

03081

② 2g.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

EL SISTEMA RESPIRATORIO DE *Rhizobium phaseoli*
EN VIDA LIBRE Y DURANTE SIMBIOSIS.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA (BIOQUIMICA).

PRESENTA

M. EN C. BLANCA LILIA BARQUERA ALCALDE

1990

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	5
<u>INTRODUCCION</u>	6
LA RESPIRACION Y LA GENERACION DE ENERGIA	10
1. Respiración bacteriana	11
2. Organización secuencial y espacial	12
3. Componentes de las cadenas respiratorias bacterianas	13
3.1 Flavoproteínas	14
A. Flavoproteínas deshidrogenasas	14
B. NADH deshidrogenasa	15
C. Succinato deshidrogenasa	15
3.2 Reacción con oxígeno de las flavoproteínas	16
A. Propiedades de las Flavoproteínas transferidoras de de electrones	16
B. Propiedades de las Flavoproteínidasas	17
C. Propiedades de las Flavoproteínas monooxigenasas	17
3.3 Quinonas	18
3.4 Citocromos	19
A. Citocromos no autooxidables	21
B. Citocromos oxidasas	22
EL SISTEMA RESPIRATORIO DE <i>ANABAZONA</i> . Diferencias entre el crecimiento en vida libre y el bacteroide	29
1. Transporte de electrones en vida libre	29
2. Transporte de electrones en el bacteroide	30
<u>EXPERIMENTAL</u>	32
1. CULTIVO DE CELULAS	34
A. Cultivo aerobio	34
B. Cultivo anaerobio	35

C. Cultivo "anaerobio" o estático	35
2. FRACCIONAMIENTO CELULAR	35
3. DETERMINACION DE PROTEINA	36
4. ENSAYOS ENZIMATICOS	36
A. Oxidorreductasas. DCFIP como aceptor	36
B. Oxidorreductasas. Ferricianuro de potasio como aceptor	37
C. Inactivación alcalina de flavoproteínas	38
D. Oxidasas	38
E. Inactivación alcalina	40
5. ANALISIS DE CITOCROMOS	40
A. Espectros diferenciales	41
B. Complejos con CO	41
C. Picos de oxidación	42
D. Extracción de hemos. Cuantificación del cit c.	42
6. OSTENSION DE BACTEROIDES	46
RESULTADOS EXPERIMENTALES	46
1. MEDIO DE CULTIVO	46
2. DEPA OFNAD	49
2.1. Expresión de citocromos a lo largo del crecimiento	49
A. Cultivo aerobio	50
B. Cultivo microaerofílico	52
C. Actividades Respiratorias	54
D. Resistencia al KCN	55
E. Ramificaciones del SP	57
F. Cinética para O ₂	58
G. Inhibición con etebrina	60
H. Inactivación alcalina	62
I. Substratos	62
J. Fotoinactivación	65
K. Aceptores	66

L. Citocromos a y c	62
2.2. Bacteroides	70
A. Deshidrogenasas. DCFIP o Ferricianuro como aceptores	70
B. Cinética de O_2	72
C. Inhibición con atebrina y curva de NADH	72
D. Análisis espectral	72
3. CEPA CEE	73
A. Actividades respiratorias	74
B. Inhibición con KCN	74
<u>REFERENCIAS</u>	79
<u>REFERENCIAS</u>	81
<u>APENDICE</u>	87

- Barquera, F. García-Horsman, A. Escamilla, J.E. Cytochrome c expression and regulation pattern in free-living *Fructibacillus obscurus*. Archives of Microbiology, 1990. En revisión.
- Barquera, F. García-Horsman, A. Escamilla, J.E. An alternative noncytochrome branch in the respiratory system of free-living *Fructibacillus obscurus*. Archives of Microbiology, 1990. En revisión.

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina.
CE 3	Cepa de <i>R. phaseolus</i> resistente a estreptomidina.
CFN 42	Cepa de <i>R. phaseolus</i> resistente a ácido nalidixico y rifampicina.
cit	citronato.
CEM	Coefficiente de extinción molar.
ΔS	Cambio en la entropía libre.
ΔE°	Cambio en el potencial redox basado en constantes de equilibrio absolutas.
DEAE	Dietil amino etil.
DOPIF	Dicloro (fenol) indofenol.
DO	Densidad óptica.
E°	Potencial redox estándar a pH 0 (mV).
E_m	Potencial redox medio (potencial redox estándar a un pH definido, generalmente a 25°C y pH 7).
FMN	Flavin mononucleótido.
FAD	Flavin adenin dinucleótido.
Fp	Flavoproteína.
H^+ / O	Cociente número de protones / átomo de oxígeno. Número de protones translocados por la cadena respiratoria durante el transporte de $1 e^-$ del sustrato al oxígeno.
H^+ / e	Cociente número de protones / electrón reducido.
HEPES	4-(2-Hidroxietil) piperazina- N-(2-etansulfonato).
HONO	Hidroxido de N-nitrosil-N-nitrosodifenilamina.
K_m app	Constante aparente de Michaelis.
MS	Microsomas.
MS	Microsomas.

NADH	Dinucleótido de adeníl nicotinamida reducido.
NAD(P)H	Dinucleótido de adeníl nicotinamida fosfato reducido.
ox	oxidado.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
PMS	Fenilmetilsulfato.
FMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo.
PY	Triduo de pectato, extracto de levadura y calcio.
D	Quinona oxidada.
OH	Sesquioxona.
OH ₂	Durolol.
rpm	Revoluciones por minuto.
red	reducido.
SR	Sistema respiratorio.
SBS	Dodecilo sulfato de sodio.
TA	Temperatura ambiente.
TCM	Amortiguador Tris-HCl pH 7.4; CaCl ₂ ; MgCl ₂ .
TMPP	Tetrametil pirrolidindiamina.
Tris	Trisoma base.
UD-S	Ubiquinona-S. El S se refiere al número de grupos isopreno de la cadena lateral.

RESUMEN

En el presente trabajo, se presentan datos que permiten sugerir la secuencia en el transporte de electrones, en vida libre y en los bacteroides, de *R. phaseoli*, así como también algunos factores sobre la regulación de la expresión de los diversos componentes respiratorios.

Se estudiaron dos cepas de *R. phaseoli* (CFN42 y CE3), las cuales se cultivaron en un medio no fermentable a diferentes tensiones de O_2 .

En vida libre, se encontraron presente los siguientes componentes:

Deshidrogenasas: Se detectaron actividades de NADH, succinato y malato deshidrogenasas, en todas las condiciones de aeración y de edad del cultivo, aproximadamente al mismo nivel. **Citocromos no auto-oxidables:** Citocromos *b*. Se encontró que la expresión de estos citocromos se afecta fuertemente por la fase de crecimiento y por la tensión de oxígeno. La concentración de los cit *b* aumentó conforme el cultivo aerobio envejecía o al disminuir la tensión de oxígeno. Parece haber la inducción de un citocromo *b* asociado a la presencia del cit *d*.

Citocromo tipo c: Se encontraron 3 tipos de cit *c*, los cuales contribuyen a un pico de absorción en el espectro diferencial a 419 a 553 nm; el mismo patrón espectroscópico se encontró en condiciones aerobias o microaerofílicas. Los citocromos *c* fueron identificados inmunológicamente: cit *c*₁ (32,000 Da); cit *c* (21,000 Da) y cit *c* (29,000 Da). Por otro lado se obtuvo evidencia de la presencia del complejo *bc*₁ en las membranas aeróbicas de ambas cepas.

Oxidásas: Se encontraron 3 cit-oxidásas: *aa*₃, *o* y *d*. La expresión de estas enzimas estuvo fuertemente regulada por la fase de crecimiento y la tensión de oxígeno. Además dicha expresión también dependió de la cepa analizada.

expresión de esta especie activa fuertemente regulada por la fase de crecimiento. La tensión de cisión. Además, dicha expresión también dependió de la red analizada.

La curvatura se resultó la más importante durante el crecimiento periódico de estas redes.

El citó a period, se constituyó en la red CF142. Mientras que en la red CF7, su concentración aumentó como respuesta del egotamiento de nutrientes.

Con respecto al citó a, éste se encontró exclusivamente en la red CF142. Su expresión dependió de la fase de crecimiento (fase estacionaria) de la tensión de cisión en el medio. Se tuvo la máxima expresión del citó a en el inicio de la fase.

Además de las variaciones de la red, se encontró una especie con conductancia G_2 con base de fosfato, la cual fue identificada de acuerdo preliminar con una fila proteica conocida por su conductancia de 60000 DAlta y 10000 DAlta. Se pudo determinar en el proceso de análisis de la estructura, además por la aparición de un valle a 450 nm en el espectro de absorción UV.

En el caso de las conductancias, se encontró que estas pueden utilizarse para y TAD como sustancia, contener en tipo A y B. Como especie, también se puede tener la participación del citó a del citó a.

SUMMARY

In this work the electron carriers and some regulation aspects of the respiratory chains of free-living and fixed cells are described.

Two different strains of *A. baumannii* were studied (CPND and CETA), both were grown on nonfermentable carbon in different O_2 tensions.

In free-living state the electron transport chain is composed of the following components:

NADH, succinate and malate dehydrogenases were detected, their activities were not influenced by the stage of culture or O_2 tension.

The cytochrome *c* (cytochrome c_{550}) which does not appear to be involved in energy production or in electron transport, it seems that a new type of *c* protein was produced when *c* is functional.

Three cytochromes were characterized here. All of them had peaks at 4.3 and 4.61 μ . The identity of these cytochromes were established: cytochrome *b* (4.3 μ), cytochrome b_1 (4.61 μ), and two new cytochromes (4.61 μ and 4.61 μ). On the other hand, *c* protein could not be detected in any culture in any condition.

Three other cytochromes were found, c_{550} , c_{560} and c_{570} . The absorption spectra of these cytochromes were strongly influenced by oxygen tension. The c_{560} and c_{570} are important in the aerobic growth of either strain. In contrast, the c_{550} seems to be a cytochrome which is not involved in energy production, and it is produced in O_2 tension. In contrast, c_{550} and c_{560} are produced in O_2 tension. In contrast, c_{550} and c_{560} are produced in O_2 tension.

Finally, a new cytochrome was found, c_{580} , which is produced in O_2 tension. It is produced in O_2 tension.

fashion, and was identified as a flavinprotein by the absorption towards quinacrine and for the presence of a trough at 450 m μ in the TMPD-reduced *in vivo* oxidized spectrum. The enzyme could react with NADH or TMPD as substrates and with ferricyanide.

In the case of bacteria, NADH and TMPD oxidases, cytochromes b and c, and cyt b and c₅₅₃ as oxidases were found.

All the data obtained here were condensed in a scheme of *R. phaseoli* respiratory system.

INTRODUCCION

La respiración y la fosforilación oxidativa juegan un papel central en la regulación de las reacciones enzimáticas que involucran la utilización de energía, ya sea en forma de ATP o de gradientes electroquímicos, como son las reacciones biosintéticas, el transporte de solutos y el movimiento flagelar, entre otras (Harold, 1986).

Una reacción que consume grandes cantidades de ATP es la que realizan ciertas bacterias para la fijación de nitrógeno, pues para reducir una molécula de nitrógeno a 2 moléculas de amoníaco se requieren de 16-20 moléculas de ATP, así como de poder reductor en forma de NAD(P)H, además de la exclusión del oxígeno del medio circundante de la enzima (Pomeroy, 1987).

En organismos fijadores de N_2 de vida libre como *Azotobacter vinelandii*, se ha reconocido el papel central del sistema respiratorio sobre el proceso de fijación (Jones, et al., 1973; Debernetter y Pedrosa, 1987) pues este aporta la energía para la síntesis del ATP necesario, además de la protección de la nitrogenasa contra el efecto deletéreo del oxígeno: en donde las oxidasas, en especial el citocromo *c*, tienen un papel preponderante (Gallon, 1981). Este enzima funciona en forma desacoplada permitiendo el consumo de oxígeno rápido y eficiente, de hecho, el funcionamiento del citocromo *c* en *A. vinelandii*, le permite a esta bacteria tener la más alta tasa respiratoria reportada. (McInerney, et al., 1984; Jones, et al., 1973; Wong y Maier, 1987).

La fijación de nitrógeno también se lleva a cabo en las bacterias que forman asociaciones simbióticas con las raíces de ciertas plantas las cuales se conocen como radulas

(Postgate, 1987). Las bacterias más importante que realizan esta actividad son las del género *Rhizobium*, cuya forma diferenciada, el bacteroide, es capaz de fijar nitrógeno, utilizando como fuente de energía ácidos dicarboxílicos, provenientes de la planta. (Rawsthorne, et al., 1980; Humbeck y Werner, 1987; Finan, et al., 1988).

El sistema del transporte de electrones de *Rhizobium* ha sido estudiado, en especial el de los bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium leguminosarum*, y en menor medida el de las bacterias en vida libre. (Appleby, 1969b; Chakrabarti, et al., 1987; O'Brian y Maier, 1982; 1987a,b; 1989; Kretovich, et al., 1973).

Rhizobium en vida libre, puede crecer en varias condiciones: aeróbicamente; microaerofilicamente en 2% de oxígeno; anaeróbicamente con nitrato como aceptor final de electrones; y quimiolitotroficamente con H_2 y CO_2 como fuente de energía y carbono respectivamente. En cada condición mencionada, existe expresión diferencial del sistema respiratorio (Appleby, et al., 1975; Appleby, 1989a,b; O'Brian y Maier, 1982; 1983; O'Brian y Maier, 1987; O'Brian y Maier, 1989; Poole, 1983).

Existen diferencias significativas en la composición y organización de los SR del bacteroide y de las células cultivadas en vida libre. El tipo de citocromos y de las deshidrogenasas son básicamente diferentes en el bacteroide. (Appleby, 1969; Keister, et al., 1983; Humbeck y Werner, 1987). Sin embargo, las diferencias parecen radicar principalmente en el tipo de oxidasas que se encuentran en cada forma diferenciada de la bacteria, habiendo otros nuevos de oxidasas en el bacteroide, como los citocromos *b-420* y *b-420'*. (Appleby, et al., 1975; 1984)

El sistema respiratorio de *Rhizobium* en vida libre, ha sido poco estudiado. (Scheraga, et al., 1988) y poco se sabe de la

composicion y organizacion tanto en el bacteroide como en vida libre.

Intentando correlacionar la actividad del SR y la fijacion de nitrogeno, Soberon, et al., (1988) aislaron dos mutantes con capacidades reducida y aumentada para virar al colorante TMPD, respectivamente. Un cambio en la capacidad de viro del TMPD indicaba que posiblemente se tenian mutantes con capacidades alteradas en las oxidasas, lo que resultaba muy atractivo para observar la relacion entre estas enzimas y la fijacion de nitrogeno. De hecho se encontro una estrecha relacion entre la actividad de las oxidasas y la capacidad para fijar nitrogeno. Sin embargo, para entender los resultados obtenidos de las mutantes, era importante conocer la organizacion y algunos aspectos de la regulacion del SR de *A. phaseoli* en vida libre y los cambios del SR en la diferenciacion a bacteroide.

Los objetivos del presente trabajo fueron conocer la composicion, organizacion y algunos aspectos de la regulacion del Sistema respiratorio de *Mucobium phaseoli* en vida libre y compararlos con algunas propiedades del SR del bacteroide.

Los resultados obtenidos en este trabajo condujeron a proponer la secuencia en el transporte de electrones de *A. phaseoli* y ademas proponer la existencia de varias actividades respiratorias y su regulacion. Los componentes que se encontraron fueron:

Deshidrogenasas: NADH, succinato y malato. Siendo la primera la actividad mas importante en todas las condiciones probadas. Al variar la tension de oxigeno en el medio la actividad de estas enzimas se mantuvo constante, lo que indica que no son paso limitante en el transporte de electrones. La malato deshidrogenasa solo se presenta en la cepa CPN43 y no en la CEP

Citocromas no auto-oxidables tipo c y c₁. Parte de los cuales

forman el complejo α_1 . Los citoplasmas α_1 fueron los más abundantes en todas las condiciones estudiadas. Hay un aumento significativo de α_1 al inducirse la oxidación α_1 .

Con respecto al citoplasma α_2 parece haber al menos dos tipos α_2 . Se encontró el doble de concentración de los α_2 en el crecimiento aeróbico, además se pudo observar que el α_2 es el donador directo de la oxidación α_1 .

Conclusión. Se encontraron 7 citoplasmas: α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , α_6 y α_7 . La expresión de estos citoplasmas estuvo influenciada por la tensión de oxígeno y por la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. α_1 y α_2 parecen ser α proteomas solo en vida libre, mientras que el α_3 parece estar presente en el bacterio-plasma por un mecanismo α α que funciona con α α .

Además se encontró una enzima que reacciona con una afinidad por α_2 que probablemente se trata de una flavoproteína oxidada. La cual se encuentra en vida libre en el crecimiento aeróbico. Esta enzima puede oxidar el α α y el α α hasta total reduciéndose a una proteína en una vía diferente a la de los citoplasmas.

Antes de analizar los resultados observados en el presente trabajo se describen algunos puntos importantes de los sistemas respiratorios de levadura y en especial el α α se llama del α α de α α y de las diferencias entre la respiración en vida libre y el bacterio-plasma.

LA RESPIRACION Y LA GENERACION DE ENERGIA.

La respiración puede ser definida como la transferencia, termodinámicamente espontánea, de equivalentes reductores, (H , H^+ , & electrones) a partir de un reductor a un oxidante via una serie de componentes redox predominante unidos a la membrana celular (en bacterias) o a membranas internas de ciertos organelos (mitocondrias y cloroplastos) (Harold, 1986). Este proceso está acompañado por el cambio en la energía libre (ΔG), el cual depende de la diferencia de potencial redox del donador (exógeno o endógeno) y del aceptor (Harold, 1986; Jones, 1988).

A la transferencia de electrones por los complejos respiratorios, está acoplada la translocación vectorial de protones a través de la membrana, esto permite crear un potencial electroquímico que puede ser utilizado para sintetizar ATP de acuerdo con el mecanismo quimiosmótico de Mitchell. (Nichols, 1982).

Las reacciones entre los complejos respiratorios son mediadas por moléculas pequeñas y difusibles, como: flavinas, centros Fe-S, complejos Fe-hemo (de los citocromos) y complejos de Cu. (Malstrom, 1989).

Las reacciones de transferencia de electrones en la membrana tienen características que las hacen distinguirse de otros procesos celulares que involucren cambios redox. Primero, ocurren rápidamente en un rango amplio de distancias moleculares ($>10 \text{ \AA}$). Segundo, los eventos de transferencia de electrones son frecuentemente acompañados por cambios pequeños en la estructura de los sitios redox. Finalmente, muchos complejos transferidores de electrones son bombas de iones (por ejemplo, la citocromo *c* oxidasa) que operan con el control estructural del flujo de

electrones. (Malström, 1989).

1. Respiración bacteriana.

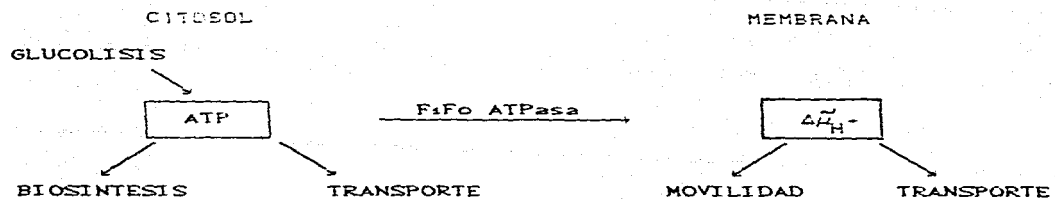
Las bacterias pueden usar tres vías diferentes para sintetizar ATP (Fig.1): fosforilación a nivel de sustrato, la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. Cada una de estas vías involucra una o varias reacciones de transferencia de electrones; aunque la forma en que estas reacciones exergónicas están acopladas a la síntesis de ATP es fundamentalmente diferente en la fosforilación a nivel de sustrato (Jones, 1988).

Los sistemas respiratorios (SR) bacterianos constituyen el mejor ejemplo de eficiencia energética y adaptabilidad dentro de los seres vivos. El gradiente electroquímico formado por las reacciones redox en la respiración bacteriana, es responsable de varias reacciones dependientes de energía, como son, la síntesis de ATP, el transporte reverso de electrones, la movilidad celular y algunas formas de transporte de solutos. (Anraku y Gennis, 1987; Harold, 1989).

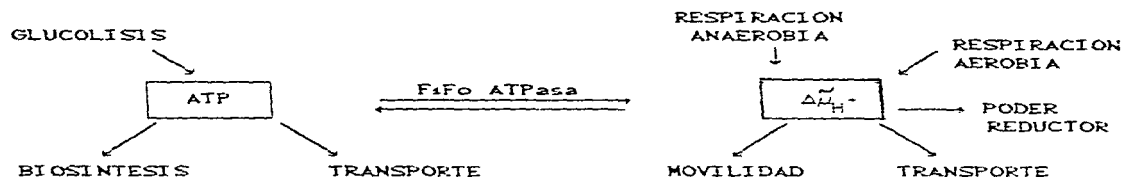
En cuanto a la adaptabilidad, es sorprendente encontrar bacterias que pueden utilizar como sustratos oxidables alcoholes, ácidos orgánicos, iones de hierro, etc. (Knowles, 1989). Otras muchas pueden sobrevivir a varias tensiones de oxígeno, desde las anaerobias respiradoras de nitrato, nitrato o sulfato hasta las aerobias estrictas. (ver Fig.2) (Knowles, 1989; Hamilton, 1989).

La respiración aerobia es la forma más eficiente de entre todos los sistemas respiratorios encontrados, de hecho el oxígeno "fue escogido por la naturaleza" como el aceptor final de la cadena transportadora de electrones porque este elemento está en estado iónico más apropiado, con una solubilidad en agua adecuada

A.



B.



C.

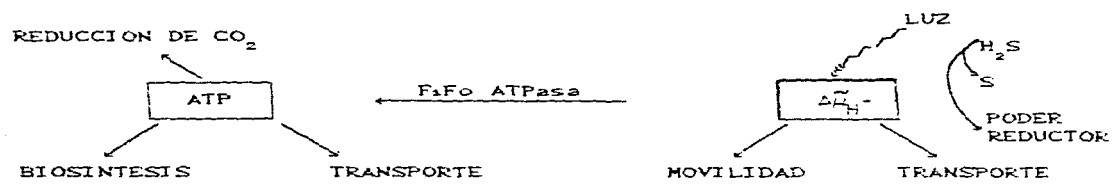


FIGURA 1. Formas de obtencion de energia en las bacterias. A. Metabolismo fermentativo (fosforilacion a nivel de sustrato). B. Metabolismo de bacterias facultativas, las cuales pueden respirar y fermentar. C. Metabolismo fotoautotrofico en cianobacterias y bacterias purpuras (fotofosforilacion). Tomada de Harold, 1956.

y con una combinación adecuada de propiedades cinéticas y termodinámicas (Fowler, 1988). De hecho, de los aceptores que se conocen en los diversos SF, el oxígeno posee el potencial redox más electropositivo y por lo tanto, la oxidación de NADH ocurre dentro de un rango amplio de potenciales redox (E° NAD⁺/NADH = -320 mV; E° $\frac{1}{2}$ O₂/H₂O = 800 mV; E° $\frac{1}{2}$ O₂/H₂O = 1140 mV (Jones, 1988).

Los sistemas transportadores de electrones de las bacterias se distinguen del mitocondrial en dos características generales:

Las cadenas de transporte de electrones son más complejas. La respiración y la transducción de energía se llevan a cabo en la membrana citoplasmática. La flexibilidad y necesidad de adaptarse a cambios drásticos en el medio ambiente, poseen una gran diversificación de las vías utilizables. Además, los procariontes pueden ejercer una regulación temporal de los complejos respiratorios, tales como sepeos de membrana o cambios accidentales por la inducción o represión de componentes renales (Jones y deVos, 1986; Jones, 1988).

Algunos complejos respiratorios muestran similitud funcional con los correspondientes complejos mitocondriales y son incluso considerados en la estructura por su similitud con el subcomplejo.

3. Organización secuencial y espacial.

Los diversos componentes de los SF bacterianos y su organización espacial y secuencial han sido estudiados desde diversos puntos de vista. Se ha intentado encontrar similitudes restructurales de los sistemas que los de la mitocondria y entonces empezar la función basados en las similitudes de localización, tanto las similitudes del sistema de electrones como también aquellas con respecto a la transducción de energía (Jones, 1988).

Como se ha mencionado, las bacterias exhiben diversidad en la complejidad de sus cadenas respiratorias y esta diversidad depende de varios factores:

- De los potenciales redox de los pares donadores y aceptores.

- De la información genética inherente al organismo.

- De la habilidad del organismo de regular la síntesis de componentes redox de acuerdo a las necesidades de la célula bajo diferentes condiciones de cultivo.

- Del grado de interacción del SR con uno o mas donadores y/o aceptores. (Harold, 1986).

Es importante hacer notar que no todas las SR que catalizan las mismas reacciones (por ejemplo, oxidación aerobia de NADH) tienen necesariamente el mismo tipo de componentes redox. Diferencias importantes ocurren entre especies y aun dentro de una misma especie dependiendo de las condiciones de crecimiento.

La organización espacial de diferentes cadenas respiratorias ha sido estudiada. (Harold, 1986; Jones, 1988). Los sitios de unión del sustrato de las flavoproteínas-FeS deshidrogenasas y reductasas y probablemente de todos los citocromos oxidasas, están del lado citoplásmico de la membrana. Por lo tanto estas proteínas son periféricas o transmembranales. Sin embargo, la localización exacta de los centros redox en estas enzimas no se conoce bien. En contraste, los citocromos tipo c y Cu-proteínas están unidas al lado externo de la membrana o están presentes en el espacio periplásmico. Los centros redox están fuertemente unidos a la apoproteína y su localización se conoce con precisión (Fig. 2).

Poco se sabe de la posición exacta dentro de las membranas de la ubiquinona, menaquinona, de los citocromos tipo b y de

2

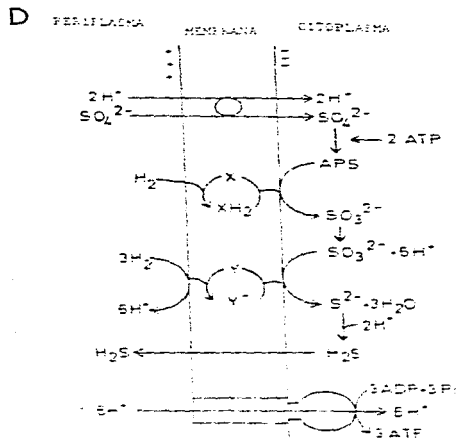
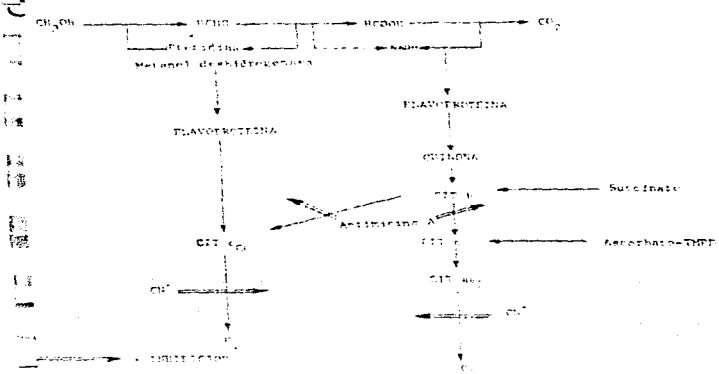
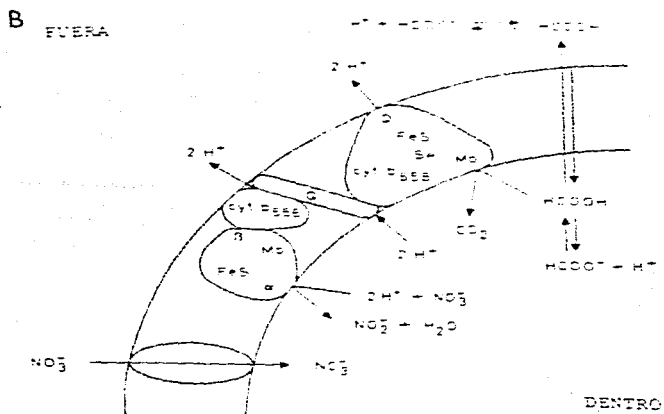
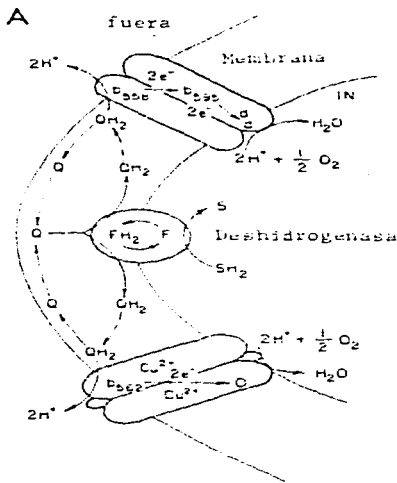


Figura 2. Diversidad de los Sistemas Respiratorios Bacterianos. Modelos topográficos de las cadenas respiratorias.

A. Varias deshidrogenasas (F) reducen a la ubiquinona-8 (Q), la que difunde en la bicapa y puede ser oxidada por cualquiera de las oxidasas terminales. Se propone a las oxidasas α y β como sitios de acoplamiento. Tomada de Anraku, y Genlis, 1987.

B. Topografía de la respiración de nitrato en *Escherichia coli*. Abreviaturas: Mo, S_2 y FeS, centros de molibdeno, selenio y hierro-azufre; Cyt. c, citocromos; Q, ubiquinona; α y β son subunidades de la nitrato reductasa. Tomada de Knowles, (ed) 1980.

C. Esquema tentativo del transporte de electrones de *Pseudomonas aeruginosa*. Tomada de Knowles, (ed) 1980.

D. Modelo quimiosmótico del acoplamiento de la fosforilación y la reducción desasimilatoria de sulfato en *Desulfovibrio vulgaris*. Abreviaturas: X, acarreador de hidrogeno; Y, acarreador de electrones. Tomada de Knowles, (ed) 1980.

En todos los casos se ilustra la organización espacial y secuencial del transporte de electrones, nota la variedad de aceptores y donadores.

algunas proteínas Fe-S. Aunque hay cierta evidencia que indica que algunos aniones de semiquinona están unidos a proteínas. Las formas quinona y quinol son difusibles en la membrana y los citocromos b de bajo potencial están probablemente cerca de la superficie periplásmica. (Krüger y Uden. 1985; Jones. 1988).

3. Componentes de las cadenas respiratorias bacterianas.

Los SR bacterianos son extremadamente variados y contienen varios tipos de acarreadores redox, los cuales pueden agrupar en los siguientes grupos.

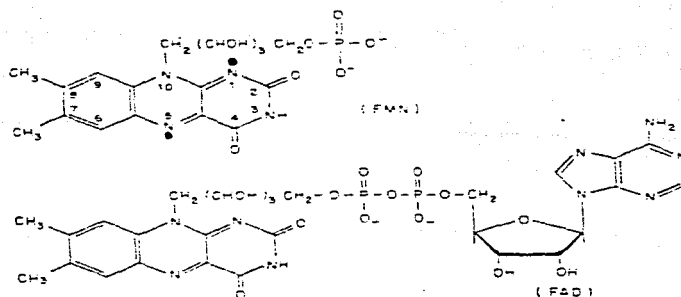
3.1. Flavoproteínas.

Las flavoproteínas contienen flavín-mononucleótido (FMN) o flavín-adenin-dinucleótido (FAD) como grupo prostético unido no covalentemente a la apoproteína. Tanto FMN como FAD transportan como máximo dos hidrogenos. (Jones. 1988). (Fig. 3A).

A. Flavoproteínas deshidrogenasas.

Las más comunes son las que oxidan L-malato, D- y L-lactato, L-glicerol-3-fosfato y L-dihidroacetato. Todas contiene FMN excepto L-lactato deshidrogenasa que contiene FAD. Estas proteínas tienen al menos una subunidad que está localizada del lado citoplásmico de la membrana, a la cual están acoplados fosfolípidos específicos por medio de interacciones hidrofóbicas (Jones. 1988; Anraku y Gennis. 1987).

A



B

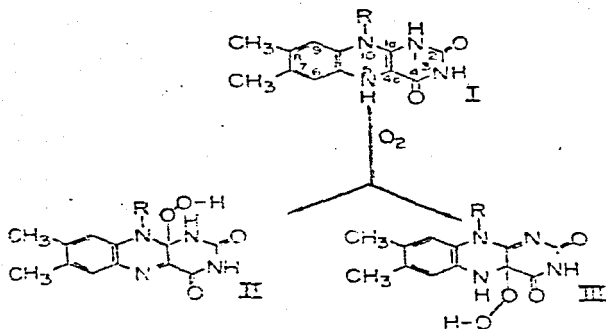


FIGURA 3. A. Estructura del flavín mononucleótido (FMN) y del flavín adenín-dinucleótido (FAD). FMN y FAD transportan 2 átomos-H. En la forma reducida 2 hidrogenos están unidos a las posiciones N-1 y N-5. Tomada de Jones, 1969.

B. Reacción con oxígeno de las flavín-oxidasas. La reactividad y la concentración relativa de los productos depende de la interacción flavina-proteína. Tomada de Massey, et al., 1969.

