

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Bioenergética de las Oxidasas terminales del Sistema Respiratorio de
Gluconacetobacter diazotrophicus. Un estudio en células enteras”.

TESIS

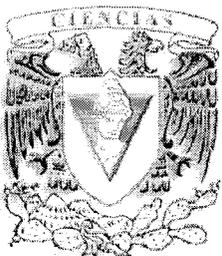
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:

Rolando Gasca Licea

TUTOR

Dr. José Edgardo Escamilla Marván





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

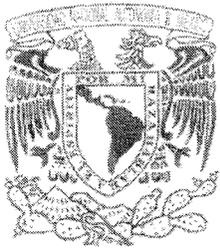


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Bioenergética de las oxidasas terminales del sistema respiratorio de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Un estudio en células enteras

realizado por Gasca Licea Rolando con número de cuenta 0-9911073-2 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Propietario Dr. Salvador Uribe Carvajal

Propietario Tutor Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Suplente Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Suplente Dr. Juan Luis Chávez Pacheco

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 22 de septiembre de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*nlm.

Índice.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1	Sistemas respiratorios bacterianos.....	6
1.2	Clasificación de las oxidasas terminales.....	10
1.3	El papel del oxígeno en la expresión de las oxidasas terminales bacterianas.....	12
1.4	El papel de la fijación biológica de nitrógeno en la expresión de las oxidasas terminales bacterianas.....	14
1.5	Transducción de energía: Fosforilación Oxidativa.....	16

II. ANTECEDENTES.

2.1	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	18
2.2	Sistema respiratorio en bacterias del ácido acético.....	21
2.3	Sistema respiratorio de <i>Ga. diazotrophicus</i>	22
2.4	Oxidasas terminales en <i>Ga. diazotrophicus</i>	24

III. HIPÓTESIS.....26

IV. OBJETIVO.....27

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1	Material biológico.....	28
5.2	Medios de cultivo.....	28
5.3	Mantenimiento del material biológico.....	28
5.4	Cultivo y obtención del material biológico.....	28
5.5	Propiedades del crecimiento de <i>Ga. diazotrophicus</i>	29
5.6	Actividad de oxidasas, efecto de inhibidores, desacoplantes y fotodisociación.....	30
5.6.1	Efecto de inhibición del KCN sobre la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i>	30
5.6.2	Efecto de inhibición del CO sobre la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i>	30
5.6.3	Efecto complementario de la respiración por KCN y CO en células enteras.....	31
5.6.4	Efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> sin inhibidores y con inhibidores de la respiración.....	31
5.6.5	Titulación del CCCP sobre la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> tratada con KCN 10 μ M.....	31
5.6.6	Cinética de la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> , inhibición por concentraciones crecientes de KCN en ausencia y en presencia de CCCP 40 μ M.....	31
5.6.7	Espectro de acción de la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> inhibida completamente con KCN y CO.....	32
5.6.8	Espectro de acción y desacoplamiento de la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> inhibida parcialmente y completamente con KCN y CO.....	32
5.7	Acidificación por translocación de protones.....	32
5.8	Potencial de membrana.....	33

VI. RESULTADOS.

6.1	Propiedades de crecimiento de <i>Ga. diazotrophicus</i>	34
6.2	Inhibidores de la actividad respiratoria de <i>Ga. Diazotrophicus</i>	36
6.3	Efecto del desacoplante CCCP en la actividad respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i>	41
6.3.1	Efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria de la oxidasa <i>ba</i> ₃	43
6.4	Espectros de acción, reactivación por luz visible de la actividad respiratoria inhibida con KCN y CO.....	44
6.4.1	Espectros de acción, reactivación por luz visible y CCCP de la actividad respiratoria inhibida parcia y completamente con KCN y CO.....	47
6.5	Acidificación por translocación de protones.....	49
6.6	Potencial transmembranal.....	52

VII. DISCUSIÓN.

7.1	La quinol oxidasa <i>ba</i> ₃ de <i>Ga. diazotrophicus</i> esta acoplada al gradiente protón-motriz y la quinol oxidasa <i>bb</i> ₃ funciona de manera desacoplada a dicho gradiente.....	54
7.2	El porqué de las ramificaciones en los sistemas respiratorios bacterianos y su importancia en el sistema respiratorio de <i>Ga. diazotrophicus</i>	57

VIII. CONCLUSIONES..... 61

IX. ABREVIACIONES..... 62

X. REFERENCIAS..... 63

I. Introducción.

Las bacterias presentan un panorama extraordinariamente diverso en sus sistemas respiratorios, que es el reflejo de su largo tránsito evolutivo, que se remonta a los mismos orígenes de la tierra, hace cerca de 4,500 millones de años. Entre las bacterias actuales encontramos representantes de cada una de las grandes etapas de la evolución de los procesos bioenergéticos, que en un principio se adaptaron a una atmósfera ligeramente reductora donde el CO_2 , el CO y el N_2 eran los principales componentes; en estas condiciones, los procesos fermentativos fueron los responsables de la síntesis de ATP (Kastins, 1993). En esta época, el O_2 solo existía en cantidades ínfimas, como producto de la radiación ultravioleta. También había cantidades limitadas de NO , que pudieron generarse por el calentamiento del CO_2 y del N_2 atmosférico, provocado por el impacto de meteoritos (Sagan y cols., 1993). Con la aparición de la fotosíntesis oxigénica, realizada por los ancestros de las actuales cianobacterias, el O_2 atmosférico comenzó a elevarse lentamente hace 2400-2600 millones de años, hasta alcanzar la presente concentración del 20%, desde hace aproximadamente 500 millones de años (Stouthamer, 1992).

Así, los procesos respiratorios comenzaron a evolucionar cuando la fotosíntesis oxigénica comenzó a cambiar el ambiente atmosférico, de una condición anaeróbica a una condición aeróbica. En el transcurso, las bacterias se adaptaron utilizando al O_2 como aceptor final de electrones (Stouthamer, 1992). De esta manera podemos distinguir entre la típica respiración aerobia (con O_2) y la respiración anaeróbica, que utiliza aceptores de electrones diferentes al O_2 , como fumarato, sulfato, nitrito, nitrato, etc. La respiración con nitrato (NO_3^-) y el papel de la denitrificación fueron reconocidos por Quastel en 1925. En 1930 Kluver estudió las bacterias reductoras del sulfato y reconoció que éste sustituye al O_2 en su función de aceptor de electrones. Durante la segunda mitad del siglo pasado se describieron múltiples tipos de respiración anaerobia en las bacterias, cada uno con diferentes aceptores terminales de electrones (Escamilla y cols., 1999).

1.1 Sistemas respiratorios bacterianos.

Los sistemas respiratorios bacterianos, están compuestos por una amplia variedad de elementos; como las flavoproteínas, proteínas Fe-S, quinonas, y citocromos. Estos componentes transportan electrones en la membrana, desde proteínas con un potencial redox bajo o negativo, hacia las que tienen un potencial redox positivo, en una serie de reacciones de reducción y oxidación hasta llegar a un aceptor final. Algunos de estos componentes translocan protones a través de la membrana plasmática, generando un gradiente protón-motriz transmembranal que es utilizado para la formación de ATP vía la ATP-sintasa (Mitchell y Moyle, 1967). En algunos casos, la cadena respiratoria no está acoplada a la síntesis de ATP, sino que se genera calor y actúa para disipar el exceso de poder reductor (García y cols., 1994).

En general, los sistemas respiratorios contienen a la NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa (complejo III ó citocromo bc_1) y la oxidasa terminal (complejo IV). Además poseen componentes móviles que participan en el transporte de electrones, como las quinonas y el citocromo-c soluble (Anraku y Gennis, 1987) como se muestra en la figura 1.

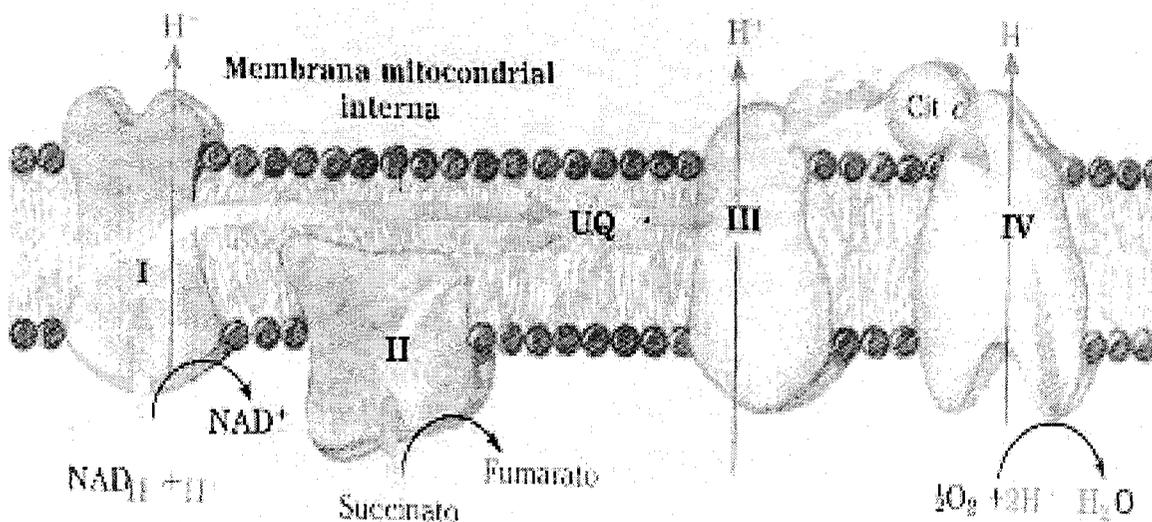


Fig.1 Composición general de una cadena respiratoria aeróbica adaptado de Nelson y Cox., (2005).

En las bacterias, el arreglo que poseen los distintos componentes en la cadena respiratoria suele ser modular, éste puede cambiar en función de los nutrientes presentes y el medio donde crecen. Las bacterias poseen, además de las deshidrogenasas para NADH y succinato, una gama de otras deshidrogenasas que les permite oxidar una amplia variedad de sustratos, sin mediación del NAD^+ . Para cada sustrato existe una deshidrogenasa membranal específica, que transfiere 2 electrones a la poza de quinonas. Por lo general cada bacteria expresa un solo tipo de quinona, siendo las más comunes aquellas que se derivan de la ubiquinona y de la menaquinona, esta primera sección en los sistemas respiratorios bacterianos se denomina, funcionalmente como; Quinona Reductasa, la poza de quinonas es el punto de confluencia para las reductasas (Escamilla y cols., 1999).

La segunda parte del sistema es divergente y a partir del quinol, existen diversas cadenas, formadas por citocromos que conducen los electrones al oxígeno o en ausencia de éste, hacia otros aceptores terminales de electrones. En la figura 2 se pueden apreciar la enorme diversidad de vías que conducen al O_2 , o a múltiples aceptores alternos. Como se muestra en el esquema, a la fecha se han descrito al menos 13 oxidasas que catalizan la reducción del O_2 . Estas enzimas se pueden dividir en dos grupos (Anraku, 1988): a) las Quinol Oxidasas que reciben electrones directamente de un quinol y b) las Citocromo-c Oxidasas que reciben los electrones a través de una vía más larga que incluye al citocromo (*complejo*) bc_1 y un citocromo *c*, tal y como ocurre en la mitocondria. Desde el punto de vista bioenergético, las cadenas respiratorias que contienen citocromo-c oxidasa son más eficientes, debido a que la mediación del complejo bc_1 añade un sitio más para la translocación de protones. En el caso de bacterias aerobias o anaerobias facultativas, sus sistemas respiratorios pueden presentar dos o más oxidasas terminales con diferente afinidad por el oxígeno, generando ramificaciones en el sistema respiratorio y permitiendo la adaptación a un intervalo amplio de concentraciones de oxígeno presentes en el medio (Escamilla y cols., 1999).

En ausencia de oxígeno, las bacterias anaerobias facultativas emplean como aceptores terminales de electrones a compuestos como fumarato, sulfato, nitrito ó nitrato; las enzimas que catalizan este proceso se denominan reductasas (Fig. 2). Se han descrito al menos 12 reductasas diferentes, todas ellas también contienen citocromos de todos los tipos menos del tipo- α . Las reductasas pueden recibir los electrones directamente del quinol o del citocromo c (Escamilla y cols., 1999).

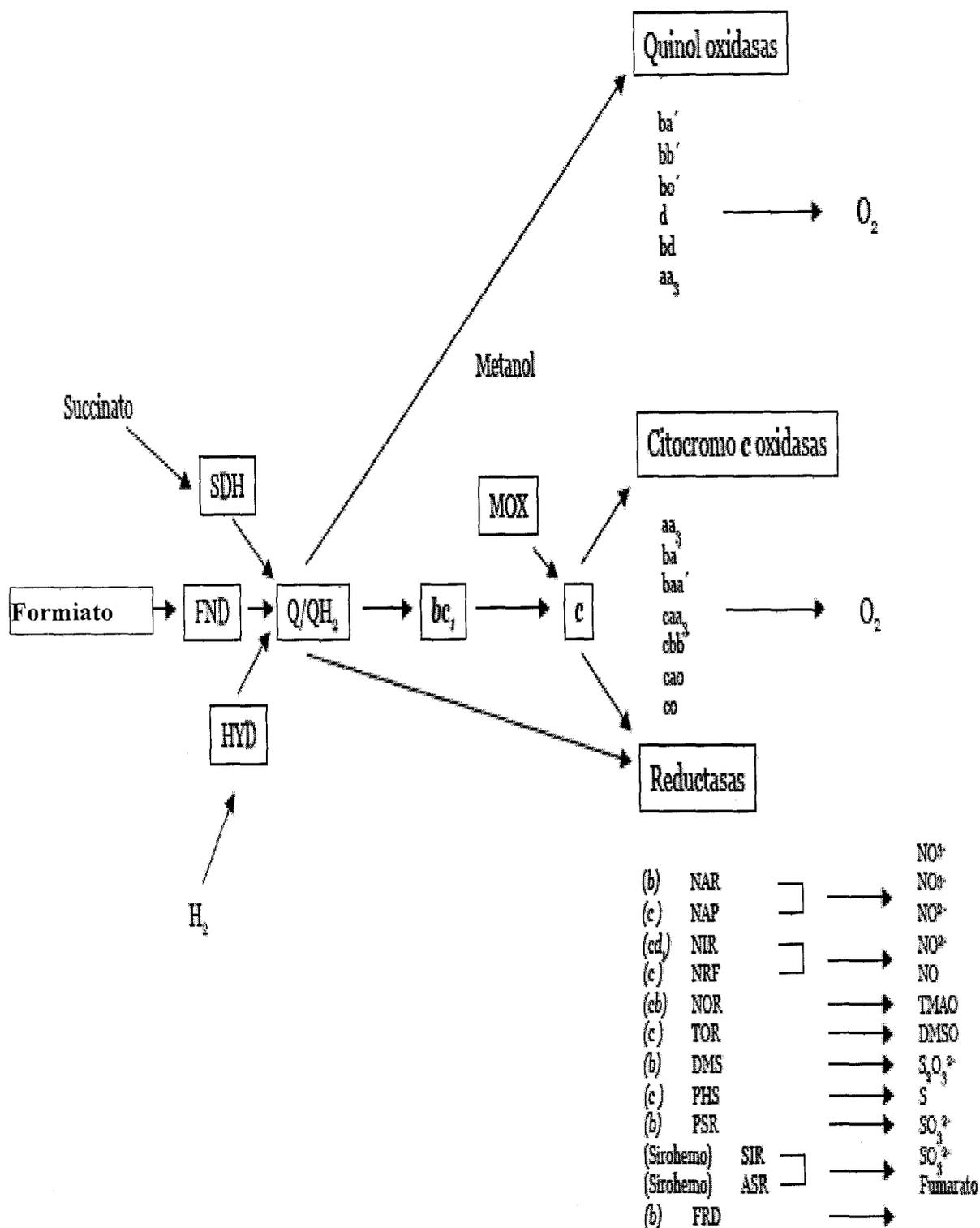


Fig. 2 Composición de diferentes cadenas respiratorias bacterianas.

1.2 Clasificación de las oxidasas terminales.

Las oxidasas respiratorias son enzimas de membrana presentes en los organismos aeróbicos, que catalizan la reducción de oxígeno molecular a agua. Utilizan la energía libre derivada de esta reacción para translocar protones a través de la membrana y formar un gradiente electroquímico. Existen varias clasificaciones para las oxidasas terminales, una de las más empleadas, mencionada anteriormente, las clasifica en función de la molécula que dona electrones a la oxidasas. De esta manera las oxidasas se dividen en dos grupos importantes: **Citocromo c oxidasas** y **Quinol oxidasas**. Las oxidasas terminales que aceptan electrones del complejo bc_1 a través del citocromo c móvil y los transfieren hasta una molécula de oxígeno generando dos moléculas de agua; son denominadas citocromo c oxidasas (Escamilla y cols., 1999). Las quinol oxidasas, son las enzimas terminales que reciben electrones directamente de un quinol, para reducir el oxígeno en agua (Anraku y Gennis, 1987).

Otro sistema de clasificación se basa en la naturaleza química de los cofactores de la enzima. La mayoría de las oxidasas se ubican en la **familia hemo-cobre**; estas oxidasas deben su nombre a la presencia en la subunidad I de un hemo de bajo spin el cual está hexacoordinado y un centro bimetálico compuesto por un hemo de alto spin acoplado a un ión cobre, el Cu_B . Por la homología en la subunidad I, la familia se subdivide en oxidasas homólogas al tipo aa_3 y en oxidasas del tipo cbb_3 (Pereira, y cols., 2001).

