

COMPOSICION, ORGANIZACION Y REGULACION DEL
SISTEMA RESPIRATORIO DE Bacillus cereus.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA: M. en C. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1 9 8 5



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.

La presente Tesis fué desarrollada en el
Centro de Investigaciones en Fisiología Celular,
UNAM, bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz
a quien agradezco su valioso apoyo.

A Mi Esposa. Patricia

A Mis Hijos. Martín y Yoame

A Mi Madre, Padre y Hermanos

A la Memoria de Don Carlos

A Mis Maestros y Amigos. Antonio, Armando
y Enrique.

Indice de Contenido	Página
Abreviaturas.....	I
Resumen	1
Summary	2
Introducción	4
Esporulación Bacteriana y Sistema Respiratorio	9
Material y Métodos	16
Resultados	23
Discusión	42
Perspectivas	53
Literatura Consultada	56

Abreviaturas Utilizadas en el Texto

AE - aeróbico

ANAE - anaeróbico

uAE - microaeróbico

asc - ascorbato

CAS - hidrolizado de caseína

cit - citocromo

CO - monóxido de carbono

DCPIP - diclorofenolindófenol

DNAasa - deoxirribonucleotidasa

E - coeficiente de extinción molar

FMN - flavín mononucleótido

FPS - flavoproteína oxidoreductasa de succinato

FPN - flavoproteína oxidoreductasa de NADH

HOQNO - 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido

K_i - constante de afinidad para un inhibidor

K_m - constante de afinidad para un sustrato I

MG - medio nutriente de glucosa

MCAS - medio nutriente de casaminoácidos

MQ - menaquinona

MR - medio nutriente rico

NADH - nicotinadenín dinucleótido reducido

NADPH - nicotinadenín dinucleótido-fosfato reducido

nm - nanometro

ox - oxidado

PMS - fenazina metosulfato

psi - libra por pulgada cuadrada

red - reducido

SR - sistema respiratorio

tg - tiempo de generación

TMPD - tetrafenilenparafenilendiamina

TRIS - hidrometilaminometano

TCM - amortiguador TRIS-HCL, cloruro de calcio y magnesio

RESUMEN

Se estudiaron la composición y organización del sistema respiratorio de Bacillus cereus en las etapas logarítmica y esporulante. El análisis espectroscópico diferencial de las membranas de ambos tipos celulares mostró la presencia de los citocromos b_{555} , c_{550} , aa_3 , b_{562} (cit.o) y a_2 (cit.d), sugiriéndose así la presencia de un sistema respiratorio ramificado y complejo.

La fotoinactivación (U.V. 360 nm) de la menaquinona endógena causó la pérdida de la actividad respiratoria NADH-dependiente, lo que indica que los electrones llegan al oxígeno sólo a través de rutas compuestas por quinona y citocromos.

Los citocromos y las actividades respiratorias (NADH deshidrogenasa, NADH oxidasa y citocromo c oxidasa) se incrementaron substancialmente durante la etapa esporulante. De varios sustratos probados, solo el succinato fue oxidado por las membranas de ambos tipos celulares.

El tratamiento de las membranas reducidas por ditionita con monóxido de carbono, permitió la identificación espectral de tres citocromos reactivos: a_3 , o y a_2 , sugiriéndose así su función potencial como oxidasas terminales. Cinéticamente solo fué posible distinguir la actividad de dos oxidasas con distinta afinidad por el oxígeno ($K_m=8.0 \mu M$ y $K_m=0.9 \mu M$). La actividad de la oxidasa de menor afinidad fue eliminada después de tratar las membranas con KCN 0.1 mM.

La cinética para NADH oxidasa, citocromo c oxidasa y succinato oxidasa en presencia de diferentes inhibidores respiratorios, así como,

los espectros diferenciales (anaeróbicos menos aeróbicos) en presencia de KCN 0.1 mM sugirieron que los citocromos o y a_2 están involucrados en la respiración CN-resistente mientras que los citocromos c_{550} y aa_3 constituyen la vía sensible al cianuro.

La tensión de oxígeno y la velocidad de crecimiento tuvieron un efecto apreciable sobre la expresión del sistema respiratorio de Bacillus cereus y sugirieron que la síntesis de los citocromos c_{550} y aa_3 se regula positivamente por la tensión de oxígeno, mientras que el citocromo a_2 se expresa preferentemente a bajas tensiones de oxígeno y lento crecimiento, pero no en el crecimiento anaeróbico. La expresión de los citocromos b_{555} y o parece ser constitutiva.

SUMMARY

The composition and organization of the respiratory system of Bacillus cereus was examined. Differential spectroscopy analysis showed that membranes of both types of cells contain cytochromes b_{555} , c_{550} , b_{562} (cit. o) and a_2 (cyt. d). Thus, a complex and branched organization for the respiratory system was suggested.

Selective photoinactivation (360 nm U.V.) of the endogenous menaquinone abolished NADH-dependent respiration, indicating that electrons were being passed to oxygen only through a quinone-cytochrome routes.

Cytochromes and respiratory activities (NADH deshidrogenase, NADH oxidase and cytochrome c oxidase) were substantially incremented during sporulation. In addition to NADH, succinate was the only physiological

substrate that was oxidized at appreciable velocity by membranes of both types of cells.

The carbon monoxide-differential spectra of dithionite reduced membranes showed the presence of three reactive cytochromes: a_3 , o and a_2 , thus suggesting their potential function as terminal oxidases. Two oxidases with different affinity for oxygen were kinetically distinguished ($K_m=8.0 \text{ uM}$ and $K_m=0.9 \text{ uM}$). The lower affinity oxidase was suppressed by 0.1 mM KCN .

Kinetics of NADH, succinate and cytochrome c oxidases in the presence of several respiratory inhibitors and the differential spectra (anaerobic minus aerobic) performed in the presence of 0.1 mM KCN let us to suggest that cytochromes o and a_2 seem to be involved in the cyanide-resistant respiration while cyt. c_{550} and aa_3 conformed the cyanide-sensitive route.

Oxygen tension and velocity of growth affected the expression of the respiratory system. The synthesis of cyt. c_{550} and aa_3 were positively regulated by the oxygen tension while the expression of a_2 was favored by low tension and low rate of growth but was not expressed in anaerobic cultures. The expression of cytochrome o and b_{555} seems to be constitutive.

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE SISTEMAS RESPIRATORIOS BACTERIANOS.-

Los sistemas respiratorios (SR) bacterianos son considerablemente más complejos que el mitocondrial, no sólo en su composición y organización sino porque también son sistemas sujetos a regulación genética cuya expresión puede ser profundamente afectada por diversos factores ambientales. Mientras que en la mitocondria de los eucariotes superiores podemos hablar de un sistema universal, en las bacterias no podemos referirnos a un sistema único, ya que encontramos diversidad en su composición, organización y regulación.

Esta variabilidad, es en primer lugar consecuencia de las grandes diferencias filogenéticas que existen entre ellas. Hay que recordar que las bacterias han habitado nuestro planeta durante al menos tres cuartas partes de su existencia y por tanto, el tiempo transcurrido está en favor de una gran diversificación del grupo; por otro lado, en este tiempo, las bacterias han invadido todo nicho ecológico concebible, lo que nos advierte que los muy diversos rumbos tomados en su evolución deben estar plasmados en una gran cantidad de cambios metabólicos adaptativos. Encontramos a las bacterias creciendo a temperaturas que van por debajo de los cero grados centígrados hasta temperaturas que superan los cien grados centígrados. Pueden utilizar una gran variedad de nutrientes que van desde CO₂ y N₂ como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, pasando por toda fuente concebible, hasta complejas mezclas de compuestos, como ocurre en las formas más extremas de parasitismo.

En sus sistemas respiratorios utilizan O_2 o una gran variedad de aceptores alternos. Encontramos especies aeróbicas estrictas, especies facultativas que son capaces de crecer en un amplio rango de concentración de O_2 que va desde la anaerobiosis hasta la macroaerobiosis y, finalmente, existen especies aerobias estrictas.

A pesar de que el grupo taxonómico de las bacterias es el más heterogéneo en su fisiología y bioquímica, no es sorprendente que se le maneje como un grupo homogéneo en los textos de bioquímica. Esta situación quizás tenga su explicación en que, a pesar de las enormes diferencias que existen entre los grupos bacterianos, todavía hay un punto de unidad: la homogeneidad estructural, la falta de un dominio nuclear separado y la ausencia, salvo contadas excepciones, de una estructura membranar interna. De hecho, cada vez que se esquematiza una bacteria se delimita su frontera membranar que le dará forma bacilar o cocoide y se sombrea su citoplasma, no para describir alguna estructuración intracelular específica, sino para advertir que no es un espacio vacío.

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

La plasticidad de su sistema respiratorio dota a las bacterias de

una gran capacidad adaptativa que les permite mantener el crecimiento a pesar de amplias fluctuaciones en la tensión de O_2 y de otros parámetros de cultivo.

En la figura 1 se muestra un esquema que agrupa las posibilidades de organización del sistema respiratorio encontrada en diversos grupos bacterianos. Se consideran 3 sectores funcionales en el sistema: El sector de entrada constituido por múltiples deshidrogenasas y flavoenzimas; un sector intermedio que puede ser común o formado por vías paralelas, aquí encontramos las quinonas, centros fierro-azufre, citocromos de los tipos b y c, y en ocasiones, metaloproteínas. El sector de salida puede estar constituido hasta por cuatro citocromo-oxidasas diferentes (cit. aa_3 , a_1 , a_2 y o) cuando el aceptor final es el O_2 ; en ausencia de éste, se pueden usar aceptores inorgánicos como nitrato, nitrito, sulfato o aceptores orgánicos diversos. Para cada caso habrá una reductasa específica y en muchos casos un citocromo de tipo b ó c que enlaza a la reductasa con el sector intermedio de la cadena.

Además de la NADH-deshidrogenasa se han identificado más de 50 deshidrogenasas (NAD-independientes) membranales que son capaces de reducir directamente al sistema respiratorio. Estas enzimas en su conjunto son capaces de deshidrogenar una gran variedad de sustratos entre los que encontramos aldehidos, ácidos, esteroides, alcoholes primarios y secundarios, polialcoholes, etc.

En muchas bacterias quimiosintéticas, las enzimas responsables de la oxidación inicial de sustratos inorgánicos (hidroxilamina, Fe^{2+} , NO_2 y H_2) son flavoenzimas directamente conectadas al SR.

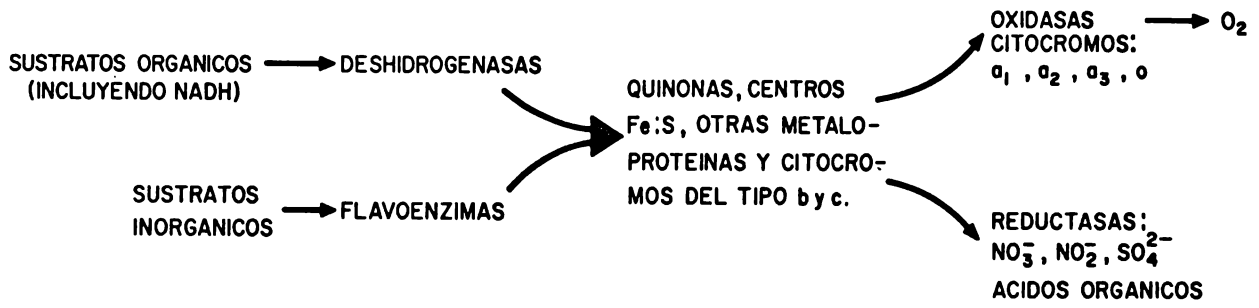


Fig. 1 Posibilidades de composición y organización de los sistemas respiratorios bacterianos. Esquema de acuerdo a N.S. Gel'man (19).

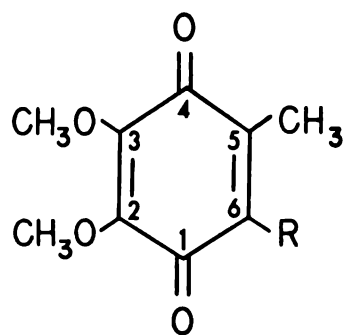
Deshidrogenasas y flavoenzimas varían en su grado de integración a la membrana, desde proteínas periféricas que se solubilizan durante la lisis o ruptura mecánica hasta proteínas integrales que requieren tratamientos drásticos para su solubilización. Muchas de estas enzimas son inducidas por su sustrato y en su caso, por la ausencia de mejores sustratos oxidables.

Las quinonas no siempre son intermediarios obligados en el transporte de electrones entre las deshidrogenasas y los citocromos, pues se ha demostrado la existencia de complejos estructurofuncionales entre des hidrogenasas y citocromos del tipo b y c. En complejos aislados, libres de quinona, algunas deshidrogenasas son capaces de reducir al citocromo justo como lo hacían en la membrana intacta.

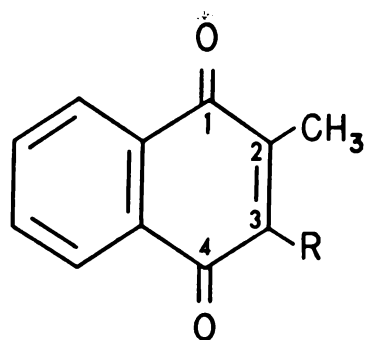
Las bacterias contienen varios tipos de quinonas liposolubles (Fig. 2); sin embargo, las más frecuentes son las ubiquinonas (derivadas del 2-3 dimetoxi-5-metilbenzoquinona) en las cuales un derivado poliprenoide ocupa la posición 6. Por otro lado tenemos a las menaquinonas (vitamina K3) derivadas de la menadiona, de la que se diferencian en que tienen un radical en la posición 3 del anillo de naftoquinona. Como regla, las bacterias gram positivas contienen menaquinonas mientras que las gram ne gativas contienen ubiquinona; sin embargo, en algunos casos como Escherichia freudii y Proteus mirabilis (19) ambos tipos de quinona están presentes y su concentración puede ser afectada por la tensión de O_2 . En anaerobiosis la menaquinona es más abundante y en aerobiosis predomina la ubiquinona.

Dos características distinguen a los sistemas de citocromos de las bacterias: La inconstancia en la composición cuantitativa y cualitativa

A:

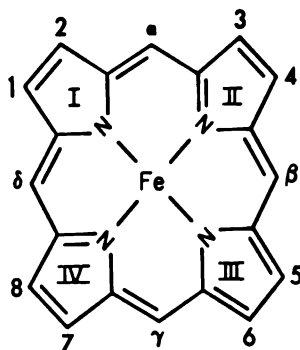


(a)



(b)

B:



(I)

GRUPO HEMO

Hemo	Sustituyentes en posición							
	1	2	3	4	5	6	7	8
*c	M	V	M	V	M	P	P	M
b	M	V	M	V	M	P	P	M
**d	M	E	M	E	M	P	P	M
a	M	ER	M	ER	M	P	P	F

Fig. 2 Fórmula de las Quinonas Bacterianas, (a) ubiquinona y (b) menaquinona. En la parte inferior se muestra la estructura del grupo hemo asociado a los citocromos bacterianos. Equivalencias para los sustituyentes de las diferentes posiciones del tetrapirrol: M=metilo F=formilo; P=propilo; V=vinilo; E=etilo o etileno; R y Ri=cadenas alquílicas.

*En los citocromos de tipo c las cadenas laterales de vinilo están sustituidas por residuos de cisteina de la cadena polipeptídica, resultando en la formación de un tioéter.

**En los citocromos a₂, la doble ligadura entre las posiciones 7 y 8 está saturada con hidrógeno.

y la presencia de varias oxidasas terminales. Además del complemento de citocromos típico de la mitocondria (cit. aa_3 , b, c_1 y c), algunas bacterias contienen todos o algunos citocromos de este complemento en combinaciones diversas con cit. a_1 , a_2 , o, b_1 , b_4 , c_3 , c_4 y c_5 .

Virtualmente podemos encontrar todas las combinaciones posibles de los citocromos enlistados.

Quizás el aspecto más interesante en la composición de citocromos es la existencia de varias oxidasas terminales con diferente afinidad por el oxígeno y diferente sensibilidad a inhibidores. La síntesis de estas oxidasas está controlada principalmente por la tensión de O_2 .

Cuando la tensión es baja, la bacteria favorece la síntesis de cit. a_1 y a_2 , que cinéticamente se caracterizan por su alta afinidad por el O_2 (Km alrededor de 10^{-8} M) mientras que a tensiones mayores el cit. aa_3 y o funcionan óptimamente como oxidasas. Sin embargo existen especies que no siguen esta regla; por ejemplo, en las especies fijadoras de nitrógeno, la elevación en la tensión de O_2 favorece la síntesis del cit. a_2 con el objetivo de proteger a la nitrogenasa, la cual es inactivada por O_2 .

Con respecto a la sensibilidad a los inhibidores, el cianuro, la azida y en muchos casos el CO son efectivos sobre cit. aa_3 y o mientras que el cit. a_2 es resistente. Gracias a esta acción diferencial de los inhibidores de sitio III se reconoció inicialmente la presencia de citocromo oxidasas alternativas.

ESPORULACION BACTERIANA Y SISTEMA RESPIRATORIO

En las bacterias esporoformadoras, como en el caso del género Bacillus la expresión del SR y en general del metabolismo oxidativo se encuentran estrechamente vinculados con el proceso morfogenético. El crecimiento vegetativo se caracteriza por la preponderancia de un metabolismo glicolítico (20,21). En esta etapa, el ciclo de Krebs y la Cadena Respiratoria carecen de algunas de sus enzimas o contienen niveles muy bajos de actividad (45). Con el inicio de la esporulación, cuando se ha agotado la fuente de carbono fermentable, cesa la glicólisis y el esporangio depende totalmente para su desarrollo del metabolismo oxidativo; entonces las actividades del ciclo de Krebs y la Cadena Respiratoria alcanzan sus niveles máximos (18, 34), permitiendo al esporangio utilizar los ácidos orgánicos (acético y pirúvico principalmente) que acumularon durante la fase vegetativa.

Las mutaciones en diferentes enzimas del ciclo de Krebs son incompatibles con la esporulación (17). Aunque no se ha explorado la genética del sistema respiratorio, es de esperarse que algunas mutaciones tengan el mismo efecto adverso sobre la esporogénesis.

Podemos asegurar que el estudio del sistema respiratorio de bacterias esporulantes se halla en sus etapas iniciales, pues aún no se conoce con certeza su composición ni su organización y por tanto no resulta sorprendente que los estudios sobre su genética y regulación no hayan sido aún abordados.

A pesar de que desde los años 50's se reconoció el papel determi-

nante del metabolismo oxidativo durante la esporulación, el estudio de su sistema respiratorio no se abordó de manera sistemática, produciéndose sólo algunos reportes basados en análisis espectrales y efectos de inhibidores respiratorios que condujeron, en muchos casos, a conclusiones erróneas.

En un principio, lo que más interesó a los investigadores no fueron los cambios del SR durante el proceso mismo de la esporulación sino la composición de los estados inicial (célula vegetativa) y final (espora latente). Keilin y Hartree en 1949 (31) determinaron el contenido de citocromos de la espora latente de Bacillus subtilis y encontraron que su contenido era menor del 6% de la cantidad presente en la célula vegetativa. Nakada et al. (44) reportaron que extractos de esporas latentes o germinadas de B. cereus carecían de citocromos. Doi y Halvorson (14) estudiaron las enzimas respiratorias en homogenados de células de B. cereus y encontraron que las células vegetativas contenían citocromos del tipo b, c y a, mientras que en el caso de las esporas sólo pudieron detectar una débil banda de absorción para citocromo b, reducible sólo por ditionita. En la fracción soluble de la espora detectaron importantes cantidades de NADH-oxidasa, actividad que caracterizaron e identificaron como una flavoenzima reactiva directamente con oxígeno y estimulable por flavín mononucleótido (FMN).