B. NADH deshidrogenasa.

Este sistema enzimático (también llamado Complejo I), cataliza la transferencia de equivalentes reductores desde el NADH hasta ubiquinona o menaquinona, siendo la vía de entrada de electrones más importante para casi cualquier SR. El complejo puede translocar protones en la mayoría de las bacterias quimioheterótrofas. (Ingledey y Poole, 1984).

La enzima contiene flavina unida no covalentemente (FMN o FAD) y más de cuatro centros Fe-S; en cuanto a sensibilidad a inhibidores del complejo I es variable de bacteria a bacteria sobre todo el caso de rotenona. (Jones, 1988).

La NADH deshidrogenasa cruda de la membrana y oxida al NADH del lado citoplásmico, sin embargo existe variabilidad en cuanto a su tamaño, por ejemplo la NADH deshidrogenasa de *Paracoccus denitrificans* tiene más de 10 subunidades en cambio la enzima purificada de *Escherichia coli* parece tener una sola subunidad, la cual carece de centros Fe-S (Jones, 1988; Jaworowski, et al., 1981; Dancy y Shapiro, 1976).

C. Succinato deshidrogenasa.

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato y transfiere equivalentes reductores preferentemente a ubiquinona. El relativo alto potencial redox del par fumarato/succinato (E_m +30 mV) hace insignificante la contribución de esta enzima en la conservación de energía, lo que impide el bombeo de protones. (Ingledey y Poole, 1984; Jones, 1988).

3.2. Reacción con oxígeno de las flavoproteínas.

Algunas flavinas y flavoproteínas (como la glucosa oxidasa, aminoácido oxidasa, entre otras) pueden reaccionar directamente con oxígeno, produciéndose la flavina oxidada y H_2O_2 . (Singer y Edmondson, 1978; Massey, et al., 1988; Ghisla y Massey, 1989). (Fig. 3B).

En términos de la reactividad con el oxígeno existen tres grupos de flavoproteínas:

Las electron-transferasas (llamadas deshidrogenasas) que generan $O_2^{\cdot -}$ y el radical flavin-enzima.

Las oxidasas, las cuales generan H_2O_2 y la enzima oxidada.

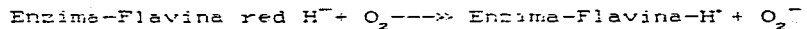
Las monooxigenasas, que rompen el enlace O-O insertando un átomo de oxígeno a un sustrato y reduciendo el otro átomo de oxígeno al agua.

La reactividad y el potencial redox de cada enzima está controlada por las interacciones entre la flavina y la apoproteína.

A. Propiedades de las Flavoproteínas transferidoras de electrones.

Ejemplos de este tipo de enzimas son: flavodoxina, ferredoxina-NADP reductasa, citocromo P-450 reductasa, etc. Estas enzimas reaccionan rápidamente con oxidantes de un electrón como ferricianuro o citocromo c. La velocidad de reacción global con oxígeno es lenta, pero la transferencia del primer electrón es

rápida. La reacción que catalizan es la siguiente:



La subsecuente reacción de oxidación del radical flavina por $\text{O}_2^{\cdot -}$ o por oxígeno es lenta. (Massey, et al., 1988).

B. Propiedades de las Flavoproteínas oxidasas.

Algunas de ellas son flavoproteínas simples, otras en cambio, forman complejos con metales como Fe y Mo. Enzimas típicas de esta clase son: D- y L- aminoácido oxidasas, glucosa oxidasa, glicolato oxidasa y L-lactato oxidasa. En general estas enzimas reaccionan lentamente con oxidantes de un electrón como ferricianuro o citocromo c pero reaccionan rápidamente con oxígeno. El producto de reducción de oxígeno es H_2O_2 sin la producción de flavin-semiquinone como intermediario. Una propiedad importante que distingue a las flavoprotein-oxidasas es que pueden reaccionar con sulfito, formando un aducto estable que puede ser identificado espectrofotométricamente (Massey, et al., 1969).

C. Propiedades de las Flavoproteínas monooxigenasas.

Las enzimas de este grupo introducen un átomo de oxígeno a un sustrato y reducen el otro átomo de oxígeno a agua. Ejemplos de estas enzimas son: la L-lactato monooxigenasa y la L-lisina monooxigenasa, las cuales llevan a cabo la descarboxilación oxidativa y la desaminación oxidativa de sus sustratos respectivamente. Para estas enzimas la fuente de poder reductor es el sustrato y esto es referido como monooxigenasas internas

3.3 Quinonas.

Las quinonas mas comunes en los sistemas transportadores de electrones bacterianos son la ubiquinona (Q) y la menaquinona (MQ). (Krüger y Uuden, 1985; Jones, 1988), las cuales están formados por núcleos de 1,4-benzoquinonas o naftoquinonas unidos a largas cadenas de pollicoprenos. La forma reducida de las quinonas acepta 2H para formar los quinoles respectivos, los cuales se forman via los intermediarios semiquinona, estos a su vez pueden ionizarse para formar el anión QH^- , el cual se estabiliza por la asociación a proteínas y muy probablemente juega un papel importante en ciclo Q. (Collins y Jones, 1981; Jones, 1988).

La ubiquinona es componente redox de las bacterias Gram-negativas mientras que la menaquinona parece ser casi exclusiva de las Gram-positivas; sin embargo, las bacterias facultivas como las *Enterobacteriaceae* (por ejemplo *E.coli*) contienen ambas quinonas. La UQ es la quinona principal durante la respiración aerobia o con nitrato como aceptor, mientras la MQ, de potencial redox más negativo, está involucrada en la respiración del fumarato. (Jones, 1988; Krüger y Uuden, 1985).

3.4. Citocromos.

Los citocromos están formados por un grupo prostético hemo unido a la apoproteína. El hemo está formado por 4 anillos pirrólicos unidos por enlaces vinilo, lo que constituye la molécula plana de porfirina. En el centro se encuentra un átomo de ión hierro el cual oscila entre la forma reducida (Fe^{2+}) y la oxidada (Fe^{3+}). Las 4 posiciones ecuatoriales de coordinación del hierro están ocupadas por nitrógenos pirrólicos mientras que las posiciones 5 y 6 están ocupadas con nitrógeno y/o azufre de

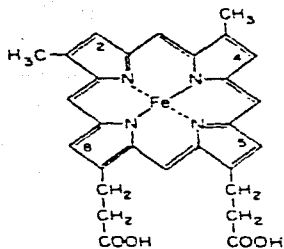
3.4. Citocromos.

Los citocromos están formados por un grupo prostético hemo unido a la apoproteína. El hemo está formado por 4 anillos pirrólicos unidos por enlaces vinilo. lo que constituye la molécula plana de porfirina. En el centro se encuentra un átomo de ión hierro el cual oscila entre la forma reducida (Fe^{2+}) y la oxidada (Fe^{3+}). Las 4 posiciones ecuatoriales de coordinación del hierro están ocupadas por nitrógenos pirrólicos mientras que las posiciones 5 y 6 están ocupadas con nitrógeno y/o azufre de histidinas o metioninas de la apoproteína. En las citocromo oxidasas una de estas posiciones puede ser ocupada por oxígeno o por agua; esta misma posición es ocupada por ligandos de campo fuerte como CO , NO_2 , los cuales son isoésteres de oxígeno y por lo tanto compiten con el oxígeno por la forma ferrosa de la enzima. (Jones, 1988; Jones y Poole, 1985; Poole, 1989).

Los grupos unidos a las posiciones C-1, C-3, C-6 y C-7 del anillo porfirínico (ver figura 4) son invariantes en todos los citocromos, mientras que las posiciones C-2, C-4, C-5, y C-8 pueden tener diferentes sustituyentes; estas sustituciones son las responsables de las diferentes propiedades de absorbencia y potencial redox de los citocromos (Poole, 1983; Jones y Poole, 1985). De acuerdo con estas variaciones se tienen 4 tipos de citocromos:

Citocromos α . Este grupo incluye a los citocromos oxidasas (ver mas adelante) tipo α_0 y α_1 , en los cuales el hemo α tiene una cadena de formilo. (Ludwig, 1987).

Citocromos β (Protohemo). En este grupo se encuentran varios citocromos β no autooxidables, citocromo oxidasas β , citocromo



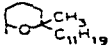
HEMO	C-2	C-4	C-5	C-8
a		-CH=CH ₂	-	-CHO
b	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃
c	-CH-CH ₃ S-	-CH-CH ₃ S-	-CH ₃	-CH ₃
d	CH-R OH	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₃

FIGURA 4. Estructura de los diferentes hemos encontrados en bacterias. Tomada de Poole, 1989.

P-450 y citocromo P-460: todos estos citocromos contienen el mismo hemo que la hemoglobina y que la mioglobina. (Jones, 1988).

Citocromos c (Mesohemo). Este grupo incluye citocromos c , c_2 , c_3 , c_4 , c_5 , c_{550} , c_{551} y c_{558} en los cuales el hemo está unido a la proteína por un tioéter entre los sustituyentes de las posiciones C-2 y C-4 del hemo y cisteínas de la apoproteína. La unión covalente del hemo c a la proteína se considera como una modificación evolutiva de la estructura del citocromo c para prevenir la disociación del mesohemo y la apoproteína, lo que permite al cit c funcionar en el periplasma o en la superficie periplásmica (Pettigrew y Moore, 1987).

Algunos citocromos c tienen la capacidad de unirse a flavoproteínas, formando complejos oligoméricos, los cuales se encuentra en *Pseudomonas* y en algunas bacterias fotosintéticas. (Jones y Poole, 1985).

Citocromos c (Clorina). Este grupo incluye a la citocromo oxidasa c (antes llamada c_2): una forma de la nitrato reductasa y al citocromo cd_1 . En todos estos citocromos el grupo hemo (d ó d_1) es una dihidroporfirina o clorina. (Poole, 1983; Au, et al., 1985; Steup y Muhoberac, 1989.)

Las máximas de absorción y algunas de las características estructurales de los citocromos pueden ser analizadas registrando espectros diferenciales de absorción (reducido vs oxidado), donde se encuentran 3 regiones o bandas de absorción para todos los citocromos en la zona visible del espectro:

Banda α (550-640 nm): banda β (520-530 nm) y banda γ ó Soret (410-540 nm), todas medidas a temperatura ambiente.

De manera excepcional los cit tipo α no exhiben una señal apreciable en la región β y los citocromos tipo d muestran una

señal débil en la región de Soret. Generalmente las máximas de absorción de la región α se usan para describir a los citocromos (λ_{558} , λ_{550} , etc.) lo que resulta más práctico que la nomenclatura c_1 , c_2 , etc.

Es necesario mencionar que el análisis espectral de los citocromos se vuelve más fino si las células enteras o las membranas se congelan antes de registrar el espectro. Esto aumenta la sensibilidad y la resolución, aunque hay un ligero corrimiento hacia el azul de las bandas máximas de absorción y no pueden hacerse determinaciones cuantitativas directas, pues los coeficientes de extinción molar (CEM) están determinados a temperatura ambiente (Jones, 1988).

En cuanto a los valores de potencial redox de los citocromos, (En pH 7), se encuentran entre -100 a $+500$ mV, aunque algunos cit c_1 tienen valores más negativos y el En (pH 3.2) de la citocromo oxidasa c_1 de bacterias acidófilas es tan alto como 700 mV. En general los valores de En (pH 7) de varios citocromos está en siguiente orden: para En c_2 « c_1 « c o alto En c_1 « c_2 . Los citocromos oxidasa c_1 y c_1 tienen valores variables de En arriba y abajo de este rango. (Jones, 1988).

A. Citocromos no auto-oxidables.

Esta denominación se refiere básicamente a citocromos tipo c_1 y c_2 , los cuales transfieren electrones entre las quinonas y algún citocromo oxidasa o reductasa.

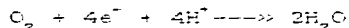
La mayoría de las cadenas respiratorias aeróbicas contienen al menos dos tipos de cit c_1 y un cit c_2 , los cuales junto con proteínas Fe-S de alto potencial forman el complejo bc_1 . Estas cadenas también pueden contener más de un citocromo c soluble (o periférico), al cual dona electrones a la citocromo oxidasa. Hay

que notar que algunos organismos, (*E. coli*) no sintetizan cantidades detectables de cit c durante el crecimiento aerobio por lo que carecen de complejo bc₁; aunque puedan sintetizar citocromos similares durante el crecimiento anaerobio (Ingledew y Poole, 1984). El complejo bc₁ junto con la quinona son parte del ciclo Q, el cual es considerado un sitio de acoplamiento. El ciclo Q involucra a las especies Q, QH y QH₂ y transfiere electrones desde un centro Fe-S de la deshidrogenasa al cit c₁ con la concomitante translocación de protones. En las cadenas respiratorias que carecen de c₁, el ciclo Q está probablemente ausente y los electrones son transferidos de la quinona a un cit b y de ahí a una o mas oxidasas. (Jones, 1985; 1988).

B. Citocromo oxidasas.

A pesar de su diversidad estructural tres de los cuatro tipos de citocromos pueden acarrear 4 electrones para reducir el oxígeno a agua: cit aa₃ y posiblemente cit a₁, cit c y algunos citocromos d. Cada uno de estos citocromos se combina con uno o mas cit no-autooxidables para formar las citocromos oxidasas (co, coa₃, bd, etc) (Poole, 1983; Jones y Poole, 1985).

Existen evidencias para señalar que prácticamente todas las citocromo oxidasas catalizan la siguiente reacción :



via intermediarios oxi y peroxi unidos a la enzima (Jones, 1988; Ludwig, 1987), aunque cada oxidasas con diferente afinidad por oxígeno. La afinidad se incrementa en el siguiente orden: d » » c » aa₃ (Jones y Poole, 1985). Dado lo cual la síntesis de las oxidasas está fuertemente influenciada por las condiciones

ambientales. Citocromo oxidasas C y d son reprimidas en condiciones de alta aereación, mientras que las oxidasas aa_3 y caa_3 pueden ser constitutivas o más frecuentemente reprimidas por bajas concentraciones de oxígeno. Esto da como resultado que durante condiciones limitantes de O_2 el citocromo (c) aa_3 es reemplazada por citocromo c y algunas veces por citocromo d. Mientras que el citocromo c (por ejemplo en *E. coli*) es sustituido por el cit d a bajas tensiones de oxígeno. (Poole, 1983; Anraku y Gennis, 1987).

Análisis topograficos de las membranas o de las estructuras de las citocromo oxidasas, revelan que todas son proteínas transmembranales y aunque el sitio de union del O_2 solo se conoce al detalle para aa_3 , se sugiere que éste puede estar del lado citoplásmico de la membrana. (Jones, 1988).

Los tres oxidasas mas estudiadas (aa_3 , c y d) tienen un papel directo en la conservación de la energía (ver mas adelante). La oxidasa d, forma complejos con citocromos tipo b ó c y cataliza la transferencia de electrones a través de la membrana desde quinol hasta oxígeno, funcionando como un ciclo redox (ver Fig. 2; Anraku y Gennis, 1987).

Recientemente Puustinen, et al., (1989) demostró que el citocromo c de *E. coli* era capaz de bombear protones de manera similar a como lo hace la citocromo c oxidasa de *P. denitrificans*, entre otras (Ludwig, 1987).

Todos los cit oxidasas pueden unir CO formando complejos con señales espectrales características; sin embargo, esta propiedad es solo sugerente de la función de oxidasa, la cual debe de confirmarse por alguna de estas metodologías:

-Comparar el espectro diferencial y el espectro fotoquímico de acción. La liberación de CO de la oxidasa y la concomitante restauración de la actividad respiratoria.

- Medida directa de la reacción entre CO y la oxidasa.
- Mostrar que la putativa oxidasa es competente para sostener la respiración con sustratos fisiológicos. (Poole, 1989).

Citocromo oxidasa aa_3 , caa_3 .

Este tipo de oxidasas está ampliamente distribuidas entre las bacterias aeróbicas y tienen cierto parecido funcional con la oxidasa mitocondrial pues contienen los mismos cuatro centros redox: 2 hemo a y 2 átomos de cobre.

A pesar de su parecido con la enzima mitocondrial, hay dos características distintivas de las enzimas bacterianas. Son más simples en composición y pueden estar asociadas covalentemente a citocromo c .

Todas son citocromo c oxidasas, siendo su donador natural el cit c : en algunos casos, sin embargo, no es claro que cit c sea el donador, si el c unido a membrana o algún c soluble. (Poole, 1983; Sone, et al., 1983).

El hemo aa_3 reacciona en el estado ferroso con oxígeno, CO, NO y azida mientras que en el estado férrico reacciona con KCN. (Jones y Poole, 1985).

Como se mencionó anteriormente, la enzima puede ser reprimida por baja tensión de oxígeno o en condiciones de exceso de carbono o nitrógeno limitado. (Jones, 1985; Escamilla, et al., 1988).

Propiedades ópticas. Tienen absorción en la región visible (600-605 nm y 440-45 nm). La banda α es debida a cit a mientras que a y aa_3 contribuyen de igual manera en la absorción en la región de Soret (De Vries, et al., 1983; Kitada y Krulwich, 1984; Jones y Poole, 1985).

Propiedades estructurales. En todas las especies que se ha estudiado, se encuentra 1 hemo a_1 , 1 hemo a_3 , 2 cobres (aunque hay reportes de la existencia de un tercer cobre) y Mn unido a la enzima sin función aparente. El número de subunidades que se han reportado es de 1 a 3 en geles de SDS. De esta forma, parece que las cit c oxidasas bacterianas conservan la estructura funcional básica, puesto que en la enzima mitocondrial se necesitan las tres subunidades mayores para establecer la función de la enzima. (Gennis, et al., 1980; Jones y Poole, 1985; Poole, 1987; Jones, 1988). De hecho se ha sugerido que la subunidad III mitocondrial es la subunidad más importante en la actividad de bombeo de protones (Hallis, et al., 1982). Varias cit c oxidasas bacterianas funcionan como bomba de protones, incrementando la eficiencia de la transducción de energía en la región terminal del EP, sin embargo, no existe un consenso con respecto a la estequiometría $H^+O_2 \rightarrow H^+e^-$. Por otro lado se han descrito citocromo oxidasas que no bombean protones (Ludwig, 1987).

Zimmermann, et al. (1989) describió la presencia de una oxidasa atípica en *Thermus thermophilus*, el citocromo aa_3 , el cual cataliza la oxidación de cit c a la reducción de oxígeno, siendo el primer reporte de una oxidasa de este tipo.

Citocromo c y cc.

El cit c es probablemente la oxidasa que se encuentra en un mayor número de bacterias con una afinidad intermedia por oxígeno (K_m entre 1.8 y 3.5 μM ; Meyer y Jones, 1970; Hoffman, et al., 1979). Sin embargo, valores más bajos han sido encontrados para *E. coli* (Fida y Hemphill, 1978) y para *Ac. pasteurians* (Weston, et al., 1974).

Su estructura se encuentra conservada pues se ha encontrado

crusa inmunológica entre cito de diversas bacterias. (Jones y Poole, 1985; Kranz y Gennis, 1985).

Funciona en alta aereación en bacterias como *E.coli* o en bajas tensiones de oxígeno sustituyendo a aa₃. (Poole, 1983; Escamilla, et al., 1985).

El citocromo c está unido a la membrana y acepta electrones de ubiquinol-2 (UQ-2). (ver Fig.2) y espectralmente ha sido identificado por el complejo característico que forma con CO (pico a 417 valle a 430 nm). La enzima purificada de *E.coli* contiene 4 polipeptidos, 2 protohemos (h₅₅₈ y h₅₆₉) y 2 cobres (la presencia del cobre es variable). (Jones y Poole, 1985; Jones, 1988).

El citocromo c ha sido reconstituido en vesículas con UQ-2 generándose potencial transmembranal debido al flujo vectorial de electrones (Gennis y Gennis, 1985) y recientemente se ha comprobado su capacidad de bombear protones (Puustinen, et al., 1988). Parece haber homología entre una de las subunidades del cito c y la subunidad de la citocromo c oxidasa encargada de la actividad de bombeo de protones. Esta hipótesis abre un panorama interesante sobre la capacidad de bombeo de protones en las oxidasas bacterianas.

El citocromo c₂ que inicialmente se purificó de *A. vinelandii*, acepta electrones del citocromo c formando un complejo que contiene 2 hemo a y 2 hemo c, siendo la estructura activa un tetramero. (Yano, 1986). Esta oxidasa se ha encontrado también en *Rhodospirillum rubrum* (King y Drews, 1978).

Citocromo *d*.

Esta oxidasa se encuentra preferentemente en bacterias Gram (-) y es rara entre Gram (+), fotótrofos y quimiolitótrofos. (Poole, 1987).

La enzima se induce en baja tensión de oxígeno, limitación de nutrientes, crecimiento en glucosa, crecimiento anaeróbico o en presencia de KCN, también se ha reportado su inducción en medios limitados en cobre o en sulfatos.

En *E. coli* el citocromo *d* sustituye al cit *b* al disminuir la tensión de oxígeno del medio. (Poole, 1987; Jones y Poole, 1985; Lorence, et al., 1986; Anraku y Gennis, 1987).

La oxidasa *d* está formada por 2 polipeptidos y 3 componentes hémicos, hemo *d* (clorina), hemo *a* (Fe^{2+}) y hemo *a*₅₅₈. Siendo el hemo *d* el encargado de unir O_2 . El complejo a_{558} - a_{595} -*d* cataliza la oxidación de 2 moles de ubiquinol-8 con 1 mol de O_2 para producir UQ-8 y agua, estableciendo un potencial de membrana y gradiente de protones, puesto que la oxidación del quinol y la formación de agua se llevan a cabo en lados opuestos de la membrana. El gradiente es el generado es producto de reacciones acopladas y no por un bombeo neto de protones. (Lorence, et al., 1986; Anraku y Gennis, 1987) (Ver Fig. 2).

El complejo *d* absorbe en la región visible del espectro a 400, valle a 450 nm (Miller y Gennis, 1983; Nita, et al., 1984a, b).

La Tabla 1 resume las propiedades más importantes de los citocromos.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS CITO Cromos.

CIT (1)	CENTROS REDOX	*ABS.VIS. (2)	E _m (mV) (3)	K _m (OXIGENO) (4)	KCN (5)	CO (6)	PK (Kd)
b (NA)	Hemo b	560;417	-104 a 110	---	---	---	12-17.5
c (NA)	Hemo c	550-4; 417	190 a 342	---	---	---	12-100
aa ₂ (D)	Hemos a, a ₂ 2 Cu	660-5;440	200 a 265 y 360 a 375; 210	4-7	++	++	73
caa ₂ (D)	Hemos a, a ₂ , c 2 Cu	660;540 y 550-3	200 a 265	4-7	++	++	90
a ₁	Hemos a	585-96	160 a 260	?	++	+/-	ND
o (D)	2 Hemos b Cu ?	555-65; 430	122-417	0.1-6.5	++	+	28
d (D)	2 Hemos d 2 Hemos b	630	280; 417	0.018-0.35	+	+	350
cd (D)	Hemos c, d	550;420 y 664;420	---	?	+	+	ND
c _{CO} (D)	Hemo c	553;419	360	?	+	-	ND

(1) NA. CITO Cromo NO AUTOOXIDABLE. (D) OXIDASA.

(2) BANDAS α : \checkmark EN (NM).

(3) POTENCIAL REDOX.

(4) K_m app POR OXIGENO EN μ M.

(5) INHIBICIÓN POR KCN.

(6) INHIBICIÓN POR CO.

MODIFICADA DE Jones. 1983 y Poole, 1989.

EL SISTEMA RESPIRATORIO DE *Rhizobium*. Diferencias entre el crecimiento en vida libre y el bacteroide.

1. Transporte de electrones en vida libre.

El SR de *Rhizobium* en vida libre se ha estudiado poco, sin embargo se han encontrado diferencias significativas entre especies y aún entre cepas, lo que demuestra el riesgo de hacer generalizaciones al estudiar una especie de *Rhizobium*.

Bradyrhizobium japonicum ha sido la especie más estudiada; Appleby (1969b) sugirió un SR con varias oxidases y con la participación de al menos dos deshidrogenasas (para NADH y succinato).

Después del trabajo pionero de Appleby (1969) en *B. japonicum*, otras especies de *Rhizobium* se han estudiado, con lo que se ha podido definir la organización del SR.

B. japonicum en vida libre expresa citocromos tipo *a* y *a*₃ y las oxidases aa₃ y a. Mientras que en *B. leguminosarum* y *B. trifolii* se encontró, aparte de las oxidases aa₃ y a, la oxidase a. La cual se expresaba a baja tensión de oxígeno.

Se ha descrito que los citocromos *a* y aa₃ pueden ser parte de una rama, mientras que los cit *a*₃ y los cit *a* de otras dos (Appleby, 1969b; De Hollander y Stoutman, 1970; Chakrabarti, et al., 1967; Irelavich, et al., 1977). Cabe mencionar que la expresión del citocromo *a* en *B. leguminosarum* y en *B. trifolii* es realmente relevante pues son de las pocas bacterias donde aa₃ es sustituido por cit *a*, sabiéndose muy poco de los mecanismos regulatorios que gobiernan este hecho.

Por otro lado el citocromo *a* en *B. leguminosarum* permanece prácticamente constante en cualquier condición de cultivo. En *B. japonicum*, en cambio, al bajar la tensión de oxígeno aumenta la

concentración del citocromo a , funcionando casi como la única oxidasa.

La expresión de oxidasas múltiples le permite a este tipo de bacterias (como a otras) sobrevivir en un rango amplio de concentraciones de oxígeno.

En cuanto a la capacidad de oxidar diferentes sustratos, en términos generales, se ha observado que el NADH es el mejor, mientras que el succinato se oxida con dificultad.

La quinona que funciona en estas bacterias es la Ubiquinona-8 (UQ-8), la cual está presente en simbiosis, en cultivos aerobios y anaerobios, y participa en la oxidación dependiente de oxígeno del NADH y succinato (O'Brien y Maier, 1985a,b). Se ha encontrado que el NADH es capaz de reducir del 75 al 85% de de la ubiquinona extraíble de la membrana.

En el caso particular de *Rhizobium* se tenía conocimiento preliminar sobre la composición del SR (Soberon, et al., 1989), pero poco se conocía acerca de la organización y regulación de los componentes respiratorios.

2. Transporte de electrones en el bacteroide.

El tipo de citocromos que existen en los bacteroides es diferente al que existe en las células cultivadas en vida libre. En general, los citocromos aa_3 y a son reprimidos en los nódulos y son sustituidos por otras oxidasas que parecen ser únicas del crecimiento simbiótico. (Appleby, 1988a; Appleby, et al., 1975; Bergersen y Turner, 1980; O'Brien y Maier, 1981; 1989). El decremento en la concentración del citocromo aa_3 ha sido correlacionado con el incremento en la actividad de nitrogenasa en los bacteroides de *R. fabariforme*. (Ching, et al., 1977). Además en cepas mutantes (ineficientes en la fijación) de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) y de *R. leguminosarum*, la oxidasa está presente en

los bacteroides ineficientes. Por otro lado se han encontrado mutantes de *R. phaseolii*, que al sobre-expresar el citocromo aa_3 , son capaces de ser más eficientes en la fijación (Soberón, et al. 1989). A pesar de estos resultados, es difícil correlacionar adecuadamente la presencia de aa_3 con la capacidad de fijar nitrógeno. Inclusive se ha afirmado que en muchas especies de *Rhizobium*, el citocromo aa_3 no está presente en los bacteroides: aunque Neister, et al. (1980) encontró expresión de aa_3 en bacteroides de algunas cepas de *R. japonicum* y esta expresión fue dependiente de la edad de los bacteroides y de la cepa estudiada, pareciendo haber diferencias significativas entre cepas de la misma especie. La expresión simbiótica de aa_3 en algunas cepas efectivas de *Rhizobium*, es hasta cierto punto sorprendente, pues esta oxidasa tiene baja afinidad por oxígeno para poder funcionar adecuadamente en las condiciones de microaerobiosis en las que se encuentra el bacteroide. Por otro lado no se ha observado actividad de oxidases de los citocromos aa_3 ni de citocromo a en nódulos de *R. japonicum*. (Appleby, 1989b; Appleby, et al., 1975).

Con respecto al citocromo a , ha sido encontrado en bacteroides de nódulos efectivos de *R. japonicum*, *R. leguminosarum* y *R. parasponiae*, sin embargo se ha dudado de la correcta identificación de este citocromo: Appleby (1989a,b y Appleby, et al., 1975) sugiere que en realidad se trata del citocromo $P-420$, el cual tiene señales de absorción parecidas al citocromo a , forma complejo con CO pero es insensible al cianuro.

Los bacteroides de *R. japonicum* expresan citocromos $c-552$, $c-554$, $P-420$ y $P-450$, los cuales reaccionan con CO y son por lo tanto candidatos para funcionar como oxidases. (Appleby, et al., 1975; O'Brien y Meier, 1982, 1985a,b; 1989).

Los bacteroides de *R. japonicum* pueden oxidar hidrógeno que proviene de la reacción de fijación de nitrógeno, en estas

condiciones se induce la actividad de una metal-flavoproteína que tiene alta actividad de citocromo *c* oxidasa e insensible al CO. (O'Brian y Maier, 1985a,b; O'Brian y Maier, 1988).

Un componente muy importante de los nódulos es la leghemoglobina, la cual es el transportador y regulador de la concentración de oxígeno intranodular, y junto con las oxidasas del nódulo mantienen niveles adecuados de oxígeno. (Appleby, 1984).

El sistema de oxidasas múltiple con que cuenta el bacteroide le permite tener por lo menos una ruta eficiente y una ineficiente con respecto a la síntesis de ATP. (Bergersen y Turner, 1980). La adición de leghemoglobina a una suspensión de bacteroides da por resultado un incremento en la actividad de nitrogenasa con un modesto incremento en el consumo de oxígeno, indicando que la relación ATP/O es mayor a bajas concentraciones de oxígeno, las cuales son mantenidas por la leghemoglobina. (Wittenberg, et al., 1974). Esto es una clara demostración de que la síntesis de ATP es máxima en los bacteroides a concentraciones de O₂ amortiguadas por leghemoglobina de 0.02-0.1 µM. El control de la síntesis de ATP por oxígeno en los organismos fijadores de nitrógeno se ha explicado en términos de la existencia de un sistema respiratorio ramificado, con una rama que tiene una oxidasa muy afin por O₂ con otra ineficiente y menos afin por oxígeno (Bergersen and Turner, 1980). Se ha demostrado que los citocromos *P-450* ó *P-420* son indispensables para la fase eficiente de la respiración la cual soporta la fijación de nitrógeno. (Natus, et al., 1977).

A altas concentraciones de oxígeno (más de 1 µM), la respiración de los bacteroides de *R. japonicum* está desacoplada de la síntesis de ATP y el citocromo *P-450* parece no intervenir en la respiración (no hay inhibición de la respiración con

N-fenilimidazol, el cual es un inhibidor de este citocromo). Se ha probado que la respiración desacoplada funciona en la "protección respiratoria" de la nitrogenasa manteniendo baja la concentración intracelular de oxígeno. (Appleby, et al., 1975; D'Brian y Maier, 1989). Este mecanismo ha sido claramente identificado en *Azotobacter*. (Ver arriba) (Postgate, 1987).

En *A. japonicum*, Appleby, et al., (1975) ha sugerido que una citocromo c oxidasa de actividad muy alta, sensible a atobrina, debe ser la responsable de la respiración desacoplada que ayuda a proteger a la nitrogenasa contra el oxígeno en los bacteroides.

Con respecto al hecho de haber encontrado citocromo c en células cultivadas en vida libre de dos especies de *Rhizobium* (*R. trifolii* y *R. leguminosarum*). (De Hollander, 1981; Vretovich, et al., 1970) resulta adecuado especular si este citocromo pudiera funcionar en el bacteroide, de una forma similar al complejo c₂ que se encuentra en *Azotobacter vinelandii*. El citocromo c₂ tiene la afinidad por oxígeno más alta de todos los citocromos y pudiera trabajar como una oxidasa desacoplada. Sin embargo no se encontró señal del citocromo c₂ en bacteroides de *R. leguminosarum*.

MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *Rhizobium phaseoli*. La CFN-42, resistente a ácido nalidixico y la C.E.3, resistente a estreptomycin, provenientes del Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM.

1. CULTIVO DE CELULAS.

El medio de cultivo que se usó fué el PY (Noel, et al., 1984) que contenía: 0.5% de peptona de caseína; 0.3% de extracto de levadura y 10 mM de CaCl_2 .

Las bacterias se cultivaron bajo tres condiciones diferentes de tensión de oxígeno: aerobia, microaerofílica y "anarobia". Las dos primeras formas de cultivo se hicieron en un fermentador de 20 litros de capacidad (Centro de Instrumentos, UNAM) a 30°C.

A. Cultivo aerobio.

En este caso se mantuvo aereación vigorosa (10 litros de aire/minuto) y agitación de 200 rpm. El cultivo se inició con 2 litros de inóculo que provenía de dos transferencias realizadas en la siguiente forma: Dos matraces con 200 ml de medio cada uno fueron inoculados con el contenido de bacterias de una caja Petri sembradas con *R. phaseoli* en medio PY-sólido. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante (200 rpm) por 24 horas. Cada matraz sirvió para inocular 2 matraces con 1 litro de medio PY, los cuales se volvieron a incubar en las condiciones indicadas. El medio PY usado para todas las transferencias contenía el antibiótico adecuado en 30 µg/ml.

