

1993
10/10/93

11261
3
EJ2

**Germinación y respiración de esporas de
Bacillus cereus en medios orgánicos
apolares**

*Tesis que para obtener el grado de Maestro
en Ciencias Biomédicas en Biología Molecular
presenta la Q.F.B.*

Martha Lucinda Contreras Zentella

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

<i>ABREVIATURAS</i>	<i>i</i>
<i>INTRODUCCION</i>	
Generalidades Sobre Enzimología Micelar	1
Métodos de Transferencia de Proteínas a Micelas Invertidas	5
Estructura de las Micelas Invertidas Conteniendo Proteínas y Otros Solutos	7
Regulación de la Actividad Catalítica de Enzimas Solubilizadas en Micelas Invertidas.	10
Sistemas Enzimáticos Concatenados en Micelas Invertidas	11
<i>ANTECEDENTES</i>	
Determinación Polarográfica de la Concentración de Oxígeno en Sistemas de Micelas Invertidas	15
Respiración en Solventes Apolares	16
Respiración de Células Enteras en Solventes Orgánicos	17
Germinación de Esporas	18
Cambios Morfológicos Asociados con la Germinación	21
<i>OBJETIVOS</i>	24

MATERIALES Y METODOS

Titulación Polarográfica de Oxígeno en Solventes Orgánicos.	26
Obtención de Esporas	28
Transferencia de Esporas al Sistema de Micelas Invertidas	29
Microscopia Electrónica	30
Determinación de la Viabilidad de Células Germinadas por Plaqueo	31
Efecto de Inhibidores de la Cadena Respiratoria Sobre la Respiración Endógena	33
Efecto de un Segundo Detergente en el Sistema Micelar Sobre la Respiración Endógena	33

RESULTADOS

Titulación Polarográfica de Oxígeno en Solventes Orgánicos	35
Efecto del Volumen de la Poza de Agua Sobre la Solubilidad de Oxígeno	36
Actividad Respiratoria de Esporas Germinadas en Solventes Orgánicos	38
Cambios Morfológicos Asociados a la Germinación de Esporas	41
Sensibilidad a Inhibidores de la Respiración	42

Efecto de un Segundo Detergente Sobre el	
Sistema Micelar	43
<i>DISCUSION</i>	46
<i>CONCLUSIONES</i>	55
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	56

ABREVIATURAS

AcCoA: Acetil coenzima A.

ADP: adenosina difosfato.

AMP: Adenosina monofosfato.

AOT: Bis (2-etil hexil) succinato de sodio.

ATP: Adenosina trifosfato.

ATPasa: Adenosina trifosfatasa.

CoA: Coenzima A.

CO₂: Dióxido de carbono.

CTP: Citidina trifosfato.

CTAB: Bromuro de hexadecil trietil amonio.

D: Daltones.

GTP: Guanosina trifosfato.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HOQNO: N-oxido de 2-n heptil 4 hidroxiquinoleina.

KCN: Cianuro de potasio.

Log P: Coeficiente de partición de un solvente dado en una mezcla equimolar de octanol-agua; índice de la polaridad de un solvente dado.

M: molar.

m: mili

μ: micro.

η: nao.

NAD⁺: Nicotinamida de adenina dinucleótido oxidado.

NADH: Nicotinamida de adenina dinucleótido reducido.

NADP⁺: Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato oxidado.

NADPH: Nicotinamida de adenina dinucleótido fosfato reducido.

Na₂N₂S₂O₄: ditionita de sodio.

UTP: Uridina trifosfato.

Wo: Relación molar entre el agua y el tensoactivo.

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE ENZIMOLOGIA MICELAR

El estudio de enzimas "in vitro" ha sido tradicionalmente conducido en soluciones acuosas diluidas. En la célula viva, sin embargo, una vasta mayoría de enzimas actúan sobre la superficie de las membranas o en el interior de ellas (41). Inclusive aquellas enzimas consideradas como libremente difusibles actúan en un medio citoplásmico cuyas propiedades fisicoquímicas están lejos de las soluciones acuosas utilizadas en la enzimología clásica. Si consideramos parámetros fisicoquímicos como la viscosidad, se ha demostrado que proteínas inyectadas en el citoplasma de células vivas difunden muy lentamente como si se estuvieran moviendo en un medio con sacarosa al 60 % (42). Esta alta viscosidad aparente, del medio celular, ha sido explicada por algunos como consecuencia de las restricciones estéricas impuestas a la difusión de macromoléculas por el retículo endoplásmico (43). Sin embargo en el interior de los eritrocitos, los cuales carecen de microestructura intracelular, se ha encontrado que la difusión del agua es lenta y el hecho parece ser debido a que en el citoplasma, ésta se encuentra altamente estructurada.

Las propiedades del agua cercana a una interfase son muy diferentes de las propiedades del agua libre y por esto existen razones para considerar que muchos estudios enzimológicos adicionales sobre la conducta de las enzimas en soluciones acuosas,

proveen imágenes imperfectas de la realidad biológica (6). A este respecto Klivanov (32) puntualiza que el agua es absolutamente requerida para la función catalítica de las enzimas, ya que participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes en una proteína (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals), que mantienen la conformación nativa y catalíticamente activa de una enzima. La pregunta sería ¿cuanta agua es necesaria para alcanzar la conformación óptima y la catálisis máxima?. Klivanov (32) ha realizado estudios con enzimas "desnudas" en solventes orgánicos y sus resultados sugieren que se requiere el equivalente a una o unas pocas capas de agua de solvatación para preservar la actividad catalítica en solventes apolares; es muy probable que esa agua asociada no se encuentre distribuida uniformemente alrededor de la enzima, sino en múltiples capas a unos pocos agrupamientos polares de la superficie enzimática.

Para simular "in vitro" las condiciones bajo las cuales las enzimas operan "in vivo", J. Hanan desarrolló en 1952 (22) el modelo de las micelas invertidas en solventes orgánicos lo que permitió que se iniciara un área de investigación atractiva con el estudio de enzimas en soluciones coloidales de agua en solventes orgánicos apolares, estabilizados con compuestos anfifílicos.

Como ya mencionamos, las propiedades fisicoquímicas de la "poza de agua" difieren en muchos aspectos de las propiedades del "agua libre", y dependen del grado de hidratación de las micelas (40, 57). Una micela invertida se ha definido como una "gota de agua" de

entre 20 a 200 Å de diámetro, rodeada de una monocapa de moléculas de tensoactivo. Las cabezas cargadas con sus respectivos contra-iones están localizadas en el interior del agregado, mientras que las colas hidrofóbicas están orientadas hacia la fase continua del solvente orgánico. El agua, los solutos hidrofílicos y solventes miscibles en agua, están solubilizados dentro de la micela, en la "poza de agua". Con estos sistemas es posible generar diferentes y bien definidos microambientes, los cuales afectan las propiedades de la enzima que se encuentra en la micela.

El término "micela invertida" define mejor a pequeños agregados con bajo contenido de agua; si usamos el parámetro W_o , que representa la relación molar entre el agua y el tensoactivo para definirla, el límite superior sería de 15 para micelas invertidas. A valores de W_o mayores es más apropiado usar el término "microemulsión agua-aceite" o simplemente "microemulsiones"; que son sistemas ternarios que contienen importantes cantidades de agua.

Las propiedades fisicoquímicas de la "poza de agua" de las micelas invertidas y las microemulsiones son diferentes. A pesar de ello, en la práctica se acepta usar el término "micelas invertidas" para referirse a ambos sistemas.

Las micelas invertidas en solventes orgánicos se forman espontáneamente por la adición de tensoactivo y la cantidad adecuada de agua. Se ha reportado el uso de una gran variedad ellos de: aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos; los más utilizados han sido el AOT (bis (2-etilhexil) succinato de sodio), como aniónico, el CTAB (bromuro de hexadeciltriethyl amonio), como

catiónico y derivados no iónicos de tween, span y polioxietilentalcoholes (7, 40). Recientemente han sido utilizados también los fosfolípidos naturales o sintéticos, por ser constituyentes naturales de las membranas biológicas (23).

Se han utilizado varios solventes orgánicos como medios dispersantes, los más comunmente usados son el n-octano, el isoctano, el benceno y el heptano. La adición de un cotensoactivo como el alcohol bencilico, el colesterol o el hexanol es requerida en algunos casos para facilitar la formación de la micela invertida (23, 55). Debido a que los sistemas basados en AOT no requieren de cotensoactivo para su estructuración, estos han sido los más estudiados (40).

Es notorio que los estudios reportados principalmente se han enfocado a enzimas hidrofílicas (30, 31), si se compara con los pocos estudios reportados para enzimas de superficie o enzimas de membranas. Entre las enzimas hidrofílicas más estudiadas se encuentran la lisozima, la tripsina, la α -quimotripsina, la ovoalbumina, la alcohol deshidrogenasa, y la γ -globulina (30, 31); entre las enzimas de superficie la peroxidasa (33) y la lipasa (31) y entre las enzimas de membrana la citocromo c oxidasa (16,18) y la ATPasa (3,4,36).

De acuerdo a los reportes hay muchos casos de enzimas que en condiciones óptimas de ensayo retienen solo una parte de su actividad catalítica medida en agua, como son la ATPasa, o la enoato reductasa (4, 54); en algunos otros casos se han obtenido en el medio orgánico actividades catalíticas muy semejantes a las

observadas en medio acuoso (β -hidroxilesteroido deshidrogenasa) (24); finalmente en algunas enzimas específicas como la peroxidasa (33), la fosfatasa ácida, la α -quimotripsina y la lacasa (8) se observan actividades catalíticas medida en el seno del solvente orgánico de varios ordenes de magnitud mayores que las obtenidas en medio acuoso. Este fenómeno se conoce como "superactividad".

Debido a que las proteínas transferidas a soluciones coloidales de agua en solventes orgánicos son ópticamente transparentes, se facilita su estudio por técnicas espectroscópicas. Sin embargo, el creciente interés en la enzimología micelar demanda el uso de un gran número de técnicas cuantitativas para la medición de actividades enzimáticas en el seno de solventes orgánicos.

MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MICELAS INVERTIDAS.

Se han reportado tres métodos para transferir y solubilizar proteínas a soluciones de micelas invertidas. (31,36,37,42). En todos los casos el proceso se inicia con una solución de tensoactivo (y cotensoactivo si fuera necesario), en el solvente orgánico. La proteína puede ser incorporada de tres diferentes maneras:

a) El método de microinyección consiste en agregar por medio de una microjeringa un pequeño volumen de una solución acuosa concentrada de la enzima a la solución de tensoactivo en solvente orgánico (solución micelar).

b) El método de transferencia en dos fases es aquel en el que el

sistema contiene volúmenes similares de una solución de micelas invertidas y una solución acuosa de la proteína.

c) En el método de transferencia en estado sólido se añade la proteína en estado seco al sistema micelar conteniendo una cantidad conocida de agua. La solubilización de las proteínas se optimiza por agitación vigorosa, hasta que el equilibrio termodinámico es alcanzado.

En el caso de los métodos de microinyección y estado sólido, el punto final de la solubilización es usualmente alcanzado en el rango de segundos a minutos, mientras que en el método de transferencia en dos fases, el equilibrio puede requerir horas (30, 33, 36). Este método puede ser acelerado aplicando sonicación (baño de sonicación) durante unos pocos segundos a minutos, para que el proceso de solubilización ocurra (3), cuidando de que no se produzca desnaturalización de la proteína causada por sonicar demasiado tiempo. Un riesgo en los métodos de microinyección y transferencia de fase sólida es la saturación con agua o con proteína, ya que el agua en exceso da preparaciones turbias; la turbidez puede ser eliminada pasando una corriente de nitrógeno sobre la preparación micelar hasta que se obtiene una solución clara (3). La proteína no disuelta es eliminada por centrifugación a baja velocidad. En el método de transferencia en dos fases, la fase orgánica (superior), conteniendo la proteína transferida, es recuperada con una pipeta Pasteur. Las ventajas y desventajas asociadas a los diferentes métodos de transferencia han sido muy discutidos (35, 40). El método de transferencia en dos fases, además del largo tiempo requerido

para alcanzar el equilibrio, tiene la desventaja de que no es posible controlar la cantidad de agua y proteína transferida de la fase acuosa a la fase orgánica y ésta solo puede ser conocida hasta el final del proceso. En contraste, los métodos de transferencia en estado sólido y de microinyección permiten controlar tanto la cantidad de agua como la concentración de proteína transferidas. De cualquier manera, la concentración de la proteína atrapada dentro de la solución micelar puede ser fácilmente determinada por métodos espectroscópicos.

ESTRUCTURA DE LAS MICELAS INVERTIDAS CONTENIENDO PROTEINAS Y OTROS SOLUTOS.

Los procesos de solubilización de enzimas en sistemas micelares resultan en la formación de micelas invertidas conteniendo proteínas hidratadas, sin importar el método que se utilice para solubilizar. Las enzimas están atrapadas en la cavidad acuosa interna de las micelas, rodeadas por una capa de agua y la "cubierta" de tensoactivo que protege a la enzima de la inactivación por el solvente; usualmente la micela contiene una sola molécula de enzima (5). Existe, sin embargo, una gran controversia en cuanto a la organización estructural de la micela invertida. En este momento hay dos modelos postulados:

El modelo de capa de agua (water-shell) propuesto por Luisi y col (5,39,59) en el que se propone que el atrapamiento de la molécula de

enzima está invariablemente acompañada por un aumento del tamaño micelar y que una micela llena contiene más moléculas de tensoactivo y agua que una micela vacía; esto es el resultado de una redistribución de los componentes micelares entre las micelas vacías y las micelas llenas (Fig. 1 A). Un modelo alternativo propuesto por el grupo de Martinek (35, 48), postula que el incremento en el tamaño micelar ocurre solamente cuando la cavidad interna de la micela vacía es más pequeño que el tamaño de la molécula de la proteína contenida (Fig 1 C); en este caso la proteína atrapada puede dar un incremento en el número de agregación así como en el grado de hidratación del tensoactivo. Por el otro lado, si el tamaño de la cavidad acuosa es mayor o aproximadamente igual al de la molécula de la proteína, proponen, en contraste con el modelo de Luisi y col, que la proteína atrapada podría no dar incremento sustancial en el tamaño de la micela invertida (Modelo de tamaño fijo Fig 1 B). Por determinaciones por ultracentrifugación se ha confirmado la validez del modelo de tamaño fijo para enzimas hidrofílicas como la tripsina, la quimotripsina, la lisozima, la albúmina de huevo, la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo y la γ globulina, en donde se ha determinado que el aumento en el tamaño micelar, si es que se produce, no es más del 10 % del tamaño inicial de la micela, aún cuando la molécula de la proteína y la cavidad acuosa de la micela inicial fueran del mismo tamaño. Las micelas conteniendo proteína tienen prácticamente el mismo número de moléculas tanto de tensoactivo como de agua, en comparación a las micelas vacías (36,49).