Así, la conclusión de que la espora carecía de pigmentos respiratorios o al menos que se encontraban severamente disminuídos prevaleció por largo tiempo a pesar de evidencias que sugerían lo contrario: como el hecho de que la respiración de la espora era afectada por cianuro (44)

lo que apoyaba fuertemente la participación de citocromos, y por otro lado, el antecedente de que Keilin y Hartree habían demostrado la presencia de citocromos en esporas de B. subtilis (31). Fué hasta 1975 cuando Bohnweg y Douthit (9) demostraron la presencia inequívoca de cantidades importantes de citocromos en la espora de B. cereus. En esta ocasión se detectaron citocromos de los tipos a, b y c. Bohnweg y Douthit tomaron en consideración el alto índice refractivo de la espora ($n=1.53$) e hicieron sus mediciones en un medio con índice cercano: glicerol ($n=1.47$). En 1964 R.J. Downey (15) demostró la participación de la menaquinona 7 en el sistema respiratorio de B. subtilis estableciendo que su concentración no se afecta significativamente por el crecimiento anaeróbico; al mismo tiempo identificó una NADH-diaforasa soluble capaz de donar electrones al SR, aparentemente a nivel de la quinona.

En 1969 Miki y Okonuki (42) demostraron la presencia de citocromo c_{554} además del c_{550} en B. subtilis; este citocromo (c_{554}) no ha podido ser demostrado en B. cereus ni B. megaterium. En 1967 Broberg y Smith (7) demostraron en B. megaterium la presencia de un nuevo citocromo reactivo a CO con características espectrales de la citocromo oxidasa o presente en otras bacterias como E. coli (49).

En 1971 K. Tochikubo (54) realizó el primer estudio sobre la regulación del SR durante la germinación y crecimiento vegetativo de B. subtilis. Demostró la presencia de citocromos aa_3 , b, c (c_1) y o, reducibles por NADH en todos los estadios de la germinación y crecimiento. Al comparar la cinética de inhibición para dos cepas PCT 129 (con

tiene aa_3 y o) y la JB 69 (que parece contener sólo aa_3), encuentra en ambos casos sensibilidad parcial y semejante al KCN concluyendo que esta respiración CN-resistente pudiera depender de la autooxidación de la NADH-deshidrogenasa (respiración flavina), vía que no considera la participación de la quinona y los citocromos. Como se verá más adelante, esta sugerencia fue utilizada por otros autores para explicar la respiración resistente a cianuro en B. cereus, aunque en ningún caso se aportaron pruebas experimentales sobre la existencia de tal vía.

En 1972 y 1973 el grupo de Lundgren (36,16) publicó dos trabajos donde analizó la composición, organización y regulación del SR de B. cereus durante el crecimiento vegetativo y la esporulación; mostró un considerable incremento de citocromos y actividades respiratorias durante la esporulación. Su análisis espectral sugirió la presencia de una sola cadena respiratoria formada por los citocromos b_{555} , c_{550} y aa_3 , composición que resultó insuficiente para explicar el pobre efecto inhibitorio del cianuro sobre la respiración estimulada por NADH. Para explicar la incongruencia los autores acudieron a la solución dada por K. Tochikubo en B. subtilis (54), proponiendo también una vía alternativa (insensible al cianuro) derivada directamente de la NADH-deshidrogenasa.

Durante mi colaboración con el Dr. A.J. Andreoli de California State University. En los Angeles realicé dos trabajos (2,3) que tuvieron como objetivo central, comparar las capacidades metabólicas de los compartimentos del esporangio: endospora y célula madre. Estos estudios fueron posibles gracias a que poco antes, en ese mismo laboratorio, se

había diseñado una técnica que permitía separar los dos compartimentos (1).

En los estudios referidos demostramos que la endospora carece de un ciclo de Krebs funcional, pero en cambio sus membranas tienen capacidad para oxidar NADH y succinato, lo que indicaba la existencia de un sistema respiratorio. También pudimos demostrar la presencia de algunas enzimas del metabolismo de aminoácidos, destacando una de ellas: la aspartasa, que no fué detectada en el citoplasma de la célula madre. Se obtuvieron evidencias que sugerían que mientras en el compartimento de la célula madre ocurre una activa degradación de proteínas, en la endospora apenas es detectable la actividad de proteasas. Todo esto ha quedado como trabajo clásico (49), ya que por primera vez se demostraba la expresión diferencial del genoma de los dos compartimentos del esporangio, se sugería que la endospora era capaz de metabolizar aminoácidos pero no en apariencia, oxidar sus esqueletos carbonados debido a la ausencia de un ciclo de Krebs funcional. En cambio la endospora sí tenía capacidad en sus membranas para oxidar sustratos endógenos (respiración endógena) y sustratos añadidos (NADH y succinato).

Como continuación del trabajo iniciado en Los Angeles, consideré importante estudiar el Sistema Respiratorio de la célula esporulante. Al definir si la endospora y célula madre poseían el mismo sistema respiratorio, podrían esperarse diferencias cuali y cuantitativas debido a diferente disponibilidad de sustratos y tensión de oxígeno (menor para la endospora). Ya que el SR de la espora latente presenta considerables diferencias en la célula vegetativa, era importante definir en el curso de la morfogénesis los cambios que operaban en cada compartimento. Del mis

no modo resultaba muy atractivo aislar mutantes respiratorio deficientes que nos permitieran hacer correlaciones entre sus deficiencias genéticas y la capacidad para esporular. Así mismo podríamos esperar información importante de estudios de correlación entre variaciones en el cultivo como modificar la tensión de oxígeno, fuente de carbono y nitrógeno, presencia de aceptores alternos de electrones (nitrato, fumarato etc.) sobre la expresión del SR y la capacidad para esporular. De acuerdo con lo que se verá a continuación, estas preguntas ahora son más relevantes, ya que conocemos que el SR de B. cereus presenta alternativas de organización y expresión.

Los proyectos anteriores no pudieron ser iniciados de inmediato, pues pronto nos dimos cuenta que era necesario hacer un alto y aprender sobre el sistema respiratorio de B. cereus. No era posible iniciar estudios sobre regulación de la expresión del SR sin antes definir con mayor exactitud su composición y organización. En verdad los datos acumulados en la literatura sobre el SR de B. cereus (16,38), estaban más basados en la especulación y referencia a otros sistemas que en la demostración experimental.

Hemos reexaminado la composición y organización del sistema respiratorio de B. cereus (Escamilla, J.E. y Benito, M.C. 1984 Journal of Bacteriology. En prensa) y demostramos, en primer lugar, que la vía alterna propuesta por el grupo de Lundgren (16, 38) no existe, ya que la respiración NADH-dependiente es eliminada cuando se destruye específicamente la quinona endógena por luz U.V. (360 nm). En segundo lugar demostramos que el SR de B. cereus es más complejo que el propuesto por

Lang y Lundgren (38), ya que también contiene citocromos b_{562} y a_2 ; demostramos que estos dos citocromos son reactivos a CO y por tanto oxidasas potenciales. Por espectrofotometría diferencial también demostramos que en presencia de CN^- el citocromo o continúa oxidándose, por lo que se le puede considerar firme candidato para constituir la vía insensible a CN^- . Finalmente ensayamos la acción de inhibidores respiratorios de sitio I, II y III sobre las oxidasas de succinato, NADH y ascorbato + tetrametilenparafenilendiamina (TMPD) y al comparar sus efectos pudimos demostrar que la vía insensible a cianuro se deriva del citocromo b_{555} . Con todo esto propusimos un nuevo esquema de composición y organización para el SR de Bacillus cereus, en donde existen cuando menos dos vías alternativas, las dos constituidas por citocromos, una de ellas resistente al cianuro.

Comparando con otros sistemas encontramos que para el SR de B. megaterium, se ha sugerido la presencia de cit a_2 (26) y para el SR de B. subtilis se ha identificado el cit o (54) pero no el a_2 (personalmente creo que debe contenerlo). De ésto podemos concluir que los SR del género Bacillus son complejos, formados por vías alternativas de citocromos, las cuales pueden ser distinguidas por su sensibilidad al cianuro. Estos SR tendrían como oxidasas terminales (potenciales) a los citocromos aa_3 , o y a_2 .

Estudios más recientes nos sugieren que la expresión del SR de Bacillus cereus es profundamente afectada por la tensión de O_2 y por la velocidad de crecimiento y/o el tipo de la fuente de carbono empleada.

MATERIAL Y METODOS

Técnicas De Cultivo. En los estudios aquí descritos se utilizó una cepa silvestre de Bacillus cereus aislada por Andreoli et al (1). El medio de cultivo utilizado fue el medio G modificado, descrito por Hanson et al (24) este medio contiene además de una mezcla de sales, extracto de levadura al 0.1% y sacarosa al 0.1% como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente.

Otro medio utilizado fue el de casaminoácidos descrito por Sterlini y Maldelstam (51); este medio carece de fuente de carbono fermentable y utiliza hidrolizado de caseína al 0.8%, glutamato al 0.4%, D, L-Alanina al 0.2% y asparragina al 0.1%. Para los cultivos anaeróbicos se utilizó un medio rico (58) consistente en una mezcla de sales, sacarosa al 0.5%, extracto de levadura al 1.0%, casaminoácidos al 2% y nitrato de potasio al 0.1%.

Los cultivos se realizaron en un biofermentador New Brunswick modelo Magnaferm 14, conteniendo 12 litros de medio o un biofermentador con capacidad de 25 litros, diseñado y construido por el Centro de Instrumentos, UNAM. En ambos casos se usaron las mismas condiciones de cultivo: 30°C, 250 rpm. y flujo de aire de 8 y 16 litros/minuto. Para iniciar el cultivo, se utilizó un inóculo de 0.1 partes del volumen contenido en el biofermentador. El inóculo fue preparado de acuerdo con la técnica de cultivo activo de Collier (11), consistente en hacer cuando menos 5 re-
siembras (1/50 volumen) en fase logarítmica media, en nuestras condiciones cada 3 horas. De esta manera se selecciona la población con máxima

velocidad de crecimiento y se logra una buena sincronía durante la esporulación. Bajo estas condiciones el cultivo alcanza la etapa estacionaria entre las 3:30 y 4:00 hrs. de iniciado. El inicio de la esporulación coincide con el final del crecimiento logarítmico y se considera que ocurre 30 min. después de alcanzar el pH mínimo en el cultivo (acidificación durante el crecimiento).

Los cultivos fueron colectados por centrifugación en una centrífuga Sharples, modelo T1 de flujo continuo. Para el presente trabajo se decidió utilizar células de etapa logarítmica media ($A_{540}=1.25$) y del estado III de esporulación (3:30 hrs. después de iniciar la esporulación). La sincronía de los cultivos y las etapas de esporulación fueron determinadas por microscopía de contraste de fases. Las células colectadas fueron lavadas 3 veces con amortiguador de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo $MgCl_2$ 5mM y $CaCl_2$ 5.0mM (buffer TCM).

Ruptura y Fraccionamiento Celular: Entre 60 y 80 gs. de células (peso húmedo) fueron resuspendidas en 250 ml de amortiguador TCM y rotas en una prensa de Ribí (Ivan Sorvall, Inc. Conn. USA), a una presión de 30,000 psi y 4°C. El homogenado resultante fué incubado a temperatura ambiente por 15 min. con unos pocos cristales de DNAasa (Sigma DN100) con objeto de romper la viscosidad.

Las células enteras fueron eliminadas por centrifugación a 1,500 x g por 5 min. El sobrenadante fue centrifugado a 140,000 x g por 60 min. con el objeto de sedimentar las membranas, las cuales fueron lavadas 3 veces con buffer TCM bajo las mismas condiciones. Las membranas obtenidas fueron utilizadas inmediatamente o almacenadas en nitrógeno líquido.

Ensayos Enzimáticos.

Succinato Deshidrogenasa. El ensayo se hizo a 30°C, de acuerdo con la técnica descrita por Arrigoni y Singer (4) en 3 ml. de mezcla conteniendo succinato disódico 20mM, fosfato de potasio 50mM, pH 8.0, fenazina metosulfato 1.1mM (PMS), diclorofenolindofenol (DCPIP) 0.08mM, KCN 0.1mM y membranas (0.25 mg. de proteínas). La reacción se inició con la adición de los colorantes, la reducción del DCPIP fue seguida en el espectro fotómetro a 600 nm. El coeficiente de extinción molar usado para DCPIP fue de 21 (mM. cm.)⁻¹.

NADH Deshidrogenasa. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con Lang et al (38) en 1 ml. de mezcla de reacción conteniendo fosfato de potasio 50mM, pH 7.6, KCN 0.1mM, NADH 0.5mM, 0.08mM DCPIP y membranas (0.25 mg. de proteína). La reacción fue iniciada por la adición de DCPIP. La reducción del DCPIP fue seguida a 600 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar antes mencionado.

Succinato y NADH oxidasas. Las actividades fueron medidas por el método polarográfico, utilizando un oxímetro Yellow Springs modelo 53. El medio de reacción (3 ml.) contenía fosfato de potasio 50mM pH 7.4, membranas (1.5 mg. de proteína). Esta mezcla fue preincubada por 3 min. a 30°C antes de iniciar la reacción con los sustratos: NADH 0.5mM o succinato 20mM (concentraciones finales).

Citocromo c oxidasa. La actividad fue estimada polarográficamente usando tetrametilparafenilendiamina 0.1mM (TMPD) y ascorbato de sodio 10mM como sistema donador de electrones para el citocromo c. Se utili-

z6 el mismo sistema amortiguador que en el caso anterior, pero a pH 6.8. En todos los casos las actividades resultantes fueron corregidas por el pequeño consumo de O_2 que ocurri6 en ausencia de membranas.

Los inhibidores respiratorios utilizados fueron preparados de la siguiente manera: Atebrina y KCN en amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 7.4, rotenona, antimicina A y 2 heptil-4-hidroxiquinolina-N- 6xido (HOQNO) en etanol; el 3, 3-metilen-bis 4-hidroxicumarina (dicumarol) fue disuelto en KOH 30mM. Las cantidades de etanol o KOH utilizadas no tuvieron efecto sobre la actividad de las enzimas respiratorias.

An6lisis Espectral de Citocromos. Los espectros de absorci6n fueron determinados con un espectrofot6metro Aminco DW 2a. Para los espectros a temperatura ambiente se utilizar6n celdas de vidrio de 1.0 cm de paso de luz, mientras que los espectros de baja temperatura (nit6geno l6quido) fueron realizados en celdas de 2mm. de paso de luz. En ambos casos las preparaciones conten6an glicerol al 50%. Para la obtenci6n de los espectros en Steady State (equilibrio de flujo) las preparaciones fueron congeladas justo despu6s de a6adir y mezclar (vortex) a los sustratos. La oxidaci6n total de las membranas en la celda de referencia se obtuvo mediante la adici6n de unos cristales de persulfato de amonio y su reducci6n total se hizo con unos cristales de hidrosulfito de sodio (ditionita). Los sustratos empleados fueron NADH 5.0mM, succinato 40mM o ascorbato 10mM + TMPD 0.1mM. El espectro diferencial anaer6bico menos el aer6bico de las membranas reducidas por NADH en presencia de 0.1mM de KCN se obtuvo mediante la preincubaci6n de membranas con NADH 5.0mM + KCN 0.1mM por 15 min. en la celda de muestra (anaer6bica) mien-

tras que la celda de referencia (aeróbica), fue preparada con el mismo contenido justo antes de la congelación.

Para estimar la concentración de citocromos se utilizaron los espectros diferenciales ditionita reducido menos persulfato oxidado obtenidos a temperatura ambiente. Los pares de longitudes de onda y coeficientes de extinción molar en cada caso fueron: aa_3 , $E(603-630nm) = 24mM^{-1} cm^{-1}$; $cit\ b$, $E(563-575nm)=22mM^{-1} cm^{-1}$, $cit\ c$ $E(550-540nm)=19mM^{-1} cm^{-1}$, $cit\ a_2$ $E(630-615nm)=8.5mM^{-1} cm^{-1}$; $cit\ a_3-CO$, $E(590-605nm)=10.1mM^{-1} cm^{-1}$; $cit\ o-CO$ $E(415-430nm)=160mM^{-1} cm^{-1}$ (16, 38, 50, 54).

Fotoinactivación de la Menaquinona: La menaquinona natural de B. cereus (probablemente menaquinona 7), fue destruida por medio de luz ultravioleta de 360nm. Para este propósito las membranas del estado vegetativo o esporulante fueron depositadas como una capa fina, en una caja de Petri abierta. La caja fue colocada sobre hielo picado y bajo una lámpara de ultravioleta de onda larga (Cromato-vue, modelo cc-20, Ultraviolet Products Inc.) a la distancia de 10 cm. De la suspensión se tomaron muestras a diferentes tiempos de irradiación en las cuales se procedió a cuantificar la actividad de oxidorreductasas y oxidasas remanente. La actividad respiratoria dependiente de NADH fué reconstituida en las membranas irradiadas por medio de la adición de 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona). La menadiona se adicionó en solución etanólica de acuerdo con Bisshop y Konnings (6).

Inactivación de Deshidrogenasas: Las actividades de NADH y succinato deshidrogenasa fueron eliminadas por tratamiento alcalino, utilizando una modificación del método originalmente descrito por T, King

(32): 100 mg. de proteína membranal suspendidas en 50 ml. de amortiguador de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_3\text{BO}_3$ (50mM cada uno) fueron ajustados a diferentes pHs: 7.4, 8.4, 9.4, 10.4 y 11.4 con NaOH 0.1N, después de lo cual se centrifugaron a 140,000 x g por 60 min. Los precipitados membranales fueron recuperados y lavados 2 veces con amortiguador TCM y finalmente resuspendidos en 5 ml. del mismo amortiguador. A estas preparaciones se les midió la actividad remanente de oxidasas y oxidorreductasas.

Cinética para oxígeno. El efecto de la concentración de oxígeno sobre la velocidad de reacción de la NADH-oxidasa fue medida por 2 técnicas diferentes: (a) Desaturación de la oxidasa de acuerdo con la técnica descrita por Meyer (41), que consiste en calibrar el oxímetro con la mezcla de reacción saturada con aire y entonces iniciar la reacción con el sustrato (NADH 2.0mM) permitiendo que la reacción proceda hasta anaerobiosis. Durante el curso de la reacción la sensibilidad del registrador (Honeywell elektronik 195) y su velocidad de registro fue incrementada a pasos, hasta alcanzar una amplificación de 100x y una velocidad de 1.0 pulgadas por 10 seg. La velocidad de consumo de O_2 fue calculada a partir de las tangentes trazadas para cada paso de amplificación y la concentración de O_2 se calculó en esos puntos de acuerdo con la amplificación usada. (b) En la segunda técnica se llevó la mezcla de reacción a anaerobiosis usando sucesivamente: burbujeo de N_2 de alta pureza y después auto-consumo de O_2 estimulado con NADH. Una vez alcanzada la anaerobiosis (trazo estable a la máxima sensibilidad del registrador), se inició la reacción añadiendo cantidades definidas de agua saturada de aire (agitación prolongada) considerándose que la concentración de O_2 en

agua saturada de aire es de 200uM. La cantidad de agua añadida al ensayo no fue mayor del 10% del volumen total. En cada caso se hicieron las correcciones para los pequeños cambios de volumen. Los valores de K_m reportados fueron obtenidos mediante el método gráfico de Eadie-Hofstee.

Nutrientes y reactivos. Los nutrientes utilizados en la preparación de los distintos medios de cultivo fueron marca Bioxon. La Deoxirribonucleasa 1 (Sigma-DN 100), Tris base, los inhibidores respiratorios y los donadores de electrones fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Para todos los demás casos se utilizó indistintamente reactivos marca Baker o Merck en su correspondiente grado de "reactivo analizado".

