

00522

2

2ii

CRECIMIENTO Y ESPORULACION DE *Bacillus cereus*
EN AUSENCIA DE CITOCROMO a_{550} . CARACTERIZACION
DE UN MUTANTE CYT a^- .

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

PRESENTA:

BIOL. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA

FACULTAD DE QUIMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1987

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AE = Aeróbico

Anae = Anaeróbico

Asc = Ascorbato

CAAS = Casaminoácidos

Cit = Citocromo

CO = Monóxido de Carbono

DCPIP = Diclorofenolindofenol

Ditio = Ditionita

DNasa = Desoxirribonucleasa

D.O. = Densidad óptica

E = Coeficiente de extinción molar

G = medio con glucosa

G2XFO4 = Medio G adicionado con el doble de la cantidad de
fosfato

KCN = Cianuro de potasio

Km = Constante de afinidad

Kiap = Constante de inhibición aparente

NADH = Nicotinamida adenin dinucleotido reducido

NAD1 = Acronimo formado a partir de el nombre de los sustratos
que usa esta reacción (naftol y dimetil-p-fenilendiamina)

nm = nanometro

ox = oxidado

FMS = Fenasina metasuifonato

Per = Persulfato de amonio

red = reducido

Silv = silvestre

Succ = Succinato

SR = Sistema respiratorio

Tg = Tiempo de generaci3n

TMPD = Tetrafenilparafenilendiamina

TNS = Transpos3n S

TRIS = Trishidroximetil amino metano

TCM = Amortiguador Tris-HCl, mas cloruro de calcio y cloruro de magnesio

U.K. = Unidades Klett

RESUMEN

Bacillus cereus. tiene un sistema respiratorio complejo, en el que se encuentran presentes 3 oxidasas terminales: cit aaa, cit g y cit d, que difieren no solo en su distinta afinidad por el oxígeno, sino también por su distinta sensibilidad a cianuro. Es poco lo que se sabe acerca de la regulación y participación de estas oxidasas en la vía transportadora de electrones. Por otro lado, se ha considerado que cit aaa es un citocromo indispensable para que la esporulación ocurra.

En el presente trabajo, aislamos mutantes deficientes en cit aaa, basados en la reacción de oxidación del tetrafenilparafenilendimina (TMPD) que cede sus electrones casi específicamente a cit g.

En medio fermentable esta mutante creció poco y no rebasó las primeras etapas de esporulación. Amortiguando el medio con fosfato, o bien usando un medio no fermentable a base de aminoácidos, el crecimiento presentó niveles cercanos a lo normal y la esporulación se completó aunque no con el mismo rendimiento que presenta la cepa silvestre.

La actividad de TMPD-oxidasa fue 5 veces menor a la de la silvestre, actividad que por encontrarse en ausencia de aaa, la asociamos a la actividad de cit. g y posiblemente a cit. d, aunque en *B. cereus* este último no está en niveles importantes.

El punto de bifurcación en la cadena, proponemos que está a nivel de cit g, ya que por un lado este citocromo está en

concentraciones normales y por otro presenta un comportamiento paralelo con cit. α cuando se realizaron espectros diferenciales en presencia de KCN.

Introducción

La diferenciación celular ha representado uno de los fenómenos biológicos que más ha llamado la atención del investigador, sin embargo, a la fecha es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos íntimos del proceso. Desde el punto de vista morfológico, la diferenciación consiste en una serie de cambios morfogénéticos que permiten a la célula diferenciada adoptar formas y estructuras que responden a una función. Así, vemos que una célula nerviosa asume formas y estructuras adaptadas a las funciones de irritabilidad y conductividad.

Desde el punto de vista molecular, el estado diferenciado se caracteriza por la síntesis diferencial de algunas proteínas específicas. por ejemplo, la hemoglobina en los eritrocitos, la colágena en los fibroblastos, actina y miosina en el mioblasto y diferentes hormonas en tejidos secretores. Juntando el criterio morfológico y el molecular resulta que la diferenciación celular es la progresiva especialización en estructura y función, que se inicia con una célula totipotencial, el huevo y termina con diferentes estirpes celulares con distintos grados de especialización.

A pesar del enorme interés que ha existido sobre la diferenciación, es muy poco lo que se conoce acerca de los mecanismos íntimos del proceso. Esto debido en parte a la enorme complejidad que representan los animales superiores como modelo de experimentación.

Un alternativa a estas dificultades experimentales es el empleo de cultivo de tejidos, sin embargo, muchos de los tipos

celulares que se han logrado cultivar sufren cambios, que los alejan de su verdadero estado diferenciado. Con todo esto, muchos investigadores buscaron modelos mucho más simples y procesos morfogenéticos parecidos a la diferenciación celular en organismos superiores así, se han abordado modelos en bacterias, protozoarios, levaduras y mesozoarios.

De entre estos modelos, la esporulación bacteriana en los géneros Bacillus, Clostridium y Sporosarcina han resultado tener enormes ventajas experimentales:

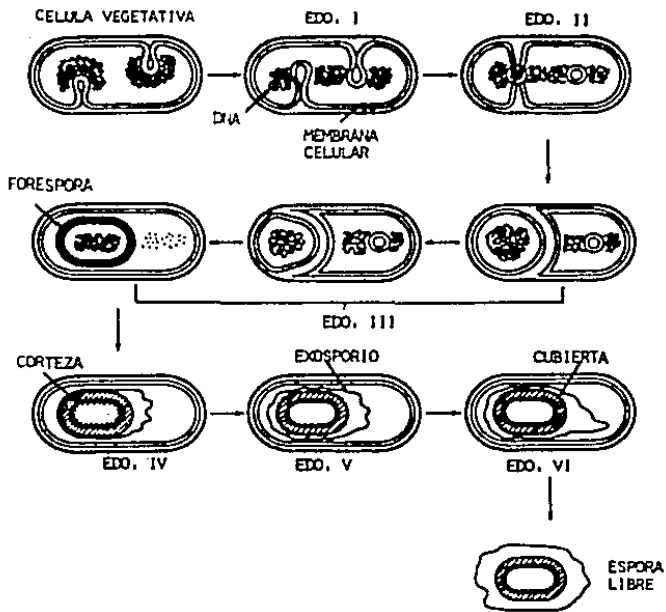
1. Son fáciles de cultivar en medios de composición conocida
2. Es posible inducir el proceso morfogenético con gran sincronía y un rendimiento mayor al 90%
3. Un tipo celular, la célula vegetativa se transforma hacia un tipo celular único, la espora.
4. Es posible cultivarlos obteniendo cantidades suficientes para el análisis morfológico, bioquímico y fisiológico.
5. Es posible obtener mutantes en diferentes estadios del desarrollo, esto posibilita a su vez la información genética necesaria para el proceso morfogenético.

Debido a esto, pocos modelos de diferenciación celular han recibido tanta atención como la esporulación bacteriana, o quizás sea más correcto decir que es el modelo donde mayor conocimiento del proceso morfogenético se ha adquirido. Las diferentes especies de Bacillus han permitido el estudio de los procesos morfogenéticos y en la actualidad se tiene el cuadro más completo de los mecanismos que inducen, conducen y mantienen el estado criptobiótico de la espora. Se conoce que la esporulación bacteriana es inducida por agotamiento de las fuentes de carbono

y/o nitrógeno y por limitaciones en requerimientos auxotróficos. También, se ha llegado a la conclusión de que una disminución significativa en la vía de síntesis de las purinas, pudiera ser el uno de los eventos primarios en esporulación (13). Se ha hecho un inventario muy completo de los contenidos moleculares y actividades metabólicas que caracterizan a los estados vegetativo, esporulante, espora latente y célula germinada (15,12). Se conoce que durante el crecimiento vegetativo en fuentes de carbono fermentables ocurre la máxima velocidad de crecimiento y que la bioenergética del proceso se apoya en un metabolismo netamente fermentativo (15) con represión catabólica sobre las vías finales de oxidación aerobia (ciclo de Krebs y cadena respiratoria). Durante el crecimiento en medios no fermentables no se presenta represión catabólica obteniéndose niveles elevados en las actividades del ciclo de Krebs y sistema respiratorio. Durante las etapas iniciales de la esporulación, independientemente del medio en el que el crecimiento haya ocurrido, hay una sobreinducción de las enzimas del sistema respiratorio, elevada, si el crecimiento ocurrió en medio fermentable (11,26) o modesta si el crecimiento previo fue en medio no fermentable (17). Cualquiera que sea la situación, se sabe que la esporulación en especies facultativas solo ocurre bajo condiciones aeróbicas (48) y que durante las etapas tempranas de la esporulación (edos. I a III) las actividades del sistema respiratorio se incrementan de manera notable (13). Así, la respiración aerobia es un proceso obligado de la esporulación en especies facultativas.

ESQUEMA I

ESTADOS DE ESPORULACION EN BACILLUS



Desde el punto de vista molecular se sabe que la expresión génica durante la esporulación bacteriana obedece a un programa ordenado y preciso de inducción secuencial (ver esquema I), en donde los eventos secundarios ocurren sólo si los eventos previos o primarios han sucedido. De hecho, el estudio con mutantes aislados en etapas definidas de la esporulación (Spo 0, Spo 1, Spo 2 etc) han revelado un comportamiento pleiotrópico, (mutación en un solo gen, que causa cambios en 2 o mas características fenotípicas) por ejemplo, una mutación en el estado II de esporulación, bloquea la expresión de eventos posteriores (4).

A la luz de los conocimientos suministrados recientemente por la genética molecular de la esporulación bacteriana, se tienen evidencias convincentes de que la RNA-polimerasa y especificante, su factor sigma, es responsable del programa de expresión secuencial de genes durante la esporulación (8,28). Se ha llegado a establecer la existencia de cuando menos 6 factores sigma o como se les conoce en algunas publicaciones: factores "parecidos a sigma". En la etapa vegetativa se expresan dos factores sigma (que se distinguen por su peso molecular: sigma 37 y sigma 55). Estos factores serían responsables de la transcripción específica de genes característicos de la fase vegetativa. A lo largo de la esporulación los factores sigma vegetativos son sustituidos por otros factores sigma que se suceden en etapas específicas de la morfogénesis con el consecuente cambio en la especificidad por sitios promotores. Así cada gene o grupos de genes serán transcritos sólo en el momento en que aparezca el factor sigma que reconoce su promotor. Durante la esporulación se siguen transcribiendo un número

considerable de genes típicos de crecimiento vegetativo; algunos casos estudiados han revelado que estos genes expresados en crecimiento y esporulación tienen 2 promotores que son reconocidos por la RNA-polimerasa-sigma correspondiente a la fase vegetativa o a la esporulante respectivamente (28).

Cada que las actividades del sistema respiratorio se expresan significativamente en fase vegetativa (medio no fermentable) y se sobreexpresan en etapas tempranas de la esporulación; es posible que sus genes correspondientes contengan dos promotores: uno de fase vegetativa y otro para su sobreexpresión en fase esporulante.

Aparte de los muy diversos e interesantes aspectos que aguardan a la biología molecular del sistema respiratorio de bacterias esporoformadoras, existen grandes lagunas en el conocimiento de su composición, organización y regulación. Sabemos sin embargo, que tiene una gran plasticidad y una mayor complejidad a la descrita en mitocondrias.

En los microorganismos la naturaleza de los donadores y aceptores de electrones, varía no solo de acuerdo al tipo de organismo de que se trate, sino también de las condiciones de crecimiento tales como: cantidad de oxígeno, edad del cultivo y naturaleza de la fuente de carbon, ya sea esta fermentable u oxidativa (11). Existe también, un amplio rango de potencial redox entre estos componentes, lo que determina que en estos sistemas respiratorios existan varios citocromos intermediarios y de 1 a 4 citocromos que funcionan como oxidasas terminales (2).

Se considera que son tres los sectores funcionales de las

cadenas respiratorias:

a) Sector de entrada.- Constituido por deshidrogenasas y flavoenzimas que alimentan a la cadena de electrones, son muy diversas y oxidan un gran número de compuestos.

b) Sector intermedio.- En este sector, encontramos a las quinonas, compuestos pequeños e hidrofobicos de dos tipos: las ubiquinonas presentes en organismos gram-, derivadas del 3,2 metoxi 3 metilbenzoquinona, y las menaquinonas características de organismos gram+, derivadas de la menadiona. Encontramos también, centros fierro-azufre, citocromos del tipo b, c y algunas metaloproteínas.

c) Sector de salida.- Participan aquí las oxidasas que aceptan electrones del sector anterior y reducen a el oxígeno. En las bacterias generalmente se encuentran mas de una oxidasa en un mismo organismo, siendo en algunas casos hasta tres las que pueden estar presentes. Existen además de el oxígeno, otros compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden funcionar como aceptores finales, en este caso existen reductasas especiales para estos compuestos.

El tener varias oxidasas va a dar al organismo ventajas selectivas, ya que estas tienen diferente afinidad por el oxígeno, así como distinta sensibilidad a CN (10,11). Estas oxidasas son hemo proteínas y hem-a + Cu, y son de tres tipos:

I.- Citocromo c oxidasas, contienen hemo a y Cu⁺⁺: Como $\bar{a}\bar{a}$ y $\bar{c}\bar{a}\bar{a}$ que tienen además del hemo a y cobre, un hemo c.

Las citocromo oxidasas $\bar{a}\bar{a}\bar{a}$ son similares a la oxidasa mitocondrial, pero contiene unicamente entre 2 y 3 subunidades (mitocondria tiene entre 7 y 14).

II.- Citocromo g oxidasas que tienen un hemo b: Dentro de estas están las oxidasas tipo g, algunas veces tienen también un hemo c y se les denomina tipo cg.

III.- Quinol oxidasas, estas tienen un hemo b y un d: Por lo tanto se les denomina oxidasas tipo bg. Dentro de este último grupo esta una quinol oxidasa tipo g, que tiene un hemo b tipo c y a sido descrita en *E. coli* (2).

El género Bacillus está constituido por especies diversas que poseen sistemas respiratorios complejos y ramificados. No se conoce con certeza la composición y secuencia de enzimas que lo constituyen. Bacillus subtilis (6,43) y Bacillus thuringiensis poseen dos caminos alternativos de transporte de electrones hacia el oxígeno, siendo sus oxidasas terminales cit aaa y cit g (Escamilla en preparación). Bacillus cereus (11) en cambio, posee 3 oxidasas terminales, cito aaa, g y d. A la fecha no es claro cual sea el componente a partir del cual los SR mencionados se ramifiquen. La proposición más favorecida es de que un citocromo del tipo b (b₅₅₈) sea el donador de electrones para las vías que conducen a cit aaa y g en B. subtilis (38) y B. thuringiensis (Escamilla en preparación) y también, el donador directo en los tres caminos alternativos de B. cereus: los cito aaa, g y d (11). Por otro lado, se ha propuesto la existencia de cuando menos cuatro tipos diferentes de cit b en las 3 especies y no se sabe cual sea la ubicación y función de cada uno, mucho menos su regulación. La confusión anterior se deriva del hecho que los máximos de absorción para los diferentes citocromos b se encuentran muy cercanos, (en el rango de 10 nm) y por tanto, se

translapan sus señales individuales y se conjugan en un pico ancho y complejo (ver resultados).

