

00562

2

14

CARACTERIZACION DE LA CADENA RESPIRATORIA
DE BACILLUS CEREUS DURANTE EL CRECIMIENTO
Y LA ESPORULACION

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA) PRESENTA
LA Q.F.B. MARIA DEL CARMEN BENITO MERCADE.

FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1982

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

INTRODUCCION	3
GENERALIDADES DE LA ESPORULACION BACTERIANA	9
MATERIALES Y METODOS	29
RESULTADOS Y DISCUSION	38
ABREVIATURAS	79
REFERENCIAS	80

INTRODUCCION.

Algunas bacterias pueden formar sistemas de transporte de electrones considerablemente más complejos que el sistema encontrado en las mitocondrias de las células eucarióticas. La complejidad de estos sistemas reside en la presencia de un mayor número de deshidrogenasas unidas a la membrana, las cuales donan los electrones a los componentes del sistema respiratorio para reducir al oxígeno y a aceptores terminales alternativos. Las múltiples deshidrogenasas primarias y oxidasas se encuentran ligadas mediante vías que se superponen e interconectan en diferentes grados. Estas interacciones dan por resultado la ramificación en los sistemas de transporte de electrones. Los electrones pueden entrar a estos sistemas a través de numerosas deshidrogenasas y abandonarlos a través de diferentes oxidasas.

Las bacterias que poseen la capacidad de sintetizar sistemas de transporte de electrones ramificados aparentemente alcanzan una mayor eficiencia evolutiva. Por ejemplo, en Haemophilus parainfluenzae se observa la aparición de un sistema de transporte de electrones más extenso y más complejo a medida que la tensión de oxígeno es disminuida en el medio de cultivo. La disminución en la tensión de oxígeno estimula la síntesis de los citocromos a_2 (d) y c, y en menor grado, la de los citocromos b y o. Mediante este proceso

el organismo es capaz de mantener una rápida velocidad de crecimiento.

En Achromobacter también se ha encontrado que este organismo modifica la composición de su sistema de transporte de electrones cuando el medio externo es cambiado. Estas células contienen por lo menos dos oxidasas que funcionan simultáneamente: la citocromo oxidasa a_2 , que es poco sensible al cianuro, y la citocromo oxidasa o , que presenta una mayor sensibilidad a este inhibidor. Estas dos oxidasas terminales también han sido descritas en Azotobacter.

En E. coli se ha obtenido evidencia de un sistema de transporte de electrones ramificado; se han sugerido vías separadas para los electrones derivados del formato hacia el oxígeno y de los derivados tanto de NADH como de succinato hacia el oxígeno.

También se ha encontrado que algunas bacterias contienen dos pigmentos capaces de combinarse con monóxido de carbono: Bacillus megaterium, Mycobacterium phlei, Micrococcus denitrificans, contienen citocromo a_3 , que se combina rápidamente con el CO, y citocromo o , que se combina con CO en forma más lenta.

Por tanto, la presencia de cadenas alternas es un fenómeno ampliamente distribuido en los sistemas bacterianos.

Por otra parte, durante la formación de endosporas también se han encontrado modificaciones, tanto cualitati-

vas como cuantitativas, en la cadena de transporte de electrones (CTE) de diferentes especies de *Bacillus*. En *B. megaterium*, por ejemplo, se ha descrito (1) la ausencia de citocromo c durante el crecimiento exponencial y su aparición durante los primeros estadios de esporulación. Además se ha demostrado la aparición de cadenas alternas, poco sensibles al cianuro, durante este proceso. En *B. subtilis* también se ha demostrado la aparición de citocromos poco comunes (2), como el citocromo o, que puede funcionar como oxidasa terminal y presenta alta sensibilidad al cianuro. En *B. cereus* existen muy pocos reportes en la literatura sobre la CTE; Halvorson (3) encontró que existe un incremento notable en el consumo de oxígeno una vez que las células dejan de dividirse y alcanzan los primeros estadios de esporogénesis. Felix y cols. (4) demostraron que al finalizar el crecimiento vegetativo existe un incremento en los componentes de la CTE y que estos niveles se mantienen a través de todo el proceso de esporulación. Estos investigadores encontraron además (5), - que la inhibición del transporte de electrones, mediante la adición de cianuro al medio de cultivo, no afecta en forma significativa el crecimiento vegetativo pero inhibe fuertemente la esporulación. Estos resultados apoyan la idea de que durante el crecimiento vegetativo no se requiere de una cadena respiratoria terminal típica, la cual sí constituye un requerimiento absoluto para la esporogénesis (6).

En la presente tesis mostramos evidencia que confirma los resultados obtenidos por Felix y cols. en cuanto al incremento en la concentración de citocromos durante la esporulación de B. cereus, no obstante, hemos encontrado grandes discrepancias en cuanto a la capacidad reductora de diferentes sustratos de la CTE; mientras que estos autores no muestran ninguna diferencia espectral en la reducción de la cadena por NADH o por succinato, nuestros resultados indican un patrón de reducción distinto.

Por otra parte, esta diferencia también se hace aparente en las actividades de la NADH y de la succinato oxidasas (medidas utilizando al oxígeno como aceptor final de electrones) así como de la NADH y de la succinato oxidorreductasas (medidas utilizando colorantes como aceptores finales), durante el crecimiento vegetativo y la esporulación. Por un lado, la NADH oxidasa incrementa su actividad (alrededor de 8 veces) en los primeros estadios de la esporogénesis y este incremento también se ve reflejado en la NADH oxidorreductasa (aproximadamente 5 veces). En el caso de la succinato oxidasa sus niveles de actividad son pobres tanto en la etapa vegetativa como en la esporulante, sin embargo, la actividad de la oxidorreductasa es elevada durante la fase vegetativa y una vez que se inicia la esporulación esta actividad desaparece totalmente, evidenciándose con la adición de cianuro al ensayo de actividad. Lang y cols. (5) también encontraron esta dependencia por el cianuro de la succinato

deshidrogenasa (SDH) de la etapa esporulante; la explicación que estos autores proponen para este efecto es que los aceptores artificiales de electrones (DCPIP) compiten con el oxígeno por los electrones en las células vegetativas pero no - en las esporulantes. Sin embargo, nuestros resultados no apo-
yan esta idea, ya que otros inhibidores de sitios I y II no evocan la actividad como lo hace el cianuro. Hemos encontrado que, además del cianuro, la anaerobiosis y la diciclohexil carbodiimida (DCCD) son capaces de evocar la actividad. Es - conocido que estas tres condiciones actúan directamente sobre la citocromo c oxidasa, por lo que resulta de interés dilu-
clar el mecanismo por el cual la SDH sufre este cambio en su actividad.

Un resultado interesante es el hecho de que el cianuro no es eficiente inhibiendo las actividades de NADH y de succinato oxidasas. En este sentido, los análisis espectrales mostrados por Felix y cols. no son capaces de explicar la ba ja sensibilidad a este inhibidor; estos autores proponen una ramificación de la CTE a nivel de la NADH deshidrogenasa, no obstante, no identifican ningún componente intermediario entre la flavoproteína y el oxígeno.

Los objetivos de esta tesis han sido, por tanto, la caracterización de la actividad oxidativa y de los componentes de la cadena respiratoria de Bacillus cereus durante el crecimiento exponencial (etapa vegetativa) y la esporulación, y,

por otro lado, la dilucidación del papel que juegan el cianuro, el DCCD y la anaerobiosis en el desenmascaramiento de la actividad de la SDH de la etapa esporulante.

GENERALIDADES DE LA ESPORULACION
BACTERIANA.

Algunos microbiólogos consideran que la formación de esporas está limitada a las bacterias de los géneros Bacillus y Clostridium, pero se ha encontrado una gran diversidad de microorganismos capaces de formar esporas, entre ellos se encuentran los cocos del género Sporosarcina, bacterias filamentosas del género Thermoactinomyces y bacterias Gram negativas del género Desulphatumaculum. La formación de endosporas no está restringida a un grupo de organismos íntimamente relacionados, la diversidad fisiológica de las bacterias de estos géneros es vasta; algunas son anaerobias (Clostridium) mientras que otras son aerobias o anaerobias facultativas - (Bacillus); algunas tienen requerimientos nutricionales simples, mientras que otras requieren de factores de crecimiento muy complejos; unas son capaces de fijar nitrógeno, otras pueden utilizar algún sulfato como aceptor final de electrones. Todas estas especies mencionadas forman una sola spora por célula. Por otro lado, se han encontrado organismos que producen dos o más esporas por célula; estos microorganismos no están perfectamente caracterizados desde el punto de vista taxonómico, y generalmente se encuentran asociados con organismos hospederos constituyendo un mutualismo, entre ellos

se encuentra un organismo designado Metabacterium polyspora que puede formar de dos a cinco esporas endógenas. Los organismos hospederos generalmente son artrópodos y anfibios y la presencia de estos microorganismo esporogénicos en el tracto digestivo - del huésped aparentemente no tiene consecuencias patogénicas.