RESULTADOS

Bajo las condiciones de cultivo aquí empleadas, la sincronía obtenida en la esporulación fue mayor del 90%; de esta manera considero que las características observadas para la etapa vegetativa y esporulante son confiables. Debido a que Bacillus cereus es insensible a las distintas técnicas diseñadas para generar protoplastos, las células fueron rotas por procedimientos mecánicos (Fraccionador Celular Ribi) así que debe considerarse que, aunque las preparaciones de membranas de células esporulantes están enriquecidas con membranas de célula madre, contienen cantidades significativas de membranas de endospora.

Oxidasas y Oxidorreductasas. Se compararon las preparaciones membranales de células logarítmicas ($A_{540}=1.25$) y esporulantes del estado III en su capacidad para oxidar sustratos (ver tabla I). Como ha sido descrito para varias especies de Bacillus (34,57) incluyendo B. cereus (38), las membranas de células esporulantes contienen niveles mayores en sus actividades respiratorias, siendo el NADH con mucho, el mejor donador fisiológico de electrones. Las membranas de células esporulantes tuvieron 7 veces más actividad de NADH oxidasa que las células vegetativas y esta diferencia se vio reflejada en los niveles de la NADH oxidorreductasa. Por otro lado, la actividad de TMPDH₂ oxidasa fue baja en las células vegetativas y se incrementó en más de 9 veces en las membranas de células esporulantes, sugiriendo que el incremento observado para la NADH oxidasa fue el resultado de una elevación paralela de la NADH deshidrogenasa y de la actividad terminal aceptora de electrones del siste-

TABLA I Actividades respiratorias presentes en preparaciones
membranales de Bacillus cereus.

ENZIMA	EDAD DE LAS CELULAS		RELACION EDO III/LOG
	ACTIVIDAD ESPECIFICA LOGARITMICA	EDO III	
OXIDORREDUCTASAS:			
Succinato: PMS-DCPIP	148	202	1.36
NADH: DCPIP	55	342	6.20
OXIDASAS:			
Succinato	18	18	1.00
NADH	43	296	6.88
Ascorbato + TMPD	35	346	9.88

Las células logarítmicas fueron cosechadas en $A_{540nm}=1.25$ y las de estado III de esporulación, 3.5 horas después de iniciada la esporulación. Las membranas fueron preparadas como se describe en métodos.

Las actividades específicas están expresadas como $\text{nmol (min. mg proteína)}^{-1}$ para las oxidorreductasas y como $\text{ng átomo } O_2 \text{ (min. mg proteína)}^{-1}$ para las oxidasas.

ma respiratorio.

La actividad de succinato oxidasa en membranas vegetativas fue de sólo un 40% de la actividad observada con NADH o TMPDH₂, ésta relación se volvió menor al 10% durante la esporulación. La oxidación de succinato utilizando O₂ como aceptor final (succinato oxidasa) fue de sólo un 9% de la actividad observada con PMS y DCPIP como aceptores. Una situación similar fué detectada en B. subtilis por Konings (36) quien propuso que la velocidad limitante en la respiración estimulada con succinato se debe a un débil acoplamiento de la succinato deshidrogenasas con la cadena respiratoria.

Además de NADH y succinato, se probaron otros sustratos fisiológicos (por ejemplo: DL-glicerol-3P, L-malato, D-lactato, isocitrato, acetato, piruvato, 2-oxoglutarato y NADPH). Estos sustratos no fueron oxidados por membranas de la fase vegetativa o esporulantes aún en presencia de NAD.

La oxidación del sustrato NADH por vesículas membranales y células bacterianas íntegras ha sido estudiado con cierto detalle. Hampton y Freese (23) concluyeron sobre la base de una investigación cinética, que la oxidación de NADH ocurre en la cara interna de la membrana. Por otro lado W. Konings (36) demostró que vesículas "right side out" y células intactas de B. subtilis, oxidan NADH en un proceso que puede acoplarse al transporte de solutos. Sobre este mismo punto, Bergsma et al (5) llegaron a la conclusión de que la oxidación del NADH en la cara externa de la membrana ocurre sin la participación de la NADH-deshidrogenasa, postulando que los electrones del NADH son directamente transferi

dos a la menaquinona (MK7). Debido a las observaciones anteriores decidí que era importante definir cual era la participación cuantitativa de la NADH-deshidrogenasa de nuestras preparaciones membranales en la oxidación del NADH. Si se supone que la NADH-deshidrogenasa es el paso limitante en la oxidación de NADH, entonces la inactivación selectiva de esta deshidrogenasa debe causar una disminución paralela en la actividad de NADH oxidasa sin afectar significativamente la actividad aceptora terminal de electrones del SR (TMPDH₂ oxidasa).

La figura 3 muestra que la incubación de las preparaciones membranales a pHs alcalinos causa una disminución paralela en la actividad de NADH-deshidrogenasa y NADH-oxidasa. A pH 10.4 más del 90% de las actividades NADH-dependientes han sido eliminadas, mientras que en las mismas condiciones, la actividad TMPH₂ oxidasa ha descendido en sólo un 25%. Las actividades de succinato oxidorreductasa y oxidasa son también inactivadas por el tratamiento alcalino sólo que a pH más alcalino. Estos resultados y el fuerte efecto inhibitorio de la atebrina sobre la oxidación de NADH (se verá más adelante) no concuerdan con los resultados obtenidos por W. Konings (36) y Bergsma et al (5) en vesículas "right side out" de B. subtilis. La explicación probable para esta discrepancia podría ser que nuestras vesículas (obtenidas por rompimiento mecánico sean "in side out" y por lo tanto en ellas el sitio activo de la NADH-deshidrogenasa estaría expuesto al sustrato. En este sentido Bronner et al (8) demostraron que las vesículas de B. subtilis preparadas por lisozioma expulsan Ca²⁺ y concentran glutamato ("right side out") mientras que las vesículas preparadas en la prensa de French hacen lo contrario.

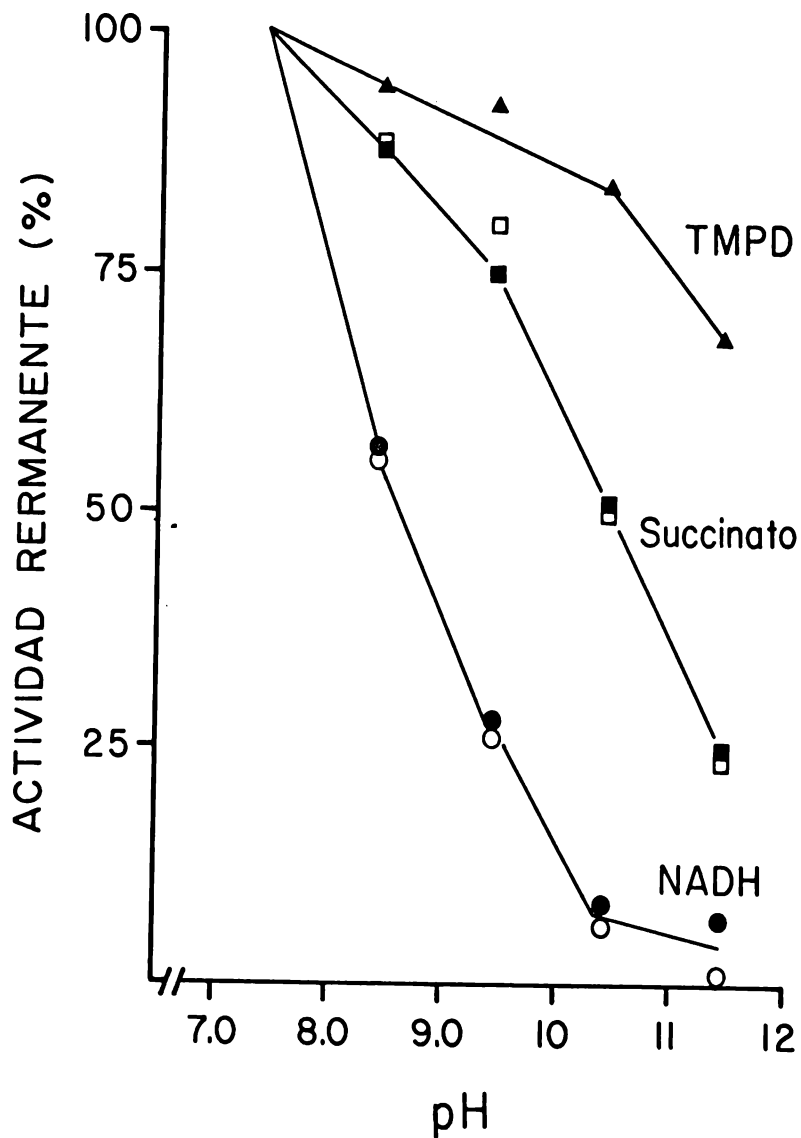


Fig. 3 Efecto del tratamiento alcalino (ver métodos) sobre las actividades enzimáticas respiratorias asociadas a las membranas de células esporulantes de *B. cereus*. Las suspensiones membranales fueron ajustadas con NaOH a los pHs indicados e inmediatamente centrifugadas a 140,000 x g durante 30 minutos. Los precipitados fueron lavados una vez y resuspendidos en el mismo amortiguador (TCM). Las membranas tratadas fueron utilizadas para medir las siguientes actividades: NADH-oxidasa (●), NADH-oxidoreductasa (○), succinato-oxidasa (■), succinato-oxidoreductasa (□) y TMPDH2-oxidasa (Δ). Las actividades específicas señaladas a pH 7.4 fueron similares a las registradas en la tabla I.

A partir de las membranas inactivadas por pH alcalino y una preparación soluble de succinato deshidrogenasa (solubilizada por BRIJ-36T, reemplazando después este detergente por colato de sodio) fue posible reconstituir las actividades de succinato deshidrogenasa y oxidasa (resultados no mostrados) lo que sugiere que el tratamiento alcalino afecta de manera selectiva a las deshidrogenasas de NADH y succinato.

Papel de la Quinona en el SR de B. cereus. Un sistema respiratorio como el propuesto (Respiración Flavina) por Felix y Lundgren (16) para B. cereus, presupone que la quinona endógena no es un paso obligado en la respiración NADH-dependiente, ya que los electrones podrían ser derivados directamente desde la deshidrogenasa hacia el oxígeno sin participación de una vía quinona-citocromos. Así, la existencia de una vía no-quinona en el SR de B. cereus puede ser probada por inactivación selectiva de la quinona endógena.

La figura 4 muestra que cuando la quinona endógena es destruida por luz ultravioleta (360nm) en membranas de células vegetativas (A) o esporulantes (B), la respiración NADH-dependiente es abolida y por otro lado, las actividades de NADH deshidrogenasa y TMPD oxidasa no sufren cambio. Al mismo tiempo, la reducción de citocromos dependiente de NADH también es drásticamente afectada después de la irradiación u.v. (figura 5). La adición de menadiona 200uM a las membranas inactivadas por U.V. restaura plenamente su capacidad respiratoria (no se muestra) y al mismo tiempo la capacidad del NADH para reducir a los citocromos del SR (Figura 5).

La respiración dependiente de succinato fué también afectada por la luz U.V.; sin embargo, en el caso de las membranas de células esporu-

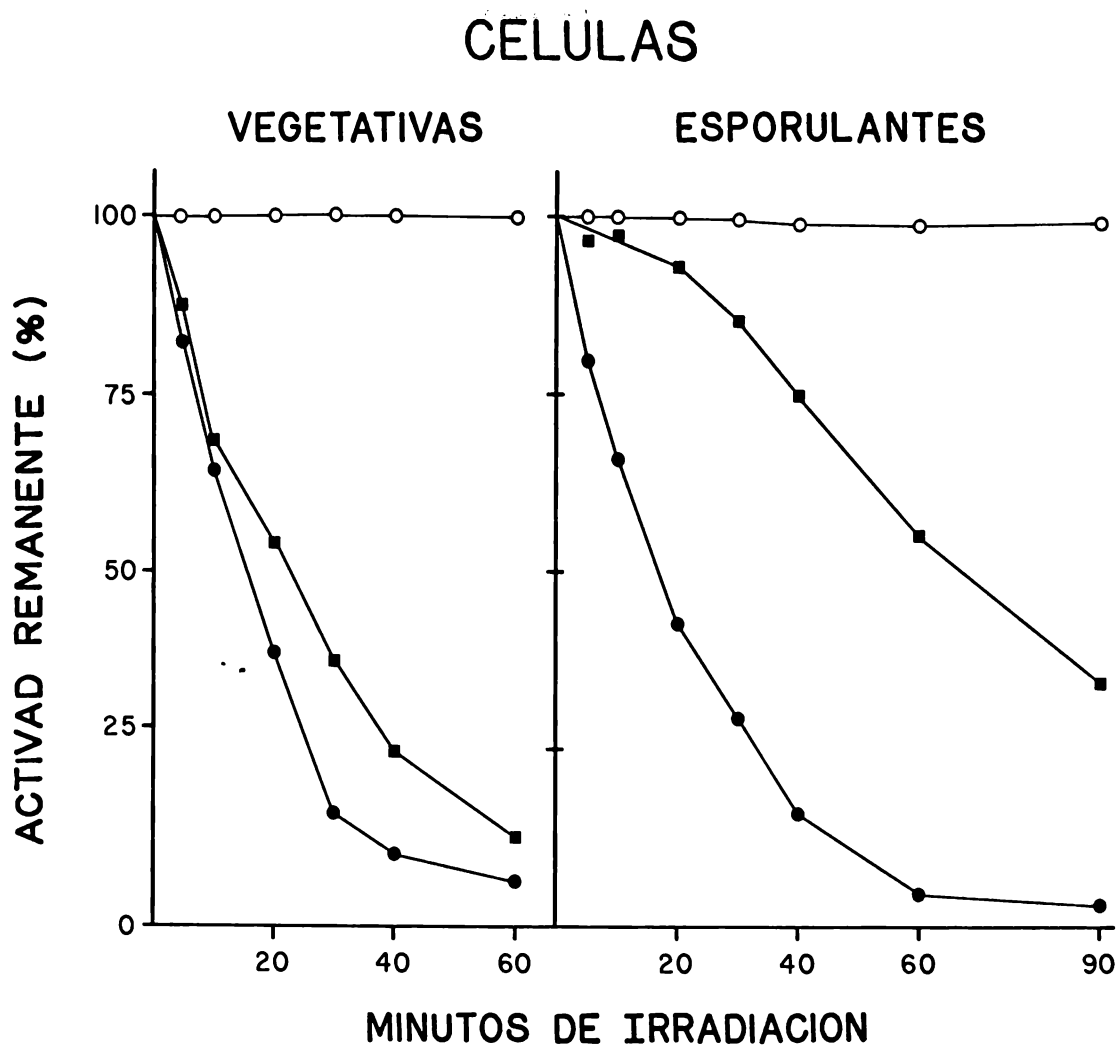
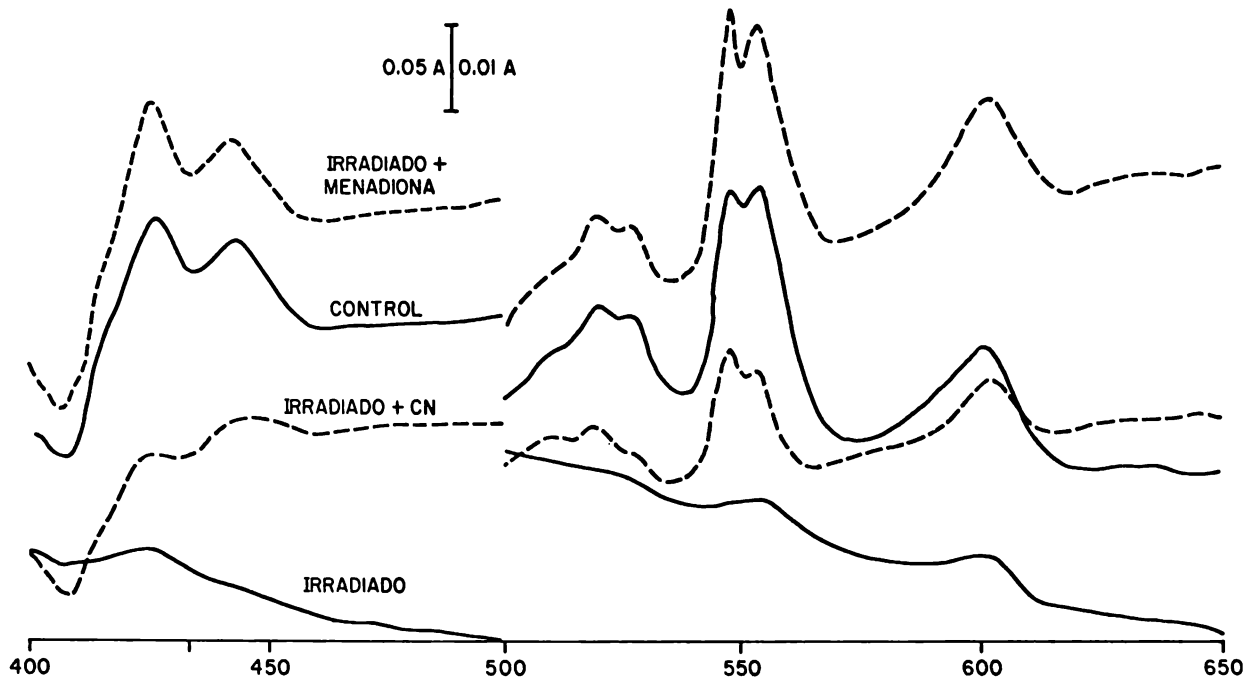


Figura 4 Efecto de la fotoinactivación (U.V.360nm) de la menaquina endógena sobre las actividades respiratorias asociadas a membranas de B. cereus. Membranas de células vegetativas (A) o esporulantes (B) fueron expuestas a la luz ultravioleta como se describe en métodos. A los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se ensayaron las siguientes actividades: NADH-oxidasa (●), succinato-oxidasa (■). Las actividades de NADH-deshidrogenasa, succinato-deshidrogenasa y TMPDH2-oxidasa no fueron afectadas por el tratamiento y se representan juntas (○). Las actividades específicas en membranas no tratadas fueron similares a las registradas en la tabla I.



EDAD: † 3.5 UV 340 nm/90 min
 NADH RED Vs OXIDADO

Fig 5 Espectros diferenciales (NADH-red menos ox) de membranas inactivadas por luz ultravioleta. Reconstitución con menadiona 200uM. La capacidad del NADH para reducir el SR es comparada en membranas normales y membranas fotoinactivadas con U.V. de 360nm por 60 min.

Se muestra el efecto del KCN 0.1 mM o de la menadiona 200 mM sobre el patrón de reducción evocado por NADH en las membranas fotoinactivadas. Para estos experimentos se utilizaron membranas (5 mg de proteína) de células de la fase esporulante.

lantes (fig. 4B) la inactivación no fue total y un 32% de la actividad específica original sobrevivió después de 90 min. de irradiación. Si consideramos que en las membranas de células esporulantes la capacidad para oxidar succinato es cuando menos 10 veces menor a la capacidad para oxidar NADH, se verá que aún después de destruir una cantidad importante de quinona endógena, todavía seguirá siendo la succinato deshidrogenasa el paso limitante en la velocidad de respiración estimulada con succinato.

Del experimento anterior podemos derivar conclusiones importantes:

a) La quinona endógena es indispensable para la respiración NADH-dependiente, luego entonces el "by pass flavina" propuesto por Lang y Lundgren (38) en B. cereus no existe.

b) Si se acepta que la succinato deshidrogenasa es con mucho, la velocidad limitante para la oxidación de succinato, entonces podemos considerar que la quinona es también indispensable para su oxidación.

c) El tratamiento con luz U.V. afecta de manera específica a la quinona, como lo sugiere el hecho de que las actividades de NADH y succinato deshidrogenasas así como TMPDH2 oxidasa no sean afectadas por el tratamiento. En favor de este planteamiento está el hecho de que la menadiona es capaz de reconstituir plenamente la capacidad para oxidar NADH y reducir citocromos a partir de este sustrato.

d) La no existencia de un "by pass flavina" en el SR de Bacillus cereus obliga a plantear una explicación diferente para la respiración resistente a cianuro y se hace necesario hacer una búsqueda cuidadosa de rutas citocrómicas alternativas que pudieran explicar satisfactoriamente la resistencia al inhibidor.