En cuanto a su expresión individual y sectorial, en el crecimiento vegetativo y en la esporulación, no se tiene un gran conocimiento. Ya mencionamos, que durante la esporulación hay un incremento generalizado de actividades, pero muy especialmente, en el sector que lleva del cit c al cit aaa . Paralelo al incremento de citocromos, también ocurre un aumento de casi 10 veces en la actividad que oxida al colorante redox tetrametilenparafenilendiamina (TMPD 11,44) donador cuasiespecífico de este sector. En el mismo período, la concentración de cit c se eleva modestamente (2 veces) y el cit d no aparece en condiciones en que el cultivo esta bien aerado (11). Así, a primera vista, parecería que la vía del cit c -- aaa es determinante para la esporulación. Esta disyuntiva fue abordada por Taber y Col. en 1974 (41), estudiando las propiedades de crecimiento y esporulación para mutantes con deficiencias en su sistema respiratorio. Algunos de los mutantes aislados probaron ser deficientes para cit aaa , y en todos los casos se observó un fenotipo asporogénico (no forma esporas). A raíz de estos resultados ha quedado impreso en la literatura, como un dogma, que el citocromo aaa es indispensable para la esporulación (48).

Estudios posteriores sobre los mismos mutantes revelaron que además de la carencia en cit aaa , los mutantes en cuestión también tenían deficiencias parciales o totales en otros citocromos y sobre todo, en actividades del ciclo de Krebs (42). Esta revelación plantea la duda de si el caracter asporogénico de los mutantes de Taber es debido solo, ó cuando menos,

principalmente a la carencia de cit aaa o si, por lo contrario, las carencias adicionales en cadena respiratoria y/o ciclo de Krebs son las responsables directas o aditivas del fenotipo asporogénico.

Examinando los procesos de selección de mutantes empleados por Taber (41) salta a la vista que la técnica empleada no fue específica para la vía $c \rightarrow aa_3$. Para la selección de mutantes emplearon bencidina que es un reactivo genérico de hemoproteínas. La bencidina es virada hacia el azul por las hemoproteínas (30) en presencia de peróxido de hidrógeno, así, con este reactivo es de esperarse que se detecten carencias generalizadas en citocromos y no la ausencia específica de la vía $c \rightarrow aa_3$.

Considerando lo anterior se decidió retomar el estudio, tratando de aislar mutantes con carencia específica de cit aaa y no con deficiencia generalizada de citocromos.

Para cumplir con este objetivo se montó una prueba específica de selección para la actividad de citocromo aaa oxidasa que no tuviera interferencia significativa de otros citocromos y actividades enzimáticas de Bacillus cereus. La mutante obtenida nos permitiría derimir la controversia sobre la obligatoriedad del cit aaa para esporulación y nos permitiría estudiar las propiedades cinéticas de la citocromo oxidasa o sin interferencia de la oxidasa aaa . Así mismo, la carencia de cit aaa permitiría obtener información acerca del punto de cruce donde se bifurcan las 2 vías alternas, específicamente sobre el papel del citocromo c en la secuencia de transferencia de electrones.

Material y Métodos

Cepas y técnicas de cultivo. Se utilizaron dos cepas de Bacillus cereus: La primera, Bacillus cereus cal ste que corresponde a una cepa silvestre aislada por el Dr. A.J. Andreoli de la Universidad del estado de California en Los Angeles, y cuyas características microbiológicas la identifican como Bacillus cereus T ATC9373 (1). La segunda cepa corresponde a una mutante espontánea deficiente en citocromo aa₃, que en adelante será nombrada como cepa cyt a⁻. Esta mutante fue seleccionada por su incapacidad para oxidar la tetrametilparafenilendiamina (TMPD), donador de electrones cuasiespecífico de la citocromo oxidasa aa₃. La reacción utilizada para la identificación de posibles mutantes Cyt a⁻ se le conoce como reacción NADI (30) de tal manera que las células competentes viran el colorante (TMPD) de su forma reducida (leuco) a la forma oxidada (morado). Las colonias incapaces de virar el colorante en los primeros 2 minutos de exposición fueron aisladas como posibles mutantes para ser confirmado su fenotipo aa₃ por

espectroscopia diferencial.

Las cepas silvestre y cyt g⁻ se conservaron a 4°C en viales conteniendo agar nutriente (23 g/litro H₂O). Para su crecimiento masivo se utilizó un biofermentador de 25 lt ajustado a 30°C, 14 litros de aire por min y 250 rpm. Se utilizaron tres medios de cultivo diferentes para el crecimiento en el biofermentador:

a) Medio G modificado descrito por Hanson et al (16) y que se caracteriza por su alto contenido en sacarosa (0.2%) como fuente de carbono fermentable. Este medio contiene además: extracto de levadura al 0.2%, (NH₄)₂SO₄ al 0.2%, K₂HPO₄ al 0.05% y una mezcla de sales en concentraciones menores y formada por: MgSO₄ al 0.02%, MnSO₄ al 0.005%, CaCl₂ al 0.0025%, Cu SO₄ al 0.0005%, Zn SO₄ al 0.0005%, Fe SO₄ al 0.00005% y Co SO₄ al 0.00002%

b) Medio de hidrolizado de caseína, descrito por Sterlini y Maldestam (39) que se caracteriza por no tener fuentes de carbono fermentables. Este medio esta constituido por: hidrolizado pancreático de caseína al 0.8%, L-glutamato al 0.4%, D,L-alanina al 0.2% y asparagina al 0.1%. La composición original fue modificada en nuestro laboratorio agregando la mezcla de sales menores descrita para el medio G. El medio es ajustado a pH 7.1 con K₂HPO₄.

c) Caldo nutritivo. Este medio esta formado por una mezcla compleja de nutrientes y fue preparado al 0.8% a partir de preparaciones comerciales de las marcas Bioxón y Difco. El medio comercial está constituido por 5 partes de peptona de gelatina y 3 partes de extracto de carne, el pH final fue de 6.9.

En todos los casos el biofermentador fue sembrado con 1.0 L de inóculo en fase logarítmica-media crecido en el mismo medio. El crecimiento fue seguido por espectrofotometría a 540 nm. Al término del crecimiento las células fueron cosechadas en una centrifuga Sharples T-1 de flujo continuo. El paquete celular fue lavado 3 veces con amortiguador TCM (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo MgCl₂ y CaCl₂ a concentración 5.0 mM). Los paquetes celulares fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

Para la selección del mutante *cyt a⁻* se sembraron de 200 a 300 células por caja de Petri preparadas con agar base 23 g x L de medio G. La fórmula del medio G sólido fue la misma descrita anteriormente excepto que la concentración de sacarosa fue reducida de 0.2% a 0.005%.

Las cajas sembradas y dispersadas por triángulo de vidrio fueron incubadas durante 48 hs a 30°C. Al cabo de ese tiempo las colonias obtenidas fueron sometidas a la prueba de la reacción NADI aplicando un papel filtro humedecido con TMPD 0.1 mM. Al cabo de 2 minutos se aislaron las colonias que no habían virado el colorante (leuco a morado) en el papel filtro. Alternativamente, la reacción NADI se practicó a cada colonia individual agregando una gota (microjeringa de 50 µl) de TMPD 0.1 mM a cada colonia.

RUPTURA DE CELULAS Y OBTENCION DE MEMBRANAS. Las células se resuspendieron en 1 volumen de amortiguador TCM que corresponde a 3 veces su peso húmedo. Con el objeto de evitar acción de proteasas, se adicionó al amortiguador en este caso, con 15 µg/ml de PMSF (Fluoruro de fenil-metil sulfonilo), que se agregó como

cristales directamente en la suspensión.

La ruptura se hizo en una prensa Ribi (RM-1 Ivan Sorvall Inc. USA) a una presión de 30,000 Lb/pulg² y 4°C comprobando bajo el microscopio óptico, la eficiencia de la ruptura. Antes de iniciar el lavado y obtención de las membranas, la muestra se trató durante 10 min con DNasa agitando lentamente a temperatura ambiente para eliminar así la gran viscosidad que dá a la muestra el DNA liberado.

Otro método de ruptura empleado fue el Dyno-Mill utilizando perlas de vidrio (WAB Dayno Mill), de 0.1 y 0.2 mm de diámetro, agitando 2 periodos de 30 segundos a 4,500 RPM y 4°C. Por este método el DNA se fragmenta por lo que no es necesario el uso de la DNasa.

Las células enteras se eliminaron centrifugando a 2,000 x g durante 10 min en una centrifuga Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments). El sobrenadante obtenido, fué nuevamente centrifugado a 144,000 x g x 30 min, y lavado 2 veces con amortiguador TCM en las mismas condiciones. Finalmente las membranas se resuspendieron en un pequeño volumen del mismo amortiguador y se separaron en fracciones, para determinar proteína y actividad respiratoria en muestras frescas. Las fracciones usadas para análisis espectrofotométrico se guardaron a -70°C. La concentración a la cual se diluyeron las membranas para su estudio fué de entre 8 a 10 mg de proteína por ml. La determinación de proteína se hizo de acuerdo al método de Lowry et al (27).

CURVAS DE CRECIMIENTO. Con objeto de comparar el crecimiento y esporulación de nuestras cepas silvestre y mutante, en los

distintos medios, se sembraron las dos cepas en matraces con 50 ml de medio y se dejaron crecer hasta la etapa logarítmica media, en ese momento se transfirió una misma cantidad de inóculo a matraces con medio fresco y se les siguió el crecimiento hasta T_0 (T_0 = tiempo al final del crecimiento logarítmico). Después de 24, 48 y 72 hs las células se observaron al microscopio para evaluar su esporulación. Experimentos de este tipo, se hicieron con las dos cepas en medio G y G adicionado de fosfato dibásico en cantidades superiores al normalmente contenido: 0.062% (1.25X), 0.075% (1.5X), 0.0875% (1.75X) y 0.1% (2X). Una muestra de los medios inoculados se tomó a las 2, 4, 6 y 8 hs de crecimiento para medir el pH.

RENDIMIENTO DE LA ESPORULACION. Se midió sembrando en cajas de agar nutriente diluciones de los diferentes medios en los que se dejaron esporular las cepas, las diluciones y cantidades plaqueadas, fueron las siguientes: dilución 10^{-4} , se sembraron 10 μ l, dilución 10^{-6} , 10, 25 y 100 μ l usando triángulo para distribuir las células homogéneamente. Se dejaron crecer a temperatura ambiente y a las 24 hrs se contó el número de colonias.

TERMORRESISTENCIA. Células de la cepa silvestre y *cyt a⁻*, se sembraron en medio G y medio G con fosfato concentrado dos veces (G 2X F04) y se dejaron esporular (48 hs), se cosecharon y lavaron dos veces con CaCl_2 10 mM pH 7.2, se resuspendieron en esta misma solución en un volumen igual al inicial y se dividieron en dos fracciones, una control (4 C) y una experimental que se calentó por 20 min a 80°C. El rendimiento de

la esporulación se midió en la forma antes descrita.

ACTIVIDADES RESPIRATORIAS. Las actividades de NADH y Succinato deshidrogenasas, así como de NADH, Succ. y Asc-TMPD oxidasas fueron medidas de acuerdo a la siguiente metodología:

Succinato oxidoreductasa.— Su actividad se determinó a temperatura ambiente, en una mezcla que contenía 20 mM succinato disódico pH 7.5, 50 mM de fosfato de potasio pH 8.0, 1.1 mM de fenazina metasulfato (FMS), 0.08 mM de 2,6-Diclorofenol-Indofenol (DCPIP), 0.1 mM de cianuro de potasio y entre 10 y 30 μ l de membranas que contenían de 10 a 20 mg de proteína.

NADH oxidoreductasa.— Se hizo en la misma forma que la anterior, sólo se sustituyeron el succinato y el FMS por NADH 0.5 mM. El pH del amortiguador para este ensayo fue de 7.4. El volumen final fue de 1.0 ml que se midieron a 600 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1800. El coeficiente de extinción usado para el DCPIP oxidado fue de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

NADH y Succinato oxidasas fueron medidas en un oxímetro modelo 53 (Yellow Spring Instruments). La mezcla (3.0 ml finales) contenía:

50 mM de fosfato de potasio pH 7.4, y el equivalente de 1.5 mg de proteína de membrana. Después de incubar 3 min a 30 C se inició agregando 40 μ M de succinato, o bien 0.5 mM de NADH (concentraciones finales).

Citocromo c oxidasa.— Su actividad fue determinada también por el método polarográfico, en una mezcla de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 6.8 con membranas en las cantidades ya descritas. Después de la incubación 3 min 30°C, se agregaron Ascorbato de sodio pH 6.8 y TMPD a una concentración final de 10

mM y 0.1 mM respectivamente. La actividad de las tres oxidasas medidas está expresada como ngram átomo de O₂ mg protein⁻¹ min⁻¹.

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE CITOCROMOS. Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro SLM - AMINCO DW-2c II, a temperatura ambiente, usando en este caso celdas de vidrio de 1.0 cm. de paso de luz y en nitrógeno líquido (77 K) en celdas de 2mm de paso de luz.

Tres tipos de espectros fueron realizados:

a) Espectro diferencial reducido menos oxidado. En este caso la reducción se hizo con diferentes sustratos, NADH 0.5 mM, succinato 20 mM, ascorbato 10 mM + TMPD 0.3 mM, o bien con una pequeña cantidad de hidrosulfito de sodio (ditionita). La oxidación de las membranas en la celda de referencia se hizo agregando unos cristales de persulfato de amonio. Este tipo de espectros se hicieron tanto a temperatura ambiente, como en nitrógeno líquido.

b) Ditionita-CO menos ditionita. Membranas reducidas con ditionita, se dividieron en dos, una parte se uso como referencia y la otra se burbujeeó con CO durante 1 min en la obscuridad y en presencia de 0.01 ml de antiespumante (Antifoam spray de Sigma). La medición se hizo inmediatamente a temperatura ambiente.

c) Espectro diferencial anaerobio menos aerobio. Se hicieron incubando por duplicado membranas en presencia de distintos donadores de electrones durante 20 min a temperatura ambiente con objeto de llevarlos a anaerobiosis. Antes de congelar, la celda de referencia se agitó (vortéx) para tener así la muestra aerobia. Este mismo experimento se realizó en presencia de KCN

0.1 mM y 1.0 mM en la celda anaerobia y en otros casos en ambas celdas.

Las membranas usadas, fueron resuspendidas en amortiguador TCM con 25% de glicerol para mantener las membranas en suspensión estable. La concentración de membranas usadas fue de entre 8 a 12 mg de proteína por ml.

