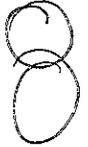


11281



Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Fisiología Celular
Doctorado en Ciencias Biomédicas

“La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus*.
Modelo para el estudio de la Protección Respiratoria de la
Nitrogenasa”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Presenta

M.C. Marcos Flores Encarnación

Director de la Tesis: Dr. Edgardo Escamilla Marván

México, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis Padres:

Agradezco a mis padres por el gran apoyo incondicional que he recibido de ellos día con día, por sus enseñanzas, por sus sabios consejos y sus palabras de aliento en los momentos más difíciles. Gracias, porque han sabido predicar siempre con el ejemplo y han hablado siempre con la verdad. Para mis padres, un amplio reconocimiento y mis más sinceros agradecimientos.

A mis Hermanos:

Agradezco a mis hermanos Coco, Juan y Eduardo por toda la ayuda que me han brindado, por los momentos que hemos compartido juntos, los ratos de alegría y de tristeza y porque sé que tengo en ellos, alguien en quién puedo confiar. Para mis hermanos, muchas gracias.

A mis Amigos:

A todos mis compañeros y amigos, quienes han compartido una parte de su vida conmigo y me han brindado su amistad. Gracias.

Agradecimientos

La investigación que se presenta en esta Tesis fue realizada en el laboratorio 101 oriente del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular –UNAM, bajo la dirección del Dr. Edgardo Escamilla Marván, a quién agradezco el gran apoyo que me ha brindado durante mi estancia en el laboratorio y durante mi permanencia en el Programa de Doctorado.

Agradezco la participación de los miembros del Comité Tutorial, quienes con sus sugerencias y sus sabios consejos fueron orientando y corrigiendo el rumbo de este trabajo:

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Edgardo Escamilla Marván

A ustedes mil gracias.

Agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por otorgarme la beca que me permitió mantener y concluir mis estudios de doctorado. Agradezco también a la Subdirección del Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP)-Tesis Doctoral, por los apoyos económicos brindados durante mi estancia en el doctorado, los cuales nos permitieron adquirir materiales para la realización de este trabajo.

Agradezco al grupo de Bioquímica y Genética Microbiana, del Centro de Investigaciones Microbiológicas (Universidad Autónoma de Puebla), por las facilidades otorgadas para la realización de una parte importante de este trabajo.

A los miembros del H. Jurado:

Dra. Socorro Durán Vargas

Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Armando Gómez Puyou

Dr. Jesús Caballero Mellado

Dr. Jorge Membrillo Hernández

Dr. Edgardo Escamilla Marván

**“ La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus*. Modelo
para el estudio de la Protección Respiratoria
de la Nitrogenasa ”**

INDICE

| | PAGINA |
|---|------------|
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| Abreviaturas | 5 |
| 1. Introducción | 6 |
| 1.1 El papel del oxígeno en la respiración de los organismos | 7 |
| 1.2 Los sistemas respiratorios bacterianos | 8 |
| 1.3 Diversidad de los sistemas respiratorios | 8 |
| 2. El papel del oxígeno en la fijación biológica de nitrógeno | 12 |
| 2.1 La fijación biológica de nitrógeno | 12 |
| 3. La protección respiratoria | 14 |
| 3.1 La protección respiratoria, una novedosa función del sistema respiratorio en bacterias | 14 |
| 3.2 El sistema respiratorio de <i>Azotobacter vinelandii</i> | 15 |
| 4. La posible existencia de un mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa en <i>Acetobacter diazotrophicus</i> | 17 |
| 4.1 <i>Acetobacter diazotrophicus</i> puede fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas | 17 |
| 4.2 <i>Acetobacter diazotrophicus</i> | 18 |
| Hipótesis y Objetivos | 20 |
| 5. Materiales y Métodos | 24 |
| 6. Resultados | 34 |
| 7. Discusión | 71 |
| 8. Conclusiones y Expectativas | 86 |
| 9. Referencias | 90 |
| 10. Artículo | 104 |

“ La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus*. Modelo para el estudio de la Protección Respiratoria de la Nitrogenasa ”

RESUMEN

La fijación de nitrógeno en todos los organismos diazótrofos es dependiente de la enzima nitrogenasa (Nasa). Dos propiedades de esta enzima, plantean problemas especiales de tolerancia al oxígeno durante la fijación de nitrógeno en aerobios estrictos. Primero, las dos proteínas que componen a la nitrogenasa son rápidamente inactivadas por el oxígeno; segundo, los altos requerimientos de ATP para la nitrogenasa deben ser satisfechos, en aerobios estrictos, a través de la fosforilación oxidativa. Las observaciones realizadas en cultivos de *Azotobacter vinelandii*, adaptándose a los cambios en las concentraciones de oxígeno, han llevado al concepto de “protección respiratoria”.

Acetobacter diazotrophicus se ha reconocido por sus propiedades de aerotolerancia durante la actividad diazotrófica. En este trabajo se reporta la composición y organización del sistema respiratorio cuando *A. diazotrophicus* crece aeróbicamente fijando nitrógeno, además su posible participación en el mecanismo de “protección respiratoria” para la nitrogenasa. En este sentido, *A. diazotrophicus* crecido en altas concentraciones de oxígeno ($K_{La} = 148 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) mostró altas actividades respiratorias, muy superiores a las registradas en otras bacterias aeróbicas. Así la concentración de oxígeno disuelto es llevada a niveles muy bajos, indetectables por el electrodo de oxígeno. La alta capacidad respiratoria de *A. diazotrophicus* fue atribuida a un conjunto de deshidrogenasas membranales muy activas; sobresaliendo, las deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído, las cuales no están ligadas a la cadena respiratoria y no utilizan a la ubiquinona como aceptor de electrones. Los resultados sugirieron que *A. diazotrophicus* cuenta con un vigoroso mecanismo de “protección respiratoria” para la nitrogenasa, donde el rápido consumo de oxígeno por las oxidadas terminales mantiene una concentración intracelular baja de oxígeno, lo cual favorece la función de la nitrogenasa.

“ The aerobic diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus*.
A Model for nitrogenase respiratory protection ”

Abstract

Nitrogen fixation in all diazotrophs is dependent on the enzyme nitrogenase. Two properties of this enzyme lead to the problem of oxygen tolerance during nitrogen fixation in strict aerobes. First, the two proteins comprising nitrogenase are rapidly inactivated by oxygen; second, the high ATP requirements for nitrogenase activity must be satisfied in aerobes by oxidative phosphorylation. Observations of cultures of *Azotobacter vinelandii* adapting to changes in O₂ concentrations have led to the concept of “respiratory protection”.

Diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* is more tolerant to oxygen than that of most aerobic diazotrophs. The goal of this work was study of the respiratory system and its possible role in “respiratory protection” of the nitrogenase. Here we report the composition and organization of the respiratory system when *Acetobacter diazotrophicus* grown aerobically nitrogen fixing.

A. diazotrophicus exhibited one of the highest respiratory activities among aerobic organisms. The increased respiratory activity was observed when cells were grown at an elevated oxygen concentration (e.g. $K_{La} = 148 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). According to the hypothesis of “respiratory protection”, oxygen is consumed readily at the cell surface so that it is prevented from entering the cell. Membrane enzymes of *A. diazotrophicus* showed the highest oxidase and dehydrogenase activities with glucose, ethanol and acetaldehyde as substrates. Dehydrogenase of glucose, ethanol and acetaldehyde are not linked to the respiratory chain; they do not use ubiquinone as electron acceptor.

Our results suggest that *A. diazotrophicus* has high respiratory activities. The terminal oxidases and high respiration rates for substrate could represent a vigorous “respiratory protection” mechanism of nitrogenase: the rapid consumption of O₂ by a highly active terminal oxidase maintains an intracellular oxygen concentration compatible with nitrogenase function.

ABREVIATURAS

Las abreviaturas que no figuran en esta lista, fueron indicadas como aparecen en la Nomenclatura establecida en Biochem. J. 1991. 273: 1-19.

| | |
|----------------------|--|
| TMPD | Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina |
| THQ | Tetrahydroquinol |
| TQ ⁺ | Tetrahydroquinona |
| PQQ | Quinona de pirrol-quinolina |
| CO | Monóxido de carbono |
| c.e.m. | Coefficiente de extinción milimolar |
| Cit- | Citocromo |
| Nasa | Nitrogenasa |
| FBN | Fijación biológica de nitrógeno |
| ARA | Ensayo de reducción de acetileno |
| K_m | Constante de Michaelis |
| K_i | Constante de inhibición |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| U.V. | Ultravioleta |
| UQ | Ubiquinona |
| G-DH | Glucosa deshidrogenasa |
| A-DH | Alcohol deshidrogenasa |
| AL-DH | Aldehído deshidrogenasa |
| NADH-DH | NADH deshidrogenasa |
| S-DH | Succinato deshidrogenasa |
| Asc | Ascorbato |
| CaC ₂ | Carburo de calcio |
| Ab _{560 nm} | Absorbancia a 560 nm |
| L | Litro |
| PAGE | Gel de poliacrilamida |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |

1. Introducción

1.1 El papel del oxígeno en la respiración de los organismos.

Muchos de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en los seres vivos involucran la participación del oxígeno. Tal es el caso de la respiración aerobia, la cual permite obtener energía útil para la célula a través del metabolismo oxidativo mitocondrial (en eucariotes) o a través del metabolismo oxidativo que se lleva a cabo en la membrana citoplasmática (en procariotes como las bacterias) (35,44).

La respiración aeróbica es posible gracias a las propiedades cinéticas y termodinámicas que convierten al O_2 en el aceptor terminal de electrones más apropiado. Entre sus propiedades destacan su reactividad cinética, la cual es intermedia entre la reactividad excesiva de los halógenos y la pobre reactividad del nitrógeno. En cuanto a su potencial rédox, el par O_2/H_2O tiene el potencial electroquímico más positivo (+ 0.80 V), lo que hace al oxígeno más oxidante cuando se le compara por ejemplo con el nitrato, el fumarato y el hierro (Fe^{+3}), tres aceptores terminales de electrones en las cadenas respiratorias anaerobias de bacterias. El uso del O_2 como aceptor terminal de electrones no está libre de problemas. Su inercia cinética requiere de una etapa de activación, la cual se consigue con un centro metálico como el hierro de un grupo hemo y un cobre en el sitio catalítico, estructura que caracteriza a las oxidasas terminales (35,89). Su baja solubilidad en agua requiere que las proteínas que lo reducen (oxidasas) y las proteínas que lo capturan (hemoglobinas) tengan altas afinidades por el sustrato O_2 . Las oxidasas reducen completamente al oxígeno produciendo agua; sus mecanismos de acción están diseñados para reducir al oxígeno en dos pasos, entregando dos electrones en cada etapa. Afortunadamente los intermediarios de la reducción permanecen fuertemente asociados al sitio activo. Este mecanismo minimiza la producción de superóxido libre (O_2^-), peróxido (HO_2^-) e hidroxilo (HO^\cdot), especies que se generan por la reducción parcial con uno, dos y tres electrones, respectivamente.

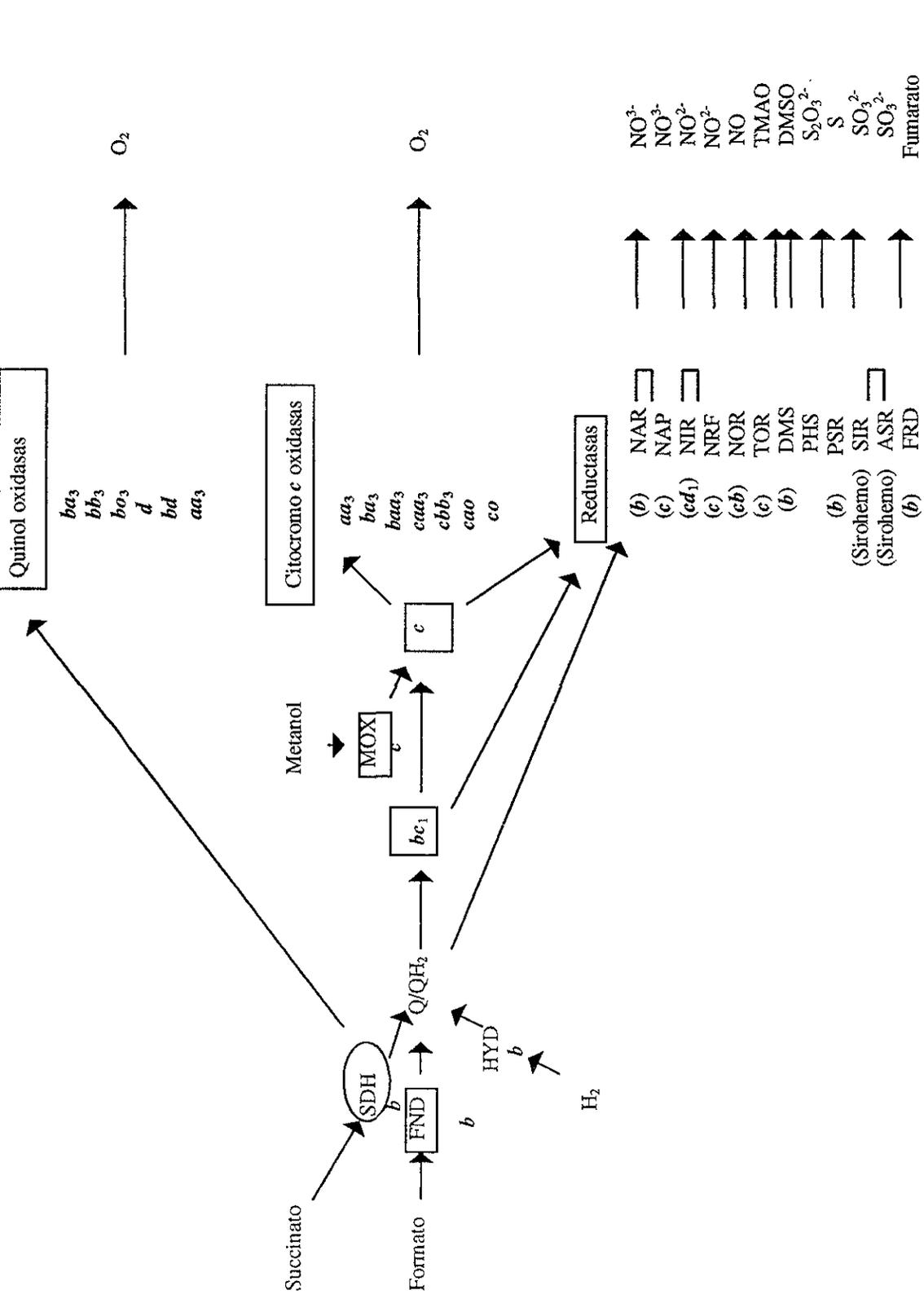
1.2 Los sistemas respiratorios bacterianos.

En general, los sistemas respiratorios bacterianos están formados por una variedad de constituyentes, tales como flavoproteínas, proteínas de hierro-azufre, quinonas y citocromos. Todos estos componentes se encuentran embebidos en la membrana citoplasmática (59).

Al igual que en la mitocondria, en un sistema respiratorio bacteriano pueden estar presentes los cuatro complejos respiratorios que participan en la transferencia de electrones: el complejo I o NADH-deshidrogenasa, el complejo II o succinato-deshidrogenasa, el complejo III o citocromo bc_1 y el complejo IV o citocromo oxidasa (4). Además existen otros dos componentes difusibles que conectan a los complejos: la ubiquinona o coenzima Q y el citocromo-*c*. La ubiquinona, una benzoquinona unida a 10 cadenas de isopreno, conecta a los complejos I y II con el complejo III, mientras que el citocromo *c* conecta al complejo III con el complejo IV. Esos complejos respiratorios transfieren electrones al oxígeno (respiración aerobia) o hacia aceptores alternativos terminales cuando el O_2 no está disponible (35,55). Hasta donde se sabe el funcionamiento de la NADH-deshidrogenasa, del citocromo bc_1 y de la oxidasa terminal (con sus excepciones) se asocian con el bombeo de protones a través de la membrana citoplasmática (10,28,51). De esta manera, el transporte de electrones a lo largo de la membrana y de protones a través de ella, conduce a la formación de un gradiente de potencial electroquímico de protones transmembranal, que es utilizado para la síntesis de ATP vía la ATP sintasa (4).

1.3 Diversidad de los sistemas respiratorios.

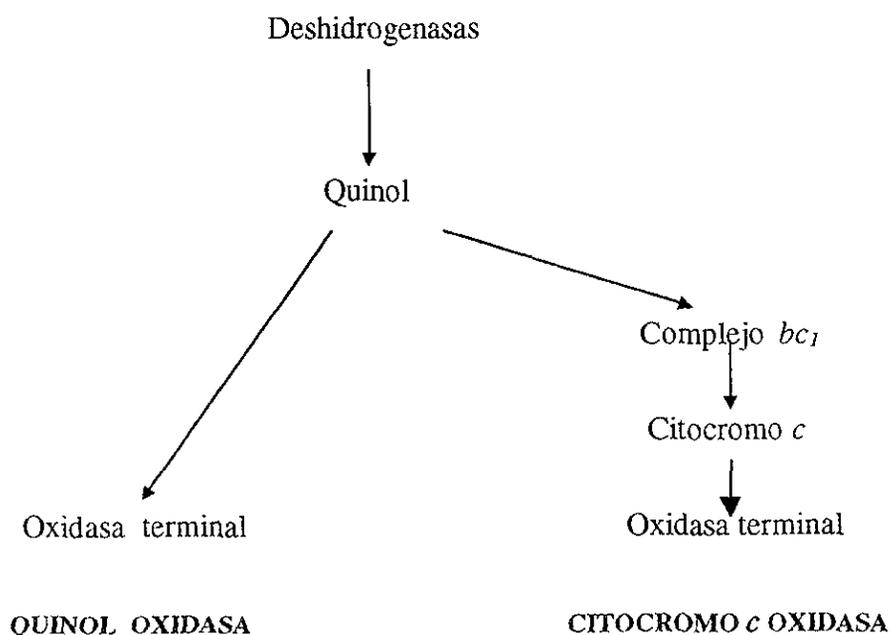
La gran diversidad de los sistemas respiratorios responde a la gran variedad de ambientes que habitan las bacterias (**Esquema 1**) (96). Las bacterias son capaces de oxidar una amplia variedad de sustratos, los cuales utilizan como fuente de energía (28,29,35). Para ello existen deshidrogenasas membranales (específicas para cada sustrato), las cuales transfieren electrones a la poza de las quinonas, siendo las más comunes aquellas que se derivan de la ubiquinona y de la menaquinona. Cada grupo bacteriano posee un



Esquema 1. Vías respiratorias de las bacterias. Sólo se muestran algunas enzimas con citocromos asociados: SDH- succinato deshidrogenasa, FDH- fumarato deshidrogenasa, HYD- hidrogenasa, Mox- metanol oxidasa. Q/QH₂ representa la poza de quinona/quinol en las membranas. Datos tomados de Thöny-Meyer, 1997 (96).

número variable de deshidrogenasas que se expresan de acuerdo con las condiciones de cultivo (presencia de sustrato en el medio). Algunas deshidrogenasas sólo se expresan en condiciones aerobias, otras sólo en condiciones anaerobias de cultivo; por ejemplo la formato deshidrogenasa de *Escherichia coli*, se expresa en condiciones anaerobias y en presencia de formato (29). Esta primera sección en los sistemas respiratorios bacterianos podemos denominarla como “quinona reductora”, por ello la poza de las quinonas es el punto de confluencia para las deshidrogenasas.

Las bacterias también presentan un panorama extraordinariamente diverso respecto a sus oxidasas terminales, las cuales se pueden dividir en dos grupos importantes: las quinol oxidasas y las citocromo-*c* oxidasas (**Esquema 2**). Las quinol-oxidasas son aquellas oxidasas que reciben directamente los electrones de la poza del quinol (QH₂), mientras que las citocromo-*c* oxidasas son aquellas que reciben los electrones de un citocromo *c*, el cual es reducido por el complejo *bc*₁ (4).



Esquema 2. Esquema general que muestra la composición de los sistemas respiratorios de tipo quinol oxidasa y citocromo *c* oxidasa.

Los esquemas 1 y 2 muestran claramente que la segunda sección de muchos de los sistemas respiratorios bacterianos es divergente y por ello a partir del quinol diversas cadenas conducen los electrones al O₂ o en ausencia de éste, hacia otros aceptores terminales de electrones. Esto es algo común entre bacterias, en contraste a la mitocondria que sólo tiene una cadena respiratoria (97).

Las bacterias pueden hacer uso de un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno. Esta flexibilidad se debe a la presencia de dos o más oxidasas terminales, cuyas afinidades por O₂ corresponden a su hábitat y pueden cubrir intervalos de concentración de O₂ que van de 10⁻⁹ a 10⁻⁶ M. El caso mejor estudiado es el de *E. coli*, donde se encuentra un sistema respiratorio constituido por dos quinol oxidasas, las cuales se regulan de acuerdo con la tensión de O₂. Así, en condiciones aeróbicas *E. coli* expresa a la quinol oxidasa *bo* mientras que en condiciones de microaerofilia expresa la oxidasa *bd* (44,55,82). Las propiedades cinéticas de estas dos quinol oxidasas explican su función diferencial en el uso del O₂. La oxidasa *bo* tiene un K_m por O₂ de 100 nM, mientras que la oxidasa *bd* tiene una afinidad sorprendentemente alta, K_m por O₂ de 5 nM (17,18). Esta elevada afinidad por el oxígeno le permite a *E. coli* utilizar el O₂ en ambientes microaerófilicos, aunque esta mayor afinidad se paga con una baja eficiencia en la translocación de protones, ya que la oxidasa *bd* transloca un máximo de 1 H⁺/e⁻ (89) e inclusive hay reportes que sostienen que la oxidasa *bd* no transloca protones (82). Contrastando con lo anterior la quinol oxidasa *bo* transloca 2 H⁺/e⁻ (89).

Hay que hacer notar que para las bacterias el bombeo de protones no siempre es lo que más interesa. Aunque la función primaria de la cadena respiratoria es la generación de un gradiente electroquímico de protones, la cadena respiratoria también es necesaria como “tiradero de poder reductor” con el fin de reoxidar el NADH.

También existen condiciones en que las cadenas respiratorias actúan de una manera desacoplada para controlar la concentración de O₂ intracelular (10,81). Así ocurre cuando es necesario proteger a ciertos componentes enzimáticos de vías metabólicas de la acción tóxica del O₂; tal es el caso de la fijación de nitrógeno en algunas bacterias de vida libre (81).

2. El papel del oxígeno en la fijación biológica de nitrógeno.

2.1 La fijación biológica de nitrógeno.

A pesar de que el nitrógeno elemental (N_2) es un gas muy abundante en la atmósfera, como fuente de nitrógeno es difícilmente utilizable por los seres vivos (41). Esta abundancia del nitrógeno, que contrasta con la dificultad de su utilización química, crea una paradoja que ha sido ingeniosamente resuelta por el proceso de la fijación biológica de nitrógeno (FBN): la reducción del N_2 a una forma metabólicamente utilizable, el amonio (41). Esta capacidad para fijar nitrógeno está restringida a un número de organismos procariotes a los que se les ha llamado “diazótrofos” y ocurre tanto en bacterias anaeróbicas, aerobias facultativas, aerobios estrictos, así como en bacterias fotosintéticas. La principal fuente de nitrógeno fijado en la biósfera procede de los organismos fotótrofos y de los organismos heterótrofos, los cuales guardan relación simbiótica con algunas plantas o son heterótrofos de vida libre (53,77).

La fijación de nitrógeno es un proceso anaeróbico que demanda de grandes cantidades de ATP (14 a 16 moléculas de ATP) y de una fuente de electrones de bajo potencial para su actividad (40,86). La reacción química que describe la fijación de nitrógeno es la siguiente:



El proceso es catalizado por la enzima nitrogenasa (Nasa), la cual está compuesta de dos proteínas, una de ellas es la hierro-proteína, y la otra es la hierro-molibdeno proteína; ambas son altamente sensibles al O_2 y el daño que sufren es irreversible (16,40,53,54,58).

Algunos de esos procariotes son aerobios obligados, por lo que la capacidad de mantener un metabolismo aerobio es benéfico dados los altos costos que implica la fijación de nitrógeno (16,22,54). Sin embargo, la presencia del O_2 es dañina porque inactiva a la enzima nitrogenasa. Por ello, los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias bioquímicas y fisiológicas que les han permitido resolver esta paradoja. La mayoría de los

diazótrofos evaden esta sensibilidad al O₂ empleando algunos mecanismos de protección. Se han descrito en la literatura algunas formas de protección para la enzima nitrogenasa, de las cuales se pueden mencionar las siguientes:

- En *Azotobacter vinelandii*, un diazótrofo de vida libre, la unión de proteínas fierro-azufre (Fe-S) a la nitrogenasa genera un complejo transitorio e inactivo de la enzima; este complejo queda de esta manera protegido del daño por oxígeno y es reversible (“protección conformacional”) (16,76,87,88).
- En algunos organismos microaerófilos de vida libre como *Azospirillum* se ha detectado una fuerte respuesta aerotáctica que les permite desplazarse hacia los sitios donde la concentración de oxígeno es óptima, tanto para la generación de energía como para la fijación de nitrógeno (85,104).
- La presencia de barreras físicas, impermeables al O₂, mantienen ambientes con escaso oxígeno, por ejemplo los nódulos de las leguminosas facilitan el desarrollo de *Rhizobium* en una relación simbiótica donde los bacteroides expresan su actividad diazotrófica (5).
- Los miembros del género *Azoarcus* spp., son microorganismos estrictamente aerobios que sólo fijan nitrógeno bajo condiciones microaerófilas. En este género bacteriano se detectó la presencia de estructuras membranales intracitoplásmicas, generadas a partir de la propia membrana citoplásmica, las cuales fueron llamadas “diazosomas”. Lo más interesante de este mecanismo de protección es que las estructuras membranales sólo se ponen de manifiesto cuando la bacteria se encuentra fijando nitrógeno; además la fierro-proteína, uno de los componentes de la nitrogenasa, se mantiene unida a estas estructuras. Se ha propuesto que la asociación entre la membrana citoplásmica y la nitrogenasa facilita el flujo de ATP, desde el sitio donde se está produciendo hacia la reacción altamente demandante de energía, la fijación de nitrógeno (43).
- En las bacterias que fijan nitrógeno aeróbicamente, la concentración de O₂ disuelto cercana a sus superficies, debe ser suficiente para mantener funcionando sus oxidadasas

respiratorias de manera eficiente. Otro mecanismo para generar regiones locales de baja concentración de oxígeno es la agregación microbiana. Así, en la raíz del Kallar se han detectado corpúsculos redondos de 3 a 20 μm de diámetro y son el resultado de la agregación bacteriana, en especial del género *Azoarcus*. La agregación microbiana permite mantener un gradiente de O_2 , por ello se cree que la concentración de O_2 en el centro del corpúsculo es unas 1000 veces menor que la concentración del mismo en la superficie (42).

- En los nódulos de las leguminosas, la leghemoglobina funciona como una proteína acarreadora que mantiene un ambiente bajo en oxígeno (5).
- En el género *Azotobacter* se describió otro mecanismo de protección de la nitrogenasa. Este mecanismo ha sido llamado de “protección respiratoria”. Las altas tasas respiratorias son las responsables de abatir la tensión de oxígeno y mantener un ambiente intracelular bajo en oxígeno, el cual es compatible con la función de la nitrogenasa (16,81).

3. La protección respiratoria.

3.1 La protección respiratoria, una función novedosa del sistema respiratorio en bacterias.

Dalton y Postgate (1969) (16) postularon que la nitrogenasa se protege del daño por O_2 a través de la alta respiración celular o bien por un cambio conformacional de la misma proteína, inducido por proteínas Fe-S, que fueron mencionadas anteriormente. De acuerdo con la hipótesis de la protección respiratoria, el O_2 se consume en las proximidades de la superficie celular y de esta forma se previene que el O_2 entre a la célula. Esta hipótesis fue propuesta basándose en el hecho de que las azotobacterias tienen una de las más altas actividades respiratorias registradas entre los organismos aerobios, además de que la actividad respiratoria se incrementa cuando las células se crecen a concentraciones elevadas de O_2 . También se ha propuesto que el incremento en la respiración se acompaña de un

respiratorias de manera eficiente. Otro mecanismo para generar regiones locales de baja concentración de oxígeno es la agregación microbiana. Así, en la raíz del Kallar se han detectado corpúsculos redondos de 3 a 20 μm de diámetro y son el resultado de la agregación bacteriana, en especial del género *Azoarcus*. La agregación microbiana permite mantener un gradiente de O_2 , por ello se cree que la concentración de O_2 en el centro del corpúsculo es unas 1000 veces menor que la concentración del mismo en la superficie (42).

- En los nódulos de las leguminosas, la leghemoglobina funciona como una proteína acarreadora que mantiene un ambiente bajo en oxígeno (5).
- En el género *Azotobacter* se describió otro mecanismo de protección de la nitrogenasa. Este mecanismo ha sido llamado de “protección respiratoria”. Las altas tasas respiratorias son las responsables de abatir la tensión de oxígeno y mantener un ambiente intracelular bajo en oxígeno, el cual es compatible con la función de la nitrogenasa (16,81).

3. La protección respiratoria.

3.1 La protección respiratoria, una función novedosa del sistema respiratorio en bacterias.

Dalton y Postgate (1969) (16) postularon que la nitrogenasa se protege del daño por O_2 a través de la alta respiración celular o bien por un cambio conformacional de la misma proteína, inducido por proteínas Fe-S, que fueron mencionadas anteriormente. De acuerdo con la hipótesis de la protección respiratoria, el O_2 se consume en las proximidades de la superficie celular y de esta forma se previene que el O_2 entre a la célula. Esta hipótesis fue propuesta basándose en el hecho de que las azotobacterias tienen una de las más altas actividades respiratorias registradas entre los organismos aerobios, además de que la actividad respiratoria se incrementa cuando las células se crecen a concentraciones elevadas de O_2 . También se ha propuesto que el incremento en la respiración se acompaña de un

desacoplamiento del transporte de electrones, de tal manera que un aumento en el consumo de O₂ no se asocia a un incremento en la producción de ATP (16). Este desacoplamiento parcial en la respiración celular es posible gracias a que el sistema respiratorio de las azotobacterias está ramificado y cuenta con dos citocromo oxidasas, una de tipo *bo* y de otra de tipo *bd*. Se cree que esta última vía presenta dicho desacoplamiento.

La protección respiratoria parece estar activa mientras las células fijan nitrógeno en presencia de O₂. De acuerdo con esto, una mutante de *A. vinelandii* que no expresa el citocromo *bd* no es capaz de fijar nitrógeno aeróbicamente. Por otra lado, una mutante que expresa niveles elevados de citocromo *bd* y cantidades no detectables de citocromo *bo* fue capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas (60).

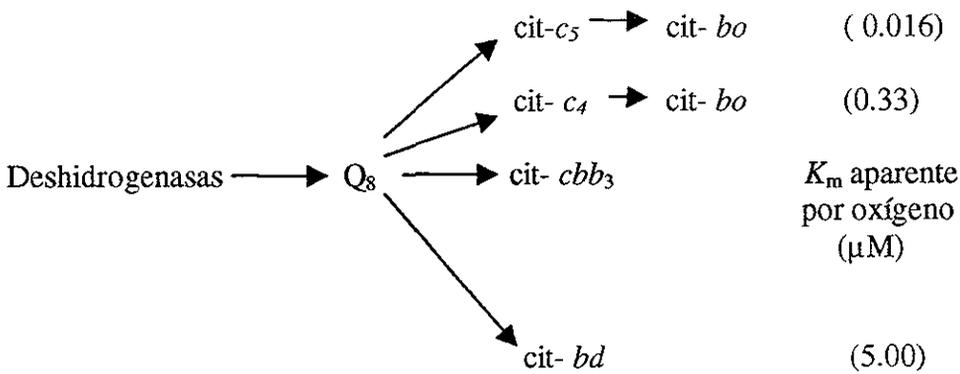
Se ha propuesto que la respiración en los organismos capaces de fijar nitrógeno aeróbicamente debe desempeñar al menos dos funciones: la primera, proveer el suficiente ATP para sostener el alto costo energético que implica la fijación de nitrógeno, y la segunda, remover el exceso de O₂ como parte del mecanismo que proteja a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno (51,77,81,87).

3.2 El sistema respiratorio de *Azotobacter vinelandii*.

La respiración de *Azotobacter vinelandii* ha sido extensamente estudiada. Los miembros del género *Azotobacter* son organismos aeróbicos estrictos, los cuales fijan nitrógeno en el estado de vida libre y lo pueden hacer en un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno (51). Esta habilidad involucra cambios en la síntesis y en las actividades de los componentes de la cadena respiratoria (41,48,81,103).

El sistema respiratorio de *A. vinelandii* se localiza en la membrana citoplásmica y consiste de un conjunto de transportadores rédox (35,81,87,102,103). Con base en estudios de sensibilidad al monóxido de carbono (CO) y al cianuro de potasio (KCN), así como en la espectrofotometría de fotodisociación de los complejos de CO y de las cinéticas de óxido-reducción de los citocromos, se propuso el modelo del sistema respiratorio de *A. vinelandii* que se observa en el **Esquema 3** (51). El sistema respiratorio comprende varias deshidrogenasas flavín-dependientes para NADH, succinato, lactato y malato, que donan

los electrones a la ubiquinona-8. Las actividades específicas de tales deshidrogenasas resultaron extremadamente altas, indicando una gran capacidad de la bacteria para oxidar rápidamente estos sustratos, por ejemplo los valores registrados para el NADH estuvieron alrededor de $5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; las actividades respiratorias con malato, lactato y succinato fueron menores (47).



Esquema 3. Esquema que muestra la composición del sistema respiratorio de *A. vinelandii*. Las deshidrogenasas para NADH, malato y otros sustratos se muestran transfiriendo colectivamente sus electrones a la ubiquinona-8 (Q_8). Durante la fijación de nitrógeno, el flujo de electrones hacia el oxígeno se conduce por la vía del citocromo bd (K_m por oxígeno = $5 \mu\text{M}$). La vía alternativa (no necesaria para la fijación de nitrógeno) consiste de una oxidasa de mayor afinidad por oxígeno, la oxidasa bo (K_m por oxígeno = $0.016 - 0.33 \mu\text{M}$) (77, 81).