El proceso de la esporulación puede ser considerado como un caso especial de adaptación celular a la accesibilidad periódica de nutrientes en el medio ambiente. Las características morfológicas esenciales de diferenciación que convierten a las células vegetativas en esporas latentes han sido - estudiadas por microscopía electrónica, y se ha encontrado - que estos eventos son similares en todas las bacterias formadoras de esporas estudiadas. La formación de esporas no es un proceso necesario en el ciclo de desarrollo de estas bacterias; normalmente - ocurre después de la fase de crecimiento logarítmico, cuando el tiempo - de generación aumenta debido a la limitación de nutrientes. La esporogénesis es, en primera instancia, un proceso de división celular mediante el cual se forma un protoplasto dentro del citoplasma de la célula. Es - además, un proceso secuencial ordenado.

El proceso de la esporulación ha sido dividido en siete eventos característicos que se muestran esquemáticamente en la figura 1.

El estadio 0 se refiere a la célula vegetativa, la cual contiene dos cuerpos de cromatina en los estadios de división, mientras que la espóra solamente contiene uno en el estado de latencia. Con el cambio del crecimiento logarítmico al creci-

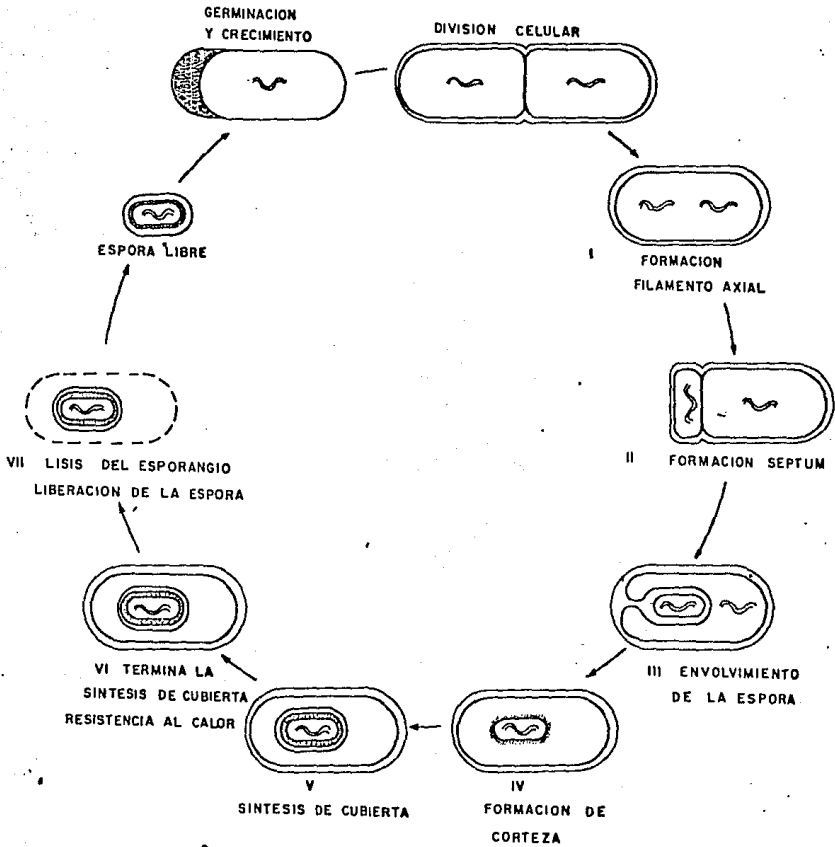


FIGURA 10 ESTADIOS MORFOLOGICOS DURANTE LA ESPOROGENESIS.

miento logarítmico al crecimiento lineal que precede al inicio de la esporulación, la síntesis de ácido desoxirribonucleico cesa, pero los cuerpos de cromatina continúan cambiando en distribución y en forma hasta que constituyen un filamento axial dentro de cada célula. Este cambio constituye el estadio I de esporulación. La deformación de la cromatina es reversible; los filamentos axiales asociados a la esporulación incipiente desaparecen rápidamente si el medio gastado es reemplazado por medio fresco. La síntesis de ADN se reinicia y los cuerpos de cromatina y las células se dividen por el camino normal.

Una vez que el filamento axial ha sido formado, los cromosomas se separan y uno de ellos migra hacia uno de los polos de la célula. El estadio II designa la formación de un septo asimétrico; la posición de este septo es presumiblemente determinada por el hecho de que el cromosoma se encuentra en el extremo de la célula, unido a mesosomas. El septo es formado a expensas del crecimiento e invaginación de la membrana plasmática, delimitándose así dos compartimientos: el de la célula madre, que ocupa dos terceras partes del volumen total del esporangio, y el de la prespora, que ocupa el volumen restante. El crecimiento continuo de la membrana conduce al englobamiento de la prespora (estadio III); el desarrollo de la membrana es soportado por dos mesosomas, ubicados en el lado externo de la prespora y no asociados a ADN. Como resultado del cre-

cimiento unidireccional de la membrana citoplasmática, la orientación de la membrana externa de la prespora es invertida, es decir, el lado de la membrana que normalmente estaba en contacto con el exterior de la célula ahora se encuentra en contacto con el protoplasma de la espora. El englobamiento culmina con la fusión de las membranas en el extremo de la célula, la prespora se libera de la membrana y se mueve libremente dentro del citoplasma de la célula madre.

El estadio IV marca el inicio de la formación de la corteza en la superficie de la membrana inmediata al citoplasma de la prespora; el peptidoglicano cortical se deposita entre las membranas interna y externa de la prespora durante este estadio y continua hasta el estadio VI. En la etapa IV la apariencia del protoplasto se hace más densa y homogénea.

Con la terminación de la prespora y el inicio de la síntesis cortical, la célula esporulante alcanza una etapa de "compromiso" en la cual no puede regresar a la etapa vegetativa a menos que lleve a cabo la maduración de la espora y, posteriormente su germinación. Antes de estos eventos, un cultivo de células en el estadio II o III puede revertir al crecimiento vegetativo mediante la adición de medio fresco. Durante estas etapas el septo de la prespora se convierte en un septo transversal que da lugar a la formación de dos células, una larga (la parte no espora) y una corta (la espora potencial). Con la reanudación del crecimiento vegeta-

tivo, estas células se dividen rápidamente, primero la más grande y después la de menor tamaño. Una vez que la prespora se ha completado, la adición de nutrientes conduce a un retardo prolongado de la esporulación y cuando las esporas se liberan, generalmente germinan.

Durante los estadios V y VI las cubiertas proteínicas de la espora son depositadas y modificadas en la membrana externa de la prespora; el esporangio sintetiza ácido dipicolínico (DPA) que es transportado al interior de la espora y se observa la acumulación de calcio en el protoplasto de la misma. Con el desarrollo de las cubiertas la mayoría de las células esporulantes llevan a cabo un blanqueamiento de la prespora que es perfectamente visible al microscopio de contraste de fases. Durante estos estadios también se lleva a cabo la maduración de la prespora, mediante la hidrólisis de los enlaces del peptidoglicano cortical que producen un polímero expandible.

El estadio VII consiste en la liberación de la espora madura mediante la autólisis del esporangio. La secuencia de eventos que tiene lugar después del estadio VI tiene una duración aproximada de siete horas en Bacillus cereus.

MICROCICLO DE ESPORULACION.

El proceso de esporogénesis ha sido descrito en células cortas, parcialmente elongadas, obtenidas de esporas germinadas. Estas células inician la esporulación eliminando la

proliferación vegetativa y a este acortamiento del ciclo se le ha denominado microciclo de esporulación.

Cuando se suspenden esporas germinadas en un medio químicamente definido que carece de una fuente de energía y limitado en fosfatos, se producen células primarias en un lapso de dos horas. Después de aproximadamente seis horas de aereación vigorosa, estas células inician el proceso de esporulación siguiendo los eventos morfogénéticos normales. Por tanto, la espora germinada o la célula primaria expuesta a un medio insuficiente de nutrientes, para soportar la división, desarrolla un tiempo de generación muy largo y es inducida a la esporulación. Durante este periodo el nivel de DNA aumenta aproximadamente tres veces antes de que la célula proceda a esporular.

ESTRUCTURA DE LA ENDOSPORA.

La espora incluye un protoplasto que contiene sustratos de reserva rápidamente metabolizables y casi toda la maquinaria completa para el metabolismo y la biosíntesis. El estado hipometabólico y las propiedades de resistencia son adquiridas como resultado de la síntesis de una serie de integumentos que rodean al protoplasto y llevan a cabo la inactivación de las macromoléculas. Un pequeño número de compuestos de bajo peso molecular y unas cuantas protefnas, únicas del protoplasto de la espora, contribuyen a la estabilidad del estado de latencia y a las propiedades de resistencia de las esporas.

La estructura y los compuestos presentes en la espora madura son similares de una especie a otra. La estructura de la endospora se muestra de manera esquemática en la figura 2.