La concentración de citocromos se calculó en los espectros realizados a temperatura ambiente reducidos con ditionita en presencia o ausencia de CO. Las siguientes longitudes de onda y coeficientes de extinción molar fueron usados: a_{88} , E(603-630 nm) = $24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (12); cit. b E(563-575 nm) = $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (12); cit c E(550-540nm) = $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (12); cit a₂ E(630-615 nm) = $8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (18); cit a₂-CO E(590-605 nm) = $10.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (38); cit a-CO E(415-430nm) = $160 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (39).

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Muestras de las cepas silvestre y cyt a- crecidas hasta T5 en medio G y G-PD₂X respectivamente, fueron cosechadas y lavadas con amortiguador TCM. El precipitado con las células enteras fue procesado para microscopia electrónica en la siguiente forma: incubación durante 2 hrs. en gluteraldehido al 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, después de fijado, se lavó 2 veces con el mismo amortiguador más sacarosa 0.25M durante 12 hs, se pasó a óxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador por 2 hs, se lavó con amortiguador y se deshidrató con etanol haciendo 2 cambios en cada una de las siguientes concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% y absoluto, todos estos pasos, se hicieron a 4°C. Se hicieron 2 cambios de óxido

de propileno a temperatura ambiente y se dejó infiltrar con este reactivo más epon en una concentración 1:1 durante 48 hs en desecación.

Inclusión: las muestras ya infiltradas, se pasaron a epon concentrado y se dejaron polimerizar durante 48 hs a 60°C, se cortaron y las rejillas fueron teñidas con acetato de uranilo más citrato de plomo de acuerdo con el método de Reynolds (36). La observación se hizo en un microscopio de transmisión Jeol-100B.

Resultados

Estudios realizados por Jurtsmuk y Muller (20) en una amplia variedad de especies bacterianas ubican a B. cereus como una especie NADI-negativa por su baja capacidad de oxidación o vira del colorante redox TMPD. Debido a que este colorante, por su potencial redox ($E^{\circ}=260$ mV), esta capacitado para donar electrones en el sector citocromo oxidasa terminal, la reacción es una medición directa de las actividades de citocromo oxidasa. Potencialmente, B. cereus (cepa silvestre) podría aceptar electrones a nivel de sus 3 oxidasa terminal (cit aa3, cit g y cit d) y de hecho así sucede como lo muestra la reducción significativa de los cit aa3 (y g), cit g y cit d (fig. 7) cuando las membranas de células crecidas en casaminoácidos se incuban en presencia de ditionita. Así, la actividad de TMPD-oxidasa en Bacillus cereus sería la suma de la actividad catalítica independiente de sus 3 oxidasa terminal, sin embargo, como se verá más adelante, la actividad de TMPD-oxidasa es por mucho, principalmente debida a la actividad de cit aa3.

Datos previos de nuestro laboratorio (11) indican que la citocromo oxidasa aa3 y en general todo el sistema respiratorio se encuentre sujeto a represión catabólica durante el crecimiento vegetativo en fuentes de carbono fermentables y que se induce en fuentes no fermentables y sobre todo, durante la esporulación. Es posible que la denominación de B. cereus como una especie NADI- haya sido hecha bajo condiciones de crecimiento que conducen a la represión catabólica de su sistema respiratorio. Pruebas preeliminares realizadas, en nuestro laboratorio, con las células en fase vegetativa y esporulante crecidas ambas en medio

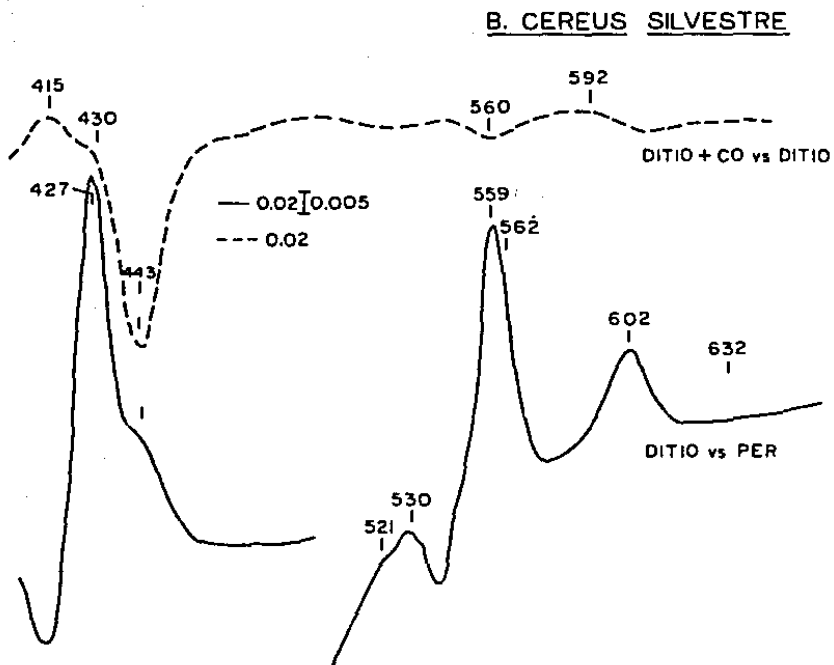
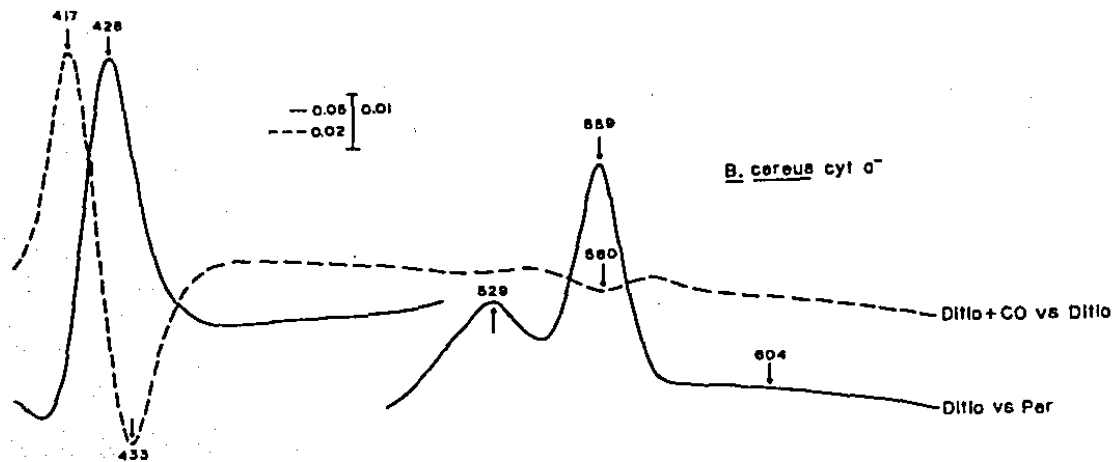
G. demostraron que en efecto, la fase vegetativa se comporta como NAD1- y la fase esporulante como NAD1+.

Por lo anterior decidimos intentar aislar mutantes respiratorios NAD1- en condiciones de máxima inducción para el sistema respiratorio y como estábamos interesados en la posibilidad de aislar mutantes *cyt a-* con capacidad para esporular (contrario al planteamiento de Taber y col. 41) decidimos incubar las cajas de Petri por 48 hs. tiempo suficiente para que las colonias se encontraran en proceso de esporulación.

Obtención de mutantes NAD1- de *B. cereus*. Se realizó una primera aproximación sembrando 200 a 300 colonias en cajas de Petri con medio G sólido. Durante el crecimiento vegetativo todas las colonias mostraron su carácter NAD1- por represión del SR. El problema que se detectó en este medio fué el crecimiento abundante y así, después de 48 hs de crecimiento, las colonias habían perdido sus límites, observándose crecimiento confluyente. Para resolver este problema se decidió castigar el crecimiento bajando la concentración de sacarosa de 0.2% a 0.005%. En estas condiciones las colonias crecieron a un diámetro no mayor de 0.5 cm y envejecieron (esporulando) sin incrementar el tamaño (diámetro) de su colonia. Las colonias de *B. cereus* no se fijan con fuerza al sustrato sólido (agar) por lo tanto, al agregar el TMPD (0.5 ml) y vaciar las cajas, las colonias flotan y se desplazan. Así, se decidió hacer la prueba NAD1 por una de 2 alternativas: Aplicar un papel filtro humedecido en TMPD 0.1 mM asegurando que el papel entrara en contacto con todas las colonias. Al cabo de 2 minutos la caja petri fue observada por

Fig. 1.- Espectros diferenciales de ditionita menos persulfato (trazo continuo) y ditionita + CO (trazo discontinuo) de membranas de Bacillus cereus cit aa3- de la fase estacionaria tardia. Las membranas (10 mg de proteina en 1 ml de glicerol al 50% en amortiguador TCM) en el primer caso fueron reducidas con algunos granos de ditionita (muestra experimental) y la cubeta de referencia preparada con la misma cantidad de proteina fue oxidada con algunos cristales de persulfato de amonio. En el segundo caso las membranas fueron reducidas con algunos granos de ditionita tanto en la cubeta de referencia como en la cubeta experimental; mientras que la cubeta exp. fue expuesta directamente a CO (burbujeo) durante 3 minutos en la obscuridad, la de referencia fue previamente aerada.

Con fines comparativos se muestran en B, los trazos obtenidos con membranas de la cepa silvestre de una fase de crecimiento similar y con una cantidad de proteina, igual a la usada para la cepa mutante (A).



abajo y se marcaron las colonias que no habían virado el colorante. A continuación se retiró el papel y se aplicó una gota de TMPD a las colonias con fenotipo aparentemente NAD⁺, se esperaron otros 2 minutos y aquellas colonias que continuaron negativas fueron picadas y transferidas a una caja petri con el mismo medio donde se sembró por estria, al cabo de 48 hs se volvió a hacer la prueba NAD⁺ (con microjeringa) a unas cuantas colonias.

Las colonias confirmadas como NAD⁺ fueron pasadas varias veces a cajas de Petri para conocer que tan estable era este fenotipo. Las colonias aisladas fueron analizadas por espectrofotometría diferencial (reducido con ditionita menos oxidado con persulfato) y se conservaron las colonias con fenotipo cyt g⁻. Para la realización de la presente tesis se escogió la cepa cyt g⁻ con la mayor velocidad de crecimiento y se procedió a la caracterización que se presenta a continuación.

Composición de Citocromos. Las cepas silvestre y cyt g⁻ fueron crecidas en medio G hasta el final de la fase logarítmica y se procedió a comparar su composición de citocromos por espectrofotometría diferencial a temperatura ambiente.

Como se aprecia en la figura 1, las células cyt g⁻ reducidas con ditionita muestran la ausencia de máximos de absorción a 603 y 445 nm, zonas específicas de absorbancia para el cit g_{ga} como se comprueba en la cepa silvestre. Por otro lado, la mutante cyt g⁻ presenta los picos característicos de cit b (428, 529 y 559 nm). Es claro que la base izquierda (550 nm) del pico con máxima a 559 se encuentra ensanchada, lo que sugiere la presencia de cit

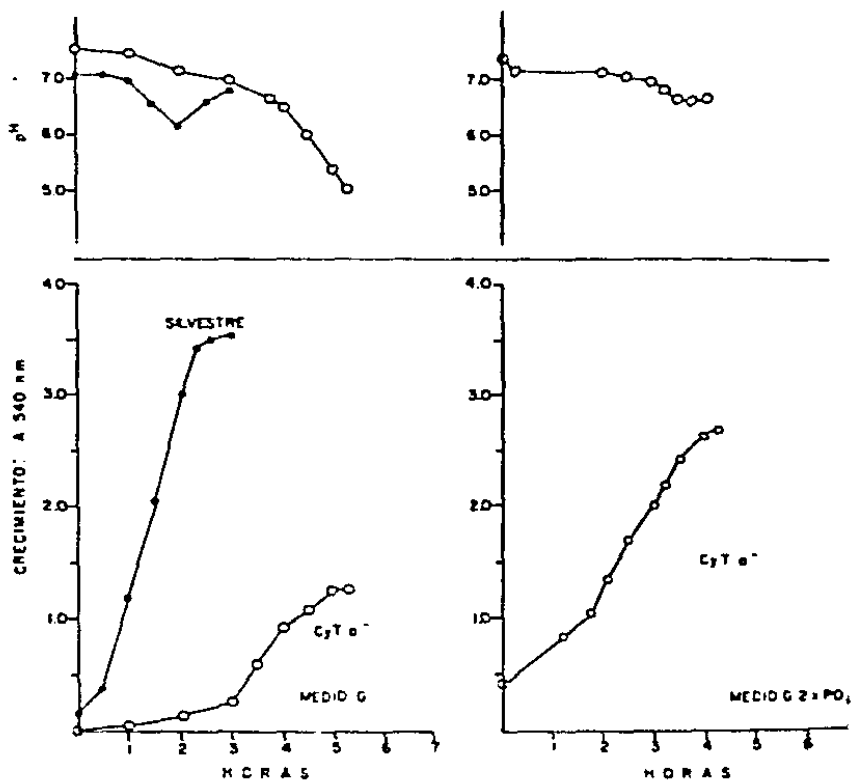


Fig. 2.- Curvas de crecimiento y pH de las cepas silvestre (●-●-●) y cit. g. (○-○-○), crecidas a 30°C, 250 RPM y 14 lts de aire por minuto, en medio G y medio G adicionado con fosfato (G_2PO_4). En ambos medios, la cepa silvestre presentó un comportamiento similar.

c. En los espectros realizados posteriormente a 77 K se ve que esta zona de 530 nm se resuelve en un hombro para cit c .

Es interesante el hecho de que el cit c se exprese en el mutante $cyt\ a^-$ pues para sistemas eucariotes, como la levadura, se ha considerado que el cit aaa es el sitio de anclaje en la membrana para el cit c y como se verá más adelante, las cantidades de cit c expresadas bajo condiciones de máxima inducción en $cyt\ a^-$, son significativamente altas. Esto nos invitó a dilucidar su función, si alguna tiene, en ausencia de cit aaa lo que discutiremos más tarde. En la misma figura se presenta el espectro de monóxido de carbono para las cepas $cyt\ a^-$ y silvestre. Hay que recordar que el CO es capaz de reaccionar con las citocromo oxidasas en su estado reducido dando un espectro característico, en el que los picos del espectro reducido sufren un blanqueo, y en su lugar aparecen nuevas bandas de absorción, características del complejo citocromo oxidasa reducida-CO. La cepa $cyt\ a^-$ muestra un espectro con un pico a 416 y 575 nm y dos valles, a 430 y 560 nm. Este es el espectro para el complejo de cit c -CO, sin interferencias espectrales del complejo cit aaa -CO que se observa en la misma figura, donde la cepa silvestre muestra picos a 416 (cit c -CO) y a 430 y 592 nm (cit aaa -CO) y valles a 445 (cit aaa -CO) y 560 nm (cit c -CO). El valle a 430 nm característico del cit c -CO se observa como un pequeño hombro debido a la interferencia causada por el complejo cit aaa -CO que absorbe a 430 nm.