Al menos seis citocromos se han detectado en el sistema respiratorio de *A. vinelandii*. Los citocromos bd y bo funcionan como oxidasas terminales. Recientemente se han descrito algunos genes que codifican para la oxidasa terminal cbb_3 en *A. vinelandii*, lo que abre la posibilidad de la existencia de una tercera oxidasa terminal (81). En *A. vinelandii* se han encontrado al menos cuatro citocromos de tipo c : dos mayoritarios, a los que se les llamó citocromos c_4 y c_5 , que donan electrones directamente a la oxidasa terminal bo ; los dos restantes corresponden a los citocromos c_{551} y c_{555} . La función de estos últimos se desconoce. Anteriormente se consideraba que los citocromos c_4 y c_5 participaban de manera secuencial en una misma vía de transferencia de electrones, desde la ubiquinona

hasta la oxidasa *bo*. En la actualidad se han propuesto dos vías por donde los electrones fluyen en paralelo: en la primera, los electrones fluyen de la ubiquinona al citocromo *c₄* y de ahí a la oxidasa terminal; la segunda vía consiste en la transferencia de electrones desde la ubiquinona al citocromo *c₅* y luego a la oxidasa *bo* (51). Así el flujo de electrones hacia el O₂ es conducido por dos o posiblemente tres oxidasas terminales, cuyas afinidades por O₂ son diferentes. En el Esquema 3 se muestran los valores de *K_m* por oxígeno correspondientes a estas oxidasas terminales.

La citocromo oxidasa *bd* de *A. vinelandii* predomina en las células que crecen fijando nitrógeno aeróbicamente. Esta oxidasa presenta baja afinidad por O₂ (*K_m* = 5 μM), su función debe ser el rápido consumo de oxígeno y la protección respiratoria de la nitrogenasa en ambientes aeróbicos (18). El estudio con mutantes de *A. vinelandii* carentes de citocromo *bd*, ha revelado que esta oxidasa terminal desempeña un papel primordial en la eliminación de O₂ durante la fijación de nitrógeno. Las mutantes carentes de citocromo *bd* pierden la diazotrofia aerotolerante, característica de la cepa silvestre de *A. vinelandii* y fijan nitrógeno sólo en condiciones microaerófilas (17,52,58). A diferencia de la citocromo oxidasa *bd* de *A. vinelandii*, las oxidasas terminales *bd* de *E. coli* y *K. pneumoniae* se expresan bajo condiciones de crecimiento microaerófilas (18,50). En este caso, la oxidasa terminal *bd* presenta alta afinidad por oxígeno (*K_m* = 5 – 20 nM), lo que permite que estas bacterias puedan desarrollarse en ambientes donde el oxígeno es escaso (17,18,81). Lo más interesante de esto es que las citocromo oxidasas *bd* encontradas en *A. vinelandii*, *E. coli* y *K. pneumoniae* son estructuralmente muy similares, sin embargo las afinidades por oxígeno son diferentes; la razón se desconoce.

4. La posible existencia de un mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa en *Acetobacter diazotrophicus*.

4.1 *Acetobacter diazotrophicus* puede fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas.

Las especies bacterianas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* forman parte del grupo de las bacterias acéticas, las cuales producen ácido acético a partir del etanol; estas bacterias pueden crecer en medios ácidos (30). En años recientes se describieron los

hasta la oxidasa *bo*. En la actualidad se han propuesto dos vías por donde los electrones fluyen en paralelo: en la primera, los electrones fluyen de la ubiquinona al citocromo *c₄* y de ahí a la oxidasa terminal; la segunda vía consiste en la transferencia de electrones desde la ubiquinona al citocromo *c₅* y luego a la oxidasa *bo* (51). Así el flujo de electrones hacia el O₂ es conducido por dos o posiblemente tres oxidasas terminales, cuyas afinidades por O₂ son diferentes. En el Esquema 3 se muestran los valores de *K_m* por oxígeno correspondientes a estas oxidasas terminales.

La citocromo oxidasa *bd* de *A. vinelandii* predomina en las células que crecen fijando nitrógeno aeróbicamente. Esta oxidasa presenta baja afinidad por O₂ (*K_m* = 5 μM), su función debe ser el rápido consumo de oxígeno y la protección respiratoria de la nitrogenasa en ambientes aeróbicos (18). El estudio con mutantes de *A. vinelandii* carentes de citocromo *bd*, ha revelado que esta oxidasa terminal desempeña un papel primordial en la eliminación de O₂ durante la fijación de nitrógeno. Las mutantes carentes de citocromo *bd* pierden la diazotrofia aerotolerante, característica de la cepa silvestre de *A. vinelandii* y fijan nitrógeno sólo en condiciones microaerofílicas (17,52,58). A diferencia de la citocromo oxidasa *bd* de *A. vinelandii*, las oxidasas terminales *bd* de *E. coli* y *K. pneumoniae* se expresan bajo condiciones de crecimiento microaerofílicas (18,50). En este caso, la oxidasa terminal *bd* presenta alta afinidad por oxígeno (*K_m* = 5 – 20 nM), lo que permite que estas bacterias puedan desarrollarse en ambientes donde el oxígeno es escaso (17,18,81). Lo más interesante de esto es que las citocromo oxidasas *bd* encontradas en *A. vinelandii*, *E. coli* y *K. pneumoniae* son estructuralmente muy similares, sin embargo las afinidades por oxígeno son diferentes; la razón se desconoce.

4. La posible existencia de un mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa en *Acetobacter diazotrophicus*.

4.1 *Acetobacter diazotrophicus* puede fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas.

Las especies bacterianas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* forman parte del grupo de las bacterias acéticas, las cuales producen ácido acético a partir del etanol; estas bacterias pueden crecer en medios ácidos (30). En años recientes se describieron los

componentes respiratorios de *Acetobacter aceti* y de *Gluconobacter suboxydans*. En ambos casos las cadenas respiratorias resultaron similares. Consisten de varias deshidrogenasas, de una quinona (ubiquinona, Q₁₀) y de varios citocromos de tipo *c*. *A. Aceti* posee dos quinol oxidasas terminales, una es la *ba* (también conocida como citocromo *a*₁) y la otra oxidasa es la *bo*. *G. suboxydans* sólo posee una quinol oxidasa, la *bo* (65,67,68,71).

Acetobacter diazotrophicus (también conocido como *Gluconacetobacter diazotrophicus*) (101) pertenece al grupo de las bacterias acéticas y es la única especie del género que tiene la capacidad para fijar nitrógeno (30). Estudios en cultivo han demostrado que *A. diazotrophicus* puede fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas (24,30,93), sin embargo no se conoce el mecanismo o los mecanismos implicados en la protección de la nitrogenasa contra el O₂.

4.2 *Acetobacter diazotrophicus*.

A. diazotrophicus se ha aislado del interior de raíces, tallos y hojas de la caña de azúcar; habita en los espacios intercelulares (7,13,15,30,39,93). Recientemente se reportó su aislamiento del café y de la piña (45,94). Esta bacteria no se ha encontrado en vida libre (93). Es un bacilo Gram negativo, es móvil, posee varios flagelos laterales y mide aproximadamente 0.7 x 2 µm de largo (15). *A. diazotrophicus* utiliza preferentemente a la glucosa y a la sacarosa como fuentes de carbono (7,13,26,39,83). También emplea el gluconato, el piruvato, el lactato y el acetato (13). Es capaz de fijar nitrógeno en cultivo y probablemente también lo haga en la planta. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C y su pH óptimo es de 5.5; también es capaz de crecer fijando nitrógeno incluso a pH 3.0 (93). En cultivo se ha demostrado que *A. diazotrophicus* presenta mayor tolerancia al O₂ en relación con otras bacterias diazótroficas (13). La forma de cómo la bacteria consigue esto no se conoce. Se sabe que su metabolismo es aerobio pero no se conocen los componentes de su sistema respiratorio. Nosotros proponemos que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* debe participar activamente como mecanismo que proteja a la nitrogenasa del daño por O₂, a través de la protección respiratoria. Sin embargo, no descartamos la posibilidad que pudieran existir otros mecanismos involucrados en dicha protección, como la protección conformacional, aunque el estudio de ellos no está contemplado en el presente

trabajo. Resulta entonces muy interesante estudiar a fondo, las propiedades de composición y organización del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*, en especial cuando la bacteria se encuentra fijando nitrógeno. Así el conocimiento del sistema respiratorio ayudará a determinar la probable existencia del mecanismo de protección respiratoria en *A. diazotrophicus*.

Hipótesis

La elevada actividad respiratoria de *A. diazotrophicus* en condiciones de fijación de nitrógeno sugiere que esta bacteria mantiene su actividad de nitrogenasa mediante un mecanismo de protección respiratoria. Creemos que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* debe participar activamente en el mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa.

Objetivos

Objetivo general:

Definir la composición y organización del sistema respiratorio de *Acetobacter diazotrophicus* en cultivo, así como su relación con la aerotolerancia en la fijación de nitrógeno y su posible participación como mecanismo de protección de la nitrogenasa frente al O₂.

Objetivos particulares:

Determinar el efecto de la aereación incrementada sobre las propiedades de crecimiento y la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus* creciendo en condiciones de limitación de amonio y de exceso de amonio.

Identificar los componentes citocrómicos de la cadena respiratoria de *A. diazotrophicus* en las condiciones de crecimiento anteriores.

Identificar las oxidasas terminales presentes en *A. diazotrophicus* mediante técnicas espectroscópicas (espectros diferenciales). Caracterizar la presencia de las oxidasas terminales por técnicas de fotodisociación.

Determinar cualitativa y cuantitativamente los grupos hemo presentes en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*.

Cuantificar la expresión de las actividades respiratorias (oxidasas y deshidrogenasas) del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* bajo condiciones que permitan fijar nitrógeno y bajo condiciones que repriman la fijación de nitrógeno.

Elaborar un modelo que relacione la regulación fisiológica del sistema respiratorio con la capacidad para fijar nitrógeno en un cultivo.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material biológico.

Acetobacter diazotrophicus cepa PAL 5.

5.2 Mantenimiento del organismo.

A. diazotrophicus se mantuvo en el medio de cultivo LGIP gelificado pH 5.5 (93), el cual contenía (g/L): 50 g de azúcar refinada comercial, 4 g de K_2HPO_4 , 5 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.01 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.1321g de $(NH_4)_2SO_4$, 13 g de agar bacteriológico y 12 ml de azul de bromotimol al 0.5%. El pH se ajustó a 5.5.

5.3 Medio de cultivo líquido LGIP.

Para todos los ensayos se empleó el medio de cultivo líquido LGIP pH 5.5 (93), el cual contenía (g/L): 50 g de azúcar refinada comercial, 4 g de K_2HPO_4 , 5 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y 0.01 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 0.1321g de $(NH_4)_2SO_4$. El pH se ajustó a 5.5.

5.4 Cultivos analíticos de *A. diazotrophicus* bajo condiciones de aereación incrementada.

Se realizaron cultivos de *A. diazotrophicus* en los que la aereación y la disponibilidad de amonio fueron las variables. Para ello, se empleó el medio de cultivo LGIP pH 5.5 (93) suplementado con 1 ó 40 mM de $(NH_4)_2SO_4$. Los cultivos de *A. diazotrophicus* se realizaron a 30 °C en un fermentador Aplikkon con capacidad de 1 L, durante 36 a 60 h. Se partió de un precultivo en crecimiento activo de 24 h, del cual se tomaron alícuotas de 25 – 30 ml para inocular los cultivos de 1 L; con este inóculo se alcanzó una absorbancia a 560 nm ($Ab_{560\text{nm}}$) de 0.07.

Se ensayaron cinco condiciones de aereación; estas condiciones de aereación fueron generadas por el paso de aire a través del medio de cultivo y fueron: 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 y 4.0 L de aire min^{-1} . La aereación y la agitación (320 r.p.m.) se mantuvieron constantes durante todo el cultivo. En todos los cultivos se midieron: la $A_{560 \text{ nm}}$, la demanda de oxígeno de los cultivos, las actividades de nitrogenasa, el pH del medio de cultivo, la concentración del amonio residual, así como la cantidad de oxígeno disuelto.

5.5 Determinación de los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}).

Se determinaron los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}) para cada una de las condiciones de aereación probadas. Los coeficientes de transferencia de oxígeno están directamente relacionados con la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida (19). Estas determinaciones fueron hechas empleando el medio LGIP pH 5.5 contenido en el fermentador de 1 L. Dentro del medio de cultivo fue introducido un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments) para valorar la cantidad de oxígeno incorporado al medio y se mantuvo constante la velocidad de agitación en el fermentador (320 r.p.m.). Luego, el medio de cultivo LGIP fue burbujeadado con N_2 hasta alcanzar el estado anaeróbico; ésto fue monitoreado en el registrador del oxímetro. Se registró la basal del estado anaeróbico e inmediatamente se procedió a introducir aire al fermentador. El cambio en las pendientes registradas permitió determinar la velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo.

5.6 Propiedades del crecimiento de *A. diazotrophicus*.

Las propiedades del crecimiento y actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus* fueron evaluadas mediante la determinación de la $A_{560 \text{ nm}}$, de las demandas de oxígeno, de la cantidad de oxígeno disuelto, de las actividades de nitrogenasa, del pH y de la cantidad de amonio residual en todos los cultivos a diferentes condiciones de aereación. Las determinaciones se realizaron a diferentes intervalos.

5.6.1 Demanda de oxígeno.

Las demandas de oxígeno fueron determinadas polarográficamente empleando un electrodo de Clark. (Yellow Springs Instruments) de acuerdo al método descrito por Escamilla *et al.*, 1991 (23). Para ello, se emplearon alícuotas del cultivo en pleno crecimiento. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 1.8 ml conteniendo medio de cultivo LGIP fresco y estéril y 250 μ l del cultivo en pleno crecimiento.

5.6.2 Oxígeno disuelto.

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue determinada *in vivo* empleando un electrodo de Clark. Para ello, se tomaron alícuotas de 1.8 ml del cultivo en crecimiento activo y fueron colocados en la cámara del oxímetro. La actividad respiratoria de las células fue inhibida instantáneamente con HgCl_2 a una concentración final de 1.5 mM (34).

5.6.3 Actividades de la nitrogenasa.

Las actividades de la nitrogenasa fueron determinadas en células enteras por el ensayo de reducción de acetileno (ARA) (83) y para ello se empleó un cromatógrafo de gases (Varian 3400). Para determinar la actividad de nitrogenasa se tomaron alícuotas de 2 ml del cultivo en pleno crecimiento y fueron colocados en viales de vidrio de 5 ml. Los viales fueron cerrados herméticamente. Se extrajo el 15 % del aire presente en la cámara aérea y fue sustituido por acetileno recién generado a partir de carburo de calcio (CaC_2). Las células se incubaron a 30 °C en un agitador orbital (250 r.p.m.) durante 30 min. Luego, se tomaron 10 μ l de la fase gaseosa y se inyectaron al cromatógrafo de gases para cuantificar la cantidad de etileno producido.

5.6.4 Medición del pH.

Se determinó el valor de pH en los cultivos de *A. diazotrophicus* empleando un electrodo de pH Corning Co. Para ello se tomaron alícuotas de 10 ml del cultivo.

5.6.5. Amonio residual.

La cantidad de amonio residual presente en el medio de cultivo fue valorado empleando un electrodo de amonio (Orion Co.). Para ello, se tomaron alícuotas de 10 ml del cultivo en crecimiento activo y se adicionaron 100 μ l de KOH 10 M. La muestra fue llevada directamente al electrodo de amonio para cuantificar el amonio residual presente.

5.7 Cultivo masivo.

El cultivo masivo de *A. diazotrophicus* se realizó utilizando el medio de cultivo LGIP (93), conteniendo 1 ó 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los cultivos se llevaron a cabo a 30 °C en un biofermentador de 60 L manteniendo las condiciones de más alta aereación y agitación de 100 r.p.m. El cultivo bajo limitación de amonio fue iniciado con 4 L de un inóculo en crecimiento activo, mientras que el cultivo en exceso de amonio fue iniciado con 2 L de inóculo. Los inóculos fueron crecidos en medio LGIP durante 24 h. Ambos cultivos fueron suspendidos al inicio de la fase estacionaria. Las células fueron cosechadas con una centrífuga de flujo continuo (Sharpless Co.). Después, las células fueron lavadas con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 conteniendo 0.5 mM de CaCl_2 y 0.5 mM de MgCl_2 y fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

5.8 Lisis celular y preparación de membranas.

Las células fueron rotas empleando perlas de vidrio (0.1-0.2 mm) en una licuadora (Bead-Beater). Se aplicaron de 4 a 5 pulsos con espacios de 2 min para evitar el calentamiento de las células. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y se empleó 1 mM de PMSF (fluoruro de fenil-metil sulfonilo) para evitar la degradación por proteasas (23). Las perlas fueron separadas con ayuda de un filtro y bomba de vacío. La suspensión de células

rotas fue centrifugada a 10,000 x g durante 10 min (a 4 °C) para separar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y luego se centrifugó a 144,000 x g durante 40 min a 4 °C. Las membranas recuperadas se lavaron con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 conteniendo 0.5 mM de CaCl₂ y 0.5 mM de MgCl₂, se alicuotaron y se almacenaron a - 80 °C hasta su uso. La cantidad de proteína en las membranas fue determinada por el método modificado de Lowry *et al.* (61).

5.9 Análisis espectral de los citocromos.

Los análisis de citocromos se llevaron a cabo espectrofotométricamente a temperatura del nitrógeno líquido (77 K) y a temperatura ambiente, de acuerdo a la metodología establecida por Escamilla *et al.*, (23). Para ello se empleó un espectrofotómetro SLM-Aminco DW 2000 y usaron cubetas con paso de luz de 0.2 cm (espectros a 77 K). Los espectros diferenciales reducido menos oxidado se obtuvieron resuspendiendo las membranas de *A. diazotrophicus* en solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado de DMSO al 30 %. En la mayoría de los casos la concentración final de proteína fue de 5 mg ml⁻¹. Las membranas fueron reducidas durante 10-20 min empleando pocos granos de ditionita, 10 mM de glucosa, 3 mM de NADH, etc, y oxidadas con persulfato de amonio. Los espectros diferenciales reducido+KCN menos oxidado se obtuvieron adicionando a la muestra reducida 1 mM de KCN (25). Los espectros diferenciales de monóxido de carbono se obtuvieron burbujeando CO a la muestra reducida durante 1-3 min. Los espectros de fotodisociación fueron realizados a 77 K en membranas y para ello a las muestras congeladas conteniendo los carboxíderivados (Cit-CO) se aplicaron 3-4 pulsos consecutivos de luz blanca. El espectro obtenido después irradiar con luz blanca sustraído del espectro de CO generó el espectro de fotodisociación. Las membranas fueron reducidas con ditionita; se emplearon 5 mg de proteína membranaral ml⁻¹.

Las concentraciones de los citocromos fueron calculadas a partir de los espectros diferenciales reducido menos oxidado o reducido + CO menos reducido a temperatura ambiente de las preparaciones membranales de *A. diazotrophicus*. La concentración de los Cit-*c* fue calculada empleando membranas después de ser tratadas con acetona-ácida (32), mientras que las concentraciones de los citocromos *b*, *d* y *a*₁, fueron calculadas empleando

membrans después de ser tratadas con 0.2 % de Tritón X-100 (65). Los coeficientes de extinción milimolar (c.e.m.) empleados fueron: Cit- *b* (562-575 nm)= 22 mM⁻¹cm⁻¹; Cit- *c* (553-540 nm)= 19.1 mM⁻¹cm⁻¹; Cit- *d* (628-649 nm)= 19 mM⁻¹cm⁻¹ y Cit- *a*₁ (427- 440 nm)= 60 mM⁻¹cm⁻¹ (23,46,65,67).

5.10 Actividades respiratorias (oxidasas y deshidrogenasas).

Las actividades de las oxidasas fueron determinadas polarográficamente a 30 °C de acuerdo al método descrito por Escamilla *et al.*,(23). Para ello se empleó el oxímetro provisto de un electrodo Clark (Yellow Springs Instruments). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 2 ml y contenía: solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 o 7.4 y suspensión membranal (0.1 mg de proteína membranal). La reacción fue iniciada con la adición del sustrato donador de electrones. Así las concentraciones finales de los sustratos fueron: 3 mM de NADH, 10 mM de glucosa, 10 mM de etanol, 10 mM de acetaldehído, 10 mM de gluconato, 50 mM de succinato. La respiración con ascorbato-TMPD (*N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamina) fue medida en presencia de 10 mM de ascorbato y 2 mM de TMPD, mientras que la respiración con ascorbato-THQ (2,3,5,6-tetracloro-1,4-bencenediol) se hizo empleando 10 mM de ascorbato y 1.5 mM de THQ.

Las actividades de las deshidrogenasas membranales fueron determinadas espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones, siguiendo la metodología establecida por Ameyama y Adachi (1,2). Brevemente, la mezcla de reacción se ajustó a 1 ml y contenía solución reguladora de citrato (MacIlvaine), suspensión membranal (0.05 mg de proteína membranal) y 10 mM de ferricianuro de potasio. Las membranas fueron inhibidas previamente con 2 mM de KCN. La reacción se inició con la adición de 10 mM de glucosa, 10 mM de etanol, 10 mM de acetaldehído, 1 mM de NADH, 10 mM de gluconato, 50 mM de succinato. La actividad fue cuantificada por el cambio en la absorbancia a 660 nm.

5.11 Extracción de las membranas con acetona-ácida.

Las membranas fueron extraídas con acetona-ácida de acuerdo al método descrito por Goodhew *et al.* (32). Se partió de una preparación membranal (20 mg de proteína

membranal) y fue colocada en cinco volúmenes de acetona-ácida (HCl 0.01M en acetona). Las membranas se mantuvieron en hielo, se agitaron suavemente y se incubaron en la oscuridad durante 20 min; luego fueron centrifugadas a 10,000 xg durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sedimento y se guardó a – 80 °C hasta su uso.

5.12 Solubilización de citocromos *c* de *A. diazotrophicus* con Tritón X-100 al 0.2 %.

Los citocromos *c* fueron solubilizados de las membranas de *A. diazotrophicus* empleando Tritón X-100 (65). Para ello, el paquete de membranas (10 mg de proteína membranal) fue resuspendido en 1 ml de solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 conteniendo Tritón X-100 al 0.2 %. La suspensión membranal fue agitada suavemente durante 2 h en frío y luego fue centrifugada a 144,000 x g durante 20 min a 4 °C. Con ayuda de una pipeta Pasteur el solubilizado fue recuperado (sobrenadante). Los citocromos *c* fueron detectados en esta fracción. Las membranas que fueron extraídas con Tritón X-100 (residuos membranales de Tritón X-100) se guardaron a – 80 °C y se mantuvieron así hasta su uso.

5.13 Análisis electroforético.

Se realizó la electroforesis en PAGE-SDS de acuerdo a la metodología descrita por Goodhew *et al.*, (32). El PAGE-SDS fue llevado a cabo en placas de 14 x 16 cm usando un gel separador de 10 % de acrilamida y un gel concentrador del 5 %. Las muestras aplicadas al gel fueron las fracciones solubilizadas y los residuos membranales obtenidas al tratar las membranas con Tritón X-100 al 0.2 %. También se emplearon las membranas que no recibieron ningún tratamiento. Las muestras fueron calentadas a 90 °C durante 5 min en presencia de SDS y β -mercaptoetanol. El PAGE-SDS se corrió a 20 mA durante toda la noche.

5.13.1 Zimografía para citocromo *c*.

Las bandas de los citocromo *c* fueron detectadas por su actividad de peroxidasa empleando la técnica de Thomas *et al.*, (95). Después de la electroforesis el gel fue

sumergido en una solución reguladora de acetato de sodio 175mM pH 5.0. Inmediatamente se adicionó TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina) 0.2 mM disuelta en metanol. La mezcla se incubó 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se adicionó H₂O₂ a una concentración final de 30 mM. Las bandas de los citocromos *c* fueron visualizadas después de la adición del H₂O₂. La reacción fue detenida lavando el gel con solución reguladora de acetato de sodio 175 mM pH 5.0 conteniendo alcohol isopropílico al 30 %.

5.14 Espectros de hemocromo-piridina.

El espectro de hemocromo-piridina fue determinado de acuerdo a la metodología reportada por Matsushita *et al.*, (67). Para ello, se empleó la fracción que contenía hemo D y que fue recuperada después de la cromatografía de fase reversa. El hemocromo de piridina se preparó adicionando NaOH y piridina a una concentración final de 0.2 M y 20 %, respectivamente. La muestra fue reducida con ditionita y oxidada con persulfato de amonio.

5.15 Análisis de los grupos hemo de *A. diazotrophicus* por HPLC de fase reversa.

La composición de grupos hemo presentes en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* fue determinada por una cromatografía HPLC de fase reversa. De esta forma, los grupos hemo extraídos y purificados de acuerdo al método descrito por Puustinen *et al.*,(82) fueron disueltos en una solución de acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5 %. La solución fue aplicada a la columna de un cromatógrafo de líquidos (Waters Chromatography System). Los grupos hemo fueron eluidos por un gradiente de acetonitrilo-agua como ha sido descrito por Lubben y Morand (62). El sistema fue calibrado usando los siguientes estándares: grupos hemo B y O extraídos de membranas de *E. coli*; hemos B y A extraídos de partículas submitocondriales de corazón bovino y protohemo IX obtenido de Sigma Co.

5.16 Irradiación de membranas con luz ultravioleta cercana (U.V. 360 nm).

Las membranas de *A. diazotrophicus* fueron resuspendidas en solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 hasta una concentración final de proteína de 10 mg ml⁻¹. La suspensión membranal fue colocada en una placa de Petri y agitada suavemente con ayuda de una bala magnética. La placa permaneció en hielo y se mantuvo destapada durante el proceso. Luego, la lámpara de U.V. (Vue lamp, Ultraviolet Products) fue colocada en las proximidades de la placa de Petri. Las membranas fueron irradiadas con luz ultravioleta cercana (U.V. 360 nm) durante 2 h (9).

5.17 Extracción con n-pentano de las membranas de *A. diazotrophicus*.

Las membranas fueron extraídas con el solvente n-pentano de acuerdo al método descrito por Peschek (78). Se partió de una preparación membranal (5 mg de proteína membranal), previamente liofilizada. Las membranas liofilizadas fueron transferidas a un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón. Se adicionaron 5-10 ml de n-pentano y las membranas se homogenizaron con ayuda del émbolo. Las membranas extraídas fueron recuperadas y se repitió el mismo procedimiento. Finalmente, las membranas fueron lavadas con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 y se almacenaron en congelación a - 80 °C hasta su uso.

6. Resultados

6.1 Crecimiento y actividad diazotrófica de *Acetobacter diazotrophicus* bajo condiciones de aereación incrementada.

A. diazotrophicus se ha reconocido como un diazótrofo aerotolerante, en el cuál el oxígeno es esencial para la producción de las grandes cantidades de ATP que son requeridas para la fijación de nitrógeno (93). Con la finalidad de conocer el efecto del oxígeno sobre las propiedades de crecimiento y la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*, se realizaron cultivos en un biofermentador de 1 L agitado a 320 r.p.m. Se probaron condiciones de aereación incrementada, las cuales fueron generadas haciendo burbujear los siguientes volúmenes de aire: 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 y 4.0 L de aire min^{-1} . El paso del aire a través del fermentador y la agitación mecánica favorecieron la disolución del oxígeno en el medio de cultivo, de esta forma cada condición de aereación alcanzó un nivel de oxígeno diferente. En todos los casos se empleó el medio de cultivo LGIP conteniendo 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para efectos de comparación, *A. diazotrophicus* fue crecido en medio LGIP conteniendo 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; este cultivo se realizó bajo la condición de más alta aereación (4.0 L de aire min^{-1}). Con base en la concentración de amonio se distinguieron dos condiciones de crecimiento, la condición limitada de amonio (1 mM) y la condición con exceso de amonio (40 mM). En todos los casos se determinó la turbidez del medio de cultivo ($\text{Ab}_{560 \text{ nm}}$) como un indicador del crecimiento, también se midió la demanda de oxígeno, la cantidad de oxígeno disuelto, la actividad de la nitrogenasa, el pH del medio y la cantidad de amonio residual.

En los cultivos limitados de amonio, los resultados indicaron que la alta aereación tuvo un fuerte efecto positivo sobre las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus*. El crecimiento fue más rápido bajo las condiciones más aereadas, obteniéndose $\text{Ab}_{560 \text{ nm}}$ más elevadas (**Fig. 1A**). A las 36 h, el cultivo más aereado (4.0 L de aire min^{-1}) alcanzó un absorbancia superior a 2.5, mientras que a las 60 h, el cultivo menos aereado (0.5 L de aire min^{-1}) apenas alcanzó una absorbancia de 2.0. Los demás cultivos presentaron absorbancias intermedias. Por otro lado, para cada una de las condiciones de aereación probadas,

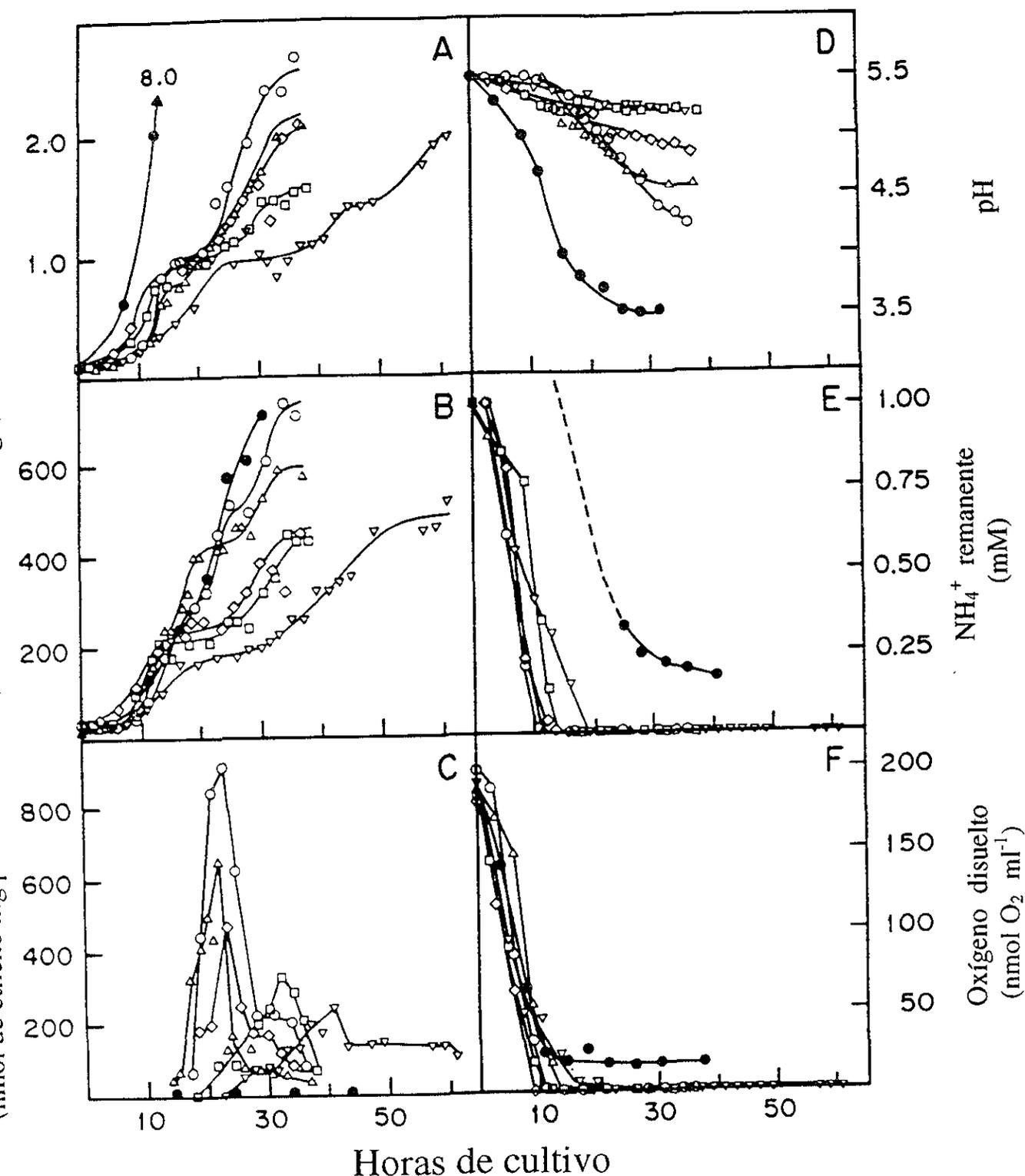


Fig. 1 Propiedades de crecimiento y actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*. Los cultivos fueron realizados a 30 °C en un biofermentador de 1 L empleando el medio de cultivo LGIP bajo diferentes condiciones de aeración ($\text{L de aire min}^{-1}$): 0.5 (∇), 1.0 (\square), 1.5 (\diamond), 2.5 (\triangle) y 4.0 (\circ). El medio de cultivo contenía 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Como control se realizó el cultivo de *A. diazotrophicus* en el medio LGIP conteniendo 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bajo la condición de mayor aeración ($4 \text{ L de aire min}^{-1}$) (\bullet).

las curvas de crecimiento y las demandas de oxígeno del cultivo, mostraron un comportamiento paralelo, al mismo tiempo que presentaron cinéticas de tipo bifásico (**Fig. 1, panel A y B**). Puesto que la dosis inicial de amonio (1 mM) se agotó en las primeras horas del crecimiento (**Fig. 1E**), se propuso que la primera fase de crecimiento (0 - 15 h) observada en todos los cultivos, fue generada en respuesta a la dosis inicial de amonio (1 mM) (**Fig. 1B**). En esta fase de crecimiento no se registró actividad de la nitrogenasa (**Fig. 1C**). En las condiciones más aereadas, el amonio se agotó alrededor de las 10 h de crecimiento, mientras que en el cultivo menos aereado el amonio se agotó a las 20 h. El amonio se requiere en el medio de cultivo como dosis inicial para que *A. diazotrophicus* inicie su crecimiento. Lo anterior se comprobó colocando *A. diazotrophicus* en medio LGIP libre de amonio; los resultados mostraron que *A. diazotrophicus* no fue capaz de crecer bajo ninguna de las condiciones de aereación ensayadas (datos no mostrados). La segunda fase de crecimiento (a partir de las 15 h), se caracterizó por la expresión de la actividad de la nitrogenasa (**Fig. 1C**). Lo más sorprendente fue que las más altas actividades de la nitrogenasa y el mayor crecimiento ocurrieron en los cultivos con mayor aereación (**Fig. 1, panel A y C**). El cultivo más aereado presentó una actividad específica de 900 nmoles de acetileno reducido mg de proteína⁻¹ h⁻¹. Los cultivos restantes mostraron actividades de la nitrogenasa inferiores y proporcionales al nivel de aereación. La máxima actividad de la nitrogenasa del cultivo menos aereado fue 4 veces menor que la máxima actividad de la nitrogenasa registrada en el cultivo más aereado (**Fig. 1C**). Por lo tanto, pensamos que la segunda fase de crecimiento fue dependiente de la actividad diazotrófica de los cultivos.

