requerido por las enzimas glioxalasa I y II que destoxifican el metilglioxal a D-lactato a través de la formación de dos metabolitos, hemitiolacetal y S-lactoilglutatión; además este último metabolito

activa los canales de potasio KefB y KefC en *E. coli*, el  $K^+$  sale a través de estos canales disminuyendo el pH intracelular y esta acidificación protege a la célula contra metilglioxal. En ausencia de glutatión, las células pierden viabilidad posiblemente porque el metilglioxal ataca algunas enzimas. *E. coli*, puede contender mejor contra el metilglioxal cuando hay glutatión y acidificación del medio (Ferguson y Booth, 1998).

El glutatión es un grupo tiol libre que ayuda a mantener grupos tioles en proteínas (o las cisteínas de grupos tioles en proteínas) en estado reducido. Si dos grupos tioles se oxidan, pueden ser reducidos no enzimáticamente por el glutatión (figura 5).

También el glutatión puede llevar a cabo la reducción de peróxidos; por ejemplo, en células eucariontes como los eritrocitos, la glutatión peroxidasa reduce  $H_2O_2$  a agua según la siguiente reacción:  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$  (Mathews *et al.*, 1999).

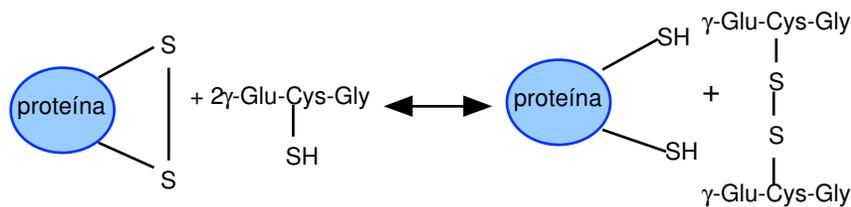


Figura 5.-Mecanismo de acción por medio del cual el glutatión protege a las proteínas de daño oxidativo (Mathews *et al.*, 1999).



### 3.-ANTECEDENTES

Dada la importancia agronómica de las rhizobia, es necesario conocer cómo los diferentes tipos de estrés afectan su sobrevivencia y cuáles son los mecanismos de defensa con los que estos organismos cuentan para protegerse cuando las condiciones ambientales son adversas.

De particular interés ha sido el efecto que tiene el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobre distintas rhizobia, por ejemplo: se ha observado que *Rhizobium leguminosarum* tiene respuesta adaptativa a estrés oxidativo por  $H_2O_2$  a través de la inducción de actividades catalasa y esto también le confiere protección contra otro tipo de estrés como es el osmótico (Crockford *et al.*, 1995 y 1996). *Sinorhizobium meliloti* tiene a las catalasas KatA y KatC, además de la catalasa-peroxidasa KatB (Herouart *et al.*, 1996). *Rhizobium etli* CE3 tiene al gen *katG* que codifica para una catalasa-peroxidasa y al activador transcripcional OxyR que induce la transcripción de genes relacionados con la defensa ante estrés oxidativo; KatG es necesaria en *R. etli* para detoxificar  $H_2O_2$  ya que sin esta enzima la viabilidad de la bacteria es afectada incluso en ausencia de peróxido exógeno (Vargas *et al.*, 2003).

En condiciones naturales, el metabolismo del  $O_2$  produce especies reactivas que son potencialmente dañinas para *Rhizobium* tanto en vida libre como en simbiosis; por ejemplo: se sabe que durante la senescencia de nódulos en leguminosas, hay flujo de oxígeno hacia el tejido central ocasionando acumulación de peróxido y fierro; sin embargo, el nódulo contiene enzimas y metabolitos como glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH) capaces de contender contra ello (Evans *et al.*, 1999).

En condiciones de laboratorio, se puede producir estrés oxidativo al aumentar la aeración (agitación) de un cultivo bacteriano, por ejemplo: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es utilizado industrialmente en la

fermentación de lácteos; esta bacteria es anaerobia pero tolera la presencia de oxígeno a ciertos niveles. En condiciones extremas de agitación se produce estrés oxidativo al tratar de eliminar el  $O_2$  a  $H_2O_2$ , reduciéndolo a través de la NADH oxidasa y la generación de  $H_2O_2$  obliga a la célula a entrar en fase estacionaria (Marty-Teysset *et al.*, 2000).

Las bacterias pueden ser resistentes a estrés oxidativo y otros tipos de estrés si antes han estado expuestas a un ambiente con nutrientes limitados, ya que presentan mecanismos que les permiten sobrevivir a tal situación hasta que los nutrientes estén nuevamente disponibles; por ejemplo: células en fase estacionaria de *Rhizobium leguminosarum* provenientes de cultivos con limitación de carbono, fueron más resistentes a distintos tipos de estrés como son: oxidativo, osmótico, ácido y calorífico (Thorne y Williams, 1997).

Por otra parte, en el laboratorio de ingeniería metabólica del CIFN, se ha estudiado sobre el metabolismo tipo fermentativo que manifiesta *Rhizobium etli* CE3 cuando es cultivado repetidamente en medio con nutrientes limitados. Este tipo de metabolismo se caracteriza por la excreción de ácidos orgánicos y aminoácidos, acumulación intracelular de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, agregación de las células en el medio y finalmente la disminución del crecimiento bacteriano luego de varios subcultivos. Los cambios mencionados se deben a que la síntesis de las vitaminas biotina y tiamina se encuentra limitada en *R. etli* (Encarnación *et al.*, 1995 y datos no publicados de Taboada, H., CIFN). Tal limitación altera la regulación y flujo de carbono en la bacteria porque esas vitaminas son cofactores de enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El metabolismo tipo fermentativo puede prevenirse con la adición al medio de cultivo de biotina o tiamina, o bien manteniendo una concentración relativamente alta de oxígeno pero sin propiciar estrés oxidativo (Encarnación *et al.*, 1995).

El cultivo de *Rhizobium etli* en condiciones de limitación de nutrientes podría prevenir un daño a la bacteria por otro tipo de estrés como es el oxidativo.

En este trabajo se utilizó el cultivo de *R. etli* en medio mínimo como punto de partida para exponerlo a alta concentración de oxígeno (aeración) y a peróxido de hidrógeno, además de ver el efecto que ello tuvo sobre algunas actividades enzimáticas de la bacteria.

## 4.-OBJETIVOS

### 4.1.-Objetivo general.

- Determinar el efecto que tiene un ambiente de estrés oxidativo sobre algunos procesos metabólicos fundamentales de *Rhizobium etli* CE3.

### 4.2.-Objetivos específicos.

- Diseñar condiciones de cultivo con tiempos mínimos de incubación, en las cuales *Rhizobium etli* CE3 esté expuesto a estrés oxidativo.

- Determinar el efecto que tiene el estrés oxidativo ocasionado por las condiciones de cultivo diseñadas, sobre el crecimiento de *Rhizobium etli* CE3.

- Establecer cómo es la respuesta de *Rhizobium etli* CE3 cuando es cultivado en presencia de un agente oxidante como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- Determinar el efecto que tienen las vitaminas biotina y tiamina sobre *Rhizobium etli* CE3 cuando es expuesto a estrés oxidativo debido a las condiciones de cultivo diseñadas y/o en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- Determinar el efecto que tiene el estrés oxidativo dado por las condiciones de cultivo y por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3, por ser esta una enzima susceptible a oxidación.

- Determinar el efecto que tiene el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad de la enzima piruvato carboxilasa, enzima que requiere biotina como cofactor y cuya actividad es fundamental en el metabolismo de carbono en *Rhizobium etli* CE3.



## 5.-MATERIAL Y METODOS

### 5.1.-Cepa de estudio.

Segovia *et al.*, 1993.

*Rhizobium etli* biovar phaseoli CFN42 ha sido designado como la cepa tipo para la especie. Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, que forma nódulos fijadores de nitrógeno con *Phaseolus vulgaris* exclusivamente. Al cultivarla en el laboratorio forma colonias circulares, convexas, opacas y de 2 a 4 mm de diámetro cuando crece de 2 a 4 días en medio agar-PY (peptona-extracto de levadura). Son colonias translúcidas y de apariencia húmeda cuando crecen en medio YM (extracto de levadura-manitol). Son incapaces de crecer en medio LB (Luria-Bertani). Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, aunque puede crecer hasta 35 °C. Todas las cepas son resistentes a ácido nalidíxico y sensibles a carbenicilina, espectinomicina, cloranfenicol y rifampicina. Una cepa derivada de la CFN42 que es la CE3 es además resistente a estreptomycin y fue la que se utilizó en este trabajo.