Las **citocromo d oxidasas**; son enzimas que pertenecen a las ubiquinol oxidasas y aunque poseen grupos hemo no corresponden a la familia hemo-cobre debido a la carencia del Cu_B en el centro binuclear, las citocromos d oxidasas suplen al Cu_B formando un centro binuclear con dos grupos hemo: b y d (Junemann, 1997).

Por último, las **oxidasas AOX**; denominadas por sus siglas en inglés (Alternate Oxidase), no poseen grupos hemo como cofactores; en su lugar poseen dominios de unión a hierro

(dos histidinas y cuatro residuos de carboxilato), dos átomos de hierro funcionan como centro catalítico para la reducción del oxígeno (Affourtit, y cols., 2005).

Una característica de las cadenas respiratorias es la generación de un gradiente electroquímico mediante la translocación de protones a través de la membrana plasmática; la NADH deshidrogenasa y el complejo bc_1 acoplan la transferencia de electrones al translocamiento de protones, movilizándolo $4H^+$ y $2H^+$ respectivamente por cada par de electrones, la oxidasa terminal es otro sitio de acoplamiento, sin embargo algunas oxidasas terminales no translocan protones, a estas oxidasas se les conoce como “**oxidadas desacopladas**” (García, y cols., 1994). Las oxidasas terminales que contienen citocromo d y las oxidasas AOX (no hémicas, dihierro carboxilato) no poseen canales para la exportación de los protones; sin embargo ambos tipos de enzimas generan potencial electroquímico. La oxidasa bd de *Escherichia coli* reconstituida en proteoliposomas genera un potencial transmembranal de 180 mV (Kita y cols., 1984), el cual le permite a *E. coli* producir suficiente ATP para su crecimiento. Teóricamente la oxidasa bd tiene una estequiometría de un H^+ translocado por electrón; sin embargo, este cálculo se debe a la liberación de $2H^+$ en el lado periplásmico en la reacción de oxidación del ubiquinol y al consumo de $4H^+$ del lado citoplásmico por cada molécula de O_2 reducida (Miller y Gennis, 1985). El consumo de protones acidifica el lado citoplasmático de manera electrogénica formando un gradiente electroquímico sin involucra translocamiento de protones.

Las “**oxidadas acopladas**” están representadas por las oxidasas de la familia hemo-cobre, las cuales acoplan la reducción del O_2 a la translocación de protones mediante cambios en los estados de protonación de grupos ácido-base provocados por cambios en el estado redox de los centros metálicos (Mills y Ferguson-Miller, 2003). Aunado a los cambios redox se requiere en la enzima, de al menos dos canales de protones de naturaleza independiente; el primero permite la entrada de los protones para la reducción del oxígeno y la salida de agua, mientras el segundo funciona para el transporte de protones acoplada a la reducción del oxígeno (Fetter y cols., 1995; Thomas y cols., 1993). Un total

de ocho protones son tomados del citoplasma por cada molécula de O₂ reducido, cuatro son enviados al centro binuclear para la catálisis y cuatro son translocados a través de la membrana (Richter y Ludwig, 2003), acidificando el periplasma de manera electroforética por la acumulación de protones transportados a través de la membrana.

1.3 El papel del oxígeno en la expresión de las oxidasas terminales bacterianas.

Se ha estimado que el 90% de la reducción del O₂ en la biosfera está catalizada por oxidasas respiratorias, mayormente por bacterianas (von Wachenfeldt C., y Hedersted L., 1990). La gran diversidad entre las oxidasas bacterianas responde a la gran diversidad de los ambientes que habitan las bacterias. La expresión de una oxidasa bacteriana depende de las condiciones prevalentes de cultivo y del estadio de desarrollo; **la tensión de O₂ es el factor regulador más importante**. Las bacterias pueden poseer más de una oxidasa terminal con diferente afinidad por el O₂, lo que les permite existir en un amplio intervalo de tensión de O₂ (10⁻⁹ a 10⁻⁶ M); esto les confiere una gran flexibilidad para la generación de energía.

El O₂ posee la mejor combinación de propiedades cinéticas y termodinámicas que lo convierten en el aceptor terminal de electrones más apropiado. Su reactividad cinética es intermedia entre la excesiva reactividad de los halógenos y la pobre reactividad del nitrógeno. En cuanto a su potencial redox (E¹⁰), el par de O₂/H₂O tiene el E⁰ más positivo (+0.82 Volt), lo que hace al O₂ el más efectivo oxidante cuando se le compara por ejemplo con el nitrato, el fumarato y el Fe³⁺, tres aceptores terminales de electrones en cadenas respiratorias anaerobias de bacterias.

El uso de O₂ como aceptor terminal de electrones no está libre de problemas. Su inercia cinética requiere una etapa de activación, la cual se consigue con un centro metálico como el Fe de un grupo hemo y un Cu en el sitio catalítico, estructura que caracteriza a las

oxidasas. Su baja solubilidad en H₂O requiere que las enzimas que lo reducen (oxidasas) y las proteínas que lo capturan (hemoglobinas) tengan alta afinidad por el sustrato O₂. Las oxidasas reducen completamente al O₂ produciendo H₂O; sus mecanismos de acción están diseñados para reducir al O₂ en dos pasos, entregando 2 electrones en cada etapa. Afortunadamente los intermediarios de la reducción permanecen fuertemente asociados al sitio activo de la enzima. Este mecanismo minimiza efectivamente la producción de superóxido libre (O₂⁻), peróxido (O₂⁻²) e hidroxilo (HO[•]), especies que se generan por la reducción parcial con uno, dos y tres electrones, respectivamente (Escamilla y cols., 1999).

En el caso de *E. coli* esta bacteria posee dos oxidasas respiratorias que se expresan de acuerdo con la concentración de O₂ en el medio. En condiciones aerobias, la oxidasa citocromo *bo*₃ es responsable de la respiración, mientras que en condiciones de microaerofilia es la oxidasa citocromo *bd*. Las propiedades cinéticas de estas dos quinol oxidasas explican su función diferencial en el uso del oxígeno. Mientras que la oxidasa *bo*₃ tiene una K_m por el O₂ de 100 nM, la oxidasa *bd* tiene una alta afinidad por el oxígeno, K_m = 5 nM, lo que permite a la bacteria utilizarlo en ambientes cuasianaeróbicos. La mayor afinidad se paga con una baja eficiencia en la translocación de protones, ya que la quinol oxidasa *bd* transloca un máximo de 1H⁺/1e⁻ (Slater, y cols., 1965; Miller y Gennis, 1985). Inclusive, hay reportes que sostienen que la oxidasa *bd* no transloca protones (Puustinen, y cols., 1991). Contrastando con lo anterior la quinol oxidasa *bo*₃ transloca 2H⁺/e⁻, entendiendo que para las bacterias el bombeo de H⁺ no siempre es lo que más interesa (Slater, y cols., 1965). Aunque la función primaria de la cadena respiratoria es la generación de un gradiente protón-motriz, ésta también es necesaria como “tiradero de poder reductor”, con el fin de reoxidar al NADH. Esto mismo ocurre en la reacción terminal de la fermentación, en donde se reoxida el NADH utilizando al piruvato u otro metabolito como aceptor terminal de electrones (Escamilla y cols., 1999).

Esta función de reciclamiento del NAD⁺ por la cadena respiratoria se vuelve muy importante cuando las bacterias, por las condiciones de crecimiento, obtienen su energía

a partir de otra vía metabólica como la glucólisis o la fotosíntesis. También existen condiciones en las que las cadenas respiratorias desacopladas actúan eficientemente para controlar la concentración de O_2 intracelular. A veces se hace necesario proteger a ciertas vías metabólicas de la acción tóxica del O_2 sobre ciertos componentes enzimáticos, como en el caso de la fijación del nitrógeno en ciertas bacterias de vida libre, como es el caso de *Azotobacter vinelandii* y de nuestra bacteria en estudio *Gluconacetobacter diazotrophicus*, en donde existen cadenas respiratorias no acopladas que consumen el oxígeno activamente para evitar que penetre e inactive a la nitrogenasa. El proceso se conoce como "protección respiratoria" (Flores-Encarnación y cols., 1999).

1.4 El papel de la fijación de nitrógeno en la expresión de las oxidasas terminales bacterianas.

La capacidad para fijar nitrógeno está restringida a un número de organismos procariontes a los que se les ha llamado "diazótrofos" y ocurre en bacterias anaeróbicas, aerobias facultativas, aerobios estrictos y en bacterias fotosintéticas (Poole y Hill, 1997). La principal fuente de nitrógeno fijado en la biósfera procede de los organismos fotótrofos y de los organismos heterótrofos, los cuales guardan relación simbiótica o son heterótrofos de vida libre (Dalton y Postgate, 1969; Flores-Encarnación, 2001).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) 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 (Hill, 1988). El proceso es catalizado por la enzima nitrogenasa (Nasa), la cual está formada por 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 (Dalton y Postgate, 1969; Hill, 1988).

Algunos de esos procariontes son aerobios estrictos; el metabolismo aerobio es ventajoso dado los altos costos que implica la fijación de nitrógeno. Sin embargo la presencia del O_2

es dañina porque causa la inactivación de la enzima nitrogenasa (Poole y Hill, 1997). Por ello, los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias bioquímicas y fisiológicas que les han permitido resolver esta paradoja Dalton y Postgate, 1969; Hill, 1988). La mayoría de los diazótrofos evaden esta sensibilidad al O₂ empleando algunos mecanismos de protección (Flores-Encarnación, 2001).

En el género *Azotobacter* se describió un mecanismo de protección a la nitrogenasa, este mecanismo ha sido llamado "protección respiratoria". Dalton y Postgate (1969) postularon que la nitrogenasa se protege del daño por O₂ a través de la alta respiración celular o bien por un cambio conformacional de la misma proteína, inducido por proteínas hierro-azufre (Fe-S), el cual es otro mecanismo de protección a la nitrogenasa conocido como "protección conformacional". Retomando la protección respiratoria de acuerdo con su hipótesis, el O₂ se consume en las proximidades de la superficie celular y de esta forma se previene que el O₂ entre a la célula. Esta hipótesis fue propuesta basándose en el hecho de que las azotobacterias tienen una de las más altas tasas de respiración registradas entre los organismos aerobios, además de que la actividad respiratoria se incrementa cuando las células crecen a concentraciones elevadas de O₂. También se ha propuesto que el incremento en la respiración se acompaña de un desacoplamiento del transporte de protones, de tal manera que un aumento en el consumo de O₂ no se asocia necesariamente a un incremento en la producción de ATP (Poole y Hill, 1997). Este desacoplamiento parcial en la respiración celular es posible gracias a que el sistema respiratorio de las azotobacterias está ramificado y cuenta con dos oxidasas, una de tipo *bo*₃ y otra de tipo *bd*. Se cree que esta última vía presenta dicho desacoplamiento (Linkenhagner y Oelze, 1995).

La protección respiratoria está activa mientras las células fijan nitrógeno en presencia de O₂. De acuerdo con esto, una mutante de *Azotobacter vinelandii* que no expresa el citocromo *bd* no es capaz de fijar nitrógeno aeróbicamente. Por otro lado, una mutante que expresa niveles elevados de citocromo *bd* y cantidades no detectables de citocromo

bo_3 fue capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones aeróbicas (Linkenhagner y Oelze, 1995).

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 O_2 como parte del mecanismo que proteja a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno ((Poole y Hill, 1997; Flores-Encarnación, 2001).

1.5 Transducción de energía; Fosforilación Oxidativa.

La hipótesis de Peter Mitchell (1961) “La teoría quimiosmótica”, indica que la diferencia transmembranal en la concentración de protones es crucial para la transducción de energía (Nelson y Cox., 2005). El dogma central de la teoría quimiosmótica establece que la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias, cloroplastos y bacterias está acoplada a la síntesis de ATP mediante un potencial electroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) que se crea a través de las membranas. La membrana juega un papel crucial en la transducción de energía, al formar una barrera física iónica y proporcionar un sustrato estructural para los procesos de transporte de electrones (Nicholls y Ferguson, 1987).

La ruta común mediante la cual las mitocondrias, cloroplastos y las bacterias proveen energía para sus funciones biológicas es el acoplamiento quimiosmótico (Nicholls y Ferguson, 1987). En las bacterias la energía de los nutrientes es utilizada para impulsar enzimas que transfieren H^+ de un lado a otro de la membrana (Bruce y cols., 2007). La forma en que se obtiene energía de los nutrientes, es mediante reacciones de oxidoreducción, estas reacciones liberan energía cuando los electrones pasan de un compuesto de alta energía a un estado de baja (potencial redox). El translocamiento de H^+ genera un gradiente electroquímico, el flujo de estos iones genera una diferencia de voltaje a través de la membrana (potencial de membrana (ΔV)) (Nicholls y Ferguson, 1987). El gradiente

electroquímico creado es importante como energía potencial útil para la síntesis de ATP, el transporte de moléculas al interior y exterior de la célula y la rotación flagelar (Bruce y cols., 2007).

Las dos transducciones de energía más importantes en la biosfera son la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación, conjuntamente estos dos procesos generan la mayor parte del ATP sintetizado por los organismos aerobios (Nelson y Cox., 2005).

La fosforilación oxidativa en bacterias es entendida como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, acoplada al transporte de protones del citoplasma bacteriano hacia el exterior, generando una diferencia de potencial electroquímico para los protones (Fuerza protón-motriz). La fuerza protón-motriz empuja los protones de regreso al citoplasma a través de la ATP-sintasa, lo que resulta en la síntesis de ATP (Brand y cols., 1994).

La velocidad de la respiración está dada por el grado de desequilibrio entre el potencial redox desarrollado en las regiones transportadoras de H^+ de la cadena respiratoria y la fuerza protón-motriz. Cuando el costo energético de translocación de un protón, iguala el potencial redox, el flujo electrónico se vuelve más lento (Nelson y Cox., 2005; Nicholls y Ferguson, 1987). Por lo tanto, todas las reacciones que disminuyan la fuerza protón-motriz estimulan la velocidad de la respiración (por ejemplo: la síntesis de ATP). La regulación de la actividad de la fosforilación oxidativa por el nivel ADP, P_i se denomina control respiratorio (Brand y cols., 1994).

II. Antecedentes.

2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria del ácido acética, endófito, Gram-negativa, con actividad reductora de acetileno y de fijación de nitrógeno, aerobia estricta. Tiene muchas características fisiológicas inusuales para un diazótrofo (fijador de nitrógeno) como la tolerancia a pH bajos y a altas concentraciones de azúcar. Para la mayoría de los diazótrofos el crecimiento celular y la fijación biológica del nitrógeno son óptimos a pHs cercanos a la neutralidad. Sin embargo esta bacteria no crece a valores de pH mayores a 7.0. Su crecimiento óptimo ocurre a pH 5.5, aunque el crecimiento y fijación de nitrógeno se han reportado hasta un pH menor a 2.5 (Stephan y cols., 1991). Mediciones de la respuesta de la actividad respiratoria al pH, muestran que las células de *Ga. diazotrophicus* respiran en un intervalo amplio de pH, aunque es óptimo a valores bajos (6-3). Esta bacteria también crece y fija nitrógeno en niveles de sacarosa mayores a 30%, indicando que está adaptada a crecer dentro de la caña de azúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Li & McRae, 1991).

Este microorganismo fue aislado por vez primera por Cavalcante y Döbereiner en 1988, a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diversas regiones de Brasil. Recién descubierta, la bacteria fue descrita como "una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido" y por ello se le otorgó el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante & Döbereiner, 1988). Durante el período de impresión de este trabajo se incluyó como *addendum* el cambio del nombre propuesto, dándole a la nueva bacteria el nombre de *Acetobacter nitrocaptans*, sobre la base de experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA. De manera anecdótica, el sobretiro recibido por JCM (Journal of Clinical Microbiology) venía con una corrección, hecha de puño y letra de Johanna Döbereiner, en la que se indicaba el nombre de la especie como *Acetobacter diazotrophicus*. Y así, solo algunos meses después, fue

cuando *Acetobacter nitrocapta* recibía el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis y cols., 1989).

Sin embargo, Yamada y cols., en 1997, propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*. Con el cambio en la clasificación de las bacterias acéticas, las especies de *Acetobacter* equipadas con ubiquinona Q₁₀ fueron transferidas al género *Gluconacetobacter* con la especie tipo *Gluconacetobacter liquefaciens* y, así actualmente el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Antúnez, 2007).

Esta bacteria llamó la atención al ser descubierta, por su capacidad de fijar nitrógeno en presencia de nitratos en plantas de familias diferentes a las leguminosas y por su carácter endófito (Cavalcante y Döbereiner, 1988). La bacteria en el interior de la caña de azúcar, sufre menor competencia por los nutrientes en comparación con el ambiente rizosférico, donde otros organismos fijan nitrógeno. Además, dispone de abundantes fuentes de carbono, producto de la fotosíntesis, para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Por otro lado el nitrógeno fijado es excretado directamente en el interior de los tejidos de la planta, la cual los usa para cubrir, al menos parcialmente, sus requerimientos en la síntesis de macromoléculas esenciales. Estas características, más su excelente crecimiento en condiciones *in vitro*, similares a las encontradas en la caña de azúcar, convirtieron a esta bacteria en un modelo pionero de bacterias endófitas, y abrió un nuevo capítulo en la investigación sobre la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas (Urquiaga y cols., 1992).

El potencial agrobiotecnológico se amplió cuando se demostró que *Ga. diazotrophicus* tenía efectivamente la capacidad de excretar el 50% del nitrógeno fijado (Cojho y cols., 1993), así como de producir diversas auxinas, especialmente ácido indol acético (Fuentes-Ramírez, y cols., 1993; Bastian, y cols., 1998) y citocininas (Jiménez-Salgado, y cols., 1994), las cuales podrían ejercer efectos directos sobre la fisiología de la planta e influir sobre el

crecimiento de la caña de azúcar.