EXOSPORIO.- El exosporio es una estructura transparente con apariencia membranosa que se encuentra rodeando a la espora completa en B. cereus, B. anthracis y organismos relacionados. Esta estructura es menos aparente en las esporas de otras especies como B. subtilis y B. megaterium.

El exosporio aislado contiene un 20% de proteína, 20% de polisacáridos, 12.5% de lípidos neutros, 5.5% de fosfolípidos y 20% de cenizas. En B. cereus aparece poco después del englobamiento de la prespora, envolviéndola gradualmente. Las cubiertas de la espora se forman dentro del exosporio en desarrollo. La función de esta estructura es, probablemente, la de concentrar las subunidades proteínicas de las cubiertas, a medida que son sintetizadas, para asegurar su polimerización en la superficie de la prespora y no en algún otro sitio de la célula madre. Las proteínas del exosporio son resistentes a la acción de proteasas, lo que sugiere que esta estructura también funciona como una defensa adicional de la espora contra los ataques de enzimas hidrolíticas.

CUBIERTAS.- Las cubiertas de la espora constituyen del 30 al 60% del peso seco de la espora, comprenden aproximadamente el 50% de su volumen y contienen más del 80% del to-

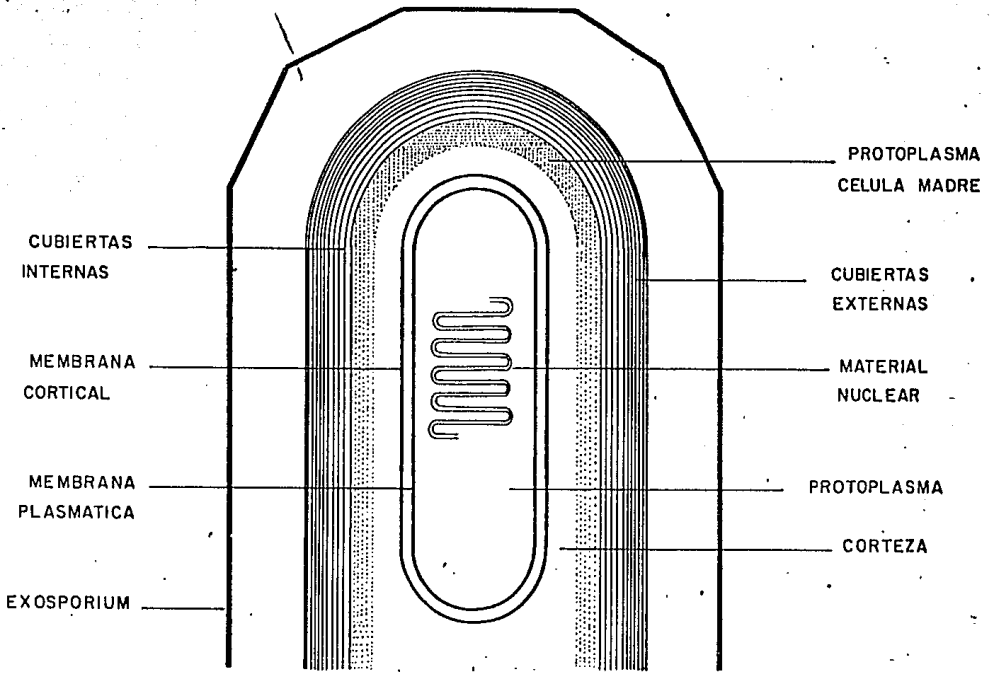


FIG. 2. COMPONENTES PRESENTES EN LA ESPORA BACTERIANA.

tal de protefna de la misma. La morfología y la estructura química de las cubiertas varfa, dependiendo de la especie.

Los estudios realizados con esporas desprovistas de cubiertas mediante tratamientos químicos y con esporas mutantes que contienen cubiertas alteradas han demostrado que estas estructuras no son requeridas para la retención del DPA, para la refractilidad o para la termoresistencia. Las esporas que carecen por completo de cubiertas son susceptibles al tratamiento con lisozima y con solventes, tales como octanol y cloroformo. La resistencia a los solventes aparece cuando se forman las cubiertas y antes de la termoresistencia.

CORTEZA Y PARED CELULAR DEL PROTOPLASTO.- La corteza a parece como una región transparente a los electrones y está rodeada por las cubiertas de la espora. Una membrana externa se encuentra separando a las cubiertas de la corteza. - Es probable que durante la deposición de las cubiertas y del exosporio quede atrapado algo de material citoplásmico proveniente de la célula madre y que se sitúe entre la membrana externa y las cubiertas. La corteza está compuesta, en su mayor parte, por un peptidoglicano modificado, cuya estructura se muestra en la figura 3. Por debajo de la corteza se encuentra la pared del protoplasto, inmediatamente - por afuera de la membrana del mismo. La corteza es hidrolizada mediante enzimas líticas durante la germinación, mientras que la pared del protoplasto persiste; aparentemente,

FIG. 3. ESTRUCTURA DEL PEPTIDOGLICANO QUE CONSTITUYE LA CORTEZA DE LA ESPORA.

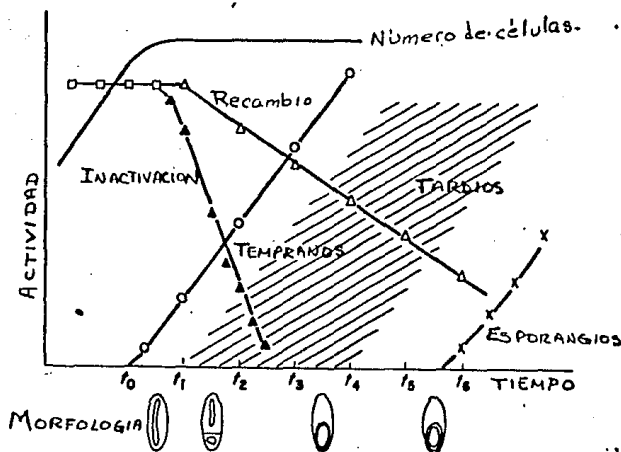
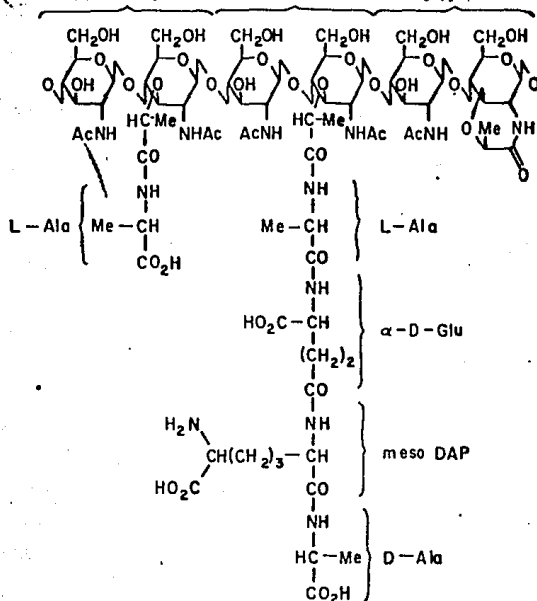


FIG. 4. CAMBIOS EN LOS NIVELES ENZIMATICOS DURANTE LA ESPORULACION.

la pared del protoplasto es estructural y funcionalmente equivalente a la pared de la célula vegetativa.

PROTOPLASTO.- Existen pocas enzimas específicas del protoplasto de la espora; algunas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y muchas enzimas biosintéticas están ausentes y las esporas germinadas no oxidan acetato hasta que estas enzimas son sintetizadas. Sin embargo, el estado hipometabólico no puede ser explicado por la ausencia de las enzimas requeridas para el metabolismo de sustratos endógenos. Las esporas latentes contienen niveles elevados de ácido 3-fosfoglicérico y las enzimas requeridas para convertir este compuesto, que es inestable en las células vegetativas, a acetato y CO_2 están presentes en la espora. El fosfoglicerato es metabolizado durante los primeros minutos de la germinación, antes de que se lleve a cabo la síntesis "de novo".

Las esporas latentes contienen cantidades muy pequeñas de nucleósidos trifosfato y una carga energética muy baja. Los azúcares fosforilados también se encuentran en niveles mucho menores que en las células vegetativas. El ATP es sintetizado rápidamente durante los primeros minutos de la germinación, antes de la iniciación de la síntesis de macromoléculas. Los nucleótidos de piridina y la acetil-CoA, también están ausentes o en niveles muy bajos en las esporas latentes.

Las fuentes primarias de energía para la síntesis de

nucleósidos trifosfato a expensas de nucleósidos difosfato durante la germinación temprana están constituidas por el fosfoglicerato y por proteínas básicas, presentes en el protoplasto de la espora. El catabolismo de estas reservas es suficiente para generar piridín nucleótidos reducidos y acetil-CoA durante los estadios iniciales de la germinación.