### 5.2.-Medios de cultivo.

Modificado de Encarnación *et al.*, 1995.

#### •MEDIO PY (EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA).

Extracto de levadura 3 g, peptona de caseína 5 g, agar (si se requería sólido) 15 g. Al momento de usar, se adicionaron CaCl<sub>2</sub> 7 mM y los antibióticos Nal y Sm.

#### •MEDIO LB (LURIA-BERTANI).

Extracto de levadura 5 g, peptona de caseína 10 g, NaCl 10 g, agar (cuando se requería sólido) 15 g. El pH se ajustó a 7.5.

#### •MEDIO MM (MEDIO MINIMO, SUCCINATO-AMONIO).

Ac. succínico 10 mM o 30 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.26 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.83 mM, NH<sub>4</sub>Cl 10 mM. El pH se ajustó a 6.8. Al momento de usar se adicionó CaCl<sub>2</sub> 0.75 mM (esterilizado en autoclave) y FeCl<sub>3</sub> 18.5 µM (esterilizado por filtración, Millex-GS 0.22 µM).

Además, el medio mínimo podía contener: biotina 4  $\mu\text{M}$ , tiamina 60  $\mu\text{M}$ , glutatión 0.2 mM (esterilizados por filtración) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.12 mM, adicionados al momento de usar.

•ANTIBIOTICOS.

Acido nalidíxico (Nal) 0.02 mg/ml de medio, estreptomicina (Sm) 0.2 mg/ml de medio; esterilizados por filtración.

### **5.3.-Controles de esterilidad.**

Para cada experimento se realizaron controles de esterilidad. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del medio de cultivo y se aplicaron sobre medio LB sólido en cajas de Petri, incubando a 30  $^{\circ}\text{C}$  ya que *R. etli* no crece en este medio. Tambien se realizaron controles de esterilidad en cajas de Petri con medio PY y varios antibióticos distintos a Nal y Sm.

### **5.4.-Subcultivos en medio mínimo.**

Encarnación *et al.*, 1995.

1.-PRECULTIVO. Antes de cualquier experimento en medio mínimo, la cepa CE3 de *Rhizobium etli* se precultivó en 100 ml de medio líquido PY (peptona-extracto de levadura) en matraces Erlenmeyer de vidrio con capacidad de 250 ml. El medio fue suplementado con  $\text{CaCl}_2$  al momento de usar. Este cultivo previo fue de 16 horas.

2.-OBTENCION DE CELULAS. Para recuperar las células, el precultivo fue centrifugado en botellitas Oak Ridge de 50 ml o en botellas de plástico de 250 ml, durante 8 min a 10,000 rpm (rotor de ángulo fijo, E-centrifuge J2-21M, Beckman) y a 4  $^{\circ}\text{C}$ ; desechando el sobrenadante y conservando la pastilla.

3.-LAVADO. Para lavar la pastilla, se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (3/4 partes de la botella), resuspendiendo las células por medio de agitación o con ayuda de un

vórtex. Después las células fueron centrifugadas 8 min a 10,000 rpm, a 4 °C. Luego de centrifugar, se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió y fue lavada nuevamente como ya se indicó.

4.-INOCULACION. Al final de la última centrifugación, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en agua (1/6 parte de la botella). Este concentrado se ocupó para inocular a  $\lambda_{540} = 0.05$  DO (espectrofotómetro DU-7500, Beckman).

5.-INCUBACION. Ya inoculado el medio mínimo a 0.05 DO (densidad óptica) se incubaron los matraces (incubadora-G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.) bajo las condiciones requeridas de acuerdo con el experimento (concentración de medio mínimo, suplementos y revoluciones por minuto en la agitadora).

#### **5.5.-Determinación de oxígeno.**

Para determinar la concentración de oxígeno presente en el medio de cultivo de *Rhizobium etli* CE3 en distintas condiciones de agitación (200 y 300 rpm), se utilizó un electrodo tipo Clark (modelo 5300, YSI) y la saturación de O<sub>2</sub> fue expresada como porcentaje.

#### **5.6.-Determinación de proteína.**

Modificado de Lowry *et al.*, 1951.

Para obtener una representación gráfica del crecimiento de *R. etli* en cada experimento, se tomaron muestras de 1 ml a distintos tiempos en las diferentes condiciones de cultivo.

#### **•OBTENCION DE MUESTRA.**

En cada experimento, 1 ml por condición de crecimiento (o más, dependiendo de la concentración del cultivo) fue centrifugado a 14,000 rpm durante 5 min y a 4 °C

(rotor de ángulo fijo, centrífuga GS-15R, Beckman). Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de ácido tricloroacético 5% (TCA), resuspendiendo la pastilla. Las muestras fueron almacenadas de este modo a 4 °C (no más de tres días) hasta el momento de su determinación.

#### •CUANTIFICACION DE PROTEINA.

- 1.- Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 14,000 rpm y 4 °C.
- 2.-El sobrenadante fue retirado y se adicionaron 100 µl de NaOH 0.4 N resuspendiendo la pastilla con ayuda de un vórtex.
- 3.-Si la muestra provenía de un cultivo no saturado, a los 100 µl se adicionó un volumen igual de H<sub>2</sub>O. Si la muestra provenía de un cultivo saturado, se tomaron 10, 20 o 50 µl y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo y agua hasta completar 200 µl de volumen. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 min.
- 4.-Se agregó 1 ml de solución ABC, resuspendiendo con vórtex y dejando los tubos durante 10 min a temperatura ambiente.
- 5.-Se adicionaron 100 µl de reactivo de fenol Folín-Ciocalteu 33%, resuspendiendo con vórtex. Dejando las muestras a temperatura ambiente durante 30 min (las muestras al principio incoloras, cambian a color azul).
- 6.-Transcurrido este tiempo, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a  $\lambda_{625}$  luz visible, en celdas con capacidad para 1 ml y comparándolas con la lectura de un estándar de albúmina (40 µg / ml).

#### •REACTIVOS

##### SOLUCION ABC.

Se compone de tres soluciones (98%-1%-1%) previamente preparadas, y mezcladas

al momento de usar. Solución A: NaOH 100 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 69 mM; solución B: KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>•4H<sub>2</sub>O 70 mM; solución C: CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 56 mM.

### **5.7.-Detección de actividad aconitasa.**

Modificado de Dingman y Sonenshein, 1987.

#### **•OBTENCION DE MUESTRA.**

1.-Se centrifugó todo el cultivo (150 ml) durante 7 min a 10,000 rpm y 4 °C (rotor de ángulo fijo, E-centrifuge J2-21M, Beckman). La pastilla fue resuspendida en 500 µl de *buffer* Tris base-MgCl<sub>2</sub> (4 °C) y transferida a un tubo eppendorf a 4 °C.

2.-Una vez en el eppendorf, la pastilla fue centrifugada (rotor de ángulo fijo, centrífuga GS-15R, Beckman) 30 segundos a 14,000 rpm y 4 °C; se desechó el sobrenadante y se agregaron nuevamente 500 µl de *buffer* Tris base-MgCl<sub>2</sub>.

3.-Las muestras fueron sonicadas durante 10 segundos a 12 µm de amplitud (Soniprep 150, MSE Dalon Scientific Ltd).

4.-Una vez sonicadas las muestras, se centrifugaron durante 5 min a 14,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf a 4 °C.

#### **•DETECCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

5.-Como sustrato de la enzima se utilizó *buffer* Tris base-MgCl<sub>2</sub> (a temperatura ambiente) con isocitrato a una concentración final de 20 mM. La cantidad de muestra a utilizar fue variable dependiendo de las condiciones del cultivo. Los blancos utilizados fueron *buffer* sólo con isocitrato y *buffer* sólo con lisado celular. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro (DU-7500, Beckman) a λ<sub>240</sub> de luz ultravioleta en celdas de cuarzo con capacidad para 1 ml. El tiempo de lectura total fue de 60 segundos, con intervalos de lectura de 10 segundos.

6.-Para calcular la actividad enzimática. El coeficiente de extinción del isocitrato es de  $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una Unidad (U) de actividad representa  $1 \mu\text{M}$  de cis-aconitato /  $\text{min}^{-1}$ .

#### •REACTIVOS

*BUFFER* Tris base- $\text{MgCl}_2$ .

Se preparó con 9 ml de Tris base 50 mM, pH 8.0 (ajustado con HCl) + 1 ml de  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Se prepararon por separado y se mezclaron al momento de usar. Se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **5.8.-Detección de actividad piruvato carboxilasa (PC).**

Dunn *et al.*, 2001.