Hacia el año 2000 muy poco se conocía sobre las características del genoma de *Ga. diazotrophicus*, en comparación con otras bacterias que se asocian con plantas de interés agrícola, tales como *Rhizobium* o *Azospirillum* (Antúnez, 2007). En la década de los 90's muchos genes involucrados en la fijación de nitrógeno de *Ga. diazotrophicus* fueron clonados y secuenciados (Sevilla, y cols., 1997, Teixeira, y cols., 1999). Por ejemplo, se conoce la organización de los genes *nif*, *fix* y *mop*; sin embargo los mecanismos involucrados en su regulación quedan por ser estudiados (Lee y cols., 2000).

Debido a su estilo de vida endófito, esta bacteria ha sido utilizada como vector para expresar genes heterólogos de interés. Un ejemplo es la expresión de los genes *cry3A* y *cry1Ab* aislados de *Bacillus thuringiensis* que son responsables de la actividad patógena contra insectos coleópteros que causan daño a la caña de azúcar principalmente (Salles y cols., 2000; Baldani y cols., 2000).

Hace pocos años se iniciaron los estudios para conocer la secuencia completa del genoma de *Ga. diazotrophicus* (Herlache y cols., 2000) y actualmente se conoce que el genoma de esta especie bacteriana tiene un tamaño aproximado de 4.2 Mb. El potencial económico del uso de *Ga. diazotrophicus* en la inoculación de caña de azúcar cultivada en Brasil ha estimulado la creación de una red de colaboración llamada RIOGENE en este país, cuya finalidad fue la secuenciación del genoma de esta bacteria (Antúnez, 2007).

El interés sobre esta bacteria ha sido también en el aspecto bioquímico, debido a que tiene la capacidad de fijar nitrógeno al mismo tiempo que es aerobio estricto. (Flores-Encarnación, 2001). Llama la atención, que la bacteria sea aerobia estricta y fijadora de nitrógeno, ya que todas las nitrogenasas examinadas hasta el momento en diversos organismos son extremadamente sensibles al oxígeno (Hill, 1998; Ng y cols., 1995). Esta característica suscitó el interés sobre el mecanismo por medio del cual la nitrogenasa se

protege de la presencia de oxígeno en el medio de cultivo. Muy poco se sabe sobre el metabolismo aerobio y específicamente sobre el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*, aunque nuestro grupo ha hecho una importante contribución (Antúnez, 2007).

2.2 Sistema respiratorio en bacterias ácido acéticas.

La oxidación incompleta de azúcares y alcoholes o Fermentación Oxidativa (Matsushita y cols., 1994) llevada a cabo por las bacterias del ácido acético es un proceso que está íntimamente ligado al sistema respiratorio, y es llevado a cabo por diferentes deshidrogenasas membranales (flavoproteínas y quinoproteínas). El acoplamiento de estas dos vías metabólicas hace que la velocidad de respiración llegue a ser 10-20 veces superior a la que se registra en otras bacterias aeróbicas típicas (Antúnez, 2007).

Estas deshidrogenasas aportan los electrones en forma directa a la cadena respiratoria a través de la quinona endógena. Sin embargo existe poco conocimiento sobre la cadena respiratoria en general y de la relación que existe entre las deshidrogenasas y la bioenergética celular (Flores-Encarnación y cols., 1999; González y cols., 2006). Las cadenas respiratorias que han sido mejor estudiadas en las bacterias ácido acéticas son las de *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter methanolicus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (antes *Acetobacter diazotrophicus*) y *Gluconoacetobacter xylinus* (antes *Acetobacter xylinum*) (Antúnez, 2007).

Existen diferencias en los sistemas respiratorios de los miembros representativos de los diferentes géneros de las bacterias ácido acéticas (Matsushita y cols., 1994). El género *Gluconobacter* está equipado con UQ₉ como la mayor ubiquinona, mientras que el género *Acetobacter* posee mayoritariamente UQ₁₀. El género *Gluconobacter* posee grandes cantidades de citocromo *c*, una citocromo *bo*₃ quinol oxidasa y una oxidasa sensible a

cianuro de naturaleza desconocida (Matsushita y cols., 1992). El género *Acetobacter* posee citocromo *c*, una ubiquinol oxidasa sensible a cianuro que, de acuerdo a las condiciones de cultivo puede ensamblarse con hemos *a* u o para constituir alternativamente oxidasas *ba₃* ó *bo₃*, respectivamente. A la oxidasa *ba₃* también se le conoce como *a₁*. Para ambos géneros existe un gran número de deshidrogenasas membranales que alimentan la cadena respiratoria (Matsushita y cols., 1992). *Gluconacetobacter* es un género que ha sido introducido relativamente hace poco tiempo y su sistema respiratorio no está totalmente entendido, sin duda los estudios hechos sobre el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* han ayudado a revelar la naturaleza de los componentes de su cadena respiratoria (Antúñez., E. 2007).

2.3 Sistema respiratorio en *Ga. diazotrophicus*.

El sistema respiratoria de *Ga. diazotrophicus* (fig. 3), está compuesta por diversas deshidrogenasas membranales que donan sus electrones directamente a una poza de UQ₁₀ membranal, aunque se ha visto que también posee UQ₉ en muy bajas cantidades (González y cols., 2006). Los electrones colectados por la UQ₁₀ son cedidos directamente a las oxidasas terminales.

Las deshidrogenasas que se encuentran en *Ga. diazotrophicus* son diversas, algunas tienen su sitio activo orientado hacia el citoplasma, como la NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa; mientras que otras poseen su sitio catalítico dirigido hacia el espacio periplásmico, como la PQQ-glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH), la PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) (Antúñez, 2007). La NADH-quinona oxidoreductasa es una enzima tipo NDH-1 (sensible a rotenona, capsaicina, resistente a flavona) y probablemente acoplada (González y cols., 2006).

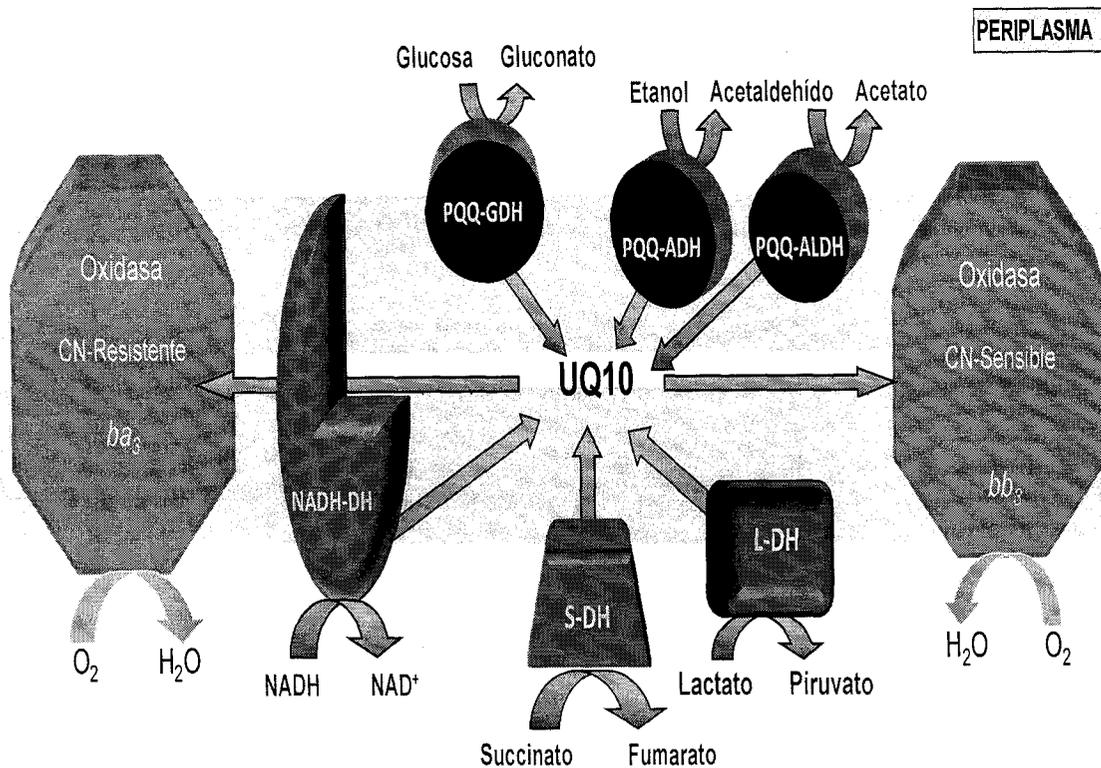


Fig. 3 Composición del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. Las PQQ deshidrogenasas periplásmicas para alcohol (PQQ-ADH), aldehído (PQQ-ADH), glucosa (PQQ-ADH) y las deshidrogenasas membranales para NADH (NADH-DH), succinato (S-DH) y lactato (L-DH) que entregan los electrones a la ubiquinona-10 (UQ₁₀) y esta a su vez a las oxidasas terminales.

La expresión de las distintas quinol-oxidasas terminales que posee esta bacteria se encuentra regulada por la concentración del amonio en el medio de cultivo (Flores-Encarnación y cols., 1999). Cada uno de los componentes del sistema respiratorios de *Ga. diazotrophicus*, cumple un papel fundamental en la fijación de nitrógeno, debido a que la alta tasa respiratoria consume el O₂ del medio, evitando que inhiba de manera irreversible a la nitrogenasa, que es la enzima encargada de la fijación de nitrógeno (Flores-Encarnación y cols., 1999). A este fenómeno se le conoce como "protección respiratoria" y ha sido postulado, como ya mencionamos, para la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* (Drozd y Postgate, 1970; Poole y Hill, 1997), y por nuestro grupo en *Ga. diazotrophicus* (Flores-Encarnación y cols., 1999).

2.4 Oxidasas de *Ga. diazotrophicus*.

En *Ga. diazotrophicus*, la titulación de la actividad respiratoria (con varios sustratos), con cianuro de potasio (KCN) en el intervalo de 0-100 μM , revelan una cinética bifásica. Esto indica la presencia de al menos dos oxidasas terminales; una oxidasa altamente sensible que tiene una $I_{50} = 5 \mu\text{M}$, y una segunda oxidasa que permanece activa a 100 μM de KCN, la oxidasa sensible a KCN representa el 50% de la respiración total (González y cols., 2006). A diferencia de otras bacterias del ácido acético, en *Ga. diazotrophicus* ningún intermediario, como la ADH membranal o algún citocromo *c* en particular, es participante obligado en la ruta de resistencia a cianuro (Antúnez., E. 2007)).

Análisis de espectros diferenciales de CO y espectros de fotodisociación de los compuestos hemo-CO en membranas de *Ga. diazotrophicus*, muestran señal para citocromos de tipo *a* y *b*. Espectros de oxidación de los citocromos titulados con KCN, indican que en concentraciones menores a 25 μM , la oxidación de un citocromo tipo “*b*” es suprimida, mientras que la oxidación del citocromo “*a*” todavía ocurre en 200 μM de KCN (González y cols., 2006).

El análisis espectral de oxidasas parcialmente solubilizadas y purificadas de membranas de *Ga. diazotrophicus* demuestran que la oxidasa sensible a cianuro $I_{50} = 5 \mu\text{M}$, tiene solamente pigmentos del citocromo *b*, mientras que la enzima resistente a cianuro $I_{50} = 450 \mu\text{M}$, contiene cantidades iguales de los citocromos *a* y *b*, las enzimas fueron separadas por cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones parcialmente obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE, encontrando que los perfiles de las proteínas eran perceptiblemente diferentes, sugiriendo que las oxidasas cianuro-sensible y cianuro resistente de *Ga. diazotrophicus* son entidades proteicas distintas (González y cols., 2006).

En ambientes altamente aerobios, *Ga. diazotrophicus* utiliza un mecanismo de protección respiratoria para preservar la actividad de la nitrogenasa del oxígeno deletéreo. Cuando la

concentración de amonio es baja en el medio, la bacteria fija nitrógeno atmosférico y expresa dos oxidasas terminales: citocromo *ba₃*, resistente a cianuro y citocromo *bb₃* sensible a este inhibidor (fig. 3); En condiciones de alto amonio (no fijación de nitrógeno), la oxidasa predominante es la *bd*. Siendo la concentración de amonio el principal regulador (Flores-Encarnación y cols., 1999).

III. HIPÓTESIS.

Si el sistema respiratorio ramificado de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos oxidasas; la quinol oxidasa ba_3 (resistente a cianuro) y la quinol oxidasa bb_3 (sensible a cianuro). Entonces una de las oxidasas debe estar acoplada a la formación de un gradiente protón-motriz y la otra no.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Definir en células íntegras, las propiedades bioenergéticas de las dos oxidasas presentes (ba_3 y bb_3) en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, estableciendo su relación con la formación del gradiente electro-químico.

4.2 Objetivos particulares.

- Definir por oximetría, la respuesta de *Ga. diazotrophicus* a diferentes inhibidores, como el KCN y el CO.
- Analizar la respuesta al desacoplante carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona en células no tratadas y células previamente inhibidas por KCN o por CO.
- Medir y comparar la acidificación del medio, generada por la acumulación de protones translocados por la oxidasa acoplada, y distinguirla de aquella acidificación producida por la oxidación de sustratos en el espacio periplásmico.
- Demostrar la capacidad bioenergética de la vía acoplada en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, con la formación de un potencial de membrana durante la oxidación de glucosa sustrato principal en la fosforilación oxidativa de *Ga. diazotrophicus*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Material biológico.

Ga. diazotrophicus cepa silvestre PAL5 ATCC49037.

5.2 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados fueron LGI modificado pH 5.5 (Flores-Encarnación y cols., 1999), el cual contiene; azúcar refinada (comercial) 50 g, K_2HPO_4 4 g, KH_2PO_4 5 g, $MgCl_2$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.02 g, $NaMoO_4$ 0.002 g, $FeCl_3$ 0.01 g, citrato de sodio industrial 5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1321 g, para un litro de medio. Con fines en obtención de biomasa el medio LGI modificado, fue enriquecido con extracto de levadura 0.5% (5 g/L) pH 5.5 (LGI+lev). Otro medio LGI modificado, fue empleado para estimular la expresión de la lactato deshidrogenasa, el cual está compuesto de sacarosa 3% (30 g/L) más lactato 0.2% (2 mL/L) pH 5.5 (LGI+lac).

5.3 Mantenimiento del material biológico.

Ga. diazotrophicus PAL5 se mantuvo en medio de cultivo LGI modificado pH 5.5 (Stephan y cols., 1991), y se cultivo a 30°C, en agitación constante (200 r.p.m) y almacenadas a 4°C para su uso posterior como inóculo.

5.4 Cultivo y obtención del material biológico.

Los cultivos para obtención de células, se encontraban en agitación constante 200 r.p.m. a

una temperatura de 30 °C, en matraces con capacidad de 250-2000 ml, conteniendo 20% de medio, y matraces 2800 ml conteniendo 1 litro de medio, el uso de matraces depende de la cantidad de biomasa requerida para cada ensayo.

Las células de cualquier cultivo fueron recuperadas al final de la fase logarítmica de crecimiento, por centrifugación (8 000 r.p.m. durante 10 minutos), y lavadas de 3 a 4 veces, las células fueron ayunadas durante 3hs, resuspendiendo en solución amortiguadora inmediatamente.

Ga. diazotrophicus PAL5 fue cultivada en medio LGI con levadura 0.5%, pH 5.5, para ensayos de oximetría y potencial de membrana. Durante la recuperación de células para ensayos de oximetría, *Ga. diazotrophicus* fue lavada 3 veces con agua, resuspendiendo las células en solución amortiguadora K_2HPO_4 (fosfatos) 50 mM pH 6, a una concentración de 0.1 g/ml. En ensayos de potencial de membrana, las células fueron lavadas 4 veces, dos con agua y después puestas en ayuno en agua estéril durante 3 hs, lavándolas una vez más con agua y una última vez con EDTA 1 mM, resuspendiendo las células en solución amortiguadora MES 5 mM, pH 6, concentradas 0.1 g/ml. En ensayos de acidificación por translocación de protones, *Ga. diazotrophicus* fue cultivadas en medio LGI con 30 g de sacarosa y lactato 0.2%, pH 5.5, en la recuperación de células, fueron lavadas 2 veces con agua, puestas en ayuno en agua estéril durante 3 hs, lavándolas una vez más con agua y una última vez con EDTA 1 mM, resuspendiendo las células en solución amortiguadora MES 0.05 mM, pH 6, concentrada 2 g/ml.

5.5 Propiedades del crecimiento de *Ga. diazotrophicus*.

Los valores de densidad óptica y acidificación del medio para determinar el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en los diferentes medios de cultivos, fueron seguidos durante 60 hs, tomando muestras cada hora, midiendo absorbencia a 560 nm en un espectrofotómetro

Shimadzu UV-2401PC y midiendo pH empleando un electrodo de pH Corning Co.

5.6 Actividad de oxidasas, efecto de inhibidores, desacoplantes y fotodisociación.

Todas las actividades de oxidasas fueron determinadas polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Springs, Instruments) a 30 °C como se describe en Escamilla y cols., (1987). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 2 ml, conteniendo; solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6, células enteras 0.1 mg concentración final peso húmedo (p/h). El sustrato utilizado como donador de electrones para estimular la actividad respiratoria fue glucosa a una concentración final de 10 mM. Para inhibir la actividad de oxidasas se empleó KCN y/o CO a distintas concentraciones. La potencialización de actividad o recuperación de actividad inhibida fue llevada a cabo utilizando el desacoplante CCCP o bien, irradiando con luz blanca o, a diferentes longitudes de onda para lograr la fotodisociación de los aductos citocromo-CO.