Aproximadamente el 45% de la coenzima A de la espora latente está unida a proteínas mediante enlaces disulfuro. Esta coenzima es liberada y convertida, en su mayoría, a - acetil-CoA durante los primeros minutos de la germinación.

Las principales fuentes de moléculas pequeñas para la síntesis de proteínas y de RNA provienen del recambio de - proteínas y del RNA de la espora. Muy pocas proteínas son hidrolizadas durante la germinación. Tres proteínas básicas, de bajo peso molecular, que comprenden del 40 al 50% de las proteínas presentes en el protoplasto son rápidamente degradadas. Las enzimas proteolíticas responsables de su degradación no hidrolizan proteínas convencionales, sino que reconocen una secuencia de aminoácidos específica, común a las proteínas básicas que son formadas durante la esporogénesis. Los polipéptidos, junto con las proteasas responsables de su hidrólisis, proveen una reserva de aminoácidos - rápidamente movilizable en la espora latente, que es utilizada para sostener la síntesis de proteínas y el metabolismo energético en la fase temprana de la germinación, hasta que las enzimas requeridas para la biosíntesis de aminoáci

dos son formadas. Las enzimas necesarias para el metabolismo no son degradadas debido a la estricta secuencia de aminoácidos requerida por las proteasas responsables del recambio de polipéptidos.

CAMBIOS METABOLICOS Y BIOQUIMICOS ASOCIADOS CON LA ESPORULACION.

Uno de los factores más importantes en la determinación de la esporogénesis es el nivel de carbohidratos disponibles, principalmente de glucosa. Se ha encontrado que el catabolismo de la glucosa sufre modificaciones cuantitativas en los diferentes estadios de desarrollo de los bacilos formadores de esporas aeróbicas. Las células vegetativas contienen enzimas de la vía glucolítica, así como también enzimas de la vía de la hexosamonofosfato (HMP). Las células vegetativas utilizan casi exclusivamente la vía glucolítica y solamente una pequeña parte de la glucosa disponible es catabolizada por la vía de la HMP. Como consecuencia de la glucólisis, las células vegetativas excretan al medio productos metabólicos intermedios, principalmente ácidos orgánicos como pirúvico, acético y láctico, lo que a su vez conduce a una disminución del pH del medio. La actividad respiratoria terminal es muy baja en las células vegetativas.

Durante el periodo pre-esporulante, dos sistemas se hacen funcionales: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la formación y degradación del ácido poli-beta-hidroxibutírico. Algunas enzimas del TCA se encuentran en muy pequeñas

cantidades en las células vegetativas de B. cereus. La citrato sintetasa, la aconitasa, la fumarasa y la enzima málica - están presentes durante la esporulación, pero en niveles bajos durante el crecimiento exponencial. El papel del TCA durante los periodos pre-esporulante y esporulante queda evidenciado por el hecho de que las bacterias deficientes en - cualquiera de las enzimas de esta vía no son capaces de esporular aún cuando crecen normalmente.

Los ácidos orgánicos excretados durante el crecimiento son utilizados al iniciarse la esporogénesis, lo que conduce a un incremento en el pH del medio.

Se ha demostrado que la mayor parte del carbono del acetato producido durante la etapa vegetativa es incorporado en las moléculas de ácido poli-beta-hidroxibutírico durante las etapas iniciales de la esporulación; este compuesto puede observarse en el interior de las bacterias esporulantes como inclusiones distribuidas a lo largo de la célula. Posteriormente este compuesto es degradado y sus productos de degradación aparecen principalmente como constituyentes de la espora y en menor grado como CO_2 . El acetato remanente es oxidado a CO_2 por las enzimas del TCA.

En las etapas de pre-esporulación y de esporulación se lleva a cabo una degradación extensa de las proteínas existentes y de los tres tipos principales de RNA, seguida de la utilización de precursores para la síntesis de nuevas moléculas. Los estudios de recambio han demostrado que el 80

al 100% de las protefinas de la espora son formadas "de novo" durante la esporogénesis. Los cambios enzimáticos que tienen lugar durante este proceso se muestran en la figura 4. Durante el crecimiento logarítmico las células contienen las enzimas necesarias para su crecimiento normal. Al tiempo t_0 se inicia la esporulación; las proteasas, los sistemas de antibióticos y la lisis de la pared se inducen (círculos abiertos), mientras que muchas de las enzimas de la célula vegetativa disminuyen su actividad. Este decremento puede ser de dos tipos: el primero aparentemente involucra la inactivación de enzimas (triángulos cerrados) como lisina descarboxilasa, isocitrato deshidrogenasa, treonina deshidratasa y fosfofructocinasa. El segundo tipo incluye las enzimas que disminuyen su actividad lentamente o permanecen constantes durante la esporulación (triángulos abiertos). En los tiempos t_1 a t_4 muchas otras enzimas aparecen en las células esporulantes. La fase temprana (t_1 a t_2) incluye algunas enzimas del TCA y enzimas que oxidan ácidos. La fase tardía (t_3 a t_4) incluye las enzimas responsables de la síntesis de los componentes de la espora, como ácido dipicolínico. Finalmente aparece el esporangio seis horas después de que cesa el crecimiento.

REGULACION FISIOLÓGICA DE LA ESPORULACION.

El inicio de la esporulación se encuentra reprimido por la presencia de fuentes de carbono y de nitrógeno fácilmente

metabolizables. Cuando cualquiera de estos componentes se agota en el medio de cultivo, la esporogénesis puede iniciarse aún en presencia de un exceso del otro. Bajo ciertas condiciones, la limitación del fosfato también puede inducir la esporulación. La probabilidad de que una célula vegetativa quede comprometida a esporular depende de las fuentes específicas de carbono y de nitrógeno. La probabilidad es baja con fuentes ricas de carbono y de nitrógeno; sin embargo, si alguna es reemplazada por un compuesto metabolizable más lentamente la probabilidad de que la esporulación se inicie se incrementa, y en algunos casos, por ejemplo el crecimiento en un medio mínimo de sales adicionado de glucosa e histidina como fuente de nitrógeno, alcanza la unidad. Estas observaciones sugieren que la esporulación es reprimida por catabolitos nitrogenados.

Un mecanismo de control negativo hipotético, mediante el cual los metabolitos nitrogenados podrían regular la iniciación de la esporulación, sería que estos metabolitos sirvieran como co-represores de la iniciación. El alto nivel de corepresor podría activar a una molécula represora, la cual podría reprimir la expresión de los genes iniciales de la esporulación. El crecimiento en fuentes de carbono y de nitrógeno pobremente metabolizables o el agotamiento de las fuentes de carbono y de nitrógeno del medio podría causar una disminución del corepresor nitrogenado y, en consecuencia, se incrementaría la probabilidad de que la represión de la -

expresión del inicio de la esporogénesis sea liberada, ya que existiría menos correpresor para activar a la molécula represora.

Otro modelo posible para la regulación de la esporulación sería la represión catabólica. En su sentido más significativo la represión catabólica está relacionada con la velocidad del crecimiento. Cuando se utiliza glucosa u otra fuente de carbono "preferida" los tiempos de generación de los bacilos en medio mínimo son de 50 a 75 minutos y la represión por catabolitos probablemente esté funcionando. Cuando se utiliza glutamato o acetato como fuente de carbono los tiempos de generación son de 80 a 120 minutos y la represión catabólica no se observa. Como el efecto de la represión catabólica requiere de la acumulación de un catabolito de glucosa, además de una cantidad grande de alguna molécula energética (probablemente ATP), el uso de este mecanismo de control encaja bien con los datos obtenidos sobre el control de la esporulación. Por tanto, cuando los nutrientes se agotan en el medio, el control por represión catabólica cesa y las enzimas de la esporulación pueden ser inducidas. Cabe hacer notar que este mecanismo no excluye la regulación de las enzimas biosintéticas por este procedimiento.

Otro mecanismo involucrado en la regulación de la esporogénesis sería la inhibición por retroalimentación. Se sabe que la poza de algunos metabolitos aumenta después de que ha finalizado el crecimiento, pero las razones de esto no han -

sido dilucidadas. El crecimiento se detiene por el agotamiento de los nutrientes y esto debería redundar en la disminución de la poza. Sin embargo, se sabe que las hidrolasas se incrementan en este momento, por lo que se cree que la poza aumenta como respuesta a un incremento en el recambio de los polímeros celulares. Esto podría tener el siguiente efecto: el incremento en la concentración celular de aminoácidos y nucleótidos reprimiría la formación de enzimas biosintéticas e inhibiría, por tanto, la síntesis subsecuente de sus productos finales por retroalimentación; esto permitiría a la célula construir la espora utilizando las enzimas no inhibidas ya existentes en la célula en crecimiento. El principal beneficio de la célula esporulante sería un uso eficiente de la energía total de la célula.