Propiedades de Crecimiento. Al comparar las propiedades de crecimiento entre la cepa silvestre y $cyt\ a^-$ en medio G (Fig 2A)

se observó que *cyt a⁻* crece lentamente y en baja proporción. Mientras que la cepa silvestre muestra un tiempo de generación de 27 min. y un crecimiento máximo hasta $A_{540} = 4.0$, la mutante *cyt a⁻* tiene un tiempo de generación de 62 min y un crecimiento máximo hasta $A_{540} = 1.25$.

Durante el crecimiento en sacarosa (medio G) Bacillus cereus excreta al medio importantes cantidades de ácidos orgánicos (acético y láctico) lo que se traduce en una caída del pH (Fig 2A) alcanzado su valor mínimo (pH = 5.6 - 6.10) poco antes de que concluya el crecimiento. Con el inicio de la esporulación y la inducción del SR, las células utilizan los ácidos orgánicos acumulados en el medio, oxidan una parte y otra se acumula en el citoplasma como poli beta-hidroxibutirato que será la fuente de carbono durante la esporulación (15).

Es interesante el hecho de que la mutante *cyt a⁻* no parece tener control sobre la acidificación del medio y el pH disminuye continuamente hasta valores de 5.0. (empíricamente sabemos que a este pH, B. cereus no crece ni esporula).

Con lo anterior surge la pregunta de si el crecimiento y esporulación de *cyt a⁻* ocurría directamente por mutación, como había sido propuesto por Taber y col. en mutantes *cyt a⁻* de B. subtilis ó si la incapacidad para crecer y esporular normalmente se debía a la falta de control en la acidificación, causada por la ausencia de *cyt aa₃* (baja actividad respiratoria).

Para explorar esta disyuntiva decidimos comparar las propiedades de crecimiento y esporulación de la mutante *cyt a⁻* en medio G y medio G con capacidad amortiguadora incrementada por la simple adición de una mayor cantidad de fosfato dibásico. En una

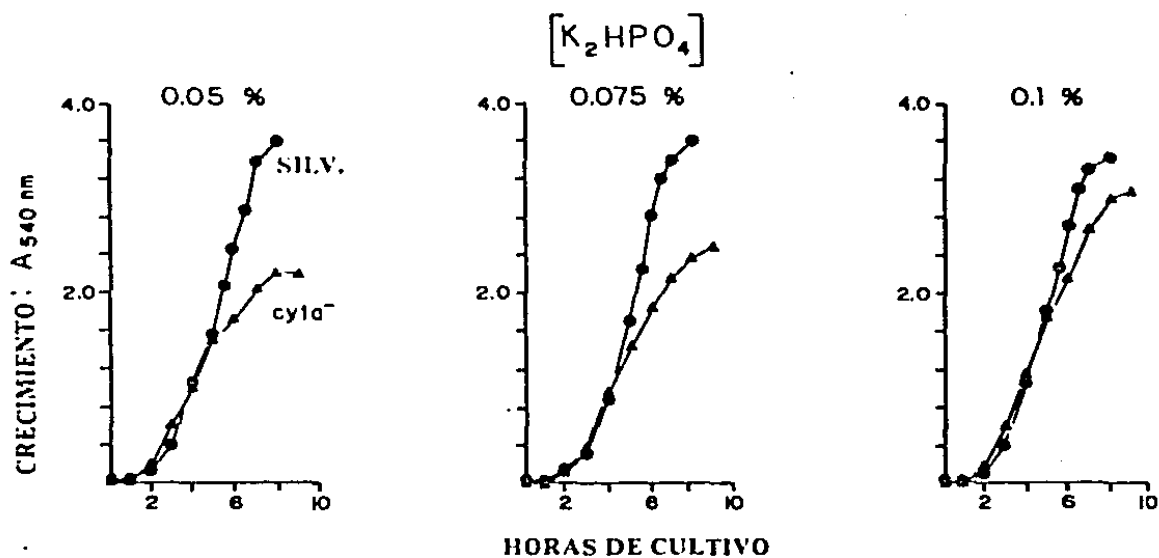


Fig. 3.- Crecimiento comparativo de la cepa silvestre (●—●) y cit⁻ (▲—▲) en medio G, con concentraciones crecientes de K₂HPO₄: 1X = 0.05%, 1.5X = 0.075% y 2X = 0.1%.

primera aproximación se decidió duplicar la cantidad de fosfato (de 0.05% al 0.1%) y como se puede observar en la figura 2b, el control del pH y el crecimiento mejoraron notablemente (el tiempo de generación fue de 48min.) y también se formaron esporas al cabo de 24 hs de incubación. Es pertinente llamar la atención de que, bajo estas condiciones, no se presentó la caída típica de pH que se observó en la cepa silvestre, esto probablemente debido a la capacidad amortiguadora que proporciona el fosfato dibásico adicional.

Se decidió aproximar la concentración mínima de fosfato que se requiere para mejorar el crecimiento y esporulación de la mutante *cyt a⁻* comparado con la cepa silvestre. Se usaron matraces nefelométricos (250 ml) para cuantificar el crecimiento, cada matraz contenía 50 ml de medio G con fosfato 1X, fosfato 1.5X y fosfato 2X. En un conjunto de matraces se sembró 1 ml de inóculo activo de la cepa silvestre y en otro, la cepa *cyt a⁻*. Los matraces fueron incubados en agitación orbital (250 rpm) a 30°C y se siguió el crecimiento cada 30 min.

Como se puede apreciar en la figura 3, la cinética de crecimiento de la cepa silvestre es semejante en las 3 concentraciones de fosfato utilizadas mientras que *cyt a⁻*, inicia su crecimiento con la misma cinética en las tres concentraciones de PO_4^{3-} ensayadas pero, a la concentración de fosfato 1X disminuye su velocidad y al poco tiempo deja de crecer. La concentración 2X permitió un crecimiento semejante al normal, alcanzándose una densidad óptica final cercana a la de la cepa silvestre. Experimentos posteriores, que no se muestran,

TABLA 1. EFECTO DE LA CAPACIDAD AMORTIGUADORA DEL FOSFATO,
 ADICIONADO AL MEDIO G° SOBRE EL CRECIMIENTO Y
 ESPORULACION^a DE LAS CEPAS SILVESTRE Y CYT _a
 DE Bacillus cereus.

	CONCENTRACION DE FOSFATO							
	0.05%		0.062%		0.075%		0.1%	
	SILV.	aa ₃ ⁻	aa ₃ ⁻	SILV	aa ₃ ⁻	aa ₃ ⁻	SILV.	aa ₃ ⁻
TIEMPO MAXIMO DE CRECIMIENTO (HRS)	8:00	7:00	7:00	8:00	7:00	7:30	8:00	8:00
CRECIMIENTO FINAL (UNIDADES KLETT)	180	110	108	180	115	130	171	150
pH FINAL CREC.	6.8	6.41	6.48	ND	6.5	6.52	ND	6.57
TIEMPO DE ESPORULACION	24 hrs.	no espo.	no espo.	24 hrs.	no espo.	48 hrs.	24 hrs.	24 hrs.
RENDIMIENTO ^a DE LA ESPORULACION	3.8x10 ⁶	ND	ND	2.8x10 ⁶	ND	1.49x10 ⁶	2.4x10 ⁶	1.4x10 ⁶

a.- En este experimento se utilizó medio G conteniendo las concentraciones de K₂HPO₄ señaladas en cada columna. La concentración de K₂HPO₄ de 0.05% corresponde a la concentración en la receta original (8).

b.-El crecimiento fue seguido en un calorímetro Klett usando filtro verde y los tiempos de esporulación (hrs) indican el lapso necesario para la conversión de los esporangios a esporas libres y refringentes.

c.-El rendimiento en la esporulación esta expresado como esporas viables forzadas por ml de medio y esto fue determinado por la técnica de plaqueo en agar nutriente, descrito en Métodos.

ND = no determinado.

indicaron que concentraciones de fosfato mayores que 2X ya no mejoran las propiedades de crecimiento de *cyt a⁻*. Así mismo se estableció en un experimento separado, que la concentración de fosfato 1.75X es suficiente para normalizar el crecimiento y la esporulación.

La eficiencia en la esporulación de la cepa silvestre y de la mutante *cyt a⁻*, a diferentes concentraciones de fosfato se determinó por la técnica de plaqueo descrita en materiales y métodos. En la tabla I se aprecia que la cepa silvestre creció de igual manera en todas las concentraciones de fosfato, alcanzando la máxima densidad óptica (171 a 180 UK) en el mismo lapso (8:00 hs) y completando la esporulación (esporas libres) en 24 hs en todos los casos; el rendimiento en la esporulación disminuyó un poco, a medida que se aumentó la concentración de fosfato, desde 3.8×10^{-9} esporas/ml a 0.05% de fosfato a, 2.4×10^{-9} esporas/ml con 0.1% de fosfato. Esta disminución no se considera significativa.

Por otro lado en la mutante *cyt a⁻*, la concentración de fosfato tuvo un efecto definitivo en el crecimiento alcanzado en el rendimiento y en el tiempo de esporulación. El crecimiento alcanzó su máximo valor (de 110 UK a 0.05% FO, hasta 150 UK a 1.0%) entre las 7:00 y 8:00 hs de incubación. El rendimiento y tiempo de esporulación en la cepa *cyt a⁻* fue dependiente de la concentración de fosfato. A las concentraciones de 0.05% a 0.075% no se detectó esporulación después de 48 hs de incubación. A 0.087% de fosfato, la esporulación se completó en 48 hs con un rendimiento de 1.49×10^9 esporas/ml y a 0.1% de fosfato se recuperaron 1.4×10^9 esporas/ml en 24 hs.

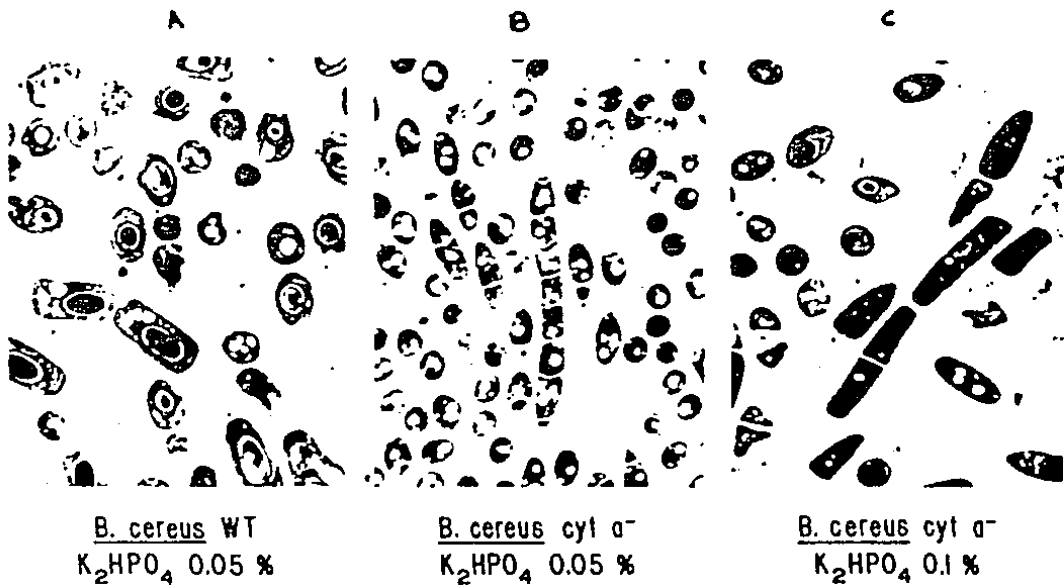


Fig. 4.- Micrografía de células esporulantes de Bacillus cereus de la cepa silvestre (WT) crecida en medio G (K₂HPO₄ 0.05% y *cyt a*⁻ crecida en medio G y medio G adicionado de fosfato. Las tres muestras, fueron fijadas, cuando la primera llegó al edo. V de esporulación.



Bacillus cereus *cyt a*⁻
Medio G-K₂HPO₄ 0.05 %

Fig. 5.- Apariencia al microscopio electrónico de la cepa mutante, obtenida cuando un control de la cepa silvestre llegó al Edo. V. de esporulación.

Los datos anteriores indican que bajo condiciones de pH controlado, la mutación *cyt a⁻* revela un fenotipo oligoesporógeno (bajo rendimiento en la esporulación) en *B. cereus* pero de ninguna manera un fenotipo asporógeno como el encontrado por Taber y col (41) en sus mutantes *cyt a⁻* de *B. subtilis*. En la mejor condición de amortiguamiento, *B. cereus* *cyt a⁻* esporula con un rendimiento del 37% comparado con la cepa silvestre. Este carácter oligoesporógeno nos indica que la carencia de *cit a₂* causa problemas en la economía metabólica de la esporulación y un porcentaje significativamente alto de la población (37%) es capaz de contender con la carencia de *cit a₂* y completar la esporulación. En nuestra opinión, el *cit a₂* no es indispensable para la esporulación y es posible conseguir mejores condiciones del medio de cultivo para permitir la esporulación masiva de la cepa *cyt a⁻*.

En las figuras 4 y 5 se ilustra la apariencia de las células de la cepa *cyt a⁻* crecida en condiciones no permisivas (Fosfato 0.05%) y permisivas (PO₄ 1.0%) para la esporulación. En la fotografía al microscopio electrónico, panel B, se aprecia que después de 96 hs de crecimiento *cyt a⁻* en 0.05% de fosfato no muestra signos de esporulación y las células se notan alteradas mostrando abundantes vacuolas como signo de degeneración. A mayor amplificación (fig 5) se puede ver con mayor claridad las vacuolas y formas abortivas de esporulación (extrema derecha) que fueron encontradas en número muy escaso.