B. Cultivo microaerófilico.

Se partió de un cultivo aerobio en fase estacionaria temprana (10 horas). En este punto se sacaron del fermentador 10 litros de cultivo y se agregaron 10 litros de medio PY estéril. A partir de éste momento, no se permitió la entrada de aire al fermentador y la agitación se mantuvo a 10 rpm.

C. Cultivo "anaeróbico" o estático.

Para diferenciar de la condición anterior, el sistema de cultivo en garrafón totalmente lleno (20 litros, cerrado) y sin agitación se denominó cultivo "anaeróbico" o estático.

Las células de los diferentes cultivos se cosecharon en las etapas de crecimiento requeridas con una centrifuga de flujo continuo (Sharples Mod.T1). La pastilla celular obtenida se lavó dos veces con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4; $MgCl_2$ 5 mM; $CaCl_2$ 5 mM (amortiguador TCM). Las células se guardaron a $-70^{\circ}C$ hasta su utilización.

2. FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Las células resuspendidas en amortiguador TCM se rompieron en un fraccionador celular "Best-beater" con perlas de vidrio de 0.1-0.2 mm de diámetro y en presencia de 15 $\mu g/ml$ de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF). Para obtener la ruptura de un mayor número de células, se dieron 20 pulsos de 30 segundos cada uno, completando un tiempo de ruptura de 10 minutos. El homogenado resultante se filtró para eliminar las perlas de vidrio y se

centrifugó a 10.000 Xg por 20 minutos. La pastilla se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 140.000 Xg por 40 minutos. Las membranas se lavaron dos veces con amortiguador TCM y se resuspendieron en el mismo amortiguador hasta aproximadamente 20 mg proteína/ ml.

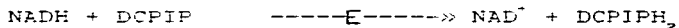
3. DETERMINACION DE PROTEINA.

Se utilizó el método de Lowry, et al. (1951) modificado por Markwell, et al., (1981). en presencia de SDS para eliminar el efecto de fosfolípidos. Para la curva patrón se usó albúmina bovina.

4. ENSAYOS ENZIMATICOS.

A. Oxidorreductasas. DCPIP como aceptor.

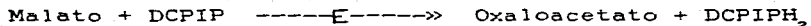
A.1 NADH:DCPIP oxidorreductasa (E.C.1.6.99.3) (Lang, et al., 1972). La actividad de la enzima se determinó de acuerdo con la siguiente reacción:



La mezcla de reacción contenía: (volumen final 1 ml).

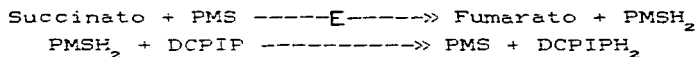
Amortiguador: de fosfatos 0.1 M pH 7.4; 5mM de KCN; 0.0.8 mM de diclorofenol indofenol (DCPIP) y 0.2 mM de NADH. Se registró la basal y la reacción enzimática se inició adicionando membranas (10 mg de proteína). El cambio de absorbencia debido a la reducción del DCPIP se midió a 600 nm. El coeficiente de extinción molar (CEM) del DCPIP usado fue de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A.2. Malato:DCPIP oxidorreductasa. (Lang, et al., 1972). La reacción que se usó para medir la actividad de la enzima fue:



La actividad se determinó de la misma forma que la actividad de la NADH:DCPIP oxidorreductasa, pero el sustrato (malato) se usó en una concentración final de 40 mM.

A.3. Succinato:DCPIP oxidorreductasa. E.C.1.3.99.1. (Lang, et al., 1972). Para esta enzima se usaron dos aceptores el DCPIP y el metasulfato de fenazina (PMS), según las siguientes reacciones:



La mezcla de reacción contenía: (Volumen final: 1ml).

Amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4; 20 mM de succinato de sodio; 5 mM de KCN y 10 mg de membranas.

La mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se inició con la adición de los aceptores: PMS 1.1 mM y DCPIP 80 μM . Se midió la reducción del DCPIP igual que en los casos anteriores.

B. Oxidorreductasas. Ferricianuro de potasio como aceptor. (Klingenberg, 1979). Cuando se usó $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como aceptor se hicieron algunas modificaciones del método descrito para el DCPIP. La reacción de reducción del ferricianuro a ferrocianato se midió a 400 nm (CEM $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

En el caso de las NADH y malato deshidrogenasas el método

es similar al descrito para el DCPIP. pero en este caso se sustituyó el DCPIP por ferricianuro de potasio (1 mM concentración final). En el caso de la succinato deshidrogenasa se usó al PMS como mediador entre el succinato y ferricianuro y no fué necesario preincubar la enzima con el sustrato.

C. Inactivación alcalina de flavoproteínas.

Cuatro alícuotas de membranas de 3 ml cada se centrifugaron a 140.000 Xg durante 45 minutos. Las pastillas de membranas se resuspendieron en amortiguadores de fosfatos de pH 9.5, 10, 10.5 y 11, respectivamente y se incubaron a 40°C por 10 minutos. Posteriormente las membranas se centrifugaron de nuevo a 140.000 Xg durante 45 minutos y se lavaron 2 veces con amortiguador TCM.

D. Oxidasas.

D.1. NADH y malato.

Las actividades de oxidasas se midieron polarográficamente en un oxímetro Yellow-Spring a 30°C. Para todas las determinaciones el electrodo se cubrió con una membrana de teflón de alta sensibilidad.

La mezcla de reacción contenía: (volumen final 2 ml).

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4: 0.5 a 1 mg de proteína.

La reacción se inició adicionando NADH (5 mM) o malato 40 mM. (concentraciones finales).

D.2. Succinato.

El sustrato (40 mM de succinato de sodio) se incubó con las membranas por 5 minutos en presencia de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4 (volumen final 2ml), a 30°C por 5 minutos. Después del tiempo de incubación se determinó el consumo de oxígeno.

D.3. Ascorbato-TMPD.

En este caso se midió selectivamente la actividad respiratoria del sector terminal de la cadena de transporte de electrones. el TMPD (tetrametil p-fenilendiamina) es un donador casi exclusivo del citocromo c.

La mezcla de reacción contenía: (volumen final 2 ml)

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.8 o amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7; 10 mM de ascorbato y 0.1mM de TMPD.

Se registró la autooxidación del TMPD y la reacción enzimática se inició adicionando 0.5 mg de membranas.

D.4. Citocromo c oxidasa.

En este caso se usó como donador de electrones citocromo c exógeno de levadura o de caballo, según la técnica reportada en García Horsman, et al., 1990.

La mezcla de reacción contenía: (volumen final 2 ml).

Amortiguador HEPES 50 mM pH 7.4; 100 µM de citocromo c y 10 mM de ascorbato.

Se registró el consumo de oxígeno debido a la autooxidación del citocromo c. La reacción enzimática se inició adicionando 0.5 mg de membranas.

D.5. Cinética de afinidad por O₂.

La afinidad de las oxidasas por uno de sus sustratos (oxígeno) se determinó con la técnica de desaturación, midiendo la velocidad en el consumo de O₂ a diferentes concentraciones de éste, aumentado la ganancia del graficador 2, 2.5 y 2 veces sucesivamente. El medio de reacción usado dependió de la actividad que se estaba midiendo. Para la NADH oxidasa: amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4; para la misma enzima pero con atebrina, se usó amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.0. Para la TMPD oxidasa se utilizó amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8 y para citocromo c oxidasa (usando citocromo c de levadura o caballo) se usó amortiguador HEPES 50 mM, pH 7.4.

E. Inactivación de la ubiquinona.

Tres mililitros de membranas (50-60 mg de proteína de membrana) se colocaron a 10 cm de una lámpara de luz ultravioleta (250 nm), con agitación a 4°C. A tiempos establecidos se tomaron 100 µl de muestra y se midieron las actividades de NADH y TMPD oxidasas. (Escamilla y Benito, 1984).

5. ANALISIS DE CITOCROMOS.

Para determinar la composición cuali y cuantitativa de citocromos en células enteras o en membranas, se hicieron los espectros diferenciales (red VS ox) a temperatura ambiente y de nitrógeno líquido (77 K).

A. Espectros diferenciales.

Las células enteras se ajustaron a una densidad óptica (D.O) de 30, se sonicaron por 45 segundos y se registró el espectro diferencial en presencia de 0.1% de Triton X-100.

Las membranas se resuspendieron en amortiguador TCM y glicerol al 30%. Los espectros diferenciales se realizaron a temperatura ambiente en celdas de 1 cm de paso de luz y a temperatura de nitrógeno líquido (77 K) con paso de luz de 2 mm.

Todos los espectros se hicieron en un espectrofotómetro SLM-Aminco (Mod. DW-2cII).

Se usaron como reductores ditionita (unos granos) y NADH, succinato, malato (40 mM) y ascorbato-IMP. (10mM- 0.1mM). Las membranas se incubaron 20 minutos (con NADH o IMPD) y 40 minutos con (succinato y malato), antes de registrar el espectro. Como oxidante se usaron persulfato de amonio (unos granos) o aire (agitación vigorosa).

Las concentraciones de los citocromos se determinaron a partir de espectros diferenciales realizados a temperatura ambiente. Los coeficientes de extinción molar (CEM) que se usaron para cada citocromo fueron los siguientes: (Jones y Poole, 1985).

citocromo a_3	16.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (603-615 nm)
citocromo b	20.0 " " (563-575 nm)
citocromo c	19.0 " " (550-540 nm)
citocromo c'	8.5 " " (630-650 nm)

B. Complejos con CO.

Para observar específicamente a los citocromo oxidasas se hicieron los espectros de los complejos cit oxidasa reducida-CO.

Las membranas se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 1 M

pH 7, se agregó ditionita a la celda de referencia y a la de la muestra, esta última se burubujeó con CO por 3 minutos. Para determinar la cantidad de complejo oxidasa-CO se usaron los siguientes CEM: (Jones y Foole, 1985).

complejo α -CO	5.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (430-445 nm)
complejo σ -CO	170.0 " " (417-430 nm)

C. Espectros de oxidación.

En este tipo de experimentos se determinó la cantidad de citocromos que pueden ser oxidados cuando las membranas se incubaron en presencia de un inhibidor. Primero las membranas se incubaron a temperatura ambiente (20 min) con sustrato (NADH 40 mM), pasado el tiempo de incubación se agitó el tubo que correspondía a la cuveta de la referencia, las muestras se pasaron a celdas para nitrógeno líquido, se congelaron y se registró el espectro diferencial.

Esto mismo se hizo pero en presencia de KCN en la cuveta de la muestra. Después de la incubación se registró el espectro a temperatura de nitrógeno líquido.

D. Extracción de hemos. Cuantificación del cit c.

Se aprovechó la cualidad del hemo c de estar covalentemente unido a la apoproteína eliminado por extracción los demás hemos, quedando en el precipitado de proteínas solo el citocromo c.

5 ml de membranas (100 mg de proteínas) se centrifugaron a 140,000 Xg por 40 minutos. El paquete de membranas se resuspendió en 5 ml de Tritón X-100 al 2% (Tritón X-100 2%, NaCl 50 mM en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8) y se agitó por 20 minutos en baño de hielo, posteriormente se volvió a centrifugar a 140,000

Xg por 40 minutos (García-Horsman, et al., 1980). El sobrenadante se extrajo con acetona ácida (10 volúmenes de HCl en acetona, se incubó por 30 minutos con agitación ocasional (Goodhew, et al., 1986). Después de la incubación, se centrifugó a 20 K Xg por 20 minutos. En el precipitado resultante se encontró al citocromo c. Este precipitado se resuspendió en amortiguador TCM para registrar el espectro diferencial.

D.1. Piridin-hemocromos.

El sobrenadante de la última centrifugación se secó al vacío y se le agregó 1 ml de piridina. 500 μ l se colocaron en la celda de la muestra y 500 μ l en la celda de la referencia. A la celda de muestra se le añadieron 500 μ l de una solución concentrada de ditionita disuelta en KOH 0.2 N; a la celda de referencia se le agregaron 500 μ l de KOH 0.2 N y se registró el espectro diferencial de los piridin-hemocromos. (Fali, 1989).

D.2. Fraccionamiento del cit c.

Se hizo una extracción de los citocromos de las membranas de *R. phaseolis*. Se utilizaron membranas esofóbicas, fase estacionaria de la capa DEE. La extracción se hizo con Tritón X-100 al 6% (ver arriba). Después del tiempo de incubación las membranas se centrifugaron a 140 000g durante 40 minutos. El sobrenadante se diluyó 3 veces con Tritón X-100 al 0.25% y se aplicó a una columna de DEAE-celulosa. La absorbencia de los citocromos se siguió a 405 nm en un UVICORE. Se colectó la fracción que no tenía afinidad por la columna, se lavó esta con amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 8, Tritón X-100 0.25%, hasta que no hubo absorbencia a 405 nm registrada en el UVICORE. Se aplicó a la columna

amortiguador salino (Tris-HCl 25 mM pH 8, Tritón X-100 0.25%, NaCl 250 mM) y se eluyó el pico de absorbencia. Las fracciones correspondientes a este máximo de absorbencia se utilizaron para realizar la electroforesis. (García-Horsman, et al., 1990).

D.3. Electroforesis SDS.

Para la electroforesis se usó el sistema de Schägger y Von Jagow (1987). 200 µl de muestra se mezclaron con 100 µl de mezcla de digestión (SDS 10%, glicerol 30%, mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 0.005% y Tris-HCl 50 mM pH 6.8) y se incubó a temperatura ambiente de 1 a 12 horas. La composición de los geles era la siguiente:

Gel concentrador:

Tris-HCl 1M pH 8.2.

SDS 0.1%.

Acrilamida-bisacrilamida 4%-0.1%.

Gel separador:

Tris-HCl 1M pH 8.2.

SDS 0.1%.

Glicerol 13%.

Acrilamida-bisacrilamida 16%-0.47%.

Amortiguador anódico:

Tris 0.2 M pH 8.9.

Amortiguador catódico:

Tris 0.1 M, tricina 0.1 M pH 8.25. SDS 0.1%.

La electroforesis se corrió 30 minutos a 30 V seguida de 3 horas a 100 V a temperatura ambiente.

Tinciones:

Coomassie: Después de la corrida el gel se sumergió en solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%) durante 1 hora, transcurrido el tiempo, el gel se sumergió en la solución de Coomassie (ácido acético 10%, azul de Coomassie G-250 0.1%) durante toda la noche. El gel se destiñó con una solución de ácido acético al 10% por 10-20 horas. (Schägger y Von Jagow, 1987).

Bencidina: Al término de la electroforesis el gel se sumergió en una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina 1.26 mM en metanol: acetato de sodio 0.25 M pH 5 (30:70) durante toda la noche. Al término de la incubación se agregó H_2O_2 hasta una concentración de 26 mM y se incubó por 1-3 horas. Posteriormente el gel se lavó con isopropanol: acetato de sodio 0.25 M pH 5 (30:70) tres veces. (Goodhew, et al., 1986).

D. 4. Inmuno transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.

Después de correr la electroforesis en SDS, el gel se incubó en amortiguador de transferencia (Towbin, Tris-25 mM; glicina 192 mM; SDS 0.1%; metanol 20%) por 30 minutos. Posteriormente, las proteínas del gel se electrotransferieron a nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo aplicando 350 mA por 4 horas en amortiguador Towbin (1977). Como control de la transferencia un gel se tiñó con tinta china y otro se reveló con anticuerpos específicos (ver variante).

Para comprobar la especificidad de la cruzada inmunológica, se hicieron varios controles:

La inmunotransferencia se realizó con extractos crudos.

Se utilizaron proteínas control: control positivo, cruzada inmunológica con citocromo *c* de bovino y con complejo *bc₁* puro. Como control negativo, se usó albumina, para observar si había cruces inespecíficos.

Tinción del papel de nitrocelulosa con tinta china. El papel de nitrocelulosa se incubó con tinta china (0.2%) disuelta en amortiguador salino de fosfato-Tween-20 (PBS-Tween, NaCl 150 mM; Na-P 10 mM pH 7.4; Tween-20 0.1%) por 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó con PBS-Tween 0.2% por 15 minutos.

Tinción proteína A-oro. El papel de nitrocelulosa que contenía las proteínas del gel se incubó en amortiguador PBS-Tween por 20 minutos a temperatura ambiente para bloquear sitios inespecíficos. Se adicionó suero anti-citocromo *c* (dilución 1:2000) y anti-citocromo *c₁* (dilución 1:200) y se incubó por dos horas. Se lavó 6 veces con PBS-Tween 0.1% por 10 minutos. Se reveló con proteína A-oro por dos horas y se volvió a lavar con PBS y con PBS-Tween. (Towbin, et al., 1979).

6. OBTENCION DE BACTEROIDES.

Los bacteroides fueron obtenidos a partir de nódulos de 40 plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), de 21 días de edad siguiendo la técnica de Perlach, et al. (1981). El aislamiento se llevó a cabo por un gradiente de Percol (ver Fig. 6).

Los nódulos se homogenizaron en un contenedor con 12 ml de amortiguador que contenía NaCl 0.15 M; KH_2PO_4 50 mM pH 7.6 a

4°C. El homogenado se filtró a través de 3 capas de gasa.

En un tubo de 50 ml de policarbonato se colocaron: 24.5 ml percol; 3.5 ml de amortiguador NaCl 1.5 M. KH_2PO_4 500 mM pH 7.6; 7 ml de agua y 1 ml del filtrado. En estas condiciones la concentración final de percol fue 70% y $\rho = 1.09$. Se centrifugó a 48,400 Xg por 45 minutos (rotor JA-20). Los bacteroides quedaron en la fracción C (ver fig 6). éstos fueron colectados por succión con una bomba peristáltica. El percol fue eliminado diluyendo los bacteroides 1:5 con amortiguador (NaCl 0.15 M. KH_2PO_4 500 mM pH 7.6 y lavados con amortiguador TCM.

Los bacteroides fueron sonicados por 3 minutos, en pulsos de 1 minuto antes de los ensayos enzimáticos.

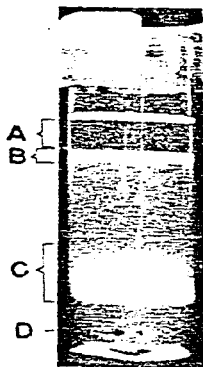


FIGURA 6. Obtencion de bacteroides de *Rhizobium phaseoli* (CFN42) usando un gradiente de Percoll. Se partio de nódulos de 21 dias de edad. Las fracciones que se obtuvieron son: A. fracción citosólica; B. restos celulares de la planta; C. bacteroides; D. precipitado de alta densidad.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. MEDIO DE CULTIVO.

Rhizobia son capaces de crecer en varias condiciones, cada una de éstas afecta la expresión cualitativa y cuantitativa de las proteínas respiratorias, entre otras enzimas. (O'Brian y Maier, 1982; 1989). Sin embargo en el caso particular de *Rhizobium phaseoli* poco se sabía acerca de la organización y regulación del Sistema Respiratorio, especialmente en vida libre. Por lo tanto, antes de empezar el estudio del Sistema Respiratorio se decidió encontrar la condición óptima de crecimiento observando el tipo de medio de cultivo (fermentable o no fermentable) que rindiera la mayor masa celular. En términos generales se ha encontrado que las especies de *Rhizobium* prefieren los medios no fermentables sobre los fermentables, además de que se han descrito diferencias significativas entre las especies de una misma cepa, por lo tanto cada cepa debe considerarse individualmente.

Las dos cepas de *R. phaseoli* (CFN42 o CED) fueron inoculadas en diferentes medios de cultivo (ver Tabla II). Los medios con fuente de carbono no fermentable fueron más eficientes en sostener el crecimiento de *R. phaseoli*. Este resultado concuerda con el reporte Brice y Hoffman, (1985), en el sentido de que las vías encargadas de la degradación de carbohidratos no funcionan adecuadamente en algunas cepas de *Rhizobium* y algunas otras tienen exigencias específicas acerca del tipo de carbohidrato que pueden utilizar.

En todos los medios fermentables que se probaron (ver Tabla II), la fuente de carbono fue la sacarosa, la cual parece no ser convenientemente degradada. En otras cepas de *Rhizobium*, se ha

TABLA II. CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO DE CULTIVO	CRECIMIENTO (DO ₅₄₀) ¹	
	CFN42	CE3
- PY (peptona, extracto de levadura, CaCl ₂)	3.5	3.7
- PY + sales* (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺)	2.8	3.0
- MG (sacarosa, extracto de levadura, fosfato monoácido de potasio, sulfato de amonio, y sales*) + hidrolizado de caseína	2.0	1.8
- Mínimo (fosfato monoácido de potasio, PH 6.8, cloruro de de amonio, sacarosa, Ca ²⁺ , Fe ³⁺ , Mg ²⁺)	0.5	0.8
-Bórico-sacarosa (Mn ²⁺ , H ₃ BO ₃ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ KI, Co ²⁺ , sacarosa, PH 6.8	0.5	0.6
-Sodio-sacarosa (Fosfato monoácido de potasio, PH 6.8; Mg ²⁺ , Na ¹⁺ ,sacarosa, extracto de levadura	1.0	1.3

1. Cultivo en matraz de 2 litros, agitación 200 rpm, 30°C

sugerido que la incapacidad de degradar la sacarosa se encuentra en la reacción de conversión de la sacarosa a fructosa 6-fosfato o en un paso posterior (Krieg y Hofman, 1986).

Por otro lado, parece haber preferencia por algunos azúcares, como el manitol, que pueden utilizarse por la vía de la hexosa monofosfato (Krieg y Hofman, 1986).

Los medios no fermentables, como el FY (peptona, extracto de levadura y calcio), produjeron el mayor crecimiento (registrado como aumento en la densidad óptica (DO₅₄₀). Esto indicaba que las cepas estudiadas (CFN42 y CED) tenían un ciclo de Krebs funcional, el cual les permitía crecer eficientemente. Tomando en cuenta estos resultados, se decidió estudiar la expresión del Sistema Respiratorio (SR) de *A. phascolii* en el medio de peptona-extracto de levadura (FY).

2. Cepa CFN42.

2.1. Expresión de citocromos a lo largo del crecimiento.

La expresión de los componentes del SR se estudió en dos cepas de *A. phascolii*, las cuales tienen un marcador de resistencia diferente. La cepa CFN42 era resistente al ácido nalidixico y la CED lo era a la estreptomicina. Cabe mencionar que era importante comparar las actividades respiratorias asociadas a cada cepa pues se ha reportado que existen diferencias en la expresión de las proteínas respiratorias entre cepas de la misma especie de *Rhizobium* (por ejemplo, Reister, et al., 1987).

Los estudios en las dos cepas de *A. phascolii* mostraron diferencias. Con la intención de dar claridad a los resultados aquí presentados, éstos se analizaron exponiendo primero aquellos referentes a la cepa CFN42. Subsecuentemente se puntualizarán las diferencias encontradas en la cepa CED, entendiéndose que las demás propiedades del SR, que no se mencionan para esta cepa, son

similares a los de la cepa CFN42.

Para conocer la expresión de los diversos componentes del SR, en especial el tipo de oxidasas que se presentaban en *R. phaseoli* (vida libre), dos factores fueron tomados en cuenta. En primer lugar, la etapa de crecimiento en el cultivo aerobio, la cual está determinada por la cantidad de nutrientes del medio y por otro lado la tensión de oxígeno.

A. Cultivo aerobio.

La bacteria se cultivó aeróbicamente hasta por 30 horas con aereación vigorosa, tomando muestras del cultivo en las fases logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria tardía para analizarse espectralmente.

En la Fig. 7A se presentan los espectros diferenciales (red VS oxidado) de cada una de las muestras (células enteras). Los espectros se realizaron a temperatura ambiente ajustando las células a una densidad óptica (DO) de 30. Posteriormente se sonicaron por 45 segundos en presencia de Tritón X-100 0.1% justo antes de correr el espectro.

Se encontró que en la fase logarítmica de crecimiento (4 a 10 horas), el citocromo a_a (pímetro a 445 y pico a 605 nm) funcionó como la oxidasa principal. Además se presentaron las señales típicas de los citocromos b (citocromo b y oxidasa b, pico 560 nm) y de citocromos c (pico a 557-558).

A partir de las 10 horas (inicio de la fase estacionaria), se comenzó a observar un hombro a 630 nm, que se hizo evidente como un pico definido de absorción en la fase estacionaria-tardía (18-30 horas de cultivo), que coincide con el pico de absorción del cit c (Hirovich, et al, 1973, entre otros). Con la inducción del citocromo c aumentó también la señal de los citocromos tipo b

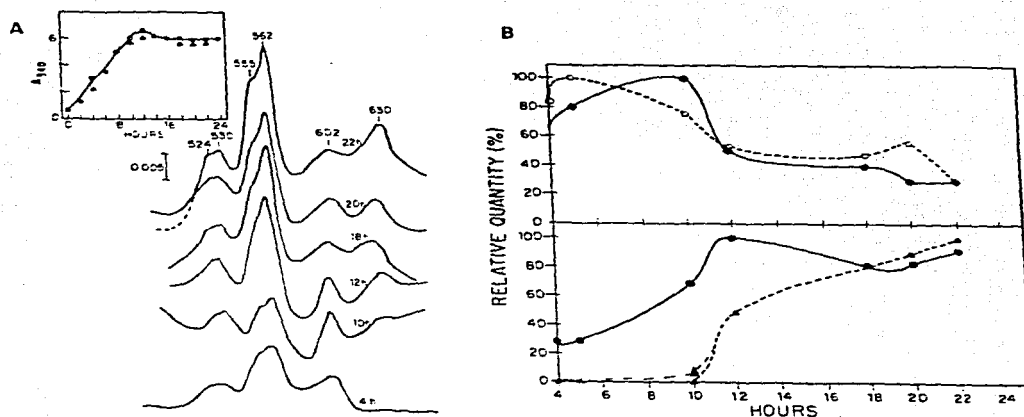


Figura 7. A. Curso temporal de la expresion de los citocromos de *R. phaseoli* (CFN42) durante el crecimiento aeróbico en medio PY. Las células fueron cosechadas en los tiempos indicados con flechas, lavadas y resuspendidas en amortiguador TCM a D.O de 30. Los células se sonicaron 45 segundos en presencia de 0.1% de Triton X-100, se redujeron con ditionita y los espectros se registraron contra la referencia oxidada con aire a temperatura ambiente.

B. Concentración relativa de citocromos a lo largo del crecimiento aeróbico de *R. phaseoli*. La cantidad relativa de citocromos se calculo a partir de los espectros de la figura 7A, usando los CEM para cada citocromo (ver Materiales y Metodos).

(pico a 560 nm).

La Fig. 7B muestra la cantidad relativa de cada citocromo con respecto a la fase de crecimiento. En términos generales puede decirse que la oxidasa aa_3 funcionó preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento y a medida que el cultivo se acercó a la fase estacionaria la concentración de la enzima disminuyó. De igual manera, el cit c funcionó preferentemente en las fases logarítmica y estacionaria-temprana.

El cit d en cambio, se encontró prácticamente ausente en el crecimiento logarítmico temprano, pero su inducción empezó en la fase logarítmica tardía, siendo su expresión máxima en la fase estacionaria-tardía; en esta etapa también hay un aumento de dos veces de los niveles de citocromos tipo b , lo cual se debió posiblemente a la síntesis de un nuevo citocromo tipo b , de manera similar que en *E. coli* (Anraku y Gennis, 1987): ver más adelante.

Es interesante notar que la oxidasa aa_3 persiste en la fase estacionaria-tardía, expresándose concomitantemente con el cit d , esto resultó interesante ya que pocas bacterias expresan ambos citocromos simultáneamente. Generalmente aa_3 se expresa junto con el citocromo c y por su parte el citocromo d es la oxidasa alterna cuando el cit c funciona en la fase aeróbica (Poole, 1983). No se conocen a la fecha los mecanismos regulatorios que operan en la expresión de estas oxidasas.

La condición de inducción del cit d , que representa el agotamiento de nutrientes en el medio coincide con lo que se ha reportado para la enzima de *E. coli* (Poole, 1989).

Para observar claramente las señales espectroscópicas de cada citocromo se hicieron el mismo tipo de espectros que los realizados con células enteras pero con membranas de la cepa CFN42 de fase logarítmica (4 horas) y de fase estacionaria-tardía.

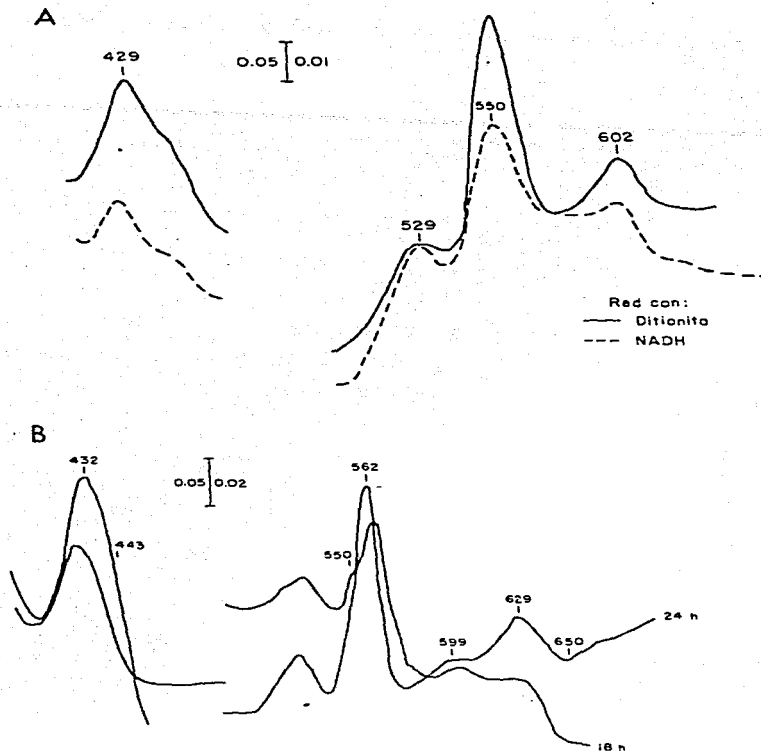


Figura B.A. Espectro diferencial (red VS ox) de membranas provenientes de cultivo aerobio, fase logaritmica de crecimiento (4 horas) de *R. phaseoli*. La muestra (5 mg de proteína membranal) se redujo con ditionita y el espectro se registró contra la referencia oxidada con aire.

B. Espectro diferencial (red VS ox) de membranas provenientes de cultivo aerobio, fase estacionaria tardía (18 y 24 h) de *R. phaseoli* (CFN42). Las muestras (5 mg de proteína membranal) se redujeron con ditionita y se registraron contra la referencia oxidada con aire.

(18-24 horas), ver Fig. 8. Se pudo observar el mismo patrón de espectros: En la fase logarítmica de crecimiento predominó la señal del cit aa_3 (pico a 603 nm) y del cit c (553 nm); en la fase estacionaria-tardía predominó el citocromo d , con señal a 630 nm, además se presentó el valle a 650 nm, que es indicativo de la presencia del cit b 575. El aumento relativo en la concentración de cit b fue evidente (560 nm).

Con estos resultados es atractivo suponer que, en *R. phaseolii*, como resultado del agotamiento de nutrientes, se formó un complejo bc_1 , como resultado del agotamiento de nutrientes en la fase estacionaria-tardía en condiciones aeróbicas. Sin embargo, se ha reportado que la inducción del cit d depender principalmente de la tensión de oxígeno en el medio. (En *E. coli*), esta enzima se induce a menos de 1 μ M. Anreku y Gennis, 1987). Esto se ha atribuido a la alta afinidad por oxígeno de la enzima (0.002 μ M, Poole, 1983), lo que indica estar especialmente diseñada para funcionar en condiciones de baja tensión de oxígeno. Se decidió determinar si el mismo patrón de regulación de esta oxidasa se presentaba en *R. phaseolii*, para lo cual la cepa CFN42 se cultivó en condiciones microaerofílicas (ver Materiales y Métodos).

B. Cultivo microaerofílico.

La Fig. 8A presenta los espectros diferenciales, usando como reductor ditionita, NADH, succinato, malato y TMPD (red VE ox) de membranas provenientes de células cultivadas microaerofílicamente. Se observó claramente la señal del cit d y el aumento en la concentración de cit b . Aunque el patrón de reducción es el mismo con todos los sustratos, la reducción del cit d que se obtiene con el TMPD es 50% menor a la obtenida con

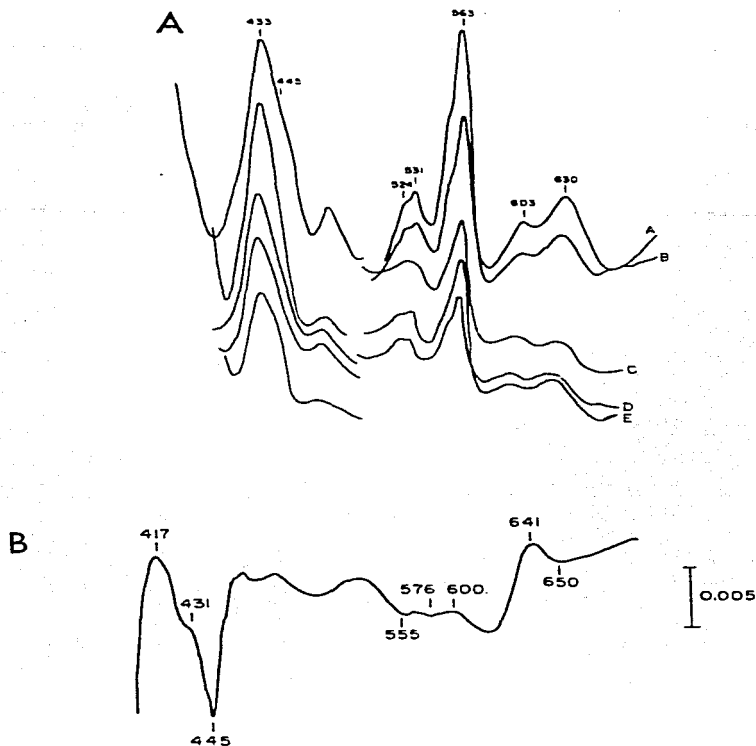


FIGURA 9. A. Patrón de reducción de los citocromos de las membranas de *Rhizobium phaseoli* (CFN42) cultivadas (72 h) en condiciones microaerofílicas en medio PY. Los espectros se realizaron de la misma forma que los espectros de la Fig.8. Trazo A, ditionita; B. NADH 5mM; C. succinato de sodio 40 mM; D, malato de sodio 40 mM; E. ascorbato-TMPD 10 mM-0.1 mM. Los espectros se registraron a temperatura ambiente.