#### •OBTENCION DE MUESTRA.

1.- Se centrifugó el cultivo completo (150 ml) durante 10 min a 10,000 rpm y a  $4^\circ\text{C}$  (rotor de ángulo fijo, E-centrifuge J2-21M, Beckman).

2.-El sobrenadante fue desechado, la pastilla resuspendida en 1 ml de *buffer* de lisis ( $4^\circ\text{C}$ ) y transferida a un tubo eppendorf.

3.-La pastilla fue centrifugada 3 min a 14,000 rpm y  $4^\circ\text{C}$  (rotor de ángulo fijo, centrífuga GS-15R, Beckman). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en  $400 \mu\text{l}$  de *buffer* de lisis ( $4^\circ\text{C}$ ).

4.-Las muestras fueron sonicadas tres veces durante 10 segundos (dejando la muestra 5 min en hielo entre cada vez) a  $12 \mu\text{M}$  de amplitud (Soniprep 150, MSE Dalon Scientific London).

5.-Una vez sonicadas las muestras, fueron centrifugadas 5 min a 14,000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se recuperó en tubos eppendorf.

#### •DETECCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

6.-Para medir actividad, se mezclaron  $36 \mu\text{l}$  del lisado celular +  $139.32 \mu\text{l}$  de mezcla de reacción +  $4.68 \mu\text{l}$  de piruvato. De esta mezcla se transfirieron  $50 \mu\text{l}$  a

un tubo eppendorf y se agregaron 12 µl de HCl 6 N (resuspendiendo suavemente con ayuda de un vórtex) para detener la reacción al tiempo cero ( $t_0$ ). Las muestras se dejaron incubando a 30 °C durante 10 min y se volvieron a resuspender 50 µl en HCl para detener la reacción transcurrido ese tiempo ( $t_{10}$ ).

7.-Las muestras fueron incubadas a 80 °C hasta evaporar. Enseguida, se adicionaron 500 µl de H<sub>2</sub>O para disolver el precipitado y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 7 min. Una vez centrifugadas, se tomaron 450 µl de sobrenadante y se transfirieron a viales, adicionando 5 ml de líquido de centelleo.

8.-Para calcular la actividad enzimática, se contaron las cuentas por minuto (CPM) en un contador de centelleo para <sup>14</sup>C (Beckman, LS 6000SC).

#### •REACTIVOS

##### PARA LISAR CELULAS:

Buffer de lisis: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.6 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.3 mM, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 5 mM, EDTA 10 mM, glicerol 7.4%. El pH se ajustó a 7.2 con los fosfatos.

##### SOLUCIONES PARA EL ENSAYO:

Tris 1 M, pH 8.0 (ajustado con HCl); MgCl<sub>2</sub> 250 mM; BSA (albúmina sérica de bovino) 10 mg / ml; DTT 0.1 M; KCl 2 M; ATP 50 mM en Tris 50 mM pH 7.0; NaHCO<sub>3</sub> 736.5 mM; NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> 50 mM con radioactividad específica de 0.3 µCi / µM NaHCO<sub>3</sub>; acetil CoA 25 mM en Tris 50 mM pH 7.0; piruvato 100 mM en Tris 50 mM pH 7.0; HCl 6 N.

•PARA MEDIR ACTIVIDAD: Por cada reacción se requirió de:

Reactivos	Mezcla de reacción (µl)	Concentración final
Tris pH 8.0	2.5	1 M
MgCl <sub>2</sub>	1.5	0.25 M
H <sub>2</sub> O	19.85	-
BSA	2.5	10 mg/ml
DTT	0.5	0.1 M
KCl	0.5	2 M
ATP	6.6	50 mM
NaHCO <sub>3</sub>	3.375	736.5 mM
NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>	0.375	50 mM
AcCoA	1.00	25 mM
Volumen total	38.7	-



## 6.-RESULTADOS

### 6.1.-Subcultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo con diferentes condiciones de oxidación.

Como se mencionó en la sección de antecedentes, *Rhizobium etli* CE3 es una bacteria aeróbica que puede cambiar a metabolismo tipo fermentativo cuando es cultivada repetidamente en medio mínimo. Una de las características que presenta la bacteria cuando ha cambiado de metabolismo, es que deja de crecer luego de tres subcultivos (Encarnación *et al.*, 1995). Este decremento en el crecimiento bacteriano se ilustra con la figura 6 donde se reprodujeron los resultados arriba mencionados.

En la figura 6 se muestra la representación gráfica del crecimiento de *R. etli* obtenido en tres subcultivos, con duración de 24 h cada uno, en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm y suplementando el medio con biotina 4  $\mu$ M y tiamina 60  $\mu$ M. Puede observarse que durante el primer subcultivo, la cepa creció con o sin suplementos (figura 6, gráfica A); en el segundo subcultivo, el crecimiento de la cepa comenzó a decaer (figura 6, gráfica B) y en el tercer subcultivo, la cepa dejó de crecer alcanzando solamente 18  $\mu$ g de proteína/ml de cultivo, contra los 115  $\mu$ g obtenidos con los suplementos biotina y tiamina (figura 6, gráfica C).

Para explicar los resultados anteriores se ha propuesto que la disminución del crecimiento de *R.etli* cuando es subcultivado, es resultado de un proceso oxidativo que afecta principalmente la síntesis de las vitaminas biotina y tiamina; ya que cuando estas vitaminas son adicionadas al medio, el crecimiento de las células es continuo durante varios subcultivos.

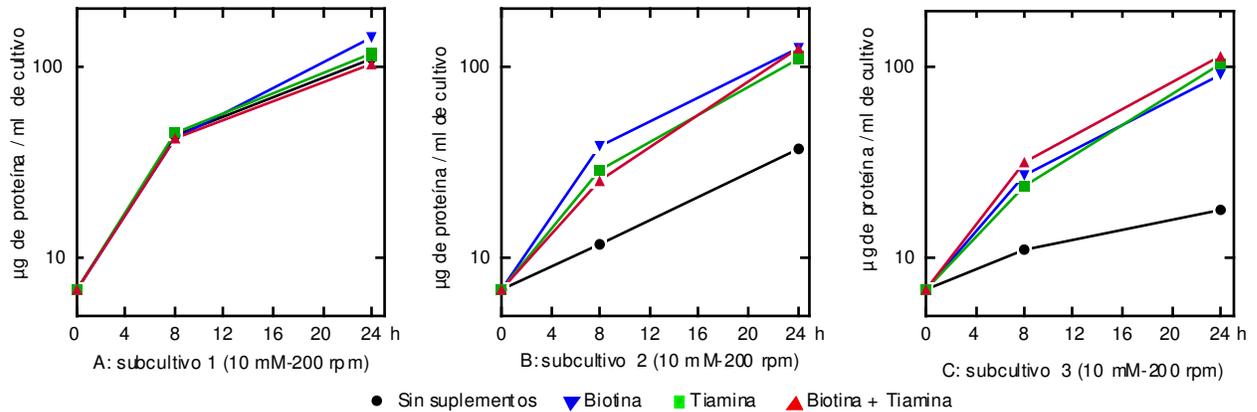


Figura 6: subcultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm.

Para aumentar la oxidación durante los subcultivos, se incrementaron la concentración de succinato (sustrato a oxidar) de 10 mM a 30 mM y la agitación de los cultivos (oxigenación) de 200 rpm a 300 rpm. En la figura 7, la cepa de *R. etli* solo creció durante las primeras 8 h de cultivo y dejó de crecer al segundo subcultivo aun en presencia de las vitaminas biotina y tiamina, por efecto de la fuerte oxidación.

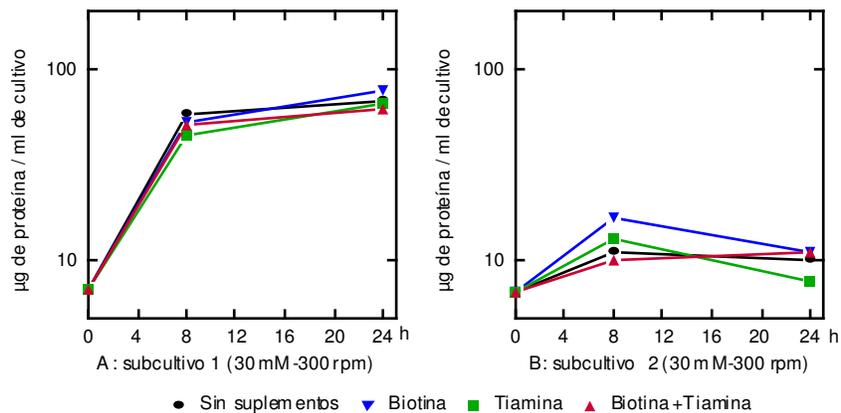


Figura 7: subcultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm.