Citocromos asociados a Membranas de Células Vegetativas y Esporulantes. En la figura 6 se muestran los espectros diferenciales (red menos ox) de baja temperatura que se obtuvieron con membranas de la fase vegetativa (A) y fase esporulante (B). Después de reducir con ditionita se observan los picos típicos para los citocromos: b_{555} (462, 527 y 555nm), c_{548} (417, 519 y 549nm) y aa_3 (443 y 602nm). En el mismo trazo se aprecia asimetría (alrededor de 562nm) en el gran pico de b_{555} y una pequeña zona de absorbencia alrededor de los 630nm. En los trazos correspondientes de NADH (trazos b) la asimetría en la zona de 562nm es más evidente y se vuelve un hombro prominente cuando se utiliza Asc + TMPD como reductores (trazos c). Así, a medida que los niveles de reducción del cit b_{555} son menores (Ditionita > NADH > ASC. + TMPD) se desmascara con claridad un pico a 562nm y de acuerdo con antecedentes en la literatura (7, 50, 57), la absorción entre 560 y 564nm corresponde a un citocromo de tipo b llamado citocromo o. Por el momento prefiero llamar a este citocromo b_{562} . Con respecto a la pequeña zona de absorbencia a 630nm que se observa en todos los trazos, ésta podría ser atribuida a la presencia de cantidades muy pequeñas de citocromo a_2 también llamado cit d (26). El coeficiente de extinción molar para el citocromo a_2 reducido es $E(603-630)=8.5 \text{ (nM. cm)}^{-1}$, el más bajo conocido para un citocromo respiratorio, de esta manera, a menos de que se encuentre presente en cantidades importantes es muy difícil detectarlo, más adelante demostraré que bajo ciertas condiciones de cultivo la concentración de citocromo d aumenta considerablemente al punto que se le puede identificar como un pico de absorción bien definido, por el momento, sólo afirmaré que en

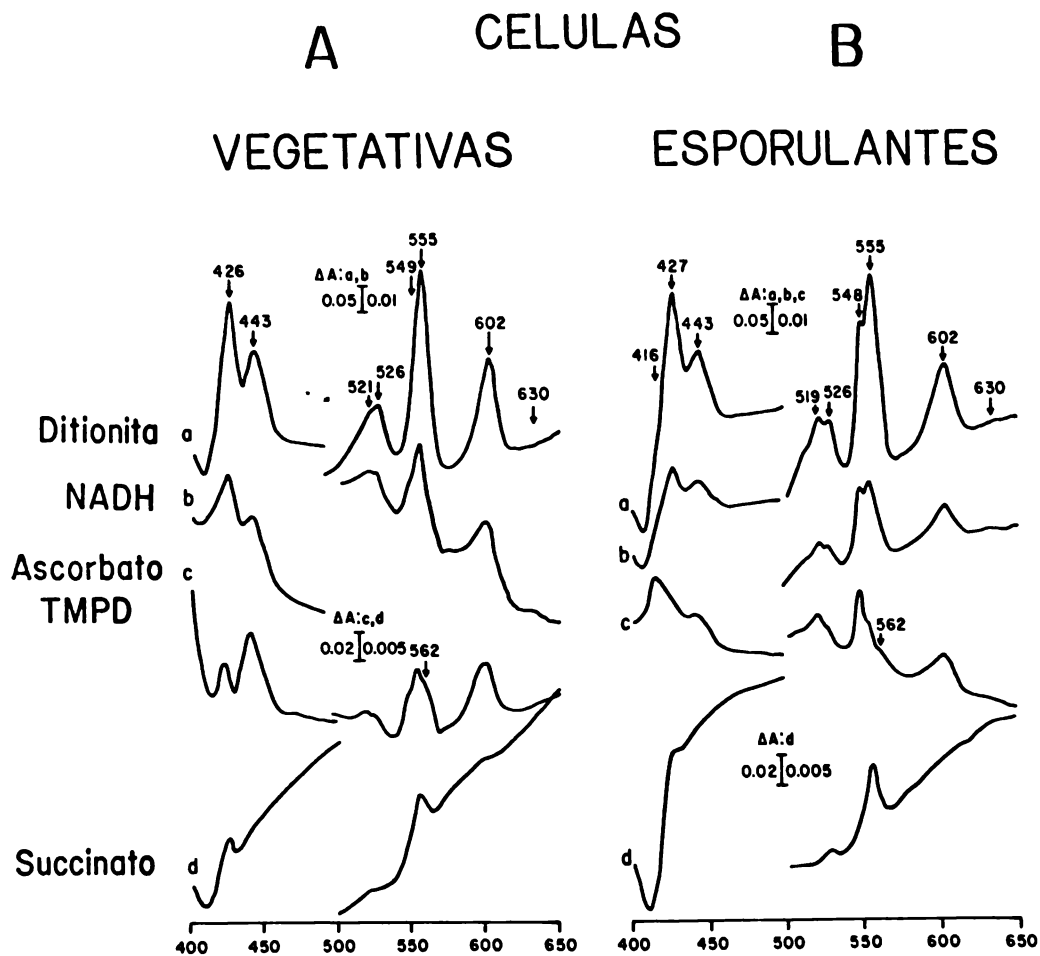


Fig. 6 Espectros diferenciales (red menos ox) a baja temperatura de membranas de la fase vegetativa (A) y fase esporulante (B). Los agentes reductores indicados fueron mezclados con las membranas (12 mg de proteína en A y 5.0 mg de proteína en B) y sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido. La celda de referencia fué preparada con la misma cantidad de membranas previamente oxidadas por agitación vigorosa. Los reductores en los trazos a, b, c y d fueron ditionita de sodio, NADH, ascorbato + TMPD y succinato disódico, respectivamente, añadidos a las concentraciones señaladas en métodos.

condiciones aerobias de cultivo en medio G modificado, la débil banda de absorción que se observa a 630nm debe corresponder a cantidades muy límitadas de cit.d.

Debido a la sobreposición de los picos de absorción de los citocromos de tipo b y c no es posible determinar con exactitud los niveles de reducción "steady state" evocados por cada uno de los sustratos probados; sin embargo, sí podemos hacer una estimación grosera de tales niveles. El NADH, en membranas vegetativas reduce 51, 90 y 70% del total (estimado por ditionita) de los citocromos b, c y aa₃ respectivamente; en células esporulantes estas cifras son de 51, 81 y 75%. Al utilizar ascorbato + TMPD los niveles de reducción para los citocromos c y aa₃ fueron similares a los anteriores, mientras que el pico de citocromo b sólo se redujo en un 25-30%. Por otro lado, los niveles "steady state" evocados por succinato fueron muy pobres, especialmente en células esporulantes (ver trazo d en la fig 6) siendo menores al 10% para todos los citocromos. Este resultado fue congruente con los pobres niveles de succinato-oxidasa detectados en membranas de células vegetativas y esporulantes (ver tabla I). A estas resultantes podemos sumar el experimento mostrado en la figura 7 donde se muestra que en presencia de KCN 0.1mM los niveles de reducción evocados por succinato se incrementan de manera dramática; el mismo efecto se produce cuando el espectro de reducción con succinato se determina en condiciones anaeróbicas (resultado que no se muestra). Todo lo anterior es congruente con la idea de que el flujo de electrones entre succinato deshidrogenasa y el SR es el paso que severamente limita la respiración estimulada por este sustrato.

~

La concentración individual de citocromos presente en membranas de células vegetativas y esporulantes fue estimada a partir de los espectros diferenciales (red. menos ox. y red. + CO menos red.) determinados a temperatura ambiente utilizando ditionita como agente reductor y persulfato de amonio como oxidante (estos espectros no se muestran). Hay que considerar que las determinaciones de cit. b y c no son exactas debido al problema de sobreposición de picos comentado anteriormente. En la tabla II se puede apreciar que la concentración de citocromos es considerablemente superior en las membranas de células esporulantes que en sus contrapartes vegetativas. El rango de incremento va de 1.74 en el caso de cit. o-CO hasta 4.33 veces en el caso de citocromo c_{548} . La concentración del cit. b_{562} no pudo ser estimada en el espectro ditionita-red menos persulfato-ox. debido a que su pico queda totalmente incluido en el gran pico de b_{555} . La concentración de a_2 fue tan pequeña que no fue posible hacer un cálculo cuantitativo confiable por lo que se reporta como cantidades traza en dicha tabla. Finalmente, como se verá más adelante, los espectros con monóxido de carbono revelaron la presencia de lo que parece ser un complejo entre cit. o y CO, que tiene su máximo de absorción a 415-417 nm y una mínima a 430 nm y 561 nm.

Identificación de Citocromos Reactivos a Monóxido de Carbono. La identificación tentativa de los citocromos b_{562} y a_2 nos condujo a realizar el análisis espectral de sus complejos con CO correspondientes. La incubación con agitación de las membranas reducidas por ditionita bajo una atmósfera saturada con CO reveló la aparición de 2 complejos citocromo-CO en la región espectral de Soret (figura 8).

Tabla II Concentración de citocromos asociados a preparaciones membranales de Bacillus cereus

CITOCROMO	EDAD DE LAS CELULAS		RELACION EDO III/LOG
	LOGARITMICA	EDO III	
a + a ₃	0.11	0.28	2.50
b ₅₅₅	0.12	0.45	3.75
c ₅₄₈	0.15	0.65	4.33
a ₂	trazas	trazas	---
a ₃ -CO	0.14	0.25	2.08
o-CO	0.05	0.09	1.76

La concentración de citocromos fue calculada de los espectros diferenciales (ditio-red menos persulfato-ox) corridos a temperatura ambiente. Para los complejos de a₃-CO y o-CO se usaron los correspondientes espectros de monóxido de carbono. En ambos casos la concentración de citocromos se expresa como nmol por mg de proteína membranal. Se usaron los coeficientes de extinción y pares de longitud de onda señalados en métodos.

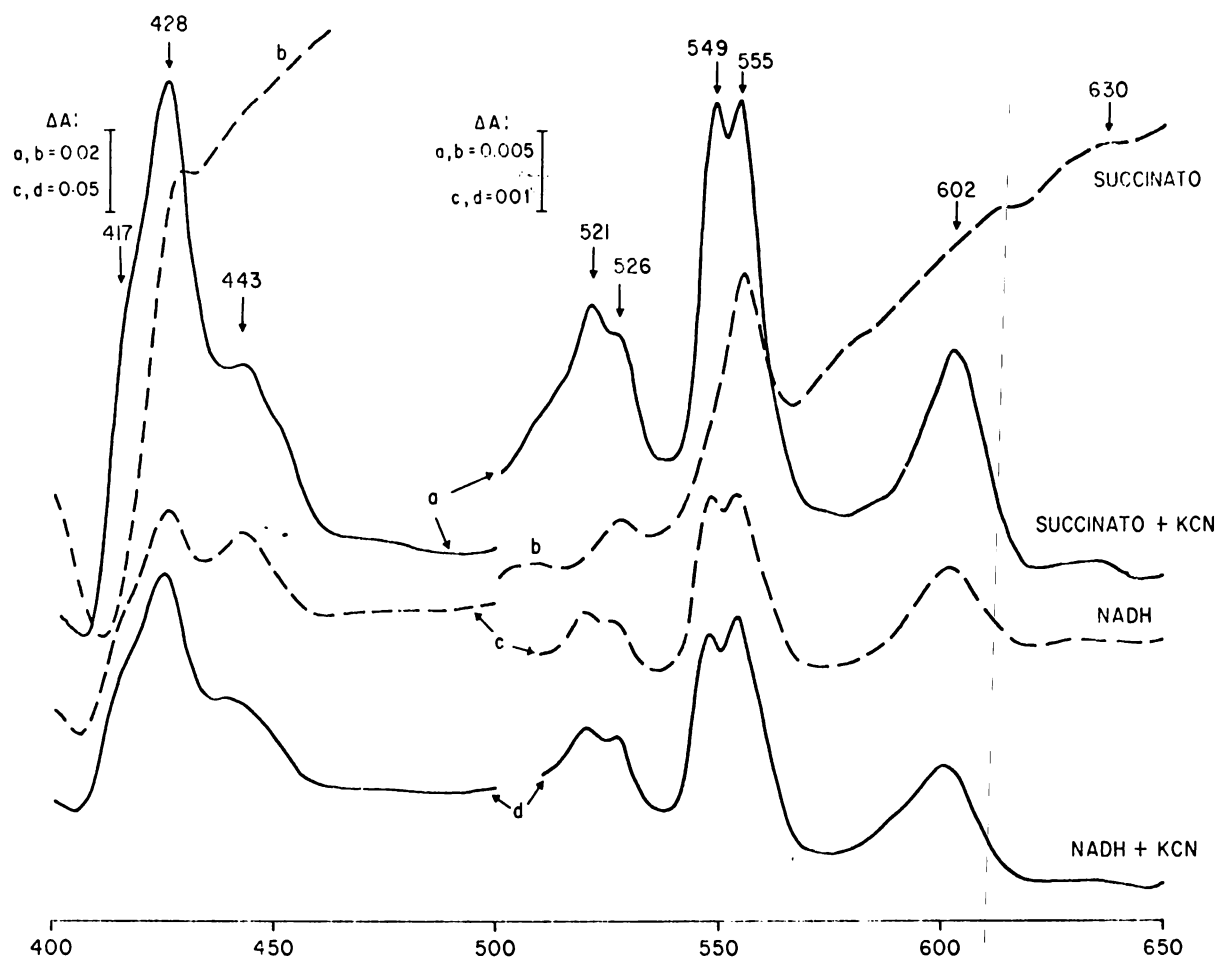


Fig. 7 Efecto del KCN 0.1mM sobre el patrón de reducción evocado por succinato en membranas de células esporulantes. Membranas (5 mg de proteína) oxidadas al aire por agitación vigorosa fueron mezcladas con succinato disódico 20mM (trazos a y b) o NADH 2.0mM (trazos c y d). Los espectros en trazo continuo son los obtenidos en presencia de KCN 0.1mM. En todos los casos la celda de referencia contenía membranas oxidadas al aire. Referencia y muestra fueron congeladas inmediatamente después de su preparación.

En los primeros minutos de incubación, se identificó claramente el espectro de cit. a_3 -CO (picos a 430 y 592, valle 445nm). Exposiciones más prolongadas a CO, producen un pico creciente en la región de 410-417nm y un decremento concomitante en el pico de 430 nm. Esta conducta sugiere la formación lenta de un complejo entre el cit. o y el CO (pico a 417nm, valle a 430nm). Resultados similares en B. megaterium fueron reportados inicialmente por Broberg y Smith (7) y confirmados más tarde por Hogarth et al. (26).

Con respecto al cit. a_2 , es bien conocido que su reacción con CO provoca el corrimiento de su pico de reducción hacia longitudes de onda un poco mayores (50,59). Un muy pequeño pico (643nm.) con estas características puede ser observado en la figura 8. Nuevamente advierto que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, éste citocromo se encuentra en cantidades traza y por tanto es muy difícil su identificación.

Efecto de Inhibidores Respiratorios. Los resultados descritos hasta el momento, sugerían la presencia de un sistema respiratorio ramificado compuesto por citocromos en B. cereus y con el objetivo de dar apoyo experimental a este planteamiento decidí analizar la cinética de inhibición para varios inhibidores respiratorios sobre la respiración estimulada por NADH succinato y ascorbato + TMPD. Se probaron los siguientes inhibidores Atebrina (inhibidor de deshidrogenasas FAD-dependientes), Dicumarol (análogo estructural de quinonas), Antimicina A y HOQNO (inhibidores del segmento b-c) y Cianuro (inhibidor de la citocromo c oxidasa).

Como se muestra en la figura 9A, ningún inhibidor fue capaz de su-

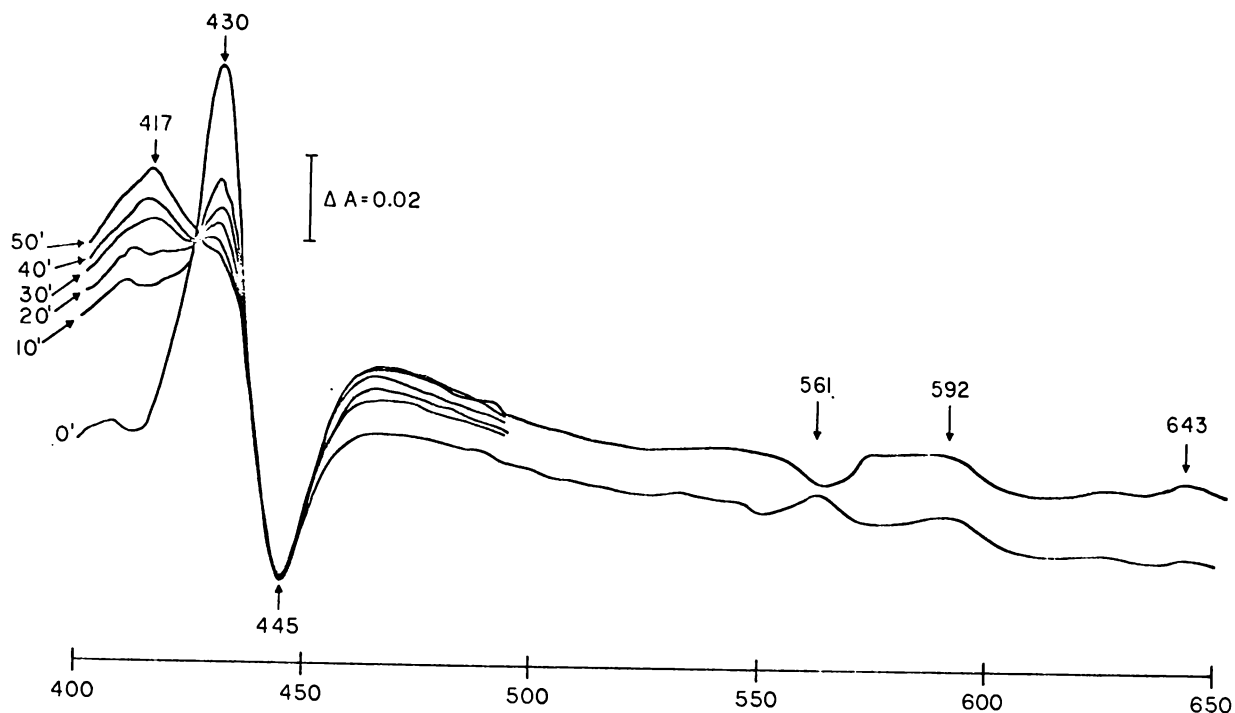


Fig. 8 Espectros diferenciales con monóxido de carbono (ditionita-red + CO menos ditionita red) de las membranas de células esporulantes. Después de agregar un poco de ditionita sólida a una suspensión membranal (15 mg de proteína) se diluyó 3 veces con amortiguador saturado con aire (referencia) o amortiguador saturado con CO (muestra). La celda de muestra se mantuvo (con agitación) bajo atmósfera de CO y se registró su espectro a los tiempos indicados en cada trazo. Los espectros y preparación de las celdas fueron realizados a temperatura ambiente.

primir completamente la oxidación de NADH; sin embargo, la Antimicina A y el HOQNO fueron los más efectivos, causando un 80% de inhibición a concentraciones cercanas a 100uM. El mismo nivel de inhibición se obtuvo con atebrina y dicumarol pero a concentraciones cercanas a 300uM. Contrastando con lo anterior, el cianuro, inhibidor clásico de citocromo c oxidasa tuvo un efecto inhibitorio muy pobre sobre NADH-oxidasa; más del 65% de la actividad fué resistente a concentraciones de KCN hasta de 1.0mM. La curva dosis-respuesta para CN sobre NADH-oxidasa fue claramente bifásica y esto sugiere la participación de cuando menos 2 vías de transporte de electrones con muy diferente sensibilidad al CN^- . Esta conclusión fue confirmada por los resultados que se observan en la figura 9B donde se analiza la cinética de inhibición para CN^- sobre las actividades de NADH, succinato y TMPH_2 oxidasas. Mientras que las actividades con NADH y especialmente con succinato, fueron resistentes al CN^- , la respiración estimulada por Ascorbato + TMPD fue muy sensible, mostrando un valor de $K_i=2.5\mu\text{M}$ para KCN.