B. Espectro diferencial de los complejos oxidasa-CO de las membranas provenientes de cultivo microaerofílico, de *R. phaseoli* (CFN42). La muestra (5 mg de proteína) se redujo con ditionita y se burbujeeó con CO por 3 minutos. El espectro se registró a temperatura ambiente contra la referencia reducida.

NADH, esto demuestra que el TMPD es mal donador para este cit *c*, (ver también más adelante). El hecho de que el cit *c* se redujera con sustratos fisiológicos es una prueba de que es una enzima funcional conectada con los demás componentes de la cadena.

Cabe mencionar que en los espectros con TMPD apareció el valle a 455 nm también se presentó en los espectros con NADH, succinato o malato (ver Fig. 9A y Fig. 13) Este valle se atribuye a la presencia de flavoproteínas; en el caso de los espectros con NADH, succinato o malato esta señal puede atribuirse a la deshidrogenasa correspondiente. Sin embargo, en el caso del TMPD, se podía sugerir la presencia de una flavoproteína en el sector terminal de la cadena transportadora de electrones. La presencia de una sustrata flavoproteína oxidasa en el SR de *A. phaseoli* se analizará más adelante.

Otra prueba indicativa de que el citocromo *c* es una enzima funcional fue su capacidad para formar complejos con CO (pico a 640 nm). En la Fig. 9B se muestra el espectro de CO, donde se pueden observar las señales de los complejos a_3 -CO (pico a 430 valle a 445 nm); a -CO (pico a 417 valle a 430 nm) y a -CO (pico a 640 nm). El complejo a -CO tiene casi el mismo máximo de absorción que la forma reducida de la enzima. (Poole, 1963). Por otro lado, en la condición microaerofílica, la señal del cit a_3 prácticamente desapareció, siendo el cit *c* la oxidasa predominante. La concentración de cit *c* (ver tabla III) es prácticamente igual en todas las condiciones de cultivo: entre 0.01 a 0.02 nmoles hemo/mg proteína; por lo que el aumento en cit *b* en microaerobiosis no fue debido a aumento en cit *c*. La Tabla III registra las concentraciones de citocromos en la etapa estacionaria-tardía y en los valores correspondientes al crecimiento microaerofílico. Hay 4 veces más citocromo *c* y *b* en microaerobiosis mientras que el cit a_3 se expresó 2 veces más

TABLA III CONCENTRACION DE CITOCROMOS DE LAS MEMBRANAS DE CELULAS AEROBICAS Y MICROAEROFILICAS de *Rhizobium phaseoli*. (CFN42)

CITOCROMO	nmol de hemo/mg de proteína		
	FASE ESTACIONARIA (b)	MICROAEROBIO (a)	a/b
b	0.23	0.6	2.60
c	0.085	0.059	0.69
α_3	0.05	0.03	0.60
d	0.113	0.20	1.80
α_3 -CO	0.07	0.02	0.28
o-CO	0.02	0.01	0.50

La concentración de los citocromos se calculó de los espectros diferenciales (red VS ox), reducido con ditionita. Los CEM utilizados se encuentran en la sección de Materiales y Métodos.

a/b es la relación entre la concentración de cit de las membranas microaerobias con respecto a las aerobias.

en el crecimiento aeróbico.

Es necesario hacer notar que en el espectro diferencial red VS oxidado de las membranas microaerofílicas (Fig. 9A), apareció un pico a 472 nm. La identidad de esta señal es incierta: se encuentra lejana a las máximas observadas para las bandas "clásicas" de los citocromos a, b ó c. Queda por averiguar a que corresponde este pico que se presenta no solo con la reducción inespecífica de ditionita sino también con sustratos fisiológicos, lo que indica su posible participación en la cadena respiratoria.

C. Actividades Respiratorias.

Se midieron las actividades respiratorias asociadas tanto a membranas aeróbicas estacionarias, como a membranas microaerofílicas. En primer lugar, se encontró que en general, los valores de actividad de las oxidases, en las membranas microaerofílicas son mayores que aquellas asociadas a las membranas aeróbicas estacionarias. El aumento fue de aproximadamente el doble con todos los sustratos utilizados, lo que sugiere que el aumento en la concentración del citocromo *c* hace mas eficiente la respiración. Por otro lado, las actividades de las deshidrogenasas prácticamente se mantuvieron constantes, lo que demuestra que estas enzimas no son un paso limitante en la actividad respiratoria (ver Table IV).

Deshidrogenasas. Se encontró actividad de NADH, succinato y malato deshidrogenasas, usando como aceptor DDPID o ferricianuro. Las diferencias encontradas usando estos aceptores se analizará posteriormente. Tomando en cuenta las actividades medidas con ferricianuro como aceptor, estas son en general, mas altas que las correspondientes oxidasas, pero la característica

TABLA IV. ACTIVIDADES RESPIRATORIAS DE LAS MEMBRANAS DE
 CELULAS CRECIDAS AEROBIA Y MICROAEROFILICAMENTE DE *Staphylococcus*
phaeodanum (CFN42).

OXIDASA ¹	AEROBIO (b)	MICROAEROFILICO (a)	a/b
NADH	300	673	2.0
Succinato	40	100	2.5
Malato	50	87	1.7
Ascorbato-TMPD	100	200	2.0
DESHIDROGENASA ²			
NADH	1200	1519	1.3
Succinato	134	134	1.0
Malato	200	250	1.3

1. La actividad esta en $\text{nat O min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

2. La actividad esta en nmoles de ferricianuro red $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

a. Celulas crecidas microaerofilicamente 72 horas.

b. Celulas crecidas aerobicamente, fase estacionaria tardia.

a/b. Relacion de actividades respiratorias del cultivo microaerofilico con respecto al aerobio.

mas sobresaliente fué que no parece haber influencia de la tensión de oxígeno sobre las actividades, pues como se observa en la Tabla IV la actividad es prácticamente la misma en el cultivo aerobio o en el microaerofílico.

Cabe hacer notar que la actividad mas importante es la de la NADH deshidrogenasa, mientras que la succinato y malato deshidrogenasas, tienen valores mas bajos de actividad. Por otro lado, no se había observado antes la actividad de la malato deshidrogenasa en esta bacteria.

La expresión y regulación del cit *d* en *R. phaseoli* parece corresponder a lo que se ha reportado para *R. japonosarum* (Kretovich, et al., 1973) y *R. trifolii* (De Hollander, 1981). El hecho de que esta enzima se induce en baja tensión de oxígeno, ha hecho especular su posible participación en la respiración de los bacteroides de *Erpobium*, donde la concentración de oxígeno es relativamente baja (« 1 atm. O'Brien y Mason, 1958) y que por lo tanto se relaciona consumiendo el oxígeno, produciendo así a la nitrogenasa. No se encontró cit *d* en los bacteroides (ver mas adelante).

A pesar de que parecía evidente la presencia de cit *d* en *R. phaseoli* en vida libre, por la aparición de su señal espectroscópica, resultó adecuado corroborar su papel como oxidasa, probando la sensibilidad a inhibidores.

D. Resistencia al KCN.

Una característica importante del cit *d* es su resistencia al KCN, por lo que se comparó la sensibilidad al KCN de membranas de

fase logarítmica de crecimiento (sin cit *d*) con las obtenidas en fase estacionaria-tardía (cit *d* presente).

La Fig. 10 presenta la titulación de la actividad respiratoria por KCN. Aquí se muestran las curvas de inhibición para la NADH oxidasa y la TMPD oxidasa. En la condición microaerofílica la NADH oxidasa fue inhibida solo al 20% por el KCN hasta concentraciones de 300 μ M (se muestra hasta 30 μ M) lo que se asocia a la presencia del cit *d*; mientras que la misma actividad de las membranas de células aeróbicas (fase logarítmica) fue muy sensible a 10 μ M hubo un 90% de inhibición. Por otro lado, con respecto a la TMPD oxidasa de las membranas microaerofílicas, se encontró que la resistencia al KCN era menor. Sin embargo, tomando en cuenta que el TMPD no es un buen reductor del cit *d* (Fig. 9), se sugiere que el TMPD es un donador poco eficiente hacia este citocromo. Por otro lado, la actividad medida en las membranas de células en crecimiento logarítmico (sin cit *d*) fue sensible a KCN, el cual inhibió hasta un 90% a 10 μ M, indicando que la ruta preferida en esta condición es hacia la oxidasa a_3 .

Por lo tanto, con respecto a la sensibilidad de la TMPD oxidasa, tanto en membranas microaerofílicas como en aeróbicas (fase logarítmica), fue la misma, se sugiere que el TMPD cede los electrones al mismo componente $\text{cyt } d \rightarrow a_3$ en los dos casos, sin la participación del cit *d*.

Por otro lado el KCN (1 μ M) produce inhibición rápida (90%) de esta actividad de la TMPD como de la NADH oxidasa aeróbica (fase log.), alrededor de 1 μ M y luego una inhibición de la actividad más lenta, esta caída lenta en actividad entre 1 y 5 μ M coincide con la 0.5 para el citocromo *a*. En preparaciones puras de a_3 solo se observa una caída rápida a 1 μ M de KCN (García-Horsman, et al 1990).

En términos generales, la NADH oxidasa fue resistente al KCN

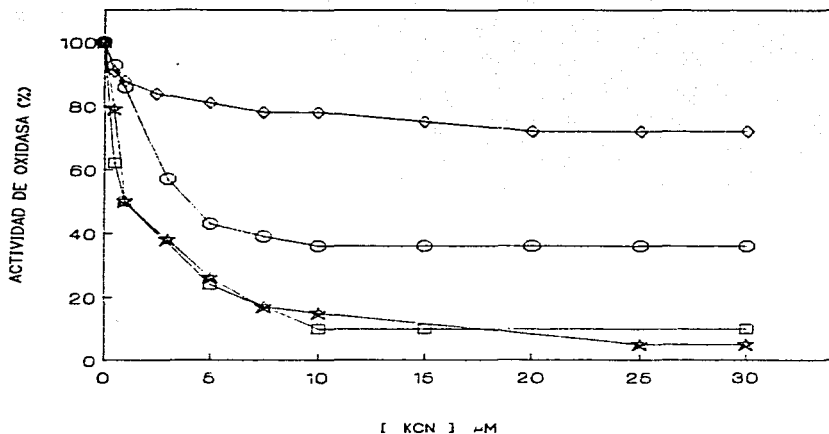


FIGURA 10. Curva de titulación con KCN de la NADH oxidasa y ascorbato-TMPD oxidasa de membranas de *R. phaseoli* (CFN42), obtenidas de células de cultivo aerobio fase logarítmica o de células de cultivo microaerofílico (1 mg de proteína de membrana). NADH 5 mM; ascorbato-TMPD 10 mM- 0.1 mM. Símbolos: \diamond --- \diamond NADH oxidasa microaerofílica; \circ --- \circ TMPD oxidasa microaerofílica; *---* NADH oxidasa aerobia; \square --- \square TMPD oxidasa aerobia.

cuando el citocromo *d* se encontraba presente. mientras que la TMPD oxidasa fué solo parcialmente resistente cuando habia cit *d*.

E. Ramificaciones del SR.

Para saber como era la secuencia del transporte de electrones. especialmente en el sector de las oxidasas se determinaron los "picos de oxidación". experimento que consistió en lo siguiente:

En dos celdas del espectrofotómetro (muestra y referencia) las membranas se incubaron con NADH hasta llegar a la anaerobiosis (20 minutos a temperatura ambiente). transcurrido el tiempo se agregó a la celda de la referencia. KCN a diferentes concentraciones y se agitó para reducir los citocromos. permaneciendo la celda de la muestra en anaerobiosis. Lo que sucedió fué que los citocromos que forman parte de una via sensible a KCN permanecerían reducidos mientras que los que pertenecian a una resistente al inhibidor se oxidaban con la agitación. En la Fig. 11 se observa que los citocromo *b* y *d* permanecieron reducidos por la adición de las bandas correspondientes. mientras que *a* y *a₃* se redujeron pues las señales son má débiles. Este experimento confirma la existencia de al menos dos vías hacia el oxígeno. una que va hacia el sector de cit *d* hasta *a₃* y otra desde un cit *b* hasta cit *a*. siendo difícil distinguir la via del citocromo *c*. Sin embargo. es probable que esta última oxidasa recibe los electrones de un cit *b* como en otros sistemas (Anraha y Gennis. 1987). aunque no fue posible definir claramente esta ruta (ver mas adelante).

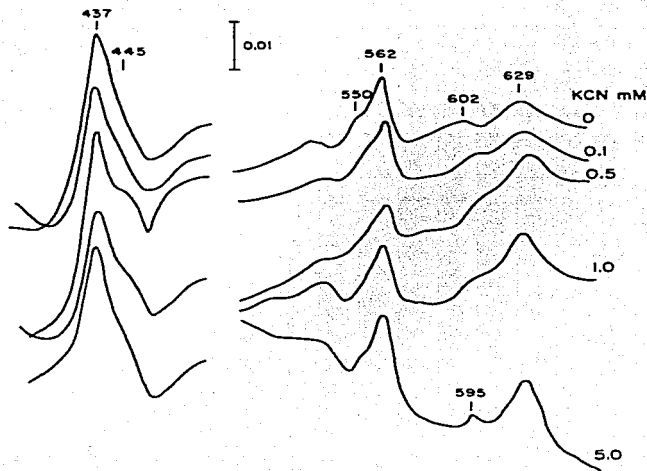


FIGURA 11. Efecto del KCN en la oxidación de citocromos de las membranas de *Rhizobium phaseoli* (CFN42) obtenidas de cultivo microaeróbico. Un mg de proteína de membrana se incubó por 20 min con NADH 5mM a las concentraciones de KCN indicadas en la figura. Después de la incubación las membranas de la referencia se agitaron vigorosamente y posteriormente, muestra y referencia se congelaron a 77 K. Los espectros se registraron a esta temperatura en presencia de nitrógeno líquido.

F. Cinética para O_2 .

Otra forma de determinar la diversidad en oxidasas del SR es la medición de la afinidad por O_2 de preparaciones membranales. Para conocer los componentes del SR que reaccionaban directamente con oxígeno, además del análisis espectral en presencia de CO, se midió el comportamiento cinético para oxígeno polarográficamente. Con estos experimentos se calcularon las constantes cinéticas por oxígeno de la NADH y TMPD oxidasas.

Existen algunas consideraciones que se deben tomar en cuenta para el análisis de los resultados obtenidos por la medición de cambios en el consumo de oxígeno. En primer lugar en cámaras cerradas usando en el electrodo tipo Clark se crea una barrera de difusión para el oxígeno alrededor del electrodo y, por tanto, las reacciones pueden depender de la difusión del oxígeno hacia este. Por otro lado, la sensibilidad del electrodo es relativamente baja (alrededor de $10 \mu M$ de O_2) y el tiempo de respuesta es lento ($\tau_{1/2} = 3$ segundos). De aquí que los datos obtenidos en el rango entre 10 y $2 \mu M$ se consideraron con reservas.

Sin embargo, como se midió la velocidad de consumo de oxígeno a lo largo de la curva de saturación (hasta $200 \mu M O_2$), los resultados son confiables si se encuentran afinidades con diferencias de más de $10 \mu M$. No obstante, los resultados de afinidad a O_2 pueden estar sobre-estimados por la limitante de la sensibilidad del electrodo, pero útiles para consideraciones cualitativas y hasta cierto punto cuantitativas.

Las membranas provenientes de crecimiento aeróbico y microaerofílico presentaron el siguiente comportamiento cinético: un componente de baja afinidad por oxígeno ($K_m \text{ app} = 72-80 \mu M$) y, dependiendo de la presencia, del cit α , un componente con $K_m \text{ app}$

= 1-10 μM ; esto utilizando NADH (Fig.12 A) o TMPD (Fig. 12B) como sustratos. En condiciones aerobias, fase logarítmica el componente con K_m app de 10 μM corresponde al valor para las oxidasas α_3 y α . Cuando el cit d estuvo presente, (ver Fig. 12 D) el valor de K_m fué entre 1 y 3 μM , lo que corresponde gruesamente a la K_m por oxígeno de la oxidasa d . Las K_m app para las oxidasas α_3 y d son 10 μM y entre 0.002-1 μM , respectivamente.

El primer componente (K_m app = 72-80 μM) es poco afín por oxígeno para tratarse de una oxidasa pues las K_m reportadas para estas enzimas están en el orden de 0.002 -10 μM (Jones y Poole, 1985). Este componente puede corresponder a una enzima diferente de una citocromo oxidasa pero que puede reaccionar con oxígeno. Haciendo una revisión, las enzimas membranales ligadas a la respiración, que pueden reaccionar con oxígeno son algunos citocromos tipo c (K_m app 20 μM) y las flavoproteínas oxidasas (Appleby, 1969a; 1984; Malström, 1982). Se decidió investigar la identidad del componente de baja afinidad por O_2 presente en nuestras preparaciones.

Lo primero que se investigó fué las condiciones de expresión de dicho componente. Dado el valor alto de K_m , inicialmente podría suponerse que la presencia de este componente se favorecía a altas concentraciones de oxígeno, por analogía con lo que se ha propuesto con relación a la regulación de las citocromos oxidasas. Para investigar esto, se determinaron las cinéticas por O_2 de membranas provenientes, tanto de cultivos microaerofílicos como de anaerobios (ver la sección de **Materiales y Métodos**).

Las membranas provenientes del cultivo microaerofílico presentaron el componente de baja afinidad por O_2 (K_m app = 75 μM), tanto con NADH como con TMPD como sustratos, además presentaron un componente con K_m = 1-3 μM que puede asociarse a la presencia de cit d .

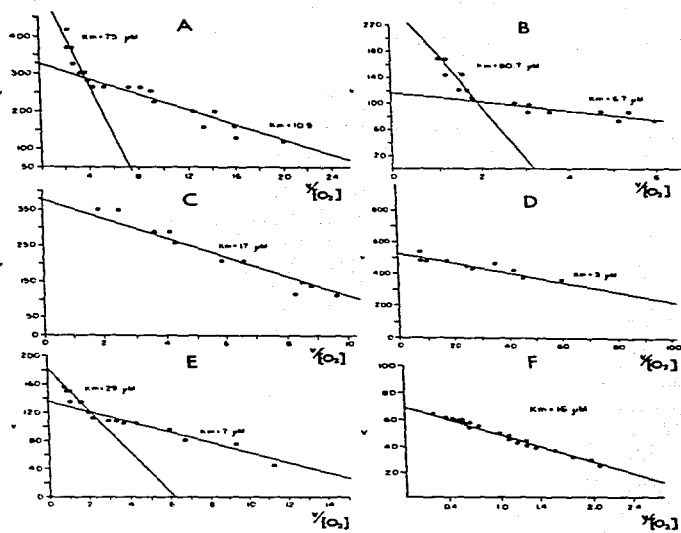


FIGURA 12. Curvas de Eadie-Hofstee de las cinéticas de desaturación por oxígeno de la NADH y TMPD oxidasas de membranas de *Rhizobium phaseoli* (CFN42). 0.5 a 1 mg de proteína de membrana se incubó en 3 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M (pH 7.4) a 30 °C (para detalles de la medición ver Materiales y Métodos).

A. NADH oxidasa. 5 mM NADH. Membranas provenientes de cultivo aeróbico, fase logarítmica.

B. TMPD oxidasa. 10 mM de ascorbato. 0.1 mM de TMPD. Membranas provenientes de cultivo aeróbico, fase logarítmica.

C. Actividad de citocromo c oxidasa. Membranas provenientes del cultivo aeróbico, fase logarítmica. 1 mg de proteína de membrana se incubó en presencia de citocromo c de levadura y ascorbato 10 mM. La actividad se determinó en amortiguador HEPES (ácido N-2-hidroxi-etil piperazina- N-2-etanosulfónico) pH 7.4.

D. NADH oxidasa. Mismas condiciones de medición que A. Membranas provenientes de cultivo anaeróbico.

E. NADH oxidasa. mismas condiciones de medición de A. Se usaron 1-5 mg de proteína de bacteroides sonicados.

F. TMPD oxidasa. Las mismas condiciones que C. pero en presencia de de atebriina 2.5 mM.

Las células cultivadas anaeróbicamente solo presentaron una K_m app por oxígeno de $2 \mu M$ usando NADH (Fig. 12D) o TMPD como sustratos. Por lo tanto el componente de baja afinidad por oxígeno se presentaba preferentemente en la condición aerobia, siendo reprimido en la condición anaeróbica como se había supuesto.

6. Inhibición con atebrina.

Para conocer la naturaleza de la enzima con K_m alta por oxígeno, se decidió probar un inhibidor de flavoproteínas, esto debido a que dicho componente podría ser una flavoproteína, pues en el espectro diferencial (red TMPD ox: aire) se observó un valle a $455 nm$, lo que sugería la presencia de una enzima de este tipo en el sector terminal de la cadena respiratoria (ver Fig. 13). Coincidió también el hecho de que en las membranas de crecimiento anaerobio, donde no se presentaba el componente de baja afinidad por O_2 , el valle en el espectro de TMPD (Fig. 13) no se presentaba.

Se probó la quinacrina (atebrina), este inhibidor se parece al anillo de isocaloxarina y por lo tanto inhibe casi selectivamente proteínas con FMN o FAD como grupo prostético (Jones, 1989). Si una flavoproteína estaba involucrada en el sector terminal del transporte de electrones, entonces tanto la NADH oxidasa como la TMPD oxidasa se debían ver inhibidas en presencia de atebrina.

La NADH oxidasa se inhibió dentro de dos rangos de concentración. Se tuvo una inhibición del 80% de 0.5 a $7 \mu M$ y de 50 a $200 \mu M$ la actividad se inhibió hasta el 90%. (ver Fig. 14A). La primera caída de actividad corresponde al rango de inhibición de la NADH deshidrogenasa (Dancey y Shapiro, 1976), mientras que

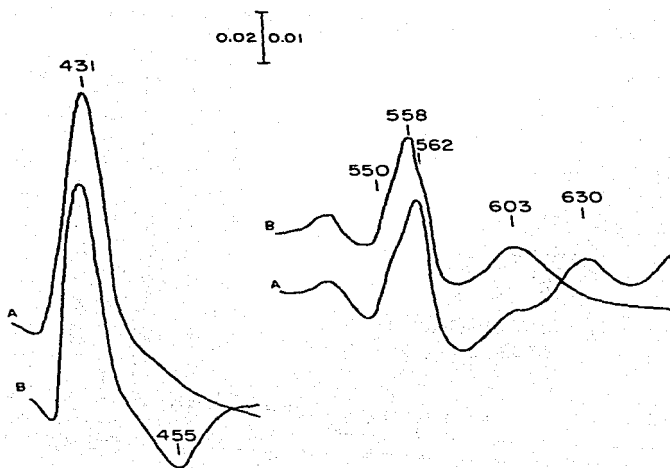


FIGURA 13. Espectros diferenciales. red VS ox de membranas provenientes de cultivo aerobio (B) y anaerobio (A) de *R. phaseoli* (CFN42). La reducción se llevo a cabo con ascorbato-IMPD (10 mM - 0.1 mM). 20 min de incubación. Notese el valle a 455 nm en el espectro de las membranas aerobias.

la actividad que se inhibe en concentraciones milimolares corresponde a la inhibición que se reportó para la flavoproteína oxidasa presente en el bacterioide de *B. japonicum* (O'Brian y Maier, 1980; 1985a,b).

Por otra parte la TMPD oxidasa (membranas de células aeróbicas) se inhibió con atebrina hasta un 50% a 2.5 mM de atebrina (ver Fig. 14B). Como control, la actividad de TMPD oxidasa de membranas de *Racillius cereus* fue insensible a la atebrina enveada en las mismas condiciones usadas con las membranas de *A. brassicajii*.

El hecho de que la TMPD oxidasa solo se haya inhibido un 50% con atebrina 2.5 mM, refleja que el TMPD puede donar electrones a la vía de la supuesta flavoproteína pero también a la vía del citocromo c.

Para observar sensibilidad mayor hacia la atebrina, es decir para observar la vía de la supuesta flavoproteína, lo que se hizo fue inhibir primero con KCN 10 μ M la vía del TMPD \rightarrow citocromo c y luego se tituló la actividad remanente con atebrina. El cianuro a 10 μ M inhibió casi al 90% la actividad de la TMPD oxidasa (membranas, fase logarítmica, sin cit. c) y por tanto el flujo de electrones del TMPD al citocromo c decreció, entonces la atebrina 2.5 mM fue capaz de inhibir el 50% lo que indica que solo se estaba titulando la oxidación hacia la supuesta flavoproteína. El nivel de inhibición en estas condiciones fue similar al obtenido con la NADH oxidasa. El siguiente experimento se realizó en un medio ácido en lugar de pH neutro, donde los mismos resultados que al usar cianuro.

Estos resultados preliminares sugirieron que el componente de baja afinidad por oxígeno podría ser una flavoproteína, la cual surge utilizar NADH o TMPD como sustratos.

Los cultivos anaerobios (Fig. 12D) no mostraron el componente

de baja afinidad y además no hubo inhibición con atebriina de la TMPD oxidasa, lo que confirma el hecho de que la supuesta flavoproteinooxidasa solo se presenta en cultivos aerobios.

Para comprobar que el componente sensible a atebriina de la actividad de TMPD-oxidasa correspondía a la inhibición del componente de baja afinidad, se realizó la cinética de O_2 para la TMPD oxidasa en presencia de atebriina 2.5 mM la cual debía de presentar un componente de alta afinidad correspondiente a los citocromos oxidases. En la fig. 12F, se muestran los resultados obtenidos, que están de acuerdo con lo esperado, es decir solo se obtuvo un componente que correspondía a las citocromo oxidases (14 μ M).

Los experimentos subsiguientes se hicieron con el propósito de investigar algunas propiedades de esta probable flavoproteína.

H. Inactivación alcalina.

En términos generales, las flavoproteínas pueden inhibirse casi irreversiblemente en medios básicos a 40-50°C (Benito, 1982), por lo que se decidió observar si la flavoproteína oxidasa era inactivada en estas condiciones para posteriormente medir la actividad de TMPD oxidasa dependiente de la vía del citocromo c y la oxidasa a_3 .

Se encontró que la NADH oxidasa se inactivó solo hasta a pH 11, lo cual refleja cierta resistencia de las flavoproteínas del sistema (ver Fig. 12G). La inactivación alélica en otras bacterias muestra actitudes más sensibles al tratamiento, i.e. la NADH oxidasa de *S. cerevisiae* se inactivó a pH 9 (Benito, 1982).

La caída observada en la actividad de la NADH oxidasa de *R. phaseolii* (CFN42 ó CED) se atribuyó a la inactivación de la NADH deshidrogenasa (NADH:DCPIR oxidoreductasa), la cual se inactiva de manera similar que la oxidasa (Fig. 15 B). Por otro lado, con

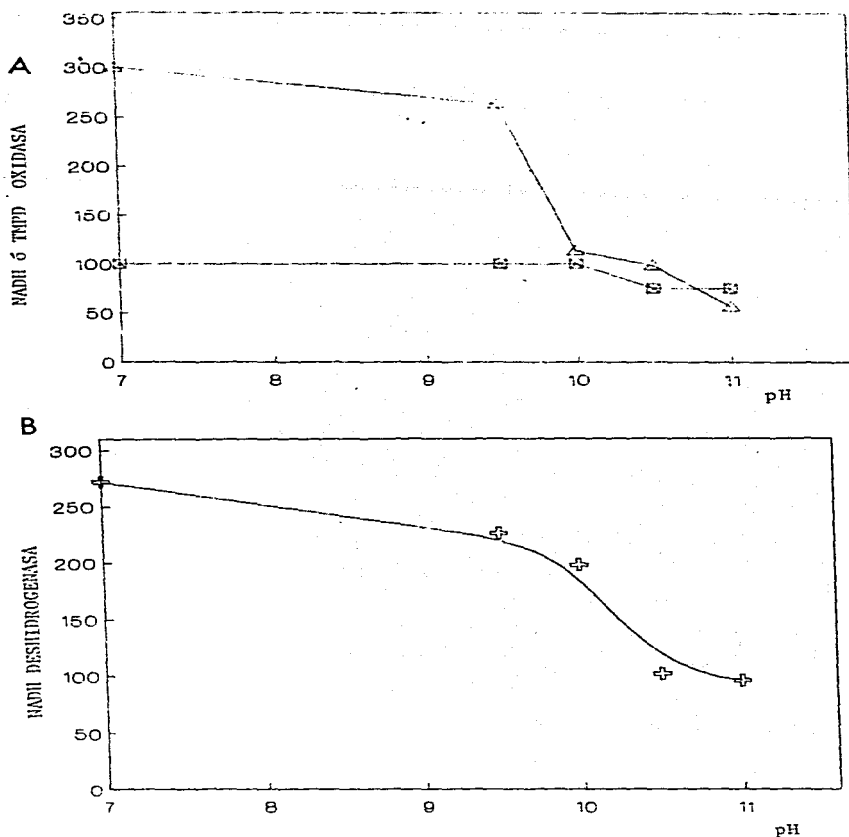


FIGURA 15. Inactivación alcalina. Actividad remanente de las actividades respiratorias después de la incubación a 40°C a los pH indicados en las figuras.

A. Efecto de la inactivación alcalina sobre las NADH y ascorbato-TMPD oxidasas de las membranas aerobias, fase estacionaria de *A. phaseoli* (CFN42). La actividad de las dos enzimas fue determinada polarográficamente (n at O/min/mg proteína). Símbolos: Δ --- Δ , NADH OXIDASA; \square --- \square , TMPD OXIDASA.

B. Efecto de la inactivación alcalina sobre la NADH deshidrogenasa (medida con DCPIP) de las membranas aerobias, fase estacionaria de *A. phaseoli* (CFN42).

Para detalles de la inactivación alcalina, consultar **Materiales y Métodos**. Las actividades se midieron a 30°C y pH 7.4. ver **Materiales y Métodos**.

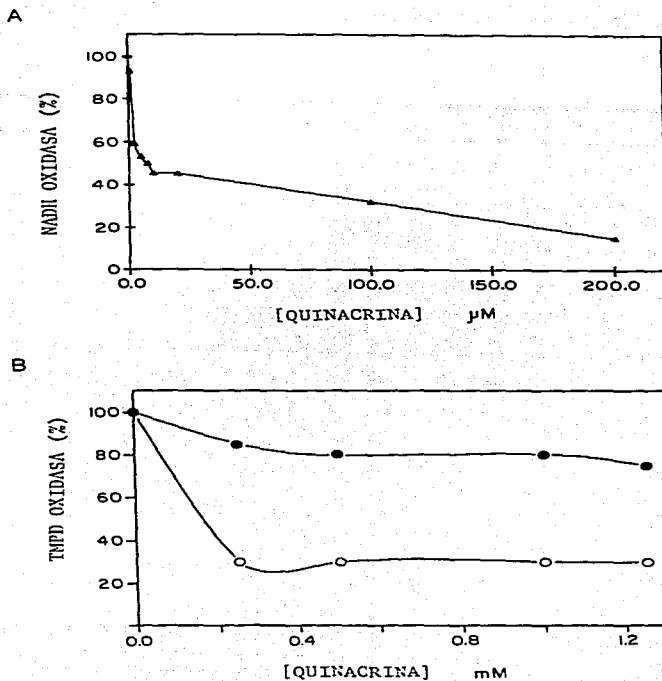


FIGURA 14. Curva de titulación con quinacrina de la NADH oxidasa (A) y ascorbato-TMPD oxidasa (B) de membranas de *R. phaseoli* (CE3) obtenidas de células de cultivo aerobio fase estacionaria (1 mg de proteína de membrana). NADH 5 mM; ascorbato-TMPD 10 mM- 0.1 mM. La quinacrina se disolvió en amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Para la Fig. B: ●---● solo atebrina; ○---○ atebrina en presencia de KCN 10 μM.

el tratamiento alcalino, la actividad de la TMPD oxidasa cayó apenas un 30% (ver Fig.15A) y además al repetir la cinética de oxígeno con las membranas tratadas (pH 10, 40°C, 10 minutos) volvió a presentar el componente de baja afinidad. Por lo tanto, podemos suponer que el comportamiento de la enzima de baja afinidad no es sensible al tratamiento. Entonces, estos resultados indican que, en primer lugar, las flavoproteínas del SR de *R. phaseolus* son relativamente resistentes al tratamiento y por otro lado, la posibilidad de que la inactivación alcalina dependa de que tanto la enzima se encuentre expuesta. Posiblemente solo la NADH deshidrogenasa está expuesta y por lo tanto es más sensible. Como control se hicieron los espectros diferenciales de las membranas tratadas y no se encontró efecto deletéreo en los citocromos.