5.6.1 Efecto de inhibición del KCN sobre la actividad respiratoria de Ga. diazotrophicus.

Células enteras fueron incubadas durante 2 min en KCN a concentraciones crecientes 0.25-50 μ M, iniciando la actividad respiratoria con glucosa.

5.6.2 Efecto de inhibición del CO sobre la actividad respiratoria de Ga. diazotrophicus.

Células enteras incubadas durante 2 min en buffer de fosfatos 50 mM pH 6 saturado con CO (concentraciones crecientes 0-100% *complementado con buffer sin CO), glucosa para iniciar la actividad respiratoria.

5.6.3 Efecto complementario de inhibición por KCN y CO sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*.

A) Células enteras incubando durante 2 min en buffer de fosfatos 50 mM pH 6 saturado con CO (0-100%) con KCN (10 μ M), la actividad respiratoria se inició con glucosa. **B)** Células enteras incubando durante 2 min en buffer de fosfatos 50 mM pH 6 saturado con CO (100%) con KCN (0-50 μ M), la actividad respiratoria se inició con glucosa.

5.6.4 Efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. Sin inhibidores y con inhibidores de la respiración.

Se ensayó el efecto que tenía el desacoplante CCCP (10-200 μ M) agregando después de 2 min de actividad respiratoria iniciada con glucosa. A células enteras tratadas con KCN (10 μ M) o CO (100%), después de 2 min de actividad respiratoria iniciada con glucosa, se les agregó CCCP 10-200 μ M.

5.6.5 Titulación con CCCP sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* tratada con KCN 10 μ M.

Células enteras incubando durante 2 min en KCN, después de 2 min de actividad respiratoria iniciada con glucosa, se agregó CCCP 10-200 μ M.

5.6.6 Inhibición de la respiración por concentraciones crecientes de KCN en ausencia y en presencia de CCCP.

Células enteras incubando durante 2 min en KCN (0.25-50 μ M), añadiendo CCCP 40 μ M después de 3 min de actividad respiratoria iniciada con glucosa.

5.6.7 Espectro de acción de la actividad respiratoria de Ga. diazotrophicus inhibida completamente con KCN + CO.

Registramos el espectro de absorbencia a diferentes filtros de luz, para ensayar el efecto que tiene la irradiación a diferentes longitudes de onda sobre preparaciones de células previamente tratadas con KCN, CO y la combinación de ambos inhibidores. Cada uno de los espectros de acción realizados con diferentes filtros de luz, se llevaron a cabo incubando las células durante 2 min en 10 μ M de KCN + CO 100%, iniciando la respiración con glucosa. La actividad fue registrada por 2 min en ausencia de luz y a continuación se emitió luz y se registro la actividad resultante.

5.6.8 Espectro de acción y desacoplamiento de la actividad respiratoria de Ga. diazotrophicus inhibida parcialmente y completamente con KCN y CO.

Se ensayó el efecto que tenía la irradiación con luz blanca sobre la preparación de células previamente inhibidas con KCN, CO y la combinación de ambos inhibidores de acuerdo al siguiente protocolo: Las células (0.2 mg p/h) fueron incubadas en ausencia o presencia de el (los) inhibidor (es) señalado(s). La respiración se inició con glucosa y al cabo de 2 min de registro, la preparación se mantuvo irradiada con luz blanca. El cambio producido durante la iluminación fue registrado. En un experimento final en presencia de KCN y CO y bajo iluminación se probó el efecto de la adición de CCCP.

5.7 Acidificación por translocación de protones.

El equipo utilizado para medir los cambios de pH fue, un Titulador; TIM 856, (Radiometer analytical). La mezcla de la reacción se ajustó a un volumen final de 20 ml, conteniendo; solución amortiguadora MES 0.05 mM pH 6, células enteras 150 mg p/h. Los sustratos utilizado como donadores de electrones para estimular la actividad respiratoria fueron lactato 45 mM o glucosa 10 mM, concentraciones finales. Para inhibir la actividad

respiratoria se empleó KCN 10 μ M concentración final.

5.8 Potencial de membrana.

Para la determinación del potencial transmembranal se empleó anaranjado de safranina midiendo el curso temporal en la diferencia de absorbencia a dos longitudes de onda (511-533 nm), en un espectrofotómetro OLIS-SLM DW 2000 en modo dual con agitación constante (Akerman y Wikstrom, 1976). El anaranjado de safranina es un colorante catiónico que cambia de color al interactuar con la membrana mitocondrial en respuesta a la generación de un potencial transmembranal (negativo al interior) (Guerrero, S. 2006). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 3 ml, conteniendo; solución amortiguadora MES 5 mM pH 6, safranina 4 μ M concentración final y células íntegras (4 mg peso húmedo). El sustrato utilizado como donador de electrones para estimular la actividad respiratoria fue glucosa a una concentración final de 10 mM. Para inhibir la actividad respiratoria se empleó KCN 10 μ M, concentración final. Para eliminar el potencial transmembranal creado, utilizamos desacoplante CCCP 3 mM, concentración final.

VI. RESULTADOS.

6.1 Propiedades de crecimiento de *Ga. diazotrophicus*.

Ga. diazotrophicus PAL5 crece en agitación constante (200 r.p.m), a 30 °C, en medio de cultivo LGI modificado pH 5.5 (Stephan y cols., 1991). Con fines en obtención de biomasa el medio LGI modificado, fue enriquecido con extracto de levadura 0.5% (5 g/L) pH 5.5. Otro medio LGI modificado, fue empleado para estimular la expresión de la lactato deshidrogenasa, el cual está compuesto de sacarosa 3% (30 g/L) más lactato 0.2% (2 mL/L) pH 5.5. Condiciones necesarias para la realización de los diferentes ensayos.

En los dos medios de cultivo empleados, las células fueron recuperadas al final del crecimiento logarítmico. La curva de crecimiento realizada para *Ga. diazotrophicus* en medio LGI+lev (fig. 3), nos muestra una fase de adaptación (fase lag); la cual dura aproximadamente hasta la hora 5, dando inicio a una fase logarítmica (fase log), que termina entre la hora 19 y 24, a partir de este intervalo inicia la fase estacionaria. Por lo tanto, los ensayos que se llevaron a cabo con células crecidas en medio LGI+lev, fueron cosechadas a las 22 hrs de crecimiento.

En la curva de crecimiento realizada para *Ga. diazotrophicus* en medio LGI+lac (fig. 3), podemos observar una curva bifásica, con una fase lag; que dura aproximadamente hasta la hora 8, dando inicio a una primer fase log que se detiene en la hora 17, a partir de esta hora observamos una fase de latencia que finaliza en la hora 23, una segunda fase log se observa hasta la hora 28, seguida de la fase estacionaria.

El comportamiento bifásico en una curva de crecimiento puede deberse a la utilización secuencial de un nutriente de rápida utilización (crecimiento rápido), seguida de un nutriente de lenta utilización (crecimiento lento). La fase de latencia que existe entre una y otra fase se debe a el cambio de metabolismo (Antúnez, 2007).

Los ensayos llevados a cabo con células crecidas en medio LGI+lac fueron cosechadas a las 30 hrs de crecimiento.

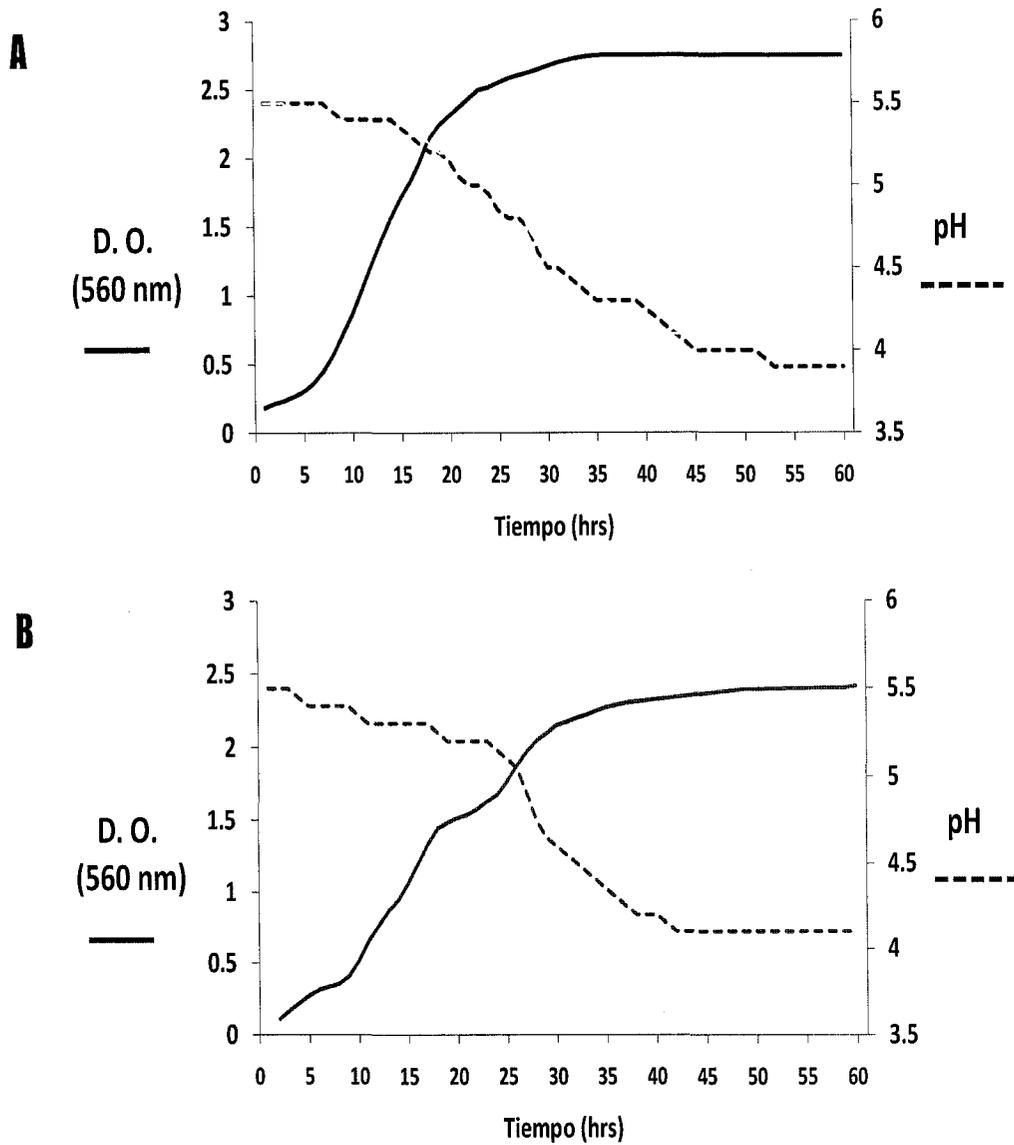


Fig. 3 Propiedades de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* PAL5. Cultivada a 30 °C en agitación constante (200 r.p.m) durante 60 hrs, en medio (A) LGI modificado, enriquecido con levadura 0.5%, pH 5.5 y en medio (B) LGI modificado, sacarosa 30 g/L y lactato 0.2% , pH 5.5

6.2 Inhibidores de la actividad respiratoria de *Ga. Diazotrophicus*.

La actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* PAL5 ha sido inhibida con KCN a diferentes concentraciones. Este inhibidor actúa como ligando alternativo al O₂ y es capaz de unirse con alta afinidad al Cu²⁺ del sitio activo de las oxidasas de la familia hemo-cobre, con menor afinidad, al Fe²⁺ de los hemos de otro tipo de oxidasas, siempre actuando en el sitio de unión al oxígeno (Jünemann, 1997). En células enteras de *Ga. diazotrophicus*, se ha titulado la actividad respiratoria para varios sustratos, empleando KCN, observando un comportamiento bifásico de la actividad respiratoria, revelando la presencia de al menos dos oxidasas terminales en la cadena respiratoria, una sensible y otra resistente a KCN, como fue reportado anteriormente por Flores-Encarnación y cols., 1999; Lee, S. 2005; Martínez, S. K. 2005; González, B. y cols., 2006 y Antúnez, E. 2007.

Mencionamos que *Ga. diazotrophicus* fue crecida en medio LGI+lev con la finalidad de obtener mayor biomasa, consideramos que los aminoácidos presentes en la levadura agregada para enriquecer el medio LGI, no afectan la fijación de nitrógeno, por lo tanto la expresión de las oxidasas terminales. Para comprobar esto, la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* crecidas en medio LGI+lev fue titulada con KCN 0-50 μM. Los resultados obtenidos (fig. 4), muestran una cinética bifásica de la actividad respiratoria, sin importar el enriquecimiento del medio con levadura. Al menos dos oxidasas terminales continúan siendo encargadas de la actividad respiratoria, una oxidasa terminal sensible a bajas concentraciones de KCN que tiene una I₅₀ = 0.75 μM, y una segunda oxidasa que es muy activa a 50 μM de KCN, la oxidasa sensible a KCN representa el 60% de la respiración total (fig. 4). González, B., en el año 2006, reporta la oxidasa terminal sensible a cianuro como una quinol oxidasa *bb₃*, y la oxidasa terminal resistente a KCN como una quinol oxidasa *ba₃*, como únicas oxidasas encargadas de la respiración en *Ga. diazotrophicus*.

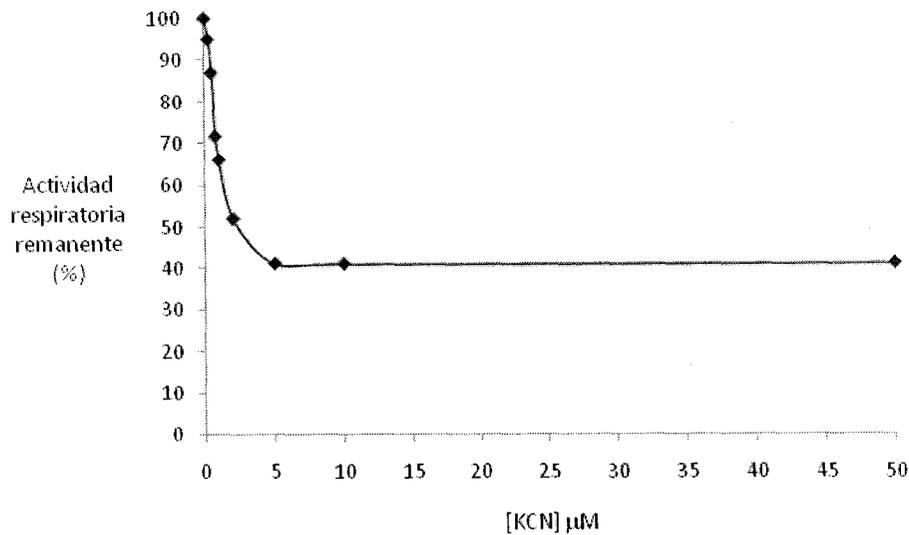


Fig. 4. Efecto de inhibición del KCN sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*.

Una vez obtenida la cinética de inhibición con KCN, realizamos una cinética de titulación de la actividad respiratoria en células enteras de *Ga. diazotrophicus*, con otro inhibidor de oxidasas terminales. El CO actúa sobre la citocromo oxidasa, reaccionando con la forma reducida del citocromo de alto spin. El CO inhibe el transporte de electrones cuando se combina directamente con el citocromo terminal e impide la unión del oxígeno. Este inhibidor, había sido anteriormente empleado sobre membranas de *Ga. diazotrophicus*, mostrando efecto de inhibición sobre la actividad respiratoria (Martínez, 2005), por lo cual decidimos observar el efecto que tiene sobre células enteras de *Ga. diazotrophicus*.

Una solución amortiguadora de fosfatos fue saturada por burbujeo con CO, diferentes volúmenes de la solución fueron usados para dar concentraciones de CO entre el 0 y cercano al 100% de saturación. Como resultado observamos un comportamiento bifásico de la actividad respiratoria (fig. 5), similar al ensayo de titulación con KCN, ya descrito. Este resultado nos indica la presencia de al menos dos oxidasas terminales en la actividad respiratoria, una oxidasa sensible a CO, y una segunda oxidasa que se mantiene activa a la concentración máxima experimental de CO. La oxidasa sensible a CO representa el 40% de la respiración total.

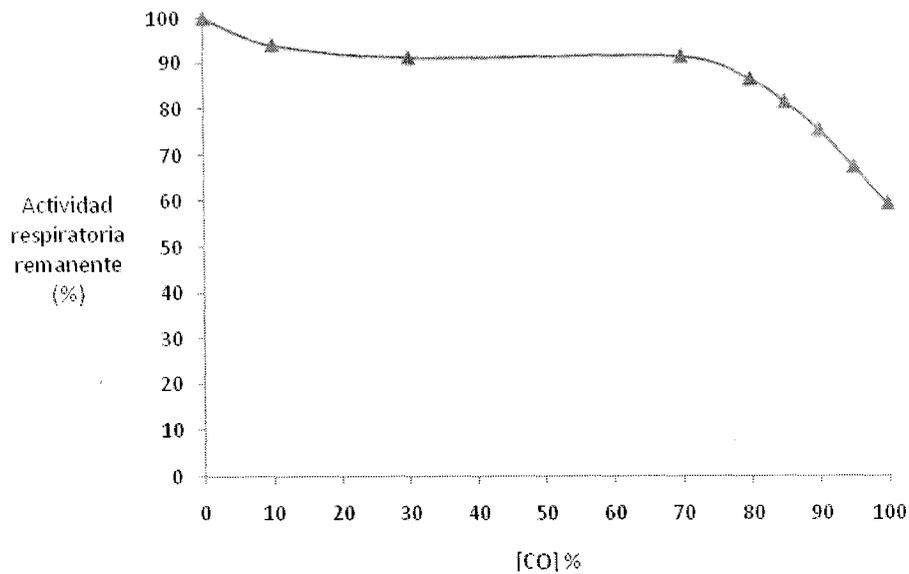


Fig. 5. Efecto de inhibición del CO sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*.