Se sabe que la utilización de la glucosa por *A. diazotrophicus* conduce a la acidificación del medio de cultivo, debido a la producción y acumulación de ácido glucónico (13). En este trabajo se determinó que el incremento de la aereación favoreció el crecimiento de *A. diazotrophicus* y con ello, la acidificación del medio de cultivo (**Fig. 1D**). La acidificación fue determinada midiendo directamente el pH del medio de cultivo. Así, los cultivos más aereados registraron mayor acidificación (en la condición de 4.0 L de aire min⁻¹, el pH al finalizar el crecimiento fue de 3.8). En los cultivos menos aereados, la acidificación fue menor y por ello el pH del medio de cultivo no cambió considerablemente (en la condición de 0.5 L de aire min⁻¹ el pH final fue de 5.3). Lo anterior sugirió que en los cultivos más aereados se llevó a cabo una intensa oxidación de la glucosa para producir

ácido glucónico, el cual se acumula en el medio de cultivo. Se ha reportado que este proceso es llevado a cabo por una glucosa deshidrogenasa ligada a la membrana (7). En la **Fig. 1F** se indica que, después de las 10 h de crecimiento, la concentración de oxígeno disuelto en todos los cultivos fue llevado a niveles no detectables por el electrodo de oxígeno. Lo anterior nos llevó a proponer que: i). Las altas demandas de oxígeno registradas en los cultivos (**Fig. 1B**) deben ser las responsables de abatir la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. ii). La actividad de la nitrogenasa sólo se expresa cuando el oxígeno es llevado a niveles tan bajos que permitan su función, en la mayoría de los cultivos eso ocurre después de las 10 h de crecimiento (**Fig. 1, panel C y F**). iii). La actividad de la nitrogenasa se pone de manifiesto una vez que el amonio se agota en el medio de cultivo (**Fig. 1E**).

Para efectos de comparación, se realizó el cultivo de *A. diazotrophicus* bajo condiciones de alta aereación (4.0 L de aire min^{-1}) en presencia de 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La alta aereación y el exceso de amonio tuvieron un fuerte efecto sobre las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus*. La absorbancia fue 4 veces mayor ($A_{560 \text{ nm}} = 8.0$) que la absorbancia alcanzada en los cultivos limitados de amonio (**Fig. 1A, círculos llenos**). La cinética de crecimiento y la demanda de oxígeno presentaron una sola fase, a diferencia de los cultivos limitados de amonio donde se encontraron dos (**Fig. 1, panel A y B**). Las demandas de oxígeno de este cultivo fueron muy parecidas a las registradas en el cultivo limitado de amonio con la más alta aereación. Lo más notable fue que no se detectó actividad de nitrogenasa durante el crecimiento (**Fig. 1C, círculos llenos**), indicando que el amonio reprimió la actividad de la nitrogenasa y que *A. diazotrophicus* lo utilizó como única fuente de nitrógeno. Después de 25 h de crecimiento, la concentración de amonio en el medio de cultivo decayó a 0.25 mM y así se mantuvo hasta las 60 h (**Fig. 1E, círculos llenos**). La curva de oxígeno disuelto (**Fig. 1F**) mostró una cinética muy parecida a la del amonio residual; el oxígeno disuelto disminuyó hasta en un 90 % ($25 \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1}$), pero no llegó a niveles no detectables (como ocurrió en los cultivos limitados de amonio). Lo anterior hizo suponer que las células crecidas en exceso de amonio debían poseer tasas respiratorias más bajas que las células crecidas bajo condiciones limitadas de amonio. Como la respiración está ligada a la oxidación de la glucosa se esperaba baja acidificación del medio de cultivo. Sin embargo, la acidificación fue mayor que la registrada en las

células limitadas de amonio; el pH al final del crecimiento fue de 3.5 (**Fig. 1D**). Proponemos que la acidificación alcanzada se debió a que el cultivo desarrolló mayor masa celular. Hay que recordar que la densidad óptica de este cultivo fue 4 veces mayor que la densidad óptica alcanzada en los cultivos limitados de amonio (**Fig. 1A**). Por ello la respiración acumulada debió favorecer la acidificación del medio de cultivo.

6.1.1 El impacto del incremento de la aereación sobre la actividad diazotrófica de *Acetobacter diazotrophicus*.

Los resultados anteriores permitieron conocer el efecto de la aereación incrementada sobre las propiedades de crecimiento y en especial, sobre la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*. Las condiciones de aereación fueron generadas pasando diferentes volúmenes de aire al fermentador. Sin embargo, ese procedimiento no proporcionó información sobre las cantidades de oxígeno disponibles (oxígeno disuelto) en cada condición de cultivo probada. Para conocer tanto los niveles de oxígeno disuelto como el impacto real del incremento de la aereación sobre la expresión de la nitrogenasa, se determinaron los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}) para cada condición de aereación. Los valores de K_{La} están directamente relacionados con la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida (19). El procedimiento para la determinación de los valores de K_{La} fue detallado en la sección de Materiales y Métodos. En la **Tabla 1** se indican los valores de K_{La} correspondientes a cada condición de aereación ensayada. Para determinar el impacto del incremento de la aereación sobre la expresión de la nitrogenasa, se construyó un gráfico en el que se relacionaron los valores máximos de actividad de la nitrogenasa *versus* los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}) para cada condición de aereación. Los resultados indicaron que la actividad de la nitrogenasa se incrementó en forma directa a los valores de K_{La} . La actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus* es favorecida por los más altos niveles de aereación, al menos en el intervalo de concentraciones de oxígeno probadas (de 25 a 148 mmoles de O_2 L de medio⁻¹ h⁻¹) (**Fig. 2**).

Tabla 1. Valores de K_{La} calculados a partir de las velocidades de aereación utilizadas en el biofermentador Applikon con 1 L de medio de cultivo. La determinación fue realizada empleando el electrodo de Clark.

| Velocidad de aereación (L de aire min^{-1}) | K_{La} ($\text{mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) |
|--|---|
| 0.5 | 25 |
| 1.0 | 44 |
| 1.5 | 76 |
| 2.5 | 97 |
| 3.5 | 129 |
| 4.0 | 148 |

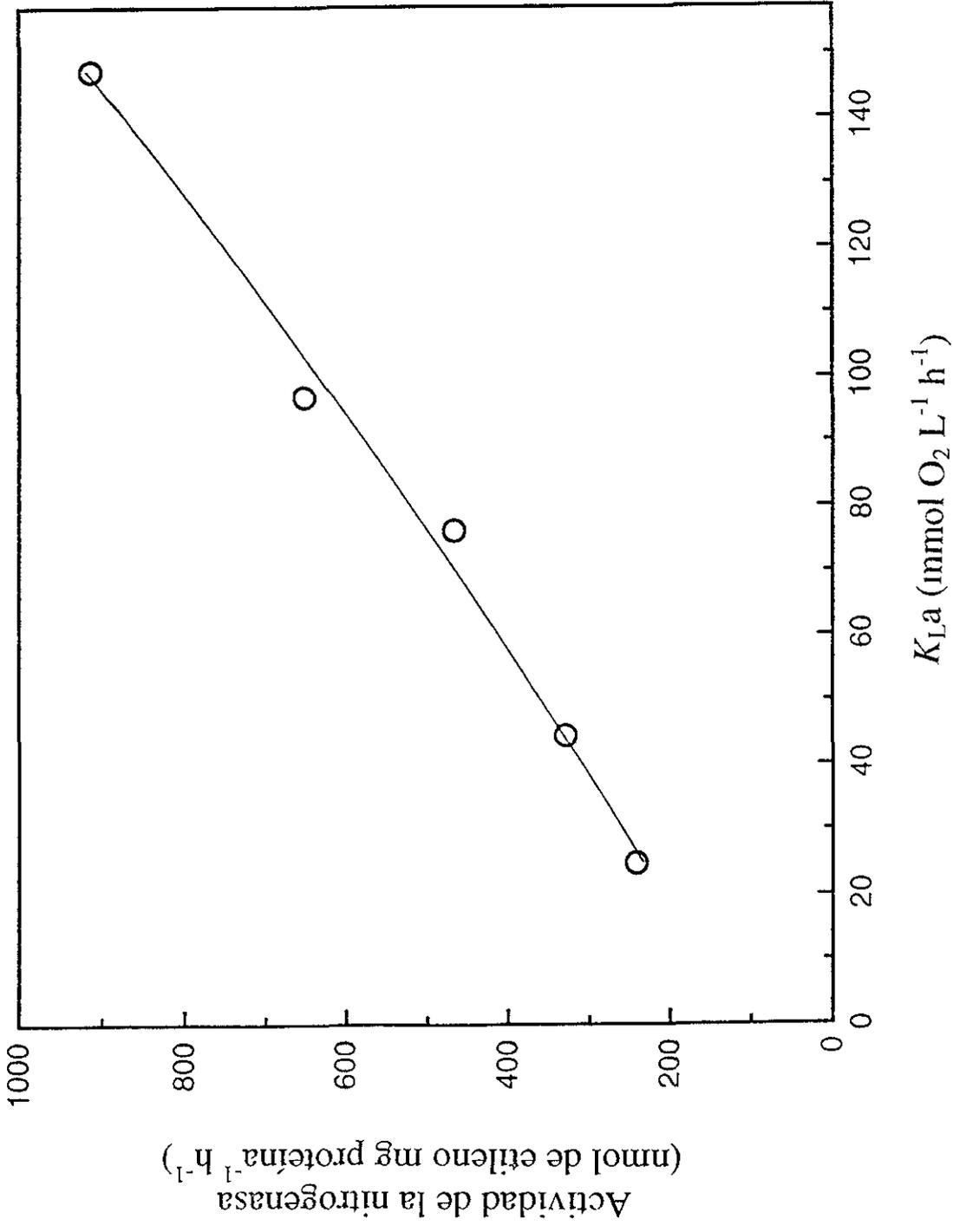


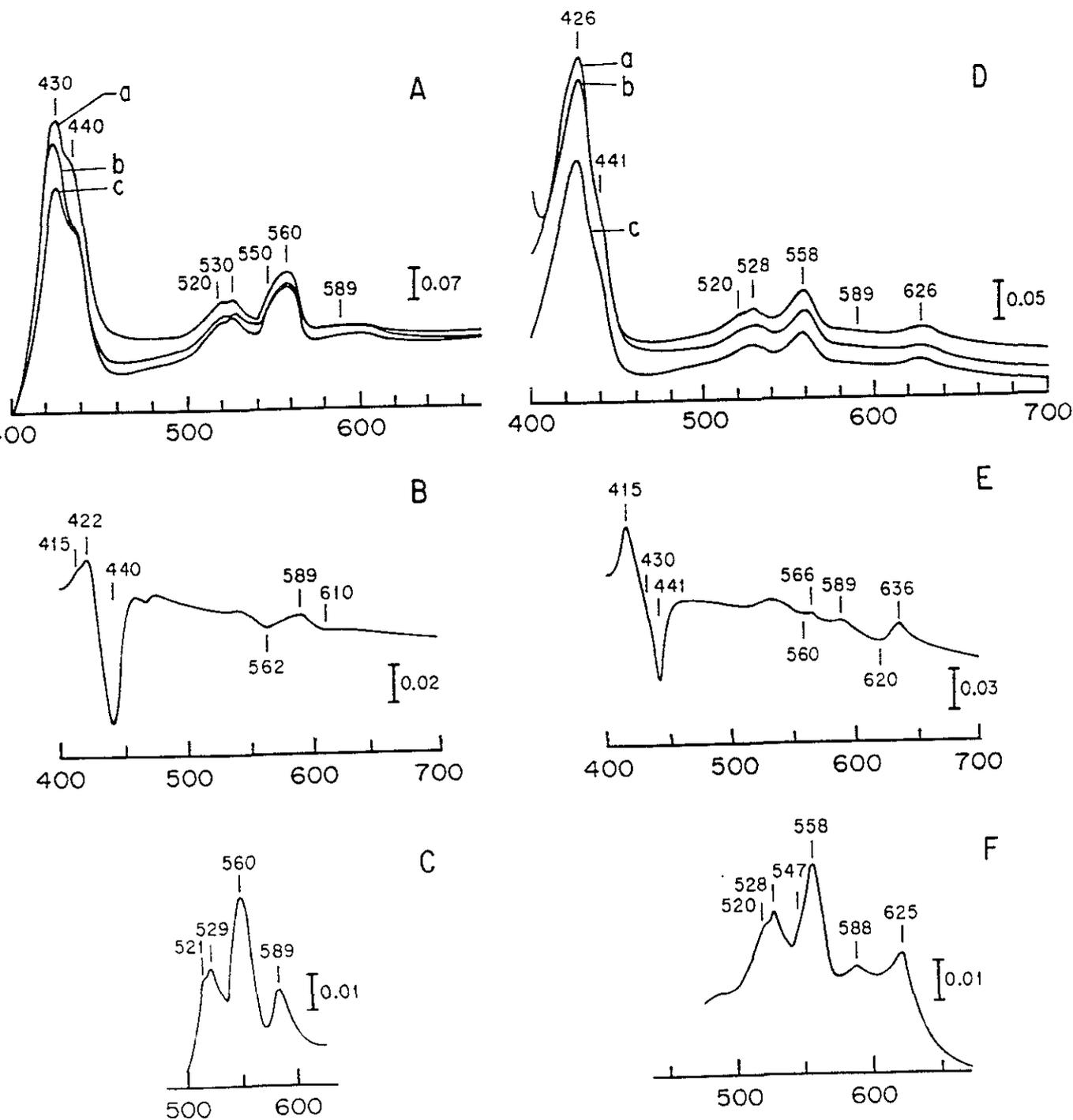
Fig. 2 El efecto del incremento de los coeficientes de transferencia de oxígeno (K_{La}) sobre la actividad de la nitrogenasa en los cultivos de *A. diazotrophicus*. Las actividades de la nitrogenasa (O) indicadas en la gráfica corresponden a los valores máximos alcanzados en cada condición de aereación.

Lo anterior sugirió que el aporte de oxígeno al medio de cultivo constituye el paso limitante para el crecimiento dependiente de la fijación de nitrógeno.

6.2 Composición citocrómica del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido bajo condiciones de alta aereación.

Conocido el efecto de la aereación sobre el crecimiento y la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*, se procedió a determinar los componentes citocrómicos presentes en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido bajo la condición de más alta aereación. Para ello, se realizaron cultivos de *A. diazotrophicus* en un fermentador de 60 L. Se empleó el medio de cultivo LGIP limitado de amonio y se ajustaron las condiciones para mantener una aereación de 4.0 L de aire min^{-1} . Para efectos de comparación se realizó otro cultivo conteniendo un exceso de amonio (40 mM) bajo las mismas condiciones de aereación. Las células fueron cosechadas y se rompieron empleando perlas de vidrio en un Bead-Beater (Materiales y Métodos). Las membranas citoplásmicas fueron recuperadas por ultracentrifugación y los componentes citocrómicos fueron determinados en las membranas mediante espectros diferenciales reducido menos oxidado a 77 K.

Los espectros diferenciales reducido menos oxidado indicaron diferencias importantes en el contenido de citocromos en las membranas obtenidas de células crecidas con limitación de amonio, comparado con membranas obtenidas de células crecidas con exceso de amonio (**Fig. 3**). Las células crecidas con limitación de amonio (**Fig. 3A**) mostraron la presencia de citocromos de tipo *b* (picos a 430, 530 y 560 nm), *c* (hombros a 520 y 550 nm) y a_1 (hombro a 440 nm y una débil señal alrededor de 600 nm). Las membranas fueron reducidas con diferentes donadores de electrones como ditionita, NADH y glucosa. En cada caso se alcanzaron diferentes niveles de reducción pero en todos los casos el perfil citocrómico fue el mismo. Los espectros diferenciales con monóxido de carbono (CO) revelaron la presencia de un citocromo a_1 reactivo con CO (picos a 422 y 589 nm y valles a 440 y 610 nm) (**Fig. 3B**). A este citocromo se le atribuyó la actividad de oxidasa terminal. La identidad de la oxidasa terminal a_1 fue confirmada por las señales espectrales obtenidas al realizar el espectro de fotodisociación del complejo con CO (picos



Longitud de onda (nm)

Fig. 3 Espectros diferenciales a baja temperatura (77 K) de las membranas de *A. diazotrophicus* crecido bajo condiciones aeróbicas en el medio LGIP conteniendo 1 mM (A - C) y 40 mM (D - F) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A y D corresponden a los espectros diferenciales reducido menos oxidado; las membranas fueron reducidas con ditionita (a), NADH (b) y glucosa (c) y oxidadas con persulfato de amonio. B y E corresponden a los espectros diferenciales reducido + CO menos reducido; las membranas fueron reducidas con ditionita, luego la celda de muestra fue burbujeada con monóxido de carbono (CO). C y F corresponden a los espectros diferenciales reducido + KCN menos oxidado; las membranas fueron reducidas con ditionita en presencia de 1 mM de KCN y oxidadas con persulfato de amonio. Todos los ensayos fueron realizados empleando 2.5 mg de proteína membranal ml^{-1} . Las células fueron cosechadas al inicio de la fase estacionaria donde alcanzaron una $Ab_{560 \text{ nm}}$ de 2.5 (crecidas en 1 mM de amonio) y de 6 a 8 (crecidas en 40 mM de amonio)

a 441 y 608 nm, valles a 426 y 589 nm) (**Fig. 4A**). El hombro a 415 nm y el valle a 562 nm observados en los espectros diferenciales con monóxido de carbono sugirieron la presencia de un citocromo de tipo *o* reactivo con CO. Su existencia fue descartada ya que no se detectaron grupos hemo de tipo O al realizar el análisis cromatográfico por HPLC (ver más adelante). Por otro lado, la reacción del cianuro (KCN) con la preparación reducida, produjo la intensificación de la señal a 589 nm (**Fig. 3C**). Este efecto hipercrómico del KCN en el espectro reducido, ha sido considerado como un criterio para la identificación de la citocromo oxidasa de tipo *ba* (también conocida como citocromo a_1) (25,65,67,69). El análisis de citocromos de las células crecidas con exceso de amonio (40 mM) mostró un panorama diferente (**Fig. 3, panel D, E y F**). Los espectros diferenciales reducido menos oxidado a 77 K de las células crecidas con exceso de amonio (**Fig. 3D**) indicaron máximos a 426, 528 y 558 nm correspondientes a los citocromos de tipo *b*; las señales para el citocromo *c* a 418, 520 y 550 nm fueron difícilmente detectables. Sin embargo, los cambios más dramáticos estuvieron directamente relacionados con las oxidasas terminales. El espectro diferencial con CO (**Fig. 3E**) y el espectro de fotodisociación (**Fig. 4B**) pusieron de manifiesto la presencia de dos oxidasas terminales, la oxidasa a_1 y la oxidasa de tipo *bd*. El valle a 620 nm y el pico a 636 nm indicaron la presencia del complejo citocrómico *bd* - CO (**Fig. 3E**). Se debe recordar que en las membranas de las células crecidas con limitación de amonio la oxidasa terminal predominante fue la oxidasa a_1 , en cambio en las células crecidas en exceso de amonio la oxidasa predominante fue de tipo *bd* (pico a 626 nm) (**Fig. 3D**); el citocromo a_1 también estuvo presente en este tipo de membranas pero sus niveles de reduccción fueron muy bajos. La reacción del KCN con la preparación reducida puso de manifiesto a la oxidasa terminal a_1 (débil señal a 589 nm para el complejo citocromo a_1 - KCN), aunque la oxidasa terminal predominate fue la citocromo oxidasa *bd* (**Fig. 3F**).

6.3 Contenido citocrómico del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* bajo condiciones de alta aereación.

Con el propósito de conocer las relaciones estequiométricas de los citocromos presentes en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido bajo condiciones de alta aereación (limitado de amonio o con exceso de amonio), se determinaron las

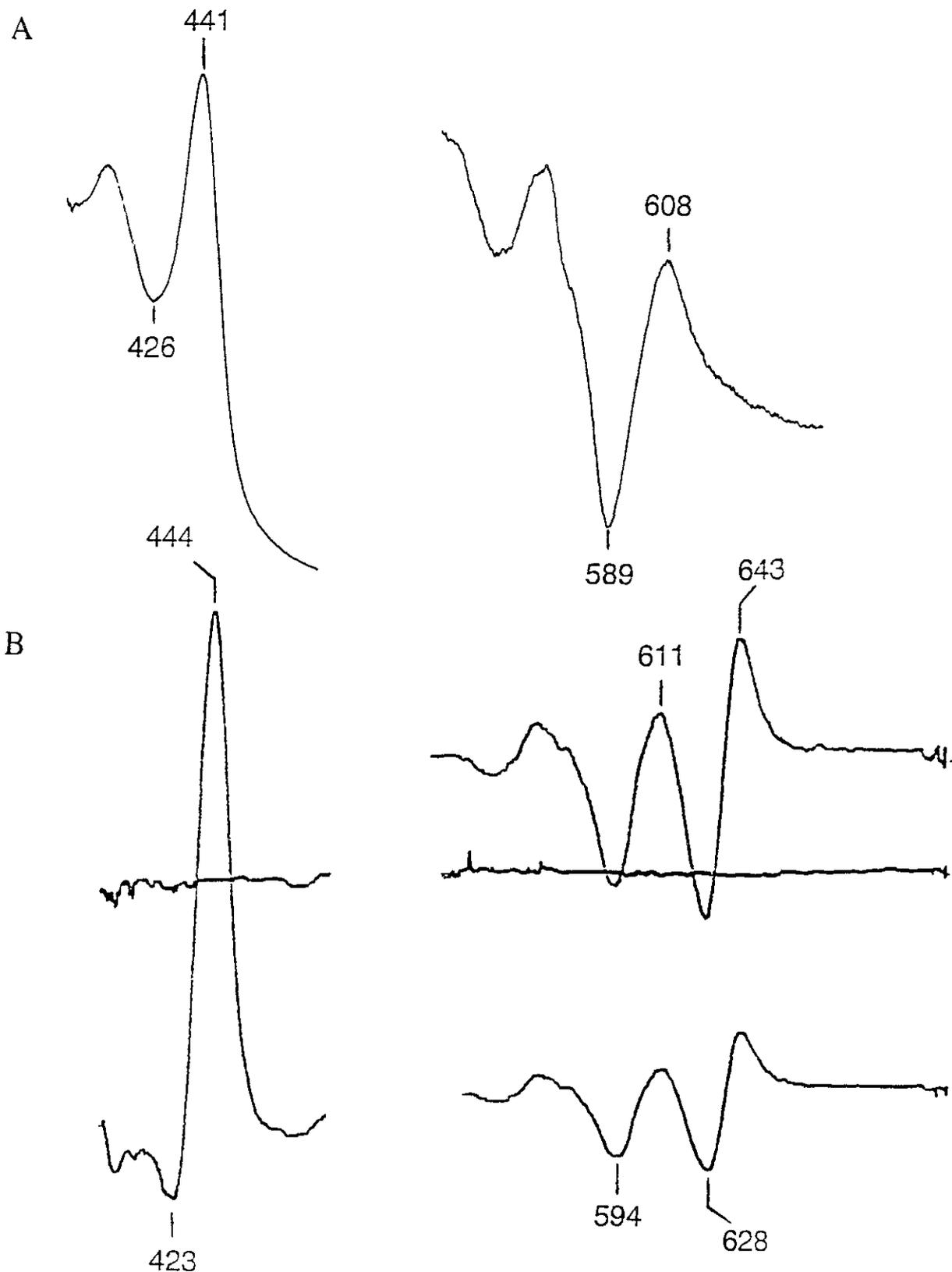


Fig. 4 Espectros de fotodisociación a baja temperatura (77 K) de las membranas de *A. diazotrophicus* crecido bajo condiciones aeróbicas en el medio LGIP conteniendo 1 mM (A) y 40 mM (B) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los complejos Cit Fe^{2+} - CO fueron fotolizados con 3 pulsos de luz blanca a intervalos de 2 s. Las membranas fueron reducidas con ditionita y se emplearon 5 mg de proteína membranar ml^{-1} .

concentraciones de los citocromos. Para ello, se realizaron espectros diferenciales a temperatura ambiente y las concentraciones de los citocromos fueron calculadas a partir de los coeficientes de extinción milimolar (c.e.m.) correspondientes (Materiales y Métodos). Las oxidasas terminales a_1 y bd fueron cuantificadas a partir de sus complejos con CO (65). Los resultados indican (**Tabla 2**) que las células crecidas bajo limitación de amonio presentaron los más altos contenidos citocrómicos; en ambos tipos de células el componente citocrómico predominante fue el citocromo b . En las células crecidas bajo limitación de amonio el contenido de citocromo b fue de 0.25 nmoles mg de proteína⁻¹, mientras que en las células crecidas con exceso de amonio fue de 0.17 nmoles mg de proteína⁻¹. Le siguen los contenidos citocrómicos correspondientes a las oxidasas terminales (a_1 y bd) (0.16 nmoles mg de proteína⁻¹) y luego los contenidos de citocromo c . En las células crecidas bajo limitación de amonio no se detectó la presencia de la citocromo oxidasa bd ; la oxidasa terminal predominante fue el citocromo a_1 . La citocromo oxidasa bd sólo fue detectada en las células crecidas con exceso de amonio. Al parecer la expresión de este citocromo sólo es regulada por la presencia de amonio en exceso en el medio de cultivo. El aporte de oxígeno no tiene ninguna influencia sobre la expresión de esta oxidasa. Lo anterior se comprobó creciendo *A. diazotrophicus* con exceso de amonio (40 mM) bajo condiciones microaerófilas (datos no mostrados). Los resultados indicaron la presencia de la citocromo oxidasa bd . Por lo tanto, se propuso que el amonio en exceso es responsable de la expresión de la oxidasa terminal bd .

En bacterias acéticas, se ha reportado que algunas deshidrogenasas como la alcohol deshidrogenasa (A-DH) y la aldehído deshidrogenasa (AL-DH) contienen asociados citocromos de tipo c (66). Al parecer *A. diazotrophicus* no es la excepción. De esta forma, si la cantidad de citocromos c en las células crecidas bajo limitación de amonio fue dos veces mayor que en las células crecidas con exceso de amonio (**Tabla 2**), se esperaría que las actividades de oxidasa y deshidrogenasa para etanol y acetaldehído fueran superiores en las células crecidas bajo limitación de amonio. Esto es lo que ocurrió (ver más adelante).

| Citocromo | Células crecidas con: | |
|-------------------------------------|---|-----------------------------|
| | Limitación de amonio (1 mM) | Exceso de amonio (40 mM) |
| | Contenido (nmol mg proteína ⁻¹) | |
| Citocromo <i>c</i> | 0.12 | 0.06 |
| Citocromo <i>b</i> | 0.25 | 0.17 |
| Citocromo <i>a</i> ₁ -CO | 0.16 | 0.01 |
| Citocromo <i>d</i> -CO | n.d. | 0.16 |

Tabla 2. Efecto de la concentración del amonio sobre la composición de los citocromos asociados a las membranas de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente. Los cultivos fueron llevados a cabo a 30 °C en un biofermentador de 60 L empleando el medio LGIP suplementado con 1 ó 40 mM de (NH₄)₂SO₄. Los cultivos fueron realizados bajo las condiciones más altas de aereación ($K_L a = 148$ mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹). Las células fueron cosechadas en la fase estacionaria temprana: Ab_{560 nm} = 2.5 (cultivos limitados de amonio) y 6 a 8 (con exceso de amonio).

n.d. - No detectado.

6.3.1 El grupo hemo O no está presente en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*.

El espectro diferencial con CO de las células crecidas bajo limitación de amonio sugirió la presencia del citocromo *o* en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Para comprobar la presencia de este citocromo y para confirmar la identidad de los citocromos presentados anteriormente, se realizó la extracción con acetona ácida de los grupos hemo no covalentes, tanto de las membranas obtenidas de células crecidas bajo limitación de amonio como de células obtenidas con exceso de amonio. Los grupos hemo fueron separados e identificados por cromatografía HPLC de fase reversa. Los perfiles cromatográficos se muestran en la **Fig. 5**. Las membranas obtenidas de células crecidas en limitación de amonio sólo presentaron dos componentes hémicos, el hemo B y el hemo A (**Fig. 5A**). Los tiempos de retención de los grupos hemo B y A fueron 28.5 y 31.4 min, respectivamente. El grupo hemo B fue el componente predominante; la proporción de hemo B fue 4 veces mayor que el hemo A. Estos grupos hemo deben formar parte de la oxidasa terminal a_1 compuesta de los citocromos *b* y *a* (25,65,71). En este tipo de células y en concordancia con los espectros de fotodisociación (**Fig. 4**) no se detectó la presencia del hemo O (**Fig. 3B**). De esta manera se descartó la presencia del citocromo *o* en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Las membranas obtenidas de células crecidas con exceso de amonio mostraron un perfil de grupos hemos similar al de las células crecidas bajo limitación de amonio. Las membranas mostraron un solo componente correspondiente al grupo hemo B cuyo tiempo de retención fue de 28.5 min. El grupo hemo A (tiempo de retención = 31.4 min) sólo fue detectado en cantidades traza (**Fig. 5B**). No se detectó la presencia del grupo hemo O. El grupo hemo D no se pudo detectar por esta técnica. Su presencia fue confirmada mediante los espectros de hemocromo-piridina realizados en la fracción recuperada después de la separación cromatográfica por HPLC (datos no mostrados).

6.4 Las actividades respiratorias de *A. diazotrophicus* bajo condiciones de alta aereación.

En los cultivos limitados de amonio, se encontró que la alta aereación tuvo un fuerte efecto positivo sobre las propiedades de crecimiento de *A. diazotrophicus*. A pesar de la alta aereación, los cultivos registraron los más altos niveles de actividad de la nitrogenasa.

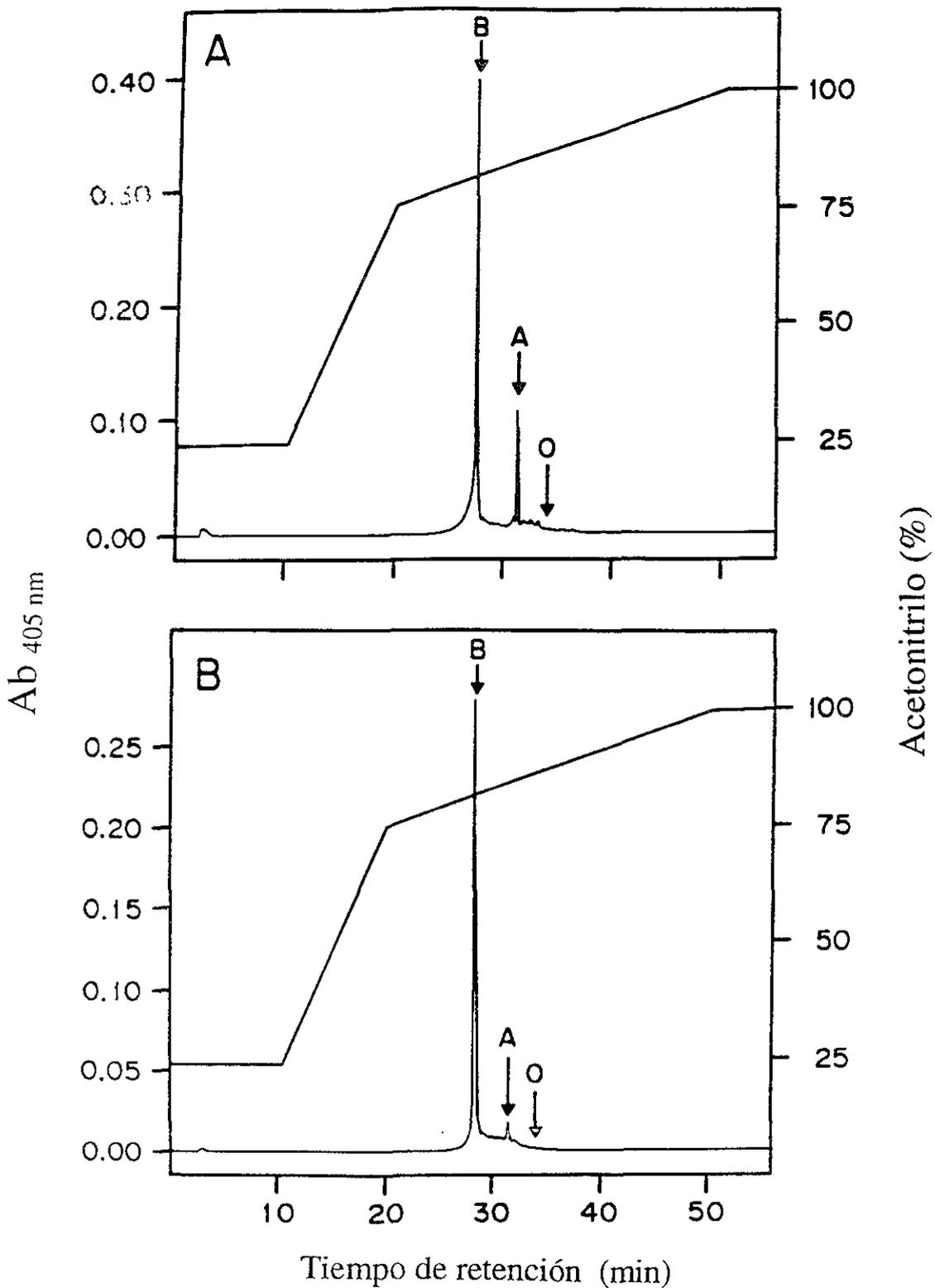


Fig. 5 Separación cromatográfica por HPLC de fase reversa de los grupos hemo de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente. A. Cromatograma de los grupos hemo unidos a las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP conteniendo 1 mM de $(NH_4)_2SO_4$. B. Cromatograma de los grupos hemo de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP conteniendo 40 mM de $(NH_4)_2SO_4$. Los tiempos de retención para los grupos hemo de *A. diazotrophicus* fueron: hemo B, 28.5 min; hemo A, 31.4 min y hemo O, 34 min. El sistema fue calibrado usando los siguientes estándares: hemos B y O extraídos de membranas de *E. coli*; hemos B y A extraídos de partículas submitocondriales de corazón bovino y protohemo IX obtenido de Sigma Co

Lo anterior hizo suponer que la bacteria debía contar con un mecanismo que permitiera proteger a la nitrogenasa del daño por oxígeno. La alta demanda de oxígeno registrada en los cultivos más aireados permitió plantear que las actividades respiratorias deben ser las responsables de abatir el oxígeno presente en el medio de cultivo para que la nitrogenasa pueda realizar su función. Para probar lo anterior y para conocer las enzimas que constituyen al sistema respiratorio, se determinaron las actividades respiratorias (oxidasa y deshidrogenasas) de *A. diazotrophicus*. Esto se hizo en las membranas de las células crecidas aeróbicamente bajo condiciones de limitación de amonio como con exceso de amonio. Las actividades de las oxidasas se midieron polarográficamente con el electrodo de oxígeno (8,9,23,27). Las actividades de las deshidrogenasas se midieron espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones (1,2,56,73).