I. Sustratos.

Dado que la enzima de baja afinidad por O_2 podía utilizar NADH o TMPD como sustratos se hicieron dos tipos de experimentos: curva de sustrato para el NADH, pues no se sabe si los electrones pasaban por la deshidrogenasa de NADH en su ruta hacia el O_2 por medio de la suuesta flavoproteína o si esta última era capaz de oxidar al NADH directamente, si éste último fuera el caso, entonces, se esperaría observar al menos dos afinidades por NADH, la correspondiente a la NADH deshidrogenasa y otro que podría ser atribuido a la flavoproteína-oxidasa.

Por otro lado se probó si el TMPD era el donador directo de la Fp o el cit c funcionaba con intermediario entre el TMPD y la enzima.

Curva de sustrato para NADH. Se determinó el comportamiento cinético de la NADH oxidasa frente a uno de sus sustratos (NADH) a concentración constante de oxígeno. La Fig.16A muestra la representación de Hofstee de esta curva para las membranas aeróbicas. Se puede observar la presencia de dos componentes: $K_m\text{ app} = 16\ \mu\text{M}$, la cual corresponde a la reportada para la NADH deshidrogenasa de *E.coli* (Dancey y Shapiro, 1976). La otra componente ($K_m\text{ app} = 76\ \mu\text{M}$) se puede atribuir a la Flavoproteína oxidasa. El comportamiento se repitió con membranas intactas o sonicadas previamente, lo que eliminó la posibilidad de tener vesículas cerradas que podrían estar causando el aumento en el valor de K_m para la NADH deshidrogenasa. Esto sugiere que solo existen dos enzimas con diferente afinidad al NADH o que es una sola enzima dos afinidades. De acuerdo con lo reportado (Dancey y Shapiro, 1976), las NADH-deshidrogenasas tienen un solo sitio para NADH, lo que sugiere, por tanto, que muy probablemente se tienen dos enzimas: una, la NADH deshidrogenasa, con mayor afinidad y otra enzima (la flavoproteína) con una afinidad menor.

Citocromo c. Como se encontró que la supuesta flavoproteína era capaz de oxidar el TMPD, resultó interesante investigar si se tenía un citocromo tipo c como intermediario entre el TMPD y la oxidasa, puesto que este donador (el TMPD) tiene un potencial de 260 mV, adecuado para reducir este tipo de citocromos. Entonces lo que se hizo fue determinar la cinética de oxígeno usando como sustrato ferrocitocromo c de levadura. Si la flavoproteína oxidaba el citocromo c, entonces podríamos observar el componente de baja afinidad por O_2 . En la Fig.12C se presenta la gráfica de Hofstee, donde se puede ver solo una componente con $K_m\text{ app} = 17\ \mu\text{M}$. Esto indica que el citocromo c no funciona como donador de la Fp y que posiblemente la enzima pueda recibir electrones

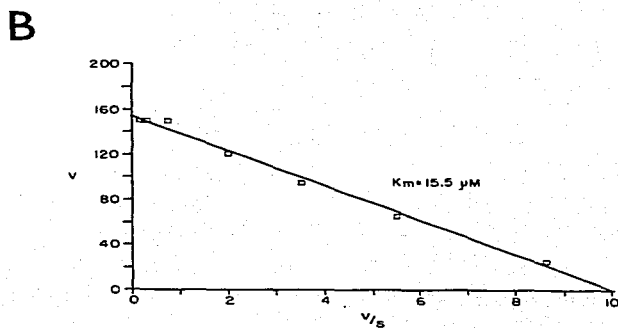
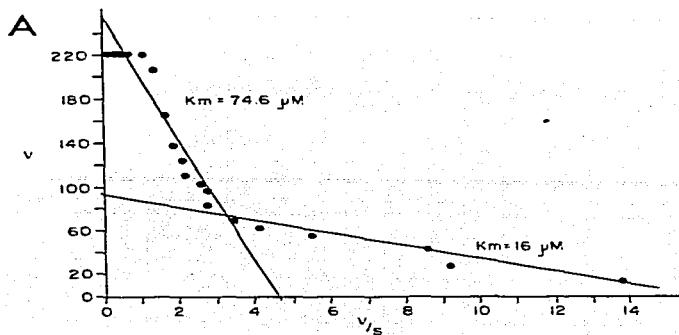


FIGURA 16. Representación de Eady-Hofstee de la curva de sustrato (NADH) de la NADH oxidasa de *Rhizobium phaseoli*.

A. Membranas provenientes del crecimiento aeróbico (CFN42). (1 mg de proteína membranar).

B. Curva de los bacteroides. Los bacteroides obtenidos de nódulos de 21 días de edad, se sonicaron por 3 minutos antes de medir la actividad. (5mg de proteína).

directamente del TMPD. Sin embargo, existe la posibilidad de que otros cit c puedan ser donadores y no el de levadura con se ha observado en otros sistemas (O'Brian y Maier, 1983; 1985a; Probst, et al.1979).

J. Fotoinactivación.

Con los resultados obtenidos se podía sugerir la existencia de una Fp de alto potencial capaz de reaccionar con oxígeno, usando TMPD y preferentemente NADH como sustratos. Lo que faltaba por corroborar era si la enzima estaba conectada con los demás componentes del SR. Una forma de hacerlo era determinando si la ubiquinona servía como intermediario en el transporte de electrones desde NADH hasta la "flavoproteína".

Para esto se inactivó selectivamente a la ubiquinona (UQ) de la cadena con luz ultra-violeta (260 nm). Si la NADH oxidasa se inhibía por completo, entonces la UQ estaba participando, si no, el componente resistente tenía que ser sensible a quínezina. La Fig.17 muestra el comportamiento de la NADH oxidasa de las membranas irradiadas (aerobias y anaerobias). Las membranas aerobias, a 2 horas de irradiación la actividad cesó un 70%, siendo la actividad remanente sensible a atetrina 2.5 µM. esto indicaba que al destruir la ubiquinona el flujo de electrones hacia el oxígeno era debido únicamente a la vía de la putativa flavoproteína, por lo tanto, se puede sugerir que la ruta de los electrones desde el NADH hacia la supuesta flavoproteína, es una ruta alterna que no está conectada al sistema cíclico. Las membranas anaeróbicas, donde no se presentaba la supuesta flavoproteína, fueron totalmente inactivadas por la luz ultra-violeta al cabo de 2 horas de irradiación (Fig. 17).

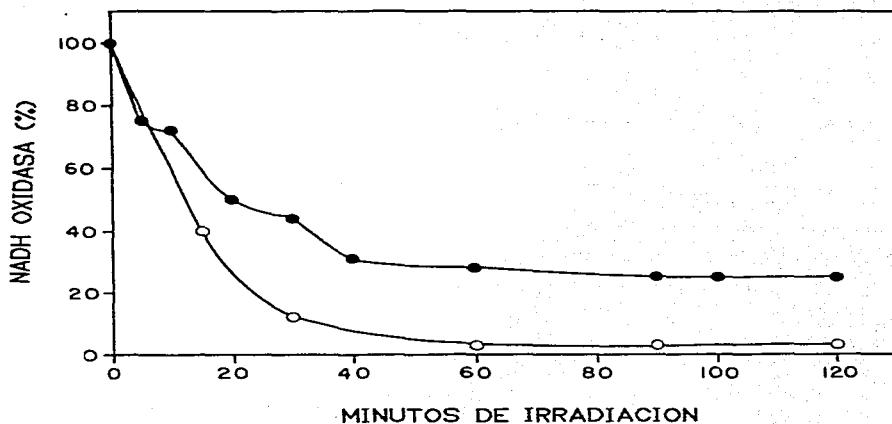


FIGURA 17. Curva de foto-inactivación con U.V. de la actividad de NADH oxidasa en membranas de *Rhizobium phaseoli*. Las membranas se irradiaron con luz ultra-violeta (360nm) por el tiempo indicado y la actividad se midió igual que en los casos anteriores. ●---● Membranas provenientes del crecimiento aeróbico, fase estacionaria (CFN42). ○---○ Membranas provenientes del cultivo anaeróbico.

K. Aceptores. Las flavoproteínas oxidasas pueden reaccionar con aceptores artificiales como el ferricianuro y en mucho menor medida el DCFIP (Massey, *et al.*, 1969). Por otro lado, se había observado que al medir las deshidrogenasas con DCFIP los valores de las actividades (especialmente el de la NADH deshidrogenasa) eran menores a los valores de las oxidasas (ver Tabla V). Lo que se esperaba era que el valor de las deshidrogenasas fuera por lo menos igual al de las oxidasas. Esto indicaba que el DCFIP no estaba funcionando adecuadamente como aceptor. Se decidió entonces, utilizar como aceptor al ferricianuro, encontrándose que la actividad de la NADH deshidrogenasa (en membranas aerobias y microaerofilicas) fué 6 veces mayor con respecto a la actividad obtenida con DCFIP, y 2 veces mayor que la actividad de la oxidasa (NADH).

Las membranas anaerobias y los bacteroides, que no presentaban el componente de baja afinidad por O_2 . (ver mas adelante) presentaron la misma actividad de NADH deshidrogenasa con cualquiera de los dos aceptores (DCFIP o ferricianuro). Con estos resultados se puede confirmar que la Fp se presenta en la fase aeróbica, vida libre, siendo capaz de utilizar al ferricianuro como aceptor y no DCFIP.

L. Citocromos b y c.

Hasta este punto del trabajo se había considerado especialmente la actividad de las oxidasas, faltaba por resolver el tipo de cit c y b que contenía la cadena respiratoria de *R. phaseolii*. Los espectros diferenciales revelaban la presencia de citocromos tipo b, los cuales impedían observar claramente la señal de los cit tipo c.

La expresión de los citocromos tipo b, estuvo fuertemente

TABLA V. RELACIONA DE ACTIVIDADES DE DESHIDROGENASAS USANDO DCPIP O FERRICIANURO DE POTASIO COMO ACEPTORES DE LAS MEMBRANAS DE *Rhizobium phaseoli*.

A. *R. phaseoli* (CE3). Crecimiento aeróbico³.

ACEPTOR:

<u>SUSTRATO</u>	<u>DCPIP</u> ¹	<u>FERRICIANURO</u> ²	2/1
NADH	115	672	6.0
Succinato	56	69	1.2
Malato	---	---	---

B. *R. phaseoli* (CFN42). Crecimiento aeróbico³.

ACEPTOR:

<u>SUSTRATO</u>	<u>DCPIP</u> ¹	<u>FERRICIANURO</u> ²	2/1
NADH	200	1200	6.0
Succinato	85	134	2.0
Malato	80	200	3.0

C. *R. phaseoli* (CFN42). Crecimiento microaerofilico⁴.

ACEPTOR:

<u>SUSTRATO</u>	<u>DCPIP</u> ¹	<u>FERRICIANURO</u> ²	2/1
NADH	228	1519	7.0
Succinato	85	134	2.0
Malato	80	250	3.0

D. *R. phaseoli* (CFN42). Crecimiento anaerobio⁵.

ACCEPTOR:

<u>SUSTRATO</u>	<u>DCPIP</u> ¹	<u>FERRICIANURO</u> ²	2/1
NADH	376	443	1.0
Succinato	36	60	2.0
Malato	94	256	3.0

E. Bacteroides de *R. phaseoli* (CFN42)

ACCEPTOR:

<u>SUSTRATO</u>	<u>DCPIP</u> ¹	<u>FERRICIANURO</u> ²	2/1
NADH	265	310	1.1
Succinato	--	--	--
Malato	--	--	--

1. n moles DCPIP red $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

2. n moles $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ red $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

3. Cultivo aerobio, fase estacionaria tardía.

4. Cultivo microaerofílico, 72 horas (ver Materiales y Métodos).

5. Cultivo anaerobio o estático, 72 horas (ver Materiales y Métodos).

2/1 Relación entre las actividades determinadas con ferricianuro con respecto al DCPIP.

influenciada por la fase de crecimiento en la condición aeróbica o en condiciones microaerofílicas (ver Fig.7.8 y 9). Es decir existe inducción de cit *b* paralelamente a la inducción de cit *d*. Probablemente los cit *b* que se sintetizan son el *b-558* (valle 550 nm, espectro red VS ox. Fig.9), y el *b-595*, de manera similar al complejo *bd* que se sintetiza en *E.coli*. (Poole,1983).

Como ya se mencionó, dado que existe una alta concentración de los cit tipo *b* (pico a 560 nm, espectro red VS ox) era difícil cuantificar en estos espectros la cantidad real de cit *c* (550-540 nm). Pero aprovechando la característica de los citocromos tipo *c*, de tener el hemo covalentemente unido, resultaba factible, en condiciones desnaturalizantes, estudiar los cit *c*, tanto espectralmente como electroforéticamente. Entonces se decidió hacer una extracción con acetona Ácida (ver **Material y Métodos**). Se utilizaron membranas de las siguientes condiciones: de células provenientes de a) cultivo aerobio, fase estacionaria; b) cultivo microaerofílico.

Con el tratamiento de extracción con acetona Ácida, las proteínas se desnaturalizan y precipitan, quedando en el sobrenadante los grupos hemo de los citocromos *a*, *b* y *d* y en el precipitado todas las proteínas, incluyendo los citocromos tipo *c* con su hemo covalentemente unido. El precipitado se redisolvió en amortiguador TCM y se hizo el espectro diferencial red VS oxidado. (ver Fig.18). Los tres tipos de membranas dieron el mismo tipo de espectro, picos a 419 y 553 nm, habiendo el doble de cit *c* en la condición aerobia. Con este espectro se pudo cuantificar la cantidad real de cit *c* de cada tipo de membrana (ver Tabla III).

Como control, para observar la integridad del resto de hemos, se hicieron los piridin-hemocromos. (ver Fig.18B). Se encontró que los hemos de los cit tipo *a*, *b* y *d*, fueron

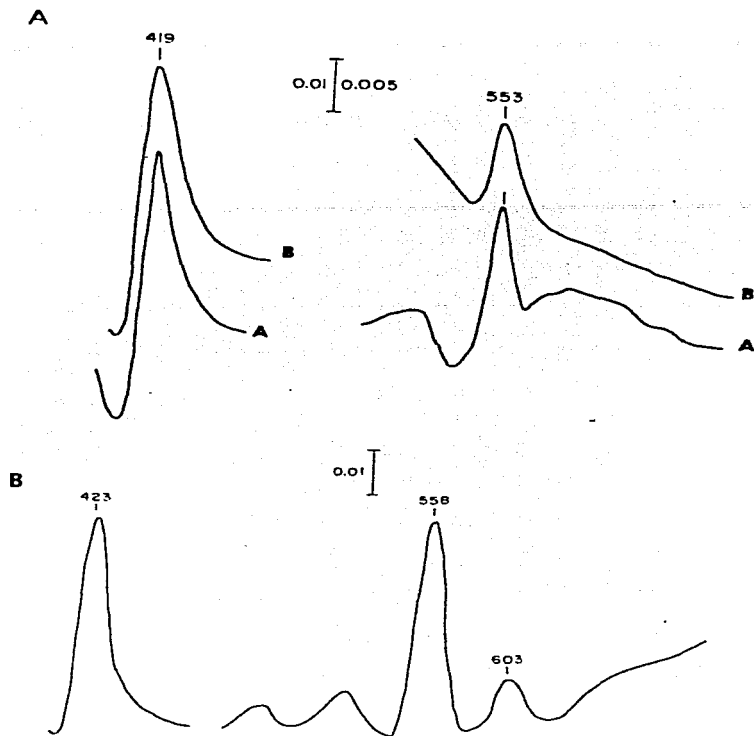


FIGURA 1B. A. Espectro de absorción de los citocromos tipo c de membranas de *Rhizobium phaseoli*. Las membranas se extrajeron con acetona-ácida (ver la sección de Materiales y Métodos) y el precipitado se redisolvió en amortiguador TCM y se registró el espectro diferencial. Trazo A. señal del cit c proveniente de las membranas aerobias (CFN42 o CE3). Trazo B. señal del cit c proveniente de las membranas microaerofílicas (CFN42). B. Piridin-hemocrogénos. El sobrenadante de la extracción con acetona-ácida (ver Material y Métodos) se secó. Se separó en dos porciones, a una de ellas se preparó como la referencia para el espectro agregando piridina y KOH, a la otra se le agregó piridina y ditionita disuelta en KOH y se registró el espectro a temperatura ambiente. Se muestra el espectro correspondiente a las membranas aerobias (CE3).

solubilizados y eran funcionales para formar los piridín-hemocromógenos.

Estos datos indicaban la presencia de cit. c, posiblemente c_1 , (por el máximo de absorción a 553 nm), pero no decían mucho acerca del tipo de cit. c. Se decidió entonces, determinar el peso molecular del citocromo c para confirmar el tipo de cit. que se tenía. Para esto se preparó una fracción enriquecida de cit. c de la siguiente forma: (para los detalles, ver **Materiales y Métodos**).

Las membranas se extrajeron con Tritón X-100 al 6% en NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8. El sobrenadante de la extracción se diluyó tres veces y se aplicó a una columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) equilibrada con Tritón 0.5%, Tris 50 mM pH 8, seguido de un gradiente salino (0 a 100 mM de NaCl), similar a lo reportado por García-Horsman, *et al.*, 1990. Las fracciones con señal de cit. c se colectaron y reextrajeron con acetona-ácida. El precipitado redisoluelto en amortiguador SDS se aplicó a una electroforesis en presencia de glicerol y SDS. La electroforesis se corrió por duplicado, un gel se tiñió con azul de Coomassie y el otro con bencidina (ver Fig. 19).

Sorprendentemente el gel teñido con bencidina reveló 3 bandas (PM 21, 29 y 32 kDa, respectivamente). Ninguna coincidía con la banda de cit. c de levadura (PM 12 kDa). Para explicar esto existían dos posibilidades. La primera, que se tuvieran 3 clases diferentes de cit. c (posiblemente c_1 , por el PM, pues el PM de los cit. c_1 está entre 28-32 kDa; Inöny-Mayer, *et al.*, 1989; van Veseveld y Kosma, 1987) o la segunda, que hubiera degradación proteolítica de un citocromo c, resultando dos fragmentos que mantuvieran el hemo unido. Para determinar el tipo de cit. c al que correspondía cada banda, un gel del extracto de acetona-ácida (mismas condiciones, arriba señaladas), se transfirió a papel de

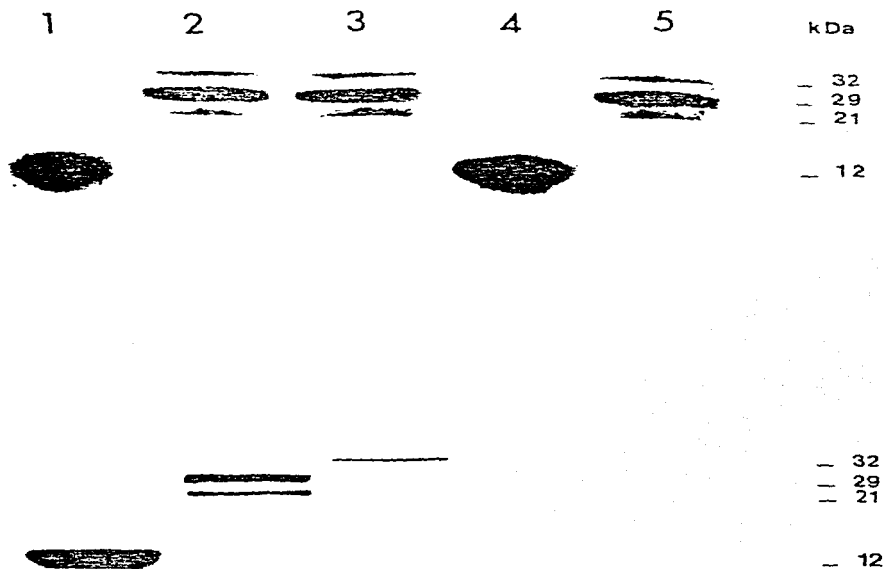


FIGURA 19. A. Electroforesis en SDS teñida con bencidina (ver Materiales y Métodos) de la fracción enriquecida de citocromo *c* y luego extraída con acetona ácida. ver Materiales y Métodos. Carriles 1 y 4: Citocromo *c* de levadura. Carriles 2, 3 y 5: Bandas correspondientes a cit *c* de *R. phaseoli* (CE3), crecimiento aeróbico.

B. Transferencia a nitrocelulosa. Los carriles 1 y 2 fueron decorados con anti-citocromo *c* de bovino (dilución 1:2000). los carriles 3 y 4 con anti-citocromo *c* de bovino (dilución 1:200).

nitrocelulosa (ver Material y Métodos) y hizo la cruzada inmunológica con anticuerpos contra cit c y cit c_1 de mitocondrias de corazón de bovino.

Como se puede ver en la Fig. 19 B, la banda de 32 kDa cruzó con anti-cit c_1 , mientras que las otras dos (21 y 29 kDa respectivamente) cruzaron con anti-cit c. Este experimento confirma la existencia de al menos un citocromo c_1 . Con respecto a las bandas que cruzaron con anti-cit c, los pesos moleculares encontrados son altos en relación a lo que se ha reportado para citocromos tipo c. Por otro lado, en *Paracoccus denitrificans* se ha encontrado 4 tipos diferentes de citocromos tipo c unidos a membrana (14, 22, 30 y 45 kDa), la síntesis de estos depende fuertemente de la tensión de O_2 en el medio (Versavelo y Bosma, 1987). En el caso de *F. phaseola* la banda de 29 kDa fue la más abundante y posiblemente las otras dos bandas (21 y 32 kDa) pertenecen a citocromos a cuya expresión sea menor en la fase aerobia. Otra explicación es que se formaron dímeros de cit c, los cuales no son digeridos por SDS, y posiblemente la banda de 21 kDa fue producto de degradación de la banda de 29 kDa. Sin embargo, los mismos resultados se obtuvieron haciendo la electroforesis de membranas frescas (obtenidas en presencia de PMSF), de solubilizado membranar en presencia de PMSF y además de diferentes lotes.

Por otro lado, en *F. denitrificans*, un citocromo c (22 kDa), coincide con una de las bandas, la de 21 kDa, se reportó como aceptor electrónico del complejo bc_1 . Esta proteína parece ser la misma que se sintetiza en *F. denitrificans* (α -SDS) que copurifica con el complejo bc_1 . (Berry y Trumpower, 1988).

Puede decirse entonces que el SD de *F. phaseola* contiene al menos dos tipos diferentes de cit c, citocromo c (el donador del cit aa_3) y cit c_1 , éste último probablemente sea parte del

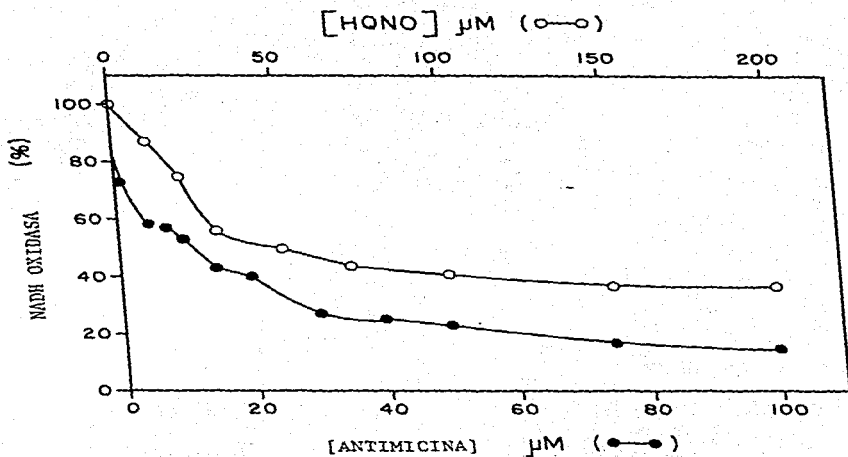


FIGURA 20. Curvas de inhibición con antimicina y HQNO de las membranas provenientes del crecimiento aeróbico de *Rhizobium phaseoli* (CE3). Se usaron de 1-5 mg de proteína de membrana, y las condiciones de medición se señalan en la sección de Materiales y Métodos. Los inhibidores se disolvieron en DMSO, siendo este inocuo en los volúmenes que se agregaron a las membranas. ○---○ HQNO; ●---● Antimicina.

complejo bc_1 (ver adelante) como lo sugiere el hecho de que en una fracción del gradiente salino de la cromatografía de afinidad se obtuviera una mezcla casi equimolecular de cit b y c , lo que concuerda con el aislamiento de este complejo en otras bacterias.

Complejo bc_1 . Para averiguar si había un complejo bc_1 funcional en las membranas de *R. phaseolii* se probó el efecto de la antimicina y el HONO. Se tituló la actividad de la NADH oxidasa de las membranas aerobias y microaerofilicas con ambos inhibidores. En la Fig. 20 se muestran las curvas de inhibición (membranas aerobias), encontrándose que la actividad cae a un 50% con 15 μM de antimicina y 50 μM de HONO, lo que coincide con otros sistemas (O'Brien y Maier, 1985a,b; 1989). Este resultado fue sugerente de la presencia de un complejo bc_1 funcional que se expresa durante el crecimiento aerobio de *R. phaseolii*. Queda por contestar como se regula la expresión de este complejo en las formas diferenciadas de *R. phaseolii*.

2.2. Bacteroides.

Dado que se han reportado diferencias significativas entre la expresión del SR en vida libre y bacteroides, se hizo el análisis de las actividades respiratorias asociadas a los bacteroides maduros, para compararlas con los datos obtenidos de la bacteria crecida en vida libre. Se aislaron bacteroides (ver Material y Métodos), provenientes de nódulos de 21 días de edad. Los bacteroides se espicaron por 5 minutos antes de medir las actividades.

A. Deshidrogenasas, DCFIP o Ferricianuro como aceptores.

Se ha reportado que los ácidos dicarboxílicos como los sustratos más eficientes en sostener la respiración de

bacteroides de diferentes especies de *Rhizobium* (O'Gara, et al, 1989), lo que nos hizo buscar que actividades de deshidrogenasas contenían los bacteroides, buscando en especial la actividad de la succinato deshidrogenasa. Solo se encontró actividad de NADH deshidrogenasa en los bacteroides. (ver Tabla V), los cuales fueron efectivos en la fijación de nitrógeno. Queda, por lo tanto, por investigar si los bacteroides de *R. phaseoli*, o los de ésta cepa (CFN42), en particular, utilizan al α -cetoglutarato y/o a la sacarosa como sustratos respiratorios en lugar del succinato o malato.

Se probaron como aceptores para la determinación de la NADH deshidrogenasa, tanto el DCFIP como el ferricianuro; esto se hizo con la misma idea que se tenía en los experimentos con membranas de células crecidas en vida libre, es decir, se había encontrado a una supuesta flavoproteína oxidasa en el crecimiento aeróbico (ver arriba). El ferricianuro podía reaccionar con dicha enzima, mientras que el DCFIP no, lo que se reflejaba en una diferencia de 6 veces la actividad entre los dos aceptores.

En los bacteroides, se encontró prácticamente el mismo valor de actividad con cualquiera de los aceptores utilizados. (ver Tabla V), lo que sugiere la ausencia de la supuesta flavoproteína.

Sin embargo, en bacteroides de *B. japonicum* se encontró una flavoproteína que funciona como oxidasa terminal utilizando al hidrógeno como sustrato. (O'Brian y Maier, 1983).

Se decidió buscar a la flavoproteína que se había encontrado en el crecimiento aeróbico, pensando en que ésta pudiera funcionar de manera similar a la Fp de *B. japonicum*, realizando los siguientes experimentos:

B. Cinética de O_2 .

La Fig. 12E muestra la cinética de oxígeno, usando NADH como sustrato, la cual presentó dos componentes. Uno con K_m app de $29 \mu M$ y otro con K_m app de $7 \mu M$. El primer componente fué difícil de interpretar, pero puede tratarse de un cit c que funcione como oxidasa. Esto coincide con el hecho de que en el espectro de CO se observó un valle a 553 nm , atribuible al complejo cit c-CO (ver mas adelante, y Fig. 21). La K_m app de $7 \mu M$ puede asociarse con la presencia del cit c como lo muestra el espectro de CO (Fig. 21 B). Por lo tanto, cinéticamente no se encontró al componente de baja afinidad, identificado como una supuesta flavoproteína.

C. Inhibición con atebрина y curva de NADH.

La TMPD oxidasa del bacteroide, fué insensible a atebрина lo que comprueba la ausencia de una flavoproteína oxidasa, como la que se encontró en vida libre, crecimiento aeróbico.

Al construir la curva de sustrato, utilizando NADH (Fig. 16 B), ésta solo mostró un componente (K_m app = 15.5 mM), que corresponde al valor encontrado para la NADH deshidrogenasa en membranas de células de vida libre (Fig. 16 A). Por lo tanto, la Fp-oxidasa no se encontró en los bacteroides, demostrándose que la enzima está restringida al crecimiento en vida libre en condiciones aerobias. Faltaría por investigar si existe alguna Fp-oxidasa en el bacteroide que utilice hidrógeno y no NADH como sustrato.

D. Análisis espectral.

El espectro diferencial red VS oxidado, mostró que el

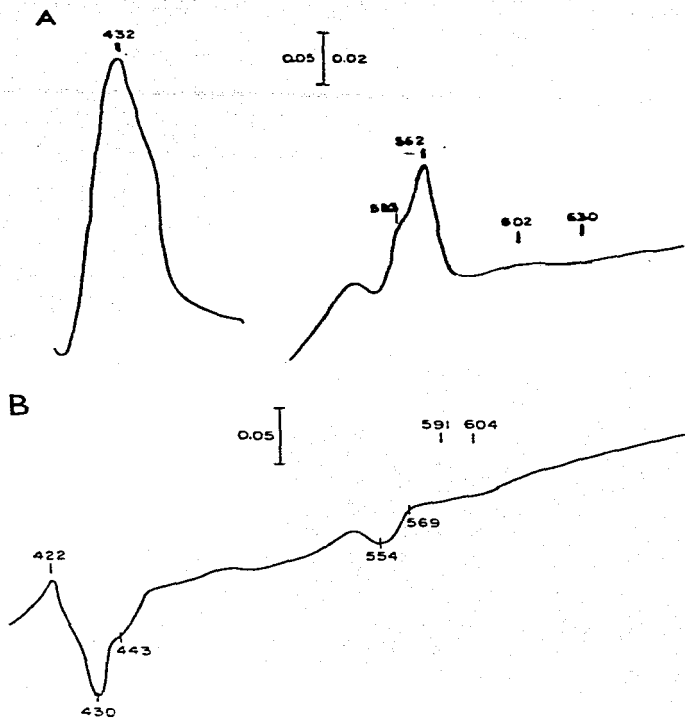


FIGURA 21. A. Espectro diferencial (red VS oxidado T.A) de bacteroides (10 mg) de *Rhizobium phaseoli* (CFN42). Los bacteroides se sonicaron por 3 minutos. La muestra se redujo con ditionita y el espectro se registró contra la referencia oxidada con aire.

B. Espectro diferencial de los complejos oxidasa-CO de los bacteroides de *R. phaseoli* (CFN42). La muestra (10 mg de proteína) se redujo con ditionita y se burbujeó con CO por 3 minutos. El espectro se registró a temperatura ambiente contra la referencia reducida.

bacteroide tiene citocromos *b* y *c*, principalmente, prácticamente no hubo señal de las oxidasas aa_3 , ni del cit *d*.

Por otro lado, en el espectro de CO, se detectaron la presencia del cit *a*, (pico a 417, valle a 430 nm); una señal muy pobre de cit aa_3 ; y un cit *c* (valle a 553 nm) capaz de reaccionar con CO, que podría funcionar como oxidasa terminal (ver Fig. 21).

El hecho de no haber encontrado a los cit aa_3 y cit *d* en los bacteroides, revela que factores adicionales a la tensión de oxígeno regulan la expresión de los citocromos.

Una secuencia propuesta del transporte de electrones para los bacteroides se encuentra en la Fig. 24.

3. Cepa CE3.

Dado que existen reportadas diferencias significativas en la expresión de complejos respiratorios de diferentes cepas de la misma especie de *Rhizobium*, se comparó el patrón de regulación de citocromos que se presentaba en la cepa CFN42, con el correspondiente al de la cepa CE3. Esta cepa proviene de la misma cepa madre que la primera pero la diferencia radica en su resistencia a estreptomidina, a diferencia de la resistencia al ácido nalidixico de la cepa CFN42.