Las enzimas alostéricas tendrían además otras ventajas durante la esporulación. La actividad basal de muchas de las enzimas del metabolismo de carbohidratos es afectada por metabolitos que no son estrictamente los productos finales, pero que reflejan el estado energético de la célula. Un ejemplo de este tipo es la fosfofructocinasa (PFK), que es inhibida por el ATP. La regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis depende de las reacciones que producen energía. Los bacilos que esporulan en un medio mínimo pueden llevar a cabo un control alostérico específico que permite la síntesis de aminoazúcares (para la corteza) en las células que se encuentran en inanición.

Se ha encontrado un tipo de inhibición que no es debida al fenómeno de retroalimentación. Algunas enzimas biosintéticas disminuyen drásticamente su actividad cuando los metabolitos siguen el reverso de la vfa. La PFK es una de estas enzimas. Este fenómeno se ha observado únicamente en levaduras y bacilos. Al inicio de la esporulación la PFK disminuye varias veces y esto ocurre simultáneamente a la disminución del ATP de la poza intracelular. Esto sugiere que la actividad de PFK se pierde por otro mecanismo diferente al de inhibición por retroalimentación y a una velocidad mucho mayor que la esperada por el recambio de proteínas. Una hipótesis de trabajo podría ser la transición alostérica controlada por un metabolito que podría fluctuar como respuesta a las necesidades del metabolismo esporulante.

Los mecanismos mencionados parecen ser suficientes para proveer el control fisiológico necesario para la esporulación, pero pueden existir otros.

MATERIALES Y METODOS.

Cepa empleada.

Se utilizó una cepa de Bacillus cereus T, aislada por Andreoli y cols. (7), con las mismas propiedades bacteriológicas que la cepa de Bacillus cereus 9373.

Condiciones de cultivo.

a) En presencia de glucosa como fuente de carbono (medio G): El microorganismo se creció en 12 litros de medio G modificado (8) cuya composición es a base de sales, 0.1% de sacarosa y 0.1% de extracto de levadura; para ello se utilizó un fermentador (Magnaferm, New Brunswick Scientific Co.) aereado vigorosamente (8 litros de aire por minuto), agitado a 150 rpm y temperado a 30°C. El inóculo para el crecimiento a gran escala se preparó con la técnica de Collier (9), utilizando un mínimo de 5 transferencias seriadas, a intervalos de tres horas, crecidas en el mismo medio.

b) En medio de casaminoácidos como fuente de carbono - (medio CAAS): el bacilo se creció en el medio de hidrolizado de caseína descrito por Sterlini y Mandelstam (10) en un fermentador con 12 l de medio, las condiciones de aereación, agitación y temperatura fueron las mismas que las utilizadas para el medio G. Para el inóculo se utilizaron esporas activadas por choque térmico, mediante calentamiento a 70°C durante

30 minutos.

Crecimiento y cosecha.

En ambos tipos de medio el crecimiento se siguió espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 540 nm. Las células se colectaron por centrifugación en una centrífuga de flujo continuo (Sharples, modelo T-1) durante la etapa - exponencial (A_{540} 1.25) o al tiempo de esporulación indicado. Los cultivos fueron examinados periódicamente en un microscopio de contraste de fases para evaluar el estadio de esporulación y el grado de sincronía. Típicamente más del 90% de las células se encontraban en el mismo estadio de esporulación. El paquete celular se lavó tres veces con buffer Tris-HCl 0.2 M pH 7.4 adicionado de $CaCl_2$ 5 mM y $MgCl_2$ 5 mM (buffer TCM) mediante centrifugación a 10,000 rpm/10 min. a 4°C (centrífuga Sorvall RC-2B).

Rompimiento celular y preparación de las membranas.

Las células así obtenidas se resuspendieron en 100 ml de buffer TCM y se rompieron en un fraccionador Ribi cell (modelo RM-1 Ivan Sorvall Inc.) a 30,000 lb/pul² de presión, según Andreoli y cols. (7). El homogenado obtenido se incubó con unos pocos cristales de desoxirribonucleasa I pancreática bovina durante 10 min. a temperatura ambiente y agitación suave, para eliminar la viscosidad producida por el ADN liberado. Las células completas se eliminaron por centrifugación a 1,500 x g durante 10 min., se descartó la pastilla y

el sobrenadante se centrifugó a 140,000 x g durante una hora para sedimentar las membranas. El paquete de membranas se lavó tres veces con buffer TCM, mediante centrifugación a 140,000 x g durante 60 min. Las membranas así obtenidas pueden almacenarse en nitrógeno líquido durante varias semanas sin pérdida apreciable de actividad de SDH, - sin embargo, el almacenamiento en estas condiciones disminuye drásticamente la actividad de NADH deshidrogenasa, por lo que es preferible ensayar esta enzima con membranas recién preparadas.

Ensayos enzimáticos.

a) Oxidorreductasas:

1. Succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa. El ensayo se realizó de acuerdo con el descrito por Arrigoni y Singer (11), en cubetas de 3 ml a 30°C. La mezcla de ensayo contenía: buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.6, membranas (aproximadamente 0.4 mg de proteína de membranas), succinato disódico 20 mM, metasulfato de fenazina (PMS) 1.1 mM y diclorófenolindofenol (DCPIP) 0.08 mM llevados a un volumen final de 3 ml con agua destilada. La mezcla de ensayo se incubó durante 3 min. antes de la adición de los colorantes. La reducción del DCPIP se siguió espectrofotométricamente a 600 nm (espectrofotómetro Pye - Unicam SP 1800, al cual se adaptó un circulador de agua para mantener la temperatura a 30°C). Se registró la actividad durante 2 a 3 min. y se adicionó KCN 0.1 mM. La actividad dependiente de cianuro se cuantificó por el cambio producido en la pendiente después de la adición del mismo. La adición del cianuro durante el periodo de incubación (antes de los colorantes) no modificó significativamente el resultado.

La actividad se expresa como nanomolas de DCPIP reducidas por minuto por mg de proteína. El coeficiente de extinción molar utilizado para el DCPIP fue $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2. NADH:DCPIP oxidoreductasa. La mezcla de ensayo contenía buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.6, 0.4 mg de proteína de membranas, NADH 1.4 mM, DCPIP 0.08 mM y agua destilada hasta volumen final de 3 ml. La mezcla de ensayo se incubó durante 3 min. La reacción se inició con la adición de DCPIP. La adición de cianuro y la reducción del DCPIP se llevaron a cabo de la manera arriba descrita. La actividad se expresa en la misma forma que para la succinato oxidoreductasa.

3. Succinato:citocromo c oxidoreductasa. La mezcla de ensayo contenía buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.6, succinato disódico 20 mM, 1.5 mg de citocromo c, 1 a 2 mg de proteína de membranas y agua destilada hasta un volumen final de 3 ml. La mezcla de ensayo fue incubada a 30°C durante 3 min. antes de la adición del citocromo c. La reducción de este citocromo se cuantificó midiendo la absorbancia a 550 nm durante 3 a 4 min. después de lo cual se adicionó KCN 0.1 mM. La actividad se expresa como nanomolas de citocromo c reducidas por minuto por mg de proteína. El coeficiente de extinción molar utilizado para el citocromo c fue de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4. NADH:citocromo c oxidoreductasa. El ensayo se realizó en la misma forma que el anterior, excepto que se utilizó NADH 1.4 mM como sustrato, en lugar de succinato. La actividad se expresa de igual manera que para la succinato:citocromo c oxido-

rreductasa.

b) Oxidasas.

Las oxidasas se ensayaron polarográficamente utilizando un electrodo de oxígeno. La cubeta contenía en todos los casos la siguiente mezcla de ensayo (M.E.): buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4, membranas (1 a 2 mg de proteína de membrana) y agua destilada hasta volumen final de 3 ml. La mezcla de ensayo se preincubó durante 3 min. a 30°C antes de iniciar la reacción con la adición del sustrato.

1. Succinato oxidasa: M.E. + succinato disódico 20 mM.

2. Succinato:DCPIP (o TMPD) oxidasa: M.E. + DCPIP 0.3 mM (o TMPD 0.3 mM) preincubación a 30°C y adición de succinato 20 mM.

3. NADH oxidasa: M.E. + NADH 0.5 mM.

4. NADH:DCPIP oxidasa: M.E. + DCPIP 0.3 mM preincubación a 30°C y adición de NADH 0.5 mM.

5. Ascorbato:DCPIP (o TMPD) oxidasa: M.E. + DCPIP 0.3 mM (o TMPD 0.3 mM) preincubación a 30°C y adición de ascorbato 10 mM.

Las actividades de oxidasas se expresan como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto por mg de proteína. Los valores se corrigieron en aquellos casos en que se presentó autooxidación de los colorantes.

Los inhibidores se adicionaron a la mezcla de ensayo antes de los 3 minutos de preincubación. Se probaron los siguientes

inhibidores: cianuro de potasio (KCN), azida de sodio (NaN_3), dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-oxido (HOQNO), antimicina y rotenona. El HOQNO, la antimicina y el DCCD se utilizaron en solución etanólica; el KCN y la NaN_3 se disolvieron en buffer de fosfatos.