Sin embargo, como se observa en la figura 8 (gráfica proporcionada por Taboada, H., CIFN) al incubar a *R. etli* en un primer subcultivo en medio suplementado con glutatión 0.2 mM y luego en un segundo subcultivo con glutatión y biotina 0.2 mM el resultado fue que el crecimiento se mantuvo; de modo

que en tales condiciones fueron necesarios biotina para suplir la deficiencia de esta en la bacteria y glutatión como amortiguador redox contra el estrés oxidativo generado en los subcultivos.

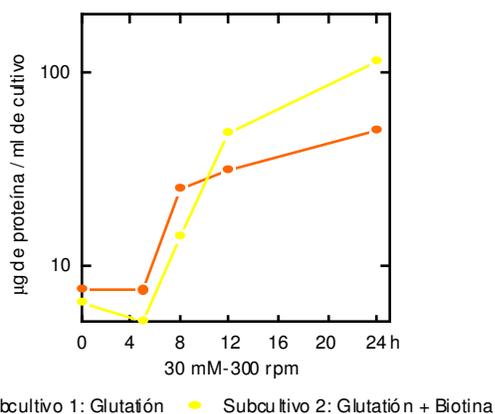


Figura 8: crecimiento de *Rhizobium etli* con glutatión.

En la figura 9 se muestra como fue la concentración de oxígeno en *R. etli* al ser cultivado en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm y en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm. A diferencia de la disminución de oxígeno que se observó en el cultivo con agitación de 200 rpm; en las nuevas condiciones con agitación de 300 rpm, la concentración de oxígeno disminuyó ligeramente y al haber saturación de O<sub>2</sub> era de esperar que los procesos oxidativos fueran mayores. El porcentaje de oxígeno fue determinado a través de un electrodo tipo Clark.

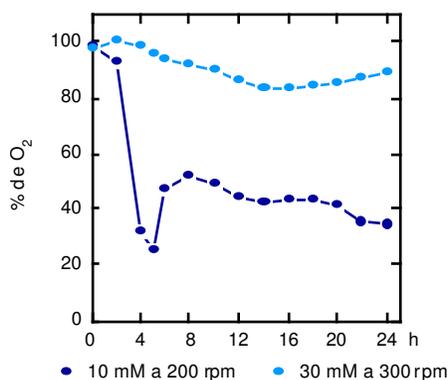


Figura 9: cuantificación de O<sub>2</sub> en cultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo.

Es importante mencionar que la cepa  $katG^-$  de *Rhizobium etli* CE3, que tiene una interrupción (debida a la inserción de un transposón) en el gen que codifica para una catalasa-peroxidasa, presenta una fase de crecimiento retardado durante las primeras 4 h de cultivo en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm, para luego crecer. Esto significa que efectivamente, estas condiciones de incubación fueron más oxidantes por la formación de especies reactivas del oxígeno (como peróxido de hidrógeno) y una cepa como la  $katG^-$  que no tiene la capacidad para detoxificar los agentes oxidantes que se forman en tales condiciones no pudo crecer óptimamente durante las primeras horas de incubación (datos no publicados de Taboada, H., CIFN). Lo anterior se muestra en la figura 10.

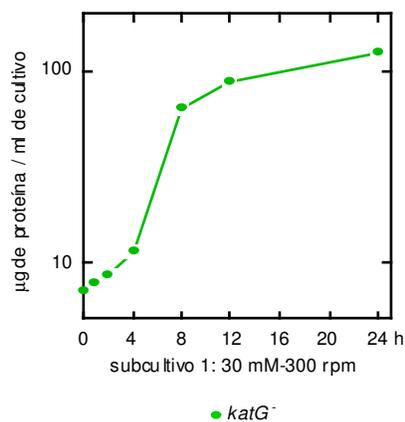


Figura 10: crecimiento de la cepa  $katG^-$  de *Rhizobium etli*.

Con objeto de tener condiciones de cultivo en que los procesos de oxidación fueran mayores pero donde aun las vitaminas lograran restituir el crecimiento bacteriano, *R. etli* CE3 fue cultivado en medio mínimo con succinato 30 mM y 300 rpm durante un primer subcultivo y posteriormente, en un segundo subcultivo con succinato 10 mM a 200 rpm para disminuir la oxidación; en este caso, las vitaminas lograron restaurar parcialmente el crecimiento de la bacteria. Cuando se hizo un segundo subcultivo en medio rico PY, incluso a 300 rpm, se logró un mayor crecimiento de la cepa. Figura 11.

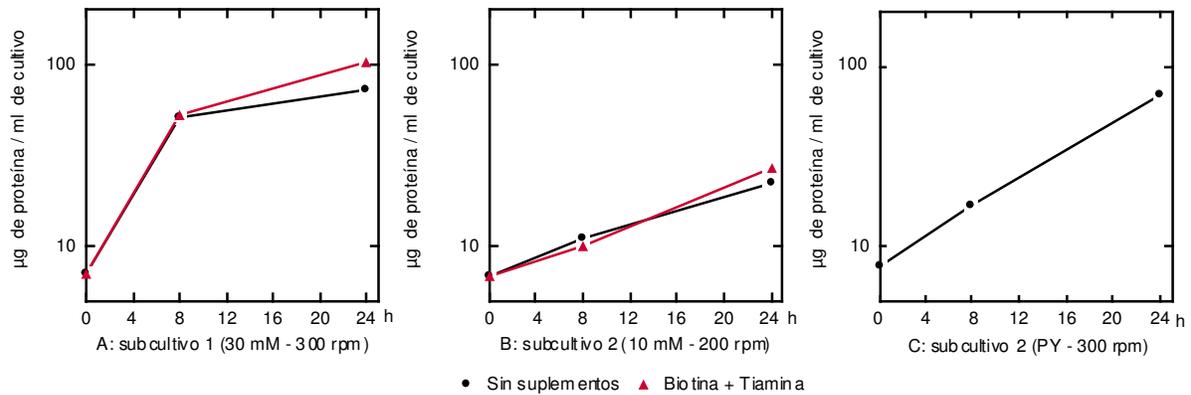


Figura 11: subcultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm y 10 mM a 200 rpm / PY a 300 rpm.

Para lograr un mejor efecto sobre la restitución del crecimiento en *R. etli* por acción de las vitaminas biotina y tiamina, se realizó un primer subcultivo con duración de 4 h en condiciones de fuerte oxidación; es decir, en medio mínimo con succinato 30 mM y agitación de 300 rpm, después se hizo un segundo subcultivo de 8 h en condiciones de menor oxidación con succinato 10 mM a 200 rpm; y por último, un tercer subcultivo con las mismas condiciones que el anterior pero con duración de 12 h. Como se observa en la figura 12, en el tercer subcultivo las vitaminas protegieron el crecimiento bacteriano de las condiciones oxidantes del cultivo. En esta forma se logró que en solo 24 h se tuvieran condiciones óptimas de oxidación así como protección celular debida a las vitaminas.

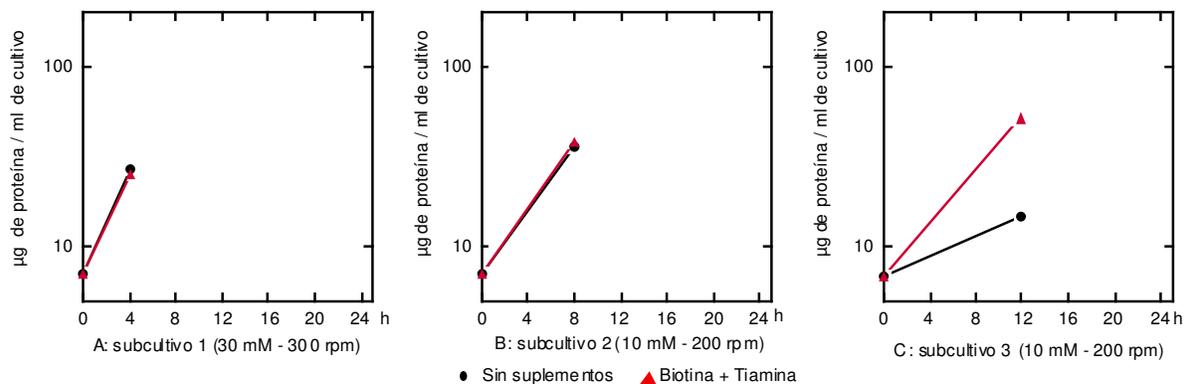


Figura 12: subcultivos de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm (4 h) y 10 mM a 200 rpm (8 y 12 h).