La cepa CE3 se cultivó aeróbicamente hasta fase estacionaria tardía. Se encontraron importantes diferencias en esta cepa. En primer lugar en condiciones aeróbicas (fase estacionaria-tardía), la cepa CE3 no tuvo actividad de anillo deshidrogenasa, y no presentó señal de absorción del cit *d* como se ve en la Fig. 22A, (espectro red VS ox). El espectro mostró los picos de absorción del cit aa_3 y pudo observarse mejor la señal del cit *c* (pico a 553 nm), la cual se distinguió del pico de los cit tipo *A* (560

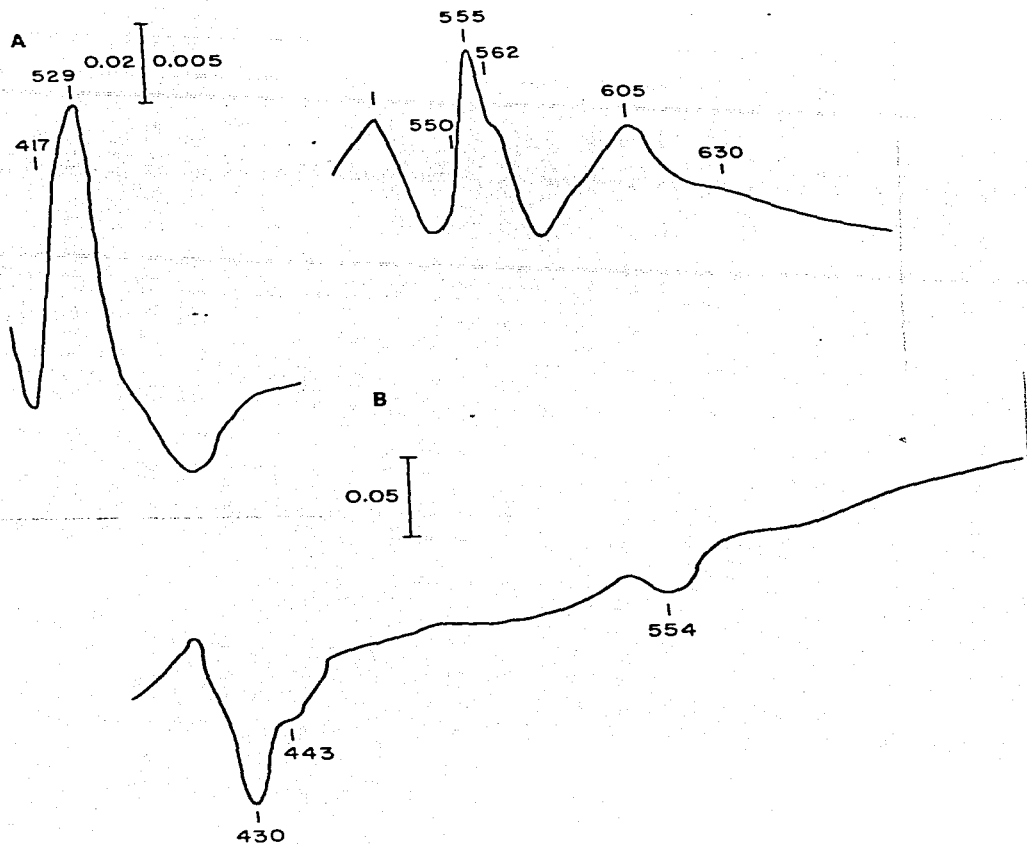


FIGURA 22. A. Espectro diferencial (red VS ox) de membranas provenientes de cultivo aerobio, fase estacionaria de *R. phaseoli* (CE3). Las muestras (5 mg de proteina membranar) se redujeron con ditionita y los espectros se registraron contra la referencia oxidada con aire.

B. Espectro diferencial de los complejos oxidasa-CO de las membranas provenientes de células de cultivo aerobio, fase estacionaria de *R. phaseoli* (CE3). La muestra (5 mg de proteina) se redujo con ditionita y se burbujeó con CO por 3 minutos. El espectro se registró a temperatura ambiente contra la referencia reducida.

nm).

En cuanto a los espectros de CO, (Fig. 22B) estos revelaron la presencia de la oxidasa que ya se habían detectado en el espectro red VS oxidado, ($\alpha\alpha_3$) y además se encontró la señal característica del cit *c*, con respecto a este citocromo, se encontró que su concentración fué mayor en esta cepa (0.06 nmoles hemo. mg^{-1} contra 0.01 - 0.02 en la cepa CFN42 en las mismas condiciones). Puede decirse, en este caso, que el agotamiento de nutrientes (fase estacionaria) elevó la concentración del cit *c*.

A. Actividades respiratorias.

Por otro lado las actividades respiratorias (condición aerobia, fase estacionaria) (NADH, succinato y TMPD oxidasas) fueron prácticamente iguales a las actividades de la cepa CFN42 en crecimiento logarítmico (sin señal de cit *d*). Sin embargo, la cepa CE3 resultó útil para distinguir claramente el citocromo donador de la oxidasa $\alpha\alpha_3$ e inferir el posible donador del cit *c*.

Para esto se hicieron los espectros de los picos de oxidación (ver Fig. 23 A), se encontró que los citocromos *c* y $\alpha\alpha_3$ tuvieron un comportamiento paralelo frente a KCN, entre 1 y 50 μM , mientras que los citocromo tipo *b* permanecieron oxidados hasta 50 μM de KCN, demostrando la resistencia de esta vía. Estos datos sugieren que $\alpha\alpha_3$ recibe los electrones del cit *c* mientras que *c* posiblemente de un citocromo tipo *b*.

B. Inhibición con KCN.

Cabe mencionar que el patrón de inhibición de las actividades respiratorias para la cepa CE3 (condición aerobia,

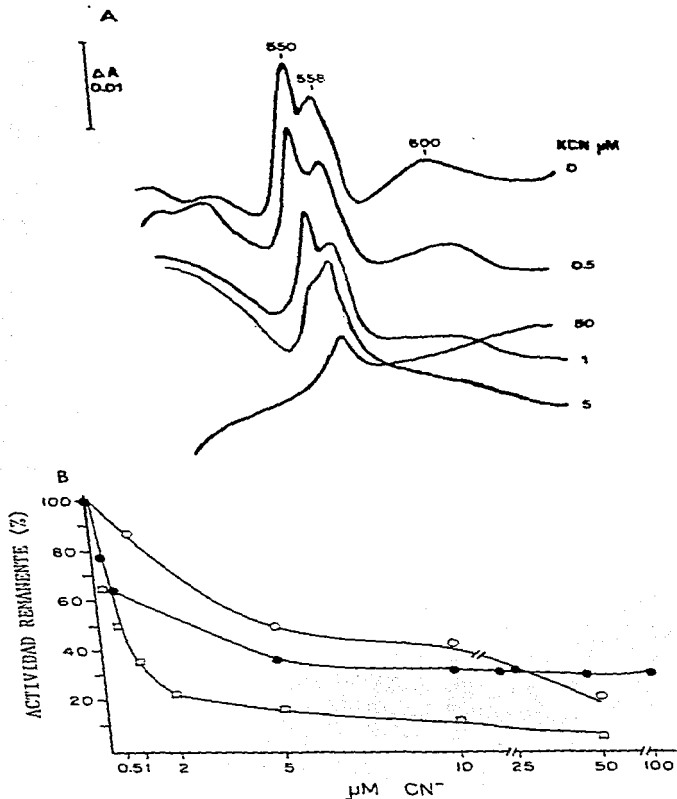


FIGURA 23. A. Efecto del KCN en la oxidación de citocromos de las membranas de *Rhizobium phaseoli* (CE3) obtenidas de cultivo aeróbico. Un mg de proteína de membrana se incubó por 20 min con NADH 5mM a las concentraciones indicadas de KCN. Después de la incubación las membranas de la referencia se agitaron vigorosamente y posteriormente, muestra y referencia se congelaron a 77 K. Los espectros se registraron a esta temperatura en presencia de nitrógeno líquido.

B. Curvas de titulación de KCN de la NADH, succinato y ascorbato-TMPD oxidasas de membranas de *R. phaseoli* (CER), obtenidas de células de cultivo aeróbico fase estacionaria (28 horas). (1 mg de proteína de membrana), NADH 5 mM; ascorbato-TMPD 10 mM- 0.1 mM. Símbolos: □---□ NADH oxidasa; ○---○ Succinato oxidasa; ●---● TMPD oxidasa.

fase estacionaria) por KCN tuvo algunas diferencias con el patrón obtenido para la cepa CFN42 (fase logarítmica, es decir sin cit d). La NADH oxidasa resultó ser más sensible al KCN que la TMPD oxidasa, a 10 μ M de KCN de la NADH oxidasa queda el 15% de actividad remanente, mientras que de la TMPD oxidasa queda el 30%. (Fig. 23B), para lo que no se tiene una explicación satisfactoria.

La cepa CEE presentó el componente de baja afinidad por oxígeno, de forma análoga a lo descrito para la otra cepa (CFN42). Del mismo modo, los resultados de las actividades respiratorias, excepto malato deshidrogenasa y el análisis de los citocromos A y c fueron los mismos.

En resumen, se tienen dos cepas con propiedades similares en la expresión del SF. Sin embargo, pudieron detectarse diferencias con respecto las actividades de malato deshidrogenasa y oxidasa y citocromo c. Una posible explicación de las diferencias entre las dos cepas es que la cepa CEE fue seleccionada por su resistencia a estreptomicina (un aminoglicósido) y la resistencia a este tipo de antibiótico ha sido asociada a cambios en expresión en el SF de algunas bacterias. Esto se reportó en *S. subtilis*, donde la expresión de la oxidasa a_3 y citocromos, en general, se vio afectada negativamente. De hecho, en *S. subtilis* se ha utilizado la selección de mutantes resistentes a aminoglicósidos como una estrategia para obtener mutantes en componentes del SF (Mueller y Taber, 1980).

Con todos los resultados obtenidos, se puede proponer una secuencia del transporte de los electrones para *S. passiflora* en vida libre y compararlo con algunos resultados que se tienen de la expresión de citocromos y actividades en el bacterioide.

DESHIDROGENASA. Se encontró actividad de 3 deshidrogenasas

diferentes: para NADH (sensible a quinacrina y rotenona), succinato y malato, siendo la primera la actividad más importante. La actividad de malato deshidrogenasa solo se presentó en la cepa CFN42, lo cual concuerda con la variación reportada para la utilización de sustratos entre cepas de *Rhizobium* (Saroso, et al. 1984).

Las actividades de las deshidrogenasas no parecen estar afectadas por la etapa de crecimiento ni por la tensión de oxígeno en el medio, lo que demuestra en parte que no son el factor limitante de la actividad de la cadena respiratoria.

Por otro lado fué interesante encontrar que en el bacterioide solo se pudo detectar actividad de NADH deshidrogenasa. No obstante valdría la pena investigar si existen otros sustratos, como ácidos dicarboxílicos, que se han reportado como los sustratos preferidos de los bacterioides (Saroso, et al. 1984). Finan, et al., 1983).

UBIQUINONA. Se puede suponer que *R. phaseoli* contiene ubiquinona como quinona móvil, pues *R. leguminosarum* y *R. trifolii*, que son especies relacionadas con *R. phaseoli*, contiene ubiquinona. Además, en general las bacterias Gram (-) contiene solamente ubiquinona (O'Brain y Maier, 1989).

CITOCROMOS b y c. El citocromo b (pico a 560 nm, espectro red VS cb) es el más abundante en todas las condiciones probadas y su expresión estuvo fuertemente influenciada por la expresión del cit c, cuando se induce la síntesis de cit c se induce también la síntesis de el menos un cit b (cit b-585, que se traslapa con la señal de aa₃, valle a 650 nm).

El citocromo c parece ser preferentemente sintetizado en fase aerobia junto con la oxidasa aa₃, ha medida que la concentración de la oxidasa disminuye en la fase estacionaria (cultivo aerobio), también disminuyó la concentración de cit c.

Parece haber dos tipos de citocromo c : c_1 y c_2 . Posiblemente el cit c_1 sea parte del complejo bc_1 y el cit c sea el donador del cit a_3 . No obstante, es posible la existencia de un tercer citocromo c cuyo origen y posición relativa en la cadena respiratoria se tendría que definir.

OXIDASAS. Las enzimas responsables de reducir oxígeno en el SR de *R. rhazesolii* fueron fuertemente influenciadas por la fase de crecimiento (cultivo aerobio) o por la disminución en la tensión de oxígeno (cultivos microaerofílico a estático).

En las fases logarítmica y estacionaria temprana del crecimiento aeróbico predominó la oxidasa a_3 , y la supuesta flavoproteína oxidasa (esto en ambas cepas, CFN42 y CE3). En la fase estacionaria tardía y en los cultivos microaerofílicos y anaerobio de la cepa CFN42, predominó la expresión de la oxidasa d , la cual permitió la máxima expresión del transporte de electrones. En la condición microaerofílica el cit d funcionó como la oxidasa terminal más importante, con una baja contribución de la oxidasa a_3 .

Con respecto a la oxidasa c , en la cepa CFN42, esta enzima se expresó constitutivamente, pues se encontró prácticamente la misma concentración en todas condiciones de cultivo empleadas.

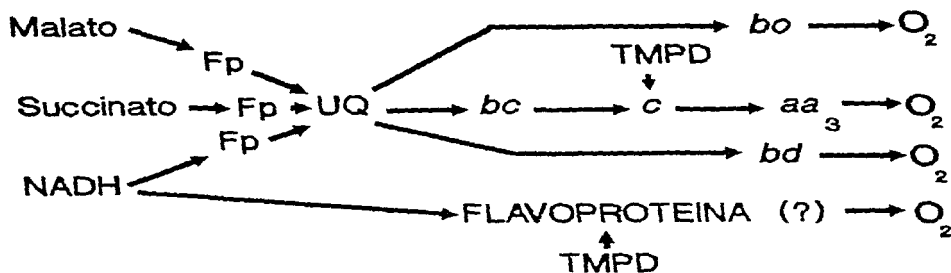
En la cepa CE3, hubo un aumento en la concentración de cit c en la fase estacionaria (cultivo aerobio) y no hubo inducción de la oxidasa c , esto significa un mecanismo de regulación de las oxidases diferentes en las dos cepas. En la cepa CE3 la oxidasa c parece funcionar en condiciones en que se induce el cit d en la cepa CFN42.

Además de las citocromo oxidasas se encontró un componente no-citocrómico capaz de reaccionar con oxígeno, el cual puede sugerirse como una flavoproteína. Esta enzima parece ser exclusiva

del crecimiento aeróbico, lo cual concuerda con su poca afinidad por oxígeno. No existe evidencia de su presencia en el bactericida, al menos usando NADH como sustrato, no sabemos si exista una FP capaz de utilizar hidrógeno como en el caso de los bactericidas de *B. japonicum* (O'Brian y Maier, 1988a,b). Especulando un poco, se puede decir que esta enzima pudiera servir como verdadero de poder reductor (NADH). Es decir, en el crecimiento aeróbico, los niveles del NADH aumentan, por lo tanto, la supuesta flavoproteína oxidasa se encargaría de consumirlo. La concentración de NADH en otras bacterias (*B. cereus* y *E. coli*: Setlow, 1983; Andersen and Meyerberg, 1977) se encuentra entre 0.1 y 0.2 mM, este rango de concentración coincide con la Km reportada para NADH de la enzima en nuestro sistema.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede proponer la secuencia en el transporte de electrones de *Rhizobium phaseoli* en vida libre (Fig. 24). Cabe indicar que faltarían experimentos por realizar para conocer como se regulan los niveles de citocromos por una fuente de carbono fermentable; para conocer que deshidrogenasas pueden sintetizarse y como se regula su síntesis; como se regula la expresión del complejo bc_1 y si esta regulación se parece de algún modo a la que opera en *B. japonicum* (Thöny et al., 1989).

A.



B.

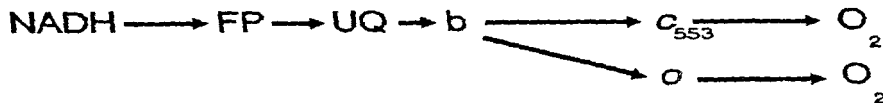


FIGURA 24. A. Esquema propuesto para el transporte de electrones en vida libre de *Rhizobium phaseoli*. Este esquema corresponde a los datos obtenidos en las cepas CFN42 y CE3 de *Rhizobium phaseoli*.

B. Esquema del transporte de electrones de los bacteroides de *Rhizobium phaseoli* (CFN42).

PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en este trabajo abren varias preguntas acerca de la regulación de la expresión de los diversos componentes del SR de *R. phaseoli*.

Fuente de carbono. Las células de *R. phaseoli* se cultivaron en una fuente de carbono no fermentable, donde el crecimiento resultó mas adecuado. Sin embargo, no se sabe como se regulan las actividades respiratorias por sustratos fermentables. En primer lugar se tiene que buscar el tipo de carbohidrato mas adecuado para sostener el crecimiento de *R. phaseoli*. Un buen candidato es el manitol, el cual parece ser el que puede mantener el crecimiento de varias especies de *Rhizobium*. Se deben encontrar cambios en las actividades de las deshidrogenasas, ya que en la mayoría de las bacterias (ver Jones, 1989), estas enzimas estan fuertemente influenciadas por la fuente de carbono (Ingledeu y Poole, 1984).

Por otro lado cabe preguntarse como cambian las actividades de éstas enzimas durante la diferenciación de *R. phaseoli*, pues aquí solo se encontró actividad de NADH deshidrogenasa en los bacteroides. En otras especies de *Rhizobium*, la actividad mas importante de deshidrogenasa corresponde a la de succinato, de hecho el succinato parece ser la fuente de carbono mas importante del fotosintato (Finan, et al., 1980; Postgate, 1987).

Otra pregunta que queda por resolver es el efecto de fuente de carbono fermentable en la expresión de citocromos, especialmente en la expresión de las oxidasas. Se ha encontrado en otras bacterias que la expresión de las diferentes oxidasas puede modificarse de acuerdo al tipo de fuente de carbono y nitrógeno con las que se cultiva a la bacteria (Escemilla, et al., 1987;

Poole, 1983).

Con respecto a los diferentes citocromos tipo *c* que se observaron se necesita en primer lugar, definir la identidad de cada uno de ellos, pues aquí solo fué sugerida. En segundo lugar, se tiene que responder como se regula su síntesis y es probable que a diferentes tensiones de oxígeno en el medio se tenga una especie de cit *c* en particular, como ocurre en *F. denitrificans* y otras bacterias (Van Verseveld y Bosma, 1987; Thöny, et al., 1989).

En el caso de la supuesta flavoproteína oxidasa, se tienen datos indirectos de su existencia, por tanto lo que sigue por hacer es purificarla, al menos parcialmente para observar sus propiedades, y concluir sobre su identidad, pues en las preparaciones de membranas, aquí analizadas, no fué posible distinguir sus propiedades espectrales (solo se observa el valle característico a 450 nm en los espectros diferenciales como TMPD, Fig. 16). Por último, cabe mencionar que este trabajo abrió la posibilidad de plantear preguntas que finalmente conducirán a entender los cambios ocurridos durante la diferenciación de *F. phaeodis*, de vida libre a bacterioide.

REFERENCIAS

- Andersen, K.B., and von Meyerberg, K. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**: 4151-4156.
- Anraku, Y. and Gennis, R.B. (1987). *TIBS.* **12**:262-266.
- Appleby, C.A. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* **172**:71-87.
- Appleby, C.A. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* **172**:88-105.
- Appleby, C.A. (1984). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**:443-478.
- Appleby, C.A., Turner, G.L. and Macnicol, P.K. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* **387**:461-474.
- Au, D.C.T., Lorence, R.M., and Gennis, R.B. (1985). *J. Bacteriol.* **161**:123-127.
- Barquera, B., Garcia-Horsman, J.A., and Escamilla, J.E. (1990). *Archives of Microbiol.* submitted.
- Benito Mercade, M.C. (1982). Tesis de Maestria. Facultad de Quimica. UNAM.
- Bergersen, F.J. and Turner, G.L. (1980). *J. Gen. Microbiol.* **11**:235-252.
- Berry, E.A. and Trumpower, B.L. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**:2458-2475.
- Carter, K. and Gennis, R.B. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**:10986-10990.
- Chakrabarti, S., Mianne, A.K. and Chakarabarti, P.K. (1987). *Current Microbiol.* **15**:165-170.
- Ching, T.M., Hadtke, S. and Newcomb, W. (1977). *Plant Physiol.* **60**:771-774.
- Colins, R.D. and Jones, D. (1981). *Microbiol. Rev.* **45**: 316-354.
- Dancey, G. and Shapiro, B.M. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**: 5921-5928.
- De Hollander, J.A. (1981). Tesis Ph.D. Vrije Universiteit, Amsterdam.

- De Hollander, J.A. and Stouthamer, A.H. (1980). *Eur. J. Biochem.* **111**: 473-478.
- De Vrij, W., Azzi, A. and Konings, W.N. (1983). *Eur. J. Biochem.* **131**: 97-103.
- Döbereiner, J. and Pedrosa, F.O. (1987). En "Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plant. 24-26 pp. Science Tech. Publishers, Madison, Wisconsin.
- Escamilla, J.E. and Benito, M.C. (1984). *J. Bacteriol.* **160**: 473-478.
- Escamilla, J.E., Ramírez, R., del Arenal, I.F., Zarzoza, G. and Linares, V. (1987). *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3549-3555.
- Falk, J.E. (1969). B.F.A. Library. Vol. 2. 181-185pp.
- Finan, T., Wood, J.M. and Jordan, D.C. (1983). *J. Bacteriol.* **154**: 1403-1413.
- Gallon, J.R. (1981). *TIBS.* (January). 19-23.
- García-Horsman, J.A., Barquere, E., González-Halphen, D. and Escamilla, J.E. (1990). *Mol. Microbiol.* in press.
- Gennis, R.F., Casey, R.F., Azzi, A. and Ludwig, E. (1982). *Eur. J. Biochem.* **125**: 189-195.
- Ghisla, S. and Messet, V. (1989). *Eur. J. Biochem.* **181**: 1-17.
- Goodhew, C.F., Brown, N.R. and Pettigrew, G.W. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* **852**: 289-294.
- Haltia, T., Roustinien, A. and Finel, M. (1988). *Eur. J. Biochem.* **172**: 543-546.
- Hamilton, W. (1969). En "Bacterial Energy Transduction". (C. Anthony, ed). 13-151 pp. Academic Press, London.
- Harold, F.M. (1986). En "The Vital Force: a Study of Bionergetics". pp. W.H. Freeman, New York.
- Hoffman, P.S., Morgan, T.V. and Der Vartanian, D.V. (1979). *Eur. J. Biochem.* **100**: 19-22.
- Humbek, C. and Wanner, D. (1987). *Current Microbiol.*

- 14:259-262.
- Ingledeu, W.J. and Poole, R.K. (1984). *Microbiol. Rev.* **48**: 222-271.
- Jaworowski, A., Campbell, H.D., Poules, M.I. and Young, I.G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2041-2047.
- Jones, C.W. (1988). En "Bacterial Energy Transduction". 1-82 pp. Academic Press, London.
- Jones, C.W., Brice, J.M., Wright, V. and Ackrell, B.A.C. (1973). *FEBS Lett.* **29**:77-81.
- Jones, C.W. and Poole, R.K. (1985). En "Methods in Microbiology". (Ed. G. Gottschalk), Vol.18. 285-328 pp. Academic Press, London.
- Keister, D.L., Marsh, S.S. and El Mokadem, M.T. (1983). *Plant Physiol.* **171**:194-196.
- King, M.-T. and Drews, G. (1976). *Eur. J. Biochem.* **68**:5-12.
- Kita, M. Kasehara, M. and Anraku, Y. (1984a) *J. Biol.Chem.* **259**:3368-3374.
- Kita, M. Kasehara, M. and Anraku, Y. (1984b) *J. Biol.Chem.* **259**:3375-3381.
- Kitada, M. and Krolwich, T.A. (1984). *J.Bacteriol.* **158**:963-966.
- Klingenberg, M. (1979). *Math. in Enzymol.* **LVI**:229-233.
- Knowles, C.J. (ed) (1980). "Diversity of Bacterial Respiratory Systems". Vols. I and II. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kranz, R.G. and Gennis, R.B. (1985). *J. Bacteriol.* **161**:k709-713.
- Kretovich, V.L., Romanov, V.I. and Korolev, A.V. (1973). *Plant Soil* **39**:219-224.
- Krüger, A. and Under, G. (1985). En "Co. G". (G.Lenas, ed). 285-300 pp. John Wiley & Sons, N.York.
- Lang, D.R., Felix, J. and Lundgren, G. (1972). *J. Bacteriol.* **110**:968-972.
- Lorence, R. M., Miland, J.G. and Gennis, R.B. (1986).

Biochemistry 25:2314-2321.

- Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). *J. Biol.Chem.* 193:265-275.
- Ludwig, B. (1987). *FEMS Microbiol. Lett.* 46:41-56.
- Mälstrom, B. (1982). *Ann. Rev. Biochem* 51:21-59.
- Mälstrom, B. (1989). *FEBS Lett.* 250: 9-21.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E. and Bieber, L.L. (1981). *Meth. in Enzymol.* 72: 296-303.
- Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, F.A., Howell, L.G., Mayhew, S.G., Matthews, R.G. and Foust, G.P. (1969). *J. Biol. Chem.* 244:3999-4006.
- Massey, V., Schopfer, L.M. and Anderson, R.F. (1988). In "Oxidases and Related Redox systems". 147-166 pp. Alan R.Lies.
- Matus, V.K., Melik-Sarkisyan, S.J. and Kretovich, V.L. (1973). *Microbiology (URSS)* 42:95-100.
- McKay, I.A., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. (198). *J. Gen. Microbiol.* 134:1433-1440.
- McInerney, M.J., Holmes, K.B., Hoffman, P. and Der Vartanian, D.V. (1984). *Eur. J. Biochem.* 141:447-452.
- Meyer, D.L. and Jones, C.W. (1973) *FEBS Lett.* 33: 101-105.
- Miller, M.J. and Gennis, R.B. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 9159-9165.
- Mueller, J.F. and Taber, H.W. (1989). *J.Bacteriol.* 171:4967-4978.
- Nichols, D. (1982). In "Bioenergetics: An Introduction of Chemiosmotic Theory". 1-12pp. Academic Press, London.
- Noel, R.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J. and Ceballos, M.A. (1984). *J. Bacteriol.* 155:481-487.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1982). *J.Bacteriol.* 152:422-430.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1983). *J.Bacteriol.* 155:481-487.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1985a). *J.Bacteriol.* 161:507-514.

- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1985b). *J. Bacteriol.* 161:775-777.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1987). *J. Bacteriol.* 169:1089-1094.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3219-3223.
- O'Brian, M.R., Kirshbom, P.M. and Maier, R.J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:8390-8393.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1988). *Advances in Microbial Physiol.* 29: 2-52.
- O'Brian, M.R. and Maier, R.J. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* 974: 229-246.
- O'Gara, F.D., Birkenhead, K., Boesten, E. y Fitzmaurice, A.M. (1989). *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 93-102.
- Pettigrew, G.W. and Moore, G.R. (1987). "Cytochrome c: Biological Aspects". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Poole, R.H. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* 726: 205-243.
- Poole, R.H. (1989). In "Bacterial Energy Transduction". 231-291 pp. Academic Press, London.
- Postgate, J. (1987). "Nitrogen Fixation". 33 pp. E. Arnold, N.York.
- Probst, I., Wolf, G. and Schlegel, H.G. (1979). *Biochim. Biophys. Acta.* 576: 471-478.
- Puustinen, A., Finel, M., Värkki, M. and Wikström, M. (1989). *FEBS Lett.* 249: 167-167.
- Rawsthorne, S., Ninchin, P.F., Summerfield, R.J., Cookson, C. and Coombs, J. (1980). *Phytochemistry* 19:341-355.
- Rice, C.W. and Hempfling, W.P. (1978). *J. Bacteriol.* 134: 115-124.
- Reibach, P.H., Mesh, P.L. and Streeter, J.G. (1981). *Can. J. Microbiol.* 27: 491-498.
- Saroso, S., Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. (1984). *J. Gen.*

Microbiol. 130: 1809-1814.

- Schäger, H. and Von Jagow, G. (1987). Anal. Biochem. 166:368-379.
- Setlow, P. (1983). Germination and outgrowth. En "The Bacterial Spore". Vol.2. (A.Hurst, y G.W. Gould, eds). pp. 216-218. Academic Press. London.
- Singer, T. and Edmondson. D.E. (1978). Meth. in Enzymol. Vol.LIII,Part D.
- Soberon, M., Williams, H.D., Poole, R.K. and Escamilla, E. (1982). J. Bacteriol. 171:465-472.
- Sone, N., Kagawa, Y. and Oriti, Y. (1983). J. Biochem. 93: 1329-1336.
- Steub, M.F. and Muhoberac, B.B. (1989). J. Inorg. Biochem. 37:233-256.
- Thöny-Meyer, L., Stax, D. and Hennecke, H. (1989). Cell 57: 683-697.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- van Verseveld, H.W. y Bosma, G. (1987). Microbiol.Sci. 4:329-333.
- Weston, J.A., Collins, P.A. and Knowles, C.J. (1974). Biochim. Biophys. Acta. 368: 148-157.
- Wittenberg, J.B., Bergersen, F.J., Appleby, C.A. and Turner, G.L. (1974). J. Biol. Chem. 249: 4057-4066.
- Wong, T.H. and Mager, F.J. (1987). Biochim. Biophys. Acta. 892:81-89.
- Zimmermann, B.H., Nitsche, C.L., Fee, J.A., Rusnak, F. and Münck, E. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5779-5783.

APENDICE

CYTOCHROME α EXPRESSION AND REGULATION PATTERN IN
FREE-LIVING *Rhizobium phaseoli*.

BLANCA BARQUERA¹, ARTURO GARCIA-HORSMAN² AND JOSE E. ESCAMILLA*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
D.F. Apartado Postal 70-242, CP 04510 México.
Tel. 5505215 ext 4887 and 4836.
FAX No. (5) 548 03 87

¹ Present address: Department of Biochemistry, University of Illinois at
Urbana-Champaign, 505 South Mathews Av. Urbana, IL 61801. USA.

ABSTRACT. The cytochrome expression pattern of *R. phaseoli* CFN42 in free-living cultures was studied. Cytochromes *b*, *c*, *o* and *aa₃* were found in fast growing cells cultured under forced aeration. Stationary aerobic cells, and microaerobic grown cells to a longer extent showed decreased levels of cytochromes *c*, *aa₃* and *o*, concomitant with a significant increase of *b* type cytochromes and the synthesis of a new cytochrome, tentatively identified as cytochrome *d*. Cell membranes showing the highest content of cytochrome *d* (microaerobic grown cells) also showed the highest respiratory activities with NADH, succinate, malate or ascorbate-TMPD (N,N, N'.N'-tetramethyl p-phenyldiamine). In the presence of either of the above electron donors cytochrome *d* was clearly reduced. NADH dependent respiration in membranes of fast growing cells (no cytochrome *d* detected) was abolished by 25 μ M KCN. This inhibitor concentration caused only 15-20% inhibition in microaerobic cell membranes (cyt *d* present). Moreover, in the presence of 1 mM KCN, the oxidation of cyt *d* and *b* type cytochrome was spectrally detected. It is suggested that cyt *d* is a functional cytochrome in the respiratory system of free-living *Rhizobia*, probably acting as terminal oxidase.

Key words: Cytochrome *d*- *Rhizobium phaseoli*- Respiratory system.

Reduction of one N₂ molecule to NH₃, in nitrogen fixing bacteria, requires 16-20 ATP molecules (O'Brian and Maier, 1989). Therefore, oxidative phosphorylation, the main source of ATP in *Rhizobia*, might become the limiting step for biological nitrogen fixation. In addition to ATP generation, it has been proposed that respiratory electron transport in N₂ fixers could play an additional role in protecting nitrogenase against the deleterious action of free O₂ (Appleby, 1969a; Bergersen and Turner, 1980). Thus, respiratory system of *Rhizobia* has

been extensively studied (Appleby, 1969b; Chakrabarti, et al. 1987; De Hollander and Stouthamer, 1980) specially in the symbiotic bacteroid (Keister, et al. 1983; O'Brian and Maier, 1983). In *B. japonicum* (Appleby, 1969b; O'Brian and Maier, 1983; Thony-Meyer, et al. 1989), *R. leguminosarum* (Kretovich, et al. 1983), and *R. trifolii* (De Hollander, 1981), the presence of at least two dehydrogenases (NADH and succinate), ubiquinone, bc_1 complex, cyt *c*, aa_3 and cyt *o* have been shown.

According to the prevailing growth conditions, *Rhizobia* species thrives as free living bacteria that exhibits a diverse selectivity for carbon sources and distinct expression of the respiratory system, (De Hollander and Stouthamer, 1989; Kretovich, et al. 1973; Mc Kay, et al. 1988). In addition, significant differences in the electron transport system between bacteroid and free-living cells have been found, in particular those that concern the expression of terminal oxidases (Kretovich, et al. 1973). In all species studied, cyt *c-aa₃* is present during symbiosis. The presence of cyt *o* (specially in the bacteroid) is a matter of discussion (Keister, et al. 1983; O'Brian and Maier, 1983; O'Brian and Maier, 1989). Furthermore, in *R. leguminosarum* (Kretovich, et al. 1973), and *R. trifolii* (De Hollander, 1981), a third oxidase, cyt *d*, is synthesized during the late aerobic stationary phase and specially in microaerobic growth conditions. However, *B. japonicum* in microaerobic growth conditions (O'Brian and Maier, 1983; 1985) does not express cyt *d*, but instead exhibits a higher level of cyt *o* in the aerobic cultures. On the other hand, in no case cyt *d* has been claimed to be present in the bacteroids of the several species so far studied (Keister, et al. 1973; Kretovich, et al. 1973; O'Brian and Maier, 1983). In previous report (Soberón, et al. 1989) had not been found a cytochrome *d* in *R. phaseoli*, probably because it had been studied in logarithmically grown bacteria.