En la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* encontramos componentes enzimáticos sensible y resistente a KCN y CO. Para definir cómo actúan los 2 inhibidores sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, se probó el efecto de cada uno, sobre preparaciones previamente tratadas por el otro inhibidor (fig. 6). En este experimento observamos, que el KCN y el CO (viceversa) se comportan de forma aditiva, inhibiendo juntos, casi totalmente la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. El efecto de cada uno de los inhibidores por separado fue aproximadamente del 50% de la respiración. Es importante resaltar, que el resultado de este experimento, nos indica que los inhibidores actúan en sitios diferentes de la cadena respiratoria, esto es, en cada una de las dos presuntas oxidasas de *Ga. diazotrophicus*.

Concluimos, que la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos oxidasas terminales, que actúan como entidades proteínicas individuales en la cadena respiratoria, una quinol oxidasa bb_3 la cual se inactiva empleando 5 μ M de KCN y una quinol oxidasa ba_3 que se inactiva empleando CO.

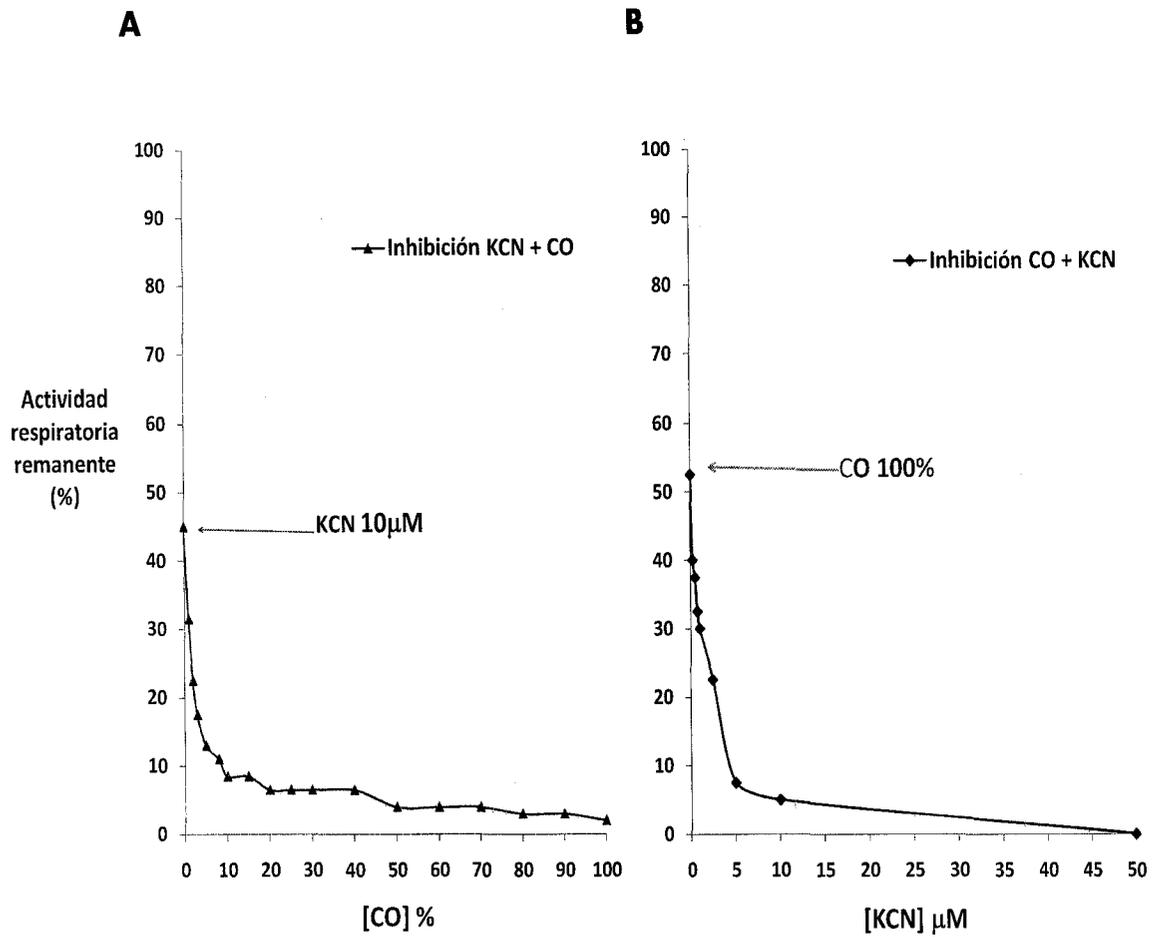


Fig. 6. Efecto complementario de inhibición por KCN y CO sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. (A) Inhibición KCN + CO. (B) Inhibición CO + KCN.

6.3 Efecto del desacoplante CCCP en la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*.

Tener un inhibidor para cada una de las oxidasas de *Ga. diazotrophicus* es una ventaja, ya que nos facilitó su manipulación. Permittiéndonos mantener a una oxidasa o ambas, activa(s) o inactiva(s), según las necesidades en ensayos posteriores.

Hasta este momento sabemos que la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos oxidasas terminales que reaccionan de manera independiente a dos inhibidores, una quinol oxidasa bb_3 sensible a cianuro, resistente a monóxido, y una quinol oxidasa ba_3 resistente a cianuro, sensible a monóxido. Por lo tanto, la transferencia de electrones hasta el oxígeno y la translocación de protones para la formación de un gradiente protón-motriz, debe de estar regulada de manera independiente por cada una de estas dos oxidasas.

Existen reactivos que desacoplan la respiración de la fosforilación, eliminando el gradiente protón-motriz. Entre estos desacoplantes químicos encontramos un grupo de compuestos relacionados con el carbonilcianuro-fenilhidrazona, como es el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos desacoplantes son ácidos débiles con propiedades hidrofóbicas que les permite difundir fácilmente a través de la membrana. Una vez que la forma protonada ha cruzado la membrana puede liberar el protón (Nelson y Cox., 2005).

Se propuso probar el efecto del desacoplante CCCP sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* (células enteras). De la misma forma, en un ensayo donde la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* se encontrará tratada con KCN inactivando la oxidasa bb_3 , y otro ensayo, donde la actividad respiratoria se encontrará tratada con CO inactivando la oxidasa ba_3 (fig. 7). En el ensayo donde la actividad respiratoria se encuentra sin inhibidores, la utilización del CCCP no mostró cambio alguno sobre la actividad respiratoria (fig. 7 B), consideramos que el efecto del desacoplante no es observado debido a un enmascaramiento por la actividad de una oxidasa desacoplada. El

efecto de desacoplamiento en *Ga. diazotrophicus* se manifestó para la vía oxidativa resistente a cianuro, observando un incremento en la actividad de la única oxidasa activa, la quinol oxidasa ba_3 (fig. 7 D), En el caso de la vía oxidativa (oxidasa bb_3) sensible a cianuro, resistente a CO, el efecto de desacoplamiento no fue observado (fig. 7-F).

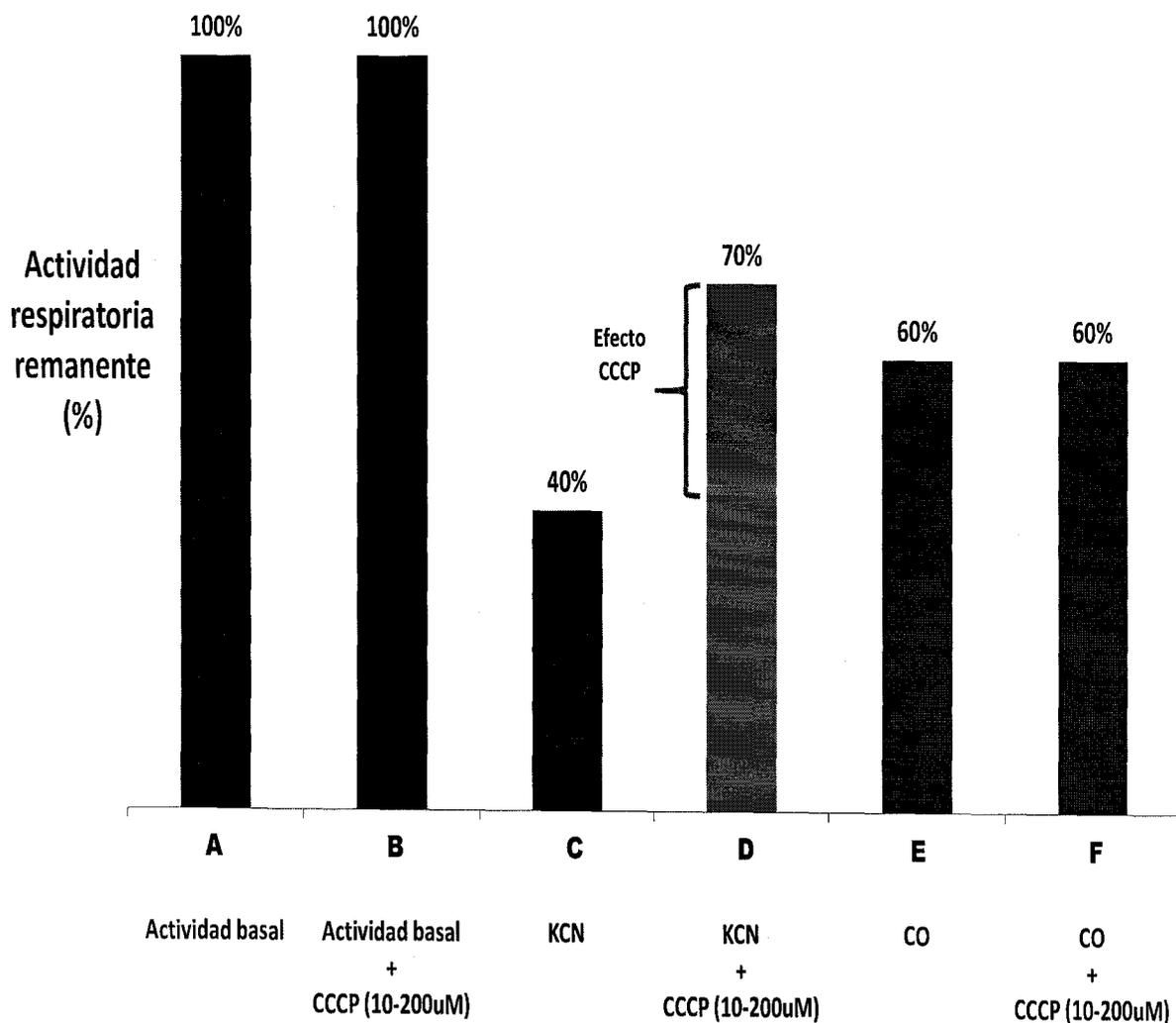


Figura 7. Efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* sin inhibidores y con inhibidores; (A) Actividad basal. (B) Actividad basal + CCCP 10-200 μM. (C) Actividad respiratoria inhibida con KCN 10 μM. (D) Actividad respiratoria inhibida con KCN 10 μM + CCCP 10-200 μM. (E) Actividad inhibida con CO. (F) Actividad inhibida con CO + CCCP 10-200 μM.

En el ensayo anterior, donde la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* se encuentra parcialmente inhibida con KCN (oxidasa *bb*₃ inactiva), observamos un cambio sobre la actividad respiratoria registrada, producto del efecto del CCCP (fig. 7-D). Este ensayo, nos permitió definir la concentración donde el desacoplante del CCCP es más eficiente. El máximo desacoplamiento ocurre en las concentraciones de 40 y 80 μ M de CCCP (fig. 8-A), observando una recuperación del 50% de la actividad inhibida (fig. 8-B). El CCCP se preparó en solución orgánica con dimetil sulfóxido (DMSO), el cual, a volúmenes superiores a 50 μ l causa un efecto tóxico en la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* (experimentos no mostrados), así, en los ensayos posteriores el CCCP (40 μ M final) fue añadido en un volumen de 20 μ l de DMSO.

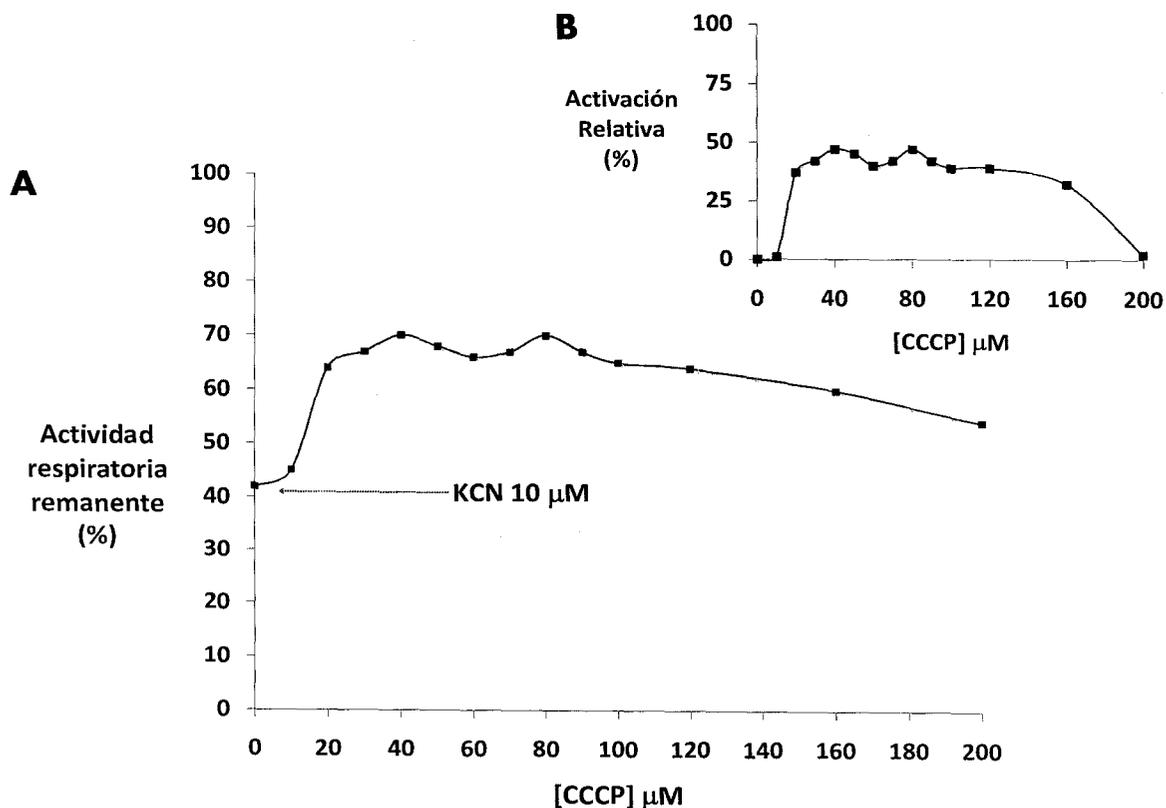


Fig. 8. (A) Titulación con CCCP sobre la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* tratada con KCN 10 μ M. (B) Activación relativa (%) del CCCP sobre la actividad respiratoria inhibida.

6.3.1 Efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria de la oxidasa ba_3 .

Una vez definida la concentración donde el efecto desacoplante del CCCP es más eficiente, realizamos una cinética de inhibición con cianuro agregando 40 μM de CCCP (fig. 9). En este experimento se muestra claramente la inhibición de la vía quinol oxidasa bb_3 sensible a cianuro. El efecto desacoplante del CCCP resultó en un incremento del 40 al 70% de la actividad respiratoria. Al ser la oxidasa ba_3 resistente a cianuro la única oxidasa activa, pensamos que el efecto del desacoplante incide directamente sobre la vía quinol oxidasa ba_3 , incrementando 30% la actividad registrada en células tratadas con KCN. Basados en este resultado consideramos que la quinol oxidasa ba_3 (resistente a cianuro) funciona en forma acoplada, actuando activamente en la formación del gradiente protón-motriz derivado de la respiración de *Ga. diazotrophicus*.

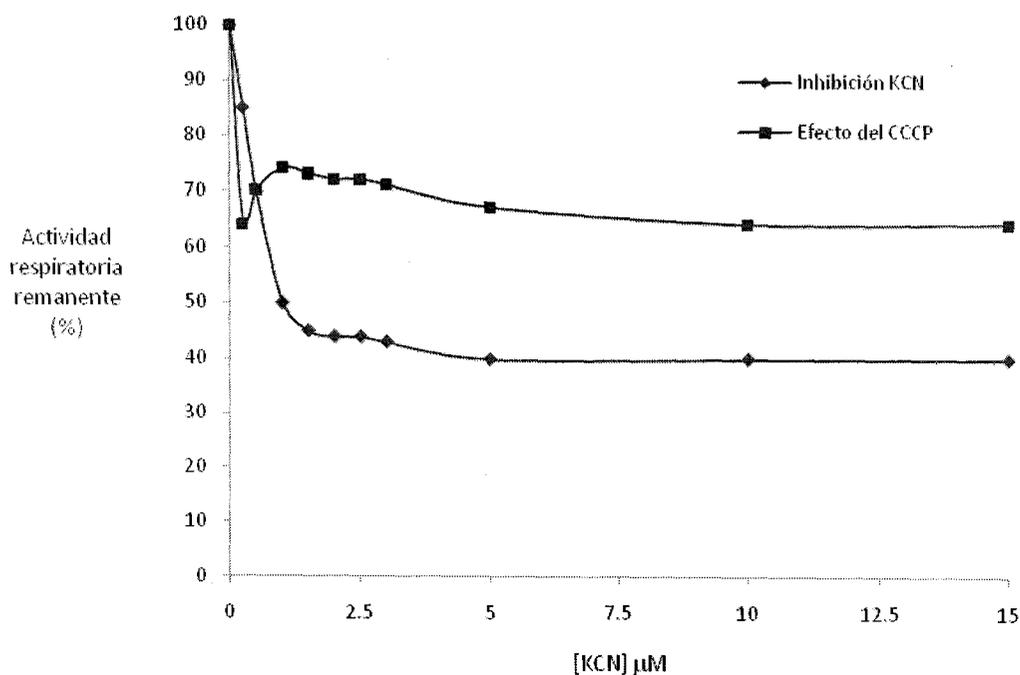


Fig. 9. Cinética de la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, inhibición por concentraciones crecientes de KCN en ausencia (\blacklozenge) y en presencia de CCCP 40 μM (\blacksquare).