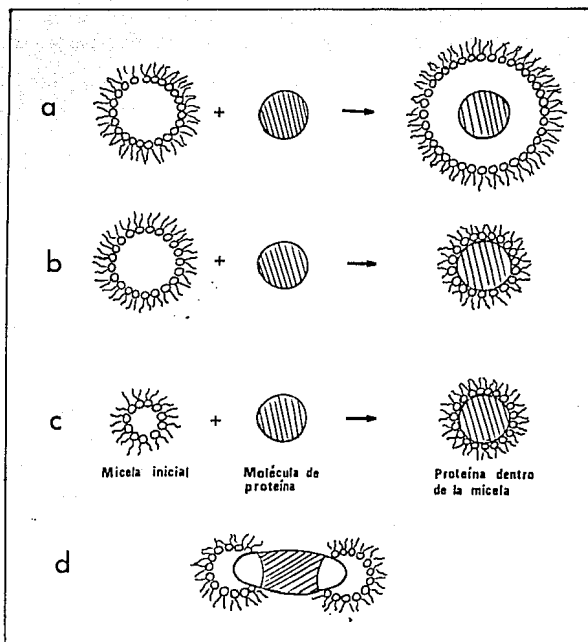


FIGURA 1. MODELOS PARA LA SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN MICELAS INVERTIDAS. a) Modelo de la "capa de agua". $R_{mp} > R_m$ y $r_{mp} > r_p$, independientemente de la relación r_p/r_m . b) Modelo de la inducción del tamaño adecuado. $R_{mp} > R_m$ y $r_{mp} \approx r_p$, cuando $r_p > r_m$. c) Modelo del tamaño fijo. $R_m \approx R_{mp}$, cuando $r_p \leq r_m$. d) Micelas invertidas conteniendo proteínas hidrofóbicas.

r_p : radio de la proteína; R_m : radio externo de la micela vacía; r_m : cavidad interna de la micela vacía; R_{mp} : radio externo de la micela conteniendo proteína; r_{mp} : radio de la cavidad interna de la micela conteniendo la proteína.

En cuanto a proteínas de superficie, que interaccionan fuertemente con la interfase micelar, se ha estudiado en sistemas micelares conteniendo AOT como tensoactivo, la proteína básica de mielina, que aunque no cumple completamente con el modelo de tamaño fijo, bajo ciertas condiciones permite que la validez del modelo sea confirmada (9). Cuando se han solubilizado enzimas integrales de membrana como la bacteriorodopsina y la porina (45,56), en sistemas de micelas invertidas, se induce la formación de agregados micelares en forma de casquetes en los cuales las partes polares de las moléculas de enzima orientan parches de tensoactivo hidratado en los polos, mientras que las partes hidrofóbicas de la proteína están en contacto libremente con el solvente orgánico (Fig. 1 D).

Los solutos añadidos al sistema micelar se localizarán en el sistema de micelas invertidas dependiendo de su naturaleza (48). Los solutos hidrofóbicos se localizarán en promedio únicamente en la fase hidrocarbonada (Fig 2 A y B), es decir, permanecerán fuera de la cavidad acuosa de la micela invertida, estando o no en contacto con la micela dependiendo del grado de hidrofobicidad del soluto; si el soluto añadido es hidrofílico, se localizará inmerso en la poza acuosa micelar, o dentro de ella y en contacto con la interfase dependiendo de su interacción con las cabezas polares del tensoactivo (Fig 2 C y D) Si el soluto añadido tiene propiedades de tensoactivo, es posible que se localice en la interfase de la micela invertida (Fig.2 E). Por otro lado, Menger y Yamada (44) proponen la existencia de solutos que son capaces de formar sus propios agregados, induciendo la formación de pequeñas micelas invertidas en

cuyo caso existieran dos poblaciones de micelas en el sistema (Fig 2 F).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE ENZIMAS SOLUBILIZADAS EN MICELAS INVERTIDAS

EFECTO DEL GRADO DE HIDRATACION (W_0).

Uno de los efectos observados más notables cuando se estudian enzimas solubilizadas en micelas invertidas, es el de la dependencia de la actividad catalítica de la enzima en relación al grado de hidratación del sistema micelar. Esta dependencia ha sido observada para todas las enzimas estudiadas en sistemas de micelas invertidas (31,42). A menudo, esta dependencia es en forma de campana, con un valor de W_0 al cual la actividad catalítica de la enzima solubilizada es máxima. El valor óptimo de W_0 depende de la naturaleza de la enzima y del tensoactivo. Para explicar la dependencia en forma de campana que se observa para la actividad catalítica con el W_0 , es importante recalcar que W_0 es el parámetro que determina el tamaño de la poza acuosa de las micelas invertidas; a mayor W_0 se da el mayor tamaño de la poza acuosa (13). Al analizar los datos de las curvas que representan esta dependencia se ha determinado que la mayor actividad enzimática se encuentra a valores de W_0 que corresponden a micelas invertidas con el tamaño de cavidad interna muy cercano al tamaño de la molécula de enzima; ésta condición obliga a la enzima a mantenerse en su estado

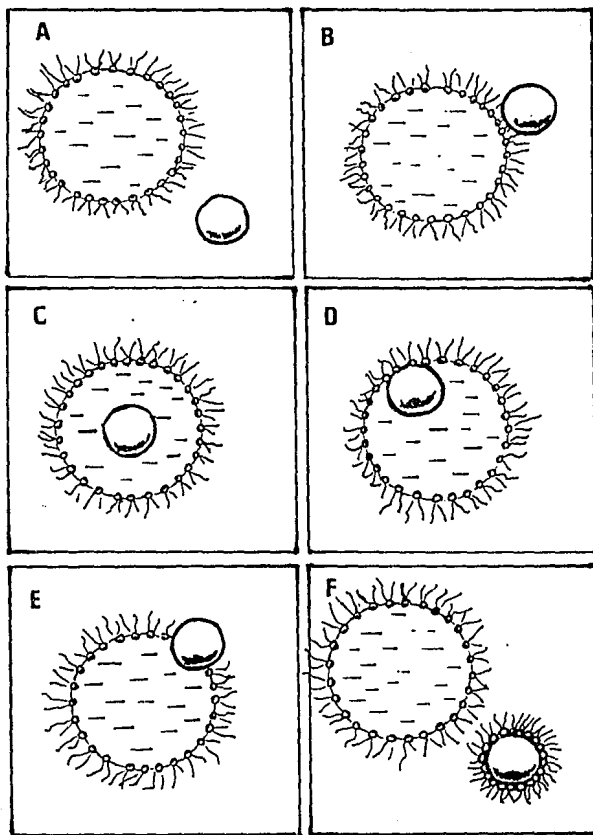


FIGURA 2. MODELO DE LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES DE SOLUTOS EN MICELAS INVERTIDAS. a y b) Localización de solutos hidrofóbicos. c y d) localización de solutos hidrofílicos. e) Solutos localizados en la interfase y que actúan como tensoactivo. f) Solutos capaces de formar sus propios agregados.

conformacional de máxima actividad por estar la molécula más rígida o "congelada".

SISTEMAS ENZIMATICOS CONCATENADOS EN MICELAS INVERTIDAS.

La dinámica de los sistemas micelares permite el rápido intercambio de sus contenidos; al menos así sucede para los solutos de bajo peso molecular (24). Este rápido intercambio permite considerar al agua micelar como una pseudofase continua, que no es limitante para la velocidad de una reacción enzimática (8), ya que los contenidos micelares de bajo peso molecular entran rápidamente en equilibrio.

De esta manera las enzimas atrapadas en sistemas de micelas invertidas pueden intercambiar sustratos, productos, coenzimas, factores metálicos, inhibidores, etc. Así, es posible llevar al cabo reacciones multienzimáticas en secuencia, a partir de enzimas atrapadas, por separado, en micelas invertidas. Las enzimas así atrapadas, son capaces de intercambiar productos y sustratos, actuar en secuencia y llegar a un producto final. Aparte del interés académico de un sistema multienzimático en micelas invertidas, también existe un interés industrial, sobre todo en lo que respecta a los procesos de biotransformación de esteroides, donde sustratos y productos son insolubles en agua.

Un prerrequisito para la aplicación industrial de enzimas es que muestren una actividad catalítica alta y que la conserven por largos

períodos; de las enzimas que cumplen con estas características las oxidorreductasas son las más comunes. Este tipo de reacciones involucran coenzimas, que son consumidas durante la catálisis, lo que provoca el encarecimiento de la reacción enzimática. Hilhorst y col (25,26) han postulado algunos sistemas enzimáticos concatenados funcionando en micelas invertidas, que permiten la regeneración de aceptores de electrones, entre ellos coenzimas.

En la figura 3 A se muestra uno de los sistemas postulado por este grupo (23); se plantea un sistema altamente organizado que permite un eficiente acoplamiento entre la hidrogenasa y un sistema fotoquímico, que produce equivalentes reductores y protones necesarios para la función de la enzima. Este modelo resulta de interés para el estudio de procesos naturales como la fotosíntesis, e inicia la investigación de fotoquímica en sistemas micelares, teniendo aplicaciones potenciales para la conversión y almacenaje de energía solar, donde es esencial la separación de los fotoproductos formados en las reacciones de transferencias de electrones; esto se logra por fotosensibilización vectorial de un electrón transferido de un donador en la fase orgánica, el tiofenol, al través de un sensibilizador formado por un complejo tensoactivo-Ru²⁺, localizado en la interfase, que permite la transferencia de electrones hasta un aceptor en la poza de agua, el metil viológeno. La hidrogenasa toma los electrones del metil viológeno reducido, produciendo hidrógeno y permitiendo el reciclamiento del aceptor. El tiofenol, tiene propiedades únicas que le permiten funcionar como donador de electrones; su escasa polaridad le permite entrar a la interfase;

una vez oxidado se torna más polar, facilitándose su extracción de la fase orgánica; este hecho permite la separación de los fotoproductos, lo que confiere al sistema micelar ventajas de tipo económico para su utilización a nivel industrial.

Otro de los sistemas enzimáticos concatenados postulados por el grupo de Hilhorst (23), es aquel en el que combinan un sistema regenerador de NADH, que se puede utilizar en un medio micelar en combinación con una enzima que utiliza NADH, para la conversión de un esteroide apolar (figura 3 B). Al permitirse la regeneración de la coenzima dentro del sistema, la catálisis enzimática se vuelve económicamente atractiva para la industria. El hidrógeno burbujeado dentro del sistema micelar es utilizado por la hidrogenasa para reducir el metil viológeno; la lipoamina deshidrogenasa consume dos de los radicales del metil viológeno reducidos para generar NADH a partir de NAD^+ , que se formó por la acción de la β hidroxilesteroides deshidrogenasa sobre el cetoesteroide, formándose β hidroxilesteroides. El acoplamiento de estas reacciones da el reciclamiento, tanto del metil viológeno como del NAD^+ , mientras el hidrógeno se consume.

Los sistemas concatenados incluidos en sistemas de micelas invertidas ofrecen varias ventajas para conversiones enzimáticas sobre todo de compuestos apolares, en relación a otros sistemas que han sido descritos (25): son sistemas termodinámicamente estables, fáciles de preparar, permiten una gran actividad y estabilidad enzimática, son capaces de permitir la regeneración de cofactores, su composición puede ser modificada según los requisitos

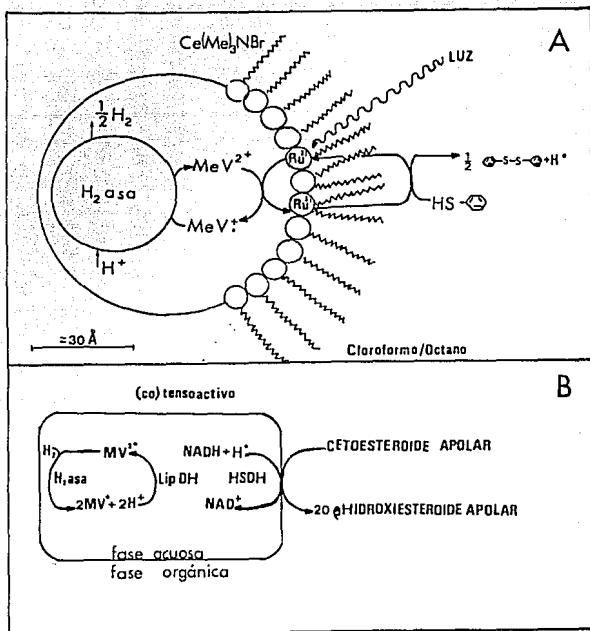


FIGURA 3. A. ESQUEMA DE LA PRODUCCION DE HIDROGENO CATALIZADA POR HIDROGENASA EN MICELAS INVERTIDAS. MeV^{2+}/MeV^+ par redox del metil viológeno. Ru^{2+} y Ru^{3+} son las formas reducidas y oxidadas respectivamente del complejo tensoactivo sensibilizado. $Ce(Me)_3Br$: bromuro de cetiltrimetil amonio.

B. ESQUEMA DE LA REGENERACION DE NADH, DADA POR HIDROGENO Y LA SUBSECUENTE REDUCCION DE UN ESTEROIDE APOLAR EN MEDIO MICELAR. Para esquematizar se dibujan todos los componentes solubles en agua dentro de una micela, aunque en realidad los componentes están distribuidos entre todas las micelas, produciendose un rápido intercambio entre ellas. MV^{2+}/Me^+ par redox del metil viológeno; H_2asa : hidrogenasa; LipH: lipoamida deshidrogenasa; HSDH: 20 β hidroxiesteroide deshidrogenasa.

particulares deseados y no hay limitación de difusión; estas características hacen que los sistemas de micelas invertidas sean potencialmente aplicables para la industria.

ANTECEDENTES

DETERMINACION POLAROGRAFICA DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO EN SISTEMAS DE MICELAS INVERTIDAS

La polarografía de oxígeno en el seno de solventes orgánicos es una técnica recientemente reportada (17,27), la cual tiene aplicación potencial en la enzimología micelar. La técnica fue descrita originalmente en nuestro laboratorio y fue aplicada para el estudio de la reacción de catalasa en un sistema de AOT-tolueno-agua (17).

Se ha reportado también el uso de sondas fluorescentes de pireno para determinar el contenido relativo de oxígeno, como función de la distancia aparente entre el centro de micelas invertidas de alquilbencensulfonato de calcio en n-heptano (29). Se concluye que el oxígeno forma un gradiente de concentración menor en la fase acuosa discontinua y varias veces mayor en la fase orgánica continua. Wong y col. (58), usando técnicas fluorescentes exploraron la naturaleza del centro acuoso de las micelas invertidas y encontraron que la solubilidad del oxígeno en micelas de AOT en heptano era cercana a la obtenida en agua pura. Así, aquellas reacciones que involucran oxígeno y tienen lugar en el centro de la micela ocurren bajo tensiones de oxígeno más típicas de soluciones acuosas, mientras que la fase orgánica continua que rodea a la micela tiene una alta capacidad de solubilización para el oxígeno, actuando así, como un reservorio o amortiguador de oxígeno.

RESPIRACION EN SOLVENTES ORGANICOS APOLARES.

Una de las aplicaciones más interesantes de la técnica polarográfica para determinación de oxígeno en cinéticas enzimáticas en el seno de solventes orgánicos, es el estudio de las actividades de la cadena respiratoria usando oxígeno como aceptor final de electrones.