Espectros Diferenciales.

La medición de los espectros diferenciales se realizó a 77°K en un espectrofotómetro de doble rayo (Aminco DW2) con aditamento para nitrógeno líquido, utilizando "split beam" con un paso de banda de 1 nm. Se utilizaron cubetas de 0.4 ml con una longitud de paso de luz de 0.2 cm. Las membranas fueron resuspendidas en glicerol al 50%. Los espectros reducidos menos oxidado se registraron utilizando como reductores NADH 5 mM, succinato 30 mM, ascorbato 10 mM + DCPIP (o TMPD) 0.3 mM o ditionita (algunos cristales); las membranas se oxidaron mediante agitación en el Vortex durante 5 minutos. La velocidad de registro fue de 2 nm/segundo. Los máximos de absorción obtenidos de esta manera se consideran "steady state". Los espectros anaeróbicos reducidos vs aeróbicos reducidos se obtuvieron burbujeando nitrógeno a las membranas durante 60 min.

Solubilización de la succinato deshidrogenasa.

La SDH fue solubilizada de las membranas de células vegetativas o de células esporulantes utilizando un detergente no iónico, el Brij 36-T, que es un derivado de alcoholes polioxi etilénicos. Las membranas resuspendidas en buffer TCM se adi-

cionaron con 0.3% del detergente y fueron sonicadas durante 15 min., en un baño de hielo, e incubadas durante 60 min. a 4°C. La suspensión se centrifugó a 140,000 x g durante 2 horas y se separaron las fracciones. Este tratamiento produce aproximadamente un 60% de actividad de SDH en el sobrenadante, comparada con la actividad de las membranas no tratadas.

Inactivación alcalina de la SDH de membranas vegetativas y esporulantes.

La inactivación se llevó a cabo de acuerdo al método de King (12). Las membranas (de células vegetativas o esporulantes se resuspendieron en buffer de fosfatos-boratos 50 mM, pH 7.6 y se alcalinizaron con NaOH 1N hasta pH de 11.5, se centrifugaron inmediatamente a 140,000 x g durante 60 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer TCM pH 7.6, aforando al volumen original. La actividad de SDH en esta fracción fue nula.

Reconstitución de la SDH soluble en membranas inactivadas por tratamiento alcalino.

Para que la enzima solubilizada pudiera ser utilizada en los experimentos de reconstitución fue necesario remover el Brij 36-T, ya que este detergente presenta una concentración micelar crítica (CMC) muy baja, que impide la asociación de la enzima a las membranas inactivadas. La remoción del detergente se llevó a cabo utilizando una columna de DEAE-celulosa D-22

de 15 cm de largo por 1.5 cm de diámetro, equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM + succinato 40 mM + colato al 0.25%, pH 7.4. La adición de colato tuvo por objeto el intercambio de detergentes, necesario para evitar la inactivación de la SDH. El colato presenta una CMC mucho mayor que el Brij 36-T por lo que no interfiere en la reconstitución ya que es dializable. El sobrenadante obtenido de la solubilización se adsorbió en la columna; la elución del Brij 36-T se llevó a cabo pasando el buffer utilizado para equilibrar la columna; este detergente absorbe a 260 nm, lo que permitió seguir su salida, hasta la recuperación de la línea basal, después de lo cual se adicionó NaCl 0.6M para eluir la proteína. A esta fracción la denominamos SDH soluble.

Para los experimentos de reconstitución se adicionó enzima esporulante (o vegetativa) soluble, con una actividad relativa de $\Delta D.O. = 11$ unidades por minuto a 1 ml de membranas vegetativas (o esporulantes) inactivadas por tratamiento alcalino y con una concentración de proteína de 2.5 mg/ml. La preparación se sonicó durante 10 min. continuos, en un baño de hielo, y se colocó en una bolsa de diálisis; se dializó contra 500 ml de buffer Tris-HCl 50 mM + succinato 40 mM + colato 0.25%, pH 7.6, durante 12 horas con dos cambios de buffer. El dializado se centrifugó a 140,000 x g, se separó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer TCM al volumen original, después de dos lavados previos. Se determinó actividad a cada una de las fracciones.

La concentración de proteínas se determinó de acuerdo con el método de Lowry (13).

Reactivos.

La desoxirribonucleasa I, el PMS, el NADH, el citocromo c (tipo III), el HOQNO y la antimicina fueron obtenidas de la casa Sigma Chemical Co.; el DCPIP de la casa Baker. Los demás reactivos utilizados fueron de grado reactivo.

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la figura 5 se representa una gráfica típica del crecimiento y la esporulación de B. cereus en medio G modificado. El tiempo t_0 indica el inicio de la esporulación, el cual se lleva a cabo a los 30 minutos posteriores al pH mínimo del cultivo. Los estadios subsecuentes de esporulación t_1 , t_2 , t_3 , etc., se obtienen a los 60, 120, 180, etc., minutos después de haberse detectado t_0 y pueden seguirse mediante la observación al microscopio de contraste de fases.

La figura 6 muestra el crecimiento y la esporulación de B. cereus en medio CAAS; se observa una fase de retardo muy larga que no se presenta en el crecimiento en medio G. Esta diferencia es debida, por un lado, a la preparación del inóculo, que en el caso de medio G consiste en un cultivo activo, mientras que en el medio CAAS se parte de esporas activadas (ver Materiales y Métodos); por otro lado, el medio G contiene glucosa como fuente de carbono, que es un sustrato de rápida utilización, no así el hidrolizado de caseína que es metabolizado más lentamente. El pH en este medio no muestra variación porque no hay acumulación de ácidos orgánicos en el medio, como ocurre en presencia de glucosa. Por tanto, se considera como t_0 el final del crecimiento logarítmico; los estadios subsecuentes de la esporulación se siguen mediante microscopía de contraste de fases.

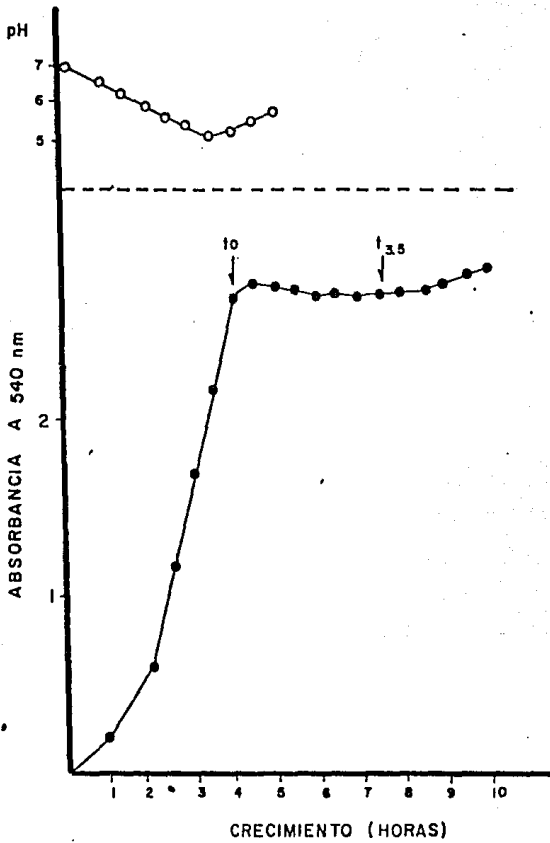


FIG. 5. CURVA DE CRECIMIENTO DE B. cereus EN MEDIO G MODIFICADO.

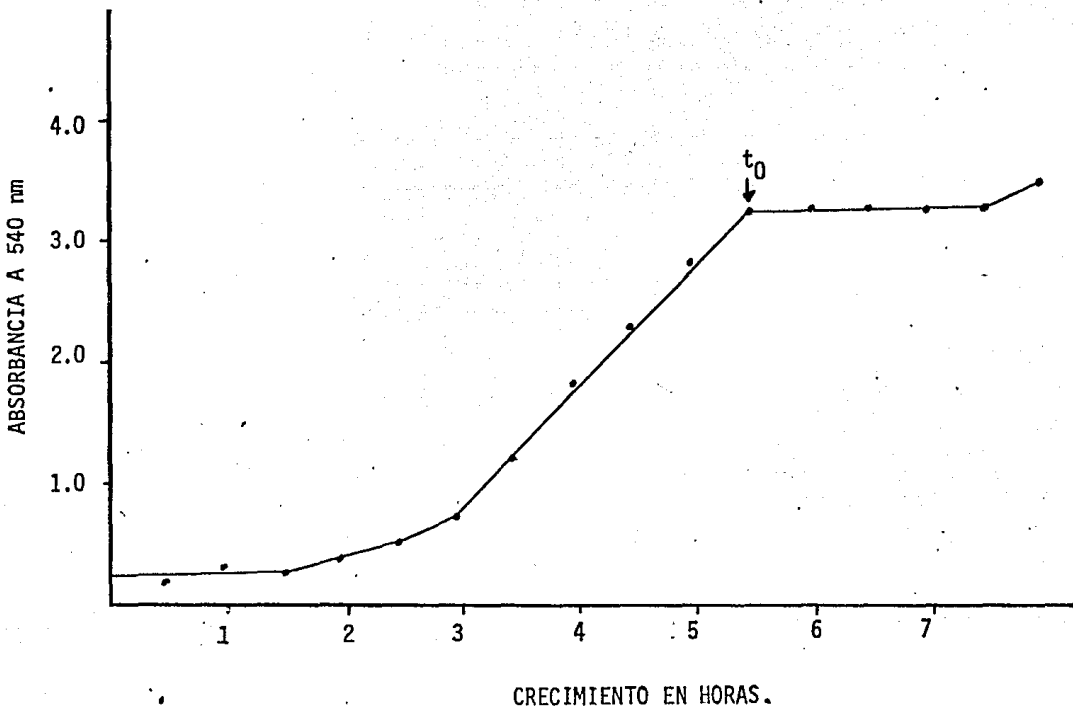


FIG. 6. CURVA DE CRECIMIENTO DE B. cereus EN MEDIO CAAS.