6.4 Espectros de acción, reactivación por luz visible de la actividad respiratoria inhibida con KCN y CO.

Los resultados de los experimentos anteriores nos sugieren la existencia de 2 vías en el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*: una vía acoplada y otra no acoplada. La especificidad de inactivación del CO sobre la oxidasa ba_3 y la nula respuesta al efecto desacoplante del CCCP nos sugieren que la vía quinol oxidasa bb_3 no está acoplada. En contraste la especificidad de inactivación del cianuro sobre la oxidasa bb_3 y la manifestación del efecto desacoplante del CCCP; nos sugiere fuertemente que la quinol oxidasa ba_3 es la supuesta vía acoplada a la generación del gradiente protón-motriz.

La pregunta que surgió hasta este momento fue, ¿Cómo podemos confirmar que la vía quinol oxidasa ba_3 es la involucrada en dicho acoplamiento? Para contestar esta pregunta, debemos recordar que anteriormente, se ensayó el efecto desacoplante del CCCP en células donde la actividad respiratoria se encontraba parcialmente inhibida con CO. Donde el resultado fue nulo, ya que no observamos reactivación alguna. Esto es, la oxidasa ba_3 es inactivada por el CO y al mismo tiempo, mayormente responsable por la formación del gradiente protón-motriz. Contestando a la pregunta, propusimos reactivar dicha vía y observar si generábamos alguna respuesta al CCCP.

Sabemos que el CO enlazado a citocromos puede liberarse por irradiación con luz visible. En algunas ocasiones, cuando un fotón golpea una molécula, la energía proveniente del fotón provoca que la molécula se separe, fenómeno conocido como fotodisociación. La fotodisociación de los agregados moleculares CO-oxidasa, tras la absorción de uno o más fotones, reactivaría a la oxidasa ba_3 , permitiendo llevar a cabo el flujo de electrones al O_2 , recuperando actividad respiratoria previamente inhibida por el CO. Propusimos, por medio de fotoirradiación liberar la actividad respiratoria inhibida por CO, que desde luego correspondería a la quinol oxidasa ba_3 .

En los experimentos de la figura 10, nos enfocamos a observar la fotólisis de los agregados moleculares CO-oxidasa a diferentes longitudes de onda obtenidas por medio de filtros de diferentes colores, sobre células inhibidas completamente por la combinación de KCN y CO. Como se puede apreciar en la figura 10, la fotodisociación de los agregados moleculares CO-oxidasa, manifiesta reactivación con luz de todos los colores probados, desde luego, la mayor eficiencia se obtuvo con su combinación en la "luz blanca" recuperando el 20% de actividad respiratoria basal de *Ga. diazotrophicus*.

Espectros de fotodisociación a 77 K demuestran la fotólisis de agregados moleculares del citocromo a-CO con valles en 428 y 591 nm y picos en 444 y 610 nm (González, 2006). Nuestros resultados concuerdan con el espectro reportado por González y cols. Pues nosotros obtuvimos la máxima reactivación con la luz amarilla (λ_{max} a 440 nm), azul (λ_{max} a 624 nm) y desde luego, con la luz blanca, que es la combinación de todos los colores, coincidiendo así el espectro de absorción del aducto cit. *ba₃-CO* con el espectro de acción de la respiración inhibida por CO.

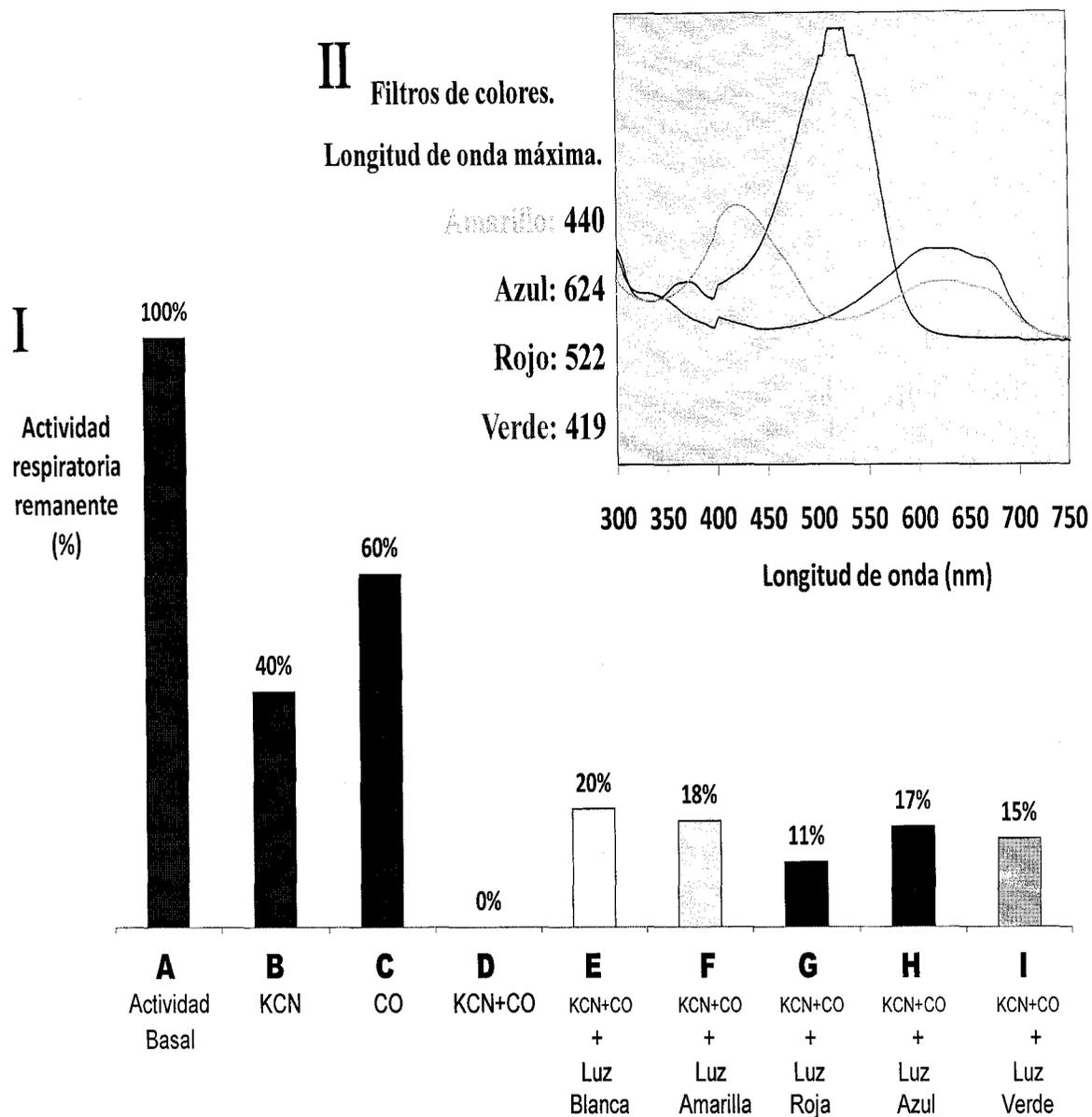


Fig. 10. I. Espectro de acción de la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* inhibida completamente con KCN y CO. (A) Actividad basal. (B) Actividad inhibida con KCN 10 μ M. (C) Actividad inhibida con CO 100%. (D) Actividad inhibida con KCN + CO (de la misma forma en los ensayos E, F, G, H, I). (E) Irradiación con luz blanca. (F) Irradiación con luz amarilla. (G) Irradiación con luz roja. (H) Irradiación con luz azul. (I) Irradiación con luz verde. II. Espectros de absorción de los filtros de colores empleados.

6.4.1 Espectros de acción, reactivación por luz visible y CCCP de la actividad respiratoria inhibida parcial y completamente con KCN y CO.

Para corroborar que la fotólisis se da específicamente en los aductos formados por el CO con la oxidasa ba_3 , llevamos a cabo un experimento donde células inhibidas con KCN fueron irradiadas con luz blanca. Demostrando que no hay cambio en la actividad registrada (fig. 11-B, 11-C). En contraste, las células inhibidas con CO e irradiadas con luz blanca (fig. 11-E), resultó en un incremento significativo de la actividad. Por lo tanto el efecto de fotodisociación se manifiesta únicamente en los agregados moleculares formados por CO-oxidasa ba_3 .

Basados en lo anterior, los espectros de acción nos indican que la oxidasa ba_3 está implicada en la formación de aductos con CO y su posterior reactivación por luz. En este momento es posible probar si el CCCP presenta una vez más efecto desacoplante en esta vía oxidativa. Al probar si el CCCP tiene efecto activador adicional, sobre células inhibidas por CO y reactivadas con luz, no encontramos ningún cambio en la actividad registrada (fig. 11-F). Creemos que en este experimento, la actividad de la quinol oxidasa bb_3 (desacoplada) no afectada por el CO, enmascara el efecto del desacoplante, como ocurrió al probar el efecto del CCCP sobre la actividad respiratoria basal (sin inhibidores) de *Ga. diazotrophicus* (fig. 7-B). Esto fue corroborado, al realizar un experimento donde las dos vías están totalmente inactivadas (inhibición con KCN + CO), 20% de actividad fue recuperada al irradiar con luz blanca (fotólisis de ba_3 -CO) y sobre esto, el CCCP causó una reactivación adicional del 15% (efecto desacoplante del CCCP sobre la vía quinol oxidasa ba_3) para dar un total de 35% de actividad (fig. 11-I). Lo cual nos corrobora que la vía quinol oxidasa ba_3 de la respiración de *Ga. diazotrophicus*, está acoplada al gradiente protón-motriz.

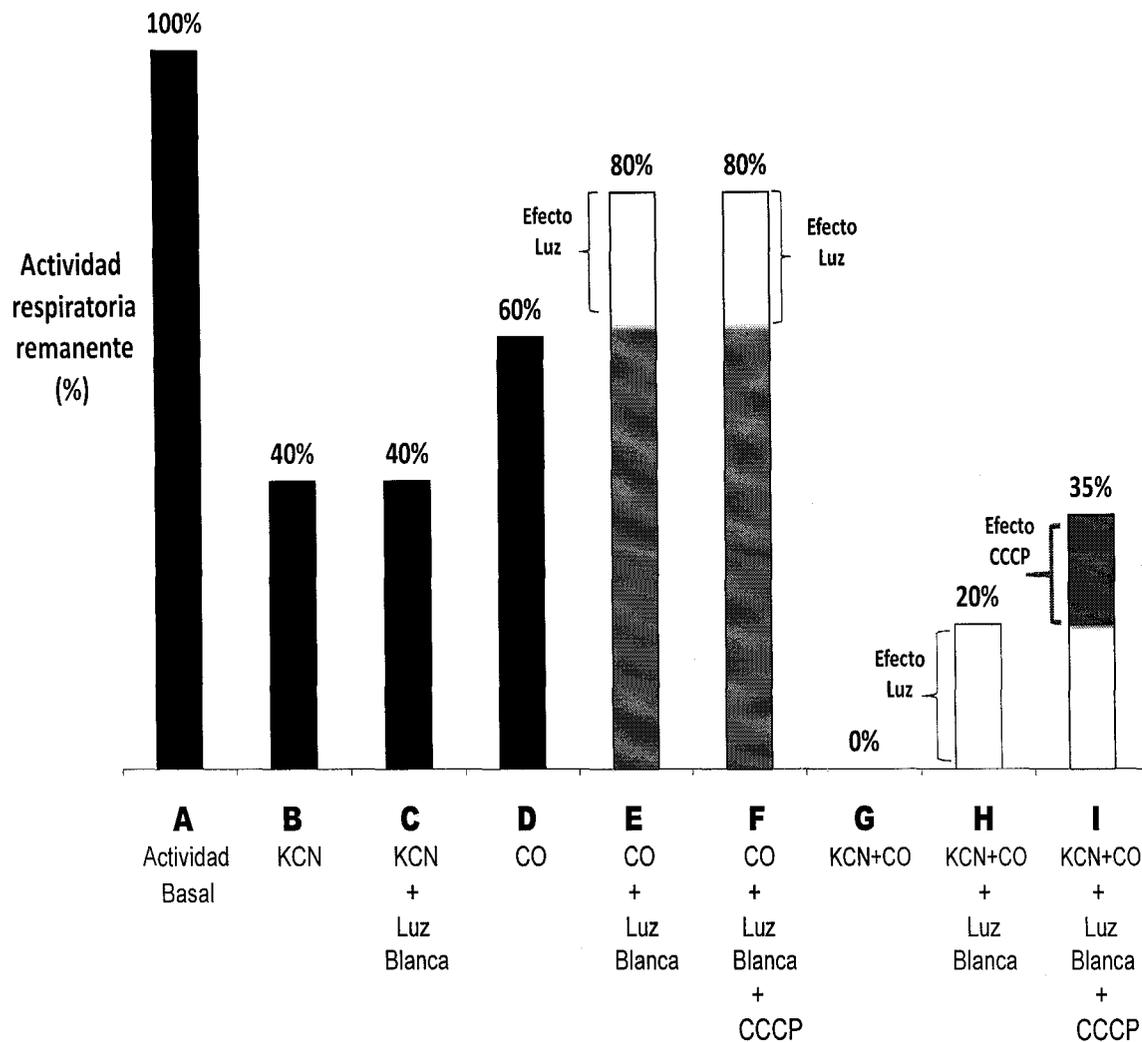


Fig. 11 Espectro de acción y desacoplamiento de la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* inhibida parcialmente y completamente con KCN y CO. **(A)** Actividad basal. **(B)** Actividad inhibida con KCN 10 μ M. **(C)** Actividad inhibida con KCN, irradiada con luz blanca. **(D)** Actividad inhibida con CO 100%. **(E)** Actividad inhibida con CO, irradiada con luz blanca. **(F)** Actividad inhibida con CO, irradiada con luz blanca + CCCP 40 μ M. **(G)** Actividad inhibida con KCN + CO. **(H)** Actividad inhibida con KCN + CO, irradiada con luz blanca. **(I)** Actividad inhibida con KCN + CO, irradiada con luz blanca + CCCP 40 μ M.

6.5 Acidificación por translocación de protones.

La acidificación del medio está íntimamente vinculada con la actividad respiratoria de las bacterias en general; esto es especialmente cierto en el caso de las bacterias del ácido acético, debido a la enorme tasa respiratoria resultante de la fermentación oxidativa de azúcares y alcoholes. Las deshidrogenasas membranales son las encargadas de alimentar a la cadena respiratoria. Los sustratos oxidados por estas enzimas generan como productos ácidos orgánicos, como ácido acético, ácido glucónico, etc., que se depositan en el medio de cultivo provocando su acidificación (Matsushita y cols., 1994).

La oxidación de la glucosa por *Ga. diazotrophicus* conduce a una gran acidificación del medio, debido principalmente a dos factores; 1) La enorme tasa respiratoria evocada, siendo la glucosa deshidrogenasa la enzima más activa del sistema respiratorio de esta bacteria. 2) La oxidación de la glucosa ocurre en el espacio periplásmico donde se deposita el ácido glucónico, el cual se disocia causando una acidificación electrogénica en el medio. Esta acidificación se observó en nuestro experimento (fig. 12-A), donde la oxidación de la glucosa hizo caer el pH del medio en aproximadamente 2 unidades. En el mismo experimento (fig. 12 A) se registró la acidificación después de inactivar a la oxidasa bb_3 con KCN $10\mu\text{M}$, donde observamos que el proceso de acidificación fue más lento y se alcanzó un punto final ligeramente menos ácido (0.5 unidades de pH), lo cual es comprensible pues en presencia de KCN $10\mu\text{M}$ la actividad respiratoria es llevada a cabo únicamente por la oxidasa ba_3 que representa el 50% de la actividad potencial de la célula y cuya actividad es regulada por el gradiente protón-motriz.

En contraste, la oxidación del lactato por *Ga. diazotrophicus* ocurre a una velocidad baja, acidificando de manera electroforética, esto es, dependiente de la translocación de protones al medio. Lo cual es explicable, ya que la oxidación del lactato se da en la cara citoplasmática de la membrana. En la figura 12-B, observamos cómo, a pesar de que la actividad respiratoria es llevada a cabo por las dos oxidasas, la acidificación del medio no

es comparable con la acidificación por la oxidación de la glucosa. La importancia de este experimento, radica en que existe una ligera acidificación electroforética, el pH baja 0.064 U de pH (100% de acidificación) al oxidar el lactato. Es importante hacer notar que cuando la respiración fue inhibida parcialmente con KCN 10 μ M, cancelando así la función de la oxidasa *bb*₃, la acidificación fue 0.054 U de pH, al inactivar a la oxidasa *bb*₃ la acidificación disminuyó 16%, lo cual sugiere fuertemente que la oxidasa *ba*₃, resistente a cianuro, es la oxidasa mayormente responsable (84%) de la acidificación del medio por translocación de protones, y así, la oxidasa acoplada en la respiración de *Ga. diazotrophicus*.