Existen muy pocos antecedentes de estudios realizados con componentes de la cadena respiratoria en solventes orgánicos. Estudios hechos con citocromo c en micelas invertidas indicaron la posibilidad de que se lleven al cabo reacciones de oxido-reducción que involucran componentes fisiológicos de la cadena respiratoria (12). En estos estudios hay evidencias que demuestran que el citocromo c en micelas invertidas conserva sus propiedades espectroscópicas asociadas tanto a su estado oxidado como a su estado reducido; los patrones espectroscópicos normales de citocromo c en estos sistemas pueden alterarse a bajos grados de hidratación, lo que sugiere que el hemo c podría usarse como una sonda espectroscópica de la conformación de la proteína en micelas invertidas.

Estudios más recientes (16) con citocromo c de caballo y citocromo oxidasa en un sistema de micelas invertidas de asolectina en tolueno, demostraron la transferencia de electrones entre al menos dos componentes redox de la cadena respiratoria; en estos experimentos se siguió espectroscópicamente la reducción de la

citocromo c-oxidasa por citocromo c reducido con ascorbato.

En nuestro laboratorio, Laura Escobar (18) utilizando mitocondrias de corazón de bovino, demostró que existe transporte de electrones al través de la cadena respiratoria, aunque la velocidad de transferencia es muy baja, siendo el paso limitante la reducción del citocromo *b*. Sin embargo fue posible obtener reducciones casi totales de todos los citocromos cuando al sistema se le adicionó menadiona para reemplazar a la menaquinona endógena, que se repartió entre la fase orgánica y la acuosa.

Además de las preparaciones mitocondriales, en nuestro laboratorio hemos observado que las membranas bacterianas también muestran actividades asociadas a la transferencia de electrones cuando son transferidas al seno de solventes orgánicos. Partículas membranales de Bacillus cereus o Rhizobium phaseoli en un medio de asolectina-isooctano, mostraron ser bastante más activas que las preparaciones de mitocondria de corazón de bovino (Leticia Sánchez, Tesis de Maestría en preparación).

RESPIRACION DE CELULAS ENTERAS EN SOLVENTES ORGANICOS.

Existen reportes en la literatura en los que se describe el uso de células bacterianas no vivas suspendidas o inmobilizadas en solventes orgánicos, que son capaces de llevar al cabo procesos catalíticos con aplicaciones comerciales potenciales. Las preparaciones de células enteras en comparación con enzimas puras,

han mostrado ser más estables como microreactores en solventes orgánicos (1). En 1985 Häring y col. (21) reportan por primera vez la transferencia de células bacterianas a micelas invertidas compuestas de tween 85 con 3 a 4 % de agua (v/v) usando como solvente isopalmitato. Su sistema micelar contiene más de 10^8 células ml^{-1} ; esta concentración celular daría suspensiones turbias en agua; sin embargo, en micelas invertidas se obtienen soluciones transparentes. Estos experimentos han sido repetidos en otros laboratorios usando levaduras o células bacterianas que han sido transferidas a una gran variedad de sistemas de surfactantes-solventes. (33,46). En algunos casos se han reportado valores de viabilidad en el rango de horas a días (46).

Células microbianas transferidas a micelas invertidas son capaces de presentar actividades metabólicas usando sustratos endógenos o exógenos. En relación a esta actividad metabólica se ha reportado la utilización del electrodo de Clark para medir la respuesta respiratoria de Saccharomyces cerevisiae usando como sustrato etanol en micelas invertidas de tween 88-isopropilpalmitato (46).

GERMINACION DE ESPORAS

CAMBIO METABOLICO ASOCIADO CON LA GERMINACION.

Un modelo que es de interés potencial para su estudio en sistemas de micelas invertidas en solventes orgánicos es el de germinación de esporas bacterianas ya que presenta características relacionadas

con su latencia (53) como son la falta de metabolismo endógeno y su resistencia a condiciones extremas. Un ejemplo de condición extrema sería la presencia de solventes orgánicos, que permiten su estudio en sistemas micelares orgánicos.

Las esporas bacterianas no tienen un metabolismo endógeno detectable. Consecuentemente, no es de sorprenderse el que contengan niveles extremadamente bajos de ATP y piridín-nucleótidos reducidos; otros compuestos de alta energía como CTP, GTP, UTP, deoxinucleótidos trifosfato y acetil coenzima A, se encuentran a niveles muy bajos o ausentes. En contraste, las esporas contienen altos niveles de adenín-nucleótidos libres como ADP y AMP y cantidades significativas de NAD, NADP y coenzima A (53).

La transformación de esporas bacterianas a células vegetativas es el resultado de al menos tres procesos en secuencia: la activación, la germinación y la elongación o "outgrowth" (53).

La activación es un proceso reversible, que prepara a las esporas para germinar y que se presenta por tratamientos como choque térmico o inducción química; en el caso de esporas envejecidas el proceso de activación puede no ser necesario.

La germinación involucra los primeros pasos irreversibles en la conversión de la espora latente a la célula vegetativa. Hill fue el primero en descubrir que los requerimientos de germinantes para esporas bacterianas podría ser simple y específico (53); En el caso de *B. cereus*, se ha reportado que la mezcla de alanina-adenosina es el tratamiento de activación que permite el mejor rendimiento en la germinación de sus esporas. Este proceso está acompañado por la

rápida degradación de algunos tipos de macromoléculas, la excreción de moléculas específicas como los ácidos dipicolínico y sulfoacético así como muchos de los iones metálicos de la espora; se pierde su resistencia al calor, la radiación y los agentes químicos, y aumenta la permeabilidad a un gran número de diferentes moléculas. La actividad metabólica y la biosíntesis macromolecular se inicia en los primeros minutos de la germinación de la espora, apareciendo compuestos de alta energía; encontramos la acumulación de ATP, NADH, NADPH y acetilcoenzima A. La producción de compuestos de alta energía en los primeros minutos de la germinación están dados en gran medida por el metabolismo de reservas energéticas de la espora latente, como el ácido 3-fosfoglicérico, que constituye entre el 3 y el 5 % del peso seco de la espora; el piruvato generado del ácido 3-fosfoglicérico puede ser metabolizado a acetato, vía piruvato deshidrogenasa, con la producción asociada de compuestos de alta energía como acetil-coenzima A y NADH. Otras reservas energéticas en la espora latente son los aminoácidos generados vía degradación temprana de las proteínas, (aproximadamente entre el 15 y el 20 % de la proteína total en las esporas de *B. cereus* es degradada a aminoácidos en los primeros 20 min de la germinación), el α glicerofosfato y algunos polisacáridos.

La espora latente contiene un sistema de transporte de electrones inactivo; en nuestro laboratorio se (15) ha determinado que este sistema contiene todos sus componentes citocrómicos, en concentraciones muy semejantes a las de una espora germinada; de la misma manera las actividades específicas de las deshidrogenasas

asociadas al sistema son muy semejantes. Sin embargo hay una importante disminución en la concentración de la menaquinona; si se añade menadiona, que es un análogo de la menaquinona, a membranas de esporas latentes, se restaura la respiración dependiente de NADH y la reducción de citocromos. De la misma manera, en los primeros minutos de la germinación son restauradas simultáneamente la respiración dependiente de NADH y la reducción de citocromos, asociadas a un aumento de 4 veces el contenido de la menaquinona; no se observan cambios significativos en los niveles o segmentos de actividades de transporte de electrones del sistema.

El "outgrowth" permite la transformación de una espора germinada a una célula vegetativa. Existe alguna controversia sobre cuales son los caminos metabólicos que operan durante este proceso, en particular, si el flujo de carbono es al través de la vía de Embden-Meyerhof o de la de las hexosas monofosfato. Estudios hechos con *B. cereus* han sugerido que la vía de Embden-Meyerhof es la más importante durante el metabolismo de la glucosa. En este proceso la biosíntesis no puede darse sin que se suministren a la célula sustratos endógenos (53).

CAMBIOS MORFOLOGICOS ASOCIADOS CON LA GERMINACION.

Asociados a estos cambios fisiológicos, encontramos durante la germinación cambios morfológicos importantes, que pueden ser seguidos por microscopía (53).

La espора latente está caracterizada por tener estructuras

externas como el exosporium, rodeando una cubierta de dos o más capas, una corteza muy bien definida, y la espora propiamente dicha rodeada por una membrana celular; el citoplasma se encuentra deshidratado, sin observarse definición de componentes celulares. (Figura 4 A, 4 B-1).

Cuando la germinación se inicia (Figura 4 B-2), puede observarse un oscurecimiento de la espora; la corteza empieza a ser reabsorbida o disuelta apareciendo, como ya se mencionó, la respiración como uno de los eventos fisiológicos tempranos.

Al iniciarse el "outgrowth" (Figura 4 B-3,4), comienza el hinchamiento de la espora por hidratación del citoplasma, llegando a aumentar su volumen hasta más de tres veces; la corteza sigue disminuyendo y, asociada a esto, hay una mejor definición de los componentes celulares (ribosomas y material genético). Finalmente la célula se prepara para la primera división (Figura 4 B-5).

Basándonos en las características mencionadas sobre los diferentes procesos que llevan a la germinación, es posible plantearla como un modelo ventajoso y de interés para estudiarse en micelas invertidas. De estas características las que consideramos más importantes para lograr este fin son:

a) En la espora latente no es posible detectar metabolismo endógeno (no hay respiración endógena).

b) Las esporas latentes son muy resistentes a los solventes orgánicos, por lo que la transferencia a solventes orgánicos no afecta su viabilidad.

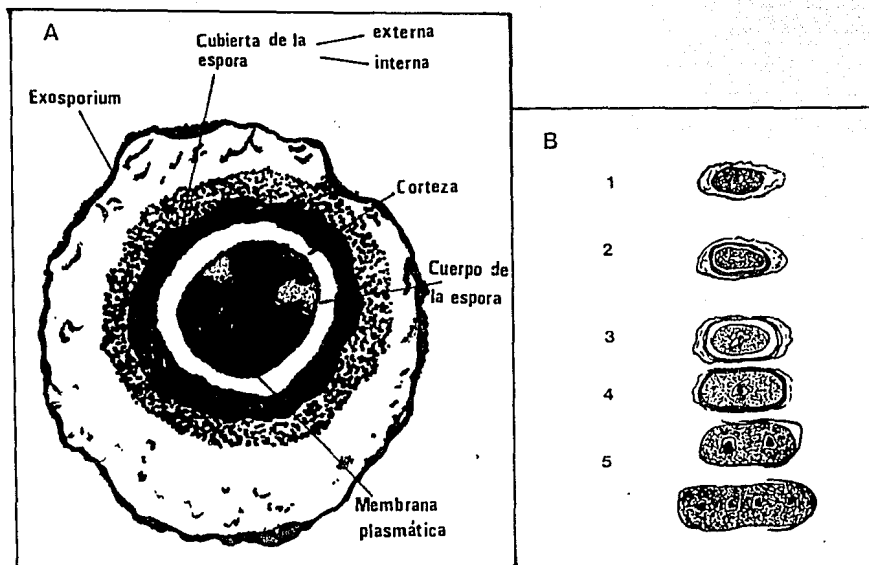


FIGURA 4. A. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE UNA ESPORA LATENTE DE *B. cereus*; se señalan sus componentes principales.

B. ESQUEMA DEL DESARROLLO DE UNA ESPORA LATENTE DE *B. cereus* HASTA UNA CELULA VEGETATIVA. Estadio 1: latencia; estadio 2: germinación; estadio 3: hinchamiento; estadio 4: elongación; estadio 5: primera división. La germinación fue inducida químicamente por una mezcla de alanina-adenosina como germinantes.

c) Las esporas latentes son muy resistentes a la desecación, lo que las convierte en un buen modelo para estudiar los efectos de la concentración de agua sobre el metabolismo celular en un sistema de micelas invertidas.

d) La germinación representa un "renacer" de la célula, durante el cual se reinicia el metabolismo celular, observándose el 95 % de las células germinadas en los primeros 10 a 15 min después de la inducción de la germinación.

e) La germinación bacteriana y subsecuente "outgrowth" son procesos que se encuentran muy bien definidos, con una secuencia muy clara de eventos bioquímicos, lo que permite tener marcadores metabólicos para seguir su desarrollo y es acompañada por drásticos cambios morfológicos específicos.

OBJETIVO

La pregunta importante en el caso de la solubilización de células enteras en sistemas de micelas invertidas es hasta que punto el metabolismo celular puede ocurrir en el seno de un sistema orgánico apolar. Que tanto podemos usar el metabolismo endógeno bacteriano para catalizar transferencias químicas con interés académico y/o económico.

El objetivo de este trabajo es demostrar que una respuesta celular compleja como lo es la germinación de esporas bacterianas, tiene lugar en un medio orgánico apolar compuesto de isoctano, asolectina y cantidades limitadas de agua. En este sentido y como se mencionó en antecedentes, las esporas latentes se caracterizan por un estado metabólico críptico. Durante la germinación el metabolismo celular se reinicia y este resurgimiento de actividades puede ser detectado al estudiar los diferentes caminos metabólicos secuencialmente reactivados. Una de las primeras actividades que se manifiesta, es el inicio de la actividad respiratoria que se detecta en los primeros minutos de la germinación. También puede seguirse, aprovechando técnicas de microscopía electrónica, que permiten detectar los cambios morfológicos que sufre la espora (degradación de cubiertas y corteza, hidratación del citoplasma celular, etc.).

Para el presente trabajo, se estudió la respuesta germinativa de las esporas de *Bacillus cereus* en un sistema orgánico apolar constituido por isoctano-asolectina y cantidades limitadas de agua. La respuesta germinativa fue detectada funcionalmente, por la

aparición de actividad respiratoria endógena que nos indica la activación de múltiples vías metabólicas. El proceso de germinación fue comprobado visualmente, a través de micrografía electrónica de transmisión, comparando los cambios morfológicos ocurridos a la espora latente en respuesta a germinantes específicos, tanto en un medio acuoso como en el medio orgánico apolar.

MATERIALES Y METODOS

TITULACION POLAROGRAFICA DE OXIGENO EN SOLVENTES ORGANICOS INDICE DE POLARIDAD Y SU RELACION A LA SOLUBILIDAD DEL OXIGENO.

La determinación polarográfica de oxígeno fue adaptada para nuestras condiciones de medición en solventes orgánicos apolares. Utilizamos un electrodo de oxígeno estandar de Clark y un oxímetro modelo 53 (Yellow Springs Instruments); la cámara de reacción (Figura 5), debe tener las siguientes características: ser de vidrio, ya que el uso de solvente puede producir daño en la cámara, con un volumen de 1.7 ml; estar dotada con una chaqueta por donde circula agua y que servirá para controlar la temperatura durante el experimento (en todas las mediciones fue de 30°C); un orificio lateral por donde será introducido el electrodo, el cual estará herméticamente ajustado con el mismo empaque de hule que sujeta la membrana. Para evitar el intercambio de oxígeno entre la atmósfera y la solución se utilizó un tapón de vidrio con un tubo capilar de 1-2 cm de longitud, que es el conducto por donde se hicieron las adiciones durante el registro y que se puede cerrar mediante la introducción de una punta cónica de plástico.