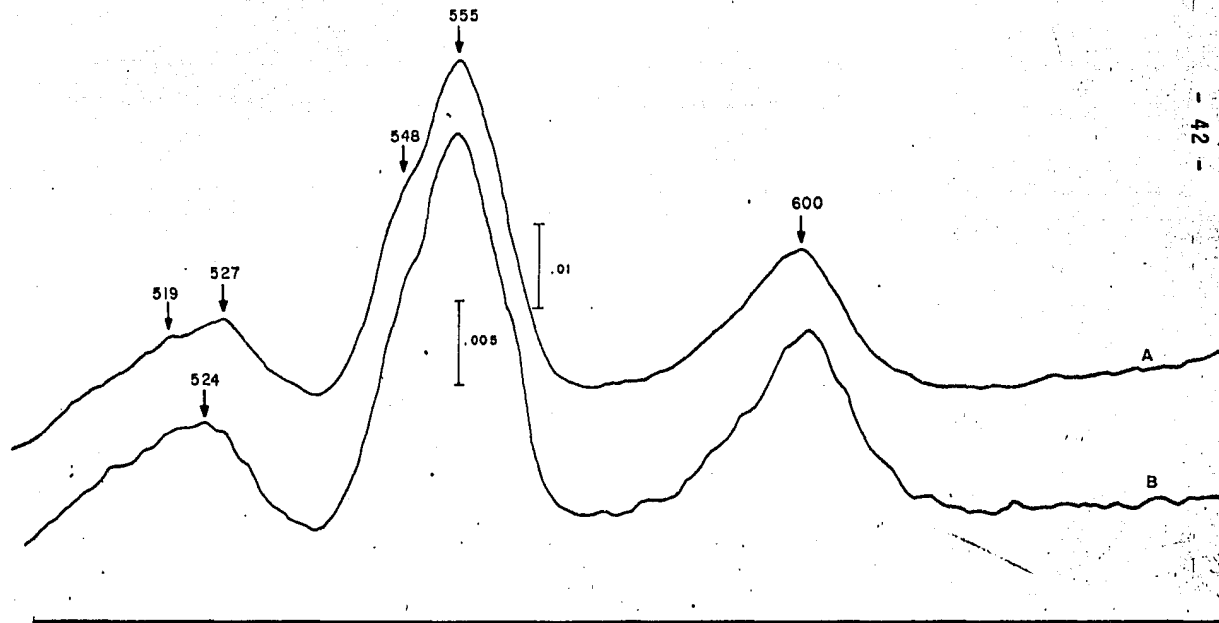
El objetivo de cultivar el bacilo en ausencia de glucosa fue el de evitar la represión, por este sustrato, de las enzimas del ciclo de Krebs durante el crecimiento exponencial, inducir la cadena de transporte de electrones (CTE) en esta etapa y comparar el sistema oxidativo de las membranas de células crecidas en estas condiciones con el de las crecidas en presencia de glucosa.

En la tabla I se muestran las actividades de NADH y succinato - oxidasas presentes en las membranas de células vegetativas (membranas veg) crecidas en presencia (medio G) y en ausencia (medio CAAS) de glucosa y su comportamiento frente al cianuro. Se observa que ambas actividades se incrementan 3.1 y 4.9 veces respectivamente, lo que sugiere la existencia de un incremento en los componentes de la CTE en ausencia de glucosa. Esta idea se ve reforzada por los espectros diferenciales (reducidos con ditionita vs oxidados) que se muestran en la figura 7. Puede observarse que en ambos casos la composición de citocromo es igual, desde el punto de vista cualitativo. Existen picos de absorción a 527 y a 555 nm correspondientes a citocromo b; un hombro muy ligero a 548 nm que corresponde a citocromo c, este citocromo también absorbe a 519 nm (línea beta), sin embargo este máximo no se detecta en forma clara en las preparaciones mostradas, apareciendo únicamente un hombro ancho en la región de 515 a 530 nm; finalmente se observa un máximo a 600 nm que corresponde a citocromo - a+a₃.

Por otra parte, desde el punto de vista cuantitativo encontramos que la altura de los picos en el medio CAAS (trazo A) es aproximadamente el doble que la de los picos registrados en el medio G (trazo B),

ESPECTROS DIFERENCIALES. MEMB VEG.
REDUCIDO CON DITIONITA vs OXIDADO

A) MEDIO CAAS (5.5 mg/ml)
B) MEDIO G (6 mg/ml)



500

FIG. 7.

600

Oxidasa	MEDIO G			MEDIO CAAS			Act. CAAS Act. G
	-KCN	+KCN	% INHIB.	-KCN	+KCN	% INHIB	
NADH	10	8.1	18.8	31	27	13	3.1
Succinato	7.5	6.3	15.7	36.7	33.4	9.1	4.9

TABLA I. Actividad de oxidasas presentes en membranas veg de B. cereus.

La concentración de KCN es 0.1 mM

La actividad se expresa como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto por mg de protefna de membrana.

Oxidasa	MEDIO G			MEDIO CAAS			Act. CAAS Act. G
	-KCN	+KCN	% INHIB.	-KCN	+KCN	% INHIB	
NADH	81.2	63.5	21.7	197.2	157.7	20	2.4
Succinato	13.6	12.2	10.4	34.3	28.2	17.7	4.9

TABLA II. Actividad de oxidasas presentes en membranas spo de B. cereus.

La concentración de KCN es 0.1 mM

La actividad se expresa en la misma forma que en la Tabla I.

ya que en el primer caso el espectro fue trazado con la mitad de la sensibilidad de la utilizada para medio G (Abs. 0-0.1 y 0-0.05, respectivamente). La concentración de proteína es similar en ambos casos.

Es sabido que los espectros obtenidos a la temperatura del nitrógeno líquido (77°K) no son adecuados para realizar cálculos cuantitativos y esto es debido a que la baja temperatura disminuye la distribución de los subestados de energía, tanto vibracional como rotacional, de las moléculas lo que da por resultado la aparición de picos exagerados en relación a la cantidad real de citocromos presentes. No obstante, es posible efectuar comparaciones cuantitativas cuando las concentraciones de proteína son equivalentes.

En el caso de las membranas obtenidas de células esporulantes (membranas spo), también encontramos un incremento en la capacidad oxidativa cuando los bacilos esporulan en el medio CAAS comparada con la de los bacilos que esporulan en medio G (tabla II); este incremento también se refleja en la altura de los picos de los espectros diferenciales (figura 8) evocados con ditionita.

El incremento registrado en los componentes de la CTE de las membranas obtenidas de células crecidas en ausencia de glucosa era de esperarse, ya que en estas condiciones la célula requiere de otras vías, distintas a la glucolítica, para la obtención de energía. Cuando la única fuente de carbono presente en el medio son aminoácidos, la energía debe ser obtenida a expensas del ciclo de Krebs, el cual a su vez requiere de una cadena respiratoria funcional para reoxidar al NADH.