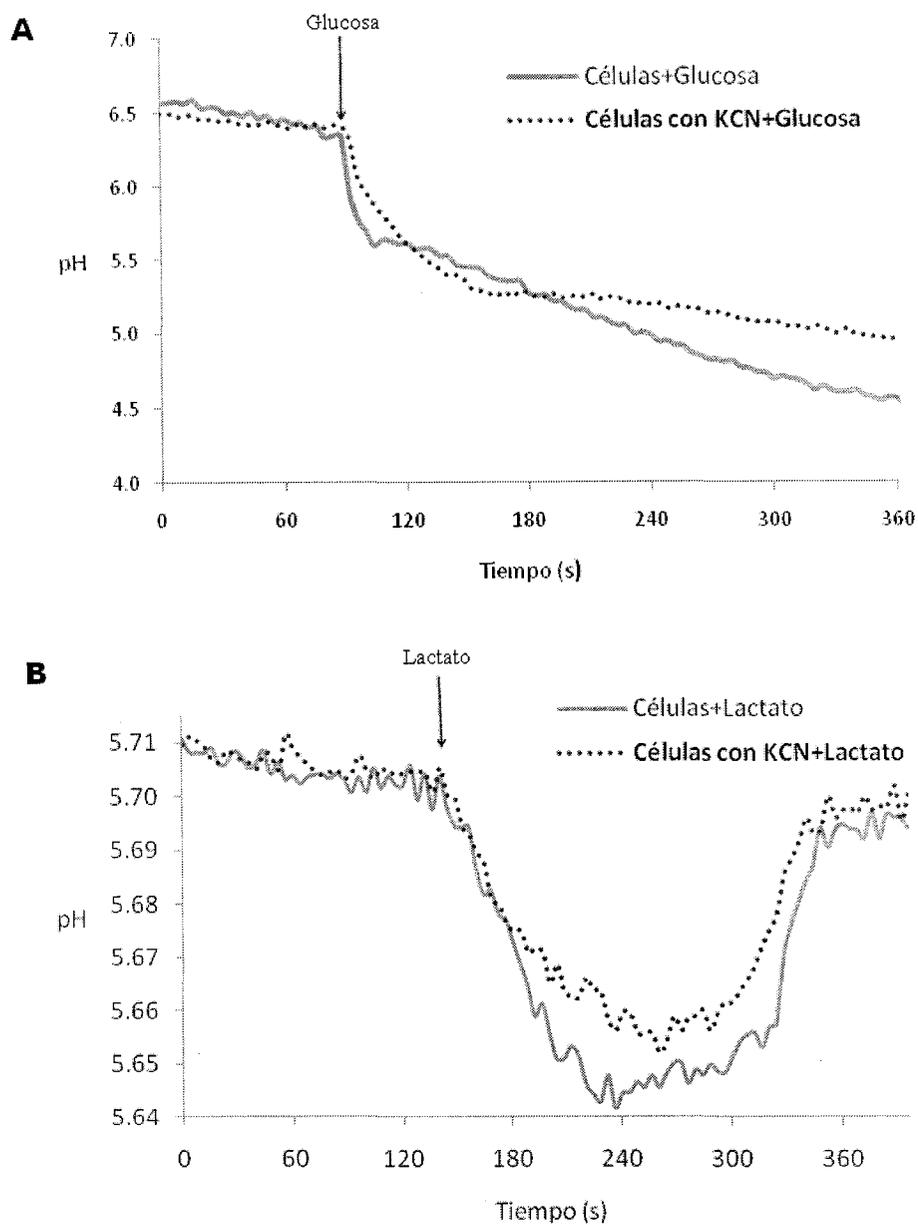


Fig. 12. (A —) Acidificación del medio por la oxidación de glucosa en la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. (A) Actividad respiratoria parcialmente inhibida con KCN 10 μ M. (B —) Acidificación del medio por la oxidación del lactato en la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. (B) Actividad respiratoria parcialmente inhibida con KCN 10 μ M.

6.6 Potencial transmembranal.

El desplazamiento de protones tiene dos consecuencias principales; 1) generar un gradiente de pH a través de la membrana plasmática, con un valor de pH mayor interno. 2) generar una diferencia de voltaje (ΔV) a través de la membrana plasmática (potencial de membrana), negativo en el interior y positivo en el exterior. El gradiente de pH (ΔpH) empuja a los H^+ hacia adentro y a los OH^- hacia afuera de la membrana interna, reforzando así el efecto del potencial de membrana que actúa atrayendo hacia el interior a cualquier ion positivo y empujando hacia el exterior a cualquier ion negativo. En conjunto, estos dos gradientes constituyen la fuerza protón-motriz.

Entendiendo que nuestra oxidasa ba_3 es la principal oxidasa acoplada al transporte de protones en el sistema respiratorio de *Ga diazotrophicus*, decidimos llevar a cabo un experimento donde pudiéramos observar la creación de un potencial transmembranal manteniendo únicamente activa a esta oxidasa (vía quinol oxidasa ba_3).

Para determinar el potencial transmembranal se empleó anaranjado de safranina midiendo la diferencia de absorbencia a dos longitudes de onda (511-533 nm) en un espectrofotómetro (Akerman y Wikstrom, 1976). El anaranjado de safranina es un colorante catiónico que cambia de color al interactuar con la membrana mitocondrial al generarse un potencial transmembranal (Guerrero, 2006).

En la figura 13, se muestra como al añadir células a un medio con glucosa como sustrato, en presencia de KCN y safranina, es clara la formación de un potencial transmembranal. De la misma forma, observamos claramente como al añadir el desacoplante CCCP el gradiente es abatido por completo, corroborando los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis.

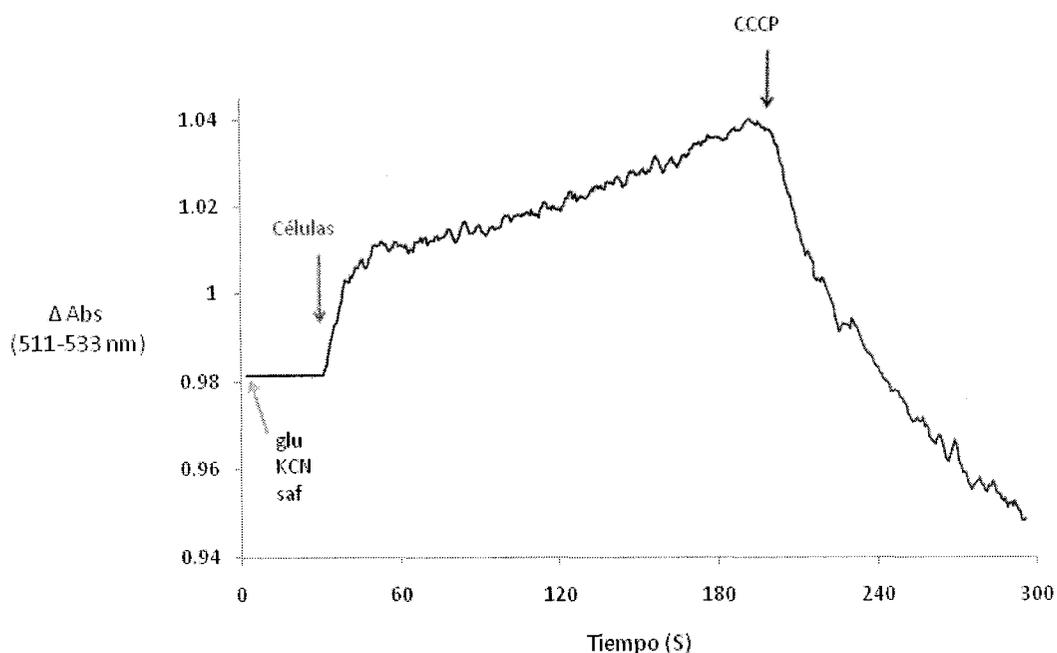


Fig. 13 Potencial transmembranal de la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* parcialmente inhibida con KCN 10 μ M determinado por el método de safranina.

Integrando los resultados del presente trabajo corroboramos que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* está ramificado, contando con dos vías de transporte de electrones. Concluimos que; la quinol oxidasa tipo bb_3 funciona de manera no acoplada con la formación del gradiente protón-motriz y la quinol oxidasa de tipo ba_3 funciona de manera acoplada con la formación del dicho gradiente.

VII. DISCUSIÓN.

7.1 *La quinol oxidasa ba₃ de Ga. diazotrophicus esta acoplada al gradiente protón-motriz y la quinol oxidasa bb₃ funciona de manera desacoplada a dicho gradiente.*

González, B. (2006) reportó, que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos oxidasas terminales; una quinol oxidasa *ba₃* resistente a cianuro y una quinol oxidasa *bb₃* sensible a este inhibidor. Nosotros consideramos que al menos una de estas dos oxidasas, debe estar desacoplada a la formación de un gradiente protón-motriz, lo que le permitiera disminuir la concentración del oxígeno disuelto, independientemente de la existencia de un gradiente de protones saturado, manteniendo la protección respiratoria. De la misma forma esperábamos encontrar una de las dos oxidasas acoplada a la generación de un gradiente protón-motriz, que abasteciera el ATP requerido para la fijación de nitrógeno, así como otros procesos metabólicos.

El efecto diferencial de inhibición con KCN y CO para distintas enzimas concordó con lo previamente reportado (Flores-Encarnación y cols., 1999; Lee, S. 2005; Martínez, S. K. 2005; González, B. y cols., 2006 y Antúnez, E. 2007) mostrando cinéticas bifásicas de la actividad respiratoria (fig. 4 y fig. 5). Observamos que la inhibición con KCN y CO se comporta de forma aditiva, inhibiendo casi totalmente la actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus*, a diferencia de lo reportado en membranas (Martínez, S.K., 2005; González, B., 2006), donde la inhibición aditiva no es total. Con ello demostrábamos que cada oxidasa puede ser inhibida de manera independiente, con KCN o CO.

El consumo de O₂ por minuto en un sistema acoplado al gradiente protón-motriz aumenta cuando dicho gradiente es disipado. Entendiendo que un desacoplante aumenta la permeabilidad de la membrana para los H⁺, quisimos valernos de esto para saber si alguna de las oxidasas no inhibidas, observables en las cinéticas bifásicas, estaban acopladas a dicho gradiente. En células tratadas con KCN o CO medimos el efecto del desacoplante

CCCP sobre cada oxidasa activa (no inhibidas), con la finalidad de evidenciar cuál de ellas funcionaba de manera acoplada a un gradiente protón-motriz. Encontramos que la actividad respiratoria basal de la vía quinol oxidasa ba_3 aumento en presencia del CCCP, lo que significa que esta oxidasa funciona de manera acoplada a un gradiente protón-motriz. La disipación del gradiente por el desacoplante disminuyo el trabajo necesario para translocar protones causando el aumentando de la actividad respiratoria (fig. 7-D y fig. 9). El efecto de desacoplamiento se manifestó únicamente para la vía oxidativa resistente a cianuro. En el caso de la vía oxidativa sensible a cianuro (resistente a CO, oxidasa bb_3), el efecto de desacoplamiento no fue observado (fig. 7-F). Basados en este resultado consideramos que la quinol oxidasa ba_3 (resistente a cianuro) funciona en forma acoplada, actuando activamente en la formación del gradiente protón-motriz, mientras que la bb_3 funciona de manera independiente del gradiente protón-motriz.

Quisimos demostrar nuevamente este resultado a través de espectros de acción. Sabemos que muchos de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria absorben la luz visible y cambian de color cuando son oxidados o reducidos. En general, cada uno de ellos tiene su propio espectro de absorción y su reactividad suficientemente característicos para poder ser distinguido. Tal es el caso del espectro de absorción del aducto formado por el cit. α -CO, con valles en 428 y 591nm y picos en 444 y 610nm, el cual al ser irradiado con luz visible es fotodisociable (González y cols. 2006). Los resultados de la figura 10; donde la luz amarilla 440nm y luz azul 624nm fueron las reactivaciones máximas de la actividad inhibida coincidiendo con el espectro de absorción del aducto cit. α -CO, sugieren que la oxidasa ba_3 es la única oxidasa implicada en la reactivación por luz. Para estar seguros de esto, irradiamos con luz visible el aducto formado por la oxidasa bb_3 -KCN, sin obtener respuesta alguna (fig. 11-C). En contraste, células tratadas con CO irradiadas con luz, mostro un incremento del 50% de la actividad respiratoria inhibida (fig. 11-E). Lo que nos comprueba que la oxidasa ba_3 es la única oxidasa implicada en la formación de aductos con CO (CO-sensible) y su posterior reactivación por luz. Teniendo esto claro, decidimos probar si el CCCP presenta una vez más efecto desacoplante en esta vía

oxidativa. Lo cual pudimos observar claramente en la figura 11-I, cabe mencionar que el desacoplamiento es disminuido ya que la actividad de la oxidasa ba_3 es afectada por el CO, comparada con el experimento esquematizado en la figura 7-D. Corroborando así, que la vía quinol oxidasa ba_3 de la respiración de *Ga. diazotrophicus*, está acoplada al gradiente protón-motriz.

Entendiendo que nuestra oxidasa ba_3 esta acoplada al translocamiento de protones en el sistema respiratorio de *Ga diazotrophicus*, y tomando en cuenta que el desplazamiento de protones por una enzima acoplada tiene como consecuencias principales: 1) generar un ΔpH , el cual pudimos observar claramente en nuestro experimento esquematizado en la fig. 12-B, donde el lactato al ser oxidado en el interior de la bacteria, dona electrones a la cadena respiratoria, estimulando la translocación de protones por la única oxidasa activa (ba_3), causando una acidificación electroforética del medio. La importancia de este resultado radica, en que la acidificación registrada llevada a cabo por la actividad de una o ambas oxidasas es casi la misma. Corroborando una vez más, que la oxidasa ba_3 es la única oxidasa acoplada a la formación del gradiente protón-motriz en el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. 2) La generar ΔV , representado en la fig. 13, el cual fue creado únicamente por la oxidasa ba_3 (única oxidasa activa), al oxidar glucosa.

Concluimos: que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* está ramificado, contando con dos vías de transporte de electrones. Una donde participa la quinol oxidasa tipo bb_3 que funciona de manera desacoplada con la formación del gradiente protón-motriz, y otra vía, donde la quinol oxidasa de tipo ba_3 funciona de manera acoplada con la formación del gradiente protón-motriz.

7.2 *El por qué de las ramificaciones en los sistemas respiratorios bacterianos y su importancia en el sistema respiratorio de Ga. diazotrophicus.*

La composición de los sistemas respiratorios no es constante para una bacteria dada y puede variar de acuerdo con las condiciones prevalentes del medio. En el caso de bacterias aerobias o anaerobias facultativas, sus sistemas respiratorios pueden presentar dos o más oxidasas terminales, generando ramificaciones en el sistema respiratorio. La principal importancia de estas ramificaciones es el lograr flexibilidad en la ruta de transferencia de electrones; de manera que se obtenga rendimientos máximos en la oxidación de sustratos con diferentes componentes terminales, favoreciendo la adaptación de ambientes hostiles. Un sistema respiratorio ramificado, también permite la transferencia de electrones en vías desacopladas; las cuales ayudan a mantener un equilibrio redox adecuado, reoxidando coenzimas esenciales como el NADH, además de proteger ciertas vías metabólicas de factores nocivos. Estas ramificaciones no están exentas de llevar a cabo su función primaria, formar un gradiente protón-motriz.

Cuando las bacterias se ven forzadas a crecer en condiciones aeróbicas utilizando vías metabólicas anaeróbicas que son inactivadas por el oxígeno, Lo pueden resolver de varias maneras. Una de ellas es el incremento de su actividad respiratoria. Otra, a nivel de la membrana plasmática la sobre-expresión de alguna cadena no acoplada permitiendo reducir la cantidad de O₂ que logra penetrar al citoplasma y con esto se mantienen condiciones intracelulares cuasianóxicas. Tal es el caso de *A. vinelandii* fijando nitrógeno, en la cual se ha propuesto que su alta tasa respiratoria, está acompañada de un desacoplamiento en el transporte de electrones. 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*₃ y otra de tipo *bd* (D'mello, R., y cols., 1994). 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 en la nitrogenasa. El estudio de mutantes de *A. vinelandii* nulos para citocromo *bd* ha confirmado esta propuesta (Linkenhagner, K., 1995).

Como ocurre en *A. vinelandii*, el incremento en la respiración de *Ga. diazotrophicus* está acompañada de un desacoplamiento del transporte de electrones. De esta manera un aumento en el consumo de O_2 no está asociado a un incremento en la translocación de H^+ concomitante a la producción de ATP. Este desacoplamiento parcial en la respiración celular es posible gracias a que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos quinol-oxidasas, una de tipo ba_3 (KCN-resistente, CO-sensible), la cual en los resultados del presente trabajo se ha encontrado como vía acoplada al gradiente protón-motriz. La otra oxidasa de tipo bb_3 (KCN-sensible, CO-resistente), se encontró como vía que actúa de forma desacoplada (fig. 14).