## 6.2.-Actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 en subcultivos de medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm (4 h) y 10 mM a 200 rpm (8 y 12 h).

Dado que en el sistema de subcultivos cortos (figura 12) hay mayor oxidación, se midió la actividad enzimática de la aconitasa por ser susceptible a daño oxidativo y porque para compensar tal efecto, esta enzima aumenta su expresión. La actividad enzimática fue medida en el precultivo de PY y al final de cada subcultivo en medio mínimo. En la figura 13 se observa que tanto en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm (subcultivo 1) o en medio con succinato 10 mM a 200 rpm (subcultivos 2 y 3) la actividad de la aconitasa fue mayor en medio sin vitaminas que con estas, lo que indica que la biotina y tiamina protegieron contra el daño oxidativo.

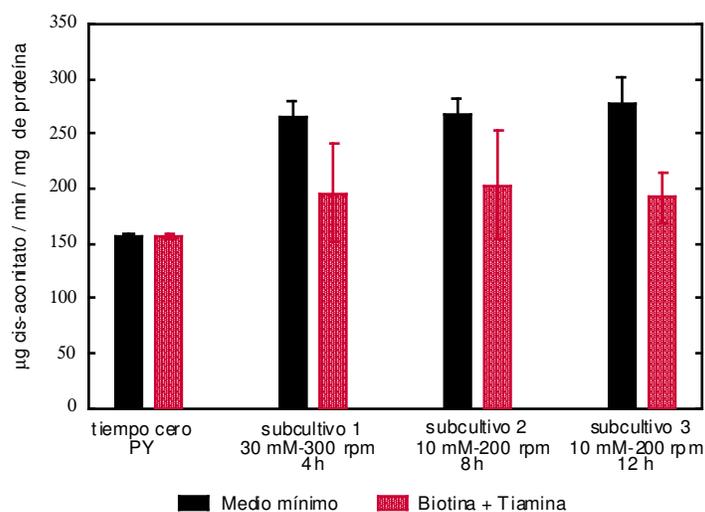


Figura 13: actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 en medio mínimo.

## 6.3.-Crecimiento de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para determinar en forma directa el efecto de un agente oxidante sobre el crecimiento de *Rhizobium etli* CE3 y sobre la actividad de la enzima aconitasa en medio mínimo con y sin vitaminas, se adicionó al medio de cultivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*R. etli* se cultivó en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm durante 4 h, después se realizó un segundo subcultivo en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm durante 12 h para dar seguimiento prolongado al cultivo. A las 5 h del segundo subcultivo, se adicionó  $H_2O_2$  1.12 mM dejándolo en el medio por 1 h y luego las células fueron transferidas a medio fresco sin peróxido.

Como se puede ver en la figura 14, hubo un efecto inmediato del  $H_2O_2$  sobre el crecimiento bacteriano porque se detuvo durante la hora siguiente a la exposición, después de ello el crecimiento continuó para detenerse al final del cultivo. En presencia de vitaminas no se observó efecto del peróxido.

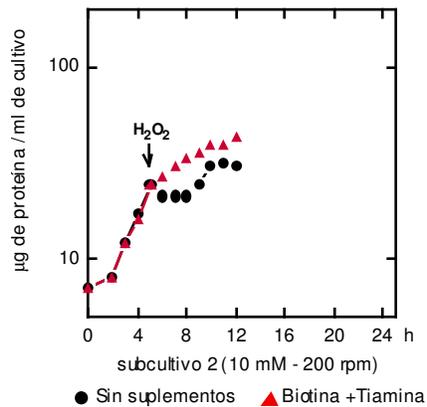


Figura 14: crecimiento de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a  $H_2O_2$ .

#### 6.4.-Actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a $H_2O_2$ .

La adición de  $H_2O_2$  al cultivo resultó en que la actividad de la enzima aconitasa disminuyó inmediatamente para volver después a los niveles originales. Lo anterior fue observado tanto en medio suplementado con vitaminas como sin ellas, aunque en presencia de biotina y tiamina la actividad de la aconitasa tardó más en elevarse; la explicación a esto es que con vitaminas hubo protección contra el efecto oxidante del peróxido. Figura 15.

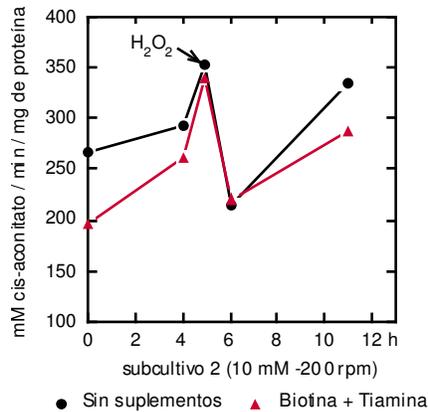


Figura 15: actividad aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 6.5.- Actividad de la enzima piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como se ha mencionado anteriormente, existe una limitación en la síntesis de las vitaminas biotina y tiamina en *Rhizobium etli* CE3 (Encarnación *et al*, 1995; y datos no publicados de Taboada, H., CIFN); una forma de detectar esta limitación, es midiendo la actividad de la piruvato carboxilasa, enzima que requiere biotina como cofactor. En la figura 16 se muestra que la actividad enzimática fue menor (hasta casi desaparecer al final del subcultivo) cuando el medio carecía de vitaminas; esto, luego de que la bacteria fuera cultivada en condiciones altamente oxidantes como es el medio mínimo con succinato 30 mM y 300 rpm. En presencia de vitaminas, la actividad enzimática casi no disminuyó durante las primeras 5 h del subcultivo y fue solo después de la adición de peróxido, cuando la actividad disminuyó un poco más. Así pues, la síntesis de biotina está limitada en condiciones de oxidación y las vitaminas compensan el efecto dañino que se produce.

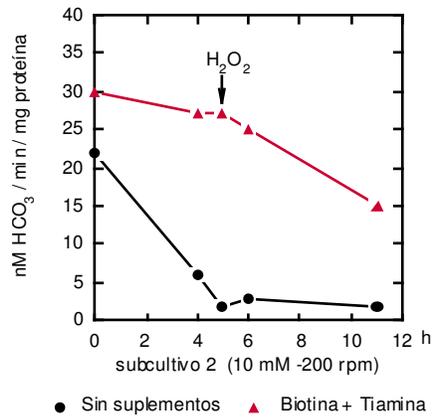


Figura 16: actividad de la enzima piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nota:

Todas las figuras representan experimentos realizados al menos por triplicado.

En todas las figuras de resultados, excepto la figura 13, se obtuvieron desviaciones estándar, pero no fueron representadas gráficamente por ser iguales o menores a  $\pm 3$ .



## 7.-DISCUSION

### 7.1.-Metabolismo tipo fermentativo de *Rhizobium etli* CE3.

*Rhizobium etli* CE3 es una bacteria aeróbica que en subcultivos en medio mínimo presenta un metabolismo tipo fermentativo. Estudios fisiológicos han revelado que este cambio metabólico se caracteriza por: reducción de la tasa de crecimiento en cada subcultivo; disminución en la actividad de enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA); excreción al medio de ácidos orgánicos como 2-oxoglutarato, malato, fumarato, lactato y  $\gamma$ -hidroxibutirato así como la excreción de aminoácidos como glutamato y alanina; acumulación intracelular del polímero de reserva poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y agregación bacteriana en el medio después de varios subcultivos (Encarnación *et al.*, 1995).

La respuesta fermentativa de *R. etli* CE3 podría estar relacionada con la baja actividad de enzimas participantes en el ciclo TCA; ya que cuando se adicionaron al medio de cultivo biotina y tiamina, el crecimiento de la cepa fue recuperado (figuras 6, 12, 14, 16). Lo que sucedió fue que se proporcionaron los cofactores necesarios para una óptima actividad enzimática, porque biotina es cofactor de la enzima piruvato carboxilasa (PC) y tiamina es cofactor de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), dando como resultado que a través de estas enzimas pudieran ser suministrados los sustratos que el ciclo TCA requeriría para un adecuado flujo de carbono. Estos experimentos sugieren que existe una deficiencia en la síntesis de tiamina y biotina en *R. etli* debido a que no tiene el complemento adecuado de enzimas para biosintetizar estas vitaminas.