Si consideramos que los electrones de TMPH_2 son donados específicamente al cit. c, podemos concluir que la vía sensible al CN estaría formada por cit. c y cit. aa_3 . Por otro lado, el hecho de que los inhibidores de sitio I y II hayan inhibido efectivamente la respiración estimulada por NADH hace pensar que el SR de B. cereus se ramifica entre cit. b_{555} y cit. c_{550} y por lo tanto, la vía no sensible a CN debe derivarse del cit. b_{555} .

Constituyentes de la Vía Insensible a CN^- : En los experimentos anteriores se demostró que la vía sensible a CN^- estaba constituida por

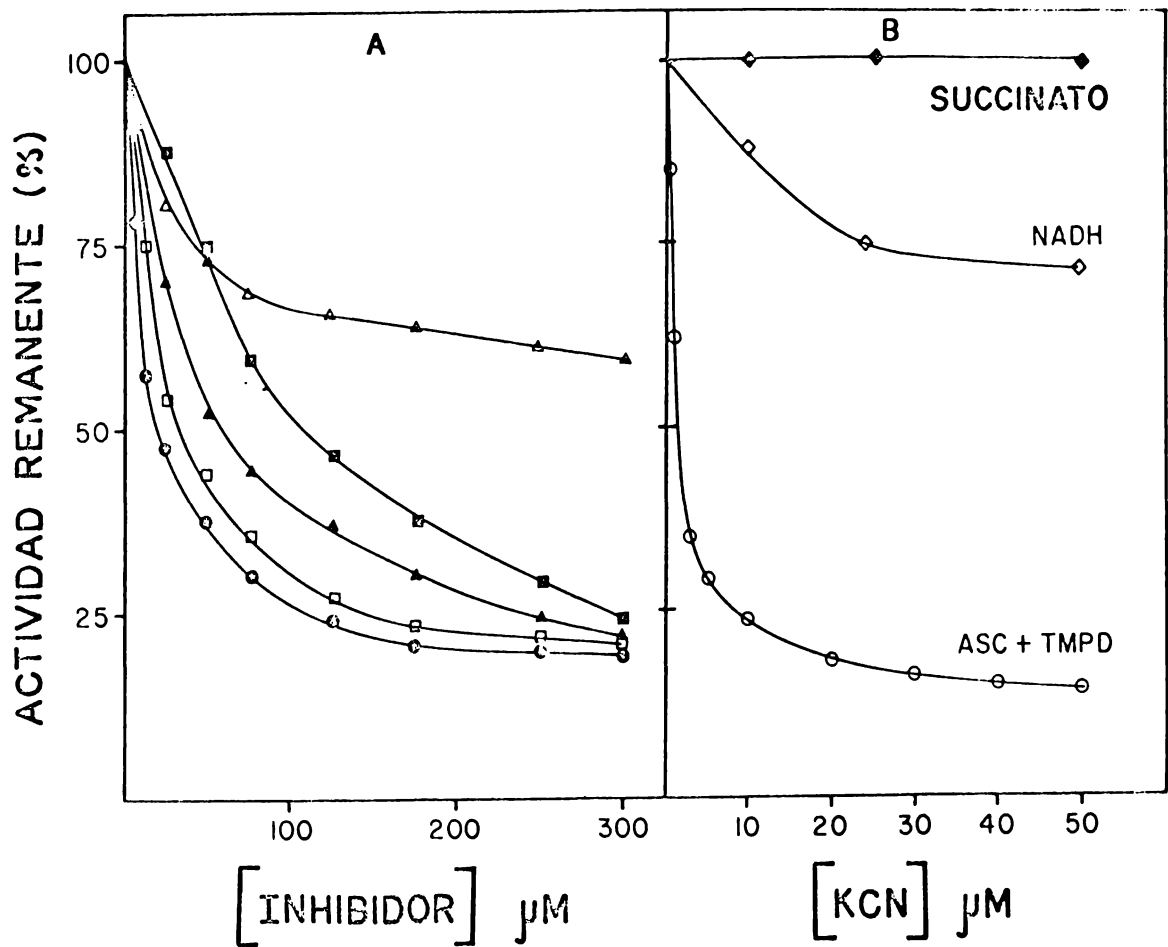


Fig. 9 Efecto de inhibidores respiratorios (A) sobre la actividad de NADH-oxidasa de membranas de células esporulantes. Las membranas (0.5mg de proteína) fueron preincubadas a 30°C por 3 min., en 3 ml. de amortiguador TCM conteniendo las concentraciones indicadas de inhibidores respiratorios. Los inhibidores probados fueron: HOQNO (o), antimicina A (◻), atebriina (∠), dicumarol (◻), y KCN (∇). La reacción fue iniciada con NADH a una concentración de 2.0mM. En el panel B se muestra el efecto de la concentración de KCN sobre las actividades de NADH-oxidasa (∠), succinato oxidasa (◊) y TMPH2 oxidasa (o). Bajo las mismas condiciones de ensayo arriba descritas.

cit. c_{550} y aa_3 . Por exclusión podríamos pensar que los citocromos b_{562} y a_2 constituirían la vía insensible al CN; sin embargo, era necesario demostrarlo experimentalmente. Se decidió utilizar una técnica (26) espectrofotométrica que permite visualizar como picos de absorbencia aquellos citocromos que continúan siendo oxidados en presencia de CN^- . De acuerdo con esto, sí se obtiene el espectro diferencial anaeróbico vs. aeróbico de las membranas reducidas por NADH en presencia de KCN 0.1mM, sólo aquellos citocromos que continúan siendo oxidados (celda de referencia, aeróbica) formarían picos de absorción debido a que todos los citocromos en la celda experimental (anaeróbica) se encuentran totalmente reducidos.

La figura 10 muestra que en la presencia de CN^- , sólo el cit. b_{562} continúa siendo oxidado; los picos para citocromos c_{550} y aa_3 no aparecen significativamente oxidados, lo que corrobora la conclusión de que estos dos citocromos forman la vía sensible al CN^- . En el caso del cit. a_2 , desgraciadamente su pequeña concentración y pequeño coeficiente de extinción molar no permiten detectarlo oxidado bajo esta técnica. Antecedentes en la literatura (10, 22, 47, 59) nos demuestran que la presencia de cit. a_2 siempre puede asociarse a la respiración insensible a CN^- .

Más adelante veremos que en condiciones de cultivo microaerofílicas, la concentración de los citocromos c_{550} y aa_3 se reduce drásticamente y con ellos la respiración sensible a CN^- y al mismo tiempo, se incrementa notablemente la concentración del cit. a_2 prevaleciendo la respiración insensible al CN.

Efecto de la Concentración de Oxígeno sobre la Velocidad de Respiración. Como se dijo anteriormente, en el capítulo de Introducción, las oxi

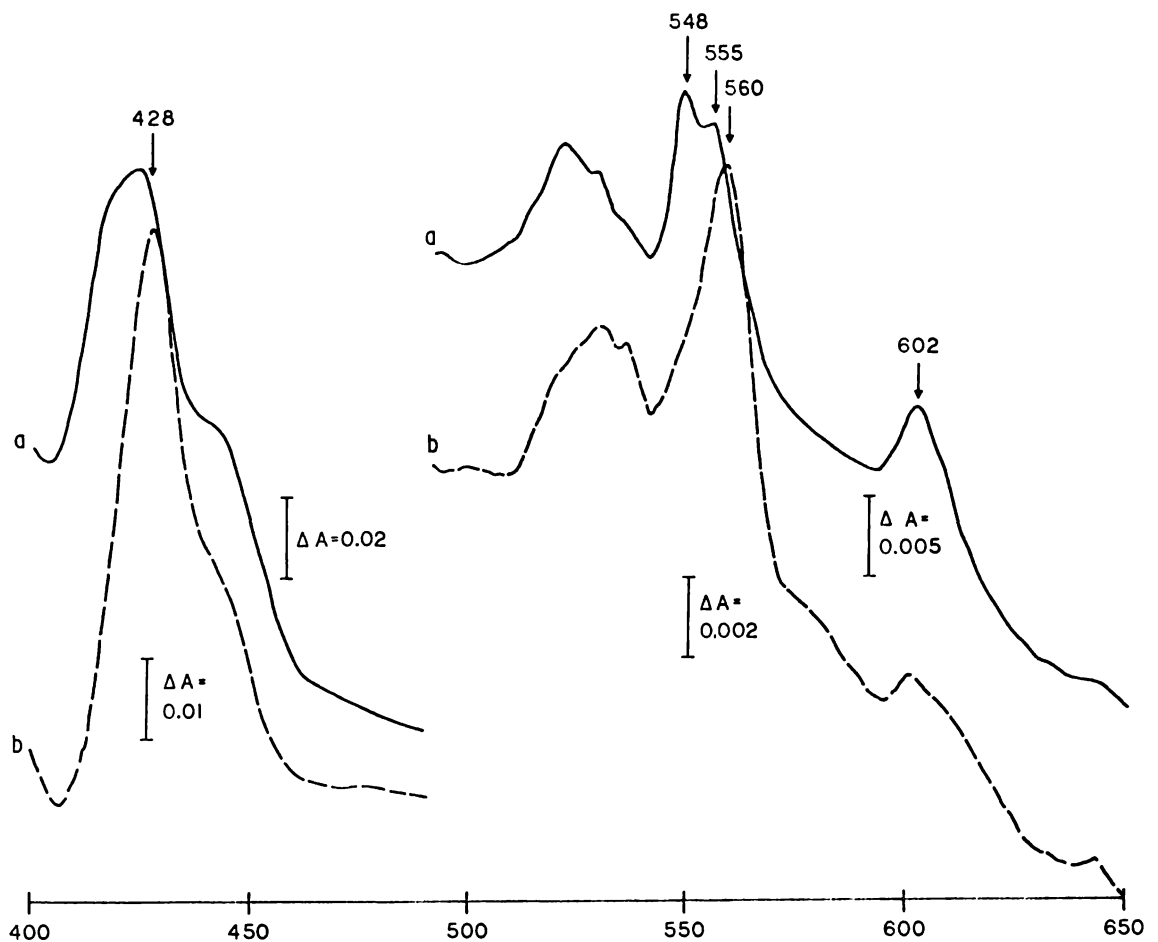


Fig. 10 Espectro diferencial (anaeróbico menos aeróbico) de las membranas de células esporulantes reducidas por NADH en presencia de KCN 0.1mM. Las celdas de muestra y referencia contenían en 0.4 ml. volumen final: 0.5mM NADH, 0.1mM KCN y membranas (5 mg de proteína) en amortiguador TCM. La celda de muestra, con la mezcla reacción completa, fue incubada a 30°C por 15 min. para volverla anaeróbica. La referencia aeróbica fue preparada e incubada bajo las mismas condiciones, excepto que el NADH fue agregado justo antes de la congelación. Su espectro se muestra como trazo discontinuo. El espectro de trazo continuo es el diferencial de NADH (red menos ox) que se muestra para comparación.

dasas terminales pueden distinguirse no sólo por su distinta sensibilidad a inhibidores sino también por su diferente afinidad hacia el O_2 . La K_m de los citocromos oxidasas bacterianos ha sido determinada en varias especies encontrándose valores que van de $10^{-6}M$ a $10^{-8}M$ (52, 53) y se ha visto que los valores de afinidad se pueden correlacionar con la composición de citocromo oxidasas en cada especie; por ejemplo, en el caso de S. typhimurium (39) la única oxidasa presente es cit. o y su K_m para O_2 es de $7 \times 10^{-7}M$. En el caso de E. coli que contiene cit o y a_2 , se pueden distinguir dos pendientes en la cinética para O_2 (48). La primera de baja afinidad, corresponde a cit. o con una K_m de $2 \times 10^{-7}M$ y la segunda de alta afinidad corresponde a cit. a_2 , con una K_m de $2.4 \times 10^{-8}M$.

La determinación de las constantes de afinidad para oxígeno exige condiciones muy especiales para alcanzar la sensibilidad que se necesita en el oxímetro. Se requiere una membrana de respuesta rápida y un registrador con gran capacidad de amplificación.

En nuestras condiciones de trabajo utilizando membranas Yellow Springs de alta sensibilidad y un registrador Honeywell modelo Electronik 195 pudimos detectar, en forma reproducible, concentraciones de O_2 tan bajas como $0.2 \mu M$.

En la figura 11 se presenta la gráfica de Eadie-Hofstee para la velocidad de respiración estimulada por NADH en membranas de la fase esporulante contra la concentración de O_2 disuelto. Dentro del rango de concentración de O_2 ($0.2 \mu M$ a $200 \mu M$) que técnicamente fué posible anali-

zar, podemos apreciar una cinética con 2 pendientes. La pendiente de mayor afinidad con un K_m de 0.9 μ M para O_2 y la de menor afinidad con una K_m de 8.0 μ M.

En el inserto de la figura 11 se muestra que cuando el experimento se realiza en presencia de CN^- , se elimina la pendiente de baja afinidad. Lo anterior sugiere que la oxidasa aa_3 , sensible a CN^- , tiene baja afinidad por O_2 ($K_m=8.0\mu M$), mientras que la oxidasa insensible a CN que detectamos, tiene una mayor afinidad por O_2 ($K_m 0.9\mu M$). Los valores obtenidos de K_m sugieren que nuestra oxidasa de alta afinidad ($K_m 0.9\mu m$) corresponde a la oxidasa cit. o pues su afinidad es cercana a los valores reportados para oxidasa o de S. typhimurium ($K_m=0.7\mu M$) y E. coli ($K_m=0.2$). Para partículas de Keilin y Hartree de corazón de cerdo se ha reportado un valor de afinidad de 2.8 μ M (41), mientras que para la oxidasa aa_3 bacteriana de Microbacterium thermosphactum se ha dado una afinidad de 8.0 μ M (41). nuestros valores son muy cercanos a este último caso. Respecto a la oxidasa a_2 , por las razones técnicas antes expuestas, no fué posible confirmar su presencia funcional.

Efecto de las Condiciones de Cultivo sobre la Expresión del Sistema Respiratorio. Debido a que B. cereus, como anaerobio facultativo, tiene capacidad para crecer en un amplio rango de tensión de O_2 (46) consideré relevante estudiar los efectos de la variación en la tensión de O_2 durante el cultivo, sobre la expresión de su SR. Del mismo modo, por antecedentes en la literatura con otras especies bacterianas (22, 58, 59) se podía esperar que la naturaleza de la fuente de carbono en el cultivo aerobio, tuviera consecuencias sobre la expresión del SR de B. cereus.

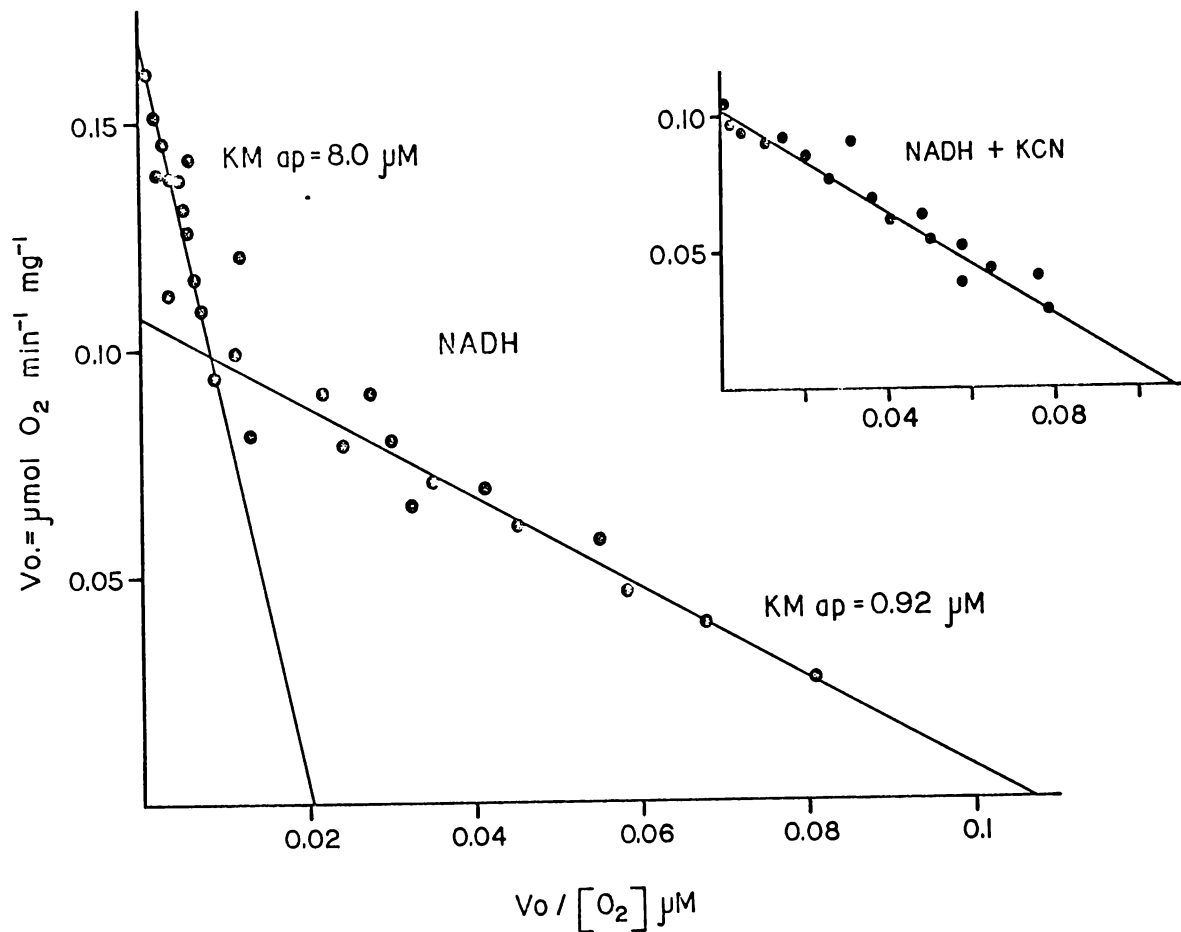


Fig. 11 Efecto de la concentración de oxígeno sobre la velocidad de respiración estimulada por NADH, en membranas de células esporulantes. Gráfica de Eadie-Hofstee. Membranas de la fase esporulante, estado III (0.5 mg de proteína) fueron incubadas con amortiguador TCM y NADH 2.0mM hasta anaerobiósis (ver métodos). Las concentraciones de O_2 (desde 0.2uM) fueron dadas añadiendo volúmenes definidos de agua destilada saturada de aire (200uM). El recuadro muestra la misma cinética realizada en presencia de KCN 0.1mM.

Decidí comparar 2 medios de cultivo en condiciones aerobias. El medio G modificado (24) que utiliza sacarosa como fuente de carbono fermentable y por otro lado, el medio de casaminoácidos (51) que utiliza hidrolizado de caseína, glutamato, alanina y asparragina y no contiene fuente de carbono fermentable.