Por otro lado, la cepa silvestre (fig 4A) cosechada después de 16 hs de incubación tiene una apariencia normal y muestra a la

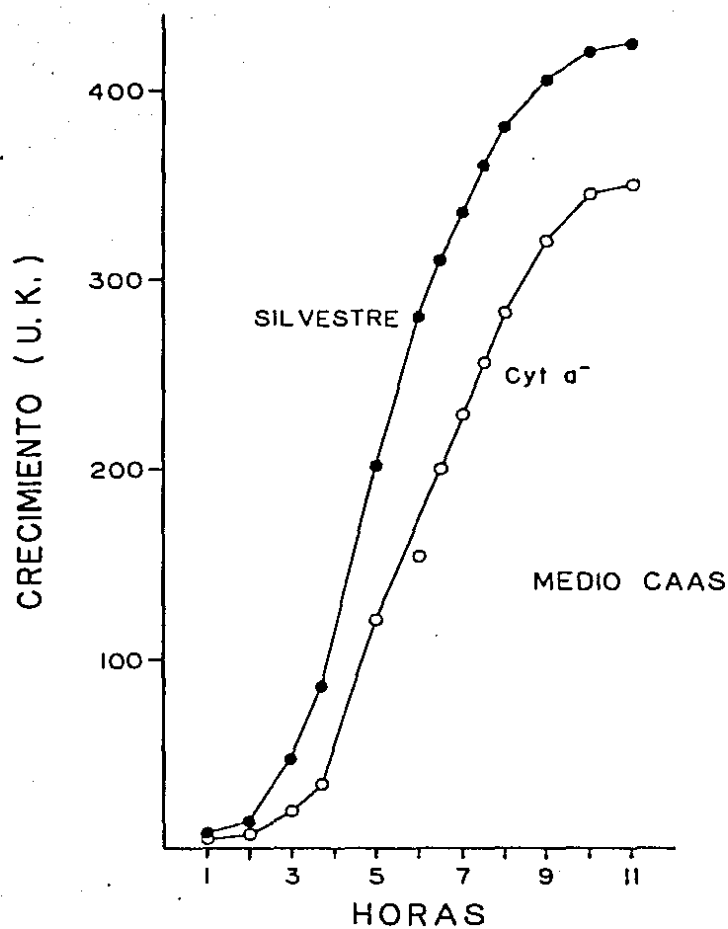


Fig. 6.- Curvas de crecimiento en medio de caseínas para las cepas silvestre (●●●) y a^{-} (○-○). Las condiciones de cultivo fueron iguales a las descritas para el medio G₁ en material y métodos.

mayor parte de la población en un estado avanzado de esporulación (Edo. V) con la corteza (zona blanca alrededor del protoplasto de la endospora) plenamente formada. Finalmente, el panel c de la fig 4 demuestra que en fosfato 2X, el mutante *cyt g⁻* mejora dramáticamente su capacidad de esporulación, las células lucen normales aunque definitivamente su apariencia es asincrónica; existen células con la corteza totalmente formada (edo. V). Es probable que las células más retrasadas no alcancen a completar la esporulación y esto cause que solo el 37% esporule (Tabla 1). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el medio G y cualquier otro medio donde la fuente de carbono principal sea un azúcar fermentable de rápida utilización no serían los más adecuados para el crecimiento y esporulación de *cyt g⁻* dado que los productos de glucólisis (láctico, acético y pirúvico) son excretados en mayor cantidad que en la cepa silvestre. en cambio, la mutante *Cyt g⁻* parece no la tener capacidad para utilizar estos productos a una velocidad que impida su acumulación excesiva en el medio de cultivo (al final del crecimiento, se inducen el SR y el ciclo de Krebs).

De acuerdo con lo anterior el mutante *cyt g⁻* en medios no fermentables no debe enfrentar los mismos problemas para su crecimiento y esporulación. Así, utilizando el medio de hidrolizado de caseína (CAAS, ver Materiales y Métodos), *cyt g⁻* crece y esporula en proporciones similares a la cepa silvestre (fig 6). En medio CAAS no hay acidificación y al final del crecimiento el medio tiene un pH de 7.5 comparado con el pH inicial de 7.1. *B. cereus* silvestre y *cyt g⁻* crecen más lento en medio CAAS que en azúcares fermentables pero en cambio alcanzan

TABLA 11.- Actividades respiratorias en membranas de Bacillus cereus*, cepa silvestre y cyt a- en los medios G y CAAS.

	MEDIO G			MEDIO CAAS		
	Silvestre (a)	cyt a- (b)	a/b	Silvestre	cyt a-	a/b
Deshidrogenasas++:						
Succinato PMS-DCPIP	84	48	1.8	220	113	1.9
NADH-DCPIP	55	67	0.8	150	82	1.8
Oxidases++:						
Succinato	15	5.0	3.0	40	4.5	9
NADH	40	30	1.3	90	21	4.3
Ascorbato-TMPD	35	11	3.1	75	15	5.0

* Los cultivos se cosecharon al final del crecimiento logaritmico.

** La actividad especifica de la Deshidrogenasas están expresadas como n mol de DCPIP red mg proteina⁻¹ min⁻¹. En el caso de las oxidases como n gramo atomo de O₂ mg proteina⁻¹ min⁻¹.

densidades ópticas que son de más del doble de las observadas en medio G. Es interesante mencionar que el rendimiento en la esporulación de *cyt a⁻* no guardó proporción con el crecimiento máximo alcanzado, sino que el número de esporas formadas (7.4×10^{-9} ml⁻¹) fue cinco veces mayor que en medio G - PD₂ 2X (1.4×10^{-9}). Esto nos sugiere que la composición del medio CAAS, rica y completa en aminoácidos, potencia la posibilidad de que un mayor número de células *cyt a⁻* completen la esporulación.

Capacidad Respiratoria de la cepa *cyt a⁻* Las propiedades de crecimiento y esporulación del mutante *cyt a⁻* en medio CAAS sugerían que la composición y función de su sistema respiratorio en ausencia de cit *aga* era suficiente para satisfacer sus necesidades energéticas y su equilibrio redox durante crecimiento y esporulación. Con el objeto de tener una imagen cuantitativa de la capacidad respiratoria de *cyt a⁻*, se procedió a analizar las actividades específicas de sus oxidasas y oxidoreductasas tanto en medio G como en CAAS presentes al final del crecimiento, comparado con la cepa silvestre (Tabla 11). Es claro que en los dos medios de cultivo, la cepa silvestre expresa mayor actividad específica para todas las enzimas (excepto NADH-DCPIP en medio G). Las diferencias cuantitativas menores se encontraron en el medio G, medio que causa represión catabólica en la cepa silvestre (15) y mantiene un nivel bajo de expresión del SR en B. cereus NT (11). Así, en este medio, el nivel de actividades respiratorias en *cyt a⁻* no lo encontramos muy alejado de la cepa silvestre, en contra de lo esperado. La diferencia máxima encontrada fue de 3 veces para succinato oxidasa y en todo caso

la actividad es baja en ambas cepas (cyt a^- = 5.0; silvestre = 15).

En medio CAAS que no contiene fuente de carbono fermentable, no se presenta represión catabólica y la expresión del SR lleva a niveles de actividad considerablemente más altos. En estas condiciones las diferencias entre silvestre y cyt a^- son de casi el doble para NADH y succinato-oxidoreductasas y entre 4.3 (NADH) y 9.0 veces para las (succinato) oxidasas. Los niveles de actividad de TMPD-oxidasa merecen un comentario aparte, ya que esta actividad se basa la reacción NADI. La cepa silvestre en medio G expresó 3 veces (35 n at O_2 mg⁻¹ min⁻¹) más esta actividad que la cepa cyt a^- . En medio CAAS, la diferencia fue de 5 veces a favor de la cepa silvestre (75 n at O_2 mg⁻¹ min⁻¹). Como se recordará el mutante cyt a^- fue seleccionado en medio G (sacarosa con 0.005%) y la diferencia de actividad que observamos en la Tabla II quizás no sería suficiente para distinguir claramente el fenotipo NADI-. Tenemos que recordar que las colonias se dejaron envejecer 48 hs antes de hacer la reacción NADI, periodo en el que la TMPD-oxidasa de la cepa silvestre estaría inducida por la esporulación y la diferencia de actividad con la cepa cyt a^- debe ser mayor, suficiente para distinguir los fenotipos cyt a^- y silvestre.

Por los resultados obtenidos en esta tabla y sabiendo que cyt a^- carece de cit a_{aa} es claro que el TMPD puede seguir siendo oxidado con mucho menor eficiencia por las citocromo oxidasas alternas (cit p y cit q). En ausencia del cit a_{aa} la eficiencia para oxidar asc-TMPD baja cuando menos cinco veces (columna CAAS en Tabla II).

Tabla III. Cocientes de Expresión*, para las actividades y concentración de citocromos de las cepas silvestre y cyt a- de Bacillus cereus, crecidas de hidrolizado de caseína vs medio G

	COCIENTE DE EXPRESION	
	MEDIO CAAS SILVESTRE	MEDIO G Cyt a-
Oxidorreductasas:		
Succinato PMS:DCPIP	2.6	2.3
NADH : DCPIP	2.7	1.2
Oxidasas:		
Succinato	2.6	0.9
NADH	2.2	0.7
Asc-TMPD	2.1	1.3
Citocromos++:		
C ₅₅₀	3.0	5.0
b ₅₅₅	2.4	3.0
a ₆₀₀	3.0	no hay
O-CO	3.5	2.4

*Para calcular los cocientes de expresión se dividieron los valores de actividad específica (oxidorreductasas y oxidasas) obtenidos en medio CAAS entre los valores obtenidos en el cultivo en medio G (ver Tabla II)

**Los cocientes de expresión para citocromos se calculó de la misma manera pero a partir de los valores de la Tabla IV.

En el caso de las actividades dependientes de succinato en medio CAAS, es interesante que los niveles de succinato-oxidoreductasa son apenas 1.9 veces mayores en la cepa silvestre que en la cepa *cyt a⁻* (220 vs 113) y sin embargo la actividad de succinato oxidasa es 9.0 veces mayor en silvestre (40 vs 4.5). Así, más que un incremento en la actividad de la oxidoreductasa tenemos un incremento en su capacidad de acoplamiento a la cadena respiratoria. Esta situación no parece acontecer en la mutante *cyt a⁻*. Es interesante comentar que en el caso de *Rhizobium phaseoli*, una mutante inducida por TNS y que tiene fenotipo NADH-, presenta niveles bajos de succinato oxidasa (Mario Soberón, comunicación personal). En ninguno de los 2 casos contamos con una explicación.

La cepa silvestre de *Bacillus cereus*, tiene una mejor expresión de sus actividades respiratorias y citocromos en medio de CAAS que en medio G. La Tabla III muestra los cocientes de inducción (actividad específica en medio CAAS dividida entre la actividad en medio G) para las 2 cepas silvestre y *cyt a⁻*, crecidas hasta la etapa estacionaria. Es evidente que para todas las actividades el cociente de inducción es mayor en la cepa silvestre que en la cepa *cyt a⁻* pero, en el mejor de los casos (NADH y succinato oxidasas) la diferencia es un poco mayor que el doble (2.2 para la silvestre vs 0.7 en *cyt a⁻* y 2.6 en silvestre vs 0.9 en *cyt a⁻* respectivamente). Por el contrario, en los cocientes para inducción de citocromos que se muestran en Tabla III (calculados a partir de los datos de la Tabla IV) muestran que la capacidad de inducción para cit g y cit b es mayor en la

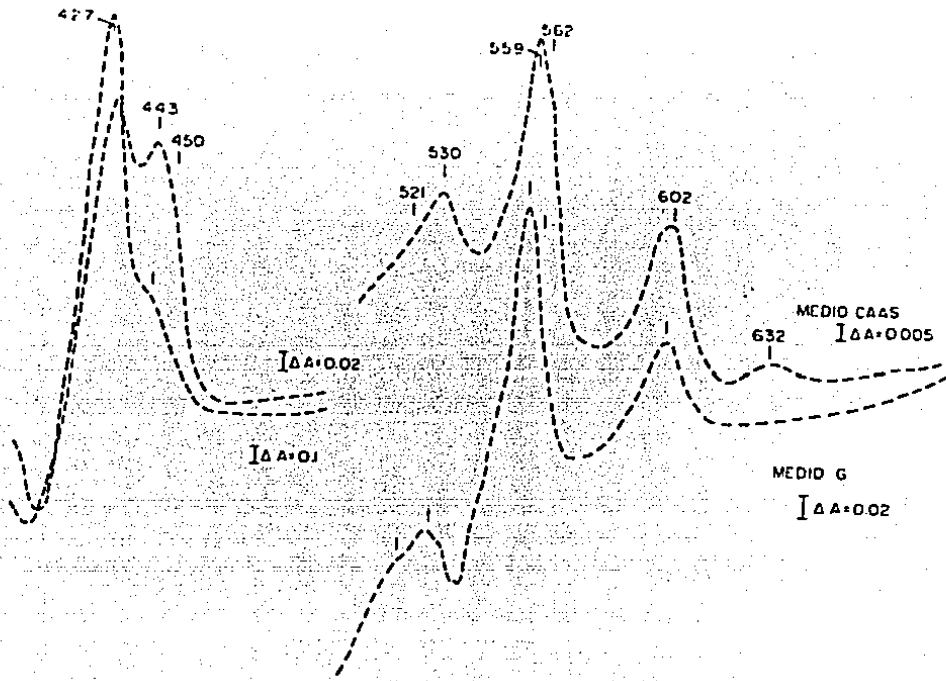
TABLA IV.- CONCENTRACION DE CITOCROMOS ASOCIADOS A PREPARACIONES MEMBRANALES DE *Bacillus cereus* CEPAS SILVESTRE Y *cyt a-*, OBTENIDAS AL FINAL DEL CRECIMIENTO LOGARITMICO EN MEDIO G Y MEDIO DE CASAMINOACIDOS.

Citocromo	Medio G			MEDIO CAAS		
	Silv.	<i>cyt a-</i>	<i>a-/Silv.</i>	Silv.	<i>cyt a-</i>	<i>a-/Silv.</i>
caa	0.05	0.05	1.0	0.15	0.24	1.6
baa	0.12	0.16	1.3	0.29	0.48	1.6
c-CD	0.04	0.13	3.2	0.15	0.32	2.07
aaa	0.07	no hay	0.0	0.21	no hay	0.0

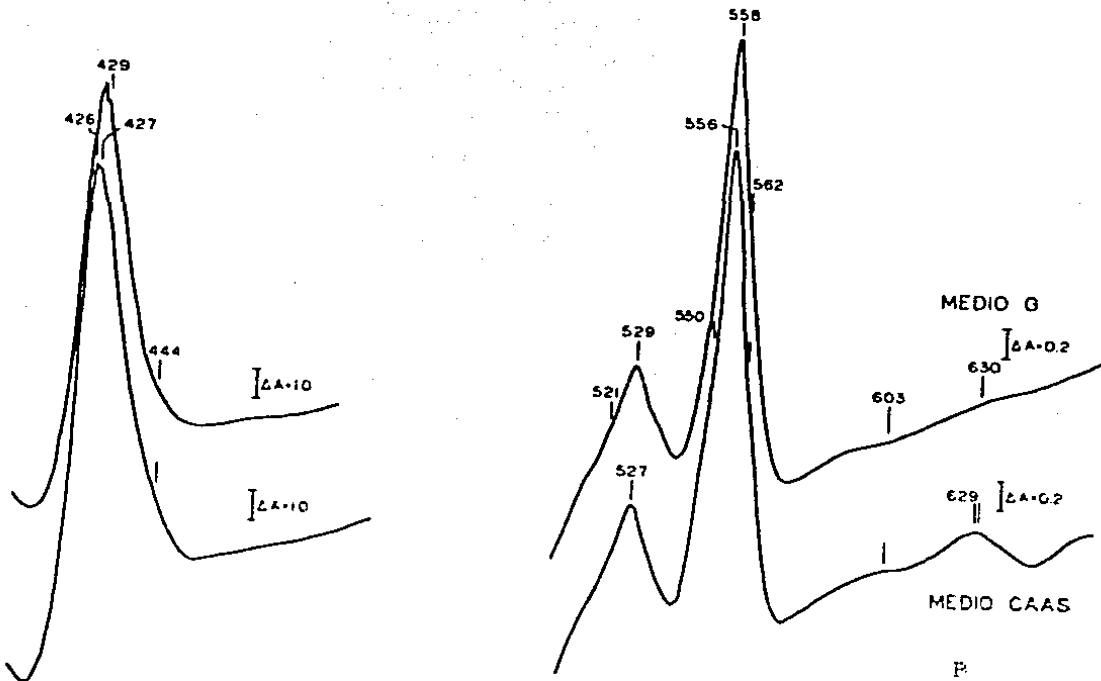
Concentración de citocromos expresada como nmol x mg de proteína membranar.