Se determinó la concentración del oxígeno solubilizado tanto en medio acuoso como en el medio apolar, en cuyo caso se utilizaron diferentes solventes con distintas polaridades; como índice de polaridad se utilizó el log de P (a mayor valor de log de P el

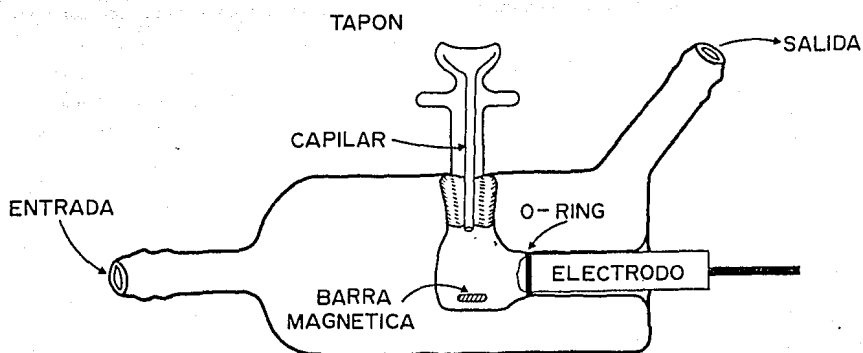


FIGURA 5. MODELO DE LA CAMARA DE REACCION PARA POLAROGRAFIA DE OXIGENO EN SOLVENTES ORGANICOS. Un electrodo tipo Clark es insertado dentro de la cámara de vidrio (ver materiales y métodos).

solvente es más apolar), que es el coeficiente de reparto de un solvente dado en una mezcla equimolar de octanol-agua. Los solventes utilizados fueron : benceno, tolueno, ciclohexano, hexano e isoctano. El electrodo de oxígeno se pone en contacto con el sistema micelar hasta que se obtiene una lectura estable (entre 2 y 3 min); este valor se considera el 100%. Entre cada medición, la cámara es lavada con etanol y el solvente correspondiente.

Para determinar la solubilidad del oxígeno en el solvente orgánico se llevó al cabo la titulación por los siguientes métodos (17):

a) Titulación química de oxígeno con una solución anaeróbica de $\text{NaN}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionita de sodio). La solución de ditionita (50 mM) se preparó en agua fría que fue llevada a anaerobiosis al burbujearle nitrógeno durante 15 min, envasada llenando una botella hasta el cuello y tapada herméticamente. De esta solución se toman alícuotas de 3 μl para el medio acuoso y de 15 μl para el medio micelar orgánico con una microjeringa a través del tapón, y se añaden a la cámara de reacción. Los cambios en el registro producidos por las adiciones sucesivas de ditionita se comparan y convierten a μmol de oxígeno, considerando que 0.5 ηmol de ditionita consume una ηmol de oxígeno.

b) Titulación enzimática de oxígeno producido por la descomposición de H_2O_2 por catalasa de hígado de res (18). Soluciones acuosas de catalasa son llevadas a anaerobiosis por burbujeo con nitrógeno. La reacción se inicia con alícuotas del sustrato (10 μl) conteniendo concentraciones conocidas de H_2O_2 (9.2 a 2.0 μmol). La concentración de oxígeno en los sistemas acuoso y orgánico se calcula asumiendo

que 1 μmol de H_2O_2 produce 0.5 μmol de oxígeno. (19).

OBTENCION DE ESPORAS.

Se obtuvieron esporas de Bacillus cereus utilizando una cepa silvestre aislada y caracterizada por Andreoli. (2).

Para la obtención de esporas se utilizó un medio fermentable (medio G) (20); en este caso se aumentó la concentración de sacarosa, levadura y fosfatos al doble para mejorar el rendimiento en la masa celular. La composición del medio usado fue :

0.2 % de extracto de levadura.

0.2 % de sacarosa.

0.2 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

0.1 % K_2HPO_4 .

0.02 % MgSO_4 .

0.005 % $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

0.0025 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

0.0005 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

0.00002 % $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

0.0005 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

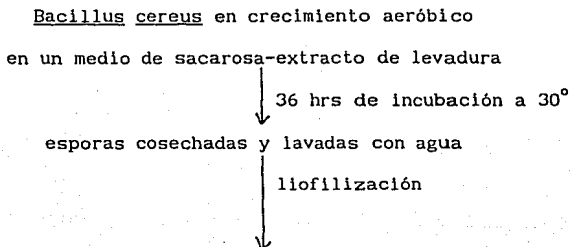
Se realizaron cultivos aeróbicos en un fermentador de 25 litros de capacidad construido por el Centro de Instrumentos de la UNAM, con las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura de 30 °C, agitación a 250 rpm y un flujo de aire a través del medio de 8 a 12 litros/minuto. El inóculo utilizado fue del 5 % del volumen total

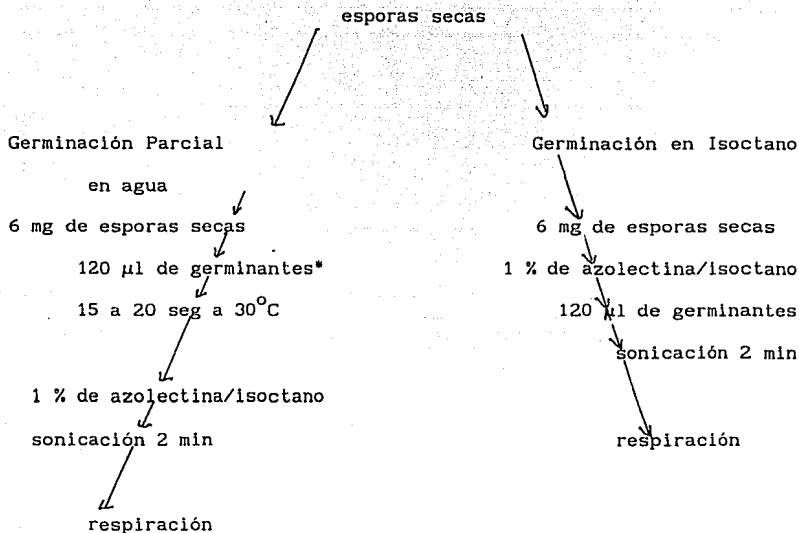
del fermentador, que se obtuvo creciendo el bacilo en el mismo medio hasta la etapa logarítmica de crecimiento. Antes de inocular el fermentador se observan las células al microscopio de contraste de fases. El cultivo se dejó crecer durante 32-36 horas, hasta que al microscopio de contraste de fases se observaron esporas libres.

Las esporas fueron cosechadas por centrifugación en una centrifuga marca Sharples de flujo continuo, lavadas 8 veces con agua y liofilizadas; se almacenaron a temperatura ambiente.

TRANSFERENCIA DE ESPORAS AL SISTEMA DE MICELAS INVERTIDAS

Para poder determinar la cinética de germinación a diferentes tiempos en medio acuoso (germinación parcial en agua), se realizó el siguiente esquema de transferencia. La germinación en isoctano se consideró como el tiempo 0 de germinación ya que los germinantes en solución acuosa son añadidos después de la transferencia de la espóra al medio orgánico.





* Germinantes: Se utilizó una mezcla de alanina 40 mM, adenosina 2 mM disueltos en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7; esta mezcla es la más adecuada para obtener un alto rendimiento en la germinación de esporas para el caso de *B. cereus* (ver antecedentes).

Las concentraciones de germinantes, azolectina y amortiguador de fosfatos que permitieron obtener una máxima germinación celular fueron calculadas en relación al volumen total del sistema micelar.

MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Esporas germinadas por 2 hs en el medio micelar en respuesta a la mezcla de germinantes alanina + adenosina y a las que se les

determinó actividad respiratoria, así como esporas no germinadas (no estuvieron en presencia de germinantes), fueron fijadas con una solución de glutaraldehído al 3 % en amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M pH 7.2 por 15 min y se centrifugaron en una microcentrifuga Beckman modelo 152 durante 4 min. La preparación se dejó fijando durante 90 min más, después de lo cual el glutaraldehído fue eliminado; las células se lavaron durante toda la noche con el amortiguador solo. Se añadió tetróxido de osmio al 2 % en el mismo amortiguador y se incubó durante 2 hr, después de lo cual el osmio fue desechado. Las células se lavaron 4 veces con el amortiguador solo y se deshidrataron al pasarlas por concentraciones crecientes de etanol (de 30 a 100%) y óxido de propileno; se incubaron en una resina Epon diluida en óxido de propileno 1:1 por 24 hr seguida de una polimerización a 60°C durante 36 hr en resina no diluida. Se cortaron bloques en un microtomo Reichert UMO₃ con un cuchillo de diamante Dupont obteniéndose secciones de grises a plateadas, que fueron recogidas en mallas de cobre del No. 300, y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo de acuerdo a Reynolds (50). Las secciones teñidas fueron observadas en un microscopio electrónico JEOL 100 B, operado a 60 kV.

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE CELULAS GERMINADAS POR PLAQUEO.

Para determinar cuantas células germinadas permanecían viables después de su transferencia a medio orgánico se plaquearon

en medio de agar nutritivo. El número de células viables obtenido después de la transferencia a medio orgánico compuesto por azolectina o una mezcla de azolectina Brij 36 T como tensoactivo, se comparó con el obtenido para células germinadas incubadas en un medio acuoso.

Se tomaron 3 mg de esporas a las que se les agregaron 2 ml de germinantes (alanina 40 mM más adenosina 2 mM) disueltos en un medio fermentable (medio G) y se incubaron 2 min a 30 °C. De esta preparación se tomaron 20 µl para ser transferidos ya sea a 2 ml de agua estéril ó a 2 ml de medio micelar . Se probaron dos diferentes medios micelares: a) azolectina (10 mg ml⁻¹)- isoctano ó b) azolectina (10 mg ml⁻¹)- brij 36 T (12mM)- isoctano. Inmediatamente después de la transferencia una alícuota de cada muestra se diluyó en el medio correspondiente hasta una concentración final de 10⁻⁸ veces y se sembraron 100 µl de estas diluciones en cajas de agar nutritivo (t₀); Las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 hr y se contaron las colonias obtenidas. El resto de las muestras se incubó con agitación a 30 °C, tomándose alícuotas de 100 µl para plaqueo a las 12, 24, 48 y 96 hr y a los 8 días; las preparaciones se diluyeron y sembraron de la misma manera que se hizo para t₀.

EFEECTO DE INHIBIDORES DE CADENA RESPIRATORIA SOBRE LA RESPIRACION ENDOGENA DE ESPORAS GERMINADAS EN MEDIO MICELAR.

6 mg de esporas secas fueron incubadas durante 2 min en presencia de germinantes (alanina + adenosina, disueltas en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 8); la preparación fue transferida a azolectina 1 % - isoctano, y se midió la respiración endógena. Sobre el trazo se añadieron alícuotas de KCN o HOQNO disueltos en solución acuosa, para obtener las concentraciones requeridas (entre 0 y 500 mM en base al volumen micelar total).

EFEECTO DE UN SEGUNDO DETERGENTE EN EL SISTEMA MICELAR SOBRE LA RESPIRACION ENDOGENA DE ESPORAS GERMINADAS.

Para observar el efecto que tiene un segundo detergente (cotensoactivo) como constituyente del sistema micelar, sobre la respiración endógena de las esporas germinadas, 6 mg de esporas secas fueron incubadas durante 2 min en germinantes (alanina + adenosina, disueltos en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 8) y transferidas al medio micelar, constituido por azolectina 1 % - isoctano; se midió la respiración endógena basal y sobre el trazo se agregaron alícuotas de soluciones concentradas de los diferentes detergentes solubilizados en isoctano, para obtener las concentraciones señaladas (entre 0.1 y 50 mM según fuera el caso, considerando el volumen total del sistema micelar). El efecto

observado se comparó con los resultados obtenidos cuando los mismos
detergentes se añadieron a un medio acuoso.

RESULTADOS

TITULACION POLAROGRAFICA DE OXIGENO EN SOLVENTES ORGANICOS.

INDICE DE POLARIDAD Y SU RELACION CON LA SOLUBILIDAD DEL OXIGENO.

Se sabe que la solubilidad de oxígeno difiere según el medio y las condiciones de medición, por lo que fue necesario determinar su solubilidad en el medio orgánico utilizado. Para poder determinarla se llevó al cabo su titulación midiendo el consumo de oxígeno polarográficamente por medio de la reacción química con ditionita y, enzimáticamente, midiendo la descomposición de agua oxigenada por la acción de la catalasa de hígado de res. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos al hacerse la determinación en medio acuoso (A) y se comparan con los obtenidos al utilizar un medio compuesto por 0.2 M de AOT/ tolueno/ agua (B). Los trazos obtenidos son muy reproducibles y nos permitieron determinar la concentración de oxígeno en el medio acuoso, que fue de 0.2mM, y en tolueno, que fue de 1.4 mM. La solubilidad de oxígeno por lo tanto, fue 7 veces mayor en tolueno, si se compara con la determinada en medio acuoso. El trazo C de la misma figura muestra la estabilidad del electrodo en el medio micelar, de dos maneras: con el oxímetro abierto y a partir de donde la flecha lo indica con el oxímetro cerrado; con oxímetro cerrado nos refererimos al momento en que el capilar de vidrio es cerrado con una punta de plástico

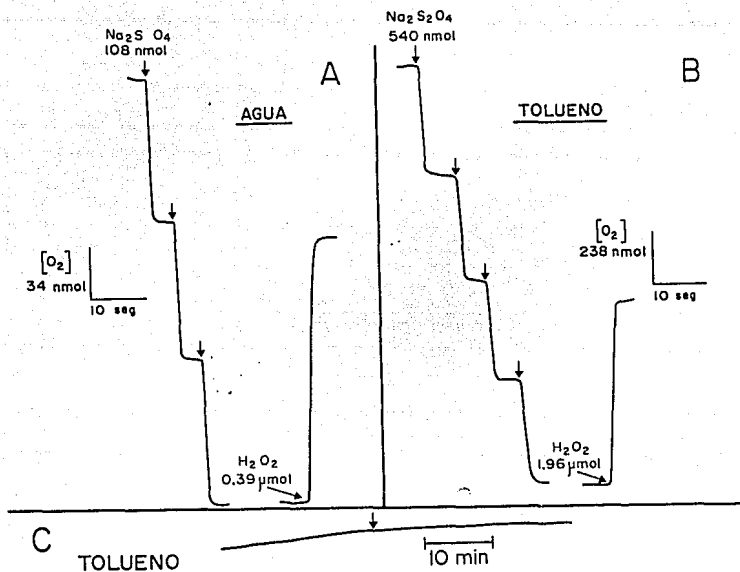


FIGURA 6: DETERMINACION POLAROGRAFICA DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO EN BUFFER DE FOSFATOS 0.1 M pH 7 (A) Y EN TOLUENO CONTENIENDO H₂O 1.6 M Y AOT 0.2 M (B). La titulaci3n de oxigeno fue hecha con una soluci3n anaer3bica de Na₂S₂O₄. Los cambios en las lecturas causados por adiciones sucesivas de la soluci3n de Na₂S₂O₄ fueron comparadas y convertidas a μmol de O₂ (ver materiales y m3todos) asumiendo que el sistema acuoso contenia 0.2 μmol de O₂ ml⁻¹. El oxigeno producido por catalasa a partir de H₂O₂ fue calculado a partir de los cambios en la concentraci3n de oxigeno producidos por la adici3n de cantidades conocidas de H₂O₂. Los medios org3nico y acuoso contuvieron 17.5 y 7 μg de catalasa respectivamente. Los ensayos se realizaron a 30°C. El trazo C muestra la estabilidad del electrodo en el curso de una hora, midiendo una soluci3n micelar depletada de oxigeno por burbujeo con nitr3geno; donde la flecha lo indica, la c3mara fue cerrada insertando una punta conica sellada en el capilar.

sellada. Es claro que el trazo es muy estable y permitió la medición continua por periodos largos; debe notarse que la velocidad de registro para éste último experimento es muy lenta y por lo tanto el registro abarca más de 1 h de monitoreo.