In the present paper we report the presence of a third putative

oxidase in free-living *R. phaseoli*, CFN42, cyt *d*, similar to that of *R. leguminosarum* and *R. trifolii*. Cyt *d* was present in aged aerobic cultures but specially in microaerobic grown cells. The appearance of cyt *d* was accompanied by a decrease in cytochromes *c* and $\alpha\alpha_3$ levels.

The respiratory activities supported by NADH was far more resistant to cyanide in membranes that contained cyt *d*. Finally, a *b* type cytochrome (peak at 562 nm) could be associated to the oxidation of cyt *d* in the presence of cyanide, suggesting its participation together with cyt *d*, in a cyanide resistant branch.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria strain and Culture methods. The strain *R. phaseoli*, (CFN-42), has been previously described (Noel, et al. 1984; Soberón, et al. 1989). Aerobic cultures were made in PY-medium, (18) 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% casein enzymatic hydrolyzate; 10 mM CaCl_2 ; 10 $\mu\text{g/ml}$ nalidixic acid in a 25 l Fermentor at 30°C, with an air flux of 8 l/min and 250 rpm stirring. It was inoculated with 2 liters of an active culture in PY-medium. Cells were harvested in a continuous-flow centrifuge and washed twice with 50 mM Tris-HCl pH (7.4); 5 mM CaCl_2 ; 5 mM MgCl_2 (TCM buffer).

Microaerobically grown cells were obtained by growing the cells in aerobic conditions up to the end of log phase (10 hours), at which time half of the culture was drained and replaced with a fresh sterile medium. At this time, influx of air into the fermentor was arrested, and the culture was incubated for a further 48 hours more at 50 rpm.

Cell disruption and membrane preparation. Washed cells were disrupted with a bead-beater (0.1-0.2 mm glass beads) in the presence of 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Beating was carried out for 10 minutes in 30-second pulses. After that, DNase I (Sigma DN100) was added to a final concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. The homogenate was

centrifugated 10 min at 10K X g and the supernatant was centrifugated 45 min at 140K X g. The membrane pellet was washed 3 times with TCM buffer. All the steps were performed at 4°C. Membranes were stored under liquid nitrogen. No changes in their studied properties were detected during storage.

Protein concentration in membranes was measured by the Lowry-SDS method (Markwell, et al.1981), using bovine albumin as the standard.

Respiratory activities and Cytochrome spectra. NADH, succinate, malate and TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl -p-phenylendiamine) oxidases were determined polarographically at 30°C as described elsewhere (Escamilla, et al.1987), in a final volume of 3 ml that contained: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4; 0.2-1 mg membrane protein. The reaction was started by either the addition of 5.0 mM NADH or 40 mM malate (final concentrations). In the case of succinate oxidase, membranes were incubated with 40 mM disodium succinate for 5 min before the reaction was started. TMPD oxidase was determined at pH 6.8 in the presence of 0.1 mM TMPD and 10 mM ascorbate.

NADH, succinate and malate dehydrogenases were measured spectrophotometrically (420 nm) in 50 mM K-phosphate buffer pH 7.4, 5 mM KCN and 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ as electron acceptor. (Escamilla, et al.1987; Klingenberg, 1979). In the case of succinate dehydrogenase, 30 μ M phenazine metosulfate (PMS) was used as redox carrier mediator to ferricyanide. A extinction molar coefficient of $1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ was used for ferricyanide.

The cytochrome spectra of membranes or cells of *R. phaseoli* suspended in TCM buffer containing 30% glycerol (v/v) were performed with a SLM Aminco Midan 11 spectrophotometer. The samples (0.5 mg of protein) were reduced with a few grains of sodium dithionite, 0.1 mM-10 mM ascorbate-TMPD, 5 mM NADH, 40 mM succinate or 40 mM malate. Oxidized references were stirred (vortex agitation). The spectra were obtained at room temp. with 1 cm light path cuvettes, or at 77 K using

2 mm light path cuvettes. To obtain CO-cytochrome complexes, CO was bubbled through dithionite reduced sample for 3 minutes at room temperature using dithionite reduced preparations in the reference cuvette. Cytochrome concentrations were calculated from reduced (dithionite or substrate minus air oxidized spectra at room temperature) using the following wavelength pairs and millimolar extinction coefficients: cyt a_3 (605-615 nm)=16.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; cyt b (563-575 nm)=20 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; cyt c (553-538 nm)= 19 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; cyt d (630-655 nm)= 19 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (Jones and Poole, 1985).

Acid-acetone extraction of haem. (Goodhew, et al.1986). Ten volumes of 0.01 M HCl in acetone was added to the membrane sample and after 30 min the precipitate was sedimented. The pellets were suspended in TCM buffer and the difference spectra were recorded.

RESULTS

Cytochromes in aerobic and microaerobic cultures. Expression of cyt d in gram (-) bacteria is more commonly observed in the late stationary cultures or as response to scarce oxygen conditions (Kretovich, et al.1973; Poole,1983). Thus, we studied if cyt d could be expressed in *R. phaseoli* under culture conditions above mentioned (see Methods). As reported earlier for *R. phaseoli* (Soberón, et al.1989), cytochromes a, b and c types were present in whole cells obtained from the aerobic logarithmic stages, (4-10 hours of growth), Fig.1A. In addition to these cytochromes, here we showed that stationary cells exhibited the presence of characteristic absorption bands for cyt d (peak at 630 nm, trough at 650 nm) (Lorence, et al.1986). No cyt d was detected before the first 10 hours of culture. However by the end of the log-phase (10 -12 hours), a small but defined signal for cyt d was progressively observed following 10 hours of culture; it reached a maximal level in late-stationary phase (22 hours). Thus, the expression of cyt d in *R. phaseoli* in aged aerobic

cultures is similar to that reported in other cyt *d* containing bacteria, particularly in *R. leguminosarum* and *R. trifolii* (De Hollander, 1981; Kretovich, et al.1973). A temporal course for the relative cytochrome expression (Fig 1B) calculated from spectra in Fig.1A, showed that during the period in which cyt *d* progressively increased, there was also a marked decrease of cyt *c* and cyt *aa₃*. It is noteworthy that the level of type *b* cytochromes also increased during the same period. Cytochrome *o* did not seem to contribute to the increment of the levels of *b* type cytochromes, since membranes of log cells (not shown) contained twice the quantity found in late stationary cells (Table 1). It has been claimed (Lorence, et al.1986); that the trough at 650 nm, which is always present in bacteria containing cyt *d*, is due to the cyt *b*-595 of the *bd* complex; this signal also appeared in our spectra (Fig.2). It is important to note that the cyt *b* and cyt *c* measurements were compromised because they were looking at levels of what may be more than one specie.

The participation of cyt *d* during substrate oxidation was analyzed in reduced minus air-oxidized spectra of membranes obtained from microaerobic grown cells (Fig.2). Reduction with NADH, succinate or malate (traces B-D respectively) yielded similar reduction patterns, however, NADH was the most effective reductant: noteworthy reduction of cyt *d* was noted in all cases. It was also found that cyt *d* could be reduced by ascorbate-TMPD (trace E in Fig.2) indicating that putative cyt *d* is confined in the high potential side of the respiratory system; this has been described for other bacteria (Au, et al.1985; Poole,1983). It is to be noted that membranes from microaerobically growth cells exhibited a peak at 472 nm in reduced minus oxidized spectra (traces A-D, Fig.2). This pigment was not identified. It was difficult to measure cyt *c* in whole cells and membranes since there was an overlap of cyt *c* and cyt *b* peaks. Therefore, membranes were extracted with acid-acetone (see Methods)

and the membrane residue used for the determination of cyt c. Dithionite reduced, room temp. spectra (Fig. 3A) showed the characteristic peaks for cyt c i.e. 419 and 553 nm. Spectra obtained with membrane residues from late-stationary aerobic cells (trace A) and from microaerobic culture (trace B) were similar. The spectra showed that late stationary aerobic cells expressed 1.4 times more cyt c than microaerobic grown cells.

CO-reactive cytochromes were spectrally analyzed in membrane preparations of cell cultured under microaerophilic conditions (Fig. 3B). CO-difference spectrum of dithionite reduced membranes showed the presence of cyt α_3 -CO complex (430, 590 nm peaks and 444 nm trough). The o-CO complex through signal at 430 nm was partially overlapped by the α_3 -CO peak signal at 430 nm, however, the peak at 417 nm and trough at 560 nm for o-CO complex were clearly observed. It is to be noted that upon reaction with CO, the signal peak at 630 nm which corresponds to the reduced cyt d (Fig. 2), was shifted to 641 nm. This behavior of cyt d has been described in other bacteria (Poole, 1983; Jones and Poole, 1985).

Cytochrome concentrations in membranes (Fig. 2 and 3B) and membrane residues (cyt c, Fig. 3A) were calculated from dithionite reduced spectra (Table 1). Cells cultured under microaerobic conditions expressed more cyt b and d than at the late-stationary aerobic phase (2.6 and 1.8 times respectively). In addition it was found that cyt c and cyt α_3 were expressed to a higher extent (1.4 and 1.6 times respectively) in aerobic cells cultured up to late-stationary phase than in microaerobic cultures. Thus, it appears that the expression of cyt c and α_3 were lower under restricted O_2 conditions (microaerobic cultures), but that conditions also brought about a higher expression of b and d types cytochromes.

Respiratory activities. The comparison of oxidase respiratory activities in membrane particles obtained from late-stationary aerobic

cells and microaerobic cells (Table 2) showed that the latter cells were two fold more active. On the other hand, both types of membranes were three fold more active with NADH than with ascorbate-TMPD. The activity with succinate or malate was 13 to 16% of the activity observed with NADH. Thus, it seems that *R. phaseoli* is highly adapted to utilize NADH. Interestingly, the two-fold increment observed in cyt *b* and *d* (Table 1) in microaerobic cells was accompanied by a corresponding increase in the rate of electron transport (Table 2). Data in the literature (Jones, *et al.* 1973) indicate that over-expression of cyt *b* and *d* in *Azotobacter vinelandii* is accompanied by an enhancement of electron transport activities.

On the other hand, the levels of dehydrogenase activities expressed in both conditions were the same (not shown). These data pointed out that dehydrogenases do not constitute a limiting stage for electron flow to oxygen, as has shown for other systems (Jones, *et al.* 1973).

Cyanide resistant respiration. In all the cases that have been studied, cyt *d* dependent respiration is far more resistant to KCN, than respiration through cyt *c-aa₃* and cyt *o* branches (Poole, 1983). Thus, NADH and ascorbate-TMPD dependent respiration were titrated with KCN (Fig. 4) in membrane particles obtained from log aerobic cells (no cyt *d* detected) and from microaerobic cells (cyt *d* maximally expressed). Respiratory activities stimulated by NADH or ascorbate-TMPD in membranes of log-aerobic cells, showed a highly sensitive component (Fig. 4) that was inhibited 50-65% (ascorbate-TMPD and NADH respectively) by 1 μ M KCN. This suggests a significant contribution of the cytochrome *c-aa₃* branch to the respiration supported by NADH or ascorbate-TMPD. At 25 μ M KCN, respiration with NADH or ascorbate-TMPD was almost abolished. It has been reported (Poole, 1983) that cytochrome *o* is more resistant to KCN than cyt *aa₃*; thus cyt *o* could account for the respiratory activity observed with

concentration of KCN about 1 μ M KCN.

The respiratory activity in membranes of microaerobic cells showed increased resistance to KCN. At 5 μ M KCN, 40-50% of ascorbate-TMPD oxidase and 80 to 85% of NADH oxidase were observed. Thus expression of cyt *d* in *R. phaseoli* resulted in major increase in the resistance to KCN and this was in agreement with other cyt *d*-containing bacteria (Poole, 1983).

The suggested participation of cyt *d* and a *b* type cytochrome in the cyanide resistant respiration was further explored. Anaerobic minus aerobic difference spectra reduced by NADH in the presence of KCN were recorded. After a 20 min incubation period at room temp. with 5 mM NADH, the reference cuvette was vigorously stirred (vortex), and the steady-state reduction pattern was trapped at 77 K and recorded against the anaerobic sample (77 K). In the absence of KCN, the oxidation of all cytochrome components (Fig. 5) was evident, while in the presence of 0.5 or 1 mM KCN, the oxidation of cyt *c* and *aa₃* was arrested. Cyt *d* (630 nm peak) and cyt *b* (562 nm peak) continued to be oxidized even in the presence of 1 mM KCN.

DISCUSSION

In a previous report (Soberón, et al. 1989) it was not observed a cyt *d* in other strains of *R. phaseoli*. The results presented here indicate that *Rhizobium phaseoli* (strain CFN42) possesses the capacity to express cyt *d* in free-living cultures, under low oxygen tension as well as in the late stationary phase of aerobic cultures. It has been reported important differences among strains of the same specie (i.e. Keister, et al. 1983). The expression pattern is similar to those reported for *R. trifolii* (De Hollander, 1981) and *R. leguminosarum* (Kretovich, et al. 1973) and in accordance with to other cyt *d* containing bacteria (Poole, 1983). Thus, the existing evidence indicates that cyt *d* is not rare among N_2 -fixing bacteria. In

addition to the above mentioned species of symbiotic *Rhizobium*, *cyt d* is also expressed in free-living N_2 -fixing bacteria, such as *Azotobacter vinelandii* (Jones, et al.1973) and *Azospirillum brasilense* (Döbereiner and Pedrosa, 1987).

The course of expression for cytochromes in *R. phaseoli* cultured under forced aeration (Fig.1) suggested that cytochromes *c-aa₃* and *o* branches are associated with fast growing aerobic cells while *cyt d* was expressed when growth was impaired by depletion of nutrients (aerobic stationary cells, Fig.1) or by restriction of O_2 (microaerophilic cells, Fig.2). This regulation of the expression of *cyt d* agrees with previous reports in other bacterial species. (Au, et al. 1985; Poole,1983).

One of the features related to *cyt d* dependent respiration is its striking resistance towards KCN (Poole,1983). Our membrane preparations obtained from microaerophilic cells showed an ascorbate-TMPD, but specially NADH-dependent respiration (Fig.4) that was far more resistant to KCN, than in the log-aerobic cell membranes (Fig.4). Indeed, the participation of *d* and a *b* type cytochromes in the cyanide resistant respiration (NADH) could be spectroscopically visualized (Fig. 5). Moreover in the presence of 5 mM KCN only *cyt d* and a *b* type cytochrome continued to be oxidized. These results were in agreement with the previous reports (Escamilla, et al.1987; Poole,1983) for other *cyt d*-containing bacteria.

All *Rhizobium* species, have the capacity to express cytochromes oxidases *aa₃*, *o* and *d* types; however the requirement for certain oxidases types in symbiosis is still controversial.

The expression of particular cytochrome oxidases during symbiosis seems to vary within wild strains, i.e. *cyt aa₃* has been found in some strains of *R. phaseoli* (Soberón, et al.1989), *R. leguminosarum* (Kretovich, et al.1973) and *B. japonicum* (Appleby, 1969a; El Mokadem and Keister, 1982). but not in other strains (Keister, et al.1983).

Moreover, cyt *c* was reported to be absent in bacteroids of *B. japonicum* (Appleby, 1969b; Keister, et al.1983) and *R. leguminosarum* (Kretovich, et al.1973). Thus, although cytochromes *aa₃* and *c* are commonly expressed in free-living *Rhizobia*, this does not seem to be a general rule for its expression in symbiosis.

With respect to cyt *d*, it seems that its expression in *Rhizobium* could be restricted to free-living bacteria that grow under conditions where oxygen is scarce and/or nutrients have been depleted (Kretovich, et al.1973; De Hollander,1981, this work). As far we know, there is not a single report claiming the presence of cyt *d* during plant-bacteria symbiosis.

The high affinity of cyt *d* towards oxygen (Au, et al.1985; Poole,1983) and its expression under low O₂ tensions have lead the proposal that the presence of this cytochrome enables bacteria to grow and consume O₂ in low oxygen environments. Thus, the biological role of cyt *d*, as putative oxidase, in free-living *Rhizobia* could be related to the above proposal.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our deep appreciation to M. Tuena and A. Gómez-Puyou for their help and criticism during the preparation of this work.

We thank M. Soberón for providing the strain used in this work and R. Arredondo for his performance of nodulation probes.

REFERENCES

- Appleby, C.A. 1969. Electron transport system of *Rhizobium japonicum*. I. Haemoproteins, P-450, other CO-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroids from N₂-fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta.* 172:71-87.
- Appleby, C.A. 1969. Electron transport of *Rhizobium japonicum*

11. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. Biochim. Biophys. Acta. 172:88-105.

Au, D.C.T., Lorence, R.M., and Gennis, R.B. 1985. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking the cytochrome *c* terminal oxidase. J.Bacteriol. 161:123-127.

Bergersen, F.J. and Turner, G.L.. 1980. Properties of terminal oxidases system of bacteroids from root nodules of soybean and cow pea and of N_2 -fixing bacteria grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 11:235-252.

Chakrabarti, S., Mishra, A.K. and Chakrabarti, P.K. 1987. Cytochromes in free-living *Rhizobia*. Current. Microbiol. 15:165-170.

De Hollander, J.A., and Stouthamer, A.H.. 1980. The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*.-Eur.J.Biochem. 111:473-478.

De Hollander, J.A.1981. Ph.D. thesis. Vrije Universiteit, Amsterdam.

Döbereiner, J. and Pedrosa, F.O. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plant. Science Tech. Publishers, (ed). Madison, Wisconsin. Chap.2. 24-26 pp.

El Mokadem, M.T., and Keister, D.L. 1982. Electron transport in *Rhizobium japonicum*. Isolation of cytochrome *c* deficient.

Escamilla, J.E., Ramirez, R., del Arenal, P. Zarzoza, G, and Linares, V. 1987. Expression of oxidases in *Bacillus cereus*. Effects of oxygen tension and carbon source. J.Gen.Microbiol. 133:3549-3555.

Goodhew, C.F., Brown, K.R., and Pettigrew, G.W.. 1986. Haem staining in gels. a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. Biochim. Biophys. Acta. 852:288-294.

Jones, C.W., Brice, J.M., Wright, W., and Ackrell, B.A.C.. 1973. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. FEBS Lett. 29:77-81.

Jones, C.W. and Poole, R.K. 1985. The analysis of cytochromes. Method. in Microbiol. 18:285-328.

Keister, D.L., Marsh, S.S., and El Mokadem, M.T. 1983. Cytochromes of *Rhizobium japonicum* 61a76 bacteroids from soybean nodules. *Plant Physiol.* 71:194-196.

Klingenberg, M. 1979. The ferricyanide method for elucidating the sidedness of membrane-bound dehydrogenase. *Meth. in Enzymol.* LVI:229-233.

Kretovich, V.L., Romanov, V.I., and Korolev, A.V. 1973. *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). *Plant Soil.* 39:619-634.

Lorence, R., Koland, J.G. and Gennis, R.B. 1986. Coulometric and spectroscopic analysis of the purified cytochrome *d* complex of *Escherichia coli*: Evidence for the identification of "cytochrome a_1 " as cytochrome ζ_{595} . *Biochemistry.* 25:2314-2321.

Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Tolbert, N.E., and Bieber, L.L. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Method. in Enzymol.* 72:296-303.

Mc Kay, I.A., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R. 1988. C_4 -dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J. Gen. Microbiol.* 134:1433-1440.

Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, L. and Cevallos, M.A.. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.

O'Brian, M.R., and Maier, R.J. 1983. Involvement of cytochromes and a flavoprotein in hydrogen oxidation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 155:481-487.

O'Brian, M.R., and Maier, R.J. 1985. Expression of cytochrome *o* in hydrogen uptake constitutive mutants of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 161:507-514.

O'Brian, M.R., and Maier, R.J. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbioses. *Biochim. Biophys. Acta.* 974:229-246.

Poole, R.K. 1983. Bacterial cytochrome oxidase. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. biophys. Acta.* 726:205-243.

Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K., and Escamilla, E. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171:465-472.

Thöny-Meyer, L., Stax, D., and Hennecke, H. 1989. An unusual gene cluster for the cytochrome bc_1 complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. *Cell* 57:683-697.

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1A. Temporal course expression of cytochromes in *Rhizobium phaseoli* CFN42 during culture in aerobic PY medium. Cells were withdrawn from fermentor at the indicated times (arrows in insert), washed in TCM-buffer and resuspended ($A_{540} = 30$) in the same buffer, containing 50% glycerol and 0.1% Triton X-100. Dithionite reduced samples were recorded (room temp.) against air oxidized references.

Fig. 1B. Relative cytochrome concentrations during aerobic growth of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 in PY medium. Relative cytochrome concentrations were calculated from spectra in Fig. 1A, using the wavelength pairs noted under **Material and Methods**.

Fig. 2. Substrate dependent reduction pattern of cytochrome in membrane particles of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 cultured (72 hours) in PY medium, under microaerophilic conditions. Samples (5mg membrane protein) were incubated (20 min, room temp) with 5 mM NADH or 40 mM disodium succinate or 40 mM malate or 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD (trace B to E respectively) and recorded against air oxidized references. Dithionite reduction pattern is shown for comparison (trace A). Note reduction cytochrome *d* at 630 nm in all cases.

Fig. 3A. Cytochrome *c* in membrane residue prepared by acid-acetone extraction (see **Methods**) of membranes (5 mg of membrane protein) from *Rhizobium phaseoli* CFN 42 obtained from late stationary aerobic cells (trace A) or from microaerophilic cells (trace B). Samples were reduced with dithionite and recorded against air oxidized references. Cyt *c* concentration was calculated in both samples and recorded in Table 1.

Fig. 3B. CD difference spectra of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 membranes (0.5 mg membrane protein) of cells cultured under microaerophilic conditions.

Fig. 4. Cyanide titration of NADH oxidase (circles) and ascorbate

plus TMPD oxidase (triangles) in membranes of *Rhizobium phaseoli* CFN 42, obtained from logarithmic aerobic cells (open symbols) or from microaerophilic cultured cells (full symbols). 1 mg of membrane protein were stimulated with 5 mM NADH or 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD (final concentrations) in the presence of the indicated KCN concentrations. Specific activities of NADH and ascorbate plus TMPD were similar to those shown in Table 2.

Fig. 5. Effect of KCN on the oxidation of membrane cytochromes of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 obtained from microaerophilic cultures. Membranes (1 mg protein) were incubated with 5 mM NADH and the indicated KCN concentrations up to anaerobiosis (20 min room temp). Samples and reference cuvettes (2 mm path light) were incubated in horizontal position to avoid sedimentation. After incubation period reference membranes were vigorously agitated (vortex, 1 min) and at this point, sample and reference cuvettes were frozen at 77 K and spectra recorded at 77 K. Note that oxidation of cytochromes *c*-553 and $\alpha\alpha_3$ (603 nm) was arrested in 0.5 and 1 mM KCN while *cyt d* (630 nm) and an unidentified *cyt b* (562 nm) continued to be oxidized even in the presence of KCN.

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOCHROMES ASSOCIATED WITH MEMBRANES OF AEROBIC AND MICROAEROBIC CELLS OF *Rhizobium phaseoli*.

CYTOCHROME	nmol/mg protein		RATIO (a)
	LATE STATIONARY AEROBIC	MICROAEROBIC	
b	0.23	0.6	2.6
c	0.085	0.059	0.69
aa ₃	0.05	0.03	0.60
d	0.113	0.2	1.8
a ₃ -CO	0.07	0.02	0.28
o-CO	0.02	0.01	0.50

Cytochrome concentration were calculated from room temp. spectra. The wavelength pairs and millimolar coefficients described in *Material and Methods* section were used.

(a) Ratio of cytochrome concentrations in microaerobic membranes to that in aerobic membranes.

TABLE 2. RESPIRATORY ACTIVITIES ASSOCIATED WITH MEMBRANES OF AEROBIC AND MICROAEROBIC CELLS OF *Rhizobium phaseoli*.

OXIDASE ⁽¹⁾	AER O B I C ⁽²⁾	M I C R O A E R O B I C ⁽³⁾	R A T I O ⁽⁴⁾
NADH	300	673	2.0
Succinate	40	100	2.5
Malate	50	87	1.7
Ascorbate-TMPD	100	200	2.0

(1) Activity in $\text{nat } 0 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

(2) Cells harvested at late stationary phase.

(3) Cells harvested at 72 h microaerobic growth.

(4) Microaerobic/aerobic.

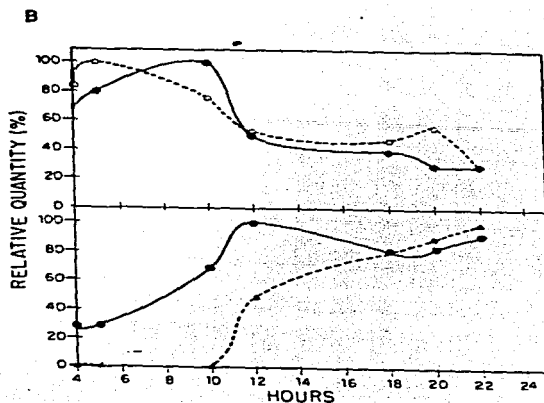
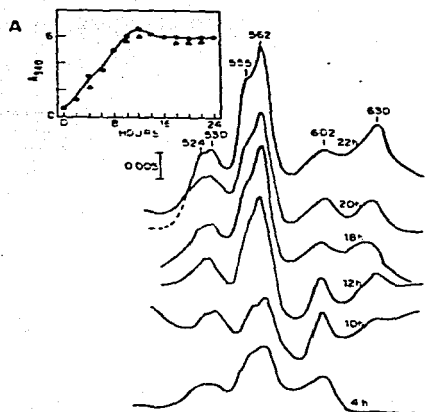


Fig. 1A. Temporal course expression of cytochromes in *Rhizobium phaseoli* CFN42 during culture in aerobic PY medium. Cells were withdrawn from fermentor at the indicated times (arrows in insert), washed in TCM-buffer and resuspended ($A_{540} = 30$) in the same buffer, containing 50% glycerol and 0.1% Triton X-100. Dithionite reduced samples were recorded (room temperature) against air oxidized references.

Fig. 1B. Relative cytochrome concentrations during aerobic growth of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 in PY medium. Relative cytochrome concentrations were calculated from spectra in Fig. 1A, using the wavelength pairs noted under Material and Methods. (Symbols: \blacklozenge cyt c; \circ , cyt aa_3 ; \bullet , cyt b; \blacktriangle , cyt d).

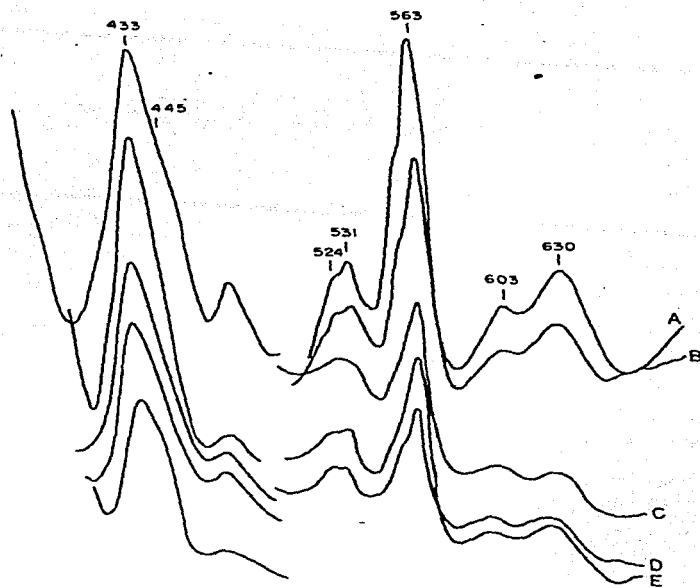


Fig. 2. Substrate dependent reduction pattern of cytochrome in membrane particles of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 cultured (72 hours) in PY medium, under microaerophilic conditions. Samples (5mg membrane protein) were incubated (20 min, room temp) with 5 mM NADH or 40 mM disodium succinate or 40 mM malate or 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD (trace B to E respectively) and recorded against air oxidized references. Dithionite reduction pattern is shown for comparison (trace A). Note reduction cytochrome *d* at 630 nm in all cases.

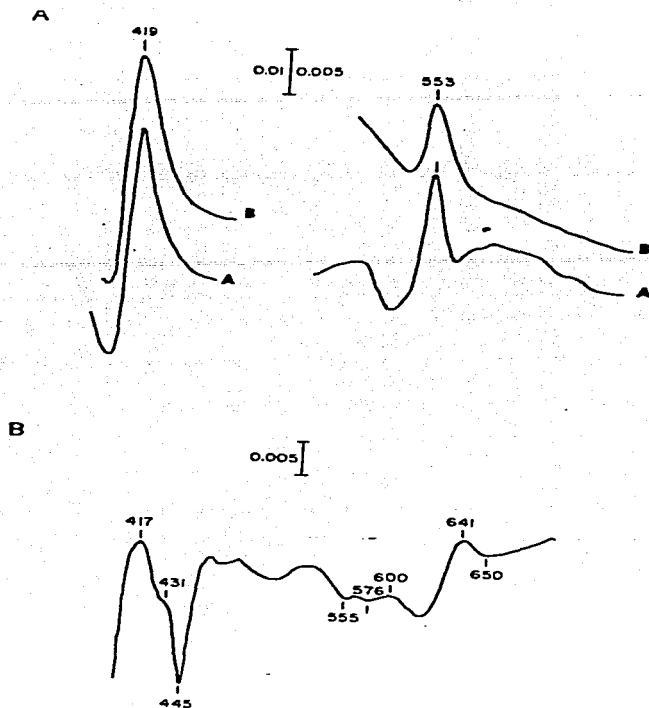


Fig. 3A. Cytochrome *c* in membrane residue prepared by acid-acetone extraction (see Methods) of membranes (5 mg of membrane protein) from *Rhizobium phaseoli* CFN 42 obtained from late stationary aerobic cells (trace A) or from microaerophilic cells (trace B). Samples were reduced with dithionite and recorded against air oxidized references. Cyt *c* concentration was calculated in both samples and recorded in Table 1. Fig. 3B. CD difference spectra of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 membranes (0.5 mg membrane protein) of cells cultured under microaerophilic conditions.

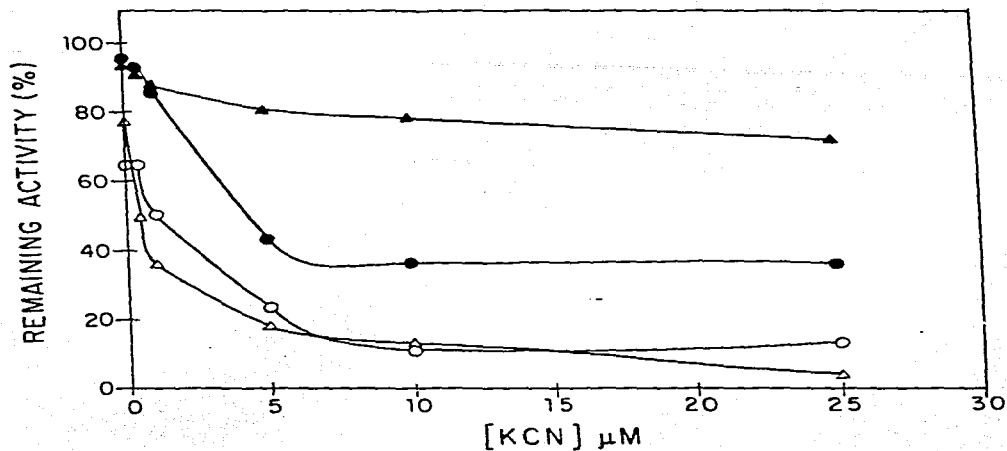


Fig.4. Cyanide titration of NADH oxidase (triangles) and ascorbate plus TMPD oxidase (circle) in membranes of *Rhizobium phaseoli* CFN 42, obtained from late-stationary cells (open symbols) or from microaerophilic cultured cells (full symbols). 1 mg of membrane protein were stimulated with 5 mM NADH or 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD (final concentrations) in the presence of the indicated KCN concentrations. Specific activities of NADH and ascorbate plus TMPD were similar to those shown in Table II.

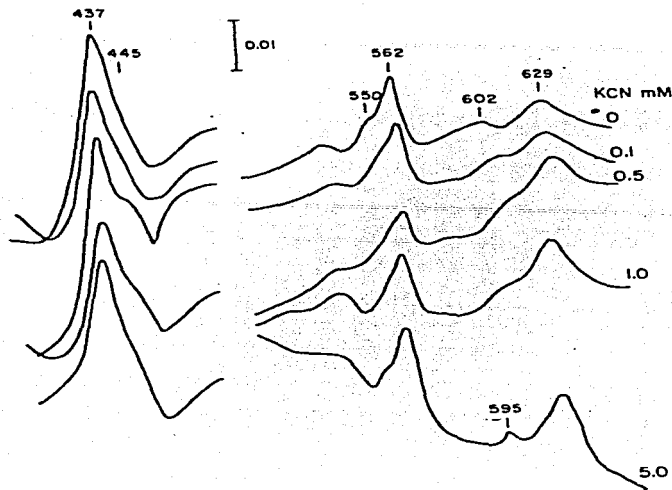


Fig. 5. Effect of KCN on the oxidation of membrane cytochromes of *Rhizobium phaseoli* CFN 42 obtained from microaerophilic cultures. Membranes (1 mg protein) were incubated with 5 mM NADH and the indicated KCN concentrations up to anaerobiosis (20 min room temp). Samples and reference cuvettes (2 mm path light) were incubated in horizontal position to avoid sedimentation. After incubation period reference membranes were vigorously agitated (vortex, 1 min) and at this point, sample and reference cuvettes were frozen at 77 K and spectra recorded at 77 K. Note that oxidation of cytochromes c -553 and α_3 (603 nm) was arrested in 0.5 and 1 mM KCN while cyt d (630 nm) and an unidentified cyt b (562 nm) continued to be oxidized even in the presence of KCN.