Fig. 7.- Espectros diferenciales reducido con ditionita, oxidado con persulfato, de las membranas de células en la fase estacionaria tardía (10 mg. de proteína / ml de glicerol al 50% en TCM). En A los trazos corresponden a la cepa silvestre (trazo discontinuo) crecida en medio G y medio de casaminoácidos. En B, los mismos trazos corresponden a la cepa mutante (trazo continuo).

Los espectros se hicieron a la temperatura del nitrógeno líquido.



A



B

cepa *cyt a⁻* que en la cepa silvestre. Esto quizás sea una acción compensatoria para activar el flujo de electrones en la vía del *cit g*, la oxidasa alternativa que reemplaza al *cit a₃* en la cepa *cyt a⁻*.

Expresión de citocromos en *B. cereus* cepas silvestre y *cyt a⁻*.

Antes de proceder a mostrar los espectros de las membranas de la mutante *cyt a⁻*, reducidos por diversos sustratos y compararlos con los espectros de la cepa silvestre, considero adecuado mostrar primero el análisis cuantitativo de citocromos expresados durante el crecimiento aerobio en medio G y en medio de casaminoácidos. La tabla IV muestra que la mutación *cyt a⁻* no afecta la expresión de los citocromos *c₅₅₀*, *b₅₅₇* y *g*.

En medio G la cepa silvestre y la mutante *cyt a⁻* expresaron los mismos niveles de *cit c₅₅₀*, (0.05 nmol/mg proteína⁻¹) y en el caso de los citocromos *b₅₅₇* y *g-c_g*, la cepa *cyt a⁻* expresó 1.3 y 3.2 veces más respectivamente cuando se le compara con la cepa silvestre. Como se puede constatar en las figs. 8 a 10 la mutante *cyt a⁻* no muestra la presencia de *cit a₃*.

En el caso de las células crecidas en medio de casaminoácidos (Tabla IV), las membranas de la mutante *cyt a⁻* muestran una expresión cuantitativamente superior a la cepa silvestre, esto ocurrió para todos los citocromos, siendo de 1.6 veces mayor para *cit c₅₅₀* *b₅₅₇* y de 2.0 veces para el *cit g-c_g*. Tampoco en este medio se detectó la presencia de *cit a₃* en la mutante *cyt a⁻*.

Los resultados anteriores indican que la mutación *cyt a⁻* afecta de manera negativa y específica la expresión del *cit a₃* y que como consecuencia de esta mutación y probablemente debido a

la disminución en la capacidad de transporte de electrones y/o a una baja en la eficiencia para conservar energía, el mutante *cyt a₂* compensa expresando mayor cantidad de los otros citocromos particularmente, de la otra oxidasa terminal alternativa, el *cit c*.

En la figura 7 se comparan los espectros obtenidos a 77° K (ditionita menos persulfato) de las cepas silvestre (trazo discontinuo) y *cyt a₂* (trazo continuo) crecidas en medio B y medio de hidrolizado de caseína. En la zona alfa de absorbancia para los citocromos de tipo *b* (555 a 562 nm) se resuelven 3 máximos (556, 558 y 562 nm) correspondientes a otros tantos citocromos de tipo *b*. En la zona beta (530 nm) y gama (490 nm) los citocromos *b* no presentan diferencias discernibles en sus máximas de absorción. Es importante comentar que la cuantificación para citocromo *b* mostrada en la tabla IV no distingue ni considera la contribución de cada tipo de citocromo *b* en la región α de absorción. La máxima de absorbancia para los 3 tipos de citocromo *b* (556, 558, 562 nm) se superponen y confunden los picos haciendo imposible su resolución cuantitativa. En términos generales solo podemos decir que cualitativamente los 3 citocromos *b* están presentes en *cyt a₂* y que la concentración sumada de los 3 es superior que en la cepa silvestre. Debido a esta total reducción de los citocromos *b*, no se aprecian en esta figura los picos y hombros correspondientes a *cit c* (418, 521 y 550), los que si podemos apreciar claramente en la figura 8 en los que se usaron otros sustratos como donadores de electrones.

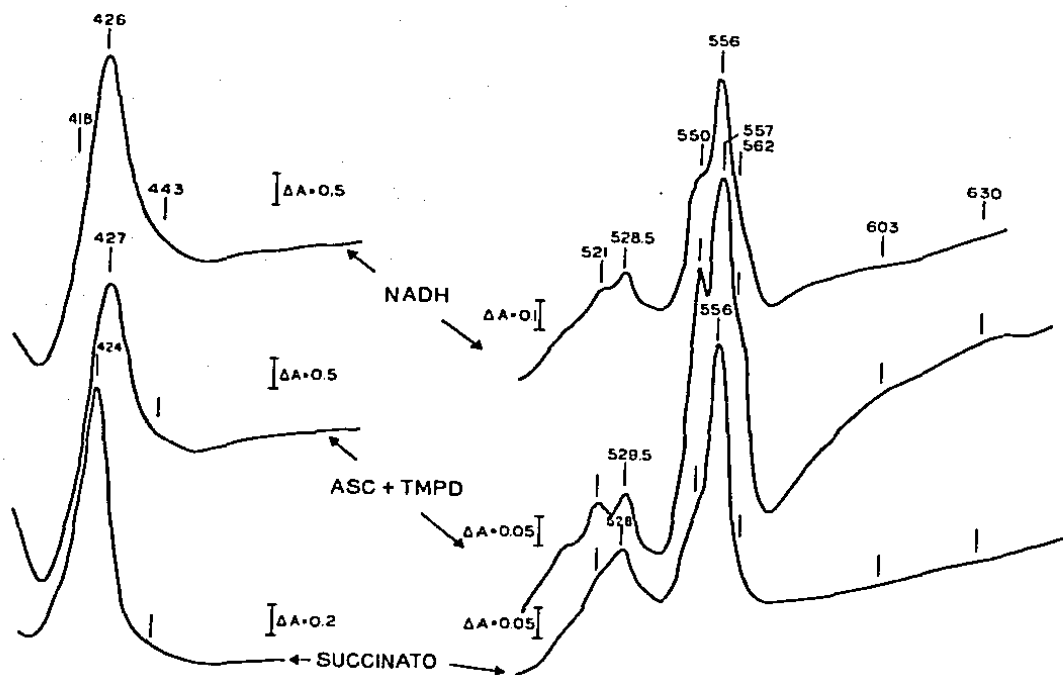


Fig. 8.- Espectros diferenciales reducido-oxidado a 77K, de membranas de células en la fase tardía de crecimiento, crecidas en medio CAAS. En presencia de los siguientes sustratos: NADH, Succ. y Asc.-TMPD. Las membranas de la celda de referencia se oxidaron agregando unos cristales de persulfato a las membranas. En todos los casos, la cantidad de proteína de membrana usada, fue de 11.5 mg de glicerol al 50 % en 10N.

En cuanto al citocromo c_{550} (444 y 603 nm) es evidente que la cepa silvestre lo expresa en cantidades apreciables, tanto en medio fermentable como en el medio de casaminoácidos. La cepa cyt_{g-} no muestra siquiera trazas de expresión para este citocromo. Hay que llamar la atención de la presencia de un pico de absorción a 692 nm que se manifiesta en ambas cepas solo en el caso de crecimiento en medio de casaminoácidos, el mismo pico no se detecta en células crecidas en medio β . Este pico es característico de la citocromo oxidasa d . Este citocromo fue por primera vez descrito para B. cereus en nuestro laboratorio (11) y de acuerdo con el esquema de regulación establecido, su expresión ocurre a bajas tensiones de O_2 , anaerobiosis o durante el crecimiento aeróbico en fuentes de carbono de utilización lenta como sería el caso del medio CAAS. Es interesante que la mutante cyt_{g-} no ha perdido ni la capacidad de expresión ni la de regulación por fuente de carbono para esta citocromo oxidasa.

Debido a que la mejor expresión del SR ocurre en medio de cultivo no fermentable, decidimos analizar los patrones de reducción evocados por NADH, succinato y ascorbato + TMPD en membranas de células cyt_{g-} crecidas en medio de casaminoácidos (Fig. 8).

En los espectros a 77 K podemos resolver de forma clara, los picos correspondientes a citocromo c_{550} , destacando el caso de asc + TMPD donde se alcanza el máximo nivel de reducción. La reducción con NADH o asc + TMPD demuestra que la mutante cyt_{g-} , a pesar de la ausencia de $cit_{c_{550}}$, sigue expresando cantidades normales de $cit_{c_{550}}$, este resultado es un tanto sorprendente ya que como mencionamos con anterioridad, se ha sugerido que en

eucariotes el cit aaa, a través de su subunidad II, sirve como punto de anclaje para el cit g.

Por otro lado, hay que recordar que el citocromo g de nuestro bacilo y otras especies bacterianas (3) se encuentra firmemente asociado a la membrana y no se pierde durante la preparación y lavado de partículas membranales como ocurre en el caso del cit g de eucariotes (31).

En cuanto a los citocromos b, observamos que tanto el NADH y el succinato dan una máxima de reducción a 529 y 557 nm; en el caso de asc. + TMPD las máximas se encuentran a 530 y 550 nm. Con los 3 sustratos se forma un hombro a 562 nm más conspicuo en el caso del TMPD que aparentemente corresponde al complejo del cit g (9,17).

En la zona Soret, el succinato reduce un pico a 424 nm que por su posición corresponde a un citocromo b. Con ninguno de los 3 sustratos encontramos sugerencia de que el cit aaa este presente, resultado que está de acuerdo con los espectros de ditionita mostrados en la figura 7.

En cuanto al citocromo g, solo en el caso de ascorbato + TMPD encontramos evidencia de su reducción a 630 nm.

Efecto del Cianuro sobre la respiración en las cepas silvestre y xyl α^- . Las citocromo oxidasas bacterianas pueden ser distinguidas por su sensibilidad a inhibidores de sitio III como el nitruro, sulfuro y cianuro, o también, por su afinidad relativa al O_2 . En trabajos previos de nuestro laboratorio (9.11) se demostró que la cit aaa se caracteriza por su alta sensibilidad al KCN ($K_{iapp} = 2.5 \mu M$) mientras que las oxidasas cit g y

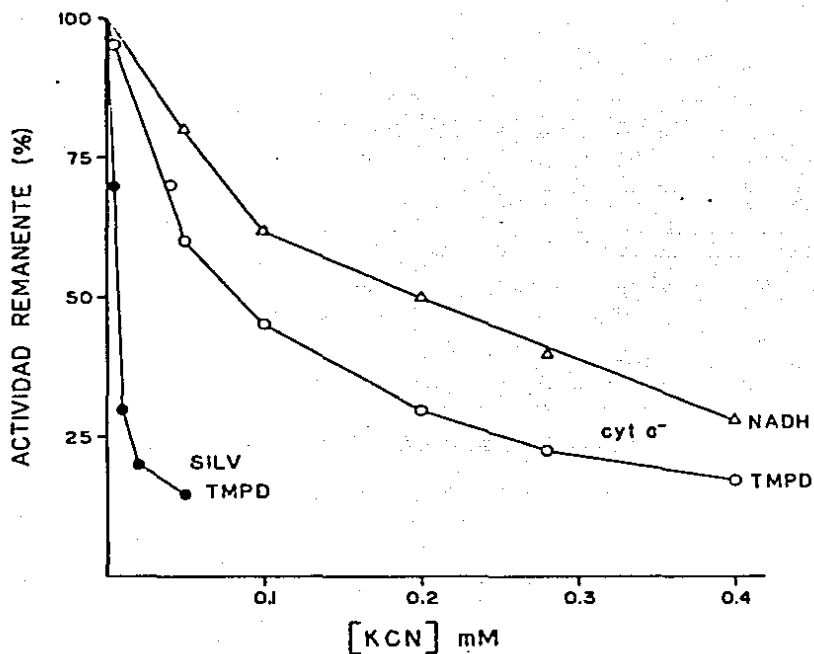


Fig. 9.- Cinética de inhibición por cianuro de NADH (Δ — Δ) y TMPD (o—o) oxidases en la cepa *cyt c*⁻. Las membranas utilizadas fueron cosechadas en la fase estacionaria tardía. Se incluye el trazo obtenido para la inhibición de TMPD oxidasa de membranas de la cepa silvestre (•—•).

especialmente la d requieren concentraciones de KCN considerablemente mayores para ser inhibidas. Así, la ausencia del $cit\ a_{aa}$ en la cepa $cyt\ a^-$ presupone que la sensibilidad al KCN para la respiración debe ser menor que en la cepa silvestre.

La figura 9, muestra que la respiración estimulada por ascorbato-TMPD, mezcla de sustratos que estimula cuasiespecíficamente la catálisis de $cit\ a_{aa}$, es considerablemente más resistente en las membranas de la mutante $cyt\ a^-$ que en las de la cepa silvestre. A concentración de KCN de 20 μM sobrevive sólo el 20% de la TMPD oxidasa en la cepa silvestre mientras que a esta misma concentración, todavía detectamos el 80% de la TMPD-oxidasa de la cepa $cyt\ a^-$. Cuando NADH es el sustrato, en el caso de la cepa silvestre la respiración muestra un comportamiento bifásico indicando la participación de más de una vía en el transporte de electrones. Debido a que la actividad sumada de las oxidasas terminales de El. cereus no son el factor limitante para la velocidad de respiración a partir de NADH (9) entonces el KCN estaría actuando como un interruptor que a baja concentración inhibe el flujo de electrones a través de la vía $cit\ a_{aa}$ y desvia el flujo hacia la vía menos sensible ($cit\ c$ y/o $cit\ d$). De acuerdo a datos obtenidos por Escamilla y Benito (9), el KCN a baja concentración no parece tener mayor efecto sobre la velocidad de respiración promovida por NADH en la cepa silvestre.