Además de tolueno, hay algunos otros solventes de uso común en los estudios de enzimas en solventes orgánicos. Por esto fue importante conocer si el uso del electrodo de oxígeno de Clark podía extenderse a otros solventes orgánicos con diferentes polaridades. Se decidió efectuar la titulación de la concentración de oxígeno en diferentes solventes, en relación con su polaridad, utilizando micelas invertidas de 0.2 M de AOT solubilizado en los siguientes solventes : benceno, tolueno, ciclohexano, n-hexano, e isoctano; los valores de concentración de oxígeno obtenidos fueron graficados contra su correspondiente valor de $\log P$ (índice de polaridad del solvente; a mayor valor de $\log P$ más apolar es el solvente), como se muestra en la Figura 7. Podemos observar que la solubilidad de oxígeno en los diferentes solventes fue mayor conforme disminuye su polaridad, mostrando una correlación lineal entre el oxígeno disuelto y la polaridad del solvente probado.

EFFECTO DEL VOLUMEN DE LA POZA ACUOSA SOBRE LA SOLUBILIDAD DE OXIGENO.

Uno de los fenómenos estudiados más frecuentemente en la

enzimología micelar es la dependencia de la actividad catalítica de la enzima solubilizada en relación al tamaño de la poza acuosa (W_o). La variación en el W_o se puede dar de dos maneras: se mantiene constante el volumen de la fracción acuosa variándose la concentración de tensoactivo, ó se aumenta el volumen de la poza acuosa manteniendo constante la concentración de tensoactivo.

Ya que la solubilidad de oxígeno en la fase orgánica es varias veces mayor en relación al agua, es importante conocer como el aumento en el W_o , dado por un aumento en el tamaño de la poza acuosa y manteniéndose constante la concentración de tensoactivo, afecta la solubilidad del oxígeno. Decidimos estudiar el efecto del W_o sobre la solubilidad de oxígeno en un medio micelar compuesto por AOT-isoctano y cantidades crecientes de agua. Los resultados se muestran en la Figura 7 B. Se puede observar un efecto pequeño y proporcional al incremento en el contenido de agua en el sistema (W_o) sobre la concentración de oxígeno disuelto, a valores entre 2 y 60.

Una vez que el método fue calibrado, iniciamos el estudio de la germinación de esporas bacterianas, siguiendo como marcador la respiración. En todas las determinaciones se utilizó como solvente isoctano y se siguió el esquema de transferencia descrito en materiales y métodos.

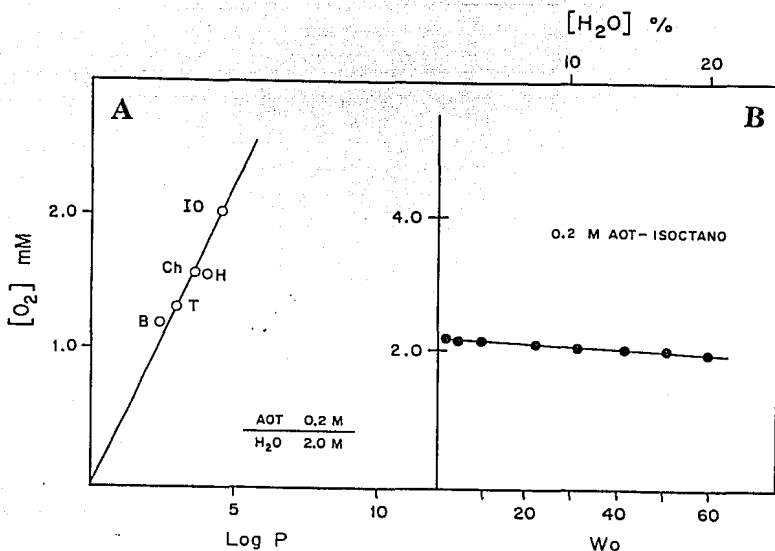


FIGURA 7 A. TITULACION DE OXIGENO EN MEDIO MICELAR COMPUESTO POR AOT/ AGUA Y DIFERENTES SOLVENTES. Las titulaciones se hicieron de la misma manera, utilizando solventes con diferentes polaridades: benceno (B), tolueno (T), hexano (H), ciclohexano (Ch) e isooctano (IO). Se gráfica la concentración de oxígeno contra el log de P, que es un índice de la polaridad del solvente (ver materiales y métodos).

FIGURA 7 B. EFECTO DEL W_0 SOBRE LA SOLUBILIDAD DE OXIGENO EN EL MEDIO MICELAR. El medio micelar estuvo compuesto por AOT 0.2 M- isooctano y cantidades crecientes de agua, para obtenerse los W_0 indicados. Se grafica concentración de oxígeno contra valores crecientes de W_0 , indicandose los porcentajes de agua correspondientes. Los ensayos se realizaron a $30^{\circ}C$.

ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE ESPORAS GERMINADAS EN SOLVENTE ORGANICO.

En la literatura existen reportes con las condiciones óptimas para la germinación de esporas de *Bacillus cereus* en un medio acuoso. Para determinar las mejores condiciones para la germinación de esporas en el solvente , se siguió la actividad respiratoria y el efecto sobre ella de diferentes concentraciones de germinantes (alanina más adenosina), tiempos de sonicación para la transferencia de las esporas al medio micelar, concentración de asolectina y concentración del amortiguador de fosfatos utilizado; en algunos casos se compara con los resultados obtenidos al estudiar las mismas variables en medio acuoso.

Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. De estos resultados determinamos que la máxima actividad respiratoria en el solvente orgánico se observó cuando las concentraciones de alanina y adenosina son de 40 y 2 mM respectivamente, obteniendose una curva de campana, mientras que en el medio acuoso, la actividad respiratoria aumentó en forma lineal con la concentración de germinantes. En cuanto al efecto del tiempo de sonicación sobre la actividad respiratoria observamos que a tiempos cortos la actividad es baja (no se muestra), para ir aumentando hasta llegar a los 2 min de sonicación, donde la respuesta respiratoria es máxima, y disminuir después. El efecto de la concentración de asolectina en el medio micelar, y el efecto de la concentración de amortiguador de fosfato, tanto en medio acuoso como en medio micelar,

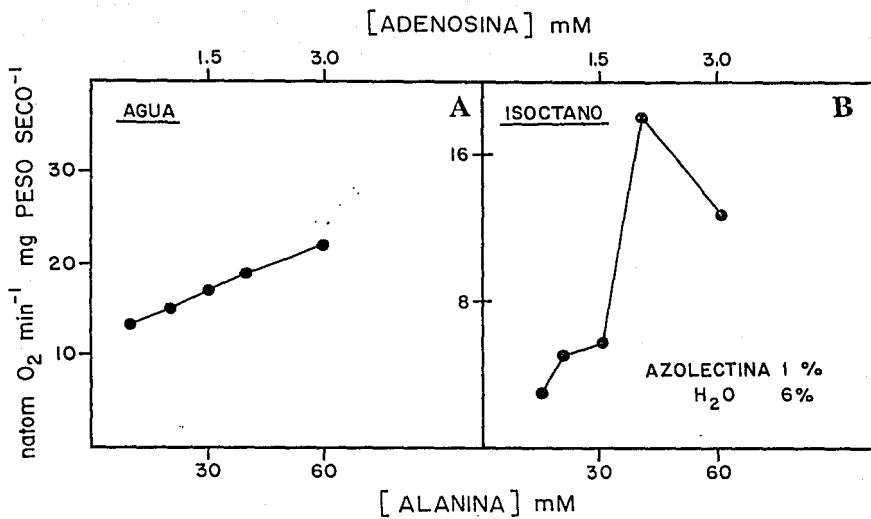


FIGURA 8. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GERMINANTES (ADENOSINA + ALANINA SOBRE LA RESPUESTA RESPIRATORIA OBTENIDA DURANTE LA GERMINACION, DE ESPORAS DE *B. cereus*, EN MEDIO ACUOSO (A) Y MEDIO MICELAR (B). Se midió la respuesta respiratoria a diferentes concentraciones de adenosina y alanina (germinantes), manteniendose una relación de 1:20. El medio micelar estuvo compuesto por 1 % de azolectina-isoctano- 6% H₂O, mientras que el medio acuoso fue amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. El método de transferencia usado fue el que se indica en materiales y métodos. Las mediciones se hicieron a 30°C.

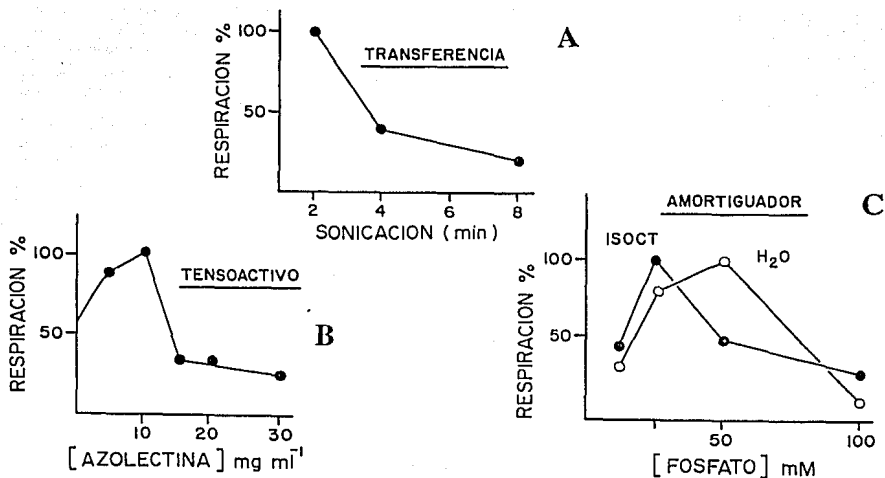


FIGURA 9. OPTIMIZACION DE LA RESPUESTA RESPIRATORIA DE ESPORAS DE *B. cereus* GERMINADAS EN UN MEDIO ORGANICO APOLAR BAJO DIFERENTES CONDICIONES. Efecto del tiempo de sonicación durante la transferencia (A), y efecto de la concentración de fosfatos de potasio pH 7 (C), en un medio micelar compuesto por 1 % de asolectina- isoctano- 6% de agua. Para determinar el efecto de la concentración de tensoactivo (asolectina) (B), se utilizó un medio micelar compuesto por isoctano- 6% de agua y cantidades variables de asolectina. El método de transferencia utilizado para todos los casos es el reportado en materiales y métodos. En el caso del efecto de la concentración del buffer de fosfatos pH 7 (C) se comparan medio acuoso (buffer a la concentración señalada) y medio micelar. La temperatura utilizada para todos los ensayos fue de 30 °C.

mostraron también una respuesta en forma de campana, aunque con diferentes máximos para los tres casos, encontrándose la máxima actividad respiratoria a una concentración de azolectina de 10 mg ml⁻¹, y una concentración de fosfatos de 25 mM para el caso del medio micelar y de 50 mM para el caso del medio acuoso. La ausencia de azolectina en el sistema micelar no permitió observar respiración endógena asociada a la germinación de la espora bacteriana, observándose precipitación de las células.

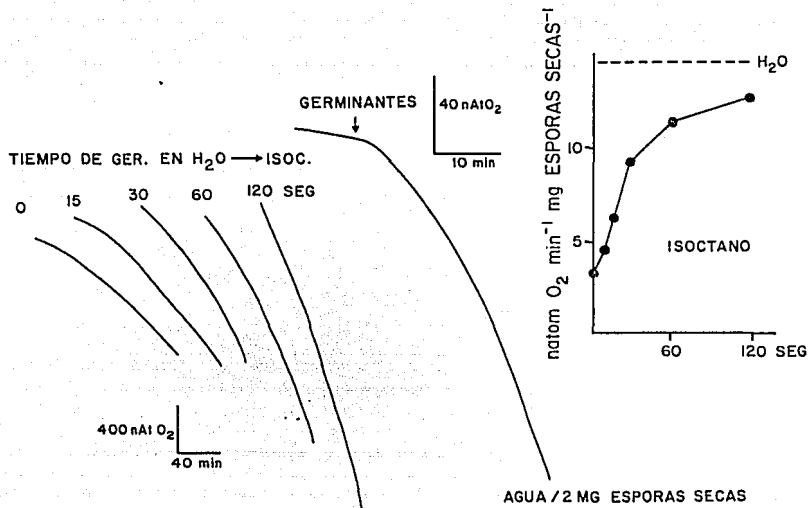
Una vez determinadas las condiciones óptimas de germinación en nuestro sistema micelar, decidimos analizar la cinética de germinación, siguiendo la actividad respiratoria.

En la Figura 10 se muestra la respuesta respiratoria asociada a la germinación, después de incubar por cortos periodos las esporas de nuestro bacilo en la solución acuosa de germinantes (alanina más adenosina en amortiguador de fosfatos 25 mM, pH 8) antes de su transferencia al medio micelar, por sonicación durante 2 min. El punto marcado como t_0 nos indicó que las esporas fueron primero incluídas en el medio micelar, antes de adicionar los germinantes y sonicar. Dicho de otra manera, la germinación de las esporas de la condición t_0 , fue iniciada en el medio orgánico apolar, por adición de los germinantes. En todos los casos se presentó actividad respiratoria; es interesante observar que en los tiempos marcados como t_0 , t_{15} , y t_{30} , la respiración se inició lentamente, aumentando su velocidad con la incubación; este resultado nos indica que el proceso metabólico se inició en el medio

acuoso y se continuó en el solvente orgánico hasta llegar a su máxima velocidad de respuesta, tal y como ocurre en el agua (ver abajo). Es importante hacer hincapié en que la actividad respiratoria observada es respiración endógena, por lo que no se presentaría de no ser que en el seno del solvente orgánico se estén llevando al cabo un gran número de reacciones enzimáticas involucradas en la germinación de la espora (ver antecedentes). Estas reacciones enzimáticas permiten que sustratos como NADH, que es utilizado por la cadena respiratoria, sea generado a partir de la degradación de sustratos, como el ácido 3-P-glicérico, que se encuentran acumulados en la espora latente (54).

En la figura 10 también se muestra (para comparación), la cinética obtenida en medio acuoso; a partir de la flecha el proceso fue iniciado por la adición de germinantes, lentamente al principio, para alcanzar su máxima velocidad después de 10 min, de manera muy semejante a lo ocurrido en el medio orgánico. A la derecha se muestra una gráfica que muestra el tiempo de germinación permitido en el medio acuoso antes de transferir al medio orgánico, de las máximas velocidades alcanzadas para cada condición mostrada en los trazos. Debe notarse que la máxima velocidad en el caso del medio micelar corresponde entre el 80 y el 90% de la actividad respiratoria inducida, transcurrida y medida en medio acuoso.