AN ALTERNATIVE NON-CYTOCHROME BRANCH IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF
FREE-LIVING *Rhizobium phaseoli*

BLANCA BARQUERA¹, ARTURO GARCIA-HORSMAN¹ AND JOSE E. ESCAMILLA*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular,

Universidad Nacional Autónoma de México,
D.F. Apartado Postal 70-242, CP 04510 México,
Tel. 5505215 ext 4887 and 4836.

FAX: 525- 548 0387

1. Present address: Department of Biochemistry. University
of Illinois at Urbana-Champaign. 505 South Mathews Av. Urbana,
IL 61801.USA.

ABSTRACT: The existence of a non-cytochrome NADH oxidase pathway in membranes of free-living *Rhizobium phaseoli* was explored. This alternative electron transport route was distinguished from the cytochrome oxidase linked pathway by its low affinity towards O_2 ($K_{m\text{app}} = 75-80 \mu\text{M}$), higher K_m for NADH ($75 \mu\text{M}$), a hundred-fold lower sensitivity to quinacrine inhibition, and resistance to U.V (360 nm) photoinactivation. In addition to NADH, tetramethyl p-phenylenediamine (TMPD) donates electrons to this low- O_2 affinity pathway, causing reduction bleaching of a flavoprotein absorption band at 455 nm. TMPD oxidase was partially (30%) inhibited by $200 \mu\text{M}$ quinacrine. The low O_2 -affinity oxidase activity promoted by NADH, or ascorbate plus TMPD was present in aerobic and microaerophilic-grown cells and absent in anaerobic and bacteroid cells. Thus, a NADH linked flavoprotein type oxidase is suggested.

Key words: NADH-dehydrogenases- flavoproteins- *Rhizobium phaseoli*- Respiratory system.

Previous studies on the electron transport system of free-living *Rhizobium* have revealed the presence of *a*, *b*, *c* and *d* type cytochromes (Chakrabarti, et al, 1987; Esibrener, et al, 1982; Kretovich, et al, 1973; O'Brian and Maier, 1989; Soberón et al, 1989; Thöny-Meyer, et al, 1989; Barquera, et al, 1990, submitted), probably organized in three oxidative pathways with either cytochromes aa_3 , *c* and *d* as terminal oxidases. Cyt aa_3 and *c* preferentially become appear in well aerated logarithmic cultures (Appleby, 1969; Chakrabarti, et al, 1987), whereas cyt *d* is expressed under O_2

restricted conditions or during the stationary growth phase of well aerated cultures (Kretovich, et al, 1973; Barquera, et al, 1990, submitted). Thus, expression of alternative oxidases in free-living *Rhizobia* seems to obey the general rules described for most aerobic bacteria (Poole, 1983).

In addition to cytochromes, flavoproteins are also involved in bacterial electron transport chains, functioning as dehydrogenases and, in some cases, as oxidases (Ghisla and Massey, 1989). Flavoproteins which can react directly with oxygen, forming alternative branches in the electron transport system have been reported (Malström, 1982). Some seem to form complexes with cytochrome *c*, but others react with oxygen without participation of cytochromes (Malström, 1982; Appleby, 1978; O'Brian and Maier, 1983).

B. japonicum bacteroid hydrogen oxidation involves a high redox potential flavoprotein, which can function as terminal oxidase; this enzyme was sensitive to atebriane and cyanide (O'Brian and Maier, 1983). Appleby suggested (1978) that the flavin and metal prosthetic groups of this enzyme can transfer four electrons to reduce oxygen to water. The presence of this enzyme and the cytochrome oxidases allow the regulation of the electron transport to oxygen, depending on the differing affinity of each protein for O_2 . Cytochrome *c* oxidase produces ATP via an energy-coupled pathway, whereas the flavoprotein functions consuming oxygen in an uncoupled pathway. The flavoprotein was implicated as a terminal oxidase in the hydrogen metabolism. In rhizobia the flavoprotein serves to recover part of energy lost during hydrogen evolution and also protect nitrogenase by reducing oxygen to water (Dixon, 1972; Emerich, et al, 1979).

The results presented in this paper strongly suggest, that in addition to cytochrome α_3 , *c* and *d* (Barquera, et al., 1990), there is a fourth oxidase in free-living *R. phaseoli*, tentatively identified as a NADH-dependent flavoprotein oxidase. This activity could be

distinguished by its low affinity towards O_2 and NADH, its low sensitivity to quinacrine inhibition, and its selectivity to K-ferricyanide over DCPIP as artificial electron acceptors. In addition, evidence suggesting that reduced TMPD might act as electron donor to the putative flavoprotein oxidase is described. This activity was expressed in aerobic and microaerobic cultured cells, but not in anaerobic and bacteroid cells.

MATERIAL AND METHODS.

Bacterial strains and culture methods. In this work two strains of *Rhizobium phaseoli* were used, CFN42 and CES (Noel, et al, 1984). Bacteria were cultured under aerobic or microaerobic conditions as described earlier (Barquera, et al, 1990, submitted), or under anaerobic conditions at 30°C in a top-filled 10 l flash without agitation nor aeration at 30°C. In all cases PY medium (Noel, et al, 1984) containing 0.5% (w/v) casein enzymatic hydrolyzate, 0.3% yeast extract, and 10 mM $CaCl_2$.

Cell disruption and membrane preparations. Cells were disrupted to obtain cell membranes with a bead-beater, similarly to (Barquera, et al, 1990, submitted).

The protein concentration was determined by the Lowry-SDS method, using bovine albumin as standard (Markwell, et al, 1981).

Bacteroids isolation. Bacteroids (CFN 42) from root nodules of *Phaseolus vulgaris* (Negro Jamapa) plants were isolated as previously described by Reibach, et al, (1981), with a self-generating Percoll gradient. Nodules of 21 days of age from 40 plants were used.

Respiratory activities and cytochrome spectra. NADH and TMPD oxidases were determined polarographically as described before (Escamilla, *et al*, 1987). In the kinetic determinations, the time course of oxygen concentration, was followed by a Clark-type electrode covered with an ultra-thin teflon membrane in a closed reaction vessel (3ml) maintained at 30°C. For oxygen uptake measurements, the desaturation technique was used, where the sensitivity was increased by amplifying the gain of recorder by 2, 2.5 and 2 factors successively. Immediately after each sensitivity increase the zero in the recorder was readjusted.

NADH dehydrogenase was spectrophotometrically measured in 50 mM K-phosphate buffer pH 7.4, 5 mM KCN, and 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ (420 nm) or 40 mM 2,6 dichlorophenol-indophenol (DCPIP, 660 nm) as electron acceptors (Klingenberg, 1979; Escamilla, *et al*, 1984).

The effect of inhibitors on the respiratory rate was evaluated in the polarographic experiments. Cyanide was added during the activity assay, the inhibitor was solubilized in K-phosphate buffer pH 7.4. Quinacrine was preincubated with membranes before addition of substrates (NADH or TMPD). Quinacrine was solubilized in 50 mM Tris-HCl pH 7.0.

The cytochrome spectra of membranes were performed with a SLM Aminco Midan II spectrophotometer, as described in (Barquera, *et al*, 1990). The spectra were obtained at room temp. with 1 cm light path cuvettes.

RESULTS AND DISCUSSION.

Kinetics of oxygen consumption. To ascertain the components involved in the reaction with oxygen of the *Rhizobium phaseoli* respiratory chain, we determined the desaturation kinetics for oxygen (see Methods) in membranes of cells cultured under different O_2

tensions as well as in purified bacteroids, using either NADH, or ascorbate-TMPD, or ascorbate-yeast cytochrome *c* as substrates. The Hofstee plots for O₂ uptake of aerobic cell membranes using 5.0 mM NADH (Fig.1A) or 10 mM ascorbate plus 10 μM TMPD (Fig. 1B) were similar. The kinetic pattern showed two components with K_{m app} = 6.7-10 μM and 75-80.7 μM respectively. On the other hand, using 10 mM ascorbate plus 150 μM yeast cyt *c*, the kinetic pattern towards oxygen showed one single component with a K_{m app} = 17 μM (Fig. 1C). We attributed the K_m value of 6-17 μM to the combined activity of cytochromes *aa₃* and *c*, since the K_m values obtained are within the affinity range reported for bacterial cytochrome oxidases of these types (Poole, 1983). Indeed, cytochromes *aa₃* and *c* were the only spectroscopically detected cytochrome oxidases in membranes of log-aerobic grown CFN42 cells (Fig.3). The low affinity component (75- 80 μM) revealed with NADH or ascorbate-TMPD seems to be far out of the affinity range for oxygen (0.2 μM to 10 μM; see Poole, 1983) reported for typical bacterial cytochrome oxidases. This suggests that a non-cytochrome oxidase enzyme could be responsible for the low affinity O₂ uptake showed. This component was not apparent when succinate or malate were used as substrates (not shown).

Membranes of microaerophilic or late stationary aerobic cells (CFN42) tested with NADH or ascorbate-TMPD (not shown) showed again two kinetic components towards oxygen, with K_m values of 3 μM and 72 μM respectively. Since this type of membranes were shown to contain cyt *d* and *c* as major oxidases (Barquera, et al, 1990, submitted), the high affinity K_m value results from the combined activities of cytochromes *d*, *aa₃* and *c*.

In contrast to the above results, membranes of cells obtained from static anaerobic cultures showed mainly one single kinetic component, with either NADH (Fig. 1D) or TMPD (not shown); it had a K_{m app} value of 3 μM that according to the spectroscopic examination

of this type of membranes (Fig.3) roughly corresponds to d-type cytochrome oxidase. Traces of the low affinity component could be also detected. Thus cells obtained from anaerobic-static cultures do not seem to express significant quantities of the low affinity component.

For comparative purposes O_2 consumption by bacteroids was investigated. Purified bacteroids were sonicated (see Methods), and oxygen uptake were determined with NADH as substrate. Two Km components were observed, one with a Km of 7 μM and another of 29 μM (Fig. 1C). The O_2 affinity value of 7 μM , rather typical of a cytochrome oxidase, may be attributed to cytochrome *c* type oxidase, since our strain does not seem to express cyt *aa₃*, nor cyt *d* in symbiosis (not shown, Krétořich, et al, 1973; O'Brian and Maier, 1989). A low affinity component, as is the case of aerobic or microaerophilic cultures (Km app = 72 -80 μM) could not be detected in bacteroids, instead a kinetic component with a Km = 29 μM was detected, this might be related to a cyt *c* which has been proposed (Appleby, 1978) to function as oxidase in bacteroids.

Validation of our O_2 -uptake kinetics determinations requires to consider some technical limitations of the Clark O_2 electrode: i) \rightarrow Time response of the electrode is large ($t_{1/2} = 35$ sec) making this method more suitable to record O_2 concentration under steady-state conditions (De Hollander and Stouthamer, 1983). ii) O_2 reaction rate at the electrode is faster than O_2 diffusion rate through the medium, and this factor becomes critical at low oxygen concentrations, therefore Km O_2 values obtained for cyt-oxidases, by this method are overestimated (De Hollander, and Stouthamer, 1983). iii) Km O_2 values reported for bacterial cytochrome oxidase ranged between 0.002 to 10 μM , thus near to the sensitivity limit of the standard polarographic technique (Focle, 1983). Due to a limitation of the experimental

system, we could not evaluate the contribution of individual cytochrome oxidases (cyt aa_3 , c and d) in *R. phaseoli*, in the diverse membrane preparations assayed (Fig. 1). However, the sensitivity of the technique was adequate to distinguish the overall contribution of the cyt oxidases (K_m 3-16 μM , Fig.1), as well as the contribution of a putative alternative oxidase, with a very low O_2 affinity (K_m app= 75-80 μM).

This low O_2 affinity branch was detected (Fig.1) in membranes of aerobic and microaerophilic grown cells, with NADH or ascorbate-TMPD as electron donors, but was not detected when succinate, malate or yeast cyt c (reduced by ascorbate) were the electron donors. The low O_2 affinity branch was not detected in anaerobic grown cells, nor in bacteroids, that suggests that O_2 is involved in its expression.

Inhibitors. To gain insight about the nature of the low O_2 -affinity branch, the action of quinacrine and cyanide on the membrane respiration stimulated by NADH, ascorbate-TMPD or ascorbate-yeast cyt c was tested. To this purpose, we compared cell membranes that according to their O_2 kinetic (Fig.1) contain the low affinity component (aerobic and microaerobic free-living cultures) with membrane types that had not shown such kinetic component (anaerobic free-living cultures and bacteroids).

The inhibition by quinacrine, a flavoprotein inhibitor (O'Brian and Maier, 1983) of NADH-dependent respiration of aerobic (Fig. 2A) and microaerobic cell membranes (not shown); 50% of the activity was inhibited by 2.5 μM quinacrine, while 200 μM was required to reach 85% inhibition. Interestingly, membranes obtained from anaerobic grown cells or from bacteroid were severely inhibited by low quinacrine concentrations (i.e 80%, inhibition at 5 μM , not shown).

Oxygen uptake stimulated by ascorbate-TMPD in aerobic cell

membranes was inhibited 20% by 200 μ M quinacrine (Fig. 2B); the remaining activity was hardly affected by concentrations of to 2.5 mM) of quinacrine. However, when TMPD dependent electron flow through the cytochrome oxidase was arrested by 10 μ M KCN the remaining non-cyanide sensitive activity (20% of the total) was severely inhibited by 200 μ M quinacrine which caused 70% inhibition (Fig. 2B), as a control. quinacrine up to 2.5 mM failed to inhibit TMPD oxidase from *Bacillus cereus* (not shown) aerobic respiratory system which contains cyt a_3 and o as terminal oxidase (Escamilla, *et al.*, 1987).

O_2 uptake stimulated by exogenous cytochrome *c* in aerobic *Rhizobium phaseoli* membranes was fully insensitive to quinacrine up to 2.5 mM. Thus, the low oxygen affinity branch is not reduced by electrons from cyt *c*, and in consequence insensitive to quinacrine.

Above results led us to predict that O_2 titration curve of TMPD oxidase of aerobic *R. phaseoli* membranes in the presence of quinacrine should behave very like to the O_2 titration curve obtained with yeast cyt *c* as electron donor (Fig. 1E). The low O_2 -affinity slope previously observed (Fig. 1B) in the oxygen titration assay of TMPD oxidase was abolished when 2.5 mM quinacrine was included in the assay (Fig. 1F). The remaining electron transport inhibited one single component with a K_m app = 16 μ M. Thus the respiratory activity linked to the low O_2 -affinity component was abolished by quinacrine. These findings suggest the participation of a flavoprotein. Moreover, quinacrine failed to inhibited TMPD oxidase activity in membrane preparations obtained from anaerobic grown cells or from mature bacteroids (not shown).

It is well known that reduction of a flavoprotein can be detected spectroscopically by the bleaching of its absorption band around 450 nm. Ascorbate-TMPD minus air oxidized spectra (Fig. 3) of membranes from aerobic grown cells clearly showed a trough at 455 nm; this signal was absent in membranes obtained from anaerobic cell

membranes (Fig.3).

NADH dehydrogenase. NADH dehydrogenase activity was determined (Table 1) in membranes of aerobic, microaerophilic, anaerobic and mature bacteroids, using DCPIP ($E^{\circ} = +217$ mV), and potassium ferricyanide ($E^{\circ} = +360$ mV) as alternative electron acceptors. NADH dehydrogenase:DCPIP acceptor activity in aerobic and microaerophilic grown cells were about 60% (200 and 228 nmol of reduced DCPIP mg protein⁻¹. min⁻¹ respectively) of the maximal NADH oxidase activity in the same type of membranes (300 and 673 ng atoms of consumed O₂. mg protein⁻¹.min⁻¹, respectively). These values hardly increased when DCPIP assays were performed under anaerobic conditions (not shown), suggesting that DCPIP titrated not more than two thirds of the NADH supported electron transport. When NADH dehydrogenase was titrated with potassium ferricyanide, the resulting activity values (Table 1) were six times higher than those detected by DCPIP. Interestingly, titration of NADH dehydrogenase with DCPIP in anaerobic grown cells or mature bacteroids gave almost the same activity (i.e. 376 and 440 nmol. mg protein⁻¹.min⁻¹, respectively). Also, the NADH dehydrogenase activity level detected in anaerobic or bacteroids cells roughly corresponds to the electron transport capacity measured as NADH oxidase (i.e. 448 and 210 ng atoms of O₂. mg protein⁻¹.min⁻¹ respectively). Thus, it is suggested that the DCPIP insensitive NADH-dependent activity of aerobic and microaerophilic cell membranes could be related to the low O₂-affinity branch that is expressed in those types of cells, this is not expressed in anaerobic and bacteroid cells.

Since the experiments with the alternative electron acceptors, DCPIP and K-ferricyanide, suggested the presence of two distinct NADH dehydrogenase systems in aerobic and microaerophilic grown cells. Thus, O₂ uptake at various NADH concentrations in aerobic grown cell

membranes (Fig. 3A) and bacteroids (Fig. 3B) was determined. Hofstee plots, of the former case, showed the presence of two kinetic components, one with a $K_m \text{ app} = 16 \mu\text{M}$ that nearly correspond to the classical NADH dehydrogenase (Dancey *et al.*, 1976), and a second kinetic component with a $K_m \text{ app} = 75 \mu\text{M}$; this could correspond to the presumed alternative flavoprotein oxidase. Alternatively the appearance of the two affinities towards NADH may be due to different populations of right side and inverted membranes vesicles; however the same K_m values were obtained in sonicated (1 min, maximal output, (not shown) preparations). In the case of bacteroids membranes, the NADH-plot obtained (Fig. 4B) showed only one kinetic component with a $K_m \text{ app} = 15 \mu\text{M}$; most likely this corresponds to the high affinity dehydrogenase detected in aerobic cell membranes.

NADH oxidase photo-inactivation. (U.V. 360 nm). The above results suggested that aerobic and microaerophilic grown cells contain an alternative NADH-dehydrogenase with low affinity for NADH, and a preference for K-ferricyanide selectivity, over DCPIP, as terminal electron acceptor. To ascertain if this electron transport contained ubiquinone-cytochrome system, the effect of ubiquinone-photoinactivation (Escamilla and Benito, 1984) on the NADH oxidase activity of aerobic and anaerobic cell membranes was determined. Membrane samples were continuously irradiated (U.V. 360 nm, see Methods), and samples were withdrawn at the indicated times (Fig. 4). NADH oxidase in aerobic cell membranes was partially resistant to photoinactivation i.e. a two hour irradiation led to the inactivation of not more than 70% of the initial activity; in these samples, NADH failed to reduce to a significant extent the cytochromes (not shown). On the other hand, NADH oxidase activity in membranes of anaerobic cultured cells (Fig. 4, open symbols) was almost completely abolished after 90 min of irradiation. U.V.

photoinactivation of the two preparations studied showed no deleterious effects on NADH dehydrogenase activities (DCFIP and K-ferricyanide: acceptor activities) nor on TMPD oxidase, when compared with activities in native membranes (not shown).

The physiological role of the electron transport system here described is still out of scope, however, considering its low affinity towards NADH and its ubiquinone-cytochrome independent via to O_2 , it is tempting to suggest that this system may be acting as a futile oxidative pathway, active when ever NADH concentration levels increases above critical redox values and O_2 tension is sufficiently high.

ACKNOWLEDGEMENTS. We express our deep appreciation to Marietta Tuena and Armando Gómez-Puyou for their help and criticism during the preparation of the manuscript. We thank M.Soberon for providing nodules.

REFERENCES

- Appleby CA (1969) Electron transport of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. *Biochim Biophys Acta* 172:88-105
- Appleby CA (1978) Function of *P-450* and other cytochromes in *Rhizobium* respiration. In Degn A, Lloyd D, Hill G(ed) *Functions of alternative terminal oxidases*. Pergamon Press, New York, pp 11-20
- Chakrabarti S, Mishra AK, Chakrabarti PK (1987) Cytochromes in free-living *Rhizobia*. *Current Microbiol* 15:165-170
- Dancey GF, Levine AE, Shapiro BM (1976) The NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254: 5911-5920

- De Hollander JA, Stouthamer AH (1980) The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*. Eur J Biochem 111:473-478
- Dixon ROD (1972) Hydrogenase in legume root nodules bacteroids: occurrence and properties. Arch Microbiol 85: 193-201
- Emerich DW, Ruiz-Argüeso T, Russell SA, Ching TM, Evans JJ (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. J Bacteriol 137: 153-160
- Escamilla JE, Benito MC (1984) Respiratory system of vegetative and sporulating *Bacillus cereus*. J Bacteriol 160: 473-477
- Escamilla JE, Ramírez R, del Arenal IP, Zarzoza G, Linares V (1987) Expression of oxidases in *Bacillus cereus*. Effects of oxygen tension and carbon source. J Gen Microbiol 133: 3549-3555
- Ghisla S, Massey V (1989) Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions. Eur J Biochem 181: 1-17
- Klingenberg M (1979) The ferricyanide method for elucidating the sidedness of membrane-bound dehydrogenase. Meth in Enzymol LVI: 229-233
- Kretovich VL, Romanov VI, Korolev AV (1973) *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). Plant Soil 39: 619-634
- Malmström BG (1982) Enzymology of oxygen. Ann Rev Biochem 51: 21-59
- Markwell MAK, Haas SM, Tolbert NE, Bieber LL (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. Method in Enzymol 72: 296-303
- Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J, Cevallos MA (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J Bacteriol 158: 148-155
- O'Brian MR, Maier RJ (1983) Involvement of cytochromes and a flavoprotein in hydrogen oxidation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. J Bacteriol 155: 481-487
- O'Brian MR, Maier RJ (1989) Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium*-legume symbiosis. Biochim Biophys

Acta 974: 229-246

Poole RK (1983) Bacterial cytochrome oxidase. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. Biochim Biophys Acta 726: 205-243

Reibach PH, Mask PL, Streater JG (1981) A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. Can J Microbiol 27: 491-495

Soberón M, Williams HD, Poole RK, Escamilla E (1989) Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. J Bacteriol 171: 465-472

Thöny-Meyer L, Stax D, Hennecke D (1989) An unusual gene cluster for the cytochrome bc_1 complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. Cell 57: 683-697

LEGENDS FOR FIGURES

Fig.1 Hofstee plot of the substrate O_2 uptake kinetics of *R. phaseoli* (CFN42 or CE3) membranes. Activity was measured polarographically in 3 ml cuvettes as stated in Material and Methods, varying O_2 concentration.

A. NADH oxidase activity from log-aerobic cell membranes (CFN42). 1 mg membrane protein was incubated in the presence of 5 mM NADH.

B. TMPD oxidase activity from log-aerobic cell membranes (CFN42). 1 mg membrane protein was incubated in the presence of 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD.

C. Cytochrome *c* oxidase activity of *R. phaseoli* log aerobic membranes. 1 mg membrane protein was incubated with 150 μ M yeast cytochrome *c* and 10 mM ascorbate. Activity was determined in 50 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine- N-2-ethanesulfonic acid) buffer pH 7.4.

D. NADH oxidase from anaerobic cell membranes, kinetic patterns was measured similar to A.

E. NADH oxidase from sonicated bacteroids. 1-5 mg bacteroids were used with 5 mM NADH. Bacteroids were prepared as stated in Material and Methods.

F. TMPD oxidase from log aerobic cell membranes in the presence of 2.5 mM quinacrine. Activity was measured similar to B.

Fig.2A. Effect of quinacrine on NADH oxidase activity of *Rhizobium phaseoli* (CFN42 or CE3) aerobic cell membranes. 0.5 mg membrane protein were used and 5 mM NADH. Quinacrine was dissolved in 50 mM Tris-HCl pH 7.

Fig.2B. Quinacrine titration of ascorbate-TMPD oxidase activity of *Rhizobium phaseoli* (CE3) aerobic cell membranes. 1mg of membrane protein was stimulated with 10 mM ascorbate- 0.1 mM TMPD in the

presence of indicated quinacrine concentrations. (●---● without KCN; ○---○ 10 μ M KCN).

Fig.3. Ascorbate-TMPD dependent reduction pattern of cytochrome in membrane particles of *R. phaseoli* (CFN42). Samples (5 mg membrane protein) were incubated 20 min at room temp., with 10 mM ascorbate plus 0.1 mM TMPD. The spectra were recorded against air oxidized references. Trace A. Anaerobic cell membranes. Trace B. Log-aerobic cell membranes.

Fig. 4.A. Kinetics of NADH-dependent activity (NADH oxidase) of *R. phaseoli* (CFN42 or GE3 strains) aerobic cell membranes. 1 mg of membrane protein was used. Hofstee plot is shown.

4B. Kinetics of NADH-dependent activity (NADH oxidase activity) of *Rhizobium phaseoli* (CFN42 strain) sonicated bacteroids. 0.4 mg of bacteroid protein were used. Hofstee plot is shown.

Fig. 5. Effect of UV-light ubiquinone inactivation over NADH oxidase activity. *Rhizobium phaseoli* (CFN42) aerobic or microaerobic cell membranes, (●---●) ; anaerobic cell membranes, (○---○). In both cases 1 mg of membrane protein and 5 mM NADH were used.

TABLE 1. NADH DEPENDENT ACTIVITIES^a IN MEMBRANE PREPARATIONS
OF *Rhizobium phaseoli* (CFN42).

PREPARATION	Acceptor:			RATIO (2/1)
	O ₂	DCPIP (1)	FERRICYANIDE (2)	
Aerobic grown cells	300	200	1200	6
Microaerophilic grown cells	673	228	1450	6
Anaerobic grown cells	448	376	440	1.1
Mature bacteroids ^b	210	265	310	1.1

a. Activity with DCPIP and ferricyanide is expressed as nmol of reduced electron acceptor. mg protein⁻¹.min⁻¹ and for the oxidase activities as n gram atom of O₂. mg protein⁻¹.min⁻¹. Culture procedures and activity assays were performed as described in Methods.

b. Mature bacteroids, 21 days old bacteroids.

Fig 1

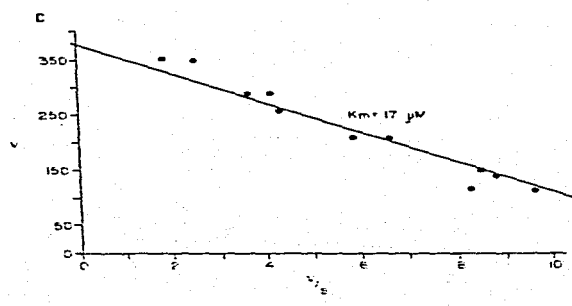
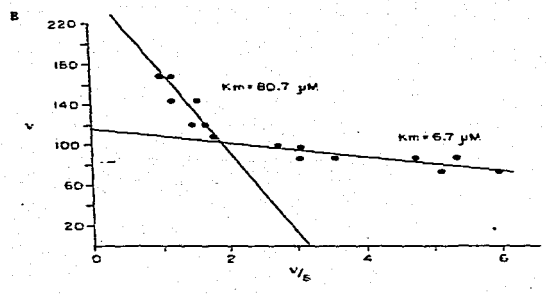
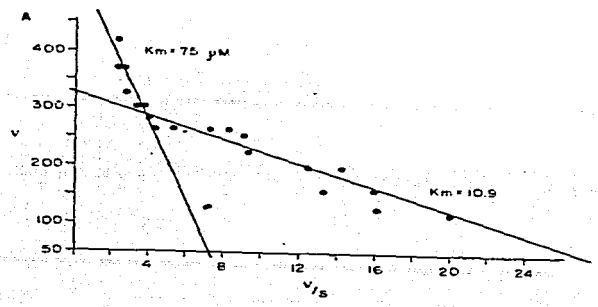


Fig 1

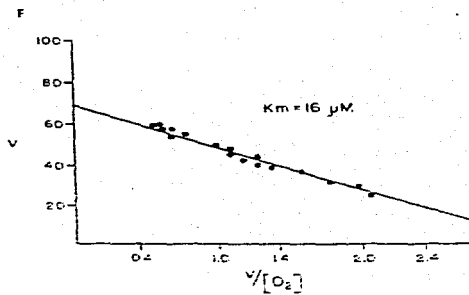
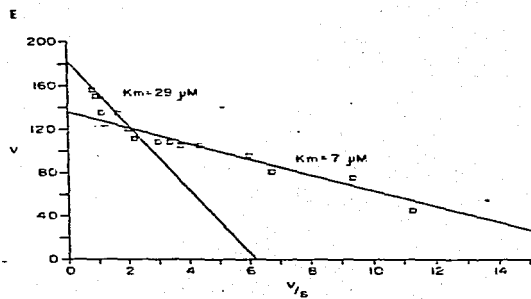
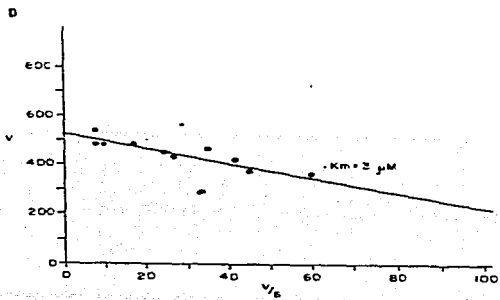
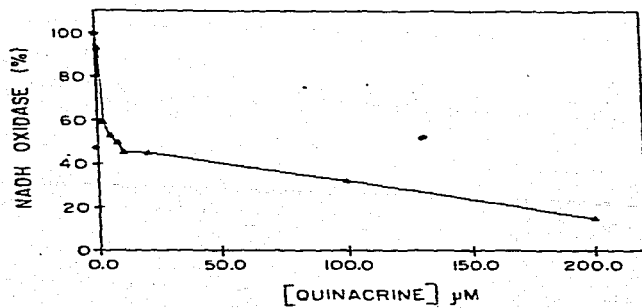


Fig 2

A



B

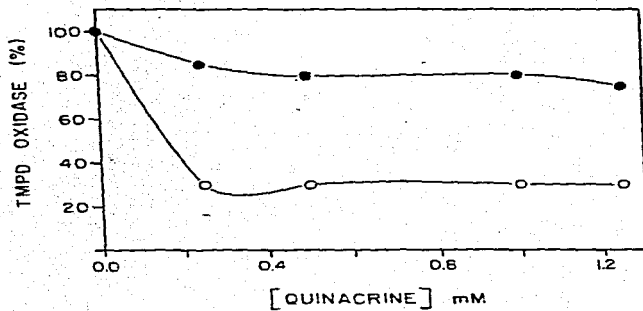


Fig 3

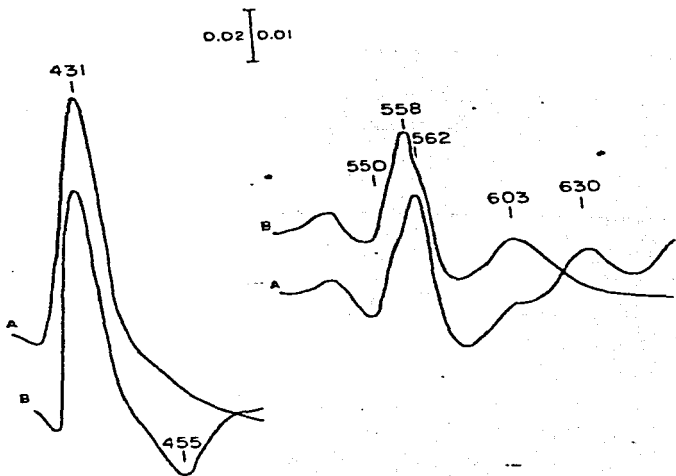


Fig 4

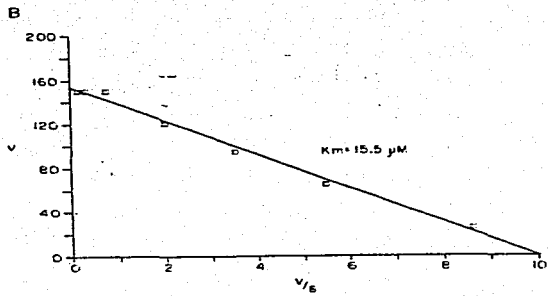
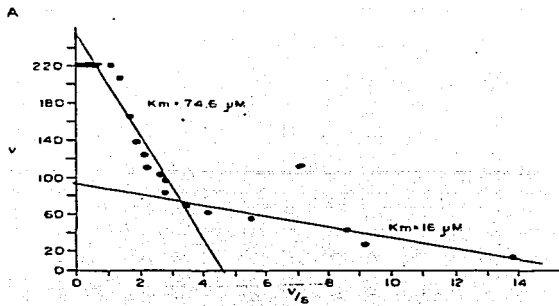


Fig 5