Al contrario de lo que sucede en medio mínimo; en medio rico, las actividades enzimáticas se mantienen, la bacteria no excreta ácidos orgánicos ni aminoácidos y no acumula PHB. La bacteria no cambia de metabolismo aeróbico a fermentativo y crece continuamente (Encarnación *et al.*, 1995).

La importancia que tiene la vitamina biotina sobre el crecimiento de las rhizobia se puede ver en el caso de *Mesorhizobium* sp cepa R7A que contiene la mayoría de sus genes simbióticos en un elemento genético cromosomal denominado “isla simbiótica”. Si este elemento es transferido a cepas de *Mesorhizobium* que no establecen simbiosis, estas adquieren la capacidad de nodular. Particularmente, en esta isla simbiótica existe un fragmento de 13.2 kb que contiene genes requeridos para sintetizar las vitaminas ácido nicotínico mononucleótido y biotina (Sullivan *et al.*, 2001).

En el laboratorio de ingeniería metabólica del CIFN, se están llevando a cabo estudios de complementación con el plásmido p996 que contiene un fragmento con los genes para la síntesis de vitaminas de *Mesorhizobium*; complementando a *R. etli* con este plásmido se ha logrado que el crecimiento sea mantenido durante subcultivos en medio mínimo (datos no publicados de Vargas, C., CIFN) de modo que la vitamina biotina juega un papel importante en la prevención del metabolismo tipo fermentativo y es necesaria para mantener el crecimiento de *R. etli* en medio mínimo.

## **7.2.-Aumento de la concentración de O<sub>2</sub> y de la fuente de carbono en el medio de cultivo de *Rhizobium etli* CE3.**

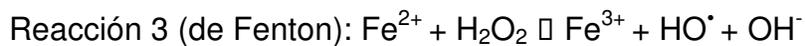
Se utilizó succinato 30 mM y agitación de 300 rpm para tener una condición más oxidante tanto por exceso de O<sub>2</sub> como de carbono. En estas condiciones *Rhizobium etli* CE3 pudo crecer sólo en un primer subcultivo de 24 h con succinato 30 mM a 300 rpm y no en un segundo subcultivo bajo las mismas condiciones, incluso adicionando vitaminas al medio (figura 7). Esto demuestra el fuerte efecto oxidante de esta condición en la que O<sub>2</sub> y succinato se mantienen elevados.

Sin embargo, en un experimento realizado por Taboada, H. en el laboratorio de ingeniería metabólica del CIFN, se encontró que en tales condiciones de oxidación, si *R. etli* era incubada en un primer subcultivo con glutatión y luego en un segundo subcultivo con glutatión y biotina el crecimiento de la cepa se recuperaba (figura 8). El glutatión es un tripéptido que protege a las proteínas de daño oxidativo al mantener los grupos tioles de estas en estado reducido (Mathews *et al.*, 1999). Se sabe que el glutatión puede contender contra situaciones de estrés en rhizobia ya que una mutante de *Rhizobium tropici* (CIAT899-13T2) deficiente en la síntesis de glutatión, es particularmente sensible al ser cultivada bajo diversas condiciones de estrés como: estrés osmótico, estrés oxidativo, exposición a ácidos orgánicos y acidificación del medio; al adicionar glutatión, la cepa recuperó el crecimiento a nivel de la cepa silvestre (Riccillo *et al.*, 2000).

La literatura reporta que cultivos sometidos a mayor aeración (agitación) presentan más difusión de O<sub>2</sub> al medio (Marty-Teyssset *et al.*, 2000). Cuando *Rhizobium etli* CE3 fue cultivado en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm comenzó a disminuir en crecimiento desde el segundo subcultivo (figura 6) y el oxígeno fue consumido durante las primeras horas (figura 9). En medio mínimo con succinato 30 mM y 300 rpm, la concentración de oxígeno solo disminuye ligeramente y el medio de cultivo se encuentra entonces saturado de O<sub>2</sub>.

Cuando la concentración de O<sub>2</sub> es alta (figura 9), sucede que también aumenta la generación de especies reactivas del oxígeno; provocando efectos dañinos sobre biomoléculas. Metales como hierro en su forma reducida Fe<sup>2+</sup>, potencian la toxicidad del O<sub>2</sub> al convertir el peróxido de hidrógeno en el radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) que es más reactivo. Además en exceso de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) hay incremento de hierro intracelular el cual estaría disponible para catálisis en reacciones tipo Fenton (Touati., 2000).

El daño al ADN por oxidación se da cuando el HO<sup>•</sup> reacciona con sus residuos azúcar modificando las bases, o rompiendo la hebra. En células anaeróbicas de *E. coli*, el daño a ADN puede explicarse mediante las siguientes reacciones donde intervienen flavinas, nucleótidos reducidos y Fe<sup>3+</sup> libre como iniciadores para la generación del ión Fe<sup>2+</sup> y del radical hidroxilo (Woodmansee e Imlay., 2002):



En medio mínimo con 30 mM de succinato y a 300 rpm puede inducirse la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo por lo que se comparó el crecimiento de *R. etli* con la cepa *katG*<sup>-</sup>.

La cepa *katG*<sup>-</sup> tiene una mutación en la enzima catalasa-peroxidasa, que es inducida en medio mínimo como respuesta a estrés oxidativo, aunque también muestra actividad en medio rico; la catalasa es una hemo proteína que metaboliza el peróxido de hidrógeno e indirectamente reduce la formación del radical hidroxilo producido por la degradación del peróxido en la reacción de Fenton: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>•</sup> + OH<sup>-</sup> (Vargas *et al*, 2003). La cepa *katG*<sup>-</sup> puede crecer durante 24 h en medio mínimo con succinato 30 mM-300 rpm, aunque en las primeras 4 h presenta una fase de crecimiento retardado que posiblemente se deba a las condiciones oxidantes del medio (figura 10).

Con propósito de mantener condiciones de cultivo fuertemente oxidantes, pero donde las vitaminas aun protegieran de ello a *R. etli*; la cepa fue cultivada en medio mínimo con succinato 30 mM a 300 rpm y luego con medio mínimo 10 mM a 200 rpm para disminuir el grado de oxidación (figura 11). En este caso el crecimiento bacteriano no fue restaurado completamente por efecto de las

vitaminas y para verificar el estado de las células, se sustituyó el segundo subcultivo por medio PY; resultando que las células fueron viables en este medio rico incluso a 300 rpm (figura 11, gráfica C). Especies de rhizobia pueden ser cultivadas en diversos medios, generalmente en medio rico como manitol-extracto de levadura o peptona-extracto de levadura. En medio de cultivo rico las células tienen todos los nutrientes necesarios (aminoácidos, vitaminas, péptidos, suplementos minerales) para estimular su crecimiento incluso si alguna ruta biosintética está afectada, ya que el medio rico suministra los precursores metabólicos que la célula necesita (Watson *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, una de las características que presenta *Rhizobium etli* CE3 cuando cambia de metabolismo aeróbico a fermentativo, es que forma agregados luego de ser subcultivada varias veces en medio mínimo con succinato 10 mM a 200 rpm (Encarnación *et al.*, 1995). En este trabajo también se ha observado agregación, solo que esto sucede tempranamente en subcultivos con succinato 30 mM a 300 rpm y que las vitaminas impiden este efecto. La agregación observada en los cultivos, podría deberse a una respuesta quimiotáctica. Cuando la bacteria es cultivada en medio mínimo, hay un aumento en la excreción de glutamato que es sentido por el quimiorreceptor glutamato/aspartato (Tar) de *R. etli*. La unión de la proteína Tar al glutamato podría ser una señal que altere la superficie celular y al colindar unas células con otras estas podrían adherirse entre sí, ocasionando disminución del crecimiento. Células mutantes de *R. etli* que carecen de este quimiorreceptor (*tar*<sup>-</sup>) no se agregan significativamente cuando son cultivadas en medio mínimo con agitación de 200 rpm, no presentan un aumento en la excreción de glutamato y el crecimiento no disminuye; de modo que la ausencia de la proteína Tar simula el efecto que se obtiene cuando la vitamina biotina es adicionada al medio de cultivo (datos no publicados de Mendoza, A., CIFN).

### 7.3.-Sistema de tres subcultivos cortos.

Se redujeron los tiempos de incubación de *Rhizobium etli* CE3 hasta que se obtuvo un sistema de tres subcultivos cortos con duración total de 24 h (figura 12); con esto se logró inducir estrés oxidativo que puede prevenirse adicionando al medio las vitaminas biotina y tiamina. Los subcultivos sirvieron también para ver el efecto que causa la oxidación sobre el crecimiento bacteriano y sobre actividades enzimáticas importantes en el metabolismo de *R. etli*.