En antecedentes se mencionó que el modelo de germinación de esporas bacterianas en solvente orgánico apolar, resulta interesante para estudiar el efecto de la concentración de agua sobre el



ISOCTANO / 6 MG ESPORAS SECAS

FIGURA 10. CINETICA DE GERMINACION DE ESPORAS DE *B. cereus*. RESPUESTA RESPIRATORIA EN MEDIO ACUOSO Y MEDIO MICELAR. El medio micelar estuvo compuesto por 1 % de azolectina-isoctano-6 % de agua, mientras que el medio acuoso fue un amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 8. La germinación en el medio micelar se dió por incubación de las esporas liofilizadas (6 mg de peso seco) en presencia de los germinantes (alanina 40 mM, adenosina 2 mM, disueltos en un amortiguador de fosfatos 25 mM pH 8) durante los tiempos indicados; el tiempo 0 es aquel en el cual las esporas fueron transferidas al medio micelar y después se añaden los germinantes. Para el medio acuoso, la reacción se inició por la adición de los germinantes a la cámara conteniendo el amortiguador más 2 mg de esporas (peso seco). El método de transferencia utilizado fue el señalado en materiales y métodos. Los experimentos fueron efectuados a 30 °C El recuadro muestra las máximas actividades obtenidas para cada experimento y la línea discontinua muestra la máxima actividad respiratoria obtenida en medio acuoso.

metabolismo celular. Para poder hacerlo se germinaron esporas en medio acuoso, incubándolas en presencia de germinantes a 30°C durante 4 min, e inmediatamente después se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las células germinadas secas fueron transferidas al medio micelar conteniendo las concentraciones de agua indicadas en la Figura 11. Como podemos observar en la figura, la actividad respiratoria máxima se obtiene con 15 μl de agua mg^{-1} de células secas, lo que correspondió a un 4.5 % del volumen total del ensayo. Es importante señalar que las células ensayadas estaban inicialmente secas y por lo tanto, el agua requerida para llegar a la máxima actividad catalítica considera un estado inicial seco para toda la estructura celular. Por otro lado, mucha del agua añadida debió formar parte de las micelas y por lo tanto no participó directamente en el proceso de activación-hidratación de la espora.

CAMBIOS MORFOLOGICOS ASOCIADOS A LA GERMINACION DE ESPORAS

La actividad respiratoria presente en el medio micelar, debe estar asociada con cambios morfológicos, que pueden ser determinados si se analizan en el microscopio electrónico las preparaciones de esporas germinadas en estas condiciones; además, estos cambios deben asociarse a los reportados en la literatura, que ocurren cuando son germinadas esporas de *B. cereus* en medio acuoso (52). Se observaron muestras de esporas después de 2 hr de inducirse la germinación en

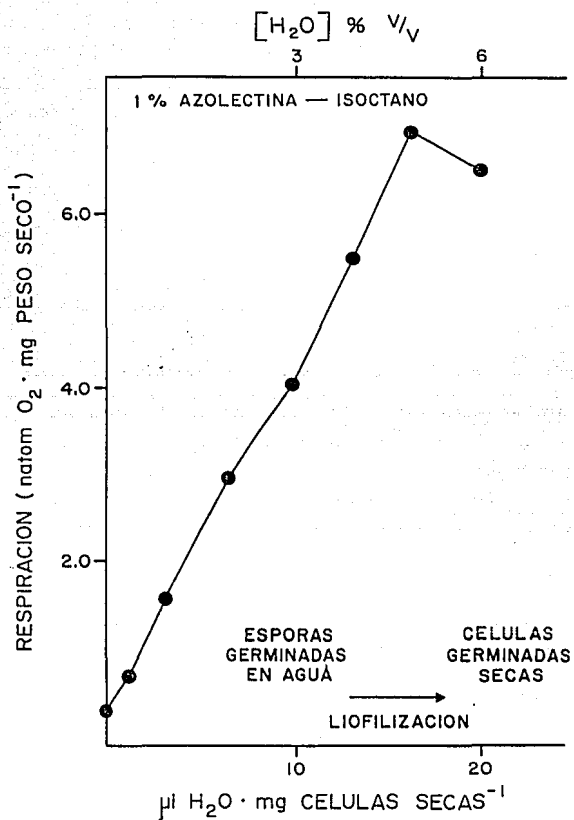


FIGURA 11. ACTIVACION POR AGUA DE LA RESPIRACION ENDOGENA DE CELULAS GERMINADAS DE *B. cereus*. Las esporas secas fueron germinadas por adición de germinantes(alanina 40 mM y adenosina 2 mM disueltos en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 8) e incubadas durante 4 min; inmediatamente después fueron congeladas en nitrógeno líquido y se liofilizan. 6 mg de estas células se transfirieron al medio micelar (ver materiales y métodos) compuesto por 1 % de azolectina- isoctano y cantidades variables de agua. Se midió la respuesta respiratoria a 30 °C.

el medio micelar (Figura 12 A), que se compararon con esporas en las que la germinación no ha sido inducida (hay ausencia de germinantes) (Figura 12 B). Si comparamos ambas preparaciones podemos observar que en el caso de esporas inducidas a germinación el citoplasma se encontró hidratado, dándose un aumento importante en su volumen; la corteza ha sido colapsada y hay una resolución de los componentes celulares, en particular del área nuclear; la forma redondeada de la espora se pierde, tendiendo a crecer polarmente, lo que indica un avance hacia el crecimiento vegetativo.

SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE LA RESPIRACION.

Quisimos estudiar si la actividad respiratoria observada en el sistema micelar, conservaba sensibilidad a inhibidores de la cadena respiratoria, semejante a la que se presenta en medio acuoso. Para probarlo se utilizó HOQNO, que es un inhibidor del complejo III, y KCN, que es un inhibidor del complejo IV de la cadena. En la Figura 13 B se muestran los resultados obtenidos; la sensibilidad de la actividad respiratoria al HOQNO fue alta, llegando a obtenerse una inhibición del 100 %; esto se debe a que el HOQNO es un inhibidor a nivel del complejo *bc1*, que es un paso de electrones compartido por las diferentes oxidasas terminales presentes en el sistema respiratorio del bacilo, por lo que se inhibe totalmente el consumo de oxígeno (Figura 13 A). Para el caso del cianuro, la cinética de inhibición fue parcial, debido a que las oxidasas terminales

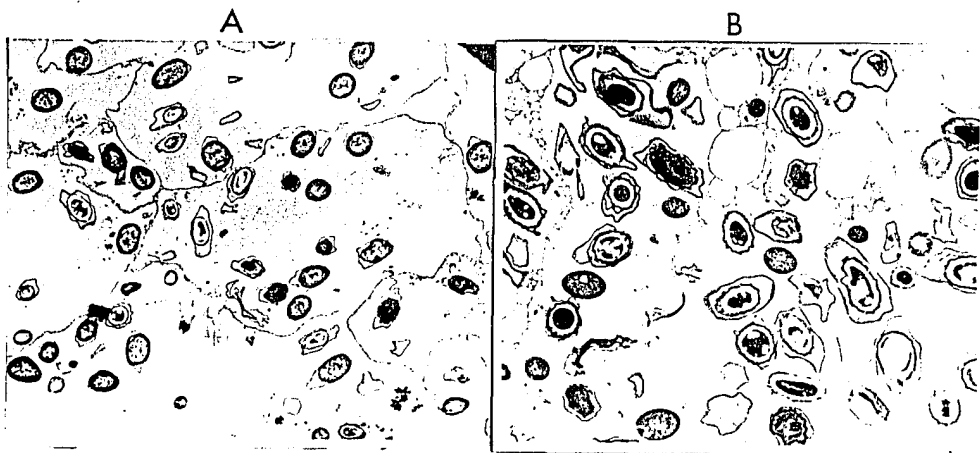


FIGURA 12. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE ESPORAS DE *B. cereus* GERMINADAS QUIMICAMENTE (ALANINA MAS ADENOSINA) (A) Y NO GERMINADAS (AUSENCIA DE ALANINA MAS ADENOSINA) (B), EN MEDIO ORGANICO APOLAR. Las esporas secas fueron germinadas por la adición de alanina más adenosina, incubadas 2 min y transferidas al medio micelar compuesto por 1 % de azolectina- isoctano- 6 % de agua (ver materiales y métodos); se siguió un control respiratorio durante 2 hr a 30 °C. Se tomó 1 ml del medio de reacción que se preparó para microscopía electrónica (ver materiales y métodos). La muestra control de esporas no germinadas se trató de la misma manera pero en ausencia de germinantes.

presentes en el sistema mostraron sensibilidades diferentes, siendo el citocromo *c* resistente al efecto del cianuro, mientras que las oxidasas *caa₃* y *aa₃* son sensibles (Figura 13 A). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en medio acuoso para ambos inhibidores (13), lo que nos indica que la sensibilidad a los inhibidores se conserva en el sistema micelar.

EFFECTO DE UN SEGUNDO DETERGENTE SOBRE EL SISTEMA MICELAR.

Como se mencionó en la introducción la composición del sistema micelar repercute directamente en la solubilidad, viabilidad y expresión metabólica de células enteras.

Se ha reportado que la adición de un cotensoactivo a sistemas micelares puede favorecer la transferencia de masa en las micelas de dos maneras: los sustratos con una polaridad intermedia entre la fase orgánica y la fase acuosa están realmente localizados en la interfase; por otro lado la adición de cotensoactivos también aumenta la transferencia intermicelar de sustratos polares, inducida por un aumento en la flexibilidad de la interfase de las micelas invertidas por la intercalamiento de las moléculas del otro tensoactivo en la interfase (53). Quisimos observar el comportamiento de nuestro sistema cuando lo enriquecimos con detergentes de diferente naturaleza. La figura 14 muestra los efectos de brij 36 T, tritón X 100 y Tween 20, que son detergentes no ionicos; del AOT, que es un detergente aniónico; y del CTAB, que

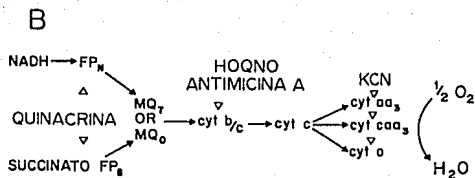
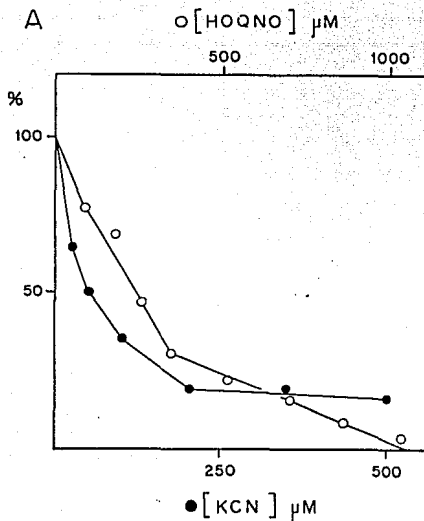


FIGURA 13 A. INHIBICION DE LA RESPIRACION ENDOGENA DE ESPORAS DE *B. cereus* GERMINADAS EN MEDIO MICELAR. Se germinaron 6 mg de esporas secas por incubación durante 2 min en presencia de alanina 40 mM más adenosina 2 mM, disueltos en buffer de fosfatos 25 mM pH 8; las células fueron transferidas al medio micelar compuesto por 1 % de azolectina- isoctano- 6 % de agua (ver materiales y métodos). Se midió la respuesta respiratoria en presencia de HOQNO o KCN a las concentraciones señaladas. La temperatura durante las mediciones fue de 30 °C.

FIGURA 13 B. ESQUEMA DEL SISTEMA RESPIRATORIO DE *B. cereus*. Se señalan los sitios de la cadena respiratoria donde actúan los inhibidores probados sobre la respiración endógena de las células en el sistema micelar.

Bacillus cereus
Esporas germinadas

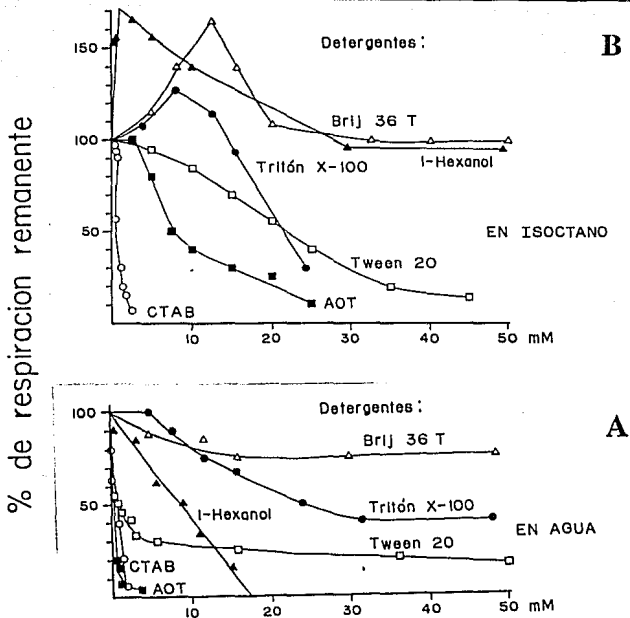


FIGURA 14. EFECTO DE UN SEGUNDO DETERGENTE (COTENSOACTIVO), EN LA RESPUESTA RESPIRATORIA DE ESPORAS GERMINADAS DE *B. cereus* EN MEDIO MICELAR. 6 mg de esporas secas fueron germinadas por incubación durante 2 min en germinantes (alanina 40 mM más adenosina 2 mM disueltos en buffer de fosfatos 25 mM pH 8); las células fueron transferidas al medio micelar compuesto por 1 % de azolectina-isooctano- 6 % de agua; se midió el efecto sobre la respuesta respiratoria de brij 36 T, tritón X-100, tween 20, AOT y CTAB, a las concentraciones señaladas (B). Se compara con los resultados obtenidos cuando los detergentes se agregaron en un medio acuoso (buffer de fosfatos 50 mM pH 8, más germinantes) (A).

es un detergente catiónico, sobre la respiración de esporas germinadas; los resultados se comparan con los obtenidos en un medio acuoso. En agua, la actividad respiratoria fue inhibida en todos los casos, siendo el efecto más drástico el observado con los detergentes cargados (AOT y CTAB). En el sistema micelar observamos que detergentes neutros a bajas concentraciones producen un aumento en la actividad respiratoria, como es el caso del Brij 36 T y el tritón X 100, o bien tienen poco efecto como es el caso del tween 20; los detergentes iónicos como el AOT y el CTAB inhiben la actividad respiratoria rápidamente; estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura por Häring (20), quien menciona que detergentes neutros permiten la expresión de actividad metabólica de células solubilizadas en ellos.