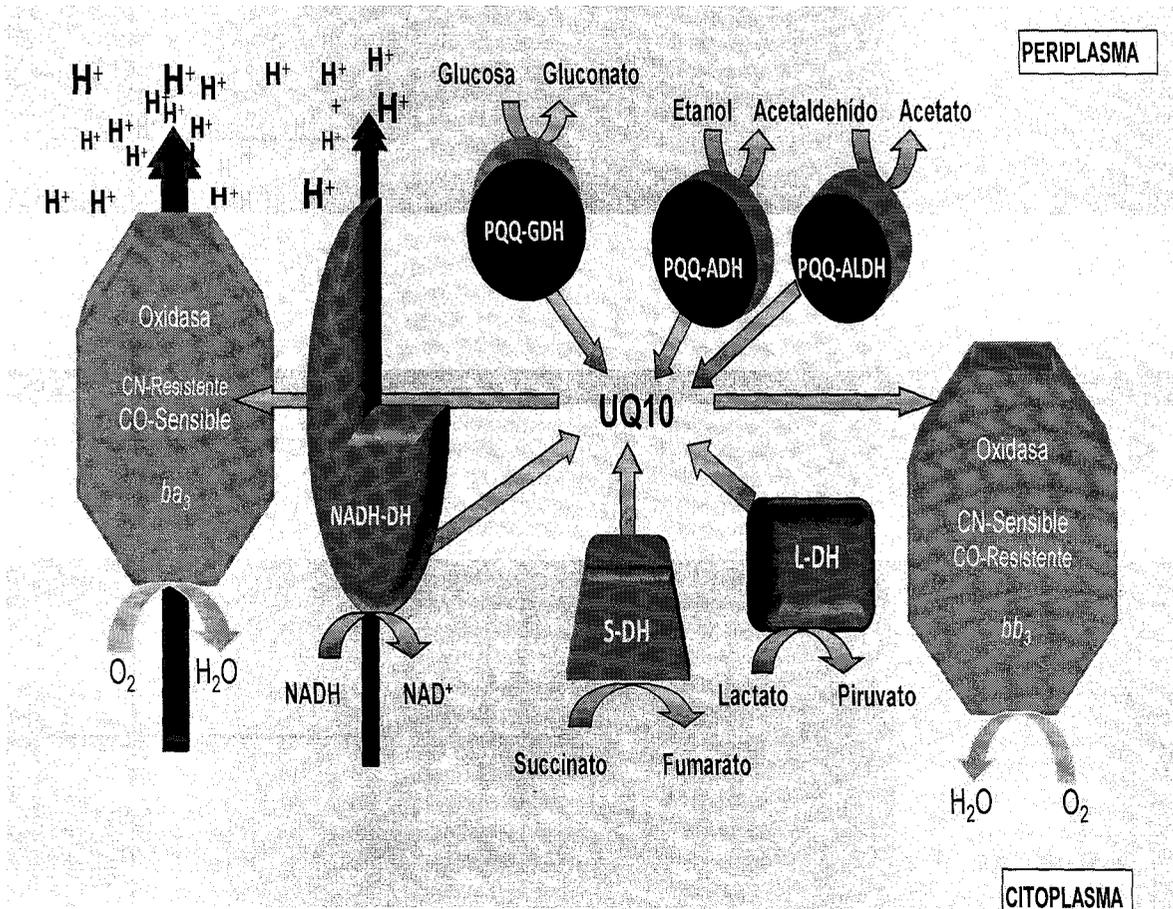


Fig. 14 Esquema funcional propuesto para el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. Las PQQ deshidrogenasas periplásmicas para alcohol (PQQ-ADH), aldehído (PQQ-ADH), glucosa (PQQ-ADH) y las deshidrogenasas membranales para NADH (NADH-DH) succinato (S-DH) y Lactato (L-DH) que entregan los electrones a la ubiquinona-10 (UQ₁₀) y ésta a su vez a las oxidasas terminales; bb_3 oxidasa desacoplada y ba_3 oxidasa acoplada al gradiente protón-motriz.

Justamente en esto radica la importancia de que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* esté ramificado. Ya que el transporte de electrones en su cadena respiratorio fluye hacia una de sus dos oxidasas de manera acoplada translocando H^+ , generando un gradiente electroquímico. Esta vía está representada por la quinol-oxidasa ba_3 , la cual colabora en la formación de ATP necesario para la fijación de nitrógeno, sin descartar los demás procesos que requieran de esta molécula energética, como el movimiento flagelar, la translocación de moléculas al interior y exterior de la bacteria, el crecimiento celular, etc. En la vía quinol-oxidasa bb_3 el transporte de electrones a lo largo de la cadena se lleva a cabo de manera desacoplada, por lo tanto no transloca H^+ y no genera un gradiente protón-motriz. Este desacoplamiento le permite a esta enzima actuar de manera ilimitada, ya que su capacidad cinética nunca se ve afectada o regulada por la saturación de un gradiente transmembranal. Esto tiene implicaciones importantes cuando se habla de fijación de nitrógeno, pues permite eliminar el oxígeno intracelular independientemente del estado en que se encuentre el gradiente protón-motriz. La actividad de una oxidasa acoplada se ve limitada por la saturación del gradiente protón-motriz, e incluso podría detener el transporte de electrones y con esto el consumo de oxígeno, lo que pondría en riesgo a la nitrogenasa, comprometiendo el proceso de fijación de nitrógeno. De esta manera, el desacoplamiento de la oxidasa bb_3 nos sugiere fuertemente que es la responsable de consumir el oxígeno disuelto en el medio, evitando que penetre en la célula e inactive a la nitrogenasa, aboliendo la fijación de nitrógeno. De esta manera la producción de ATP, acoplada a la respiración, a su vez acoplada a un gradiente protón-motriz ocurre independientemente de la constante remoción de O_2 , que garantiza una "protección respiratoria" continua. Es de suma importancia la acción conjunta de ambas vías para cumplir con sus propósitos respectivos, sin descartar la función de las deshidrogenasas.

Pruebas de sensibilidad a inhibidores específicos de la cadena respiratoria (González, B., y cols., 2006), postularon a la NADH-DH como una NADH de tipo-1. Al dar positivo para rotenona, capsaicina y negativo para flavona (Yagi., T. 1990). Lo cual, el año pasado fue

corroborado al secuenciar el operón de esta enzima (Lery., L.M.S. y cols., 2008). Consideramos importante mencionarlo, ya que las NADH de tipo-1 poseen un sitio de acoplamiento energético. Concluimos: que el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* cuenta con dos sitios que contribuyen de manera activa en la formación de energía; la NADH-DH y la quinol oxidasa ba_3 (fig14).

Entendiendo que la existencia de vías alternas en bacterias plantean disyuntivas al flujo de e^- en su salida al oxígeno. Es claro que las bacterias deben de contar con mecanismos eficientes para regular el funcionamiento de sus cadenas respiratorias especialmente las oxidasas terminales. El uso de una u otra oxidasa no es equivalente desde el punto de vista cinético y energético. De esta manera, el control genético de su expresión es un mecanismo definitivo para el uso óptimo de las cadenas respiratorias (Escamilla., y cols., 1999). Será interesante generar mutantes carentes de una u otra oxidasa y ver su impacto en la respiración, crecimiento y fijación de nitrógeno. Nuestro laboratorio ha presentado gran interés en la purificación de estas oxidasas y en la secuenciación de aminoácidos de sus subunidades. Con esto se localizarán los operones en la base de datos, se diseñarán oligos para amplificar secuencias específicas que nos permitan llevar a cabo mutagénesis dirigida. La purificación de estas oxidasas también permitirá identificar y analizar los grupos prostéticos de estas enzimas.

VIII. CONCLUSIONES.

- ✓ La actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* es llevada a cabo por dos oxidasas terminales, que actúan como entidades proteicas individuales en la cadena respiratoria, una quinol oxidasa bb_3 sensible a cianuro, resistente a monóxido, y una quinol oxidasa ba_3 resistente a cianuro, sensible a monóxido.

- ✓ La quinol oxidasa tipo bb_3 funciona de manera no acoplada con la formación del gradiente protón-motriz y la quinol oxidasa de tipo ba_3 funciona de manera acoplada con la formación del gradiente protón-motriz.

- ✓ La vía quinol oxidasa bb_3 no acoplada, podría contribuir de manera importante en el control de la concentración de O_2 intracelular, como mecanismo de protección a la nitrogenasa.

- ✓ La vía quinol oxidasa ba_3 acoplada, contribuye de manera activa a la formación del gradiente protón-motriz necesario para la síntesis de ATP, abasteciendo el requerimiento energético para el crecimiento y la fijación de nitrógeno, entre otros procesos metabólicos.

IX. ABREVIACIONES.

Abs Absorbencia

ADH Alcohol deshidrogenasa

ALDH Aldehído deshidrogenasa

CCCP Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CN Cianuro

CO Monóxido de carbono

DMSO Dimetil sulfóxido

D. O. Densidad óptica

GDH Glucosa deshidrogenasa

Glu Glucosa

KCN Cianuro de potasio

LGI Medio de cultivo LGI modificado

LGI+lev LGI modificado, fue enriquecido con extracto de levadura 0.5% (5 g/L) pH 5.5

LGI+lac LGI sacarosa 30 g/L más lactato 0.2% (2 mL/L) pH 5.5

NADH-DH NADH deshidrogenasa (Nicotinamina adenina dinucleótido deshidrogenasa)

PAL5 Cepa silvestre de *Ga. diazotrophicus* PAL5 ATCC49037

P_i Fosfato inorgánico

p/h Peso húmedo

Saf Safranina

S-DH Succinato deshidrogenada

ΔV Potencial de Membrana.

Δ_{μH}⁺ Potencial electroquímico

X. REFERENCIAS.

Affourtit, C. Albury, M. S. Crichton, P. G., y Moore, A. L. 2005. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* **510**: 121-126.

Akerman, K. E. O., y Wikstrom, M. K. F. 1976. Safranine as a prob of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* **68**: 191-197.

Anraku, Y. y Gennis B. 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 262-266.

Anraku, Y. 1988. Bacterial electron transport chain. *Biochem.* **57**: 101 - 132.

Antúnez Argüelles, Erika. 2007. "Función y biogénesis de la pirroloquinolina-quinona alcohol-deshidrogenasas (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Caracterización de una mutante PQQ-ADH". Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias.

Baldani V.L.D., Baldani J.I. y Döbereiner J. 2000. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *herbaspirillum seropediaceae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soil.* **30**: 485-491.

Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. y Bottini, R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 y A3 by *Acetobacterrophi diazotcus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* **24**:7-11.

Brand, M.D., Johannes, P., van Dijken, P. y Adachi, O. 1994. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochem. Biophys. Acta.* **1187**:132-139.

Bruce, A., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. 2007. Molecular biology of the cell. 5th edition. Chapter 14, Energy conversion: Mitochondria and chloroplasts. Garland. United States of America.

Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.

Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, A. C. y Döbereiner, J. 1993. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 23-31.

Dalton, H. y Postgate, R. J. 1969. Effects of oxygen on grow of *Azotobacter chroococcum* in bathch and continuos culture. *J. Gen. Microbiol.* **54**: 463-473

D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. 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.

D'mello, R., Purchase, D., Pool, R. K., and Hill, S. 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.

Drozd, J. y Postgate R. J. 1970. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73

Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I. P., Zarzoza, G, y V. Linares. 1987. Expresión of cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73.

Escamilla, J.E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M. y Flores L.M. 1999. Los sistemas respiratorios bacterianos. *Mensaje bioquímico.* **XXIII**: 67-103.

Fetter, J. R., Qian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., García-Horsman, A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., y Ferguson-Miller, S. 1995. Where is 'outside' in cytochrome *c* oxidase and how and when do protons get there? Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 1604-1608.

Flores Encarnación, M. 2001. "La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus*. Modelo para el estudio de la Protección Respiratoria de la nitrogenasa". Tesis doctoral. UNAM, Instituto de fisiología Celular.

Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G.A., Baca, B.E., y J.E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. J. Bacteriol. 181: 6987-6995.

Fuentes-Ramírez, L. E., T. Jiménez-Salgado, I. R. Abarca-Ocampo, y J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant Soil 154:145-150.

Garcia Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., y Gennis, R. B. 1994. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. J. Bacteriol. 176(18): 5587-5600.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J., y De Ley, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:361-364.

Gonzalez, B., Martínez, S., Chávez, J.L., Lee, S., Castro, N.A., Domínguez, M.A., Gómez, S., Contreras, M.A., Kennedy, C. y Escamilla, J.E. 2006. Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. Biochim. Biophys. Acta. 1757 (12): 1614-1622.

Guerrero Castillo, Sergio. 2006. Control del metabolismo mitocondrial de *Yarrowia lipolytica*. Papel de la oxidasa alterna y efecto de iones inorgánicos. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química.

Hill, S. 1988. How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Microbiol. Lett. **54**:111-130.

Herlache, T. C., Kent, A. D., Riggs, P., Iñiguez, A., Chelius, M. K., y Triplett, E. W.. 2000. The *Gluconacetobacter diazotrophicus* genome project. 17th. North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. Quebec, Canadá. Abs. p. 82.

Jiménez-Salgado, T., Aparicio Fabré, R. y Caballero-Mellado, J. 1994. Detección de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de caña de azúcar. XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba.

Jünemann, S. 1997. Cytochrome *bd* terminal oxidase. Biochim. Biophys. Acta. **1321**: 107-127.

Kita, K., Konishi, K., y Anraku Y. 1984. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. I. Purification and properties of cytochrome b562-o complex from cells in the early exponential phase of aerobic growth. J. biol. chem. **259**: 3375-3381.

Kastins, J. F. 1993. Earth's early atmosphere. Science **259**: 920 - 992.

Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M. and Kennedy, C. 2000. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. J. Bacteriol. **182**:7088-7091.

Lery, L.M.S., von Kruger, W.M.A., Viana, F.C., Teixeira, K.R.S., Bisch, P.M. 2008. A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic

nitrogen compound. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1784**: 1578-1589.

Li, R. P. y MacRae, I. C. 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* **23**:999-1002.

Linkenhagner, K., y J. Oelze. 1995. Cellular ATP levels and nitrogenase switchoff upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **177**: 5289-5293.

Martinez, Sury K. 2005. "El sistema de deshidrogenasas del periplasma y la ubiquinona (UQ₁₀) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5." Tesis de Maestría. UNAM. Instituto de Fisiología Celular.

Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., y M. Ameyama. 1990. Cytochrome a₁ of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 9863-9867.

Matsushita, K., Ebisuya, H. y Adachi, O. 1992. Homology in the structure and the prosthetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, cytochrome a₁ and cytochrome o, of *Acetobacter aceti*. *J Biol Chem.* **267(34)**:24748-53.

Matsushita, K., Toyama, H. y Adachi, O. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301.

Michell, P., y Moyle, J. 1942. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem J.* **105(3)**: 1147-1162.

Miller, M. J., y Gennis, R. B. 1985. The cytochrome d complex is a coupling site in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260(26)**: 14003-14008.

Mills, D. A., y Ferguson-Miller, S. 2003. Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome *c* oxidase: lessons from other

proteins. FEBS Lett. **545**: 47-51.

Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2005. Lehninger Principles of biochemistry, 4nd edición. Capitulo 19, Oxidative phosphorylation and photophosphorilation. W. H. Freeman and Company New York.

Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J., 1987. Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. 1^{ra} edición. Ilustrated. Estados Unidos.

Ng T.C.N., Laker, A.N. y Marer R.J. 1995. Cloning, sequencing and mutagenesis of the cytochrome C4 gene from *Azotobacter vinelandii*. Characterization of the mutant strain and a proposed new branch in respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta. **1230**: 119-129

Pereira, M., M., Santana, M., y Teixeira, M. 2001. A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. Biochim. Biophys. **1505**: 185-208

Poole, R. K. y Hill, S. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*-roles of the terminal oxidases. Biosci. Rep. **17**: 303-317.

Puustinen, A., Finel, M., Haltia T., Gennis, R. B., Wikstrom, M. 1991. Properties of the Two terminal oxidases of *Escherichia Coli*. Biochem. **30**; 3936-3942.

Richter, O. -M. H., y Ludwig, B. 2003. Cytochrome c oxidase – structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. **147**: 47-74.

Sagan C., Thompson, W. R., Carlson, R., Gurnett, D., y Hord, C. 1993. A search for lives on Earth from the Galileo spacecraft. Nature **365**: 715 – 721.

Salles J.F., Gitahy, P.M., Skot, L. y Baldani J.I. 2000. Use of entophytic bacteria as a vector to express the cry3A gene from *Bacillus thuringiensis*. *Braz. J. Microbiol.* **31**: 155-161.

Sevilla, M., Meletzus, D., Teixeira, K., Lee, S., Nutakki, A., Baldani I., y Kennedy, C. 1997. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol. Biochem.* **29**:871-874.

Slater E. C., van Geler B. F., y Minnaert K. 1965. En, Oxidases and related redox system. (King, T.E., Mason, H. S., y Morrison M.) Pag. 667-706. John Wiley & Son New York.

Stephan, M. P., M. Oliviera, K. R. S. Teixeira, G. Martínez-Drets, and J. Döbereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:67-72.

Stouthamer, A. H. 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **61**: 1 - 33.

Teixeira, K. R. S., M. Wülling, T., Morgan, R., Galler, E. M. Zellermann, J. I., Baldani, C., Kennedy, and D. Meletzus. 1999. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:521-530.

Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B., y Wikstrom, M. 1993. Substitution of Asparagine for Aspartate-135 in Subunit I of the Cytochrome *bo* Ubiquinol Oxidase of *Escherichia coli* Eliminates Proton-Pumping Activity? *Biochemistry* **32**: 10923-10928.

Urquiaga, S., Cruz, K.H.S. y Boddey, R.M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to

sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil. Sci. Am. J.* **56**: 105-114.

von Wachenfeldt, C., y Hedersted, L. 1990. *Bacillus subtilis* holo-cytochrome *c*-550 can be synthesized in aerobic *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **270**; 147 – 151.

Yagi, T. 1990. Bacterial NADH:quinone oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomemb.* **23(2)**: 211-225.