Una vez obtenido el sistema de subcultivos cortos, se midió la actividad de la enzima aconitasa ya que el grupo [4Fe-4S] de esta enzima es sensible a daño oxidativo siendo convertido a [3Fe-4S]<sup>+</sup> (Beinert y Kiley, 1999).

La actividad de la enzima aconitasa medida al inicio del experimento, cuando la bacteria provenía de un precultivo en PY y aún no había sido expuesta a medio mínimo, fue menor que en cualquiera de los subcultivos. El medio rico PY no es oxidante para *R. etli*, de modo que la actividad enzimática observada al tiempo cero es la que normalmente presentan las células cuando llevan a cabo un metabolismo aeróbico. Una vez que la cepa fue subcultivada en medio mínimo con succinato 30 mM-300 rpm y luego con 10 mM-200 rpm, hubo un aumento en la actividad aconitasa como consecuencia de la oxidación provocada por el medio. La actividad enzimática fue menor en medio con biotina y tiamina, lo que indica que las vitaminas protegieron contra oxidación. Por el contrario, la actividad fue mayor cuando la cepa fue cultivada en medio sin suplementos, lo que sugiere que en condiciones de oxidación hay una inducción de la expresión enzimática para compensar la aconitasa que está siendo oxidada.

Lo anterior puede verse más claramente, con el caso de *Escherichia coli*, donde la respuesta a daño oxidativo involucra dos fases, una inmediata donde las aconitasas AcnA y AcnB son inactivadas para detener el metabolismo oxidativo y no haya producción de radicales superóxido; y una segunda respuesta con la

inducción de AcnA para mantener o reestablecer el metabolismo (Gruer y Guest, 1994). También sucede que aunque las enzimas aconitasa pueden ser inactivadas por estrés oxidativo, el daño es reversible (al ser su centro 4Fe-4S reactivado por  $\text{Fe}^{2+}$  intracelular y grupos tioles), como lo demostró el hecho de que *R. etli* cultivada en medio mínimo sin suplementos (oxidante) la actividad fuera mayor que en medio rico o medio suplementado con biotina y tiamina.

#### **7.4.-Crecimiento de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

De acuerdo con el sistema de subcultivos cortos (figura 12), el primero es el más oxidante y se pensó que esto podría haberle conferido a *R. etli* cierta resistencia a condiciones mayores de estrés como es la exposición a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se observó que la concentración y el tiempo que la bacteria estuvo expuesta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  no fueron letales. Luego de que la cepa fue expuesta a peróxido en medio sin suplementos su crecimiento disminuyó, aunque hacia el final del cultivo se notó una recuperación que casi alcanzó el nivel de crecimiento de las células en presencia de biotina y tiamina (figura 14).

*Rhizobium etli* puede contender contra peróxido porque tiene una actividad catalasa dada por *katG*, que es expresada tanto en metabolismo fermentativo como en metabolismo aeróbico. KatG destoxifica el  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno (proveniente de la oxidación de flavinas reducidas por especies reactivas del oxígeno) durante la fase de crecimiento aeróbico a través de la reacción:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . También se han encontrado otros mecanismos de protección contra estrés oxidativo de *R. etli* durante simbiosis, como son proteínas con alta identidad a SOD (superóxido dismutasa, que se encarga de la destoxificación de radicales), DnaK (protección de otras proteínas contra daño oxidativo) y una proteína miembro de la familia de las peroxiredoxinas (con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como uno de sus sustratos) (Vargas *et al*, 2003).

### **7.5.-Actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Al medir la actividad de la enzima aconitasa de *Rhizobium etli* CE3 cuando fue expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en medio con y sin vitaminas) se encontró que, inmediatamente después de la adición de peróxido, la actividad de la enzima disminuyó por efecto de la oxidación de su grupo [4Fe-4S] y que cuando fueron transferidas a medio fresco sin peróxido, la actividad de la enzima se incrementó nuevamente (figura 15). Esto indica que aunque la aconitasa es susceptible a inactividad por oxidación, esta condición es reversible y no representa daño letal para las células bajo la concentración de peróxido utilizada (figura 14). Luego de ser transferidas a medio fresco sin peróxido; la mayor actividad aconitasa la presentaron células cultivadas en medio sin vitaminas, es decir en medio que no tenía ninguna protección contra estrés oxidativo. Esto sugiere que la expresión de esta enzima aumenta para compensar la enzima que ha sido inactivada por oxidación.

### **7.6.-Actividad de la enzima piruvato carboxilasa de *Rhizobium etli* CE3 expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

La síntesis de biotina y tiamina está limitada en *Rhizobium etli* CE3, como pudo detectarse al medir la actividad enzimática de la piruvato carboxilasa. Se encontró que en medio mínimo sin suplementos tal actividad fue menor comparada con la actividad presente en medio con biotina y tiamina. También se agregó peróxido al medio y se midió la actividad de la enzima en tales condiciones. Al momento de adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio sin suplementos, la actividad de la enzima ya había disminuído considerablemente y continuó así incluso después de agregar peróxido. En cambio, la actividad enzimática presente en medio con vitaminas fue mayor, pero luego de adicionar peróxido la actividad disminuyó y no pudo recuperarse (figura 16). Lo anterior indica que el medio de cultivo es por sí mismo oxidante para la piruvato carboxilasa y que luego de ser

expuesta a peróxido su actividad es abatida, aun si el medio de cultivo ha sido suplementado con biotina y tiamina.

## 8.-CONCLUSIONES

*Rhizobium etli* CE3 es una bacteria microaeróbica que puede cambiar de metabolismo aeróbico a fermentativo cuando es incubada en condiciones de estrés oxidativo; una forma de inducir tal estrés en la bacteria fue cultivándola en medio mínimo con distintas concentraciones de succinato como fuente de carbono y saturando el medio de cultivo con oxígeno; más directamente, adicionando un agente oxidante como peróxido de hidrógeno.

De acuerdo con las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo, *R. etli* en un ambiente oxidante dejó de crecer, agregándose en el medio; lo que pudo ser prevenido con suplementos como biotina, tiamina (incluso en presencia de peróxido de hidrógeno) y glutatión. Esto sugiere que la síntesis de tales vitaminas está limitada en la bacteria; y en el caso de glutatión, mostró ser un agente redox efectivo para sostener el crecimiento de la bacteria.

Otro cambio metabólico observado en *R. etli* fue que la actividad de la enzima aconitasa (enzima susceptible a oxidación) aumentó para compensar el daño oxidativo; y que su actividad solo disminuyó temporalmente luego de la exposición a peróxido de hidrógeno. Por otra parte, la actividad de la enzima piruvato carboxilasa también permitió comprobar la limitación de biotina en la célula (porque la enzima requiere de esta vitamina como cofactor) y se encontró que su actividad fue afectada negativamente por efecto de las condiciones de cultivo y la adición de peróxido; sin embargo, las vitaminas biotina y tiamina compensaron el efecto dañino producido.



## 9.-BIBLIOGRAFIA

**Arp, D.J.** 2000. The nitrogen cycle. In: Prokariotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Triplett, E.W. (ed). Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 1-14.

**Beinert, H., and Kiley, P.J.** 1999. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol.* **3**: 152-157.

**Brewin, N.J., Downie, J.A., Young, J.P.W.** 1992. Nodule formation in legumes. In: Encyclopedia of microbiology. Lederberg, J (ed). Vol. 3. San Diego: Academic Press. pp 239-248.

**Brill, W.J.** 1977. Fijación biológica de nitrógeno. *Investigación y ciencia.* **8** (8): 44-54.

**Cermola, M., Fedorova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R., and Patriarca, E.J.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli* - *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *MPMI.* **13** (7): 733-741.

**Crockford, A.J., Behncke, C., and Williams, H.D.** 1996. The adaptation of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli to oxidative stress and its overlap with other environmental stress response. *Microbiology.* **142**: 331-336.

**Crockford, A.J., Davis, G.A., and Williams, H.D.** 1995. Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Microbiology.* **141**: 843-851.

**Dingman, D.W. and A.L. Sonenshein.** 1987. Purification of aconitase from *Bacillus subtilis* and correlation of its N-terminal aminoacid secuencia with the secuencia of the *citB* gene. *J Bacteriol.* **169**: 3062-3067.