Los resultados indicaron que las células crecidas bajo limitación de amonio poseen una amplia batería de deshidrogenasas muy activas, todas ellas son membranales y tienen la capacidad de oxidar directamente sus sustratos (**Tabla 3**). Las actividades respiratorias fueron divididas en tres bloques: i). Notablemente altas, con actividades de NADH y glucosa oxidasas tan altas como 2824 y 2085 $\text{natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, respectivamente. La acetaldéhidó-oxidasa representó el 38% de la actividad mostrada con NADH. ii). Actividades moderadas, con actividades de etanol, succinato, gluconato y quinol (THQ) oxidasas, las cuales fueron cuantificadas entre 200 y 750 $\text{natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$. iii). La mezcla de ascorbato + TMPD fue pobremente utilizada (apenas un 5% de la actividad mostrada con NADH). Las actividades de las deshidrogenasas también fueron altas, por ejemplo la NADH deshidrogenasa (NADH-DH) registró una actividad de 2563 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, la glucosa deshidrogenasa (G-DH) de 2180 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ y la aldehído deshidrogenasa (AL-DH) de 1082 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$. Lo anterior sugirió que estas enzimas deben alimentar a la cadena transportadora de electrones manteniendo altas tasas respiratorias. Las actividades respiratorias de las células crecidas en exceso de amonio fueron más bajas que las actividades respiratorias de las células limitadas de amonio (**Tabla 3**). El caso más dramático fue el de la glucosa oxidasa, la cual mostró una actividad 5.5 veces menor que la registrada en las células limitadas de amonio (**Tabla 3**). Las actividades de deshidrogenasa también se encontraron

| Células crecidas con: Sustrato | Limitación de amonio | | Exceso de amonio | | Relación a/b |
|-----------------------------------|----------------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|
| | Actividades de: | | Actividades de: | | |
| | (a) Oxidasa | Deshidrogenasa | (b) Oxidasa | Deshidrogenasa | |
| Glucosa | 2085 | 2180 | 379 | 319 | 5.5 |
| NADH | 2824 | 2563 | 1293 | 1693 | 2.2 |
| Acetaldehído | 1082 | 1633 | 364 | 130 | 2.9 |
| Gluconato | 314 | 127 | 91 | 34 | 3.4 |
| Etanol | 235 | 826 | 141 | 84 | 1.6 |
| Succinato | 235 | 680 | 172 | 209 | 1.3 |
| Asc + THQ | 750 | --- | 363 | --- | 2.0 |
| Asc + TMPD | 141 | --- | 108 | --- | 1.3 |

Tabla 3. El efecto del amonio sobre las actividades respiratorias asociadas con las membranas de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente. Las actividades de oxidasa fueron medidas polarográficamente con un electrodo de Clark y fueron reportadas en $\text{nmol de O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, mientras que las actividades de deshidrogenasa ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) fueron medidas espectrofotométricamente usando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones. Las actividades de oxidasa y deshidrogenasa fueron determinadas a los valores de pH óptimo: las actividades para glucosa, etanol y acetaldehído oxidasas fueron medidas a pH 6.0, mientras que NADH, succinato y Asc+TMPD oxidasas fueron medidas a pH 7.4. La actividad con Asc+THQ fue determinada a pH 6.0 para disminuir la oxidación química de la preparación.

disminuidas. Todas las actividades de oxidasas y deshidrogenasas fueron medidas al valor del pH óptimo: las actividades de glucosa, acetaldehído, etanol y gluconato oxidasas fueron determinadas a pH 6.0, mientras que las actividades de NADH y succinato oxidasas fueron determinadas a pH 7.4. Por otro lado, el tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD) y el tetraclorohidroquinol (THQ) se consideran como donadores artificiales de electrones de las oxidasas terminales. El TMPD puede donar electrones al citocromo *c* soluble mitocondrial y bacteriano, o bien a las oxidasas terminales consideradas como citocromo *c* oxidasas (65). El THQ dona electrones directamente a la oxidasa terminal de los sistemas tipo quinol oxidasas (79). En nuestro estudio, el THQ fue oxidado en ambos tipos de membranas, en cambio el TMPD fue oxidado pobremente (**Tabla 3**). Puesto que la actividad ascorbato + THQ oxidasa fue 5 veces mayor que la actividad ascorbato + TMPD oxidasa, se sugirió que las oxidasas terminales presentes en las membranas de *A. diazotrophicus* son quinol oxidasas y no citocromo *c* oxidasas.

6.5 Inhibición con cianuro de potasio.

Las oxidasas terminales, tanto de las células crecidas bajo condiciones de limitación de amonio, como de las células crecidas con exceso de amonio, fueron caracterizadas por su inhibición con KCN en membranas de *A. diazotrophicus*. El KCN es un inhibidor de las oxidasas terminales (59,91,100). De esta forma las actividades de glucosa, NADH y acetaldehído oxidasas fueron tituladas con KCN (**Fig. 6**). Las membranas obtenidas bajo condiciones de limitación de amonio mostraron claramente la presencia de dos componentes cinéticos, uno altamente sensible al KCN y otro resistente (**Fig. 6A**). En todos los casos probados, las cinéticas de inhibición presentaron un comportamiento bifásico y cerca del 50 % de las actividades de oxidasa fueron inhibidas a bajas concentraciones del inhibidor (100 μ M). El segundo componente fue resistente hasta una concentración de 2.5 mM de KCN. La resistencia al KCN fue significativamente disminuida cuando las membranas fueron lavadas con Tritón X-100 a bajas concentraciones (0.2 %) (**Fig. 6A**, línea oscura). En este último caso, las membranas lavadas con Tritón X-100 mostraron un sistema completamente activo de glucosa oxidasa, el cual fue considerablemente más sensible al inhibidor, así la actividad de glucosa oxidasa

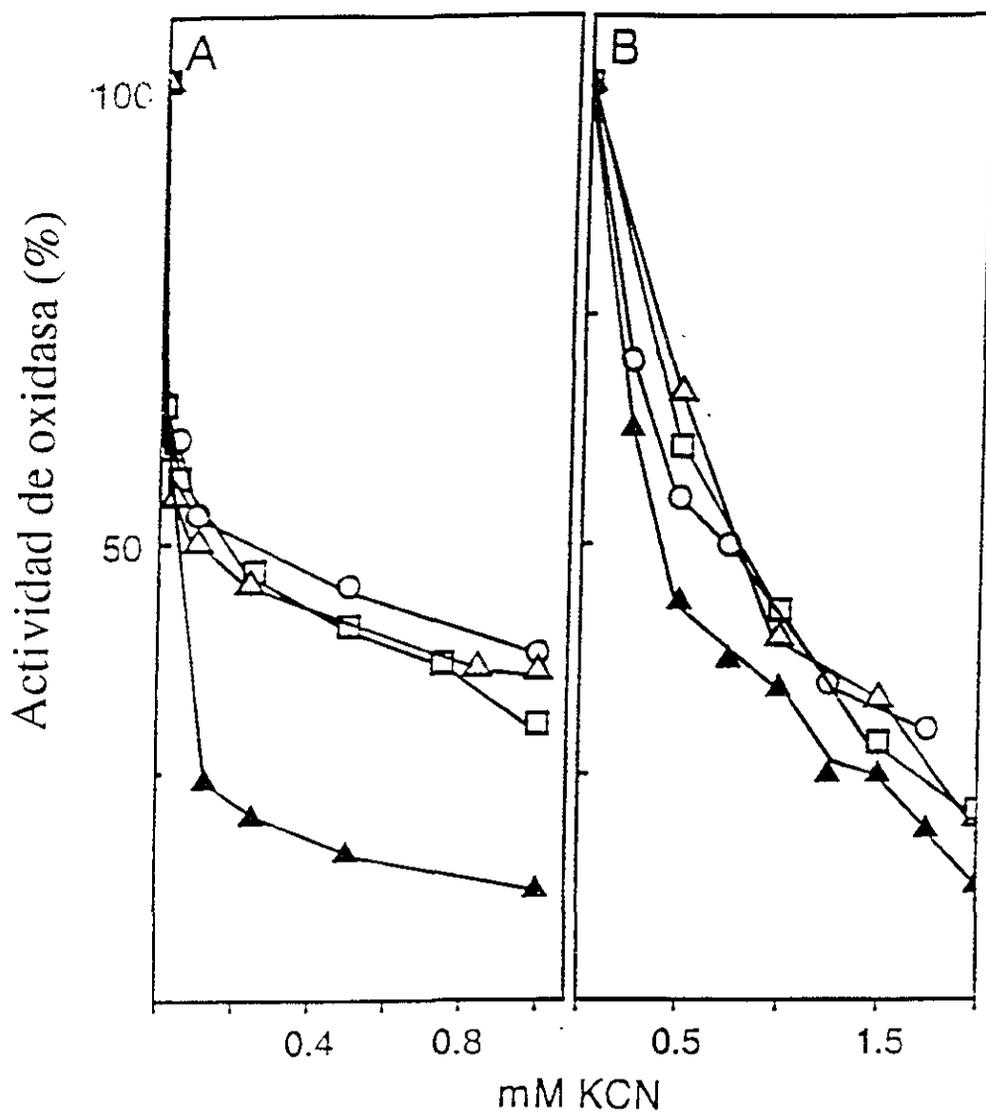


Fig. 6 Inhibición con KCN de las actividades respiratorias de oxidasa de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente en el medio LGIP suplementado con 1 mM (A) o 40 mM (B) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las actividades de NADH oxidasa (O), glucosa oxidasa (Δ) y acetaldéhidó oxidasa (\square) fueron tituladas con KCN. Después de que las membranas fueron lavadas con Tritón X-100 al 0.2 % la actividad de la glucosa oxidasa fue titulada con KCN (\blacktriangle). Las actividades de oxidasa fueron medidas polarográficamente con un electrodo de Clark. Cada ensayo fue realizado empleando 0.1 mg de proteína membranal.

fue inhibida en un 75 % en presencia de 100 μM de KCN (**Fig. 6A**). Después del tratamiento con Tritón X-100, las membranas perdieron un 40 % de su actividad NADH oxidasa, mientras que las actividades de etanol y acetaldehído oxidasas se perdieron totalmente (**Tabla 4**). Las membranas obtenidas a partir de las células crecidas con exceso de amonio mostraron la presencia de un solo componente cinético, el cual fue resistente al KCN (**Fig. 6B**). En este caso, las actividades de oxidasa ensayadas mantuvieron más del 80 % de su actividad con 100 μM del inhibidor y más del 45 % de la actividad de oxidasa sobrevivió a la presencia de 1 mM de KCN. El tratamiento de las membranas con Tritón X-100 al 0.2 % no modificó considerablemente la curva de titulación con KCN (**Fig. 6B**), lo cual fue contrario a lo encontrado en las membranas obtenidas bajo limitación de amonio, donde el Tritón X-100 eliminó la resistencia al KCN. Los resultados anteriores sugirieron la presencia de un componente resistente al KCN.

6.6 Los citocromos de tipo *c*.

6.6.1 El análisis espectral de las fracciones solubilizadas con Tritón X-100 al 0.2 %.

La actividad de glucosa oxidasa, medida en las membranas de células crecidas bajo condiciones de limitación de amonio, aumentó notablemente su sensibilidad al KCN cuando las membranas fueron tratadas con Tritón X-100 (**Fig. 6A**). Es claro que el tratamiento liberó de las membranas algún componente involucrado en la resistencia al inhibidor. Se sospechó que el componente involucrado en la resistencia era un citocromo. Con la finalidad de conocer la identidad del componente citocrómico solubilizado por el Tritón X-100 se hicieron espectros diferenciales reducido menos oxidado, tanto de la fracción solubilizada como de las membranas lavadas con el detergente (**Fig. 7A**). Los resultados indicaron que el Tritón X-100 removió selectivamente de la membrana la mayoría de los citocromos de tipo *c* (picos a 414, 521 y 551 nm) (**Fig. 7A, trazo c**), los cuales fueron detectados en la fracción solubilizada. Los citocromos de tipo *b* y *a₁* no fueron removidos de las membranas, tales citocromos fueron detectados en las membranas lavadas con el detergente (**Fig. 7A, trazo b**). Los picos a 427, 528 y 563 nm fueron indicativos de la presencia del citocromo *b*, mientras que el hombro a 440 nm y el pico a

A

B

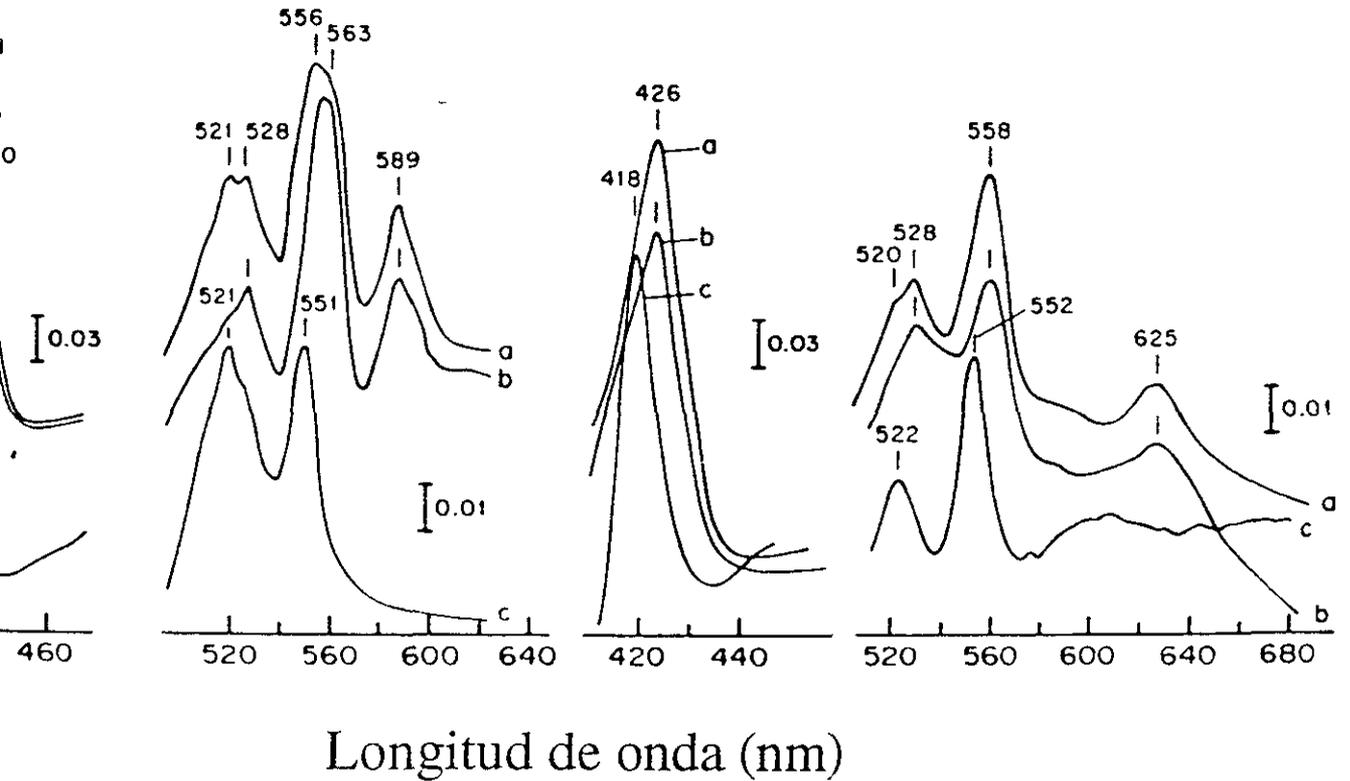


Fig. 7 Espectros diferenciales de baja temperatura (77 K) de las preparaciones obtenidas al extraer las membranas de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente con Tritón X-100 al 0.2 %.

A. Espectros diferenciales reducido menos oxidado de las preparaciones obtenidas a partir de las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. B. Espectros diferenciales reducido menos oxidado de las preparaciones obtenidas a partir de las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las membranas íntegras (a), las membranas después de la extracción con Tritón X-100 al 0.2 % (b) y el solubilizado recuperado después de la extracción con Tritón X-100 al 0.2 % (c) fueron reducidos con ditionita y oxidados con persulfato de amonio. Los contenidos de proteína en los espectros a, b y c fueron: 5.0, 4.0 y 1.0 mg ml^{-1} , respectivamente.

589 nm (intensificado con KCN) fueron indicativos de la presencia del citocromo a_1 (**Fig. 7A, trazo b**). Para efectos de comparación fueron realizados los espectros diferenciales reducido menos oxidado de las membranas que no recibieron ningún tratamiento (**Fig. 7A, trazo a**). En ellos podemos distinguir claramente la presencia de los citocromos b (picos a 427, 528, 556 nm y hombro a 563 nm), c (pico a 521 nm y un débil hombro a 551 nm) y a_1 (hombro a 440 nm y pico a 589 nm) (**Fig. 7A, trazo a**). Las membranas de las células crecidas con exceso de amonio también fueron solubilizadas con Tritón X-100 al 0.2 %. Los resultados son indicados en la **Fig. 7B**. Los citocromos de tipo c (picos a 418, 522 y 552 nm) fueron liberados de las membranas por el Tritón X-100 y se detectaron en la fracción solubilizada (**Fig. 7B, trazo c**), mientras que los citocromos de tipo b y d fueron detectados en las membranas lavadas con el detergente (**Fig. 7B, trazo b**); el citocromo a_1 también fue detectado en las membranas. Para efectos de comparación fueron realizados los espectros diferenciales reducido menos oxidado de las membranas que no recibieron ningún tratamiento (**Fig. 7B, trazo a**). Los espectros diferenciales mostraron la presencia de los citocromos b (picos a 426, 528 y 558 nm), c (hombros a 418 y 520 nm) y d (pico a 625 nm); el citocromo a_1 mostró débil señal a 589 nm (**Fig. 7B, trazo a**).

6.6.2 El análisis electroforético en PAGE - SDS de las fracciones solubilizadas con Tritón X-100 al 0.2 %.

Los experimentos anteriores demostraron que los citocromos de tipo c fueron solubilizados (en ambos tipos de membranas) por el Tritón X-100 a bajas concentraciones (0.2 %). Con la finalidad de caracterizar esos citocromos se realizó la separación electroforética por PAGE-SDS de las fracciones solubilizadas, de las membranas lavadas con el detergente y de las membranas intactas (que no recibieron ningún tratamiento) (**Fig. 8**). Los citocromos de tipo c fueron identificados por su actividad de peroxidasa (95). Los resultados indicaron que las membranas de las células crecidas bajo condiciones de limitación de amonio fueron ricas en citocromos de tipo c (**Fig. 8A, carriles a_1 y a_2**); estos citocromos resultaron novedosos y poco comunes, ya que presentaron pesos moleculares elevados. Su masa relativa (Mr) fue: 67, 56, 52 y 45 kDa. El tratamiento con Tritón X-100 removió de las membranas la mayoría de los citocromos de tipo c y fueron detectados en la

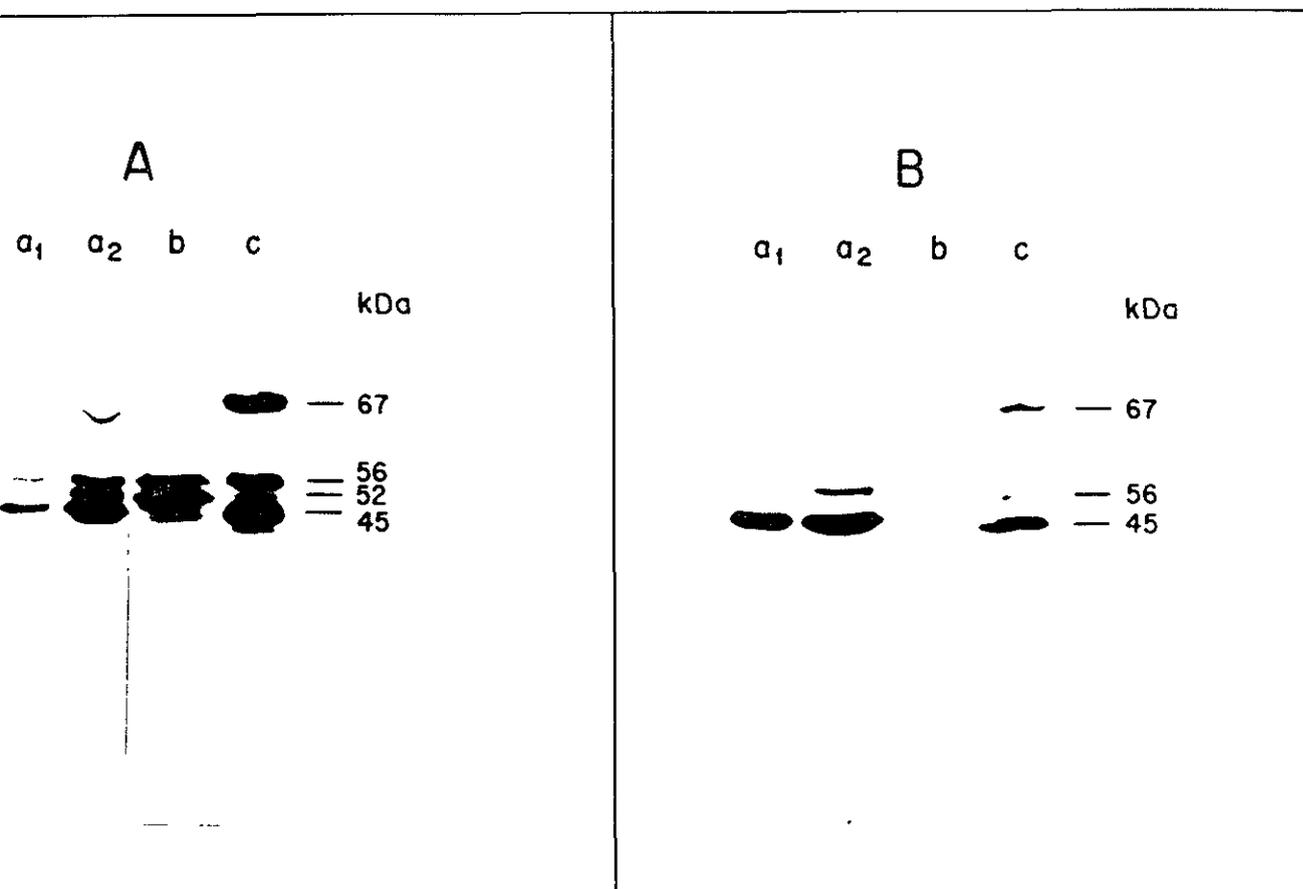


Fig. 8 PAGE-SDS de los citocromos de tipo *c* asociados con las membranas de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente. A. Citocromos *c* asociados con las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP conteniendo 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. B. Citocromos *c* asociados con las membranas de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP conteniendo 40 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las proteínas que contienen al grupo hemo C en las membranas íntegras (carriles a_1 y a_2), en las membranas después de la extracción con Tritón X-100 al 0.2 % (carril b) y en el solubilizado recuperado después de la extracción con Tritón X-100 al 0.2 % (carril c), fueron detectadas por su actividad de peroxidasa. En el panel A los contenidos de proteína fueron: 80 μg (carril a_1), 60 μg (carril a_2), 940 μg (carril b) y 1000 μg (carril c). En el panel B los contenidos de proteína fueron: 500 μg (carril a_1) y 1000 μg (carriles a_2 , b y c).

fracción solubilizada; los citocromos detectados fueron de 67, 56 y 45 kDa (**Fig. 8A, carril c**). Al parecer el citocromo *c* de 52 kDa se mantuvo unido a las membranas después del tratamiento con Tritón X-100 (**Fig. 8A, carril b**). Las membranas de las células crecidas con exceso de amonio también presentaron citocromos de tipo *c* de alto peso molecular, pero la intensidad de las bandas sugirió que la cantidad de estos citocromos es muy baja en comparación a lo detectado en las células crecidas bajo condiciones de limitación de amonio (**Fig. 8B**). El componente de 45 kDa fue el más abundante y fue detectado tanto en las membranas intactas como en la fracción solubilizada por el Tritón X-100 (**Fig. 8B, carriles a₁, a₂ y c**). Otros componentes detectados en estas membranas correspondieron a los citocromos de 67 y 56 kDa. Se debe notar que en estas membranas la banda del citocromo *c* de 52 kDa no fue detectada (**Fig. 8B, carriles a₁, a₂ y c**). El tratamiento con Tritón X-100 al 0.2 % fue suficiente para remover de las membranas todos los citocromos de tipo *c*, los cuales fueron detectados en la fracción solubilizada (**Fig. 8B, carril b**).

Los resultados obtenidos en ambos tipos de membranas indicaron que los citocromos *c* encontrados en *A. diazotrophicus* son de alto peso molecular (45 – 67 kDa). En ninguno de los casos fueron encontrados citocromos *c* de bajo peso molecular, como el citocromo *c*₁ del complejo *bc*₁ y el citocromo *c* soluble mitocondrial. Se propuso que *A. diazotrophicus* no posee al complejo *bc*₁ como parte de su sistema respiratorio.

Los resultados presentados hasta este momento, cristalizaron en la elaboración de un manuscrito que fue publicado en una revista de prestigio internacional. La cita publicada fue la siguiente: Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzuá, L., Aguilar, G. A., Baca, B. E., and J. E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* 181: 6987-6995. Por otro lado, los resultados que a continuación se muestran fueron obtenidos en las membranas de *A. diazotrophicus* creciendo bajo condiciones de limitación de amonio.

6.7 El mixotiazol y la Antimicina A inhiben las actividades de oxidasa.

Los datos anteriores apuntaron a que *A. diazotrophicus* no posee al complejo *bc*₁, sin embargo los estudios de inhibición con mixotiazol y Antimicina A de las actividades de

oxidasa indicaron lo contrario (**Fig. 9A**). Se ha reportado que el mixotiazol y la Antimicina-A son inhibidores específicos del complejo bc_1 (91,99), por ello se probó su efecto sobre las actividades de oxidasa. Los resultados indicaron que estos inhibidores causaron la disminución de las actividades de glucosa, etanol, acetaldehído y NADH oxidasas. El efecto más notable se registró con la actividad de glucosa oxidasa, la cual fue fuertemente inhibida por el mixotiazol: la actividad disminuyó en un 95 % con 10 μM de mixotiazol (**Fig. 9A**). Al parecer el efecto inhibitorio del mixotiazol fue altamente específico. Por otro lado, las actividades de etanol oxidasa, acetaldehído oxidasa y NADH oxidasa fueron inhibidas con mayores concentraciones de mixotiazol: las actividades de acetaldehído y NADH oxidasas fueron inhibidas en un 75 % con 50 μM de mixotiazol. La Antimicina-A también causó la disminución de las actividades de glucosa, etanol, acetaldehído y NADH oxidasas (**Fig. 9B**). La Antimicina-A inhibió las actividades de glucosa oxidasa, etanol oxidasa y acetaldehído oxidasa. Estas actividades disminuyeron en un 90 % en presencia de 50 μM de Antimicina-A. La actividad NADH oxidasa fue inhibida en un 60 % en presencia de 100 μM de Antimicina-A; ésta actividad fue la menos sensible de todas las actividades de oxidasa. Los resultados anteriores apuntaron a que el complejo bc_1 debía estar presente en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Sin embargo, los datos obtenidos mediante el análisis electroforético por PAGE-SDS de las membranas completas de *A. diazotrophicus* (**Fig. 8**), las bajas actividades respiratorias registradas con TMPD (**Tabla 3**) y la ausencia de actividad de citocromo *c* reductasa (dato no mostrado), proporcionaron evidencias de que *A. diazotrophicus* no cuenta con dicho complejo citocrómico. Por lo tanto, propusimos que el mixotiazol y la Antimicina-A deben reconocer e inhibir algún otro componente del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* ajeno al complejo bc_1 .

6.7.1 El mixotiazol y la Antimicina-A deben actuar en algún sitio anterior a la ubiquinona.

Con el propósito de conocer si el sitio de inhibición por mixotiazol y Antimicina-A se localizaba entre la ubiquinona y la oxidasa terminal a_1 , o bien en un sitio anterior a la ubiquinona se diseñaron dos estrategias de trabajo. En la primera estrategia, se midió la

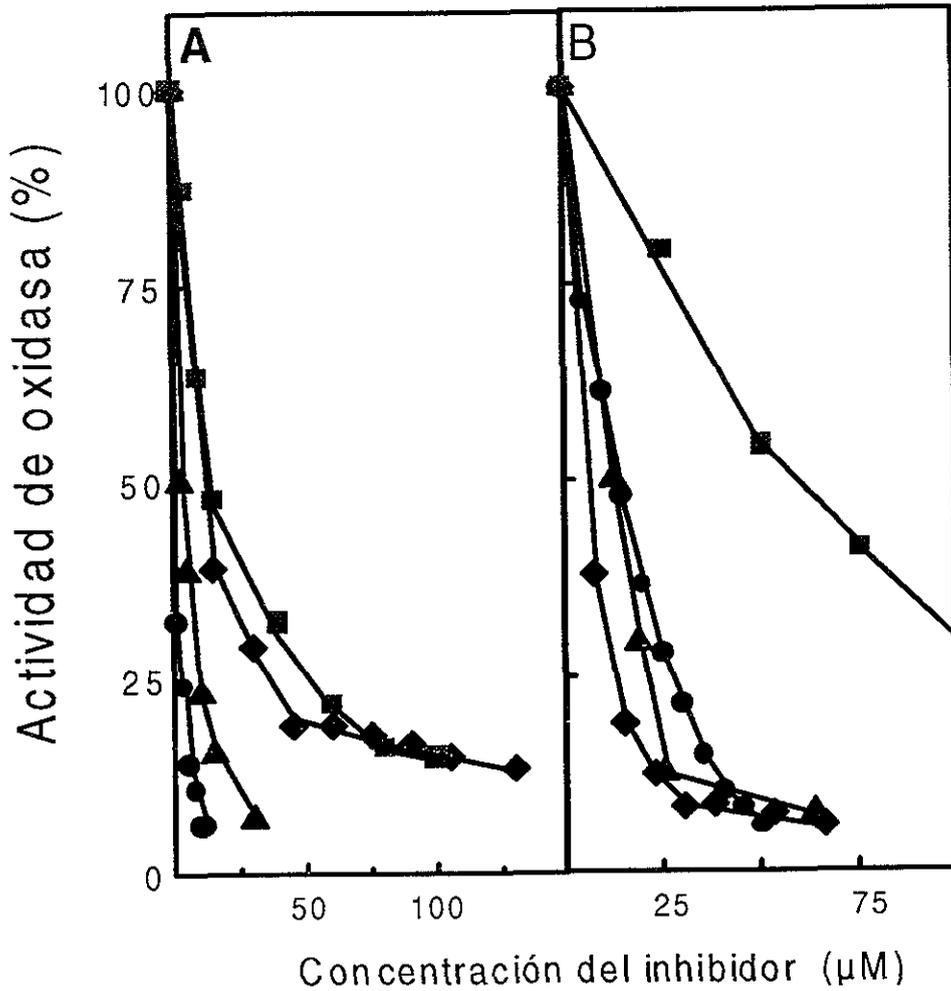


Fig. 9 Inhibición de las actividades respiratorias de oxidasa de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente en medio LGIP suplementado con 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las actividades de oxidasa para glucosa (●), etanol (▲), acetaldehído (◆) y NADH (■) fueron tituladas con mixotiazol (A) y Antimicina-A (B). Las actividades de oxidasa fueron medidas polarográficamente con un electrodo de Clark, empleando 0.1 mg de proteína membranal.

actividad de quinol oxidasa (THQ oxidasa) en presencia de mixotiazol y Antimicina-A. Este ensayo fue realizado en membranas íntegras. Como el tetrahydroquinol (THQ) es un análogo de las quinonas y funciona como donador artificial de electrones de las quinol oxidasas (79), esta estrategia permitiría saber si el sitio de inhibición se localizaba después de la ubiquinona, antes de la oxidasa terminal. Los resultados mostraron que la actividad de quinol oxidasa no fue inhibida por mixotiazol y tampoco por Antimicina-A, cuando se emplearon las concentraciones (10 y 40 μM , respectivamente), que inhiben completamente la actividad de la glucosa oxidasa (**Fig. 10**). La actividad quinol oxidasa fue parcialmente afectada (disminuyó en un 25 %) en presencia de 25 μM de mixotiazol y 130 μM de Antimicina-A. En ninguno de los casos se alcanzó el 90 % de inhibición, registrada con la actividad de glucosa oxidasa (**Fig. 9**). Los resultados anteriores llevaron a proponer que el sitio de inhibición debía localizarse antes de la ubiquinona. En la segunda estrategia se midieron las actividades de la glucosa deshidrogenasa (G-DH) y de la NADH deshidrogenasa (NADH-DH) en presencia de mixotiazol y Antimicina-A. Esta estrategia tuvo como finalidad determinar si el sitio de inhibición se localizaba antes de la ubiquinona. El ensayo fue realizado en membranas completas y se empleó ferricianuro de potasio como aceptor de electrones (1,2,56,73). Los resultados indicaron que la actividad de la G-DH fue fuertemente inhibida por el mixotiazol y la Antimicina-A (**Fig. 11**); las curvas de inhibición fueron muy similares a las obtenidas con la actividad de glucosa oxidasa (**Fig. 9**). Estos resultados proporcionaron evidencias de que el sitio de inhibición debía localizarse antes de la ubiquinona. Los resultados obtenidos con la actividad NADH-DH fueron totalmente diferentes, ya que no se encontró efecto inhibitorio ni con mixotiazol ni Antimicina-A (**Fig. 11**). Esto último indicó que el efecto inhibitorio observado con el mixotiazol y la Antimicina-A presenta especificidad por la vía de oxidación de la glucosa, lo que llevó a proponer que el posible sitio de acción de estos inhibidores debía localizarse antes de la ubiquinona y muy probablemente en las proximidades de la G-DH. También se midieron las actividades de la alcohol deshidrogenasa (A-DH) y de la aldehído deshidrogenasa (AL-DH) en presencia de mixotiazol (**Fig. 11**). El mixotiazol causó la disminución de las actividades de deshidrogenasa; la actividad A-DH disminuyó en un 80 % en presencia de 60 μM de mixotiazol. La actividad AL-DH fue menos sensible y sólo disminuyó en un 55 % en presencia de 50 μM de mixotiazol. Esto mismo ocurrió en los

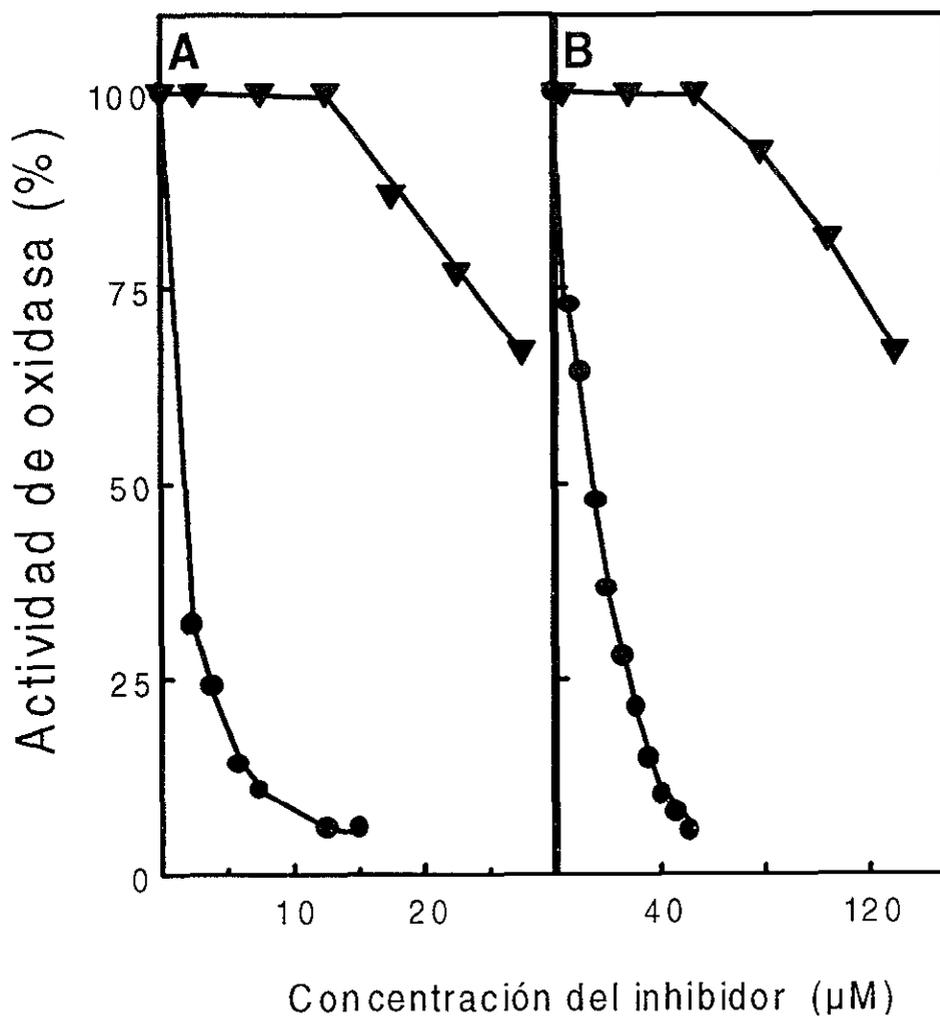


Fig. 10 Inhibición de la actividad de quinol oxidasa de *A. diazotrophicus*. La actividad de quinol oxidasa (▼) fue titulada con mixotiazol (A) y Antimicina-A (B). Dicha actividad fue medida polarográficamente con un electrodo de Clark y para ello se empleó tetrahydroquinona (THQ) como donador de electrones. Como referencia se muestra la curva de inhibición de la actividad de glucosa oxidasa en presencia de mixotiazol y Antimicina-A (●). Los ensayos se realizaron empleando 0.1 mg de proteína membranal.