En el caso de la cepa $cyt\ a^-$ sólo existen las vías con mayor resistencia y por tanto no se observa el componente cinético de alta sensibilidad. La concentración de cianuro causa una inhibición progresiva y lineal de la respiración promovida por

NADH.

En ninguno de los casos anteriores, se llega a tener la inhibición total debido a que la oxidasa *g* es extremadamente resistente al KCN y requiere de concentraciones que causan efectos no específicos sobre otros componentes de la cadena (9).

Papel del citocromo *c*₂₂₀ en mutantes *cyt a*⁻. La presencia de *cit g* está asociada a la citocromo oxidasa *aaa* en la inmensa mayoría de los casos. En bacterias la presencia de *cit g* ocurre en aquellas especies que también expresan *cit aaa* (35). Así, *cit g* y *aaa* forman un binomio estructural- funcional.

La concentración de *cit c*₂₂₀ en nuestro mutante *cyt a*⁻ resultó ser tan alta como en la cepa silvestre (ver tabla IV). En un reporte previo de nuestro laboratorio (11) se había demostrado que la expresión de *cit c*₂₂₀ y *cit aaa* seguían un patrón de regulación paralela y que se encontraban en concentraciones muy cercanas. Así, a bajas tensiones de O₂ o en anaerobiosis su concentración desciende en forma paralela hasta niveles no cuantificables. Su máxima expresión ocurre durante el crecimiento aerobio en fuentes de carbono no fermentables y durante la esporulación, independientemente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento vegetativo.

Todo lo anterior sugiere que el *cit c*₂₂₀ y el *cit aaa* se encontraban asociados de manera exclusiva, estructural y funcionalmente formando un complejo a nivel de membrana y posiblemente, formando parte de un mismo operón a nivel genético (regulación paralela). Sin embargo, la presencia de cantidades elevadas de *cit c*₂₂₀ en nuestro mutante *cyt a*⁻ y por otro el

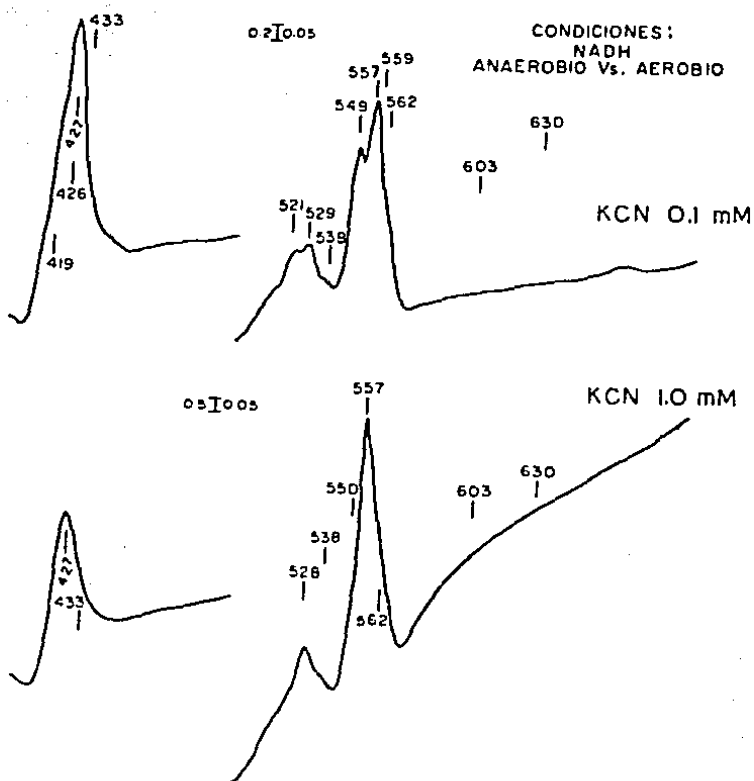
reporte de De Vrij et al (5) demostrando que el cit c₅₅₀ podía actuar como donador de electrones en preparaciones parcialmente purificadas de cit c₅ de *Bacillus subtilis*. nos impulsaron a tratar de averiguar si existía alguna relación funcional entre el cit c₅₅₀ y el cit c₅ en el mutante cyt a⁻.

La estrategia diseñada consistió en seguir cualitativamente (espectroscopia diferencial) la oxidación del cit c₅₅₀ y del cit c₅ en presencia de 2 concentraciones de cianuro. La citocromo oxidasa c₅ de *Bacillus cereus* no es inhibida a concentraciones de cianuro menores que 100 µM y se inhibe a concentraciones cercanas a 1.0 mM (9,11). De esta manera, si la oxidación de citocromo c₅ se inhibía en forma simultánea a la oxidación del cit c₅ podíamos sugerir que el cit c₅ se encuentra funcionalmente asociado a la citocromo oxidasa c₅.

Para visualizar la oxidación se hizo espectroscopia diferencial a 77 K comparando el espectro reducido con NADH en condiciones de an aerobiosis, teniendo todos los citocromos en su máximo nivel de reducción (celda experimental) y comparando contra la misma preparación en condiciones aerobias (preparación oxigenada justo antes de la congelación, celda de referencia). En adición, la celda de referencia, en un experimento contiene KCN 100 µM y en otro experimento la concentración de KCN fue de 1.0 mM. El cianuro debe bloquear la oxidación del cit c₅, si la concentración de KCN es suficiente para inhibirlo.

En la figura 10 vemos los resultados obtenidos en el experimento anterior: Cuando se utiliza KCN a concentración 100µM en la celda testigo, la oxidación de cit c₅ y cit c₅ ocurre simultáneamente. Observamos picos preponderantes a 521 y 549 nm

Fig. 10.- Espectros diferenciales anaeróbico-aerobio a 77K de membranas de cit a_1 . Las membranas se incubaron en presencia de NADH en reposo y a temperatura ambiente durante 20 min. (experimental anaerobia), justo antes de congelar, un duplicado se agito para tenerlo como referencia, a este se le adiciono con KCN 0.1 mM y en otros casos 1.0 mM.



1

correspondientes a cit c_{550} y a 555 nm correspondiente al complejo de cit $b_{555} - g$.

Por otro lado, a la concentración de KCN de 1.0 mM solo aparece un pico a 557 nm (cit b_{557}) y han desaparecido las máximas correspondientes a cit c_{550} y del cit g (562 nm).

El resultado anterior sugiere que la oxidación del cit c_{550} estaría funcionalmente asociada a la oxidación de la citocromo oxidasa g en el mutante de cyt a^- de *Bacillus cereus* y así nuestros resultados darían apoyo experimental adicional al planteamiento de De Vrig y col. (6), quienes sugirieron que el citocromo g podría ser el donador directo de electrones del cit g en *B. subtilis*.

Por otro lado, hay que considerar que la oxidación del cit b_{557} ocurre aun en presencia de KCN 1.0 mM. No es claro si este citocromo se este oxidando directamente ó si su oxidación este vinculada a la citocromo oxidasa g cuya presencia en nuestro mutante cyt a^- fue demostrada espectroscópicamente (fig 7) usando ditionita como reductor. Debido a su pequeño coeficiente de extinción molar (cyt g 630-650 = 8.0) y a que en el experimento planteado se visualizan niveles parciales de oxido-reducción, sería muy difícil poderlo observar en estas condiciones. El citocromo b_{557} no es reducido por TMPD (no se muestra) lo que sugiere que se trata de un citocromo b de bajo potencial redox y por tanto su oxidación directa con oxígeno sería difícil.

Discusión

Trabajos previos en el laboratorio, han demostrado la presencia de tres citocromo oxidasas en Bacillus cereus, aunque variando las condiciones de crecimiento es posible modular la expresión de estas, ocurren también cambios importantes en los niveles de actividad respiratoria por ejemplo, durante el crecimiento anaeróbico sin nitrato, cit. g y cit.d se expresan, desapareciendo el cit.aaa; este mismo crecimiento, (anaeróbico) pero en presencia de nitrato suprime la expresión del citocromo g y el aaa, conservando la expresión del cit. g. En cualquiera de estas dos condiciones ocurre que la capacidad respiratoria endógena y estimulada por sustratos (succinato y NADH) se deprime grandemente, debido a la baja expresión de las deshidrogenasas. En esta condición el bacilo crece muy lento y es incapaz de esporular. Resulta difícil decidir si, el crecimiento lento y la incapacidad para esporular, son consecuencia de la no expresión del cit. aaa y/o de la caída en la capacidad respiratoria.

De este modo, es necesario buscar condiciones en que se pueda eliminar la expresión de una o dos oxidasas sin afectar la capacidad respiratoria celular, de preferencia en condiciones aeróbicas de crecimiento. La estrategia que consideramos mas viable para alcanzar estos requisitos, es el aislamiento de mutantes respiratorias con defectos específicos en la expresión de alguna de las citocromo oxidasas.

En la presente tesis se aprovecharon experiencias previas en el aislamiento de mutantes específicas de la actividad de TMPD-oxidasa en diversas especies bacterianas (22,32,45,46). En

algunos casos la actividad de TMPD-oxidasa ha sido asociada a la función del citocromo c (32) y en otros, a la función del citocromo d (24). En las especies Gram positivas que poseen citocromos c y aaa la actividad de TMPD oxidasa ha sido asociada a esta vía (6).

Ya mencionamos que Bacillus cereus que posee 3 citocromos oxidasas: aaa, c y d el grueso de la actividad catalítica de oxidación del TMPD está asociado a la oxidasa aaa, esto a pesar de que este agente redox, tiene capacidad de reducir a las 3 oxidasas (11).

La afirmación anterior es apoyada por el hecho de que la mutante cyt a-, carece de todo rastro espectroscópico de cit aaa, posee actividad de TMPD oxidasa muy baja (Tabla II) a pesar de que dicha mutante expresa cantidades incrementadas de los citocromos c (tabla III) y d. La actividad de TMPD oxidasa en la cepa cyt a- fue 5 veces menor que en la cepa silvestre, por tanto se puede presumir que los citocromos c y d podrían contribuir con un máximo del 20% en la actividad de TMPD-oxidasa en la cepa silvestre. Esta diferencia en la eficiencia catalítica, permitió detectar mutantes que carecieran de la cit aaa por su simple fenotipo TMPD-oxidasa -.

Originalmente se había previsto la posibilidad de aislar mutantes TMPD- carentes de cit aaa ó carentes de cit c ó también, carentes de ambos. En verdad, tanto el citocromo c como el aaa están catalíticamente involucrados en la oxidación del TMPD (3,23). El hecho de que no hayamos podido aislar estas mutantes en B. cereus podría deberse a una de 2 razones: a) No se

ensayaron un número suficientemente grande de colonias ó. b) La carencia del citocromo c no sería compatible con el crecimiento aerobio debido a que dicho citocromo además de la vía de aa_3 fuera necesario para otra cadena alternativa (ver adelante).

A este respecto hay que recordar que Escamilla y col. (11) demostraron que la expresión del cit c se regula de manera paralela al cit aa_3 por la tensión de O_2 , sugiriendo un mecanismo común de regulación y una relación íntima en su función.

La mutación $cyt\ a^-$ afectó las propiedades de crecimiento y esporulación de Bacillus cereus en medio con fuente de carbono fermentable (figs 2 y 3). En medio de glucosa (medio G) la cepa $cyt\ a^-$ acidifica importantemente al medio (pH < 5.5, Fig.2) y esto, detiene el crecimiento e imposibilita la esporulación. Doblando la capacidad amortiguadora del medio (K_2HPO_4 , figs 2 y 3) se mejoraron notablemente las propiedades de crecimiento y el rendimiento en la esporulación (tabla I). Así mismo, la cepa $cyt\ a^-$ se desarrolló adecuadamente en medios con fuente de carbono no fermentable como el medio CAAS (fig. 6) ó en el caldo nutritivo (peptona de caseína y extracto de levadura, resultados que no se muestran).

Los resultados anteriores sugieren que la carencia de cit aa_3 disminuye la capacidad de transporte de electrones del S.R. y con ello, en medio fermentable, es incapaz de mantener un equilibrio adecuado entre la velocidad de producción de ácidos orgánicos (glucólisis aeróbica) y su oxidación por ciclo de Krebs y sistema respiratorio y esto, lleva a una acidificación excesiva del medio.

Bacillus cereus como especie facultativa muestra una gran plasticidad adaptativa en su crecimiento a cualquier tensión de oxígeno y en ausencia de éste puede utilizar otros aceptores finales de electrones como nitrato y fumarato (11). Contrastando con esta gran plasticidad del estado vegetativo, la esporulación no parece ocurrir en otra condición que no sea la aeróbica a altas tensiones de oxígeno (condición que comparte con otras bacterias esporulantes pero no con anaeróbicas obligatorias). Algunos autores (17), han considerado que: "mientras el crecimiento vegetativo ocurre en condiciones de bonanza energética, la esporulación sucede en condiciones de limitación extrema, cuando los nutrientes del medio se han agotado y por tanto su equilibrio es endeble".

El rendimiento en el crecimiento y la esporulación de *cyt g-* fue menor que en la cepa silvestre. Aún en condiciones de pH controlado en medio G (fig. 3 y Tabla I) ó en medio no fermentable (fig. 6). Lo anterior sugiere que el parámetro YATP (ATP sintetizado por mol de sustrato consumido) es, bajo condiciones óptimas, algo menor en *cyt g-* que en la cepa silvestre. A este respecto se ha sugerido (35,42) que el rendimiento energético (ATP) derivado de la utilización de una u otra citocromo oxidasa es diferente. Se ha probado que el *cyt gaa* bacteriano es capaz de translocar protones (35). Para *cyt g* sólo en el caso de *E. coli* se ha probado actividad translocadora de protones (3) sugiriéndose la existencia de diferentes citocromos *g* en bacterias (9,17,35). En el caso del *cyt g* el consenso sugiere que no transloca protones y simplemente actúa como vertedero de poder reductor (35).

Suponiendo que el cit *c* de Bacillus cereus no tenga actividad translocadora de protones, entonces el rendimiento (Y ATP) sería de 1/3 a 1/4 menor (1/4, si existe NADH/NADP transhidrogenasa, (19) que en la cepa silvestre. Esta situación sería responsable del menor crecimiento de la cepa cyt *a*- y dificultaría, pero no impediría la esporulación.