**Downie, J.A., and Walker, S.A.** 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 483-489.

**Dunn, M.F.** 1998. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiology Reviews.* **22**: 105-123.

**Dunn, M.F., Araíza, G., Cevallos, M.A., and Mora, J.** 1997. Regulation of pyruvate carboxylase in *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 301-306.

**Dunn, M.F., Araíza, G., Finan, T.M.** 2001. Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Arch Microbiol.* **176**: 355-363.

**Dunn, M.F., Encarnación, S., Araíza, G., Vargas, M.C., Dávalos, A., Peralta, H., Mora, Y., and Mora, J.** 1996. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli* : mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J Bacteriol.* **178** (20): 5960-5970.

**Encarnación, S., Dunn, M., Willms, K. and Mora, J.** 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol.* **177**: 3058-3066.

**Evans, P.J., Gallesi, D., Mathieu, C., Hernandez, M.J., de Felipe, M., Halliwell, B., and Puppo, A.** 1999. Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Plant.* **208**: 73-79.

**Ferguson, G.P., and Booth, I.R.** 1998. Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K<sup>+</sup>. *J Bacteriol.* **180** (16): 4314-4318.

<sup>a</sup>**Flint, D.H., Smyk-Randall, E., Tuminello, J.F., Draczynska-Lusiak, B. and Brown, O.R.** 1993. The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J Biol Chem.* **268** (34): 25547-25552.

<sup>b</sup>**Flint, D.H., Tuminello, J.F., and Emptage, M.H.** 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem.* **268** (30): 22369-22376.

**Gruer, M.J., and Guest, J.R.** 1994. Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **140**: 2531-2541.

**Herouart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D., and Puppo, A.** 1996. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J Bacteriol* **178**: 6802-6809.

**Hirsch, A.M., and LaRue, T.A.** 1997. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ *sui generis* ? *Crit Rev Plant Sci.* **16** (4): 361-392.

**Hirsch, A.M., Lum, M.R., and Downie, A.** 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant Physiol.* **127**: 1484-1492.

**Hopkins, W.G.** 1995. Introduction to plant physiology. New York: John Wiley and sons. pp 101-112.

**Lynch, A.S., and Lin, E.C.C.** 1996. Responses to molecular oxygen. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F. C., Curtis III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik,

B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umbarger, H.E. (eds) Vol 1, 2<sup>nd</sup> edn, Washington, DC: Am Soc Microbiol. pp 1526-1538.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.

**Marty-Teyssset, C., de la Torre, F., and Garel, J. R.** 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol.* **66** (1): 262-267.

**Matamoros, M.A., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., and Becana, M.** 1999. Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiology.* **121**: 879-888.

**Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G.** 1999. *Biochemistry.* 3<sup>rd</sup> edn. San Francisco: Benjamin-Cummings.

**Meister, A., and Anderson, M.E.** 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem.* **52**: 711-60.

**Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T.** 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell.* **7**: 869-885.

**Noctor, G. and Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant. Mol Biol.* **49**: 249-79.

**Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K., and Hassett, D.J.** 2000. Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. J Bacteriol. **182** (16): 4533-4544.

**Paracer,S., and Ahmadjian, V.** 2000. Symbiosis. An introduction to biological association. 2<sup>nd</sup> edn. New York: Oxford University Press.

**Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev. **64** (1): 180-201.

**Riccillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R., and Aguilar, M.** 2000. Glutathione is involved in enviromental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. J. Bacteriol. **182** (6): 1748-1753.

**Scandalios, J.G.** 2002. Oxidative stress responses-what have genome-scale studies taught us?. Genome Biology. **3** (7): reviews 1019.1-1019.6.

**Segovia, L., Young, P.W., and Martínez-Romero, E.** 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. **43** (2): 374-377.

**Sprent, J.** 1994. Evolution and diversity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: chaos theory? Plant and Soil. **161**: 1-10.

**Storz, G., and Imlay, J.A.** 1999. Oxidative stress. Curr Opin Microbiol. **2**: 188-194.

**Streit,W,R., Joseph, C.M., and Phillips, D.A.**1996. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium melliloti* 1021. MPMI. **9** (5): 330-338.

**Sullivan, J.T., Brown, S.D., Yocum, R.R., and Ronson, C.W.** 2001. The *bio* operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiology*. **147**: 1315-1322.

**Taté, R., Patriarca, E. J., Riccio, A., Defez, R., and Iaccarino, M.** 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *MPMI*. **7** (5): 582-589.

**Thorne, S., and Williams, H.D.** 1997. Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: analysis of survival, stress resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.* **179** (22): 6894-6901.

**Touati, D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **373** (1): 1-6.

**Vargas, M del C., Encarnación, S., Dávalos, A., Reyes-Pérez, A., Mora, Y., García-de los Santos, A., Brom, S., and Mora, J.** 2003. Only one catalase, *katG*, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology*. **149**: 1165-1176.

**Verma, D.P.S.** 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*. **4**: 373-382.

**Watson, R.J., Heys, R., Martin, T., Savard, M.** 2001. *Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. *Appl Environ Microbiol.* **67** (8): 3767-3770.

**Woodmansee, A.N., and Imlay, J.A.** 2002. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J. Biol. Chem.* **277** (37): 34055-34066.



## 10.-APENDICE

### Datos representados en las figuras de la sección de resultados.

□, sin suplementos; B, biotina; T, tiamina; G, glutatión. En negritas se indica la hora del cultivo en que fue tomada la muestra.

**Figura 6:** µg de proteína/ml de cultivo

	subcultivo 1			subcultivo 2			subcultivo 3		
	10 mM-200 rpm			10 mM - 200 rpm			10 mM - 200 rpm		
	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>
□	7	44	112	7	12	38	7	11	18
B	7	43	142	7	39	126	7	27	93
T	7	45	115	7	29	113	7	24	103
B+T	7	42	103	7	25	124	7	32	115

**Figura 7:** µg de proteína/ml de cultivo

	subcultivo 1			subcultivo 2		
	30 mM - 300 rpm			30 mM - 300 rpm		
	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>
□	7	57	68	7	11	10
B	7	52	78	7	17	11
T	7	45	65	7	13	8
B+T	7	51	62	7	10	11

**Figura 8:** µg de proteína/ml de cultivo

subcultivo 1					subcultivo 2				
30 mM - 300 rpm					30 mM - 300 rpm				
G					G + B				
<b>0</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
7	7	25	31	51	7	5	14	49	113

**Figura 9:** % de oxígeno

rpm	subcultivo continuo													
	0	2	4	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
200	98	93	32	25	47	52	49	44	42	43	43	41	35	34
300	97	100	98	96	94	92	90	86	83	83	84	85	87	89

**Figura 10:** µg de proteína/ml de cultivo

	subcultivo 1						
	30 mM - 300 rpm						
	0	1	2	4	8	12	24
<i>katG</i>	7	8	8	11	62	88	123

**Figura 11:** µg de proteína/ml de cultivo

	subcultivo1			subcultivo 2			subcultivo 2		
	30 mM - 300 rpm			10 mM - 200 rpm			PY- 300 rpm		
	0	8	24	0	8	24	0	8	24
□	7	51	72	7	11	22	7	17	70
B+T	7	53	103	7	10	27	-	-	-

**Figura 12:** µg de proteína/ml de cultivo

	subcultivo 1		subcultivo 2		subcultivo 3	
	30 mM - 300 rpm		10 mM - 200 rpm		10 mM - 200 rpm	
	0	4	0	8	0	12
□	7	27	7	36	7	15
B+T	7	25	7	39	7	52

**Figura 13:**  $\mu\text{M}$  cis-acnitato/min/mg de proteína

	precultivo	subcultivo 1	subcultivo 2	subcultivo 3
	PY	30 mM - 300rpm	10 mM - 200 rpm	10 mM - 200 rpm
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
□	156	266	267	278
B+T	156	196	203	192

**Figura 14:**  $\mu\text{g}$  de proteína/ml de cultivo

	subcultivo 2											
	10 mM - 200 rpm											
	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
□	7	8	12	17	24	21	21	21	24	30	31	30
B+T	7	8	12	16	24	27	30	34	36	40	39	43

**Figura 15:**  $\mu\text{M}$  cis-acnitato/min/mg de proteína

	subcultivo 2				
	10 mM - 200 rpm				
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>11</b>
□	266	293	352	215	335
B + T	196	261	340	222	288

**Figura 16:** nM  $\text{HCO}_3$ /min/mg de proteína

	subcultivo 2				
	10 mM - 200 rpm				
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>11</b>
□	22	6	2	3	2
B + T	30	27	27	25	15