Es más evidente el aumento en la actividad respiratoria de las células germinadas cuando se utiliza el brij 36 T como cotensoactivo; este hecho nos llevó a probar si este detergente podía además de aumentar la respiración, permitir un aumento en la viabilidad de las células germinadas en el sistema micelar. En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos cuando las esporas fueron incubadas 2 min a 30°C con germinantes disueltos en un medio fermentable (medio G) y después transferidas a medios micelares formados por azolectina-isooctano ó azolectina-brij 36 T-isooctano; los resultados se comparan con los obtenidos cuando las esporas germinadas se mantienen en medio acuoso. Ambos medios micelares permitieron una sobrevivencia mayor de las células germinadas (50 %

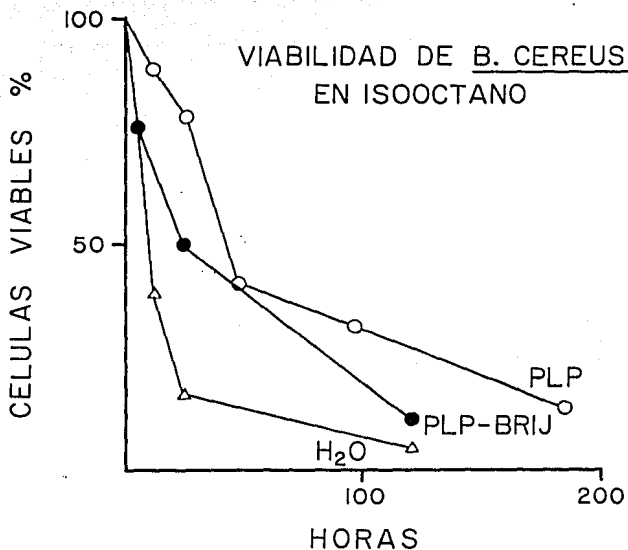


FIGURA 15. SOBREVIVENCIA DE ESPORAS GERMINADAS DE *B. cereus* TRANSFERIDAS A MEDIO MICELAR. EFECTO DE UN SEGUNDO DETERGENTE. 3 mg de esporas secas fueron germinadas por su incubación, durante 2 min, en presencia de 2 ml de alanina 40 mM más adenosina 2 mM, disueltos en medio G; 20 μ l de esta suspensión se transfirió a : 2 ml de agua estéril, 2 ml de 1% de azolectina- isooctano ó 2 ml de 1% de azolectina- brij 36 T 12 mM- isooctano. Se tomaron alícuotas que se diluyeron hasta 10^{-8} para el caso del sistema micelar y hasta 10^{-7} para el caso del medio acuoso; las diluciones se sembraron en agar nutritivo y se incubaron durante 24 hr a 30 °C. El resto de las muestras se incubaron durante los tiempos indicados a 30 °C, con agitación y después se plaquearon.

de células viables, a las 17 hr para el caso de azolectina- brij 36 T- isoctano y a las 38 hr para azolectina- isoctano), en relación a las obtenidas en medio acuoso (50 % de células viables a las 8 hr). Sin embargo es claro que el brij 36 T no favoreció un aumento en la viabilidad de las células germinadas en relación al medio micelar sin él; las células permanecieron viables durante más tiempo cuando se encuentran un medio micelar de azolectina.

DISCUSION

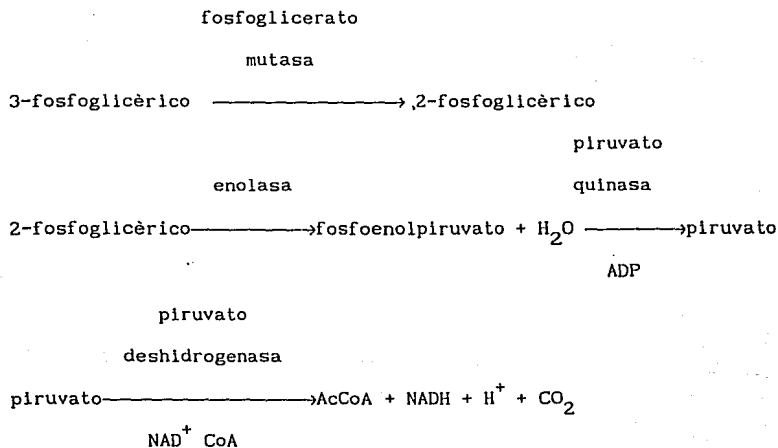
Existen reportes en la literatura en los que se menciona que células microbianas transferidas a micelas invertidas, son capaces de mostrar actividad metabólica a partir de sustratos endógenos o exógenos. En relación a esta actividad metabólica se ha reportado la utilización del electrodo de Clark para medir la respuesta respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae* usando como sustrato etanol en micelas invertidas de tween 88-isopropilpalmitato (46).

Para el caso de bacterias, el presente trabajo es el primero que demuestra que una respuesta metabólica tan compleja como lo es la germinación de esporas bacterianas, puede darse en un medio orgánico apolar en el que la cantidad de agua es limitada.

La aplicación del electrodo de oxígeno de Clark en un sistema micelar compuesto de asolectina-isoctano y cantidades limitadas de agua, en donde el solvente orgánico apolar constituye la fase continua, nos permitió seguir la germinación de esporas de *Bacillus cereus* inducida químicamente por la mezcla de alanina-adenosina en medio acuoso, monitoreando la activación de uno de los eventos metabólicos tempranos de este proceso, la respiración endógena.

La secuencia de cambios morfológicos (seguidos por microscopía electrónica), así como los eventos metabólicos asociados a la germinación (seguidos por la aparición de la respiración endógena), siguen el mismo orden descrito para la germinación en medio acuoso: activación, germinación y elongación o "outgrowth". La activación

es provocada por la inducción química al adicionar germinantes (alanina y adenosina) a nuestro sistema micelar. Durante el proceso de germinación la actividad metabólica se inicia rápidamente apareciendo compuestos de alta energía sintetizados a partir de las reservas energéticas de la espora latente, como lo es el ácido 3-fosfoglicérico, que constituye entre el 3 y el 5 % del peso seco de la espora; el piruvato generado a partir del ácido 3-fosfoglicérico es metabolizado a acetato, vía la piruvato deshidrogenasa, con la producción asociada de compuestos de alta energía como acetyl-coenzima A y NADH (53):



El NADH generado es utilizado por la cadena respiratoria de la célula, por lo que la aparición de la respiración endógena en nuestro sistema micelar a los pocos minutos de iniciada la

germinación, nos indica que todas estas reacciones enzimáticas se están efectuando en el seno del solvente orgánico. De la misma manera que es necesario generar el NADH como sustrato de la cadena respiratoria para poder observar respiración endógena, es indispensable que dicha cadena sea activa. Se ha reportado que la espora latente tiene un sistema de transporte de electrones inactivo (53); en reportes previos de este laboratorio (15) se ha determinado que en la espora latente la inactivación de la cadena respiratoria, seguida como NADH oxidasa, se observa de manera simultánea a una disminución de siete veces en la concentración de menaquinona, sin cambios mayores en el contenido de citocromos y deshidrogenasa; la adición de menadiona, un análogo funcional de la menaquinona, restaura la respiración dependiente de NADH y la reducción de citocromos. En los primeros minutos de la germinación la respiración dependiente de NADH y la reducción de citocromos es restaurada simultáneamente con un incremento de 4 veces en el contenido de menaquinona en la célula, sin observarse cambios significativos en la concentración de citocromos o en la de la deshidrogenasa. De acuerdo con estos resultados, el hecho de que la actividad respiratoria endógena se presente en nuestro sistema micelar, implica que la menadiona depletada durante la esporulación fue sintetizada en el sistema micelar durante los primeros minutos de la germinación.

En cuanto a los cambios morfológicos asociados al proceso de germinación en el medio micelar, pudimos observar el oscurecimiento

de la espóra, con disminución de la corteza por empezar a ser reasorbida o disuelta. Al permitirse la continuidad del proceso, logramos observar células muy hinchadas, con la corteza ya muy disminuida y una definición de los componentes celulares como ribosomas y material genético, que se asocian con el proceso de elongación o "outgrowth" que se observa en medio acuoso. Sin embargo no fue posible lograr que el proceso se continuara hasta la primera división celular. Será necesario buscar las condiciones necesarias para lograr que el proceso se continúe.

En cuanto al efecto de inhibidores de la cadena respiratoria sobre la respiración endógena de las esporas germinadas, obtuvimos resultados similares a los obtenidos en nuestro laboratorio en un medio acuoso (13): el HQONO, inhibidor del complejo bc_1 es capaz de bloquear el consumo de O_2 totalmente, ya que interfiere el paso de electrones hacia las diferentes oxidasas terminales (i.e. citocromos aa_3 , o y d) descritas para *Bacillus cereus*. El KCN por su parte muestra una cinética de inhibición parcial, que puede explicarse por las diferentes sensibilidades que presentan las oxidasas al inhibidor, siendo el citocromo o, resistente al efecto del cianuro, mientras que la citocromo caa_3 y aa_3 son sensibles (15).

En cuanto a los requisitos necesarios para que la germinación pueda efectuarse en el seno del solvente orgánico, pudimos determinar que el proceso no se observó si el medio micelar estaba constituido por tensoactivos distintos a la azolectina (i.e. Brij 36 T, Tween 20, Tritón X 100, CTAB o AOT); la presencia de azolectina

en combinación con cualquiera de los detergentes mencionados, permitió que la germinación se diera en el solvente orgánico, seguida como respiración endógena, aunque tuvieron efectos distintos en relación con su carga: detergentes cargados, ya sea aniónicos o catiónicos a bajas concentraciones inhiben totalmente la respiración endógena, mientras que detergentes neutros como el Tritón X 100 y el Brij 36 T a bajas concentraciones, estimulan la actividad respiratoria. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura (46) en los que se menciona que cuando se transfieren células bacterianas o levaduras a sistemas micelares compuestos por detergentes neutros o zwitterionicos como los fosfolípidos, se puede observar actividad metabólica, mientras que detergentes cargados no permiten dicha actividad. Otro de los requisitos importantes en la germinación de una espora latente es la hidratación del citoplasma celular. En nuestro sistema micelar fuimos capaces de determinar que la concentración de agua necesaria para obtener una máxima respiración endógena fue de 4.5 % en relación al volumen total de ensayo; de esta cantidad de agua, una parte, no sabemos cuanto, constituyó el centro acuoso de las micelas, mientras que el resto fue el agua requerida para la hidratación del citoplasma de la célula, proceso indispensable para que se pueda observar la germinación. El cambio de solvente orgánico de isoctano a tolueno (de mayor polaridad), no permite la germinación de la espora; este hecho ha sido explicado por las características polares de los solventes, observándose que los

sistemas micelares constituidos por solventes orgánicos apolares, en general permiten una mayor viabilidad de las células solubilizadas en ellos.

En cuanto a la estructura de los agregados de fosfolípidos formados en el sistema micelar existe muy poca información. Uno de los primeros intentos para determinar dicha estructura involucraron estudios de la presión osmótica y el coeficiente de difusión de azolectina en benceno (11). Se encontraron dos tipos de micelas invertidas en este sistema: micelas pequeñas formadas por aproximadamente cuatro moléculas de azolectina con un peso molecular de cerca de 3 180 D, y micelas grandes formadas por cerca de 70 moléculas de azolectina con un peso molecular de 55 000 D. De acuerdo a sus cálculos teóricos, ellos sugieren un arreglo de los monómeros en forma laminar para las micelas invertidas de azolectina en benceno. Los mismos autores (11) utilizando difracción de luz estudian las micelas invertidas de azolectina en alcoholes alifáticos. Sus resultados indican que conforme la polaridad del solvente disminuye, el tamaño de la micela invertida aumenta y proponen un arreglo como "bastón" de las moléculas de azolectina en las micelas invertidas para el caso de solventes apolares. Por otro lado Scartazzini y Luisi (52) proponen que conforme se aumenta la concentración de agua en los agregados que forman las moléculas de azolectina dentro de las micelas invertidas cilíndricas, se inicia el entrecruzamiento entre ellas hasta dar lugar a una estructura similar a una malla dinámica (organogeles). Nosotros proponemos un

arreglo estructural para las esporas en nuestro sistema micelar en el que estas se encuentra individualmente rodeada por micelas invertidas grandes y en forma de bastón (el isoctano es más apolar que el benceno), obteniéndose un arreglo en forma de "domo" (Figura 16).

La relevancia biotecnológica de células inmobilizadas en micelas invertidas está basada en la posibilidad de extender la microbiología a medios orgánicos apolares, haciendo posible las biotransformaciones de sustancias insolubles en agua.

Existen reportes en la literatura de trabajos con levaduras, entrecruzadas por medio de glutaraldehído, que han sido usadas para catalizar la hidrólisis enantioselectiva de derivados de aminoácidos en medios micelares(46); el hecho de que la reacción se lleve al cabo en medio orgánico permite la separación en dos diferentes medios del D-éster que no reaccionó y del L-ácido que puede ser extraído en agua de la solución micelar, siendo la enantioselectividad de más del 98 %. También se ha logrado la síntesis de enlaces peptídicos utilizando levaduras en medios orgánicos(46); las células fueron inmobilizadas en camas de alginato de calcio. Este sistema es análogo a la síntesis peptídica catalizada por proteasas solubilizadas en un sistema micelar, con la ventaja de que no es necesario añadir las enzimas puras al sistema, ya que la célula contiene toda la maquinaria metabólica necesaria para la transformación. El rendimiento de la reacción inicial en el sistema con levaduras es del doble comparado con el obtenido en

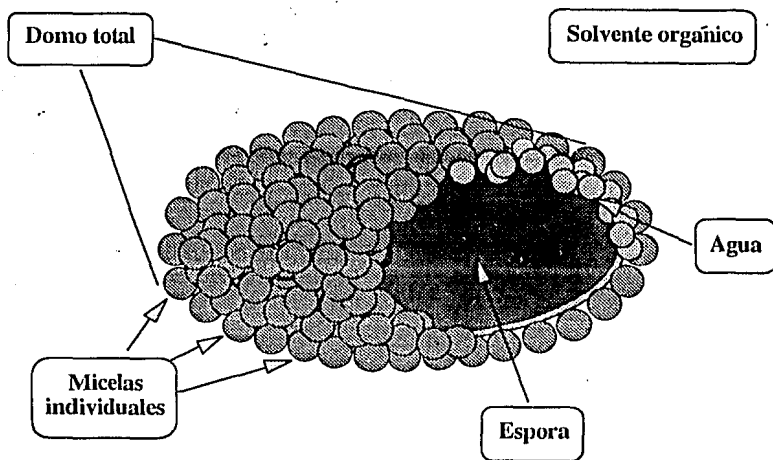


FIGURA 16. MODELO PROPUESTO PARA LA ORGANIZACION DE LAS MICELAS INVERTIDAS ALREDEDOR DE LA ESPORA BACTERIANA.

medios acuosos.

Otra de las aplicaciones de la microbiología en solventes orgánicos es la utilización de levaduras suspendidas en un medio micelar para la reducción de β -ceto-esteres y la hidrólisis del éster para generar productos ópticamente activos; en este sistema utilizan azolectina como tensoactivo, en un medio orgánico al que no se añade agua. El rendimiento de las diferentes reacciones involucradas en la transformación sobrepasa el obtenido en agua (46), y se dan una vez más por la utilización de la maquinaria metabólica celular. Una de las aplicaciones más obvias es la degradación de contaminantes derivados del petróleo por células solubilizadas en el medio orgánico, que son capaces de utilizar al solvente por sí mismo como fuente primaria de energía (47).