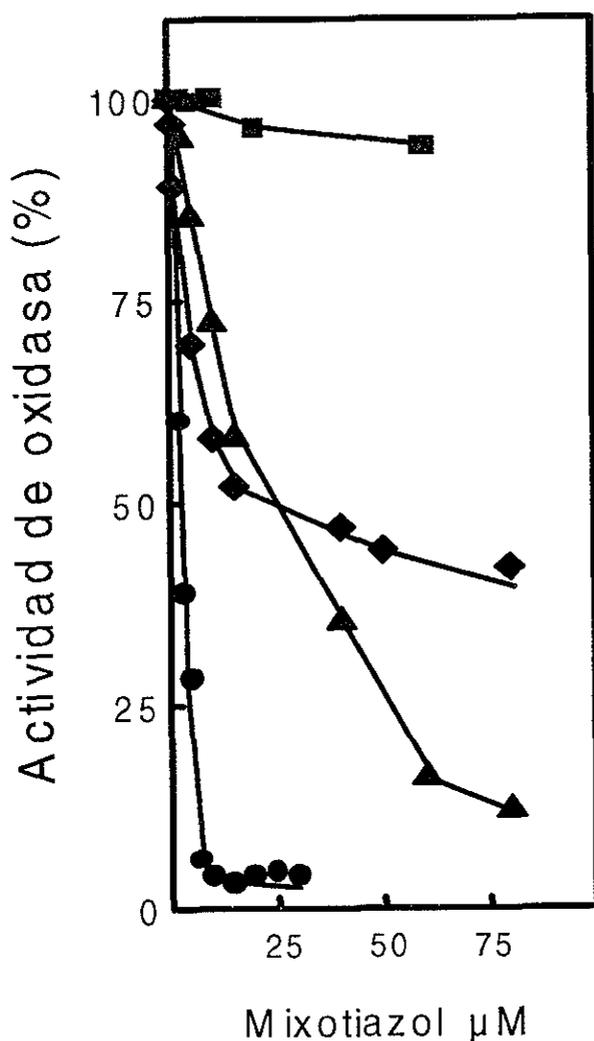


Fig. 11 Inhibición de las actividades respiratorias de deshidrogenasa de *A. diazotrophicus* crecido en medio LGIP suplementado con 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las actividades de G-DH (●), A-DH (▲), AL-DH (◆) y NADH-DH (■) fueron medidas en presencia de mixotiazol. Los ensayos se realizaron en membranas completas y se emplearon 0.05 mg de proteína membranal. La oxidasa terminal fue inhibida con 2 mM de KCN. Se empleó ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.

ensayos realizados con Antimicina-A (datos no mostrados). Los resultados sugirieron que el mixotiazol y la Antimicina-A inhibieron preferencialmente las actividades de las deshidrogenasas periplasmáticas. Aunque el mixotiazol tiene acción inhibitoria sobre las 3 deshidrogenasas (**Fig. 10**) y sus correspondientes oxidasas (**Fig. 11**), lo hace con diferente potencia y ésto sugiere que no hay un punto de inhibición común para las 3 vías, sino sitios equivalentes probablemente localizados en cada una de las deshidrogenasas.

6.8 La irradiación con luz ultravioleta (U.V. 360 nm) afecta algunas actividades de deshidrogenasa en *A. diazotrophicus*.

Los resultados anteriores sugirieron que el sitio de inhibición del mixotiazol y Antimicina-A debía localizarse antes de la ubiquinona. Para tener una mayor aproximación y para determinar si el sitio de inhibición se localizaba en las proximidades de la deshidrogenasa (G-DH), fue necesario inactivar la ubiquinona. Para ello, las membranas de *A. diazotrophicus* fueron irradiadas con luz ultravioleta de onda corta (U.V. 360 nm). Se ha reportado que la irradiación de las membranas con luz ultravioleta produce la fotoinactivación de la ubiquinona debido al rompimiento de anillos de la molécula (79). Después del tratamiento con luz U.V. 360 nm fueron medidas las actividades de oxidasas. Los resultados mostraron que las actividades de glucosa oxidasas, etanol oxidasas, acetaldehído oxidasas, NADH oxidasas y succinato oxidasas disminuyeron considerablemente (**Tabla 4**). Las actividades de glucosa oxidasas y NADH oxidasas disminuyeron hasta en un 80 % después de que las membranas fueron irradiadas con luz U.V. 360 nm. Lo mismo ocurrió con las otras actividades de oxidasas. La **Fig 12A** muestra la disminución de las actividades de glucosa oxidasas y NADH oxidasas en función del tiempo de irradiación; después de 2 h de tratamiento las actividades de oxidasas disminuyeron considerablemente. Los resultados anteriores permitieron confirmar la presencia de la ubiquinona en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*, además sugirieron que la ubiquinona es un intermediario común en el transporte de electrones a las oxidasas terminales. También se midieron las actividades de deshidrogenasa de las membranas irradiadas. Se esperaba que todas las actividades de deshidrogenasa estuvieran intactas y que no fueran afectadas por la luz U.V. 360 nm, sin embargo no ocurrió así. Sólo las actividades de NADH deshidrogenasa (NADH-DH) y

| Sustratos | (a) Ningún tratamiento | (b) Irradiadas con Luz U.V. 360 nm | (c) Extraídas con n-pentano | (d) Lavadas con Tritón X-100 al 0.2 % |
|---|------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Actividades de oxidasas ($\text{natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) | | | | |
| Glucosa | 2600 | 55 | 2260 | 2080 |
| NADH | 2400 | 75 | 130 | 1380 |
| Acetaldehído | 1384 | 36 | 1140 | 0 |
| Etanol | 650 | 18 | 510 | 0 |
| Succinato | 270 | 0 | 0 | 200 |
| Actividades de deshidrogenasas ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) | | | | |
| Glucosa | 1800 | 35 | 1600 | 1440 |
| NADH | 1595 | 1115 | 1480 | 1500 |
| Acetaldehído | 1414 | 105 | 1209 | 0 |
| Etanol | 1097 | 48 | 724 | 0 |
| Succinato | 120 | 110 | 100 | 70 |

Tabla 4. Actividades respiratorias asociadas con las membranas de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente en medio LGIP suplementado con 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se midieron las actividades de las oxidasas y deshidrogenasas en las membranas que no recibieron ningún tratamiento (a), en las membranas después de que fueron irradiadas con luz U.V. 360 nm (b), en las membranas después de ser extraídas con n-pentano (c) y en las membranas después de ser extraídas con Tritón X-100 al 0.2 % (d). Las actividades de oxidasas fueron medidas polarográficamente con un electrodo de Clark. Las actividades de deshidrogenasa fueron medidas espectrofotométricamente usando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones. En todos los ensayos se emplearon 0.1 mg de proteína membranal.

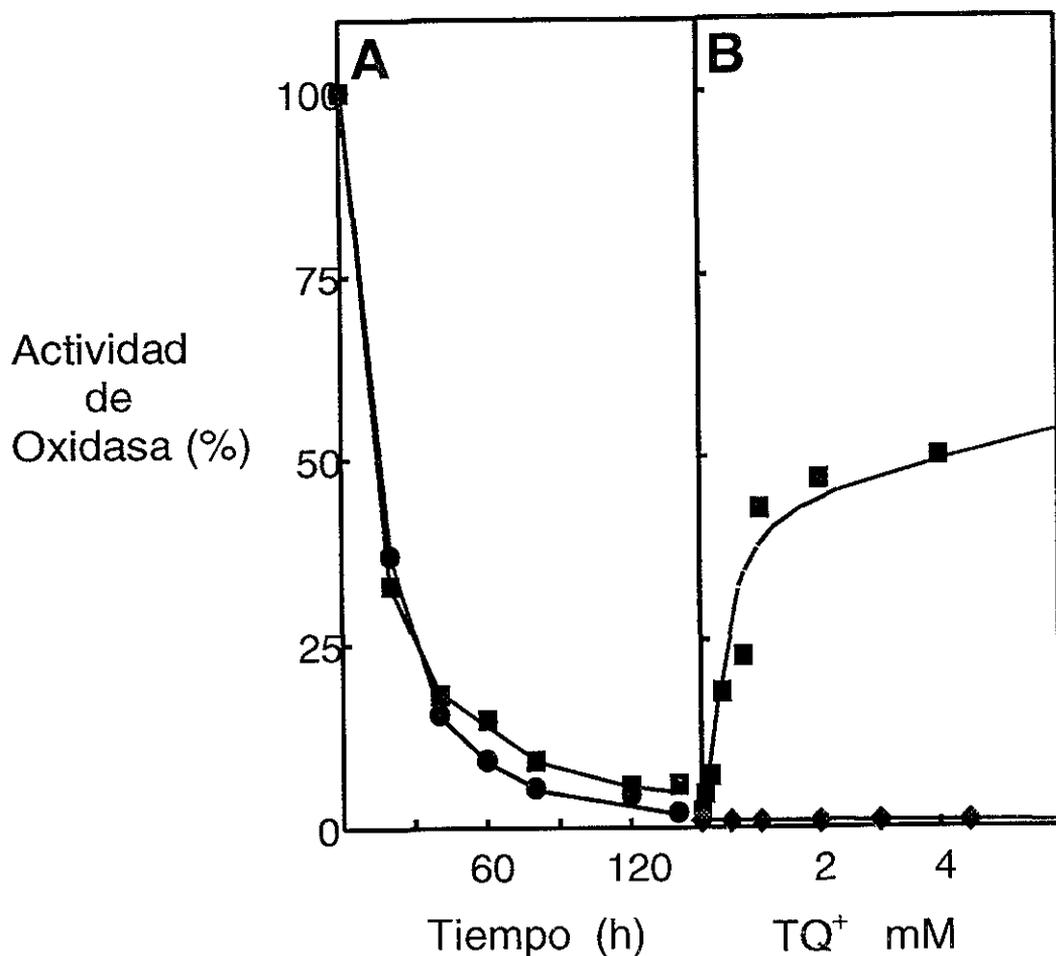


Fig. 12. La fotoirradiación de las membranas de *A. diazotrophicus* con luz ultravioleta cercana (U.V. 360 nm) produjo la inactivación de la ubiquinona y del grupo prostético PQQ de las deshidrogenasas periplásmicas. A. Las actividades de NADH oxidasa (■) y glucosa oxidasa (●) disminuyeron considerablemente después de que las membranas fueron irradiadas durante 2 h. B. La tetrahydroquinona (TQ⁺) permitió la reconstitución parcial (50 %) de la actividad de NADH oxidasa (■); las actividades de glucosa oxidasa (●), etanol oxidasa (▲) y acetaldehído oxidasa (◆) no pudieron ser reconstituidas con TQ⁺. Los ensayos fueron realizados con las membranas irradiadas durante 2 h y se emplearon 0.1 mg de proteína membranal. Como referencias del 100 % de actividad, fueron consideradas las actividades de oxidasa para NADH y glucosa de las membranas que no recibieron ningún tratamiento: NADH oxidasa (2400 natm O₂ min⁻¹ mg⁻¹) y glucosa oxidasa (2600 natm O₂ min⁻¹ mg⁻¹).

succinato deshidrogenasa (S-DH) se mantuvieron intactas después del tratamiento (**Tabla 4**). La luz U.V. 360 nm afectó de manera importante la actividad de las deshidrogenasas periplásmicas (G-DH, A-DH y AL-DH). Lo anterior llevó a proponer que la luz U.V. inactivó algún componente de esas deshidrogenasas. Se ha descrito que la G-DH, la A-DH y la AL-DH de las bacterias acéticas pertenecen a un grupo de proteínas llamadas quinoproteínas, las cuales se caracterizan por contener como grupo prostético a una quinona: el grupo PQQ (quinona de pirrolo-quinolina) (7,26,70). Las deshidrogenasas periplásmicas de *A. diazotrophicus* pertenecen a este grupo de quinoproteínas. Por ello propusimos que la luz U.V. 360 nm debió inactivar, además de la ubiquinona, al grupo PQQ de esas deshidrogenasas; lo anterior permitió explicar la pérdida en dichas actividades. Concluyendo, los experimentos con luz ultravioleta no aportaron información a cerca del posible sitio de inhibición por mixotiazol y Antimicina-A, pero fueron muy valiosos porque pusieron en evidencia la presencia del grupo prostético PQQ en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*.

6.8.1 La luz U.V. inactiva al grupo PQQ presente en las deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído.

Para comprobar que la luz U.V. 360 nm afectó el grupo PQQ de la G-DH, la A-DH y la AL-DH se hicieron ensayos de reconstitución de las actividades de oxidasa en las membranas irradiadas. Para ello, se midieron las actividades de glucosa, etanol y acetaldehído oxidasas empleando tetrahidroquinona (TQ^+). La TQ^+ funciona como acarreador de electrones entre las deshidrogenasas y la oxidasa terminal. Como control se realizó el mismo ensayo con la actividad NADH-oxidasa. Los resultados mostraron que la adición de TQ^+ regeneró la actividad NADH oxidasa de las membranas irradiadas; la regeneración alcanzó el 65 % de la actividad registrada en las membranas que no recibieron ningún tratamiento (**Fig. 12B**). En cambio, las actividades de glucosa oxidasa, etanol oxidasa y acetaldehído oxidasa no pudieron ser reconstituidas por la adición de TQ^+ (**Fig. 12B**). Lo anterior sugirió que la irradiación con luz U.V. 360 nm , además de inactivar a la ubiquinona, afectó al grupo prostético PQQ de las deshidrogenasas periplásmicas. Estos experimentos proporcionaron una evidencia importante de que las deshidrogenasas para

glucosa, etanol y acetaldehído contienen al grupo prostético PQQ, el cual fue afectado por la irradiación con luz U.V. 360 nm.

6.10 Las actividades de las deshidrogenasas periplásmicas de *A. diazotrophicus* no son afectadas por el tratamiento de las membranas con n-pentano.

Como la irradiación de las membranas con luz U.V. 360 nm produjo la inactivación de las deshidrogenasas periplásmicas, se buscó otra metodología que permitiera extraer a la ubiquinona y que no tuviera ningún efecto sobre las actividades de deshidrogenasa mencionadas. En este sentido se ha descrito que el tratamiento de las membranas con solventes orgánicos como el n-pentano, facilita la libre extracción de la ubiquinona (78). Por ello, las membranas fueron extraídas con n-pentano y luego se midieron las actividades de deshidrogenasa para glucosa, etanol, acetaldehído, NADH y succinato. Los resultados indicaron que el n-pentano no produjo ningún efecto sobre las actividades de deshidrogenasa (**Tabla 4**), por lo que resultó un método eficiente para la generación de membranas carentes de ubiquinona. Todas las deshidrogenasas mostraron actividades similares a las actividades registradas en las membranas que no recibieron tratamiento. Los resultados también sugirieron que el n-pentano extrajo a la ubiquinona pero no al grupo PQQ, de esta forma las deshidrogenasas periplásmicas (que contienen PQQ) mostraron actividad aún después del tratamiento (**Tabla 4**). Se ha descrito que el grupo PQQ está fuertemente unido al sitio activo de la G-DH, gracias a la presencia de un residuo de triptofano planar y a un residuo de histidina (72). Lo anterior puede explicar por qué el grupo PQQ de las deshidrogenasas de *A. diazotrophicus* no es extraído por el solvente.

6.10.1 Algunas deshidrogenasas de *A. diazotrophicus* no dependen de la ubiquinona.

La pérdida de la ubiquinona llevaría a la disminución en las actividades de oxidasa. Partiendo de ésto, se midieron las actividades de oxidasa para glucosa, etanol, acetaldehído, NADH y succinato en las membranas que fueron extraídas con el n-pentano. Los resultados fueron sorprendentes y muy relevantes para el estudio de la organización del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Como era de esperarse, las actividades de NADH oxidasa

y succinato oxidasa fueron abolidas; la actividad remanente de la NADH oxidasa apenas representó un 5 % de la actividad registrada en las membranas que no recibieron tratamiento (**Tabla 4**). Lo anterior sugirió que la eliminación de la ubiquinona provocó la pérdida de las actividades de oxidasa que son dependientes de la ubiquinona, en este caso de la NADH oxidasa y de la succinato oxidasa. En contraposición a ésto, las actividades de glucosa oxidasa, etanol oxidasa y acetaldehído oxidasa permanecieron intactas a pesar de que la ubiquinona fue extraída por el solvente. Lo anterior nos llevó a proponer que las deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído no dependen de la ubiquinona del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Así se determinó que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* cuenta con dos tipos de deshidrogenasas, unas como la G-DH, A-DH y AL-DH que no usan a la ubiquinona como aceptor de electrones y otras como la NADH-DH y la succinato deshidrogenasa (S-DH) que dependen totalmente de la ubiquinona.

6.10.2 Ensayo de reconstitución de las actividades de glucosa oxidasa y NADH oxidasa en las membranas extraídas con n-pentano.

Con el propósito de determinar si la disminución de las actividades de NADH oxidasa y succinato oxidasa de las membranas extraídas con n-pentano, se debió a la pérdida de la ubiquinona y no al efecto del solvente en las membranas, se realizó el ensayo de reconstitución de las actividades empleando TQ^+ . Los resultados mostraron que la actividad NADH oxidasa fue regenerada en su totalidad (**Fig. 13**); lo mismo ocurrió con la actividad de succinato oxidasa (datos no mostrados). Lo anterior sugirió que la disminución en las actividades NADH oxidasa y succinato oxidasa se debieron a la pérdida de la ubiquinona y no al tratamiento de las membranas con el n-pentano. Como pudimos observar la adición de TQ^+ a las membranas extraídas con n-pentano, facilitó la regeneración de la actividad NADH oxidasa; con la actividad de glucosa oxidasa ocurrió lo contrario. A pesar de que la actividad de glucosa oxidasa permaneció intacta después de que las membranas fueron extraídas con n-pentano, la adición de TQ^+ tuvo un efecto inhibitorio y produjo la disminución de la actividad de oxidasa (**Fig. 13**). Por lo tanto, proponemos que este efecto inhibitorio se produjo debido a la acción de la TQ^+ sobre el grupo PQQ que también es una quinona.

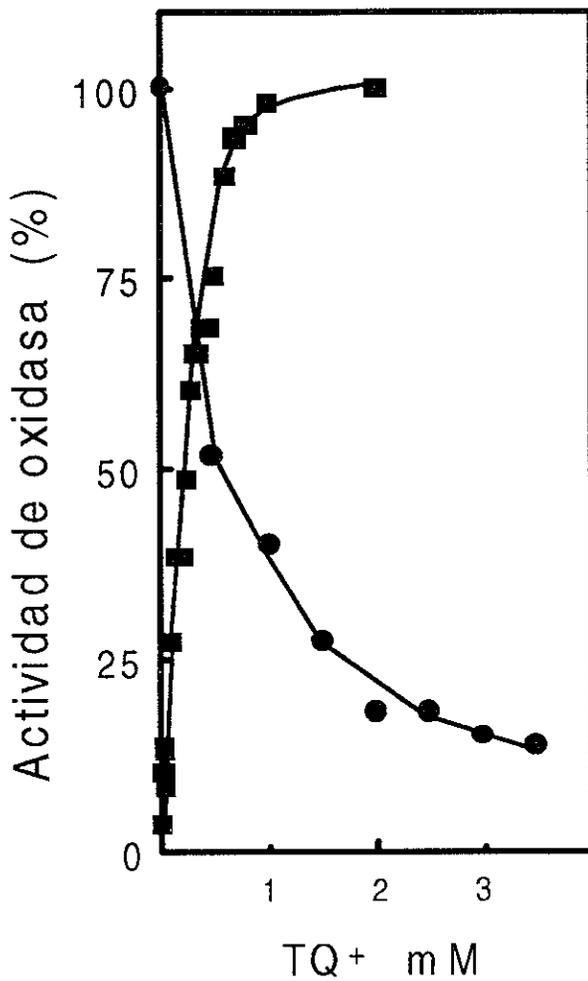


Fig. 13. El efecto de la tetrahidroquinona (TQ^+) en las actividades de oxidasa de las membranas de *A. diazotrophicus* que fueron extraídas con n-pentano. La TQ^+ regeneró la actividad NADH oxidasa (■) casi en su totalidad, mientras que la actividad de glucosa oxidasa (●) fue fuertemente inhibida por ese compuesto. El ensayo fue realizado después de que las membranas fueron extraídas con el n-pentano. Las actividades de oxidasa fueron determinadas polarográficamente con el un electrodo de Clark y se emplearon 0.1 mg de proteína membranar. Como referencias del 100 % de actividad, fueron consideradas las actividades de oxidasa para NADH y glucosa de las membranas que no recibieron ningún tratamiento: NADH oxidasa ($2400 \text{ natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) y glucosa oxidasa ($2600 \text{ natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

7. Discusión

Acetobacter diazotrophicus se ha reconocido por su capacidad para crecer y fijar nitrógeno bajo condiciones de alta aereación, lo cual es único y sugiere la existencia de un efectivo mecanismo de protección para la nitrogenasa (24,93). En este estudio se determinó que la alta aereación (e.g. $K_{La} = 148 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tuvo un fuerte efecto positivo sobre las propiedades de crecimiento y la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*, así los cultivos más aereados mostraron las más altas actividades de la nitrogenasa, contrario a lo que se ha reportado en la mayoría de los organismos diazótrosos (14,57,74). Las tasas de actividad de la nitrogenasa de los cultivos más aereados (700 a 900 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fueron similares a las tasas reportadas en *A. diazotrophicus* por Stephan *et al.*, (93), y superiores a las reportadas en los bacteroides de *Rhizobium leguminosarum* (540 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y *R. meliloti* (170 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Azospirillum brasilense* (492 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Klebsiella pneumoniae* (175 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y *Rhodoseudomonas sphaeroides* (0.5 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (14,31,36,57).

La fijación de nitrógeno es un proceso altamente demandante de energía puesto que requiere de 16 a 18 moléculas de ATP para reducir una molécula de N_2 (98). Por ello los microorganismos han desarrollado un mecanismo para “apagar” el sistema de la nitrogenasa, cuando el nitrógeno fijado presente es suficiente para cubrir las necesidades del organismo (57,98). En forma análoga, la adición de amonio inhibe la actividad de la nitrogenasa en algunas bacterias diazótrosas y este proceso es llamado “switch-off por NH_4^+ ”; después de que la concentración del amonio externo disminuye, la actividad enzimática de la nitrogenasa se restablece (“switch-on”) (57). La sensibilidad al amonio depende de las condiciones de cultivo y también de la cepa empleada (33). Los sistemas de control varían entre los organismos diazótrosos. Por ejemplo, en *A. diazotrophicus* se ha reportado que la actividad de la nitrogenasa es parcialmente inhibida por la adición de 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; algunos aminoácidos como glutamina y glutamato muestran un efecto similar (84,93). En contraste, la actividad de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* es inhibida después de la adición de bajas concentraciones de amonio (57). La actividad de la nitrogenasa de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* es inhibida completamente cuando se emplean de 0.25 a 1.0 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (37,84). El “switch-off” por amonio

consiste en la ADP-ribosilación del residuo de arginina (Arg-101) de una de las subunidades de la dinitrogenasa reductasa; la ADP-ribosilación se ha encontrado en *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* (84). Este mecanismo no ha sido observado en *A. diazotrophicus*.

La dosis inicial óptima de amonio para obtener células de *A. diazotrophicus* que fijen nitrógeno es 1 mM (93). Concentraciones en exceso como 40 mM de amonio reprimen completamente la actividad de la nitrogenasa (24). Así se determinó que la baja concentración de amonio (1 mM) se emplea como dosis inicial para que *A. diazotrophicus* pueda iniciar su crecimiento; sin amonio la bacteria no puede crecer. Los datos obtenidos en este trabajo (24), en concordancia con Stephan *et al.*, (93), permitieron proponer que el amonio incrementa el número de células de *A. diazotrophicus* en niveles tales, que disminuyen las concentraciones de oxígeno en el medio y hacen factible la actividad de la nitrogenasa. Nosotros apoyamos esta propuesta en virtud de que durante la primera etapa del crecimiento, *A. diazotrophicus* fue dependiente de amonio y al mismo tiempo, la concentración de oxígeno disuelto fue llevada hasta niveles no detectables por el electrodo de oxígeno. Esas condiciones facilitaron el desarrollo de la segunda etapa de crecimiento de *A. diazotrophicus*, la cual fue dependiente de la actividad diazotrófica y lo más notable fue que la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en niveles no detectables por el electrodo de oxígeno.

Debido a que la enzima nitrogenasa consta de proteínas altamente sensibles al oxígeno, el proceso de la fijación de nitrógeno debe llevarse a cabo en un ambiente microaerófilico (12,36,42,81,98). Esto plantea un serio problema, sobre todo para las bacterias diazóticas aeróbicas, ya que el oxígeno es esencial para la síntesis de ATP y por otro lado, inactiva a la nitrogenasa (12,36). Esta paradoja ha sido resuelta en las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* mediante la formación de nódulos en las raíces de las plantas leguminosas. El nódulo funciona como una eficiente barrera física que mantiene un ambiente microaerófilico (36). La concentración de oxígeno en el interior del nódulo es de 3 a 30 nM y es controlada por una barrera de difusión formada por capas de células empaquetadas, al mismo tiempo que el flujo de oxígeno libre es equilibrado por la leghemoglobina, proteína presente en altas concentraciones en las células del nódulo infectado (5,38). Se sabe que la leghemoglobina posee una alta velocidad de asociación por

oxígeno y una baja velocidad de disociación, lo que la convierte en un excelente medio amortiguador y de reserva de globina oxigenada (38). Así la concentración de oxígeno disuelto en las proximidades de la bacteria es suficiente para permitir que las oxidasas respiratorias funcionen de manera eficiente y también para que la generación de energía y la fijación de nitrógeno ocurran simultáneamente (42).

Stephan *et al.*, (93) reportaron que la nitrogenasa de *A. diazotrophicus* es aerotolerante. Reis y Döbereiner (84) determinaron que la presión óptima de oxígeno (pO_2) para la actividad de nitrogenasa de *A. diazotrophicus* se encuentra alrededor de 0.2 kPa. Cuando la pO_2 se incrementa a 1 kPa se pierde el 50 % de la actividad de la nitrogenasa, mientras que a 2 kPa se inhibe completamente la actividad de la nitrogenasa (84). En contraste, la actividad de la nitrogenasa de los cultivos de *A. brasilense* y *A. lipoferum* es completamente inhibida a 0.2 kPa de presión; lo mismo ocurre en *Bacillus polymyxa* (11,37). En el presente trabajo se determinó que *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente ($K_{La} = 148 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ajusta las concentraciones de oxígeno del entorno a niveles tan bajos que le permiten crecer diazotróficamente. De acuerdo a la hipótesis de la protección respiratoria, descrita en *A. vinelandii* por Dalton y Posgate (16), proponemos que *A. diazotrophicus* debe proteger su nitrogenasa del daño por oxígeno mediante una alta respiración celular. Así *A. diazotrophicus* consume el oxígeno en la superficie celular, impidiendo de esta forma que entre a la célula (60). La propuesta se hizo con base a que *A. diazotrophicus* presenta una de las más altas actividades respiratorias registrada entre los organismos aeróbicos, lo cual se manifiesta cuando las células son crecidas a elevadas concentraciones de oxígeno (24). Destacan las actividades de las deshidrogenasas para glucosa, acetaldehído, etanol y NADH, las cuales son superiores (10 a 20 veces) a las registradas en otras bacterias aeróbicas (8,9,11,16,27,65,67,68,81). Llama mucho la atención la actividad de la glucosa deshidrogenasa, la cual es más activa cuando la bacteria se encuentra fijando nitrógeno. Junto con las otras deshidrogenasas, la glucosa deshidrogenasa debe participar activamente en el mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa. De manera comparativa, en *Acetobacter aceti* se han registrado las actividades de las oxidasas para glucosa, NADH y acetaldehído y fueron 560, 1220 y 720 $\text{natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente (65), mientras que en *Acetobacter methanolicus* (actualmente *Acidomonas methanolica*) las actividades de las deshidrogenasas para

glucosa ($343 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), NADH ($230 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) y etanol ($133 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) resultaron más bajas que las encontradas en *A. aceti* (68). Las actividades de las deshidrogenasas para NADH y succinato de *Bacillus cereus* fueron reportadas en 150 y 360 ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), respectivamente (23). Por otro lado, las actividades respiratorias de *A. diazotrophicus* son similares a las reportadas en *A. vinelandii*, donde se ha descrito el mecanismo de protección respiratoria (16,81). Las actividades respiratorias reportadas en *A. vinelandii* son las siguientes: NADH oxidasa ($2400 \text{ natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), malato oxidasa ($1420 \text{ natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), succinato oxidasa ($480 \text{ natm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

Los datos anteriores nos llevaron a proponer que la nitrogenasa de *A. diazotrophicus* se comporta como todas las nitrogenasas que han sido estudiadas en los organismos diazótrofos, en virtud de que es altamente sensible al oxígeno y por lo tanto, requiere de un ambiente intracelular microaerófilico para poder realizar su función (12,36,37). En cierto sentido la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus* es semejante a la reportada en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, los cuales se desarrollan en ambientes intracelulares bajos en oxígeno. Mediante altas tasas de respiración, *A. diazotrophicus* reduce considerablemente la concentración de oxígeno hasta niveles que fueron indetectables por el electrodo de oxígeno. Muy probablemente, la concentración de oxígeno en el medio de cultivo se aproximó a la que se ha reportado en el interior del nódulo de las leguminosas (3 a 30 nM), sin embargo esto no pudo comprobarse dado que el límite de sensibilidad del electrodo de oxígeno se encuentra por arriba de esos valores (8).