En cuanto a la tensión de O_2 se decidió comparar 3 condiciones de cultivo: a) aeróbicas con aereación forzada por burbujeo (12 litros de aire por minuto) utilizando el medio G modificado. b) Condiciones microaerofílicas sustituyendo la aereación forzada (burbujeo) por el simple recambio de la atmósfera del tanque de fermentación a la misma velocidad de flujo de aire. El cultivo microaerofílico también se hizo en medio G. c) Condiciones anaeróbicas de cultivo en donde se sustituyó el flujo de aire por flujo de nitrógeno de alta pureza. Para esta última condición fue necesario utilizar un medio rico que contenía: sacarosa al 0.5%, casaminoácidos al 2%, extracto de levadura al 1% y nitrato de potasio al 0.1% como aceptor alternativo de electrones. Para todas las condiciones de cultivo descritas, el cultivo se agitó a 250 rpm (propela).

La cinética de crecimiento para las 4 condiciones de cultivo ensayadas se muestra en la figura 12. En cada curva está anotado el tiempo de generación (tg) obtenido y que corresponde al tiempo en minutos, que se requiere para doblar la densidad óptica del cultivo durante la etapa logarítmica. En el medio G modificado y bajo condiciones aerobias, se obtuvo la máxima velocidad de crecimiento con un tg de 45 min. La velocidad de crecimiento fué 2.6 veces menor (tg=120) cuando se uti

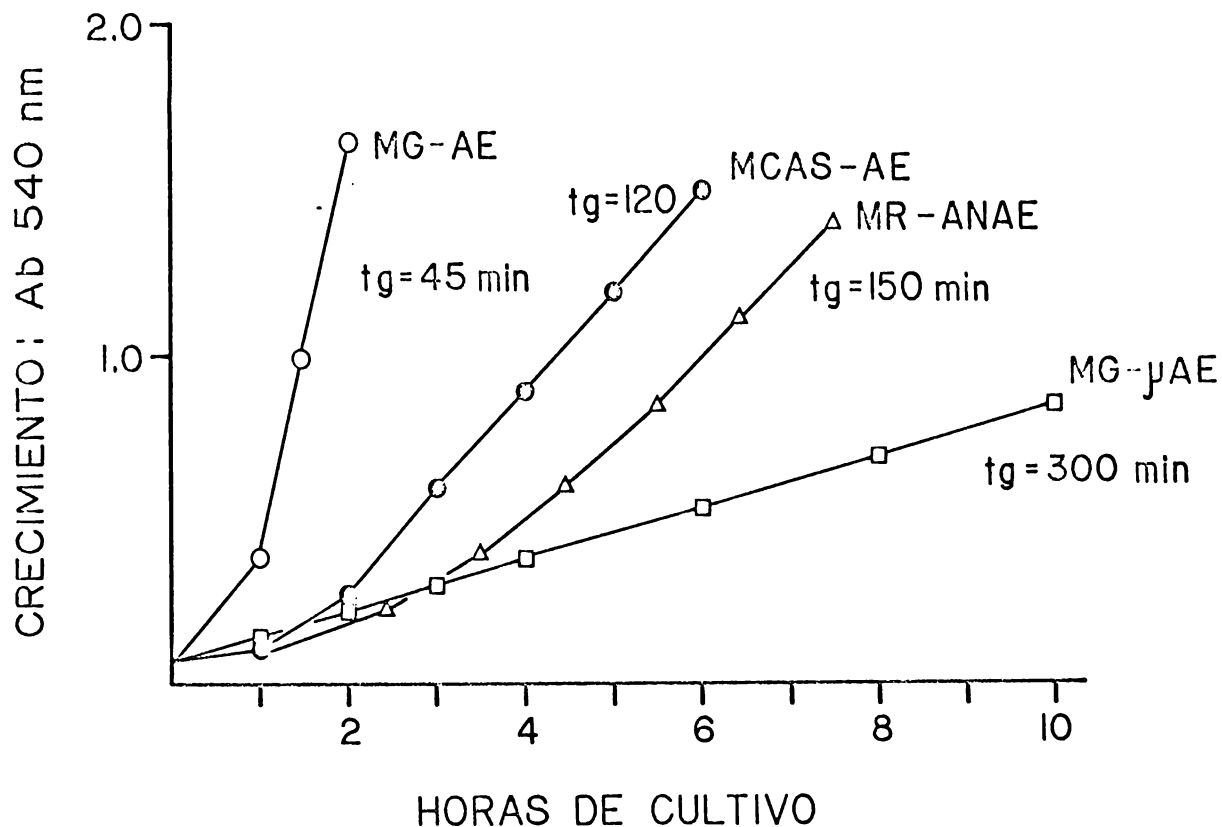


Fig. 12 Cinética de crecimiento para Bacillus cereus bajo condiciones diferentes de cultivo. Los cultivos fueron realizados en el biofermentador con 12 litros de capacidad bajo las condiciones descritas en métodos. Se comparan las cinéticas de crecimiento en medio G modificando (fuente de carbono fermentable: sacarosa) medio de casaminoácidos (fuente de carbono no fermentable) crecidos en condiciones aeróbicas (MG-AE y MCAS-AE). Para el crecimiento microaerofílico también se utilizó medio G modificado (MG-uAE) y para crecimiento anaeróbico se utilizó medio complejo (ver métodos). Tg significa el tiempo de generación o dicho de otro modo, el tiempo en minutos que se requiere en cada medio, para duplicar la densidad óptica (540nm).

lizó el medio de cassaminoácidos en condiciones aerobias y 7 veces menor ($t_g=300$) cuando la tensión de O_2 se hizo severamente limitante en el medio G modificado. Finalmente en condiciones anaeróbicas utilizando un medio muy rico con Nitrato como aceptor de electrones, la velocidad de crecimiento ($t_g=150$) es 3.3 veces menor que en el medio G modificado con condiciones aeróbicas.

Debido a que la velocidad de crecimiento y la densidad óptica final alcanzada son muy diferentes para cada tipo de cultivo, se decidió coleccionar las células al inicio de la etapa estacionaria independientemente del valor absoluto en su densidad óptica. En la tabla III se muestran las actividades respiratorias asociadas a membranas de células estacionarias obtenidas bajo las condiciones arriba descritas. Mientras que las actividades de NADH y succinato oxidorreductasas no fueron afectadas de manera significativa por las distintas condiciones de cultivo utilizadas, las actividades de oxidasa fueron severamente afectadas por la tensión de O_2 . Comparando con los valores obtenidos en aerobiosis (medio G) la actividad de NADH oxidasa cae 7.5 veces en condiciones microaerofílicas y 21 veces en condiciones anaeróbicas. La TMPH2 oxidasa disminuyó en 7.5 y 18 veces para los mismos casos arriba señalados. En cuanto a la succinato oxidasa solo se apreció una disminución significativa (3 veces) en condiciones anaeróbicas de cultivo y esto no es sorprendente si volvemos a considerar que el flujo de electrones desde la succinato deshidrogenasa al SR es severamente limitante en la velocidad de respiración con succinato.

Es importante hacer notar que la actividad respiratoria estimula-

da por ascorbato + TMPD es inhibida en un 95% (cifra entre paréntesis en la tabla III) por KCN 0.1mM en membranas de células aerobias y por otro lado, esta misma actividad en células microaerofílicas, se inhibe un 25% y sólo un 15% en células anaeróbicas. Lo anterior sugiere que la disminución drástica que se observa en la actividad respiratoria de células microaerofílicas y anaeróbicas es debida a una disminución severa en la actividad de la vía sensible a cianuro. Esta conclusión es apoyada por los resultados que se muestran en la figura 13 donde se compara la cinética de inhibición por KCN para las membranas de células aerobias y membranas de células microaerofílicas. Es claro que las células cultivadas en condiciones microaerofílicas han visto disminuida su capacidad respiratoria a expensas de la casi desaparición de la respiración sensible a CN^- , ya que la escasa actividad de TMPH2 oxidasa (ver tabla III) normalmente muy sensible a CN^- en células aeróbicas es ahora, resistente al inhibidor (ver figura 13).

Efecto de la Tensión de O_2 y Fuente de Carbono sobre la Composición de Citocromos: El análisis de oxidorreductasas y oxidasas y de la cinética de inhibición para cianuro, en células cultivadas bajo tensiones reducidas de O_2 , sugerían cambios cualitativos importantes en la expresión del SR de B. cereus. Lo anterior hacía necesario hacer el análisis espectral de las células cultivadas en condiciones microaerofílicas y anaeróbicas.

Como se puede apreciar en la figura 14, las células cultivadas bajo condiciones microaerofílicas y anaeróbicas muestran importantes cambios en su espectro diferencial (reducido-ditionita menos oxidado-per-

TABLA III ACTIVIDADES RESPIRATORIAS ASOCIADAS A MEMBRANAS DE CELULAS ESTACIONARIAS OBTENIDAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

OXIDORREDUCTASAS:	ACTIVIDAD ESPECIFICA ^a			
	AEROBIOSIS		MICROAEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS
	MEDIO G	MEDIO CAS	MEDIO G	MEDIO COMPLEJO
NADH: DCPIP .acceptor	200	160	165	180
Succinato: PMS-DCPIP acceptor	148	125	112	120
OXIDASAS:				
NADH	210	187	28	10
Succinato	18	34	15	6
Ascorbato + TMPD	280 (95) ^b	320 (95)	37 (25)	18 (15)

^aLa actividad específica para oxidorreductasas está expresada como nmol de DCPIP reducido por min^{-1} mg proteína⁻¹. En el caso de oxidasas se expresa como ngátomo de O_2 por min^{-1} mg proteína⁻¹.

^bLas cifras entre paréntesis representan el porcentaje de la respiración sensible a KCN 0.1mM.

sulfato).

Comparando con el espectro de las células cultivadas en medio G y condiciones aeróbicas (figura 6) podemos apreciar que la reducción severa en la tensión de O_2 provoca una disminución hasta desaparición (anaerobiosis) en la concentración de los citocromos aa_3 y c_{550} (el cambio en cit. c_{550} no se aprecia con claridad en espectros de temperatura ambiente). Al mismo tiempo vemos que la concentración de cit a_2 se eleva en condiciones microaerofílicas y desaparece con la anaerobiosis. Estos resultados son congruentes con la idea de que la disminución en la capacidad respiratoria de las células cultivadas en tensiones reducidas de O_2 es debida a una disminución severa en la actividad de la vía sensible a CN^- (c_{550} y aa_3).

Las células cultivadas en casaminoácidos y aerobiosis también mostraron diferencias importantes en su espectro diferencial. La concentración del cit. a_2 se encuentra elevada al mismo tiempo que se mantienen niveles normales o un poco mayores (con respecto al medio G) de los citocromos aa_3 y c_{550} .

En cuanto a los citocromos de tipo b podemos observar la presencia de b_{555} (557 a temperatura ambiente) y b_{562} en aparentemente todas las condiciones de cultivo.

Los espectros de monóxido de carbono (ditio-red) para los casos arriba descritos se pueden observar en la figura 15. Para las células cultivadas en medio de casaminoácidos tenemos un espectro parecido al obtenido con membranas de medio G (fig 6): cit. a_3 -CO (picos a 431 y

590 nm, valle a 445nm.); cit. o-CO (pico a 416nm, inflexión a 431nm y valle a 561nm). Una diferencia importante con el medio G fue la magnitud del pico del complejo cit a_2 -CO (643nm).

En condiciones microaerofílicas de cultivo observamos que la concentración del complejo a_3 -CO se encuentra muy disminuida, observándose sólo una inflexión del espectro a 445nm y por otro lado, la casi ausencia de cit a_3 -CO nos deja ver un espectro casi "limpio" para el complejo de cit. o-CO (pico a 415nm y profundo valle a 431nm). En este caso la magnitud del pico a 643 para cit. a_2 -CO también es importante.

Para condiciones anaeróbicas de cultivo sólo observamos la presencia de un sólo citocromo reactivo a CO: el cit. o-CO (pico a 416nm y valles a 431 y 561nm).

Los resultados anteriores sugieren que la vía sensible a cianuro (cit. c_{550} y aa_3) estaría regulada de manera positiva y directa por la tensión de O_2 . En cuanto al cit. o, su presencia parece ser constitutiva, pues sin detectarse grandes diferencias en su concentración, parece estar presente en todas las condiciones de cultivo ensayadas. En cuanto al cit. a_2 parecería ser inducido por las bajas tensiones de O_2 (medio microaerofílico) donde tendría un papel preponderante como oxidasa terminal (alta afinidad por O_2 ; sin embargo, hay que señalar que en el medio de casaaminoácidos y condiciones aerobias de cultivo también se induce su síntesis sin que parezca haber justificación fisiológica. Si comparamos el cultivo en una fuente pobre de carbono (casaaminoácidos) con el cultivo en un medio microaerofílico se verá que el factor común de estas condiciones de cultivo es el lento crecimiento (ver fig 12) de

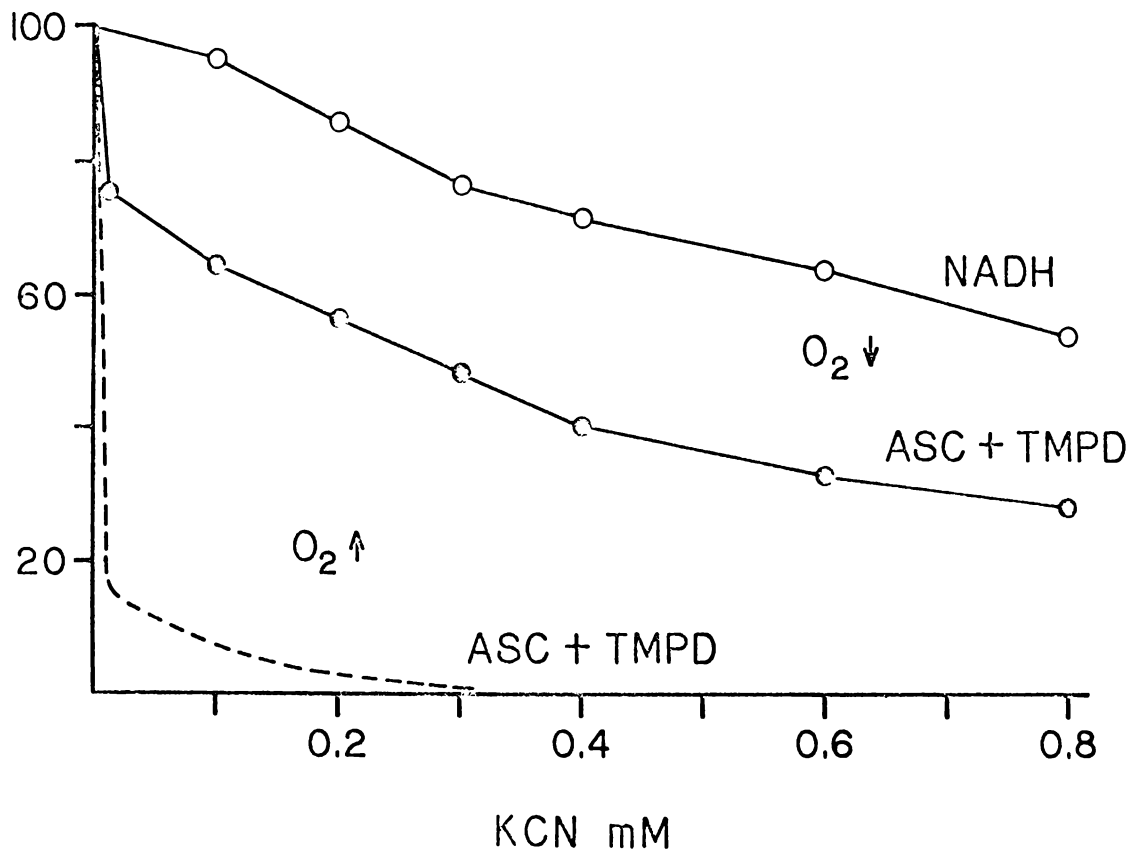


Fig. 13 Cinética de inhibición por cianuro de NADH-oxidasa y TMPDH2 oxidasa de las membranas de células crecidas en condiciones microaerofílicas. Las oxidasas fueron medidas como se describe en métodos utilizando 2.0mg de proteína membranal. Para comparación se incluye en la gráfica la cinética de inhibición para TMPDH2-oxidasa de membranas de células crecidas en medio G con aerobiósis.

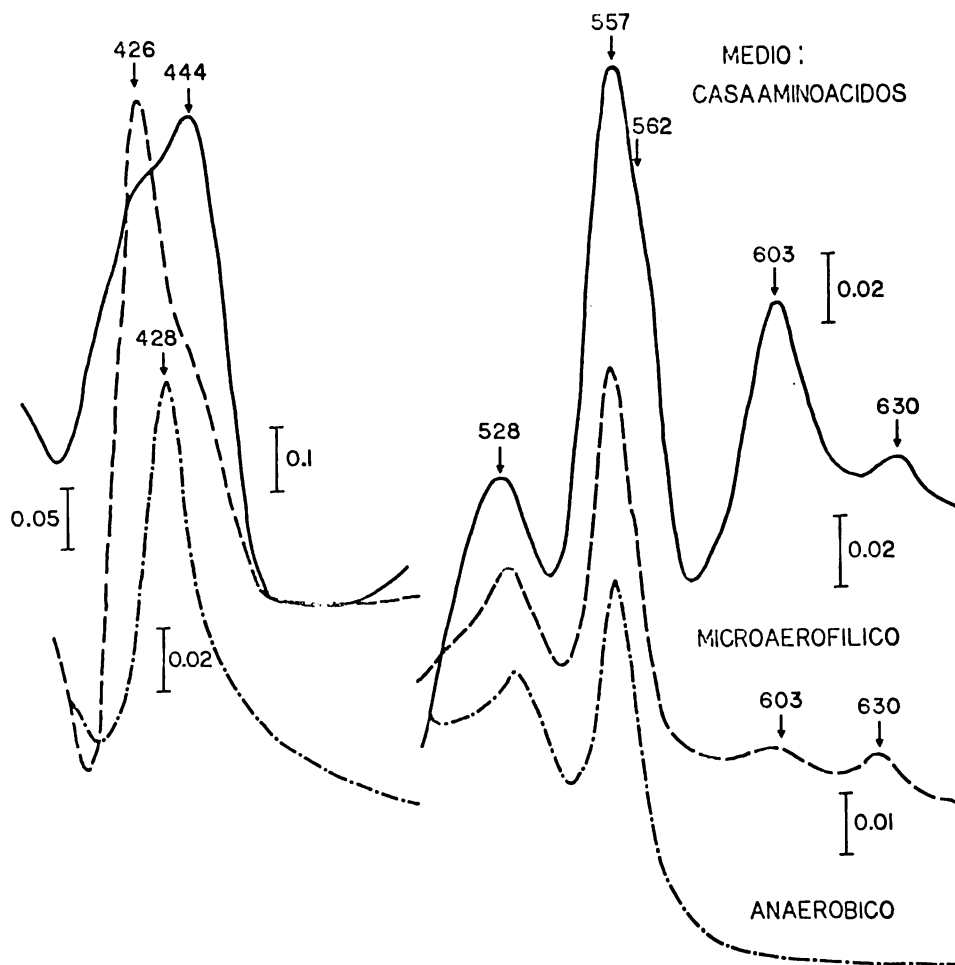


Fig. 14: Efecto de la tensión de oxígeno y fuente de carbono (velocidad de crecimiento) sobre la composición de citocromos de *B. cereus*. Las células crecidas en los medios o condiciones indicadas de tensión de O_2 fueron cosechadas al inicio de la etapa estacionaria, sedimentadas y lavadas con amortiguador TCM. Las células lavadas fueron resuspendidas (2% del volumen de cultivo) en amortiguador TCM-glicerol al 50%. Los espectros diferenciales (ditio red menos persulfato ox) fueron realizados a temperatura ambiente utilizando las células enteras.

tal manera que la síntesis de cit. a_2 sería desreprimida no por la baja tensión de O_2 directamente, sino por la dificultad para mantener la velocidad de crecimiento.