La cinética de inhibición por cianuro ha sido utilizada como criterio diferencial de las oxidasas terminales bacterianas. En el caso de B. cereus, Escamilla y colaboradores (9,11) han sido capaces de distinguir cuando menos dos componentes cinéticos; la citocromo oxidasa *aa₃* (medida como TMPD-oxidasa) que se inhibe a bajas concentraciones de KCN ($K_{iapp} = 2.5 \mu\text{M}$), mientras que para inhibir la actividad de la oxidasa cit *c* se requieren concentraciones superiores a 100 μM . En el caso del mutante cyt *a*- la actividad de TMPD-oxidasa no mostró el componente cinético de alta sensibilidad (Fig. 9) y este resultado estuvo de acuerdo con su fenotipo cyt *a*-. La actividad de NADH oxidasa en la cepa cyt *a*- requirió concentraciones de cianuro altas para solo mostrar una inhibición parcial (fig. 9). Este resultado es semejante a los reportados anteriormente para cepas silvestres de B. cereus crecidas en condiciones aeróbicas (11,26,31). La aparente insensibilidad de NADH oxidasa a KCN, en cyt *a*- contrasta con la alta sensibilidad de la TMPD oxidasa de la cepa silvestre (fig. 9), la cual como ya se comentó, depende cuantitativamente, de la actividad catalítica de la vía cit *c*, *aa₃*. La aparente insensibilidad de la NADH-oxidasa podría explicarse si se considera que la suma de actividades de las

oxidasas terminales no son el factor limitante para la velocidad de respiración con NADH. Así, siendo la Deshidrogenasa de NADH el factor limitante para la velocidad de respiración (Escamilla, 1984), entonces el KCN a bajas concentraciones estaría actuando como un interruptor que detiene el flujo de electrones por la vía sensible (cits c, aaa) y consecuentemente, lo incrementa por la o las vías más resistentes al KCN (cits g y d).

Habitualmente se considera que el citocromo c se encuentra funcional y estructuralmente asociado solo a la citocromo oxidasa aaa. En efecto, este es el caso del sistema respiratorio mitocondrial donde la citocromo oxidasa aaa es la única oxidasa terminal. En bacterias la situación es más compleja, recientemente, Anreku (3) ha publicado una revisión en donde clasifica a las oxidasas terminales en 2 clases con 2 subgrupos:

- Clase IA: Citocromo c oxidasas conteniendo hemos aaa ó caaa.
- Clase IB: Citocromo c oxidasas conteniendo hemo g.
- Clase II A: Quinol oxidasas conteniendo hemo b y hemo g.
- Clase II B: Quinol oxidasas conteniendo hemo b y hemo d.

De acuerdo con la clasificación anterior, las oxidasas de la clase IB, contienen hemo de tipo g y sin embargo utilizan citocromo c como donador directo de electrones. Es interesante hacer notar que todos los casos descritos pertenecen a especies bacterianas que también poseen citocromo oxidasa aaa. Así tenemos: *Methylobacillus methylotrophus*, *Acetobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter palustris* y *Pseudomonas aeruginosa*. De esta manera, la presencia de citocromo c en nuestra mutante *cyt g-*, en la cual no existen trazas de *cit aaa* y a cambio, existen cantidades incrementadas de

cit c, sugería que este citocromo pudiera estar actuando como donador de electrones para el citocromo g. Esta posibilidad fue analizada mediante los espectros de oxidación en presencia de cianuro (Fig. 10).

Los resultados obtenidos sugieren que la oxidasa c de Bacillus cereus podría pertenecer a la clase IB de la clasificación dada por Anraku (3) o sea, que quedaría identificada como una citocromo c oxidasa conteniendo hemo c. Anraku sugiere que las oxidasas del tipo IB, presente en organismos que también poseen oxidasa IA, podría funcionar como vía alterna para el transporte de electrones, bajo condiciones donde el oxígeno fuera factor limitante. Este planteamiento sólo sería válido en situaciones transitorias de baja tensión de oxígeno ya que la síntesis de citocromo c se reprime en cultivos microaerofílicos de B. cereus (11) y de otras especies estudiadas (35). Es interesante el hecho de que este tipo de membranas en B. cereus poseen muy baja capacidad respiratoria. Bajo estas condiciones de cultivo encontramos buenos niveles de NADH-deshidrogenasa y de citocromos b y g, pero niveles despreciables de cit c y gga. Es posible que la baja capacidad respiratoria de las células microaerofílicas y anaeróbicas sea debida a la carencia de citocromo c. Este planteamiento podría ser probado tratando de reconstituir la actividad de NADH-oxidasa con citocromo c exógeno.

La disponibilidad de un mutante de B. cereus carente en cit gga y que es capaz de crecer y esporular en proporciones cercanas a la cepa silvestre, abre varios caminos de investigación que

podrían contestar preguntas importantes sobre la bioenergética del crecimiento y esporulación bacteriana. Algunos de los problemas que pueden ser abordados serían los siguientes:

1. Revisión del esquema de composición y organización de los citocromos de *B. cereus*. En ausencia de *cyt a_{aa}* podemos diseccionar los componentes involucrados a la transferencia de electrones de la vía de *cyt g* oxidasa.

2. El mutante *cyt a-* es capaz de esporular y será interesante averiguar de qué manera se compensa la ausencia de *cyt a_{aa}* en célula madre y endospora.

3. El mutante *cyt a-* expresa cantidades incrementadas de *cyt g* y esta condición podría ser aprovechada para intentar su purificación.

4. Purificado el *cyt g* podría ser reconstituido en liposomas y saber así, si tiene actividad translocadora de protones.

CONCLUSIONES.

- 1.- La mutante caracterizada, carece de citocromo oxidasa aa_3 , pero contiene citocromo c y citocromo oxidasa c , esta última inducida entre 2 y 3 veces, (con respecto a la cantidad que presenta la cepa silvestre), lo que le permite crecer casi normalmente, tanto en medio fermentable amortiguado con fosfato 2x, como en medio no fermentable.
- 2.- La repopulación ocurre en ausencia de citocromo oxidasa aa_3 , lo que indica que este citocromo no es indispensable para que este proceso se lleve a cabo y que citocromo oxidasa c es capaz sola o junto con citocromo oxidasa d , de aportar la energía suficiente para este.
- 3.- Citocromo c se encuentra presente en la mutante, y tiene un comportamiento paralelo al del citocromo d , proponemos que citocromo c es una citocromo c oxidasa con hemo c , que funciona como una vía alterna en la cadena respiratoria de esta bacteria.
- 4.- La actividad de TMPD oxidasa encontrada, fue 5 veces menor en nuestra mutante que en la cepa silvestre, por lo tanto podemos asumir, que citocromo c (y posiblemente d) participan tan solo con un 20% de la respiración bacteriana.

Literatura Consultada

1. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sanyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klute, M.C. (1973) Release and recovery of forespore of Bacillus cereus. J. Bact. 115: 1159-1166.
2. Anraku, Y. y Gennis, R.B. (1987) The aerobic respiratory chain of Escherichia coli. TIBS 12: 262-266.
3. Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains. Ann. Rev. Biochem. 57: 101-132.
4. Chambliss, G.H. (1979) The molecular biology of Bacillus subtilis sporulation in Developmental Biology of Prokaryotes. (J. H. Parish ed.) University of California Press. Vol. I Capt. 4 pp 57-71. Berkely y Los Angeles.
5. De Vrij, W. Azzi, A. y Konings, N. (1983) Structural and functional properties of cytochrome c oxidase from Bacillus subtilis W23. European J. Biochem. 131: 97-103.
6. De Vrij, W. Burg, B.v.d. Konings, W.N. (1987) Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from Bacillus cereus. Eur. J. Biochem. 166: 589-595.
7. Doi, R.H. y Halvorson, H. (1961) Comparison of electron transport systems in vegetative cells and spores of Bacillus cereus. J. Bact. 81: 51-58.

8. Dworkin, M. (1985) Developmental Biology of the Bacteria. (The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc.) pp.22-49 California, U.S.A.
9. Escamilla, J.E. y Benito, M.C. (1984) Respiratory system of vegetative and sporulating Bacillus cereus. J. Bact. 160: 473-477.
10. Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I.P. y Aranda, A. (1986). Respiratory systems of the Bacillus cereus mother cell and forespore. J. Bact. 167: 544-550.
11. Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I.P., Zarzoza, G. y Linares, V. (1987) Expression of cytochrome oxidases in Bacillus cereus: Effects of oxygen tension and carbon source. J. Gen. Microbiol. 133: 3549-3555.
12. Felix, J.A. y Lundren, D.G. (1973) Electron transport system associated with membranes of Bacillus cereus during vegetative growth and sporulation. J. Bact. 160: 473-477.
13. Freese, E. (1981) Initiation of bacterial sporulation in Sporulation and Germination. Proceedings of the Eight International Spore Conference (H.S. Levinson, A.L. Sonentein, D.J. Tipper eds.) Amer. Soc. for Microbiol. pp 1-12. Washington, D.C.
14. Fortnagel P. y Freese, E. (1968) Analysis of sporulation mutants 11. Mutants blocked in the citric acid cycle. J. Bact. 93: 1431-1438.

NO SALIR DE LA BIBLIOTECA

15. Goldman, M. y Blumenthal, H.J. (1964) Changes in terminal respiratory pathways of intact cells of Bacillus cereus at various stages of development. J. Bact. 87: 377-386.
16. Hanson, R.S., Srinavisan, V.R. y Halvorson, H.O. (1963). Biochemistry of sporulation I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bact. 85: 451-460.
17. Hoggarth, C. Wilkinson, B.J. y Ellar, D.J. (1977) Cyanide resistant electron transport in sporulating Bacillus megaterium KM. Biochem. Biophys. Acta 461: 109-123.
18. Jones, C.W. y Redfearn, E.E. (1966) Electron transport in Azotobacter vinelandii. Biochem. Biophys. Acta 113: 467-481.
19. Jones, C.W. y Redfearn, E.R. (1967) The cytochrome system of Azotobacter vinelandii. Biochem. Biophys. Acta. 143: 340-353.
20. Jurtsmuk, P. y Muller, W.C. (1975) Bacterial terminal oxidases. Crit. Rev. Microbiol. 3: 399-468.
21. Jurtsmuk, P. Jr. y Yang, T. (1980) Oxygen reactive hemoprotein components in bacterial respiratory systems. in Diversity of bacterial respiratory system. (Knowles, C.J. Editor) C.R.C. Press, Inc. Vol. 1: 137-159. Bocaaton, Florida.
22. Kita, K., Konishi, K. y Andraku, Y. (1984) Terminal oxidases of Escherichia coli aerobic respiratory chain. I. Purification and properties of cytochrome b_{558} -D complex from cells in the

- early exponential phase of aerobic growth, J. Biol. Chem. 259: 3368-3374.
23. Klotzel, W. G. Piccolo, E. Chappelle, E. y Freese, F. (1969) Production of adenosine triphosphate in normal cells and sporulation mutants of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 244: 3270-3276.
24. Konings, W.N. (1975) Localization of membrane proteins in membrane vesicles of Bacillus subtilis. Arch. Biochem. Biophys. 167: 570-580.
25. Konishi, K. Ouchi, M. Kita, K. y Horikoshi, I. (1986) Purification and properties of a cytochrome b560-d complex. A terminal oxidase of the aerobic respiratory chain of Photobacterium phosphoreum. J. Biochem. 99: 1227-1236.
26. Lang, D.F. Felix, J. y Lundren, D.G. (1972) Development of membrane-bound respiratory systems prior to and during sporulation in Bacillus cereus and its relationship to membrane structure. J. Bact. 110: 968-977.
27. Lowry, O.H., Rosenbrought, U.J., Farr, A.K. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 1938:265.
28. Losick, R. (1981) Sigma Factors. Stage 0 Genes and Sporulation in Sporulation and Germination. (H. Levinson, A.L. Sonenshein y D.J. Tipper Eds.) Amer. Soc. Microbiol. pp 48-56. Washington, D.C.
29. Ludwig, B. (1987) Cytochrome c oxidase in Prokaryotes. FEMS

Microbiol. Rev. 46: 41-56.

30. Marr, S., B. y Gest, H. (1973) Genetic mutation affecting the respiratory electron-transport system of the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas capsulata. J. Bact. 114: 1045-1051.
31. Mc. Fatters, G.A. Wilson, D.F. y Strobel, G.A. (1970) Cytochromes in a cyanide-resistant strain of Bacillus cereus. Canad. J. Microbiol. 16: 1221-1226.
32. McInerney, M.J. Holmes, K.S. y Dervartanian, D.V. (1982) Effect of O₂ limitation of growth and respiration of the wild type and an TMPD oxidase-negative mutant strain of Acetobacter vinelandii. J. Bioenergetics and Biomembranes. Vol 14: 451- 456.
33. Prebble J.N. (1981) Mitochondria, Chloroplasts and bacterial membranes. pp365 Longman ed. London, N.Y.
34. Poole, R.K., Scott, R.T., Baines, B.S., Salmon, I. y Lloyd, D. (1982). Identification of cytochromes O and a₃ as functional terminal oxidases in the Thermophilic bacterium. F53, FEBS Letters 150: 281-284.
35. Poole, R.K. (1983) Bacterial cytochrome oxidases, a structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. Biochem. Biophys. Acta 726: 205-243.
36. Reynolds, E.S. (1962) The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain for electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-211.

37. Setlow, P. (1981) Biochemistry of bacterial forespore development and spore germination in Sporulation and Germination (H.S. Levinson, A.L. Senenhein, D.J. Tipper Eds.) Amer. Soc. Microbiol. pp 13-28. Washington D.C.
38. Smith, L. (1978) Bacterial Cytochromes and their spectral characterization. Methods in Enzimol. 53: 202-213. 40.
39. Sterlini, J.M. y Mandelstam, J. (1969). Commitment to sporulation in Bacillus subtilis and its relationship to development of actinomycin resistance. Biochem. J. 112: 29-37.
40. Sone, N. (1986) Cytochrome oxidase from Thermophilic bacterium PS3. Methods in Enzimology 126: 145-153.
41. Taber, H. (1974) Isolation and properties of cytochrome a-deficient mutants of Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol. 81: 435-444.
42. Taber, H. y Froese, E. (1974) Sporulation properties of cytochrome a-deficient mutants of Bacillus subtilis. J. Bact. 120: 1004-1011.
43. Tochikubo, K. (1971) Changes in terminal respiratory pathways of Bacillus subtilis during germination outgrowth and vegetative growth. J. Bact. 108: 652-661.
44. Wilkinson, J. y Ellar, D.J. (1975) Morphogenesis of the membrane-bound electron transport system in sporulation Bacillus megaterium IM. Eur. J. Biochem. 55: 131-139.

45. Willison, J.C. y John, F. (1979) Mutants of Paracoccus denitrificans deficient in c-type cytochromes J. Gen. Microbiol. 115: 449-450.
46. Willison, J.C., Haddock, E.A. y Boker, D.H. (1981). A Mutant of Paracoccus denitrificans deficient in cytochrome a + aa. Fems Microbiol. Letters 10: 249-255.
47. Yoshida, T. y Fee, J.A. (1974). Studies on cytochrome c oxidase activity of the cytochrome c1-aa3 complex from Thermus thermophilus. J. Biol. Chem. 259: 1031-1036.
48. Young, M. y Maldestam, J. (1979) Early events during bacterial endospore formation. Adv. Microb. Physiol. 20: 103-162.