La respiración de *A. diazotrophicus* no había sido estudiada anteriormente. En este trabajo se determinó que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* posee propiedades especiales de composición y organización, que lo hacen un modelo interesante para estudiar la diazotrofia aeróbica. El sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* se compone de una amplia batería de deshidrogenasas, las cuales se encuentran unidas a la membrana citoplásmica. Los reportes de la literatura y la determinación de los valores óptimos de pH llevaron a proponer que las deshidrogenasas para glucosa (G-DH) (pH 5.5), etanol (A-DH) (pH 4.5) y acetaldehído (AL-DH) (pH 4.5) tienen sus sitios catalíticos orientados al espacio periplásmico, mientras que la NADH deshidrogenasa (NADH-DH) (pH 7.4) y la succinato deshidrogenasa (S-DH) (pH 7.4) están orientadas hacia el citoplasma de la bacteria (64,65,67,68) (**Fig. 14**). El número y el tipo de deshidrogenasas

encontradas en *A. diazotrophicus* es muy similar al que se ha reportado en *A. aceti* (65). Sin embargo, las actividades respiratorias de *A. diazotrophicus* son mucho más altas. Las deshidrogenasas de *A. diazotrophicus* llevan a cabo reacciones de oxidación (fermentación oxidativa), las cuales involucran la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares (66). Este proceso se realiza directamente en la superficie externa de la membrana citoplásmica (3,6). Por lo tanto, el proceso es acompañado de la acumulación en grandes cantidades de los productos de oxidación en el medio externo de la bacteria; tal es el caso de la acumulación del ácido glucónico cuando *A. diazotrophicus* se hace crecer en sacarosa (13,24,26,93). Una diferencia importante de las deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído de *A. diazotrophicus* respecto de las deshidrogenasas presentes en otros microorganismos, es que no requieren de coenzimas como el NAD o el FAD para su funcionamiento. En su lugar, se ha reportado la presencia de una quinona como grupo prostético, el cual fue llamado PQQ (quinona de pirroloquinolina) (20,26,70). El grupo prostético PQQ es esencial para que las deshidrogenasas realicen su función y se ha localizado en el sitio catalítico participando activamente en los procesos de oxidación (72). También se ha descrito que las deshidrogenasas para etanol y acetaldehído poseen citocromos de tipo *c*, los cuales son de alto peso molecular y pueden ser solubilizados con gran facilidad en presencia de bajas concentraciones de detergente (Tritón X-100 al 0.2 %). Estos citocromos *c* forman parte de las subunidades I y II de la A-DH y la AL-DH de *A. diazotrophicus* (65,66). En ninguno de los casos se encontraron citocromos de tipo *c* correspondientes a las subunidad c_1 del complejo citocrómico bc_1 , tampoco del citocromo *c* soluble. Por lo tanto, se descartó la presencia del complejo bc_1 en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Otras pruebas que apoyaron dicha propuesta fueron: i). La baja actividad registrada con Asc + TMPD; la actividad con Asc + TMPD apenas representó el 5 % de la actividad de oxidasa registrada con NADH. ii). La baja actividad citocromo *c* reductasa ($18 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (datos no mostrados); iii). La alta actividad de quinol oxidasa (THQ oxidasa) confirmó la presencia de las quinol oxidasas. iv). Los análisis en PAGE-SDS demostraron sólo la presencia de citocromos *c* de altos pesos moleculares. v). El fuerte efecto inhibitorio por mixotiazol y Antimicina A en las actividades de las deshidrogenasas periplásmicas sugirió que el

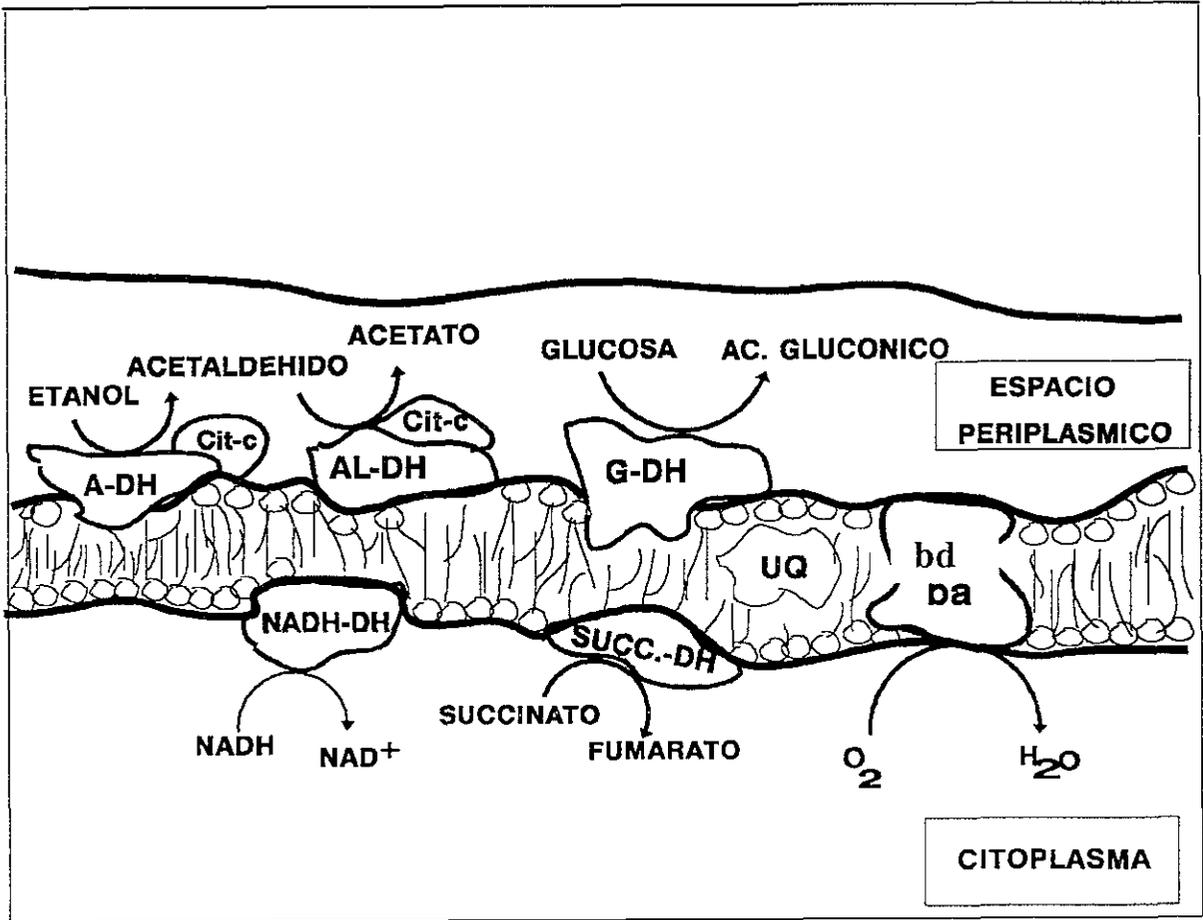
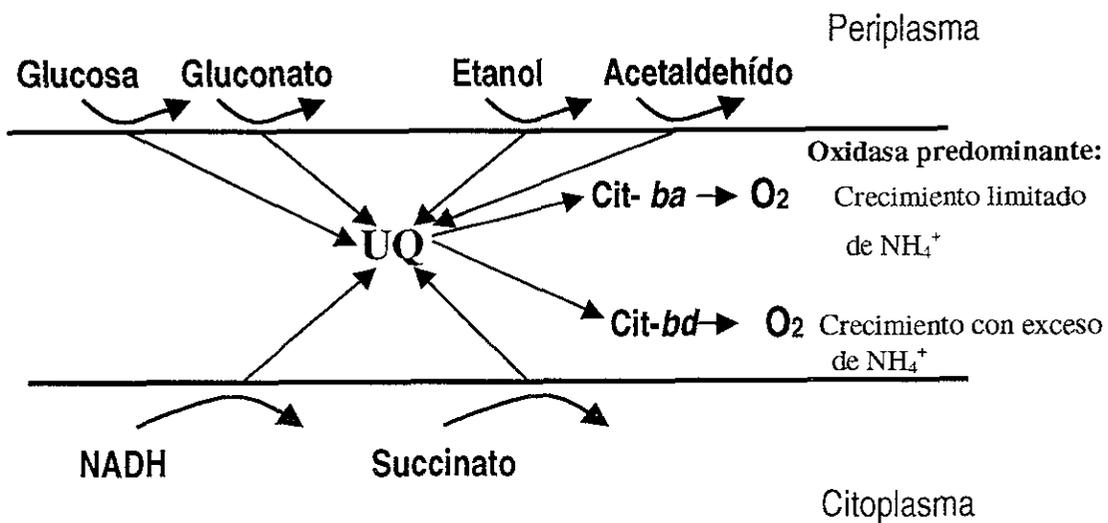


FIG. 14 Representación esquemática de la composición y organización del sistema respiratorio de *Acetobacter diazotrophicus* (datos tomados de 7,26,63,65,66).

componente sensible se encuentra en las deshidrogenasas o en las proximidades de las mismas. Proponemos que dicha inhibición se produce en el grupo prostético PQQ presente en esas deshidrogenasas.

El sistema respiratorio cuenta además con dos citocromo oxidasas terminales, el citocromo *ba* (también conocido como citocromo a_1), el cual se expresa cuando la bacteria se encuentra fijando nitrógeno, y el citocromo *bd*, que es la oxidasa terminal predominante cuando *A. diazotrophicus* es crecido en altas concentraciones de amonio. En este modelo las oxidasas terminales reciben sus electrones directamente de la ubiquinona, la cual funciona como acarreador común de electrones entre las deshidrogenasas y las oxidasas terminales (**Esquema 4**). El citocromo *ba* es poco común entre bacterias y muy poco se ha estudiado acerca de él (80). En *A. aceti* se ha descrito que el citocromo *ba* funciona como ubiquinol oxidasa de baja afinidad por oxígeno ($K_m = 4 \mu\text{M}$); se expresa bajo condiciones aeróbicas y es capaz de bombear protones ($2\text{H}^+/\text{e}^-$) (67). Está constituido por los grupos hemo A y B, por ello se conoce como oxidasa terminal *ba* (65,71). En *A. vinelandii* se ha demostrado que la citocromo oxidasa *bd* es la responsable de la protección respiratoria (81). La oxidasa *bd* de *A. vinelandii* se expresa bajo condiciones de alta aereación, funciona como oxidasa terminal de baja afinidad por oxígeno ($K_m = 4.5 \mu\text{M}$) (17). Una diferencia importante de la oxidasa terminal *bd* de *A. vinelandii* respecto de *A. diazotrophicus*, es que sólo es regulada por el oxígeno; la presencia de amonio en exceso no cambia la expresión de la oxidasa terminal *bd* en *A. vinelandii* (19). En nuestro estudio, la citocromo oxidasa *bd* de *A. diazotrophicus* no parece estar implicada en la protección respiratoria, ya que se expresa cuando hay exceso de amonio en el medio y por lo tanto, la bacteria crece sin fijar nitrógeno. En otras bacterias, como *E. coli* y *K. pneumoniae* la oxidasa *bd* se expresa bajo condiciones de crecimiento microaerofílicas (18,50,55,90). En estas condiciones los valores de K_m por oxígeno en *E. coli* (5 a 8 nM) y *K. pneumoniae* (20 nM) son considerablemente más bajas que el valor de K_m reportado en *A. vinelandii* (17,19,50). En *A. diazotrophicus* la pobre utilización del TMPD y la oxidación de la tetrahidroquinona (THQ), sustratos artificiales de electrones, indicaron que las oxidasas terminales son quinol oxidasas (89).

Los ensayos de inhibición con KCN, realizados en las membranas de las células de *A. diazotrophicus* que fijan nitrógeno, indicaron la presencia de dos oxidasas terminales.

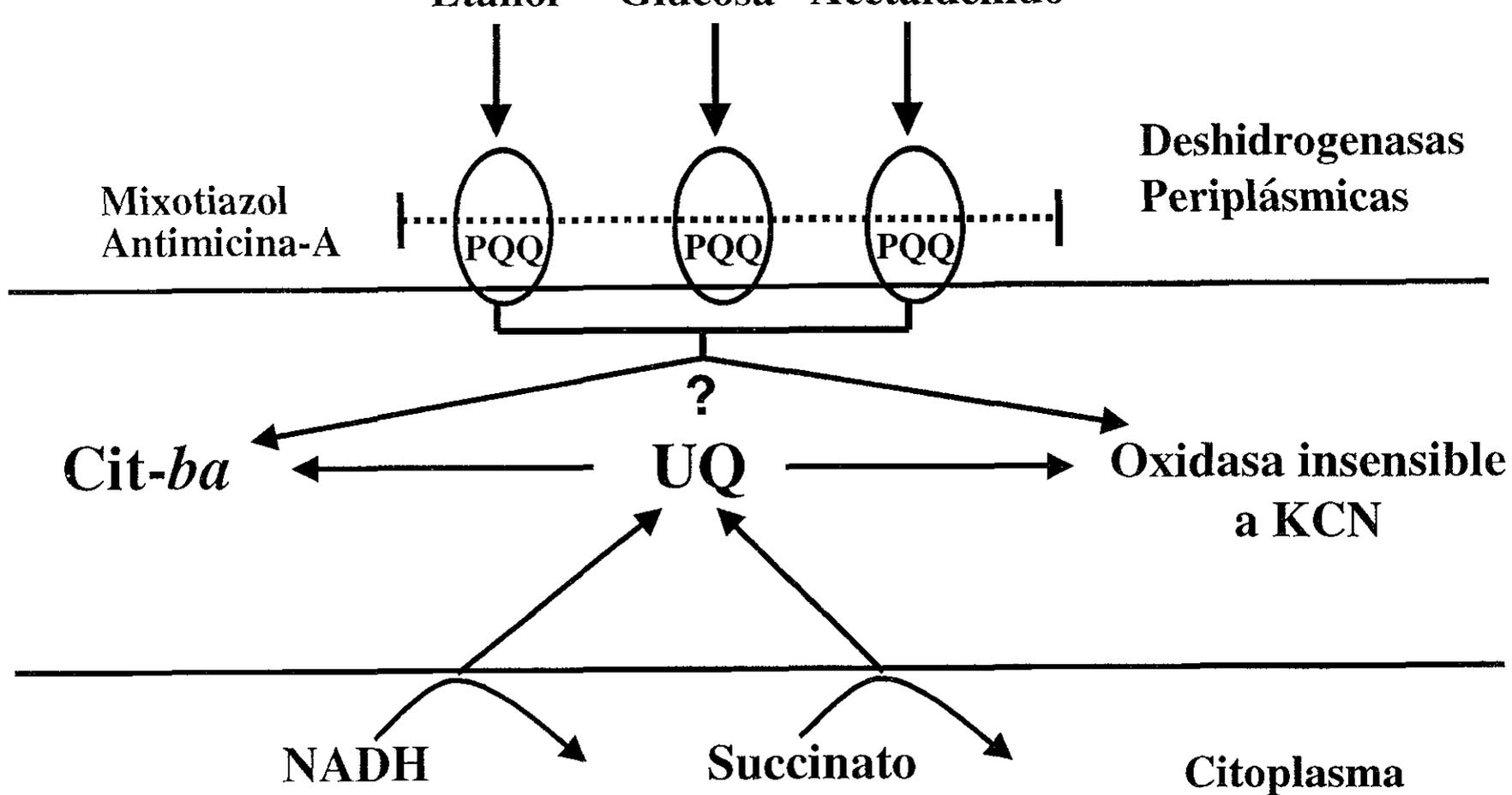


Esquema 4. Modelo propuesto para el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. El modelo se compone de varias deshidrogenasas unidas a la membrana citoplásmica, de la ubiquinona (UQ) y de las oxidasas terminales *ba* (Cit-*ba*) y *bd* (Cit-*bd*). Cuando *A. diazotrophicus* es crecido en 1 mM de (NH₄)₂SO₄ (crecimiento limitado de amonio) la oxidasa terminal predominante es el Cit-*ba*, mientras que cuando *A. diazotrophicus* crece en 40 mM de (NH₄)₂SO₄ (crecimiento con exceso de amonio) la oxidasa terminal que predomina es el Cit-*bd*.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

una altamente sensible a cianuro y la otra resistente. El componente sensible fue relacionado con la oxidasa terminal *ba* y se determinó su valor de K_m por oxígeno (4 a 7 μM) (datos no mostrados). El valor de K_i con cianuro de la oxidasa terminal *ba* se ha reportado en 74 μM (71). Desconocemos la identidad de la oxidasa terminal insensible a cianuro, sin embargo la eliminación de los citocromos *c* de las membranas con Tritón X-100 a bajas concentraciones, favoreció la pérdida de la resistencia al cianuro. No se trata del citocromo *bd*, el cual es típicamente resistente al cianuro (49). La oxidasa alternativa de *A. diazotrophicus* muestra resistencia a cianuro y presenta baja afinidad por oxígeno ($K_m = 130 \mu\text{M}$) (datos no mostrados). Esta oxidasa contribuye con el 50 % de la respiración en las células que crecen fijando nitrógeno y dadas sus características cinéticas debe participar activamente en el mecanismo de protección respiratoria.

Los datos recientes del laboratorio han indicado que el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* se encuentra dividido en dos grandes vías para el flujo de electrones a las oxidasas terminales (citocromo a_1 y la oxidasa insensible a cianuro) (**Esquema 5**). La primera vía incluye al grupo de las deshidrogenasas internas cuyo aceptor de electrones es la ubiquinona; estas deshidrogenasas son dependientes de la ubiquinona y la inactivación de la misma disminuye considerablemente las actividades de las oxidasas. En este grupo están contenidas la NADH-DH y la S-DH, cuya orientación es hacia el citoplasma. Esto está de acuerdo a los datos reportados en la literatura (59). La segunda vía incluye a las deshidrogenasas de orientación periplásmica (G-DH, A-DH y AL-DH), las cuales son muy activas y oxidan a la glucosa, al etanol y al acetaldehído; estas deshidrogenasas no utilizan a la ubiquinona como aceptor obligado de electrones. Lo anterior se encuentra en contraposición a lo reportado por varios autores. Por ejemplo, en *Gluconobacter suboxydans* y en *E. coli* se ha determinado que la G-DH dona electrones directamente a la ubiquinona Q_{10} y ubiquinona Q_8 , respectivamente. La A-DH de *G. suboxydans*, así como la A-DH y G-DH de *A. acetii* reaccionan directamente con la ubiquinona en una bicapa fosfolipídica (55,70). En *Acinetobacter calcoaceticus* se reportó que la G-DH está ligada a la cadena respiratoria vía de la ubiquinona (70). Otros autores han determinado que la G-DH de esa misma bacteria utiliza un citocromo *b-562* como aceptor de electrones (21). Desconocemos si la G-DH, la A-DH y la AL-DH de *A. diazotrophicus* requieran de algún intermediario (en lugar de la ubiquinona) para llevar los electrones a las oxidasas



Esquema 5. Nueva propuesta del modelo del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* crecido aeróbicamente bajo condiciones limitantes de amonio. El sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* posee una vía dependiente de la ubiquinona (UQ); participan en ella la NADH-DH y la S-DH. Esta vía está acoplada a la cadena respiratoria. La segunda vía no utiliza a la ubiquinona como receptor de electrones; se trata de una vía no acoplada a la cadena respiratoria. Participan en ella, la G-DH, A-DH y AL-DH. Las dos vías donan electrones a la oxidasa terminal *ba* (Cit-*ba*) y la oxidasa alternativa insensible a cianuro. Se desconoce si las deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído utilizan algún intermediario (?) para el transporte de electrones a las oxidasas terminales.

terminales.

En *A. vinelandii* se ha propuesto que un incremento en la respiración se acompaña de un desacoplamiento en el transporte de electrones (60,81). Este desacoplamiento de la respiración celular es posible gracias a que el sistema respiratorio de las azotobacterias está ramificado y cuenta con dos citocromo oxidasas: una de tipo *bo* y otra de tipo *bd* (17). Se cree que esta última presenta dicho desacoplamiento. La oxidasa *bd* parece sostener el mayor flujo de electrones en el organismo y se ha propuesto que es la responsable de la protección respiratoria de la nitrogenasa. El estudio con mutantes de *A. vinelandii* ha revelado que la citocromo oxidasa de *bd* juega un papel primordial en la eliminación de oxígeno cuando la bacteria crece en condiciones de alta aereación (60).

Como ocurre en *A. vinelandii*, una parte del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* debe proceder por una ruta no acoplada. Hemos determinado que los procesos de oxidación realizados por las deshidrogenasas periplásmicas no están acoplados a la cadena respiratoria; esta vía convierte al sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* en un poderoso tiradero de poder reductor. De acuerdo con la hipótesis de la protección respiratoria, el oxígeno se consume en las proximidades de la superficie celular y para ello, las deshidrogenasas periplásmicas muy activas se convierten en poderosos donadores de electrones, mientras que las oxidasas terminales (en especial la de baja afinidad) abaten la tensión de oxígeno del medio (**Fig. 15**). De esta forma se previene que el oxígeno penetre en la célula causando daño a la nitrogenasa (81). El paso limitante en la transferencia de electrones a la oxidasa terminal, sólo está determinado por la disponibilidad del sustrato.

La localización de las deshidrogenasas periplásmicas también favorece la protección respiratoria debido a que la oxidación de sustratos (por ejemplo, glucosa) ocurre en el exterior de la bacteria. Eso implica un ahorro energético puesto que los sustratos no tienen que ser transportados al interior para su metabolismo, como ocurre en otras bacterias. Además, los productos de oxidación se acumulan en el exterior de la bacteria, lo cual no afecta al gradiente electroquímico de protones.

¿De dónde obtienen las células de *A. diazotrophicus* la energía para sostener la fijación de nitrógeno y el crecimiento? En *A. aceti* se han propuesto tres sitios de translocación de protones: el sitio de la NADH-DH (sitio 1), el sitio de la ubiquinona (sitio

Modelo de la Protección respiratoria en *Acetobacter diazotrophicus*

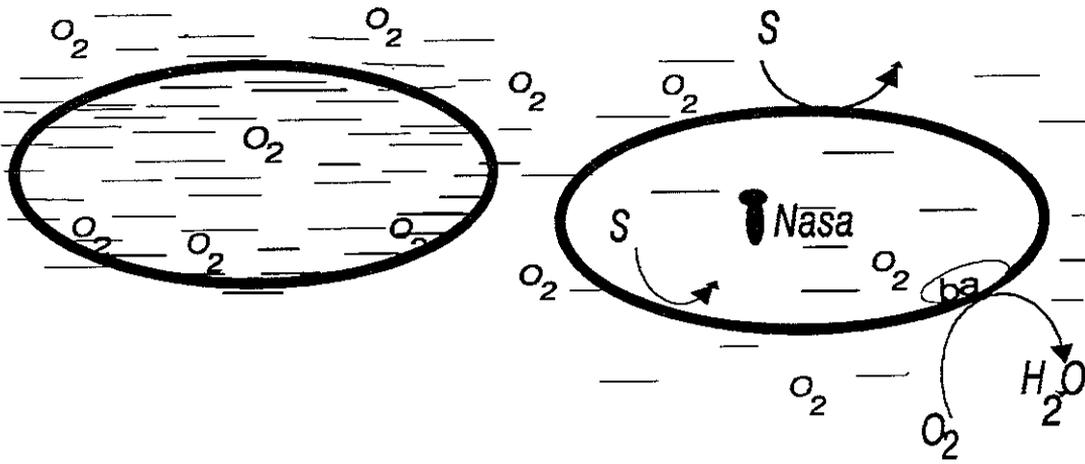


Fig. 15. Modelo propuesto para la protección respiratoria de la nitrogenasa en *A. diazotrophicus*. Izquierda, representación de una bacteria que no cuenta con protección respiratoria; la concentración de oxígeno intra y extracelular se encuentra en equilibrio. Derecha, modelo propuesto de la protección respiratoria en *A. diazotrophicus*. El oxígeno es consumido en las proximidades de la bacteria, gracias a la acción de las oxidasas terminales *ba* y la oxidasa insensible a cianuro (no mostrada en la representación). De esta forma, se mantiene una concentración de oxígeno intracelular compatible con la función de la nitrogenasa. Las deshidrogenasas (de orientación periplásmica y citoplásmica) oxidan sus sustratos (S) en la membrana citoplásmica. Las deshidrogenasas de orientación periplásmica no están acopladas a la cadena respiratoria, por ello hacen del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* un potente consumidor de oxígeno y un poderoso tiradero de poder reductor. Las deshidrogenasas de orientación citoplásmica deben ser las responsables de la conservación de energía. Nasa, nitrogenasa.

II) y el sitio de la oxidasa terminal a_1 (sitio III) (67). Los datos obtenidos en el laboratorio nos han llevado a proponer que *A. diazotrophicus* debe contener los tres sitios de translocación de protones descritos anteriormente en *A. aceti*. De esta forma, los procesos de oxidación del succinato y en especial del NADH por sus correspondientes deshidrogenasas, deben favorecer la formación del gradiente protón-electroquímico a través de la membrana citoplásmica, útil para la síntesis de ATP. Esta vía está acoplada a la cadena respiratoria y participan en ella las deshidrogenasas NADH-DH y S-DH. Esta vía debe ser la responsable del aporte de ATP para el crecimiento celular y al mismo tiempo debe favorecer la síntesis de ATP en cantidades que permitan llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Otra parte del sistema respiratorio de *A. diazotrophicus* procede por una ruta no acoplada. Participan en ella las deshidrogenasas de orientación periplásmica (G-DH, A-DH y AL-DH), las cuales son muy activas y oxidan a la glucosa, etanol y acetaldehído; como ya se mencionó anteriormente estas deshidrogenasas no utilizan a la ubiquinona como aceptor obligado de electrones. En esta vía las deshidrogenasas funcionan como poderosos donadores de electrones, mientras que las oxidasas terminales (en especial la de baja afinidad) abaten la tensión de oxígeno en el medio. Así, el oxígeno se consume en las proximidades de la bacteria y se evita que penetre en la célula causando daño a la nitrogenasa.

Las características anteriores sugieren que la capacidad de aerotolerancia reconocida en *A. diazotrophicus* se atribuye a la presencia de un mecanismo de protección respiratoria, que la bacteria utiliza para proteger a la nitrogenasa. Por lo tanto, *A. diazotrophicus* es capaz de crecer y desarrollarse fijando nitrógeno en presencia de elevadas concentraciones de oxígeno. Las altas tasas de respiración registradas en la membrana citoplásmica, acompañadas de un desacoplamiento de la cadena respiratoria, son las responsables de mantener un ambiente microaerófilico que permita el crecimiento diazotrófico. No descartamos que aunado a la protección respiratoria, *A. diazotrophicus* pueda presentar otros mecanismos de protección para la nitrogenasa, como el mecanismo de protección conformacional reportado en *A. vinelandii* (75). Recientemente se ha descrito que *A. diazotrophicus* crecido en sacarosa produce exopolisacáridos de alto peso molecular (92). Esos exopolisacáridos son del tipo de las levanas y a la enzima que los produce se le ha llamado "levansacarasa" (39). Se ha propuesto que en *A. diazotrophicus* esos

exopolisacáridos deben servir como señales de reconocimiento en la interacción planta-microorganismo (6). También es posible que *A. diazotrophicus* pueda utilizar los polisacáridos extracelulares como mecanismo de defensa formando una cápsula que lo proteja del oxígeno o de otros elementos externos.

Hasta el momento, hemos determinado que *A. diazotrophicus* es capaz de fijar nitrógeno en cultivos aeróbicos y que las altas tasas de respiración, protegen a la nitrogenasa del daño por oxígeno. Pero en la planta, ¿cuál será el impacto de la protección respiratoria presente en *A. diazotrophicus*? Como ya hemos mencionado *A. diazotrophicus* se ha aislado del interior de las raíces y tallos de la caña de azúcar. También se ha aislado de la rizosfera de las plantas de la piña y del café (45,94). En estos sitios, predominan los compuestos de carbono como la sacarosa y la concentración de oxígeno es tan baja, que probablemente *A. diazotrophicus* no requiera de la protección respiratoria para evitar el daño de la nitrogenasa por oxígeno (13). Bajo estas condiciones, el mecanismo de la protección respiratoria pareciera no tener ningún significado fisiológico. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la protección respiratoria pueda favorecer el crecimiento diazotrófico de *A. diazotrophicus* en los tejidos aeróbicos de la planta. Por lo tanto, es de sumo interés poder determinar la actividad diazotrófica de la bacteria en los diferentes tejidos de la planta donde se le ha localizado. Hasta el momento esto se desconoce. Esperamos que con el mejoramiento de las técnicas en los años venideros, lo anterior pueda determinarse.

8. Conclusiones

- La aereación incrementada tuvo un fuerte efecto positivo sobre las propiedades de crecimiento y la actividad diazotrófica de *A. diazotrophicus*. Las actividades más altas de nitrogenasa se registraron en los cultivos más aereados, contrario a lo que ocurre en la mayoría de los organismos que fijan nitrógeno, donde la presencia del oxígeno es altamente tóxica para la nitrogenasa.
- *A. diazotrophicus* requiere de amonio para poder iniciar su crecimiento y fijar nitrógeno; ésto ocurre cuando el oxígeno es llevado a niveles indetectables por el electrodo de oxígeno.
- En nuestro estudio, el aporte de oxígeno al medio de cultivo (transferencia de oxígeno al medio) constituye el paso limitante para el crecimiento dependiente de la fijación de nitrógeno.
- Los espectros diferenciales de baja temperatura (77 K) indicaron la presencia de los citocromos de tipo *b*, *c*, *a*₁ (*ba*) y *bd*. El citocromo *ba* es la oxidasa terminal predominante en las células crecidas bajo limitación de amonio, mientras que el citocromo *bd* lo es en las células crecidas con exceso de amonio.
- Los citocromos *c* mostrados por los espectros diferenciales están asociados directamente con las deshidrogenasas primarias para alcohol (A-DH) y aldehído (AL-DH) en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*. Las bajas actividades de TMPD oxidasa y citocromo *c* reductasa indicaron la ausencia del complejo citocrómico *bc*₁ en el sistema respiratorio de *A. diazotrophicus*.

- Los espectros de fotodisociación y los espectros diferenciales con CO sugirieron la presencia de dos oxidasas terminales, el citocromo *ba* y el citocromo *bd*. Propusimos que estas citocromos son ubiquinol oxidasas. La presencia de la citocromo oxidasa *ba* fue confirmada por su efecto hipercrómico a 589 nm con KCN. El citocromo *ba* (a_1) es raro entre bacterias y éste sería el primer caso en que se reporta como asociado a la fijación biológica de nitrógeno. Parece ser que esta oxidasa terminal, junto con la oxidasa insensible a cianuro, son las responsables de la protección respiratoria en *A. diazotrophicus*.
- Las altas tasas respiratorias encontradas favorecen la idea de que *A. diazotrophicus* debe contar con el mecanismo de protección respiratoria para su nitrogenasa. Las actividades respiratorias son favorecidas por varias deshidrogenasas membranales muy activas; algunas tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico y otras hacia el citoplasma. Ambas donan sus electrones a las oxidasas terminales.
- Las deshidrogenasas de orientación periplásmica G-DH, A-DH y AL-DH, son las enzimas responsables de la oxidación de glucosa, etanol y acetaldehído. Los electrones resultantes fluyen a las oxidasas terminales, que abaten la tensión de oxígeno presente en el medio de cultivo; esto permite mantener un ambiente intracelular bajo en oxígeno compatible con la función de la nitrogenasa. Estos procesos de oxidación no están acoplados a la cadena respiratoria. Por otro lado, las deshidrogenasas de orientación citoplásmica NADH-DH y S-DH, al estar acopladas a la cadena respiratoria, deben contribuir a la formación del gradiente protón-electroquímico y con ello favorecer la síntesis de ATP útil para el crecimiento y la fijación de nitrógeno.

Expectativas

- Definir la capacidad bioenergética de la vía en la que están involucradas las deshidrogenasas periplásmicas (G-DH, A-DH y AL-DH) en células crecidas en condiciones óptimas para la expresión de cada deshidrogenasa. En ellas medir la síntesis de ATP y el potencial de membrana inducido por cada sustrato.
- Identificar en la vía de la glucosa oxidasa, el componente sensible a la inhibición con mixotiazol y Antimicina-A. Dicho componente podría ser el aceptor directo de electrones de las deshidrogenasas de orientación periplásmica y se podría detectar (si es un citocromo) por el efecto del corrimiento al rojo de los inhibidores sobre el patrón de citocromos reducidos.
- Es posible que los citocromos aceptores de electrones estén asociados íntimamente y formen complejos con sus deshidrogenasas, continúen asociados y funcionales después de la solubilización con detergentes y durante su purificación posterior. Por ello, se propone la solubilización con detergentes y su purificación .

9. Referencias.

1. **Ameyama, M., and O. Adachi.** 1982. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 451-457.
2. **Ameyama, M., and O. Adachi.** 1982. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 491-497.
3. **Ameyama, M., Matsushita, K., Shinagawa, E. and O. Adachi.** 1987. Sugar-oxidizing respiratory chain of *Gluconobacter suboxydans*. Evidence for a branched respiratory chain and characterization of respiratory chain-linked cytochromes. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2943-2950.
4. **Anraku, Y., and B. Gennis.** 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 262-266.
5. **Appleby, C. A.** 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Physiol.* **35**: 443-478.
6. **Arrieta, J., Hernández, L., Coego, A., Suárez, V., Balmori, E., Menéndez, C., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R., and G. Selman-Housein.** 1994. Molecular characterization of levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiol.* **142**: 1077-1085.
7. **Attwood, M. M., Johannes, P., van Dijken, P., and J. T. Pronk.** 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioengin.* **72**: 101-105.
8. **Barquera, B., García-Horsmann, A., and J. E. Escamilla.** 1991. An alternative non-cytochrome contain branch in the respiratory systems of free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* **155**: 428-435.