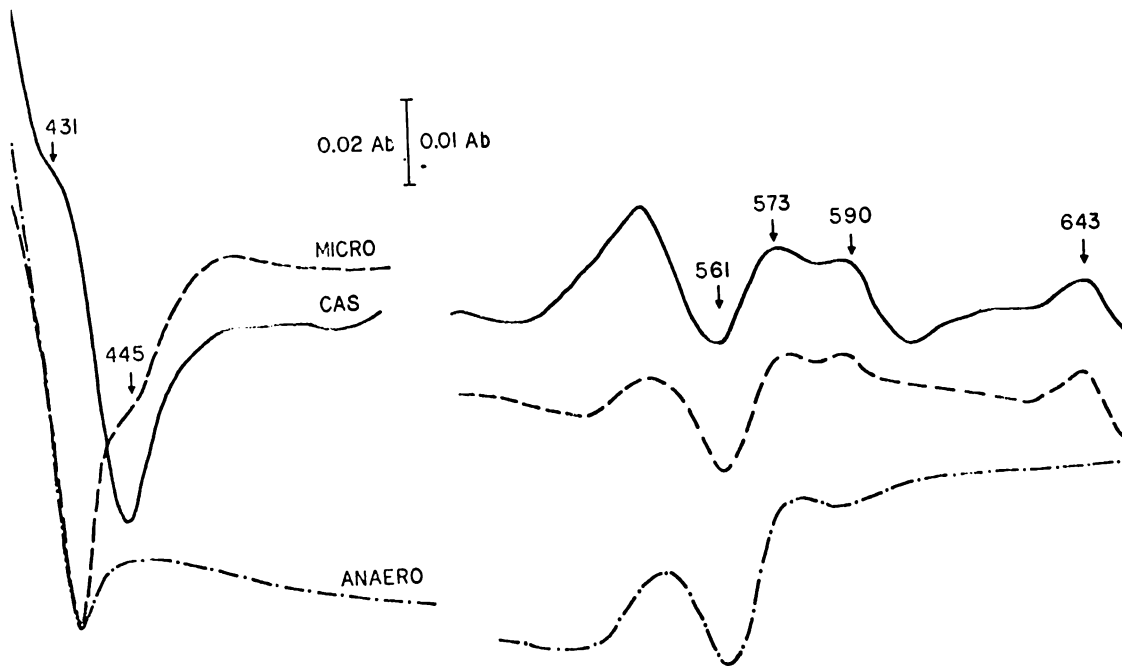


Fig. 15 Espectros diferenciales de monóxido de carbono (ditio-red + CO menos ditio-red) de las células íntegras de B. cereus cultivadas bajo las condiciones descritas en la figura 12 y 14. Las células reducidas por ditionita fueron burbujeadas con CO por 5 min. y entonces se trazó el espectro a temperatura ambiente.

DISCUSION

Los resultados expuestos en la presente tesis aportan evidencia que obliga a modificaciones substanciales del esquema propuesto por el grupo de Lundgren (16, 38) para el Sistema Respiratorio de B. cereus. En verdad, el hecho de que la respiración NADH dependiente sea abolida después de fotoinactivar selectivamente a la quinona endógena (figura 4) descarta la posibilidad de que las membranas de B. cereus posean una vía alterna de transporte de electrones, en la cual no sea necesaria la participación de menaquinona y citocromos.

Es pertinente mencionar que para varias especies de Bacillus (14, 54, 57) se ha reportado la presencia de una NADH-oxidasa soluble que es capaz de reaccionar directamente con oxígeno, esta enzima es estimulada por FMN, inhibida por ácido dipicolínico e insensible a inhibidores de cadena respiratoria (57). Tal enzima, que reúne las características cinéticas de la vía alterna propuesta por Lang y Lundgren (36), existe también en B. cereus; sin embargo, su contribución a la respiración endógena es modesta ya que no representa más del 5% de la capacidad respiratoria total de la célula. Wilkinson y Ellar (57) han sugerido que esta enzima podría tener un papel importante durante el período insensible a CN^- de la germinación de la espora.

Es necesario hacer hincapié en que la fotoinactivación del SR por luz U.V. de 360nm parece afectar a la menaquinona endógena de manera específica, esta conclusión está fundada en el hecho de que la fotoinactivación impide la respiración con NADH (fig. 4) y la reducción de citocromos por este sustrato (fig. 5), sin afectar a las actividades de NADH

y succinato deshidrogenasas, así como tampoco, la actividad de TMPDH2-oxidasa (figura 4). La respiración NADH-dependiente y con ella, la capacidad de este sustrato para reducir los citocromos fue plenamente reconstituida por la simple adición de menadiona al sistema fotoinactivado (figura 5). La reconstitución de la NADH-oxidasa por menadiona (no se muestra) siguió una cinética de saturación, alcanzándose el máximo de actividad con una concentración alrededor de 300uM.

Al desechar la existencia de una vía no quinona y no citocrómica en el SR de B. cereus era necesario encontrar una nueva explicación para la respiración insensible a CN. Una posibilidad era de que la citocromo oxidasa (aa_3) fuera insensible al inhibidor. Esta alternativa fue descartada, pues cómo se mostró en la fig. 9B, la respiración estimulada con ascorbato + TMPD es altamente sensible al cianuro ($K_i=2.0uM$). También en favor de la alta sensibilidad del cit. aa_3 al cianuro, está el efecto que tiene este inhibidor sobre el patrón de reducción de citocromos evocado por succinato (fig 5). Mientras que en ausencia de cianuro el succinato produce niveles de reducción apenas detectables para los citocromos c_{550} y aa_3 , la adición del inhibidor (KCN 10uM fue suficiente) al sistema provoca la rápida acumulación de cit. c_{550} y aa_3 reducidos.

La segunda alternativa para explicar la resistencia al cianuro era de que el Sistema Respiratorio de B. cereus estuviera constituido por rutas citocrómicas alternas. Esta posibilidad iba en contra de las conclusiones sustentadas por cinco diferentes grupos de investigación (9, 14, 16, 38 y 43) sobre la composición de citocromos de B. cereus. De

estas publicaciones la más reciente y completa (16) proponía que B. cereus poseía una sola cadena respiratoria formada por los citocromos b_{555} , c_{550} y aa_3 .

Nuestro análisis espectral de las membranas reducidas por ditionita, NADH o succinato (fig. 6) no reveló diferencias con los espectros de las publicaciones mencionadas en el párrafo anterior; sin embargo, la reducción con ascorbato + TMPD puso de manifiesto la presencia de un nuevo citocromo (fig. 6) con su máxima absorbancia a 562 nm, posición en el espectro que lo identifica como citocromo o (27, 28,50). Este citocromo hace que el gran pico de citocromo b_{555} (reducido por ditionita o NADH) sea asimétrico en su lado derecho (fig. 6); tal asimetría es también evidente en publicaciones anteriores (9, 14, 16, 43), sólo que en ningún caso fue reconocida como un citocromo independiente.

La reacción de citocromo o reducido con monóxido de carbono produce la formación de un complejo que tiene un máximo a 416nm y sus mínimos a 431 y 561nm (50) tal espectro es sugerido en las membranas de células aeróbicas cultivadas en medio G (figura 8) o cultivadas en medio de casaa-minoácidos, donde se aprecia una inflexión del espectro en 430nm. Esta inflexión es producida por el valle de cit o-CO y el pico de cit a_3 -CO que coinciden en la misma longitud de onda. Tal interferencia con el cit a_3 -CO es pequeña en células microaerofílicas (figura 15) y no existe en células anaeróbicas, de tal manera que podemos apreciar "limpio", el espectro para cit. o-CO.

Todos los citocromos que funcionan como oxidasa terminal forman como

plejos con monóxido de carbono, entre los citocromos que presentan reacción positiva con CO son oxidasas terminales funcionales (22, 50). De acuerdo con lo anterior, el cit. o detectado en nuestras preparaciones puede ser considerado sólo como una oxidasa potencial y habrá que verificar dicha función determinando el espectro fotoquímico de acción para la liberación de la respiración inhibida por CO (22, 59). Si el espectro de acción y el espectro de absorción coinciden, entonces quedará demostrada su función como oxidasa terminal.

El espectro diferencial anaeróbico menos aeróbico de las membranas reducidas por NADH en presencia de KCN 0.1mM (figura 10) sugiere que un citocromo de tipo b con máxima a 559-560 nm podría estar involucrado en vía insensible a cianuro. El mismo resultado fue obtenido por Hogarth et al (26) en B. megaterium, lo que sugiere que el citocromo o del género Bacillus participa en la respiración insensible a CN^- . Aunque en Acetobacter suboxidans (12, 13) también se ha reportado que su citocromo o es resistente a cianuro, lo usual es que este citocromo se le encuentre asociado a la respiración sensible a cianuro (35, 47, 59). Es probable que lo que nosotros y Hogarth et al (26) llamamos cit. o, basados sólo en su identificación espectral y reacción con monóxido de carbono, corresponde en realidad a un citocromo diferente a la citocromo oxidasa o de otras bacterias. Será necesario realizar más estudios para definir su verdadera identidad, demostrar que funciona como oxidasa terminal y corroborar directamente su aparente insensibilidad al CN. En el presente estamos intentando aislar mutantes que carezcan de cit. aa_3 , en ellos será posible definir el papel de cit. o en el SR de B.

cercus sin interferencia del cit. aa₃.

El análisis de la cinética con inhibidores respiratorios (figura 9A) reveló que los inhibidores de sitio I y II son considerablemente más efectivos que el cianuro en su efecto inhibitorio sobre la NADH oxidasa, sugiriendo que existe una derivación del SR entre el sitio de inhibición para antimicina y HOQNO y antes del sitio de inhibición para cianuro (aa₃). Al comparar la cinética de inhibición para cianuro, sobre NADH-oxidasa, succinato-oxidasa y TMPDH2-oxidasa (figura 9B) fue posible ubicar la derivación a nivel del cit. b₅₅₅. Sería deseable contar con un inhibidor específico de la respiración insensible a CN⁻ en bacteria; desgraciadamente hasta el presente, no se ha descrito ninguno. El hidroxamato del ácido salicílico (SHAM) que inhibe de manera específica y eficiente la respiración insensible a CN⁻ en eucariotes inferiores (25) no tiene ningún efecto sobre los sistemas bacterianos.

En nuestro laboratorio hemos encontrado que la diciclohexil-carbodiimida (DCCD) tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre la NADH-oxidasa (no se muestra). Resultados preliminares sugieren que el DCCD podría estar actuando a 2 niveles en el SR, inhibiendo a cit. aa₃ (TMPDH-oxidasa) y en algún punto entre la deshidrogenasa y el cit. c (inhibe a la NADH-citocromo c oxidorreductasa y espectralmente se observa que retrasa la llegada de los electrones desde NADH a cit. c).

El cianuro a concentraciones hasta de 1.0 mM inhibió no más del 30% de la actividad de la NADH oxidasa de membranas de células vegetativas y esporulante (figura 9A) y cabría preguntar si este porcentaje de inhibi

ción es el componente de la vía sensible que hace la ruta OX-sensible a la respiración de NADH (endógena o potencial). Estudios realizados en sistemas respiratorios de varias especies bacterianas (10, 22) indican que el paso limitante en la velocidad de respiración se encuentra, por lo general, a nivel de la deshidrogenasa, de tal manera que bajo es tas condiciones el cianuro estaría actuando como un interruptor que cie rra el flujo de electrones por una ruta y a cambio, incrementa la utili zación de rutas alternas no sensibles. Experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio sugieren que la NADH deshidrogenasa es el pa so limitante en la velocidad de respiración de NADH, pues el consumo de oxígeno estimulado por NADH se incrementa casi 2.5 veces cuando se añade simultáneamente con ascorbato + TMPD. Al mismo tiempo la sensibilidad al cianuro 0.1mM se incrementa de 20% (NADH sólo) a casi 80% cuando las membranas están respirando los dos sustratos simultáneamente, esto es, al acercarnos a la velocidad de respiración potencial (respirando los dos sustratos) saturamos el SR y entonces podemos diseccionar sus dos componentes cinéticos: vía cianuro-sensible, responsable del 80% de la respiración potencial y vía insensible responsable del 20% restante.

En cuanto al citocromo a_2 , nuestro análisis espectral (figura 6 y 14) sugiere que la síntesis de este citocromo es desreprimida durante el crecimiento lento, como ocurrió en células crecidas en condiciones aerobias con una fuente de carbono de lenta utilización (casaminoácidos) o por condiciones microaerofílicas de cultivo (figura 14). Los cultivos microaeróbicos o aeróbicos en medio de casaminoácidos tuvieron un factor común (figura 12), el lento crecimiento y quizá esta situación,

dificultades para crecer, sea la condición de inducción para citocromo a_2 . En el caso de los cultivos anaeróbicos no hay evidencia de citocromo a_2 (figuras 14 y 15). Aquí también tenemos una condición de lento crecimiento (figura 12), sin embargo, hay que considerar que se trata de una situación radicalmente diferente, en donde las condiciones anaeróbicas y presencia de nitrato nos van a inducir la síntesis de nitrato reductasa y con su acción metabólica, probablemente se reprima la síntesis de citocromo a_2 . Laszlo y Taylor (39) han demostrado en E. coli, que en presencia de nitrato se inhibe la respuesta aerotáctica al oxígeno, la cual se ha demostrado que depende de la citocromo oxidasa (52, 53), y entonces, es posible que el nitrato "per se" a algún producto derivado de la utilización del sistema anaeróbico de transporte de electrones también actúe como supresor de las condiciones de inducción del citocromo a_2 dadas por el lento crecimiento.

Es posible que tanto el citocromo o como el a_2 actúen como oxidasas terminales cinéticamente competentes y, en tal caso, cabría preguntar cuál es la contribución de cada una de ellas a la respiración insensible a CN^- . Una aproximación experimental que nos podría contestar esta pregunta es realizar el espectro fotoquímico de acción, en presencia de cianuro, para la liberación de la respiración inhibida por CO. En estas condiciones el porcentaje de liberación que ocurra a 630nm nos indicará la contribución de a_2 , mientras que el porcentaje liberado a 560nm podremos relacionarlo con citocromo o. Un hecho que llama la atención es el que el citocromo o esté presente en cantidades apreciables, durante el crecimiento anaeróbico (figura 15) ya que, al no haber O_2 no

hay función para una oxidasa terminal. John y Watley (29,30) demostraron que el citocromo *o* está presente en Paracoccus denitrificans durante su crecimiento anaeróbico. La presencia de citocromo *o* en crecimiento anaeróbico podría no tener sentido fisiológico y solo ser consecuencia del carácter constitutivo en su síntesis o podría tener alguna función, todavía desconocida, en el sistema de transporte de electrones hacia nitrato reductasa.

En cuanto al rendimiento en la conservación de energía asociado a la utilización de una u otra oxidasa en la respiración, existen dos puntos de vista antagónicos. El primero sostiene que la utilización de una u otra vía alternativa con diferente oxidasa terminal no tiene efecto sobre la eficiencia de la fosforilación oxidativa (33, 48). En el otro grupo se asume, por lo contrario, que los citocromos *o*, *d* y *aa*₃ terminan secuencias de transporte de electrones con distinta eficiencia en la conservación de energía (40). Se ha asegurado por ejemplo, que la oxidasa *a*₂ no tiene un sitio asociado para la translocación de protones y por lo tanto estaría actuando como una vía de oxidación libre necesaria para reoxidar coenzimas en condiciones de emergencia (microaerofílicas) o en el caso especial de los fijadores de nitrógeno, para proteger a la nitrogenasa de la inactivación por O₂ (59).

En el caso de B. cereus, cuando se añade KCN 0.1mM a un cultivo, durante el inicio de la esporulación y poco antes del final del estado III (etapa formativa de la endospora) resulta en un bloqueo del proceso morfogénico (resultados no mostrados), en cambio, el KCN no bloquea la esporulación durante la etapa de maduración de la espora (edo.

IV en adelante). La etapa formativa se caracteriza por una intensa actividad metabólica y por tanto una gran demanda de energía (18). Cuando se analiza la sensibilidad de la respiración endógena al CN^- (no se muestra) el consumo de O_2 no se inhibe en más de un 25% para ambas etapas.

Lo anterior sugiere que la vía cianuro-sensible es determinante en la etapa formativa de la espora probablemente, porque su utilización preferencial está asociada a una mayor eficiencia en la conservación de energía. Aunque esta interpretación es atractiva, no hay que descartar la posibilidad de que el CN^- pudiera estar bloqueando algún otro proceso sensible (diferente a respiración), característico e indispensable de la etapa formativa de la espora. Para poder descifrar esta posibilidad sería deseable contar con mutantes deficientes en uno o más componentes de la vía sensible a CN^- , y analizar en ellos, su capacidad para esporular.

Con la evidencia que hemos reunido hasta el momento podemos proponer un nuevo esquema de composición y organización para el Sistema Respiratorio de B. cereus y, considerar algunas variaciones de este esquema básico (figura 16A) bajo diferentes condiciones de cultivo.

El esquema 16A representa la composición y organización del SR que se tiene durante el crecimiento vegetativo y esporulación en condiciones aerobias y con una fuente de carbono de rápida utilización.

El sistema puede ser alimentado con NADH o succinato, pero el primero es con mucho, mejor sustrato (flecha sólida). La respiración cia-

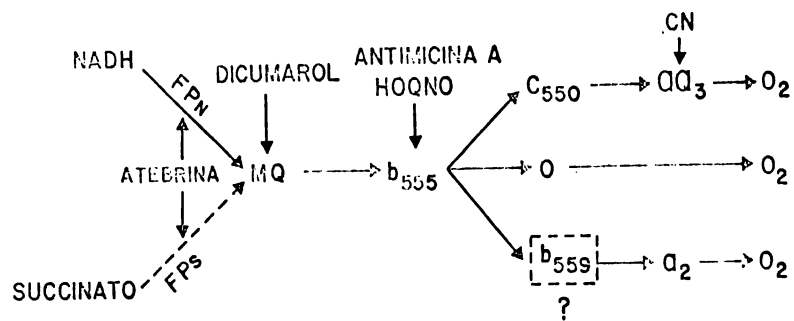
nuero-sensible es derivada a partir del citocromo b_{555} con los citocromos c_{550} y aa_3 , mientras que la respiración CN-resistente podría depender de dos vías; la primera formada por b_{555} y o y la segunda con b_{555} y a_2 . Entre el citocromo b_{555} y el a_2 todavía podría existir otro citocromo de tipo b, el b_{559} , el cual ha sido identificado como intermediario para a_2 en todos los sistemas bacterianos donde se ha confirmado la existencia de la oxidasa a_2 (22, 27, 35, 47, 59). Personalmente considero que para B. cereus aún no hemos resuelto el complejo pico de citocromos del tipo b en todos sus componentes.

Las células vegetativas y esporulantes poseen el mismo sistema respiratorio, solo que en el caso de estas últimas, la concentración de sus componentes y las actividades derivadas de ellas se encuentran considerablemente incrementadas.

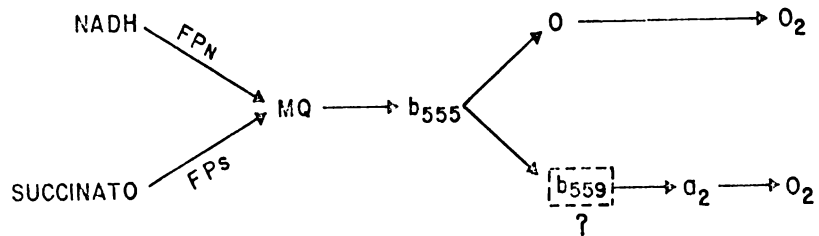
En el caso de crecimiento lento en casaminoácidos y condiciones aerobias, este esquema solo sería modificado en lo cuantitativo, ya que la concentración de a_2 se eleva considerablemente y por otro lado tenemos que al no haber fuentes de carbono fermentable será necesario una mayor actividad del sistema respiratorio durante el crecimiento vegetativo y por tanto la concentración de citocromos en general y actividad de oxidorreductasas se elevará para hacer frente a esta demanda.