Por otro lado, una de las perspectivas a futuro de mayor interés de este tipo de estudios es la aplicación de la ingeniería genética en células bacterianas solubilizadas en solventes orgánicos. El grupo de Arnold (10) ha reportado la obtención, por medio de manipulación genética, de una clona obtenida a partir de *B. subtilis*, que es capaz de exhibir una actividad de subtilisina E significativamente mayor a la que se obtiene con una cepa silvestre, cuando se encuentran en un medio orgánico polar (10 % de dimetilformamida). La clona es obtenida por mutagénesis al azar y un procedimiento de barrido en placa o selección de las clonas que expresan una mayor actividad proteolítica.

Estos resultados abren una gran posibilidad de aplicación en

biotransformaciones, cuando se utilizan células bacterianas modificadas genéticamente para sobre-expresar una actividad catalítica de interés en medios orgánicos.

CONCLUSIONES

1) En este trabajo se muestran evidencias claras de que procesos metabólicos complejos, que involucran un gran número de reacciones enzimáticas y caminos metabólicos, como es la germinación de esporas bacterianas, pueden llevarse al cabo en el seno de solventes orgánicos, obteniéndose un rendimiento de entre el 80 y el 90 % en relación a lo que se obtiene en medio acuoso; este hecho demuestra que una célula bacteriana puede mantenerse activa y por tanto susceptible de ser usada en biotecnología, cuando las condiciones de trabajo requieran que la actividad metabólica este presente en medios orgánicos apolares.

2) El sistema micelar usado estuvo formado por asolectina, isoctano y cantidades limitadas de agua. La presencia de asolectina, que es un tensoactivo zwitteriónico, permite la expresión de la actividad respiratoria que no se presenta en el caso de otros detergentes ya sean aniónicos, cationicos, ó neutros. La adición de tensoactivos neutros como cosurfactante, a nuestro sistema micelar, sobre todo en el caso de brij 36 T, produce un aumento en la actividad respiratoria de las esporas germinadas, pero no mejora la viabilidad de las células.

3) La secuencia de cambios tanto fisiológicos, medidos como actividad respiratoria y su sensibilidad a inhibidores, así como morfológicos, observados por microscopía electrónica, siguen los mismos patrones descritos para la germinación en medio acuoso.

BIBLIOGRAFIA.

1. Aldercreutz, P. y Mattiasson, B. (1987). Aspects of Biocatalyst Stability in Organic Solvents. *Biocatalysis*, 1: 99, 108.
2. Andreoli, A.J., Suehiro, S., Sakiyama, D., Takemoto, J., Vivanco, E., Lara, J.C. y Klute, M.C. (1973). Release and Recovery of Forespores from *Bacillus cereus*. *Journal Bacteriology*, 115: 1159, 1166.
3. Ayala, G., Nacimiento, A., Gómez-Puyou, A. y Darzon, A. (1985). Extraction of Mitochondrial Membrane Proteins into Organic Solvents in a Functional State. *Biochemica et Biophysica Acta*, 810: 115, 122.
4. Ayala, G., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. y Darzon, A. (1986). Thermostability of Membrane Enzymes in Organic Solvents. *FEBS Letters*, 203,1: 41, 43.
5. Bonner, E.J., Wolf, R. y Luisi, P.L. (1980). Micellar Solubilization of Biopolymers in Hydrocarbon Solvents. I. A Structural Model for Protein-Containing Reverse Micelles. *Journal Solid-phase Biochemistry*, 5: 255, 268.
6. Brockerhoff, H. y Jensen, R.G. (1974). *Lypolytic Enzymes*. Academic Press, New York.
7. Bru, R., Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F. (1989). A Theoretical Study on the Expression of Enzymic Activity in Reverse Micelles. *Biochemical Journal*, 259: 355, 361.
8. Bru, R., Sánchez-Ferrer, A. y García-Carmona, F. (1990). The

Effect of Substrate Partitioning on the Kinetics of Enzymes Acting in Reverse Micelles. *Biochemical Journal*, 268: 679, 684.

9. Chatenay, D., Urbach, W., Nicot, C., Vacher, M. y Waks, M. (1987). Hydrodynamic Radii of Protein-free and Protein-containing reverse Micelles as Studied by Fluorescence Recovery After Fringe Photobleaching. Perturbations Introduced by Myelin Basic Protein Uptake. *Journal Physical Chemistry*, 91: 2198.

10. Chen, K. y Arnold, F. (1991). Enzyme Ingeniering for Nonaqueous Solvents: Random mutagenesis to Enhance Activity of Subtilisin E in Polar Organic Media. *Biotechnology*, 9: 1073, 1077.

11. Darszon, A. y Shoshani, L. (1992). Enzymes in Reverse Micelles Containing Phospholipids. *Biomolecules in Organic Solvents*. Gómez-Puyou, A. (Ed). CRC Press, Boca Raton. Capítulo 2, pag 35, 65.

12. Douzou, P. (1980). Cryoenzymology in Aqueous Media. *Advance in Enzymology*, 51: 1, 74.

13. Eicke, H.F. y Rehak, J. (1976). On the Formation of Water/Oil Microemulsions. *Helvetica Chimica Acta*, 59: 2883, 2891.

14. Escamilla, J.E. y Benito, M.C. (1984). Respiratory System of Vegetative and Sporulating *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 160,1: 473, 477.

15. Escamilla, J.E., Barquera, B., Ramirez, R., Garcia-Horsman, A. y Del Arenal, P. (1988). Role of Menaquinone in Inactivation and Activation of the *Bacillus cereus* Forespore Respiratory System. *Journal of Bacteriology*, 170, 12: 5908, 5912.

16. Escamilla, J.E., Ayala, G., Gómez-Puyou, M., Gómez-puyou, A.,

Millán, L. y Darzon, A. (1989). Catalytic Activity of Cytochrome Oxidase and Cytochrome c in Apolar Solvents Containing Phospholipids and low amounts of Water. Archives of Biochemistry and Biophysics, 272, 2: 332, 342.

17. Escobar, L., Salvador, C., Contreras, M. y Escamilla, J.E. (1990). On the Application of the Clark Oxygen Electrode to the Study of Enzyme Kinetics in Apolar Solvents: The Catalasa Reaction. Analytical Biochemistry, 184: 139, 144.

18. Escobar, L. y Escamilla, E. (1992). Respiratory Electron Transfer Activity in an Asolectin-Isooctane Reverse Micellar System. Biochimie, 74: 161, 169.

19. Goldstein, D. B. (1968). A Method for Assau of Catalase with the Oxygen Cathode. Analytical Biochemistry, 24:431.

20. Hanson, B.S., Scrivivasan, V.R. y Halvorson, H.O. (1963). Biochemistry of Sporulation. I. Metabolism of Acetate by Vegetative and Sporulating Cells. Journal Bacteriology, 85: 451, 460.

21. Häring, G., Luisi, P.L. y Meussdoerffer, F. (1985). Solubilization of Bacterial Cells in Organic Solvents Via Reverse Micelles. Biochemical and Biophysical Research Communications., 127, 3: 911, 915.

22. Hanahan, D.J. (1953). The enzymatic Degradation of phosphatidyl Choline in Diethyl Ether. Journal of Biological Chemistry. 155: 199.

23. Hilhorst, R., Laane, C., y Veerger, C. (1983). Enzymatic Conversion of Apolar Compounds in Organic Media Using an

- NADH-Regenerating System and Dehydrogen as Reductant. FEBS Letters, 159, 1: 225, 228.
24. Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C. y Veeger, C. (1984). Rules for the Regulation of Enzyme Activity in Reversed Micelles as illustrated by Conversion of Apolar Steroids by *B*-Hidroxysteroid Dehydrogenase. European Journal of Biochemistry, 144: 459,466.
25. Hilhorst, R. (1989). Applications of Enzyme Containing Reversed Micelles. Structure and Reactivity in Reverse Micelles, Pileni, M.P. (ed), Elsevier, Amsterdam, 323,341.
26. Hilhorst, R., Raymond, M.D., Verhaert J. y Visser, W.G. (1991). Reverse Micelles, Food Biotechnology, 19:665.
27. Hochkoepller, A., y Palmieri, S. (1990). Polarographic Measurement of Oxygen Uptake Using Lipoxxygenase in Reverse Micelles. Biotechnology and Bioenginiering, 36: 672, 678.
28. Inove, A. y Horikoshi, K. (1989). A Pseudomonas Thrives in High Concentrations of Toluene. Nature, 338,16: 264, 266.
29. Jao, T.C. y Kreuz, L.K. (1984). Solubility of Oxygen in Inverted Micelles of Calcium Alkylbenzene Sulfonates. Journal of Colloid and Interface Science, 102, 1: 308,310.
30. Kavanov, A.V., Nametkin, S.N. y Levashov, A.V. (1990). The Principal Difference in Regulation of the Catalytic Activity of Water-Soluble and Membrane Forms of Enzymes in Reverse Micelles. FEBS Letters, 267: 236, 238.
31. Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L. y Martinek, K. (1984). A Microheterogeneous Medium for Chemical (Enzymic) Reactions

Based in an Organic Solvent. Russian Chemical Reviews, 53: 319, 331.

32. Klibanov, M.A. (1986). Enzymes That Work in Organic Solvents. CHEMETEC 16: 354, 359.

33. Klyachko, N.L., Levashov, A.V., y Martinek, K. (1984). Catalysis by Enzymes Incorporated in Reverse Micelles of Surface-Active Substances in Organic Solvents. Peroxidase in the Aerosol OT-Water-Octane System. Molecular Biology, 18, 4: 830, 840.

34. Lesser, E.M., Genshuan, W., Luisi, P. y Maestro, M. (1986). Application of Reverse Micelles for the Extraction of Proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications 135,2: 629, 635.

35. Levashov, A.V., Khmel'nitsky, Y.L., Klyachko, N.L. y Martinek, K. (1984). Surfactants in Solution, vol.2, Mittal, K.L. y Lindman, B. (ed), Plenum Press, New York, 1069.

36. Levashov, K.J., Khmel'nitsky, Y.L., Chernyak, V.Y. y Martinek, K. (1982). Enzymes Entrapped into Reversed Micelles in Organic Solvent Sedimentation Analysis of the Protein/AOT/H₂O/Octane System. Colloid Interface Science, 88: 444, 457.

37. Luisi, P.L. (1985). Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution. Angewandte Chemie (International edition in english), 24: 439, 450.

38. Luisi, P. L. y Magid, L. J. (1986). Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon Micellar Solutions. Critical Reviews in Biochemistry, 20: 409, 474.

39. Luisi, P. L. y Steinmann-Hofmann, B. (1987). Activity and

Conformation of Enzymes in Reverse Micellar Solutions. Cap. 19, en Methods in Enzymology, vol 136: 188, 216. Moabach, K., Ed. Academic Press, INC., Orlando, Florida.

40. Luisi, P. L., Giomini, M., Pileni, M.P. y Robinson, B. H. (1988). Reverse Micelles as Hosts for Proteins and Small Molecules. Biochimica et Biophysica Acta, 947: 209,246.

41. Martinek, K., Levashov, A.V., Khmel'nitsky, Y.L., Khachko, N.L. y Beresi, N.L. (1982). Colloidal Solution of Water in Organic Solvents: a Microheterogeneous Medium for Enzymatic Reactions. Science 218: 889, 891.

42. Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmel'nitsky, Y.L. y Berezin, I.V. (1986). Micellar Enzymology. European Journal Biochemistry 155: 453, 468.

43. Mastro, A.M. y Keith, A.D. (1989). Enzymatic Activity in Reversed Micelles: Some Modelistic Considerations on Bell Shaped Curves. Journal Molecular Liquid. 42, 71.

44. Menger, F. y Yamada. (1979). Enzyme Catalysis in Water Pools. Journal of American Chemical Society, 101: 6731, 6734.

45. Montal, M. (1984). On the Structure Dynamics and Possible Functional Roles of Inverted Micelles in Biological Membranes. Reverse Micelles, Luisi, P.L. y Straub, B.E. (eds), Plenum, New York, 221, 230.

46. Pfammatter, N., Fameglietti, M., Hochk ppler, A. y Luisi, P.L. (1992). Solubilization of Microorganisms in Organic Solvents by Reverse Micelles. Biomolecules in Organic Solvents, Gómez-Puyou, A.

(ed), CRC Press, Boca Ratón, Capítulo 11: 241,259.

47. Pileni, M.P., Zemb, T. y Petit, C. (1985). Solubilization by Reverse Micelles: Solute Localization and Structure Perturbation. *Chemistry and Physiological Letters*, 118: 414,420.

48. Pileni, M.P. (1989). Structural Changes of Reverse Micelles and Microemulsions by Adding Solutes or Protein. *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*, Pileni, M.P., (ed), Elsevier, Amsterdam. Pag 44, 53.

49. Raymond, M., Verhaert, D., Hilhorst, R., Visser, A. y Veeger, C. (1992). The Optimization of Enzyme Catalysis in Organic Media. *Biomolecules in Organic Solvents*, Gómez-Puyou, A. (ed), CRC Press Boca Ratón, Cap. 6, 133, 162.

50. Reynolds, E. S. (1963). The use of Lead Citrate at High pH as an Electron-opaque Stain in Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17:208, 213.

51. Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., y García-Carmona, F. (1988). Kinetic Properties of Polyphenoloxidase in Organic Solvents. A Study in Brij 96-Ciclohexane Reverse Micelles. *FEBS Letters*, 233:363, 366.

52. Scartazzini, R y Luisi, P. L. (1988). Organogels from Lecithins. *Journal of Physical Chemistry*, 92, 829, 833.

53. Setlow, P. (1983). Germination and Outgrowth, en *The Bacterial Spore*, vol 2, Hurst, A. y Gould, G. W., (eds), Academic Press, London, cap. 6.

54. Verhaert, R.M., Tyrakoska, B., Hilhorst, R., Shaafsma, T.J. y Veeger, C. (1990). Enzyme Kinetics in Reverse Micelles. *Behaviour*

- of Enolate Reductase. European Journal of Biochemistry., 187: 73, 79.
55. Walde, P., Giuliani, A.M., Boicelli, A. y Luisi, P.L. (1990). Phospholipid-Fased Reverse Micelles. Chemistry and Physics Lipids, 53: 265, 288.
56. Wirz, J. y Rosenbuch, J.P. (1984) Reverse Micelles, Luisi, P.L. y Straub, B.E. (eds), Plenum, New York, 231.
57. Wong, M., Thomas, J.K., y Gratzel, M. (1976). Fluorescence Probing of Inverted Micelles. The State of Solubilized Water Clusters in Alkane/Diisooctyl Sulfosuccinate (Aerosol OT) Solution. Journal of American Society, 98: 2391, 2397.
58. Wong, M., Thomas, J. K. y Nowak, T. (1977). Structure and State of H_2O in Reverse Micelles. Journal of the American Chemical Society, 14: 4730, 4736.
59. Zampieri, G.G., Jaeckle, H. y Luisi, P.L. (1987). Dissertation. Eidgenossische Technische Hochschule Nr. 8444.