9. **Barquera, B., García-Horsmann, A., and J. E. Escamilla.** 1991. Cytochrome *d* expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* **155**: 114-119.
10. **Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., and V. P. Skulachev, V.P.** 1997. Generation of protonic potential by the *bd*-type quinol oxidase of *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett.* **414**: 369-372.
11. **Burris, R. H., Hartmann, A., Zhang, Y., and H. Fu.** 1991. Control of nitrogenase in *Azospirillum sp.* *Plant Soil.* **137**: 127-134.
12. **Burris, R. H.** 1991. Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* **266**: 9339-9342.
13. **Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* **108**: 23-31.
14. **Chakraborty, A., and K. R. Samaddar.** 1995. Evidence for the occurrence of an alternative nitrogenase system in *Azospirillum brasilense*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **127**: 127-131.
15. **Cohjo, E. H., Reis, V. M., Schenberg, A. C. G., and J. Döbereiner.** 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 341-346.
16. **Dalton, H., and J. R. Postgate.** 1969. Effect of oxygen on grown of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* **54**: 463-473.
17. **D'mello, R., Hill, S., and R. K. Poole.** 1994. Determination of the oxygen affinities of the terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* using the deoxygenation of oxyleghaemoglobin and oxymyoglobin: cytochrome *bd* is a low - affinity oxidase. *Microbiol.* **140**: 1395-1402.

18. D'mello, R., Hill, S., and R. K. Poole. 1996. The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition. *Microbiol.* **142**: 755-763.
19. D'mello, R., Purchase, D., Poole, R. K., and S. Hill. 1997. Expression and content of terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* grown with excess NH_4^+ are modulated by O_2 supply. *Microbiol.* **143**: 231-237.
20. Dokter, P., Frank, J., and J. Duine. 1986. Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem. J.* **239**: 163-167.
21. Dokter, P., van Wielink, J. E., van Kleff, M. A. G., and J. A. Duine. 1988. Cytochrome *b*-562 from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem. J.* **254**: 131-138.
22. Drozd, J., and R. J. Postgate. 1970. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73.
23. Escamilla, J. E., Ramirez, R., Del Arenal, I. P., Zarzoza, G., and V. Linares. 1987. Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: Effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3549-3555.
24. Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G. A., Baca, B. E., and J. E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* **181**: 6987-6995.

25. Fukaya, M., Tayama, K., Tamaki, T., Ebisuya, H., Okumura, H., Kawamura, Y., Horinouchi, S., and T. Beppu. 1993. Characterization of a cytochrome a_1 that functions as a ubiquinol-oxidase in *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **175**: 4307-4314.
26. Galar, M. L., and J. L. Boardi. 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose-dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 713-716.
27. García-Horsman, J. A., Barquera, B., and J. E. Escamilla. 1991. Two different aa_3 -type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* **199**: 761-768.
28. García-Horsman, A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and R. B. Gennis. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* **176**: 5587-5600.
29. Gennis, R. B., and V. Stewart. 1996. Respiration. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. pp. 217-261. Neidhart, F. C., Curtis, R., Ingraham, J., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Revnikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and H. E. Umbarger (ed). 2nd ASM Press, Washington, D.C.
30. Gillis, M., Kebsters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, Stephan, M.P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J., and J. De Ley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 361-364.
31. Goldberg, I., Nadler, V., and A. Hochman. 1987. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. *J. Bacteriol.* **169**: 874-879.
32. Goodhew, C. F., Brown, K. R., and G. W. Pettigrew. 1986. Haem staining in gels, an useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim Biophys. Acta.* **852**: 288-294.

33. **Gordon, J. K., Shah, V. K., and W. J. Brill.** 1981. Feedback inhibition of nitrogenase. *J. Bacteriol.* **148**: 884-888.
34. **Gould, G. W., and A. Hurst.** 1969. Germination. In *The bacterial spore*. Academic Press. London and N.Y. pp. 410-413,
35. **Haddock, B.A., and C. W. Jones.** 1977. Bacterial respiration. *Microbiol. Rev.* **41**: 47-99.
36. **Haaker, H., Szafran, M., Wassink, H., Klerk, H., and M. Appels.** 1996. Respiratory control determinates respiration and nitrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bacterioids. *J. Bacteriol.* **178**: 4555-4562.
37. **Hartmann, A., and R. H. Burris.** 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **169**: 944-948.
38. **Hennecke, H.** 1993. The role of respiration in symbiotic nitrogen fixation. In *New Horizons in Nitrogen Fixation*. pp. 55-64.
39. **Hernández, L., Arrieta, J., Menéndez, C., Vázquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., and R. Chambert.** 1995. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacteria associated with sugar cane. *Biochem. J.* **309**: 113-118.
40. **Hill, S.** 1988. How is nitrogenase relagulted by oxygen?. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**: 111-130.
41. **Hill, S.** 1992. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In *Biological nitrogen fixation*. Edited by Stacey, G., Burris, R. H., y H. J. Evans. New York & London. pp. 86-134.

42. Hurek, T., Reinhold, B., Turner, G. L., and F. J. Bergersen. 1994. Aumented rates of respiration and efficient nitrogen fixation at nanomolar concentrations of dissolved O₂ in hyperinduced *Azoarcus* sp. strain BH72. *J. Bacteriol.* **176**: 4726-4733.
43. Hurek, T., van M. M., Kelenberger, and E. Reinhold-Hurek. 1995. Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp BH72. *Mol. Microbiol.* **18**: 225-236.
44. Ingledew, W. J., and R. K. Poole. 1984. The respiratory chain of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**: 22-71.
45. Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, E., Tapia-Hernández, A., Mascarúa-Esparza, M. A., Martínez-Romero, E., and J. Caballero-Mellado. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3676-3683.
46. Jones, C. W., and R. K. Poole. 1985. The analysis of cytochromes. *Methods Microbiol.* **18**: 285-328.
47. Jones, C. W., and E. R. Redfearn. 1966. Electron transport in *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **113**: 467-481.
48. Jones, C. W., and R. Redfearn. 1967. The cytochrome system of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **143**: 340-353.
49. Jünemann, S. 1997. Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1321**: 107-127.

50. **Juty, N. S., Moshiri, F., Merrick, M., Anthony, C., and S. Hill.** 1997. The *Klebsiella pneumoniae* cytochrome *bd* terminal oxidase complex and its role in microaerobic nitrogen fixation. *Microbiol.* **143**: 2673-2683.
51. **Kavanagh, E. P., Callis, J. B., Edwards, S. E., Poole, R. K., and S. Hill.** 1998. Redox poise and oxygenation of cytochrome *bd* in the diazotroph *Azotobacter vinelandii* assessed *in vivo* using diode-array reflectance spectrophotometry. *Microbiology.* **144**: 2271-2280
52. **Kelly, M. J. S., Poole, R. K., Yates, M. G., and C. Kennedy.** 1990. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bacteriol.* **172**. 6010-6019.
53. **Kennedy, I., and Y. S. Rand-Tchan.** 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. *Plant Soil.* **141**: 93-118.
54. **Kim, J., and D. C. Rees.** 1994. Nitrogenase and nitrogen fixation. *Biochemistry.* **33**: 390-397.
55. **Kita, K., Konoshi, K., and Y. Anraku.** 1984. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome *b₅₅₈-d* complex from cells with limited grow and evidence of branched electron-carrying systems. *J. Biol. Chem.* **259**: 3375-3381.
56. **Klingenberg, M.** 1979. The ferricyanide method for elucidating the sidedness of membrane-bound dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **31**: 229-233.
57. **Klugkist, J., and H. Haaker.** 1984. Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **157**: 148-151.

58. Kolonay, J. F., Farhad, M., Gennis, R., Kaysser, T. M., and R. Maier. 1994. Purification and characterization of the cytochrome *bd* complex from *Azotobacter vinelandii*: Comparison to the complex from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 4177-4181.
59. Lehninger, A. L. *Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. 1998. New York, N.Y., USA.
60. Linkenhäner, K., and J. Oelze. 1995. Cellular ATP levels and nitrogenase switchoff upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **177**: 5289-5293.
61. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
62. Lübenn, M., and K. Morand. 1994. Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. *Archea* have modified hemes A and O. *J. Biol. Chem.* **269**: 21473-21479.
63. Martínez-Drets, G. 1995. Carbon metabolism in diazotrophs associated with non-legumes. International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. 1995
64. Matsushita, K., and M. Ameyama. 1982. D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 149-154.
65. Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M., and O. Adachi. 1992. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a₁* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **174**: 122-129.
66. Matsushita, K., Toyama, H., and O. Adachi. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* **36**: 248-301.

67. **Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., and M. Ameyama.** 1990. Cytochrome *a₁* of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 9863-9867.
68. **Matsushita, K., Takahashi, K., Takahashi, M., Ameyama, M., and O. Adachi.** 1992. Methanol and ethanol-oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. J. Biochem. **111**: 739-747.
69. **Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., and M. Ameyama.** 1987. Purification, characterization and reconstitution of cytochrome *o*-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. Biochem. Biophys. Acta. **894**: 304-312.
70. **Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. and M. Ameyama.** 1989. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. J. Biochem. **105**: 633-637.
71. **Matsushita, K., Ebisuya, H., and O. Adachi.** 1992. Homology in the structure and the prosthetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, Cit-*a₁* y Cit-*o* of *Acetobacter aceti*. J. Biol. Chem. **267**: 27748-24753.
72. **McIntire, W. S.** 1994. Quinoproteins. FASEB J. **8**: 513-521.
73. **Mihara, K., and R. Sato.** 1982. Detergent-solubilized NADH-cytochrome *b₅* reductase. Methods Enzymol. **53**: 102-110.
74. **Miller, R.W., McRae, D. E., Al-Jobore, A. and W. B. Berndt.** 1988. Respiration supported nitrogenase activity of isolated *Rhizobium meliloti* bacterioids. J. Ccl. Biochem. **38**: 35-49.

75. Moshiri, F., Chawla, A., y R. J. Maier. 1991. Cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of the genes encoding the cytochrome *d* oxidase complex from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **173**: 6230-6241.
76. Moshiri, F., Crouse, B. R., Johnson, M. K., and R. J. Maier. 1995. The nitrogenase protective Fe-S protein of *Azotobacter vinelandii*: Overexpression, characterization and crystalization. *Biochem.* **34**: 12973-12982.
77. Ng, T. C. N., Laheri, A. N., and R. J. Maier. 1995. Cloning, sequencing and mutagenesis of the cytochrome *c*₄ gene from *Azotobacter vinelandii*. Characterization of the mutant strain and a proposed new branch in respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1230**: 119 –129.
78. Peschek, G. A. 1980. Restoration of respiratory electron-transport reactions in quinone-depleted particle preparations from *Anacystis nidulans*. *Biochem. J.* **186**: 515-523.
79. Ping, Y., and K. Folkers. 1982. Coenzyme Q and analogs for coenzymic activity. *Methods Enzymol.* **53**: 591-599.
80. Poole, R. K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and funtionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **726**: 205-243.
81. Poole, R. K., and S. Hill. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* - roles of the terminal oxidases. *Biosci. Rep.* **17**: 303-317.
82. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and M. Wikström. 1991. Properties of the terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochem.* **30**: 3936-3942.

83. **Reis, V. W., Olivares, F. L., and J. Döbereiner.** 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Microbiol. Biotech.* **10**: 401-405.
84. **Reis, V. A., and J. Döbereiner.** 1998. Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* **171**: 13-18.
85. **Reinhold, B. H., and Y. B. Zhulin.** 1997. Terminal oxidases of *Azoarcus* sp. BH72, a strictly respiratory diazotroph. *FEBS Lett.* **404**: 143-147.
86. **Robson, R. L.** 1979. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolation from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.* **181**: 569-575.
87. **Robson, R. L., and J. R. Postgate.** 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 183-207.
88. **Sherings, G., Haaker, H., Wassink, H., and C. Veerger.** 1983. On the formation of an oxygen-tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* **135**: 591-599.
89. **Slate, E. C., van Geler, B. F., and K. Minnaert.** 1965. Cytochrome *c* oxidase. In TE King, Mason H. S., and Morrison, M. (ed). *Oxidases and related redox system*. John Wiley & Son, New York. pp 667-706.
90. **Smith, A., Hill, S., and C. Anthony.** 1990. The purification, characterization and role of the *d*-type cytochrome oxidase of *Klebsiella pneumoniae* during nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 171-180.
91. **Singer, T.P.** 1979. Mitochondrial electron-transport inhibitors. *Methods Enzymol.* **55**: 454-465.

92. **Stephan, M. P., Fontaine, T., Previato, J. O., and L. Mendonca-Previato.** 1995. Differentiation of capsular polysaccharide from *Acetobacter diazotrophicus* strains isolated from sugarcane. *Microbiol. Immunol.* **39**: 237-242.
93. **Stephan, M. P., Oliveira, M., Martínez-Drets, G., and J. Döbereiner.** 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 67-72.
94. **Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J. and L. E. Fuentes-Ramírez.** 2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple. *Microbiol. Ecol.* **39**: 49-55.
95. **Thomas, P. E., Ryan, D., and D. Levin.** 1976. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P*-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **75**: 168-176.
96. **Thöny-Meyer, L.** 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 337-376.
97. **Trumpower, B. L.** 1990. Cytochrome *bc*₁ complex of microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**: 101-129.
98. **van Kammen, A.** 1995. The molecular development of nitrogen fixing root nodules. In *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. A. Tickhonovich and others (eds). Kluwar Academic Publishers. pp. 9-14.
99. **von Jagow, B., and T. A. Link.** 1986. Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc*₁ complex. *Methods Enzymol.* **126**: 253-271.

100. **Wilson, D. F., and M. Erecinska.** 1985. Ligands of Cytochrome *c* oxidase. *Methods Enzymol.* **53**: 191-202.
101. **Yamada, Y., and K. Kondo.** 1984. *Gluconacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidising acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**: 297-303.
102. **Yates, M. G., and C. W. Jones.** 1974. Respiration and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Adv. Microbiol. Physiol.* **11**: 97-135.
103. **Yates, M. G.** 1988. The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation. In *Nitrogen and Sulphur Cycles*. Edited by Cole, J. A. and Ferguson, S. Cambridge University Press. pp. 383-416.
104. **Zhulin, B. H., Bepalov, V. A., Johnson, M., and B. Taylor.** 1996. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **178**: 5199-5204.

The Respiratory System and Diazotrophic Activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5

M. FLORES-ENCARNACIÓN,¹ M. CONTRERAS-ZENTELLA,¹ L. SOTO-URZUA,²
G. R. AGUILAR,¹ B. E. BACA,² AND J. E. ESCAMILLA^{1*}

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, México D.F.,¹
and Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, C.P. 72000, Puebla Pue.,² México*

Received 15 March 1999/Accepted 26 August 1999

The characteristics of the respiratory system of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5 were investigated. Increasing aeration (from 0.5 to 4.0 liters of air min⁻¹ liter of medium⁻¹) had a strong positive effect on growth and on the diazotrophic activity of cultures. Cells obtained from well-aerated and diazotrophically active cultures possessed a highly active, membrane-bound electron transport system with dehydrogenases for NADH, glucose, and acetaldehyde as the main electron donors. Ethanol, succinate, and gluconate were also oxidized but to only a minor extent. Terminal cytochrome *c* oxidase-type activity was poor as measured by reduced *N,N,N,N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, but quinol oxidase-type activity, as measured by 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzenediol, was high. Spectral and high-pressure liquid chromatography analysis of membranes revealed the presence of cytochrome *ba* as a putative oxidase in cells obtained from diazotrophically active cultures. Cells were also rich in *c*-type cytochromes; four bands of high molecular mass (i.e., 67, 56, 52, and 45 kDa) were revealed by a peroxidase activity stain in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. KCN inhibition curves of respiratory oxidase activities were biphasic, with a highly resistant component. Treatment of membranes with 0.2% Triton X-100 solubilized *c*-type cytochromes and resulted in a preparation that was significantly more sensitive to cyanide. Repression of diazotrophic activity in well-aerated cultures by 40 mM (NH₄)₂SO₄ caused a significant decrease of the respiratory activities. It is noteworthy that the levels of glucose dehydrogenase and putative oxidase *ba* decreased 6.8- and 10-fold, respectively. In these cells, a *bd*-type cytochrome seems to be the major terminal oxidase. Thus, it would seem that glucose dehydrogenase and cytochrome *ba* are key components of the respiratory system of *A. diazotrophicus* during aerobic diazotrophy.

Acetobacter diazotrophicus is an obligatory aerobe that fixes nitrogen (1, 5, 7, 16, 39). All nitrogen-fixing bacteria have the ability to utilize atmospheric nitrogen gas as their source of nitrogen for metabolic biosynthesis (5). Otherwise, they represent species from rather different taxonomic groups with different life-styles. These microorganisms must use some mechanism to protect the nitrogenase components from oxygen. In fact, all the nitrogenases from anaerobic, facultatively anaerobic, strictly aerobic, symbiotically associated, or even photosynthetic bacteria (22) that have been purified are irreversibly inactivated by oxygen. More than 25 years ago, Drozd and Bergstrom postulated the existence of a mechanism for the protection of nitrogenase from oxygen inactivation in nitrogen-fixing cells of *Azotobacter vinelandii* (11). "Respiratory protection" was suggested as a mechanism whereby the extremely high respiratory rates of the cells maintain an intracellular oxygen concentration at levels low enough to not affect the nitrogenase components.

Among the nitrogen-fixing bacteria, *A. diazotrophicus* is interesting because it carries out nitrogen fixation under aerobic growth conditions. It appears to be a plant endophyte (10) that is capable of excreting almost half of the fixed nitrogen in a form that is potentially available to plants (8). However, its respiratory system and mechanism of protection of nitrogenase under aerobic conditions have not been explored. Hence, the aim of this work is to gain insight into the components of its

respiratory system and its relationship to nitrogen fixation metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Strain, growth conditions, preparation of membranes, and culture methods. *A. diazotrophicus* PAL5 ATCC49037, kindly provided by G. Martínez-Drets (1), was grown under conditions described by Reis et al. (37) with LGIP medium supplemented with 1.0 or 40 mM (NH₄)₂SO₄. Preparative cultures were grown aerobically at 30°C in a 20-liter-working-volume fermentor stirred at 250 rpm and sparged with 32 liters of air min⁻¹ to give an O₂ transfer coefficient (*K_a*) value of 160 (see below).

Active inocula (10 liter) were obtained after 24 h of growth in 28-liter Ferrebach flasks stirred at 250 rpm. Cells were harvested at the end of the exponential growth phase (36 h) and washed twice with cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 5 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂ (TCM buffer). The cell suspension was supplemented with phenylmethylsulfonyl fluoride (15 μg ml⁻¹) and disrupted in a Dyno-mill (WAB Maschinen-Fabrik, Basel, Switzerland) as previously described (13). Unbroken cells and debris were eliminated by centrifugation at 8,000 × *g* for 10 min. Membranes were prepared by centrifugation at 144,000 × *g* for 30 min and thereafter washed twice with TCM buffer. The membranes were used immediately for assay of enzymatic activities or stored in liquid nitrogen.

Analytical cultures were performed in an Applikon laboratory minifermentor with a working volume of 1.0 liters at 30°C and stirred at 320 rpm. Aeration was varied from 0.5 to 4.0 liters of air min⁻¹. At selected times, samples were withdrawn to determine growth (measured as optical density at 560 nm [OD₅₆₀]) and medium pH. Ammonium concentration and the amount of O₂ dissolved in culture medium were measured amperometrically by using an Orion 95-12 ammonia electrode and a Clark-type oxygen electrode. In these samples, metabolism was instantaneously arrested by adding HgCl₂ to a final concentration of 1.0 mM.

The culture O₂ demand was measured in a model 53YS1 oxygen meter by using a 10-fold dilution of culture samples in fresh media. Nitrogenase activity in whole cells was determined by the acetylene reduction assay (37, 39). Samples (2 ml) removed from the fermentor were placed into 10-ml sealed vials and acetylene was injected to give a 15% concentration in the gas phase. The vials were incubated with stirring at 250 rpm for 30 min at 30°C. The ethylene produced was determined in 10-μl aliquots on a Poropak Q column by using a Variant 3100 gas chromatography system fitted with a flame ionization detector.

*Corresponding author. Mailing address: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 242, C.P. 04510, México D.F., México. Phone: (525) 622-5627. Fax: (525) 622-5630. E-mail: escamilla@fisiologia.unam.mx

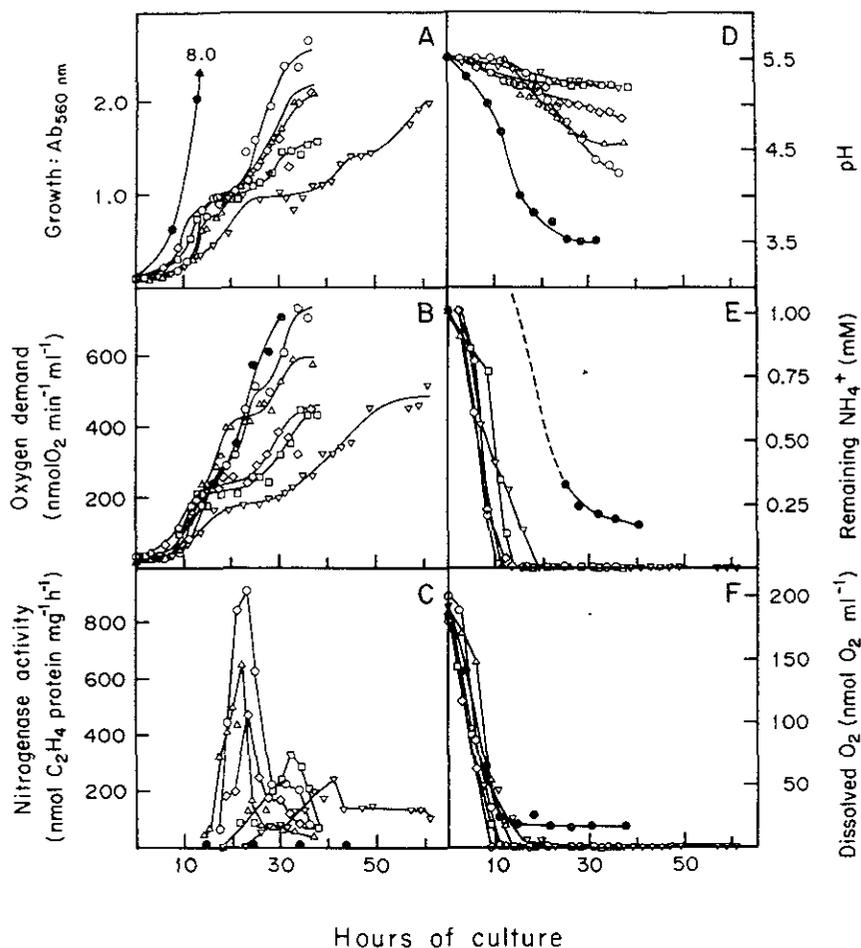


FIG. 1. Growth properties and diazotrophic activity of *A. diazotrophicus* on LGIP medium with increased aeration (liters of air min^{-1} liters of medium $^{-1}$): ▽, 0.5; △, 1.0; ◇, 1.5; △, 2.5; ○, 4.0. The medium contained 1.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the nitrogen starting dose; cultures were performed at 30°C in a fermentor with a working volume of 1.0 liter, agitated to 320 rpm. Cultures were initiated with 20 ml of inoculum from a 24-h shaker culture (200 rpm). At the times noted, samples were withdrawn to determine culture growth at 560 nm (A), culture oxygen demand (B), nitrogenase activity as measured by the acetylene reduction assay (C), medium pH (D), concentration of ammonium in the medium (E), and dissolved-oxygen concentration in the medium (F). For comparison, growth profiles obtained in LPGIP medium containing 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and with an air flow of 4.0 liters of air min^{-1} are displayed (●) in each of the sets. Details of culture and assay methods are described in Materials and Methods.

The oxygen transfer coefficient, $K_L a$, was estimated for the 1.0-liter fermentor system by the static method of gassing out as described by Stanbury and Whitaker (38). That is, the oxygen concentration of a fresh culture medium (agitated at 320 rpm) was lowered by gassing the liquid with nitrogen gas, the deoxygenated medium was then aerated and the increase in dissolved-oxygen concentration was monitored continuously with a fermentor-installed Clark oxygen electrode. $K_L a$ values under different aeration conditions (0.5 to 4.0 liters of air min^{-1}) were calculated as described by the same authors (38).

Spectral analysis of cytochromes. Membranes were suspended in TCM buffer containing 50% (vol/vol) glycerol and analyzed in an SLM-Aminco DW 2000 spectrophotometer. Difference spectra at 77 K (liquid nitrogen) were recorded in cuvettes with a 2-mm light path. Samples were reduced with a few grains of sodium dithionite in the absence or presence of 1.0 mM KCN, the reference samples were oxidized with a few grains of ammonium persulfate. Reduced-minus-CO minus reduced difference spectra were also recorded at 77 K. The concentrations of cytochromes in membranes and derived preparations were calculated from the difference spectra (dithionite-reduced minus persulfate-oxidized or dithionite-reduced plus CO minus dithionite-reduced) at room temperature by using the following wavelength pairs and absorption coefficients: cytochrome *c*, extinction coefficient at 550 to 540 nm ($E_{550,540}$) 19.1 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, cytochrome *b*, $E_{425,415}$ 27 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, cytochrome *a*-CO, $E_{433,430}$ 10 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, cytochrome *d*-CO $E_{455,445}$ 18 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (13, 20, 28, 29).

Extraction and analysis of hemes and cytochromes *c*. Hemes were extracted with 0.01 N HCl in acetone as described by Goodhew et al. (17). The membrane residues obtained were used to determine cytochrome *c* without the spectral interference of *b* type cytochromes.

Cytochromes *c* were solubilized by resuspending membrane pellets (10 mg of

protein) with 1.0 ml of 0.2% Triton X-100 in 50 mM potassium phosphate (pH 6.0). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed in 16- by 14-cm plates with 10% polyacrylamide and a 5% stacking gel by the method of Goodhew et al. (17). Cytochrome *c* bands were revealed by detection of the peroxidase activity. Protein blotting and heme peroxidase detection were performed with the Amersham enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagents, as reported by Miranda-Ríos et al. (33). SDS treatment removes noncovalently bound hemes, therefore, a peroxidase stain on SDS-gels specifically reveals *c*-type cytochromes.

Heme composition was determined on a Waters chromatography system equipped with a Waters model 996 photodiode array detector and Waters Delta-Pak HPLC18 300 Å (2 by 150 mm) reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) column. The data was analyzed with Millennium 2000 software. Hemes extracted and purified from membranes (40 mg of protein) as described by Paustinen and Wikström (36) were dissolved in 0.5% trifluoroacetic acid-acetonitrile solution and applied to a column previously equilibrated with 0.5% trifluoroacetic acid-25% acetonitrile in water. The hemes were eluted by an acetonitrile gradient as described previously (25). The following standards were used: hemes B and O extracted from membranes of *Escherichia coli*, hemes B and A extracted from bovine mitochondria particles, and protoheme IX obtained from Sigma.

Respiratory activities. Oxidase activities were determined with either of the following substrates (final concentrations are given): 3 mM NADH, 10 mM glucose, 50 mM succinate, 10 mM gluconate, 10 mM ethanol, 10 mM acetaldehyde, 10 mM ascorbate plus 2 mM TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine), or 10 mM ascorbate plus 1.5 mM T110 (2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzenediol). The reactions were initiated with 0.1 mg of membrane protein and

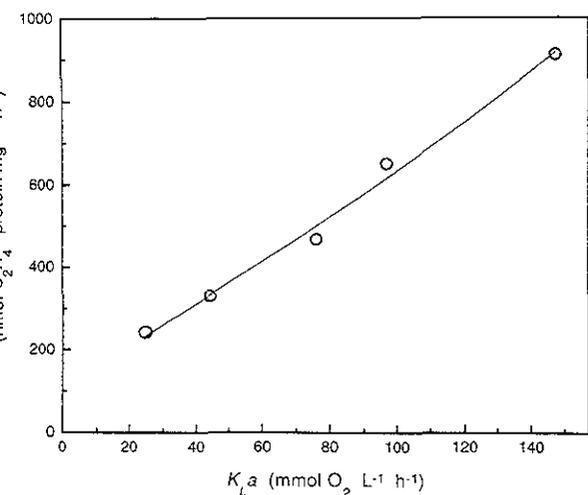


Fig. 2. Nitrogenase activities of *A. diazotrophicus* in a fermentor (1.0-liter working volume) at increased values of oxygen transfer coefficient ($K_L a$). Values $K_L a$ (see Materials and Methods) were determined under each of the aeration conditions shown in Fig. 1 and plotted against the recorded maximal values of nitrogenase activity (as shown in Fig. 1C).

measured polarographically with a Clark oxygen electrode in 2 ml of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4 or 6.0) at 30°C. Nitrogenase activities were measured spectrophotometrically with potassium ferricyanide as the electron acceptor. The assay mixture contained 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4 or 6.0), 1.0 mM test substrate, 1 mM potassium ferricyanide, and 0.03 mg of membrane protein. The reaction was initiated by the addition of substrate, and the reduction of ferricyanide was monitored by measuring the OD₆₆₀ (2, 3). One unit of activity is defined as that which reduces 1 µmol of ferricyanide per min under these conditions. The substrate was dissolved in dimethyl sulfoxide. The solvent alone had no significant effect on the respiratory activities tested. Protein concentrations were determined by a modification (12) of the Lowry method.

RESULTS

A. diazotrophicus has been recognized as an aerotolerant diazotroph (39) in which oxygen is instrumental for the generation of the large quantities of ATP required for nitrogen fixation. Hence, experiments were performed to explore the effect of increasing aeration on the growth properties and nitrogen fixation activity of *A. diazotrophicus* in batch culture at 30°C (Fig. 1).

In confirmation of the results of Stephan et al. (39), *A. diazotrophicus* did not grow in N-free LGIP medium at aeration rates of 0.5 to 4.0 liters air min⁻¹ in a 1.0-liter-working-volume fermentor agitated at 320 rpm (data not shown). Therefore, the medium was supplemented with 1.0 mM (NH₄)₂SO₄ as the nitrogen starting dose. Under these conditions, high aeration (as above) had a strong positive effect on the growth properties of *A. diazotrophicus*: growth was faster and higher cell densities were obtained (Fig. 1A). Under each of the aeration conditions tested, the curves for growth (Fig. 1A) and oxygen demand (Fig. 1B) of the culture ran in parallel and showed biphasic kinetics. The first phase of growth seems to depend on the initial dose of NH₄⁺, as suggested by the concomitant removal of this ion from the medium (Fig. 1E). After a few hours of adaptation, growth was resumed; this stage was accompanied by an expression of nitrogenase activity (Fig. 1C). The highest specific activity of nitrogenase was registered in the best-aerated (i.e., 4.0 liters of air min⁻¹) and fastest-growing culture. Therefore, this suggested that the second phase of growth depends on the diazotrophic activity of cultures. Nitrogenase activity and glucose utilization by *A. diazotrophicus* leads to the acidifi-

cation of media due to the accumulation of gluconic acids (5, 9, 39). Accordingly, increasing the aeration of cultures accelerated and increased the acidification of media during the second phase of growth (Fig. 1D), suggesting that during this time an intense oxidation of glucose to gluconic acid by glucose dehydrogenase provided appropriate metabolic conditions to generate enough ATP for growth and continuously remove O₂ from the medium (Fig. 1F) so as to protect the diazotrophic activity.

We found that at all levels of aeration, nitrogenase activity appeared after the initial dose of ammonium had been exhausted (Fig. 1E) and the dissolved O₂ concentration had dropped to nondetectable concentrations (Fig. 1F).

For a comparison, growth profiles obtained in LGIP medium containing 40 mM (NH₄)₂SO₄ with aeration of 4 liters of air min⁻¹ are displayed in each of the panels of Fig. 1. Ammonium had a large impact on the growth properties of *A. diazotrophicus*: fast growth producing high optical densities (i.e., OD₅₆₀ = 8.0 after 34 h) was observed. Rapid growth was accompanied by a fast and deep acidification of the medium (final pH = 3.5) and a quantitative removal of NH₄⁺ from the medium. The profile for oxygen demand did not reach the levels expected for such high cell densities achieved by growth. Dissolved O₂ in the medium decreased to a constant low level (i.e., 20 nmol ml⁻¹) after 10 h of growth. As expected, nitrogenase activity was not detected at any time during culture.

To gain further insight into the impact of increasing aeration on the expression levels of nitrogenase activity, oxygen transfer coefficients (i.e., $K_L a$) were estimated at the aeration levels used in the experiment in Fig. 1. A plot of $K_L a$ values against the top registered values of nitrogenase activity (Fig. 2) showed that the specific activity of nitrogenase increased linearly within the $K_L a$ range tested (i.e., 25 to 145 mmol of O₂ liter⁻¹ h⁻¹). This implies that the O₂ supply to the medium was the rate-limiting step for N₂-dependent growth.

Cytochromes. The respiratory system of *A. diazotrophicus* was characterized in membranes obtained from cells grown aerobically in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (NH₄)₂SO₄ and was compared to that of cells grown under same conditions with 40 mM (NH₄)₂SO₄. The spectroscopic analysis of the cytochrome composition of the two membrane preparations showed significant differences (Fig. 3). Reduced-minus-oxidized spectra (77 K) of cells grown on low ammonium (Fig. 3A) showed *b*-type cytochromes (peaks at 430, 530, and 560 nm). *c*-type and *a*-type cytochromes were respectively suggested by shoulders at 520 and 550 nm and by a shoulder at 440 nm plus a weak signal around 600 nm. Difference spectra (77 K) produced by carbon monoxide (Fig. 3B) and cyanide (Fig. 3C) of the reduced preparation revealed the presence of an *a*-type cytochrome: however, the reduced cytochrome-CO compound produced signals at 422 and 440 nm, i.e., a shift of a few nanometers toward the violet, relative to the typical *aa*₃-CO complex (29). On the other hand, the reaction of CN⁻ with the reduced preparation was accompanied by a large enhancement of the signal at 589 nm. This hyperchromic effect of cyanide on the reduced spectrum has been considered a reliable criterion for the identification of cytochrome *ba* oxidase (29). It is relevant that cytochrome *ba* oxidase (also named cytochrome *a*₁) has been identified in *Acetobacter aceti* (28, 29).