Para el crecimiento microaerofílico se propone el esquema 16B donde tenemos que la vía sensible al cianuro (c_{550} y aa_3) ha casi desaparecido, siendo sustituida, en apariencia, por una mayor concentración y actividad de los componentes de la respiración CN-insensible, especial-

A-AEROBICO



B-MICROAEROFILICO



C-ANAEROBICO

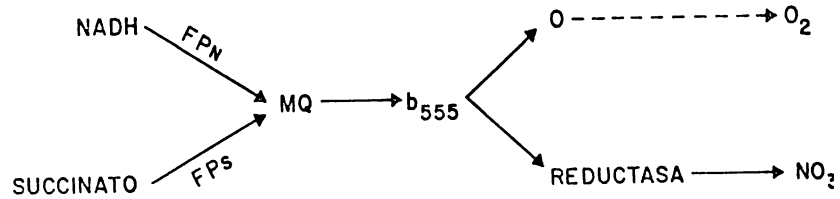


Fig. 16: Esquema propuesto para la composición y organización del sistema respiratorio de Bacillus cereus. Efecto de la tensión de oxígeno sobre la expresión del sistema.

mente a_2 .

Para el crecimiento anaeróbico se propone el esquema 16C donde los citocromos c_{550} , aa_3 y a_2 han desaparecido y entonces la respiración corre a cargo de una reductasa terminal, que será inducida por la anaerobiosis y su sustrato aceptor de electrones, por ejemplo, el nitrato inducirá nitrato reductasa. Aunque no hemos confirmado la presencia de nitrato reductasa en nuestras condiciones de cultivo, se sabe que los cultivos anaeróbicos de B. cereus producen nitrito a partir de nitrato (46).

PERSPECTIVAS

Pienso que la investigación aquí descrita ha permitido llegar a tener una mejor comprensión de los sistemas respiratorios complejos de las bacterias esporoformadoras, su composición, organización, regulación y papel que juegan en la esporogénesis, sin embargo, queda mucho por investigar:

1.- La composición dada en el esquema 16A es la mínima, debido a que la zona del espectro 540-570nm correspondiente a los máximos de absorbencia para los citocromos de tipo b y c es muy compleja y resulta difícil resolverle en sus componentes individuales. Para completar el inventario de citocromos se puede intentar lo siguiente: a) Resolver la zona compleja del espectro (sector b-c) aplicando la técnica de análisis numérico (análisis diferencial de cuarto orden) que se ha utilizado con éxito para resolver los picos múltiples (5 citocromos) de citocromo b en E. coli (48a, 49a). En este análisis podríamos utilizar células crecidas en las condiciones que sabemos, producen diferente expresión del SR. b) Solubilizar los citocromos con acetona ácida, separando a los del tipo c (hemos unido covalentemente) de los tipo b (hemos asociado por enlaces secundarios). Preparar los hemocromos de piridina y analizar su espectro reducido por ditionita. La resolución de los picos es mejor en los hemocromos de piridina que en sus correspondientes holocitocromos membranales. Los citocromos de tipo c también podrían ser identificados en electroforesis en el gel de acrilamida por medio de su reacción crómica con derivados de la bencidina (37). Esto nos diría si hay un solo tipo de c (c550) o también, si existe el

c₅₅₄ que ha sido descrito para B. subtilis (42).

2.- Como he comentado a lo largo de la discusión, sería de gran ayuda a nuestros proyectos, el contar con mutantes respiratorio-deficientes. Inicialmente hemos enfocado nuestro esfuerzo a la obtención de mutantes deficientes en cit aa₃ y/o cit c. La estrategia experimental diseñada se basa en la reacción con el TMPDH₂, compuesto que dona electrones específicamente al citocromo c. La oxidación va acompañada por un vire de color (leuco a morado). Así las colonias carentes de actividad de citocromo c oxidasa podrán ser distinguidas por que no se tiñen de morado. Hemos montado la técnica y después de mutagenizar con nitrosoguanidina, aislamos hasta 50 colonias blancas. Pronto comenzaremos a hacer su caracterización espectral. Para aislar mutantes deficientes en la vía cianuro-sensible se podría intentar aplicar la técnica de trifeniltetrazolio (colorante redox) utilizada en la detección de mutantes "petit" en levadura. La reacción deberá ser hecha en presencia de cianuro.

Considero que si logramos aislar mutantes específicos en las vías sensible y no sensible a CN, entonces se abrirá todo un horizonte de trabajo para nuestro laboratorio, pues permitirá ver en ausencia de "trucos experimentales", la composición y secuencia de cada vía, la caracterización cinética de las oxidasas terminales y el papel de las vías durante la esporulación.

3.- Definir la composición y organización del SR de la endospora y célula madre. Los resultados de la presente Tesis describen el SR

de una preparación membranal constituida principalmente por membranas de la célula madre pero significativamente contaminada con membranas de endospora (ver resultados). Dado que los 2 compartimentos están expuestos a diferente tensión de oxígeno y probablemente a diferente disponibilidad de sustratos, es justificado esperar diferencias en sus SR. Hemos hecho una modificación a la técnica de Andreoli et al. (1) que nos permite separar y purificar las membranas de la célula madre y endospora inmadura en mucho menor tiempo que la técnica original. Nuestro análisis espectral (preliminar) no refleja diferencias en composición, salvo por una aparente mayor concentración de citocromos b en la endospora. Sin embargo desde el punto de vista cinético hemos encontrado grandes diferencias en la capacidad del NADH para reducir los citocromos de la vía sensible. Mientras que en la célula madre, el NADH evoca niveles de reducción cercanos a ditionita, en la endospora, el NADH apenas y reduce los citocromos de la vía CN-sensible (cit. c y aa₃). Aparentemente la diferencia se debe a un flujo incrementado de electrones por la vía no sensible en la endospora ya que cinéticamente la NADH-deshidrogenasa y oxidasa no difieren significativamente en los 2 compartimentos ni tampoco, la reactividad de cit c y aa₃ hacia asc + TMPD. La explicación de esta diferencia cinética es actualmente materia de estudio.

4.- Como se comentó en la Discusión, es necesario definir cuales son las oxidasas funcionales de B. cereus. Esto se hará practicando los espectros fotoquímicos de acción para respiración inhibida por CO.

5.- Relación entre la composición de citocromos y la eficiencia para formar gradientes de H⁺. Sabemos que bajo ciertas condiciones de cul

tivo podemos manipular la concentración relativa de citocromos, especialmente oxidasas terminales y también, es posible que llegemos a contar con mutantes deficientes en una y otra vía; entonces podríamos aprovechar estas diferencias en la expresión del SR para intentar averiguar qué efecto tiene la composición de citocromos sobre la eficiencia para formar gradientes protón-motriz. Se podría utilizar las células íntegras o mejor aún, sus vesículas.

6.- Sistema Respiratorio de la Esporulación Microcíclica. Un modelo experimental muy interesante que se puede explotar es el de la esporulación Microcíclica que consiste en hacer que la célula vegetativa primaria vuelva a entrar en un ciclo de esporulación sin cursar por crecimiento logarítmico. Esto se logra por manipulación en la composición de los medios de cultivo. Lo importante para nuestros objetivos de estudio es que partiendo de una espora con un SR en su mínima expresión entraríamos directamente a morfogénesis sin interferencia de la expresión durante el crecimiento logarítmico.

En suma, los rumbos que puede tomar nuestra investigación sobre Sistema Respiratorio de Bacterias Esporoformadoras son amplios, pues como se comentó en el capítulo de Introducción, apenas comenzamos a conocer sobre su composición y organización y queda mucho por realizar sobre su regulación. Quizás nuestra investigación pudiera llegar a hacer contribuciones importantes sobre los aspectos bioenergéticos de un tema apasionante en Biología: La Criptobiosis.

LITERATURA CONSULTADA

1. Andreoli, A. J., S. Suehiro, D. Sakiyama, J. Takemoto, E. Vivanco, J.C. Lara and M.C. Klute, 1973. Release and recovery of forespores from Bacillus cereus. J. Bacteriol. 115: 1159-1166.
2. Andreoli, A.J., J. Saranto, P.A. Baecker, S. Suehiro, J.E. Escamilla and A. Steiner, 1975. Biochemical properties of forespores isolated from Bacillus cereus. In Spores VI. Gerhardt, P., Costilow, R. N. and Sadorff, H.L. (ed). pp. 418-424, Amer. Soc. for microbiol, Washington D.C.
3. Andreoli, A. J., J. Saranto, N. Cagliari, J.E. Escamilla and E. Pila, 1978. Comparative study of protein, from forespores and mother cell compartments of Bacillus cereus. In Spores VII. Chambliss, G. and Vary, J.C. (ed.) pp 260-264. Amr. Soc. for Microbiol, Washington, D.C.
4. Arrigoni, O. and T.P. Singer. 1962. Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenases. Nature (London) 193: 1256-1258.
5. Bergsma, J. R., Strijker, Y.E. Alkema, H.G. Steijen and W.N. Konings. 1981. NADH dehydrogenase and NADH oxidation in membrane vesicles from Bacillus subtilis. Eur. J. Biochem. 120: 599-606.
6. Bisschop, A. and W.N. Konings. 1976. Reconstitution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity with menadione in membrane vesicles from menaquinone-deficient Bacillus subtilis Aro D. Eur. J. Biochem. 67: 357-365.
7. Broberg, P.L. and L. Smith. 1967. The cytochrome system of Bacillus megaterium KM. The presence and some properties of two CO-binding cytochromes. Biochim. Biophys. Acta 131: 479-489.
8. Bronner, F., C.N. Nash and E. E. Golub 1974. Calcium Transport in Bacillus megaterium. In Spores VI. Gerhardt, P. RN. Costilow and H.L. Sadorff (ed) pp 556-561, Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C.
9. Bohnweg, G. and H.A. Douthit, 1975. Cytochrome pigments in spores of Bacillus cereus T. J. Bacteriol. 121: 737-739.
10. Cole, J. A. 1976. Microbial gas metabolism. Adv. in Microbiol Physiol. 14: 1-92.
11. Collier, R.E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in Clostridium roseum. In Spores, pp. 10-17. H.O. Halvorson (ed) Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.

12. Daniel, R.M. and E.R. Redfeam¹⁹⁶⁸. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidasa system of Acetobacter suboxydans. Biochim. 106, 49-50
13. Daniel, R.M. 1970. Electron transport system of Acetobacter suboxydans with particular reference to cytochrome o. Biochim. Biophys. Acta 216:328-341.
14. Doi, R.H. and H. Halvorson, 1961. Comparison of electron transport systems in vegetative cells and spores of Bacillus cereus. J. Bacteriol. 81: 51-58.
15. Dwney, R.J., 1964. Vitamin K mediated electron transfer in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 88: 904-911.
16. Felix, J.A. and D.G. Lungren. 1973. Electron transport system associated with membranes of Bacillus cereus during vegetative growth and sporubacteriol. 115: 552-559.
17. Fortnagel P., and E. Freese, 1968. Analysis of Sporulation Mutants II. Mutans blocked in the citric acid cycle. Jour. Bacteriol. 93: 1431-1438.
18. Freese, E. 1981. Initiation of Sporulation in Sporulation and Germination ((Eight International Spore Conference) Levinson, H.A.L. Sonenshein and D.J. Tipper (ed) pp 1-12. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.C.
19. Gel'man, N.S., Lukoyanova, M.A. y Ostrovskii, DN 1 1975. The respiratory chain and its organization in the Bacterial Membrane. In Membranes Vol. 6, pp 129-215. Editor (mismos autores). Plenum Press, New York.
20. Goldman, M. and H.J. Blumenthal. 1967. Pathways of glucose catabolism in Bacillus cereus. J. Bacteriol. 87: 377-386.
21. Goldman, M. and H.J. Blumenthal. 1964. Changes in terminal respiratory pathways of intact cells of Bacillus cereus at various stages of development. J. Bacteriol. 87: 387-390.
22. Haddock, B.A. and C.W. Jones. 1977. Bacterial respiration. Bact. Rev. 41: 47-99.
23. Hampton, M.L. and E. Freese. 1974. Explanation for the apparent inefficiency of reduced nicotinamide adenine dinucleotide in energizing amino acid transport in membrane vesicles. J. Bacteriol. 118: 497-504.
24. Hanson, R.S., V.R. Srinivasan and H.O. Halvorson, 1963. Biochemistry of sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol. 85: 451-460.

25. Henry, M. F. and E. J. Nyns 1975. Cyanide-insensitive respiration an alternative mitochondrial pathway. 4: 1-65.
26. Hogarth, C., B. J. Wilkinson and D.J. Ellar 1977. Cyanide-resistant electron transport in sporulating Bacillus megaterium KM. Biochim. Biophys. Acta 461: 109-123.
27. Horio T. and M.D. Kamen 1970. Bacterial cytochromes. II Functional aspects. Ann. Rev. of Microbiol. 24: 399-428.
28. Jagow, G. and W. Sebald. 1980: b-Type cytochromes. Ann. Rev. Biochem. 49: 281-314.
29. John, P. and F. R. Watley. 1970: Oxidative Phosphorilation coupled to oxigen uptake and nitrate reduction in Micrococcus denitrificans. Biochim. Biophys. Acta 216: 342-352.
30. John, P. and F.R. Watley 1975. Paracoccus denitrificans and the evolucionary origin of mitochondrion (London) Nature 254: 495-498.
31. Keilin, D. and E.F. Hartree, 1949. Effect of low temperature on the absorpction spectra of hemoproteins with observations on the absorpction spectrum of nitrogen. Nature (London) 164: 254-259:
32. King, T. E. 1971. Preparations of succinic-cytochrome c reductase and cytochrome b-c particle, and reconstitution of succinate-cytochrome c reductase. In Methods in Enzymology. Estabrook, R.W. and M.E. Pullman (ed) Vol. 10, pp 216-231. Academic Press Inc., New York.
33. Kita, K., Kasahara, M. and Anraku, Y. 1982. Formation of a membrane potential by reconstituted liposomes made with cytochrome b₅₆₂^{-o} complex, a terminal oxidase of Escherichia coli K12. Jour. Biol. Chem. 257: 7933-7935.
34. Klofat, W., G. Piccolo, E. Chappelle and F. Freese. 1969. Production of adenosine triphosphate in normal cells and sporulation mutants of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 244: 3270-3276.
35. Knowles, C. J. 1976. Microorganisms and cyanide. Bacteriol. Reviews 49: 652-680.
36. Konings, W. N. 1975. Localization of membrane proteins in membranes vesicles of Bacillus subtilis Arch. Biochem. Biophys. 167: 570-580.
37. Kranz, R. G. and R. B. Gennis 1982. Isoelectric focusing and crossed immunoelectrophoresis of Heme Proteins in the Escherichia coli cytoplasmic membrane. Jour. Bacteriol. 150: 36-45.
38. Lang, D.F., J. Felix and D. G. Lundgren 1972. Development of membrane-bound respiratory system prior to and during sporulation in Bacillus

- cereus and its relationship to membrane structure. J. Bacteriol. 110: 968-977.
39. Laszlo, D. J. and B. L. Taylor 1981. Aerotaxis in Salmonella typhimurium Role of electron transport Jour. of Bacteriol. 145: 990-1001.
 40. Meyer, D. J. and C. W. Jones 1973. Oxidative phosphorylation in bacteria which contain different cytochrome oxidases. Eur. J. Biochem. 36: 144-151.
 41. Meyer, D.J. and C. W. Jones 1973. Reactivity with oxygen of bacterial cytochrome oxidases a_1 , aa_3 , and o. FEBS LETTERS 33: 101-105.
 42. Miki, K. and K. Okuniki, 1969. Cytochromes of Bacillus subtilis Physicochemical and enzymatic properties of cytochromes c_{550} and c_{554} . J. Biochemistry 66: 845-854.
 43. Mc. Feters, G. A., D. F. Wilson and G. A. Strobel 1970. Cytochromes in a cyanide-resistant strain of Bacillus cereus Can. Jour. Microbiol. 16: 1221-1226.
 44. Nakada, D., A. Matsushiro, M. Kordo, K. Suga and K. Konishi, 1957. Studies on the development of anaerobic sporofforming bacteria II. Evolution of the respiratory enzyme system in Bacillus cereus. Med. J. Osaka Univ. 7: 809-818.
 45. Ohne M. 1974. Regulation of aconitase synthesis in Bacillus subtilis induction, feedback repression, and catabolite repression. J. Bacteriol. 117: 1295-1305.
 46. Psichinoty, F. et M. Durand 1980. Nutrition carbonè etude taxonomique de Bacillus cereus et Bacillus megaterium Can. J. Microbiol 26: 778-794.
 47. Pudek, M. R. and P. D. Bragg. 1974. Inhibition by cyanide of the respiratory chain oxidases of E. coli. Arch. Biochem. Biophys. 164: 682-693.
 48. Rice, C.W. and W.P. Hempfling 1978. Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in Escherichia coli. Jour. Bacteriol. 134: 115-124.
 - 48a. Salmon, I. and R.K. Poole 1980 The mitochondrial cytochromes of an unusual budding yeast: Sterigmatomyces halophilus: Spectral characterization exploiting fourth order finite difference analysis Jour Gen Microbiol 117: 315-326.
 49. Setlow, P. 1981 Biochemistry of bacterial forespore development and spore germination. In sporulation and germination. Levinson H.,

Soucashein, A. L. and Tipper, D. F. (ed) pp 13-28 Amer. Soc. for Microbiol. Washington D. C.

- 49a. Shipp, W. W. 1972 Absorption bands of multiple bands cytochromes in Bacteria detected by numerical analysis of absorption spectra. *Archiv. Biochem. Biophys* 150: 482-488.
50. Smith, L. 1978. Bacterial cytochromes and their spectral characterization In *methods in Enzymology*, Vol. 53, pp 202-213 Fleischer S. and L. Packer (ed). Academic Press Inc., New York.
51. Sterlini, J.M. and J. Maldelstam. 1969. Commitment to sporulation in Bacillus subtilis and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* 113: 29-37.
52. Taylor, B.L. 1983. How do bacteria find the optimal concentration of oxygen TIBS December 1983 pag. 438-441. Vol. 8.
53. Taylor, B.L. 1983. Role of proton motive force in sensory transduction in Bacteria. *Ann Rev. of Microbiol.* 37: 551-573.
54. Tochikubo, K. 1971. Changes in terminal respiratory pathways of Bacillus subtilis during germination, outgrowth and vegetative growth. *J. Bacteriol.* 108: 652-661.
55. Tsuchiva, T. A., Misawa, Y. Miyake, K. Yamasaki and S. Niiya. 1982. Solubilization and reconstitution of membrane energy-transducing systems of Escherichia coli. *FEBS LETTERS* 142: 231-234.
56. Weber, M. N. and D. A. Broadbent. 1975. Electron transport in membranes from spores and from vegetative and mother cells of B. subtilis. In *spores VI* Gerhardt, P., R.N. Costilow and H. L. Sadoff (ed) pp 411-417. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
57. Wilkinson, B. J. and D. J. Ellar 1975 Morphogenesis of the membrane-bound electron transport system in sporulating Bacillus megaterium KM. *Eur. J. Biochem.* 55: 131-139.
58. White, D. C. and P. R. Sinclair 1970. Effect of nitrate, fumarate and oxygen on the formation of the membrane bound electron transport system of Haemophilus parainfluenzae. *Journal of bacteriol.* 101: 365-372.
59. White D. C. and P. R. Sinclair. 1971. Branched electron-transport systems in bacteria. *Adv. in Microbiol. Physiol.* 5: 173-211.