The cytochrome analysis of cells grown on high ammonium (i.e., 40 mM) showed a different picture. In the reduced-minus-oxidized spectra (Fig. 3D), maxima at 426, 528, and 558 nm indicated *b*-type cytochromes; signals for *c*-type cytochromes at 418, 520, and 550 nm were hardly discernible. However, the most dramatic changes were those related to putative oxidases. Signals for reduced cytochrome *ba* at 440 and 589 nm were

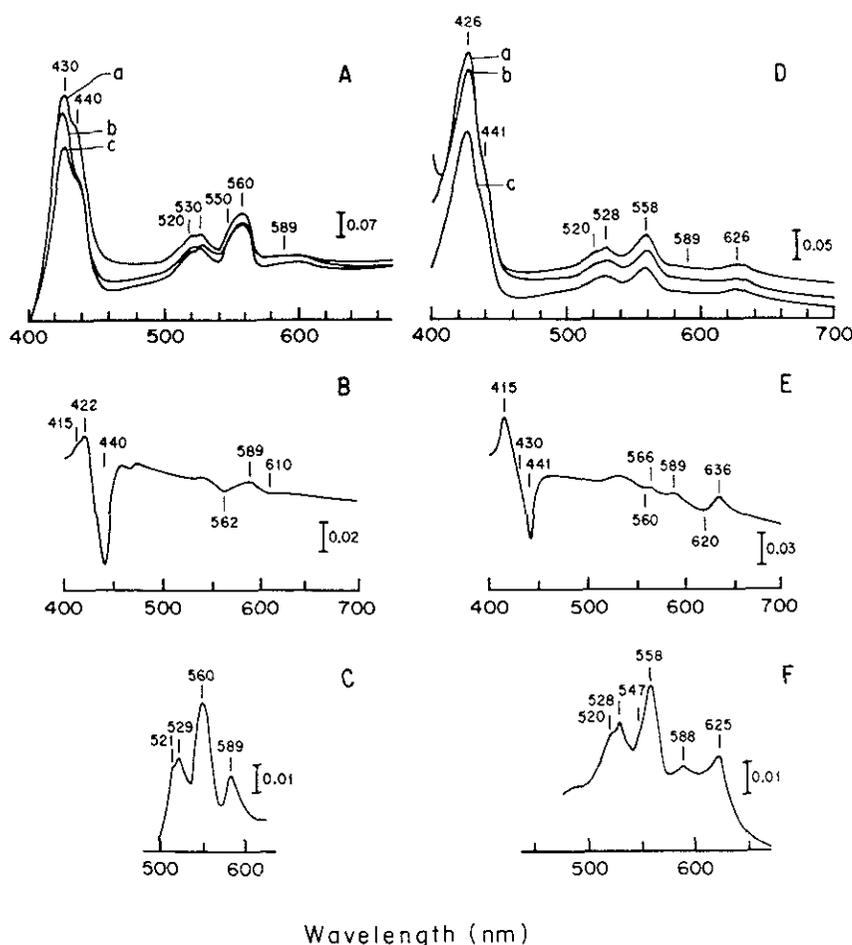


FIG. 3. Low-temperature (77 K) spectra of membranes of *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (A to C) or 40 mM (D to E) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (A and D) reduced-minus-oxidized spectra. Difference spectra were generated by adding sodium dithionite (spectra a), NADH (spectra b), and glucose (spectra c) to sample cuvettes and ammonium persulfate to reference cuvettes. (B and E) Reduced plus CO minus reduced difference spectra. Membranes from both cuvettes were reduced by dithionite and CO gas bubbled through sample cuvettes (C and F) Reduced plus 1.0 mM KCN minus oxidized spectra. Sample cuvettes were reduced with dithionite in the presence of 1.0 mM KCN. Reference cuvettes were oxidized with ammonium persulfate. All samples contained 2.5 mg of membrane protein ml^{-1} . Cells were collected at early stationary phase once they reached $\text{OD}_{600} = 2.5$ (low NH_4^+) and 6 to 8 (high NH_4^+).

significantly low, but a peak at 626 nm (Fig. 3D) was clearly apparent, suggesting the presence of a cytochrome *bd*. That conclusion was reinforced by the CO difference spectrum (Fig. 3E); it showed a weak signal at 589 nm for the cytochrome *c*-CO compound and conspicuous signals at 620 (through) and 636 nm (peak); these data would be consistent with the presence of a cytochrome *d*-CO-type compound.

Taken together, the results indicate that when culture requirements for nitrogen are satisfied by an excess of ammonium, nitrogenase is not expressed, and that cytochrome *bd* seems to replace cytochrome *ba* as the main putative oxidase in *A. diazotrophicus*. Moreover, when a culture grown for 24 h ($K_t a = 150$, $\text{OD}_{560} = 1.2$) in 1.0 mM NH_4^+ was switched to NH_4^+ -dependent growth by increasing the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration to 40 mM (results not shown), there was a change in the composition of terminal oxidases; i.e., cytochrome *bd* was spectroscopically detectable after 2.5 h in high NH_4^+ ($\text{OD}_{560} = 1.5$) and became the dominant oxidase 2.5 h later ($\text{OD}_{560} = 3.2$). On the other hand, the high levels of cytochrome *ba* at the time of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ addition decreased steadily during NH_4^+ -dependent growth. Indeed, 5 h after the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the cytochrome pattern registered in whole cells was very similar to that registered in membranes of cells obtained from

cultures in high ammonium (Fig. 2E to F). On the other hand, it is noted that cytochrome *bd* was at no time detected in cells removed from a control culture grown for 72 h in 1.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium (results not shown). These results contrast with previous reports of experiments with *Azotobacter vinelandii* that indicate that a cytochrome *bd* accounts for respiratory protection of nitrogenase (18, 19, 34).

The *c*-type cytochromes were further characterized in cells grown on limited ammonium (Fig. 4A) and on excess ammonium (Fig. 4B). Treatment of membranes with 0.2% Triton X-100 caused selective solubilization of *c*-type cytochromes (spectra c in Fig. 4), while *b*-, *a*-, and *d*-type cytochromes remained attached to membrane residues (spectra b), compared to spectra of whole membranes (spectra a). SDS-PAGE analysis of membranes and 0.2% Triton X-100 fractions showed that cells grown on limited ammonium (Fig. 4A) are rich in *c*-type cytochromes; four bands (67, 56, 52, and 45 kDa [lanes a₁ and a₂]) positive for peroxidase (33) were apparent. The bands of 67, 56, and 45 kDa were released by 0.2% Triton X-100 (lane b), but the 52-kDa band remained membrane bound (lane c). Membranes of cells grown in high ammonium (Fig. 4B) contained decreased levels of *c*-type cytochromes, and only the 45-kDa band was present at significant levels. In

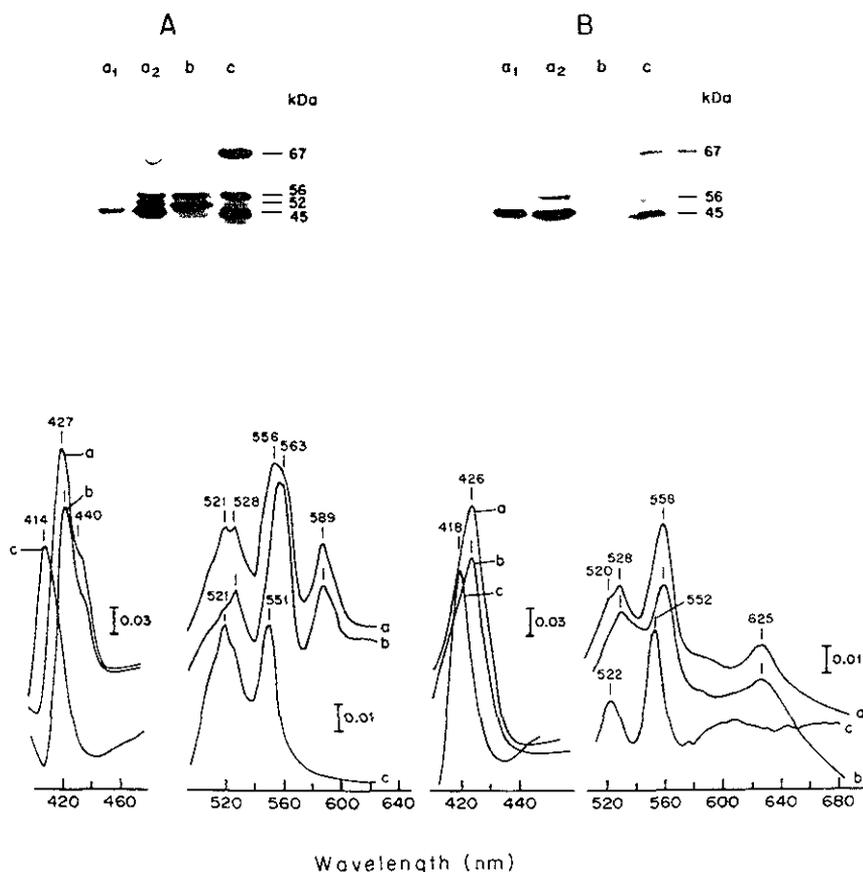


FIG. 4. *c*-type cytochromes associated with membranes of *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (A) or 40 mM (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Membranes (50 mg of protein) were extracted with 5.0 ml of 0.2% Triton X-100 in 50 mM potassium phosphate (pH 6.0) for 2 h at 4°C. Membrane fractions were sedimented at $140,000 \times g$ for 1 h. SDS-PAGE and peroxidase stain of heme C-containing proteins of whole membranes (lanes a_1 and a_2), membrane fractions after 0.2% Triton X-100 treatment (lanes b), and supernatant after 0.2% Triton X-100 treatment (lanes c). Dithionite-reduced minus persulfate-oxidized spectra at 77 K were obtained from the same samples with spectra a to c as above. The protein contents for spectra a, b, and c were 5.0, 4.0, and 1.0 mg ml^{-1} , respectively. Protein contents in SDS-PAGE of samples in panel A were 80, 160, 940, and 1,000 μg for samples a_1 , a_2 , b, and c, respectively; those in panel B were: 500 μg for sample a_1 and 1,000 μg for samples a_2 , b, and c. SDS treatment removes noncovalently bound hemes. Hence, a peroxidase stain on SDS-gels specifically reveals *c*-type cytochromes.

respect, it is noted that alcohol dehydrogenases (28, 31) and aldehyde dehydrogenases (3) of acetic acid bacteria contain subunits bearing cytochrome *c*, with molecular masses ranging from 45 to 82 kDa. In consonance with these observations, our 0.2% Triton X-100 supernatant of cells grown on limited ammonium was rich in dehydrogenase activities for ethanol and acetaldehyde (data not shown) and the membrane residues, depleted of cytochromes *c*, retained full capacity for glucose and NADH oxidation (data not shown).

The concentration of each type of cytochromes was calculated from spectra recorded at room temperature; the results (Table 1) showed that the concentration of *b*-type cytochromes was similar in membranes of both types of cells. On the other hand, in cells grown in low ammonium, the concentration of *b*-type and *a*-type cytochromes was 2- and 10-fold higher, respectively than in cells grown in high ammonium. Cytochrome *c* was detected at high concentrations only in the latter type of cells.

Hemes. Hemes were extracted, purified from membranes, and analyzed by reverse-phase HPLC (Fig. 5); the column was calibrated with hemes A, B, and O. Samples purified from *A. diazotrophicus* grown on limited ammonium (Fig. 5A) showed two main peaks with retention times of 28.5 and 31.4 min, corresponding to hemes B and A, respectively. A different

heme composition was observed in cells grown in high ammonium (Fig. 5B). The expected peak for heme B and a small peak for heme A were observed. Heme D was not detected by the HPLC procedure we used (40), but its presence in cells grown in high ammonium was confirmed by preparation of its

TABLE 1. Effect of ammonium concentration in LGIP medium on the composition of cytochromes associated with membranes of *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically^a

| Cytochrome | Amt of cytochrome (nmol/mg of protein in cells grown in) | |
|---------------------------|--|---------------|
| | Low ammonium | High ammonium |
| <i>c</i> | 0.12 | 0.06 |
| <i>b</i> | 0.25 | 0.17 |
| <i>a</i> ₁ -CO | 0.16 | 0.01 |
| <i>d</i> -CO | ND ^b | 0.16 |

^a Cultures were performed at 30°C in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (low) or 40 mM (high) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in a 20-liter-working-volume fermentor sparged with 52 liters of air min^{-1} and stirred at 250 rpm ($K_L A = 16\text{s}^{-1}$). Cells were collected at early station by phase $\text{OD}_{600} = 7.5$ (low ammonium) and 6 to 8 (high ammonium).

^b ND, not detected.

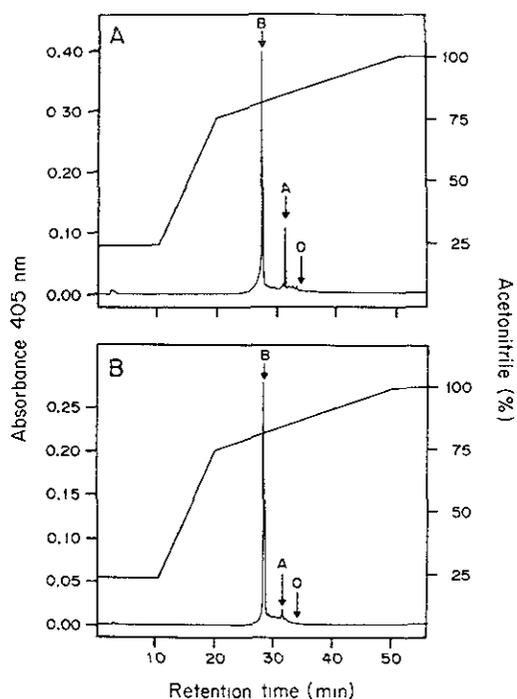


FIG. 5 Reverse-phase HPLC chromatograms of the membrane-bound hemes from *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (A) or 40 mM (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The system was calibrated with the following standards: hemes B and O extracted from membranes of *E. coli*, hemes B and A extracted from submitochondrial particles from bovine heart, and protoheme IX obtained from Sigma Chemical Co. The retention times for the standards and hemes of *A. diazotrophicus* were as follows: heme B, 28.5 min; heme A, 31.4 min; heme O, 34 min. The relative amounts of hemes B and A were estimated to be 1.0:0.26 (A) and 1.0:0.042 (B).

pyridine hemeochrome derivative (results not shown). We also found that heme O (retention time = 34 min) was not detected in either of the two types of cells.

Respiratory activities. Membrane particles of *A. diazotrophicus* grown in medium with low ammonium had respiratory specific activities higher than those of cells grown at high ammonium concentrations (Table 2). In decreasing order, NADH, glucose, and acetaldehyde were the best physiological sub-

strates for both types of cells. Oxidase activities with NADH, acetaldehyde, and glucose were 2.2-, 2.9-, and 5.5-fold higher, respectively in membrane preparations obtained from cultures in low ammonium than in those from cultures in high ammonium. The outstanding increase observed for glucose oxidase was due to a 6.8-fold increment in the glucose dehydrogenase activity. Gluconate, ethanol, and succinate were significantly less efficient as electron donors in the two cell preparations.

It is noteworthy that the quinol TQH was oxidized at high rates by both types of cell membranes whereas the TMPD-ascorbate mixture was the poorest electron donor, suggesting that terminal oxidases in both types of membranes belong to the group of quinol oxidases (15).

Oxidase and dehydrogenase activities with glucose, acetaldehyde, ethanol, and gluconate determined at pH 6.0 (Table 2) were 3-, 1.5-, 1.3-, and 1.2-fold higher respectively, than at pH 7.4 (results not shown). For NADH and succinate, we found that activities at pH 7.4 (Table 2) were 1.3- to 1.5-fold higher than at pH 6.0 (results not shown).

Cyanide inhibition. The oxidase activities with NADH, glucose, and acetaldehyde were titrated with KCN in membranes of cells grown in low ammonium (Fig. 6A). KCN inhibition at the terminal oxidase step with all substrates tested was clearly biphasic, and about 50% of the respiratory activity was abolished by 100 μM KCN. The second kinetic component was relatively resistant to the inhibitor. The residual membranes obtained after treatment with 0.2% Triton X-100 (Fig. 4) exhibited a fully active glucose oxidase which was significantly more sensitive to the inhibitor; i.e., 75% of the activity was inhibited by 100 μM KCN. Triton X-100 treatment removed most of the *c*-type cytochromes from the membrane (Fig. 4). It is thus possible that the cyanide-resistant respiration in *A. diazotrophicus* involves *c*-type cytochromes, as shown for *Gluconobacter suboxydans* (31).

The cyanide titration curves for the same oxidase activities in membranes of cells grown on high ammonium presented a single cyanide-resistant component; i.e., the three oxidases tested retained more than 80% of their activity with 100 μM KCN and about 45% survived treatment with 1.0 mM KCN. As noted above, these types of membranes contain low levels of *c*-type cytochromes and significant levels of cytochrome *bd*; this oxidase has been described as typically resistant to cyanide (20, 35). Treatment of these membranes with 0.2% Triton

TABLE 2. Effect of ammonium concentration in LGIP medium on the respiratory activities associated with membranes of *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically^a

| Substrate | Low ammonium ^b | | High ammonium ^b | | Low/high ratio for oxidase |
|----------------|--|--|--|--|----------------------------|
| | Oxidase activity (ng-atoms of O ₂) | Dehydrogenase activity (nmol of ferri-cyanide) | Oxidase activity (ng-atoms of O ₂) | Dehydrogenase activity (nmol of ferri-cyanide) | |
| NADH | 2,824 | 2,563 | 1,293 | 1,693 | 2.2 |
| Glucose | 2,085 | 2,180 | 379 | 319 | 5.5 |
| Acetaldehyde | 1,082 | 1,633 | 364 | 130 | 2.9 |
| TQO-ascorbate | 750 | | 363 | | 2.0 |
| Gluconate | 314 | 127 | 91 | 34 | 3.4 |
| Ethanol | 235 | 826 | 141 | 84 | 1.6 |
| Succinate | 235 | 680 | 172 | 209 | 1.3 |
| TMPD-ascorbate | 141 | | 108 | | 1.3 |

^a Cultures were performed on LGIP medium supplemented with 1.0 mM (low ammonium) or 40 mM (high ammonium) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, as described in Table 1.
^b Respiratory rates were measured polarographically with a Clark-type electrode, while dehydrogenase activities were determined spectrophotometrically with potassium ferri-cyanide as the electron acceptor. In both cases, the specific activities per milligram of membrane protein per minute are displayed. Each value is the mean of values obtained from three individual cultures. The standard deviations were less than 15% of the means given. Activities shown are those obtained at the optimal pH: glucose, acetaldehyde, ethanol, and gluconate at pH 6.0; NADH and succinate at pH 7.4. Activities with TQO-ascorbate and TMPD-ascorbate were measured at pH 6.0 to minimize the chemical oxidation of these cocktails.

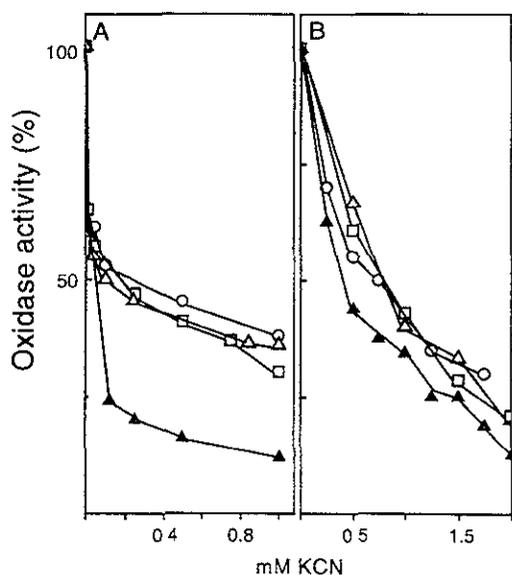


Fig. 6. Cyanide inhibition of oxidase respiratory activities of *A. diazotrophicus* PAL5 grown aerobically in LGIP medium supplemented with 1.0 mM (A) or 1.0 mM (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Oxidase activities for NADH (\circ), glucose (Δ), and acetaldehyde (\square) in membranes were titrated with KCN. Alternatively, the KCN inhibition was performed on (\blacktriangle) glucose oxidase of membrane residues obtained after treatment with 0.2% Triton X-100 (see Results and Fig. 4). The membrane preparation used, assay conditions, and oxidase specific activities were similar to those shown in Table 2.

did not modify the cyanide titration curve significantly (Fig. 6B).

DISCUSSION

A. diazotrophicus belongs to the selected group of bacterial species endowed with the capacity for nitrogen fixation; it is remarkable that this ability can be demonstrated in culture and increased by aerobic conditions (reference 39 and this work). Its peculiar life-style requires an efficient mechanism for protection of nitrogenase activity from deleterious oxygen (21–23). Therefore, it is relevant that we found that *A. diazotrophicus* PAL5 grown in well-aerated media possesses a respiratory system with the following remarkable features.

(i) It had an amazingly high respiratory capacity. The respiratory rates with NADH and glucose determined here (Table 2) are among the highest ever reported for aerobic bacteria in examples in references 6, 13, 21, 29, and 30).

(ii) The O_2 demand of *A. diazotrophicus* during N_2 -dependent growth was sufficient to remove continuously dissolved O_2 in well-aerated cultures, thus producing an adequate intracellular environment for nitrogen fixation. In fact, within the K_1 range tested (i.e., 24 to 145 mmol of O_2 liter $^{-1}$ h $^{-1}$), the O_2 supply to the medium was the limiting step rate for N_2 -dependent growth.

(iii) Respiration of glucose deserves special consideration. Garavito and Boiardi (14) showed that glucose dehydrogenase activity increased when *A. diazotrophicus* was grown under nitrogen-fixing conditions. Along these lines, Alvarez and Mauriz-Drets (1) suggested that the catalytic site of this enzyme is located in the periplasmic space, thus enabling oxidation without membrane permeation. As expected for an enzyme whose catalytic site is located in the outer acidic medium, we found that the glucose oxidation rate at pH 6.0 was threefold higher than at pH 7.4. Conversely, we found that the dehydrogenase activities for acetyl-

aldehyde, ethanol, and gluconate were higher at pH 6.0 than at pH 7.4. The ample number of dehydrogenases feeding electrons to the respiratory system without mediation of NAD (reference 1 and this study) would seem to provide a varied menu of direct electron donors that ensure sufficient electron flux for ATP synthesis and oxygen consumption.

(iv) Cytochrome a_1 (cytochrome *ba*) seems to be the major oxidase expressed during aerobic N_2 -dependent growth. This enzyme, rare among bacteria, was identified by its CO difference spectrum and by the intensification of its α -band at 589 nm when cyanide reacted with the reduced form. Its characteristics were similar to those of the well-established cytochrome a_1 of *A. acetii* (29). The presence of heme A in membranes of cells grown aerobically at low NH_4^+ concentrations was confirmed by HPLC analysis.

(v) Interestingly, a *bd*-type cytochrome is absent in cells displaying nitrogen-fixing ability during aerobic growth in limiting NH_4^+ . However, the spectral features of a *bd*-type cytochrome were conspicuous in membranes of aerobic cells grown in excess NH_4^+ . These results contrast with previous reports of studies with *Azotobacter vinelandii*, where a *bd*-type cytochrome plays the major role in the respiratory protection of nitrogenase while a *bo*-type oxidase seems to be involved in a coupled step in the generation of ATP (21, 24, 32). The presence of a *bo*-type cytochrome in *A. diazotrophicus* could not be confirmed in cells grown in low- NH_4^+ cultures, suggesting that the putative oxidase *ba* might play the role of a highly coupled site.

Membranes of *A. diazotrophicus* grown in low NH_4^+ were rich in *c*-type cytochromes with high molecular masses. By analogy to the respiratory chain of *G. suboxydans* (2, 4), *A. methanolicus* (30), and *A. acetii* (31), these *c*-type cytochromes could function as electron carriers in the segments preceding ubiquinone, i.e., those associated with primary dehydrogenases. It is known that alcohol and aldehyde dehydrogenases from *A. acetii* (31), *A. methanolicus* (30), and *G. suboxydans* (3, 4) contain subunits bearing *c*-type cytochrome with molecular masses that range from 40 to 80 kDa. The values are within the range of those found in this work (i.e., 67, 56, 52, and 45 kDa [Fig. 4]). The TMPD oxidase activity registered here (Table 2) was negligible, thus discounting a role for cytochrome *c* in the high-potential side of the respiratory system. Moreover, ubiquinol cytochrome *c* reductase activity could not be detected in membranes of *A. diazotrophicus* with NADH as an electron donor and horse cytochromes *c* as an electron acceptor in the presence of 2 mM KCN (results not shown).

Oxidase *ba* could be identified as the highly sensitive target for KCN in cells obtained from low- NH_4^+ cultures. The high-molecular-mass *c*-type cytochromes might be components of the KCN-resistant branch, since its selective release from membranes by Triton X-100 results in a membrane preparation that was more sensitive to the inhibitor.

Here we presented persuasive evidence suggesting that the ammonium concentration in the culture plays a determinant role in the expression of components of the respiratory system of *A. diazotrophicus*. This could be a unique property among acetic acid bacteria. It is noteworthy that the levels of glucose dehydrogenase, *c*-type cytochromes, and alternative oxidases *ba* and *bd* are strongly affected by ammonium concentration in media and that all this seems to be related to the unique life-style of *A. diazotrophicus* as a facultative diazotroph among acetic acid bacteria.

Although there is an underlying similarity in the organization of respiratory systems of acetic acid bacteria, there is still significant variation in its individual components, mainly at the level of the terminal oxidases. Previous descriptions of this

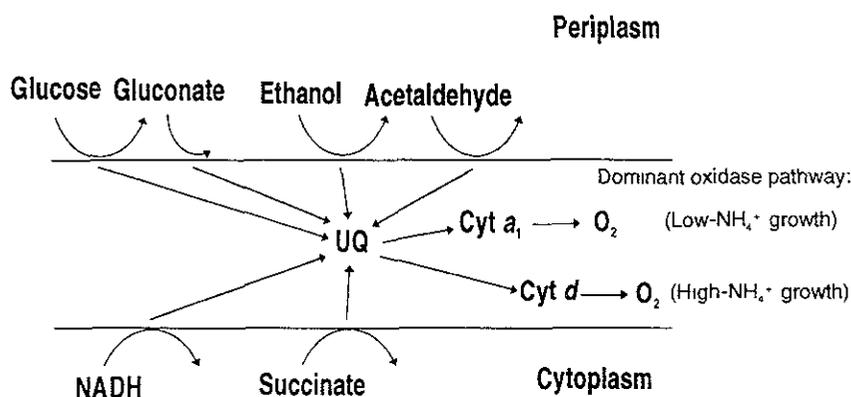


FIG. 7. Postulated composition and organization of the aerobic respiratory system of *A. diazotrophicus* PAL5. Cytochrome a_1 (also called *ba*) putative oxidase is preferentially expressed in N_2 -fixing cells, while cytochrome *bd* putative oxidase is conspicuous in cells grown with excess NH_4^+ . Respiratory activities, notably glucose oxidase, are higher in cells displaying diazotrophic activity. Cyt, cytochrome.

subject (1, 4, 27-31) show that the distinct members of the group so far described can be distinguished by the possession of personalized sets of terminal oxidases. Hence, the presence of cytochromes *ba* and *bd* as terminal oxidases in *A. diazotrophicus* constitutes a distinctive set among acetic acid bacteria.

Figure 7 illustrates our proposal for the composition and organization of the respiratory system of *A. diazotrophicus*, as well as its variations according to the ammonium concentration in well-aerated cultures.

The low-redox-potential side will be composed of several dehydrogenases directly coupled to the respiratory chain, including flavoprotein dehydrogenases for NADH and succinate with the catalytic site facing the cytoplasmic side of the membrane. The catalytic sites of quinoprotein glucose dehydrogenase and cytochrome *c*-containing dehydrogenases for ethanol and acetaldehyde are oriented facing the periplasmic space. A ubiquinone pool will collect reduced equivalents from all functional dehydrogenases, which in turn will transfer electrons to cytochrome a_1 quinol-oxidase. Alternatively, cells grown in excess NH_4^+ and under aerobic conditions will contain cytochrome *bd* quinol oxidase and limited amounts of cytochrome a_1 ; cyanide acts on the cytochrome a_1 terminal oxidase. Membranes of *A. diazotrophicus* showed significant levels of cyanide-resistant respiration, which was selectively abolished with low concentrations of Triton X-100 (Fig. 6A). The nature of the components involved in this respiration remains to be explored, but in other work cytochrome c_{553} (subunit II of alcohol dehydrogenase) has been implicated as the main component of the cyanide-insensitive oxidase bypass of *G. suboxydans* (31).

Under nitrogen-fixing conditions, a rapid respiratory electron transport activity will be required to keep intracellular oxygen tension at very low levels. This could be accomplished through the high expenditure of ATP in nitrogen fixation and a physiological mechanism that carries out a high rate of uncoupled electron transport. An uncoupled respiratory pathway (cyanide resistant) and chemical uncoupling (acidification) have been proposed in *G. suboxydans* and in *A. aceti* respectively. (31) *A. diazotrophicus* PAL5 has one of the highest known rates of respiration and, very probably, the ability to adjust its oxygen consumption to match wide variations in its oxygen supply. Rapid respiration would be able to provide "respiratory protection" to the oxygen-labile nitrogenase during aerobic diazotrophy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant DGAPA-UNAM IN-219397 and a CONACYT grant to J.E.E.

We express our deep appreciation to A. Gómez-Puyou, Mario Soberón, and Ann L. Lutterman for their generous help and criticism during the preparation of the manuscript. We are also indebted to Juan Méndez for his technical assistance and to Virginia Godínez for her secretarial assistance.

REFERENCES

1. Alvarez, B., and G. Martínez-Drets. 1995. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 41:918-924.
2. Ameyama, M., and O. Adachi. 1982. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89:450-457.
3. Ameyama, M., and O. Adachi. 1982. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89:491-497.
4. Ameyama, M., K. Matsushita, E. Shinagawa, and O. Adachi. 1987. Sugar-oxidizing respiratory chain of *Glucanobacter suboxydans*. Evidence for a branched respiratory chain and characterization of respiratory chain-linked cytochromes. *Agric. Biol. Chem.* 51:2943-2950.
5. Attwood, M. M., J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioeng.* 72:101-105.
6. Barquera, B., A. García-Horsman, and J. E. Escamilla. 1991. Cytochrome *d* expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 155:114-119.
7. Cavalcante, V. A., and J. Dobreiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31.
8. Cojho, E. H., V. M. Reis, A. C. Schenberg, and J. Dobreiner. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an auxotrophic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:23-31.
9. Cozier, G. E., and C. Anthony. 1995. Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem. J.* 312:679-685.
10. Dobreiner, J., V. M. Reis, M. A. Paula, and F. L. Olivares. 1993. Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 17:671-676.
11. Drozd, J., and J. R. Postgate. 1970. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* 63:63-73.
12. Dullea, J. R., and P. A. Grieve. 1975. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Biochem.* 64:136-141.
13. Escamilla, J. E., R. Ramírez, I. P. del Arrenal, G. Zarzoza, and V. Linares. 1987. Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* 133:3549-3555.
14. Galar, M. L., and J. L. Boiardi. 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:713-716.
15. García-Horsman, J. A., B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma, and R. B. Gennis. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176:5887-5900.
16. Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Tenver, J. Dobreiner, and J. De Ley. 1989. *Acetobacter*

- diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:361–364
- Goodhew, C. F., K. R. Brown, and G. W. Pettigrew. 1986. Heme staining in cells, as useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim. Biophys. Acta* **852**:288–294
- Hoffman, P., T. V. Morgan, and D. V. DerVartanian. 1979. Respiratory-chain characteristics of mutants of *Azotobacter vinelandii* negative to tetramethylphenylenediamine oxidase. *Eur. J. Biochem.* **100**:19–27.
- Hones, C. W., and E. R. Redfearn. 1966. Electron transport in *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**:467–481.
- Jünemann, S. 1997. Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1321**:107–127.
- Kelly, M. J. S., R. K. Poole, M. G. Yates, and C. Kennedy. 1990. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*. Mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bacteriol.* **172**:6010–6019.
- Kennedy, I. R., and Y. T. Tchan. 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. *Plant Soil* **141**:93–118.
- Kim, J., and D. C. Rees. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**:389–397.
- Koehn, D., J. van der Oost, M. J. Kelly, M. Saraste, S. Hill, and R. K. Poole. 1994. Mutagenesis of a gene encoding a cytochrome *o*-like terminal oxidase of *Azotobacter vinelandii*: a cytochrome *o* mutant is aero-tolerant during nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**:351–358.
- Lübbers, M., and K. Morand. 1994. Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. *Archaea* have modified hemes A and O. *J. Biol. Chem.* **269**:21473–21479.
- Matsushita, K., and M. Ameyama. 1982. D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane bound. *Methods Enzymol.* **89**:149–154.
- Matsushita, K., E. Shinawa, O. Adachi, and M. Ameyama. 1989. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biochem.* **105**:633–637.
- Matsushita, K., E. Shinawa, O. Adachi, and M. Ameyama. 1990. Cytochrome *a₁* of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:9863–9867.
29. Matsushita, K., H. Ebisuya, M. Ameyama, and O. Adachi. 1992. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a₁* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **174**:122–129.
30. Matsushita, K., K. Takahashi, M. Takahashi, M. Ameyama, and O. Adachi. 1992. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanoliscus*. *J. Biochem.* **111**:739–747.
31. Matsushita, K., H. Toyama, and O. Adachi. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**:247–297.
32. McInerney, M. J., K. S. Holmes, P. Hoffman, and D. V. der Vartanian. 1984. Respiratory mutants of *Azotobacter vinelandii* with elevated levels of cytochrome *d*. *Eur. J. Biochem.* **141**:447–452.
33. Miranda-Ríos, J., C. Morera, H. Taboada, A. Dávalos, S. Encarnación, J. Mora, and M. Soberón. 1997. Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **179**:6887–6893.
34. Moshiri, F., J. K. Kim, F. Changlin, and R. J. Maier. 1994. The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **14**:101–114.
35. Poole, R. K. 1983. Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **726**:205–243.
36. Puustinen, A., and M. Wikström. 1991. The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6122–6126.
37. Reis, V. M., F. L. Olivares, and J. Döbereiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**:401–405.
38. Stanbury, P. F., and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology, p. 169–191. Pergamon Press, New York, N.Y.
39. Stephan, M. P., M. Oliveira, K. R. S. Teixeira, G. Martínez-Drets, and J. Döbereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:67–72.
40. Svensson, B., M. Lübbers, and L. Hederstedt. 1993. *Bacillus subtilis ctaA* and *ctaB* function in heme A biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **10**:193–201.