DITIONITA

MEMB SPD.

a) MEDIO CAAS

b) MEDIO G

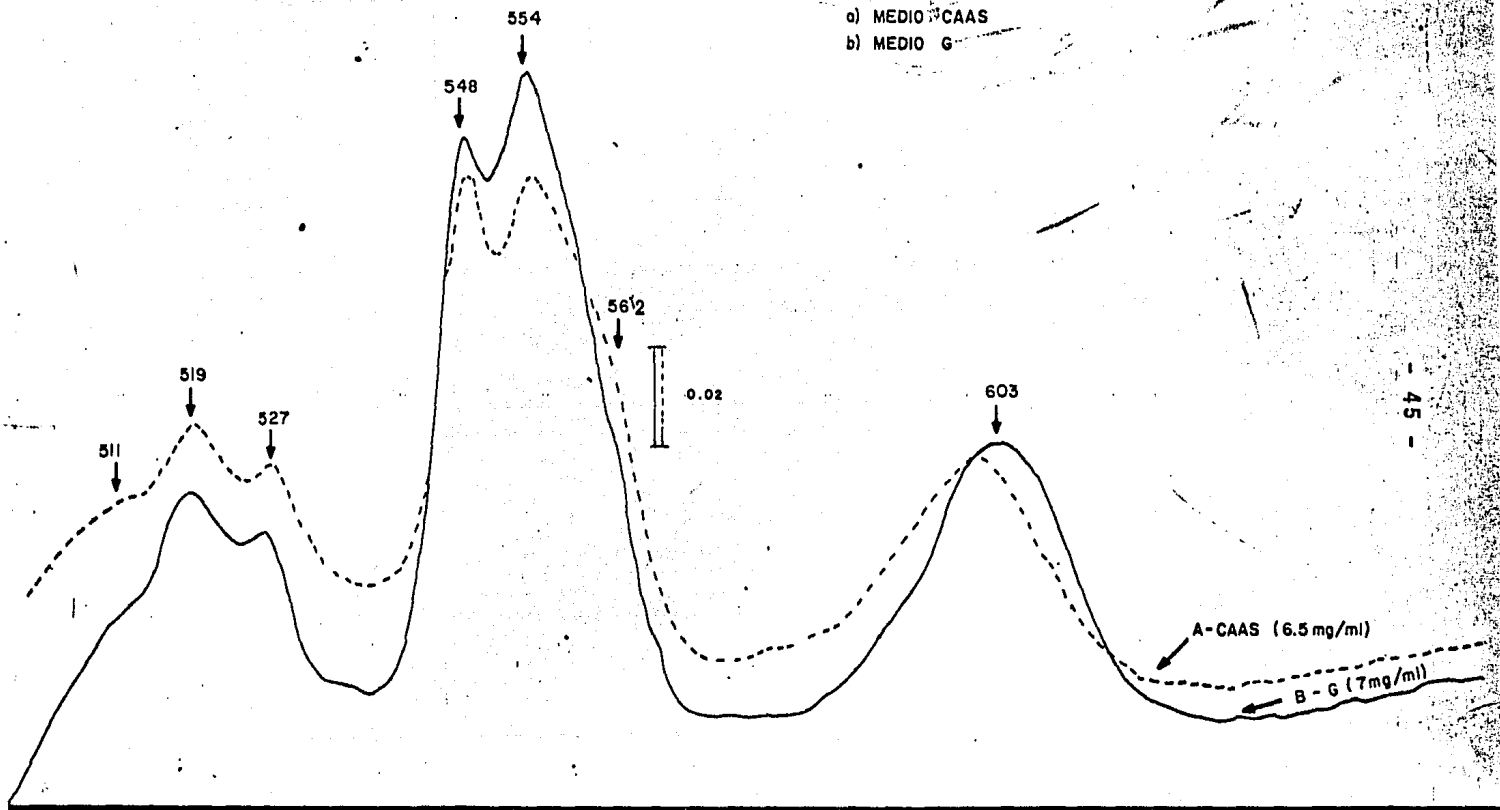
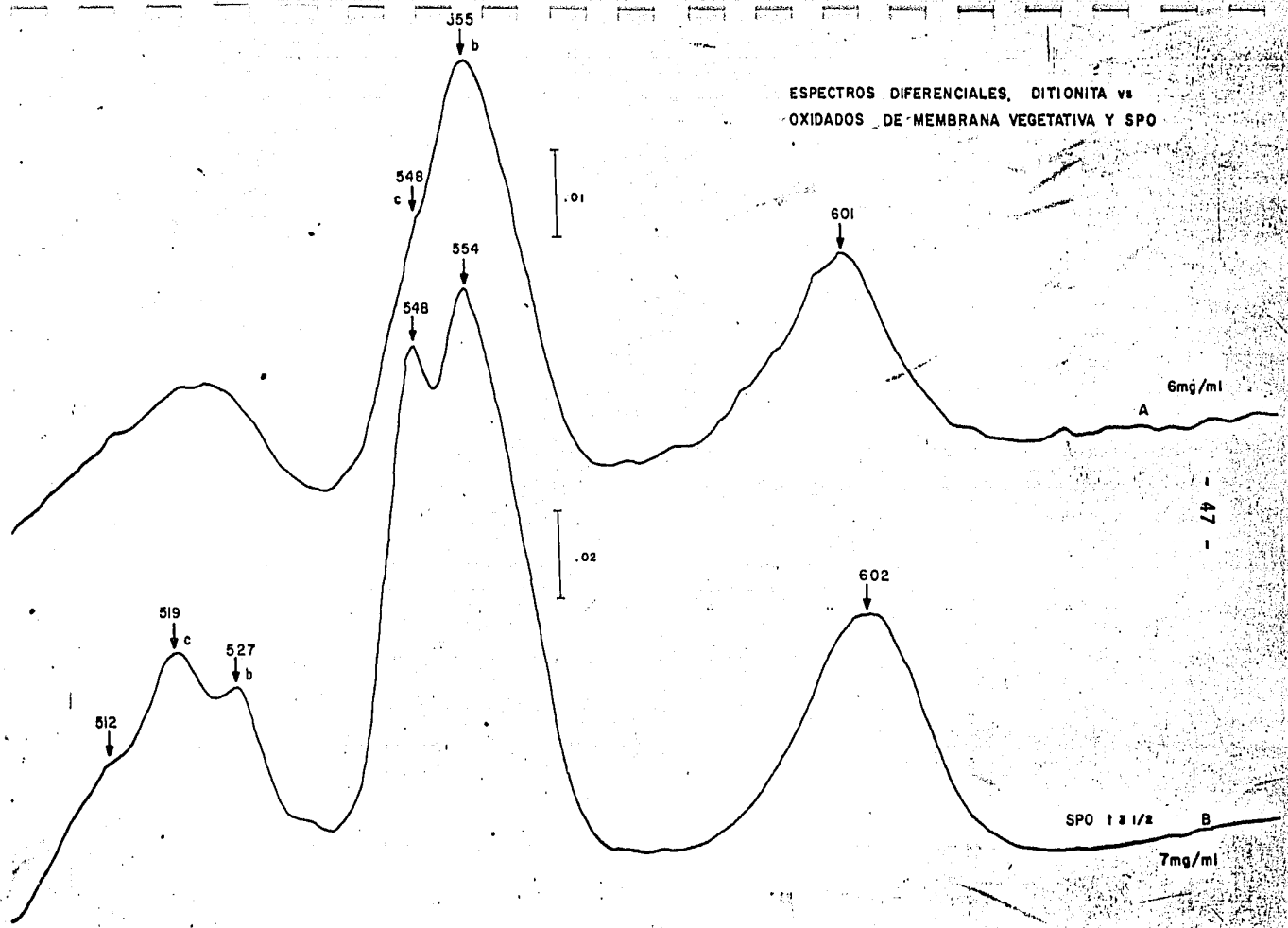


FIG. 8.

Por otro lado, independientemente de la composición del medio de cultivo utilizado, existe un incremento considerable en los componentes de la CTE durante los primeros estadios de la esporogénesis, como puede verse en los espectros diferenciales de las figuras 9 y 10, que muestran los máximos de absorción de los citocromos reducidos con ditionita de membranas veg y spo obtenidas en medio G y en medio CAAS, respectivamente. La elevación que sufren los citocromos durante la esporulación de B. cereus fue cuantificada por el grupo de Lang (5), quienes encontraron que el incremento es como sigue: citocromo b, 5.8 veces; citocromo c, 5.3 veces; citocromo a, 3.3 veces y citocromo a₃, 1.8 veces.

La tabla III muestra en forma comparativa las actividades de oxidasas de membranas veg y spo obtenidas de medio G y el efecto inhibitorio promovido por cianuro (0.1 mM). Se observa que la actividad de NADH oxidasa es pobre durante la etapa vegetativa y se incrementa 8 veces en la esporulación; además, si observamos el consumo de oxígeno promovido por la mezcla artificial ascorbato:TMPD notamos que - también existe un incremento notable (5.5 veces) durante este proceso. Es conocido que la mezcla de ascorbato:TMPD dona los electrones directamente al citocromo c (1), por tanto, el consumo de oxígeno promovido por esta mezcla constituye un reflejo directo de la citocromo c oxidasa; el incremento observado coincide con los datos de Lang y cols. Sin embargo, el incremento en la capacidad oxidativa no se ve reflejado en la succinato oxidasa, cuya actividad es pobre durante la fase vegetativa y se mantiene baja durante todo el proceso

ESPECTROS DIFERENCIALES, DITIONITA vs
OXIDADOS DE MEMBRANA VEGETATIVA Y SPO



800 FIG. 9.

DITIONITA

MEDIO CAAS

A) Veg (5.5 mg/ml)

B) Spo (6.5 mg/ml)

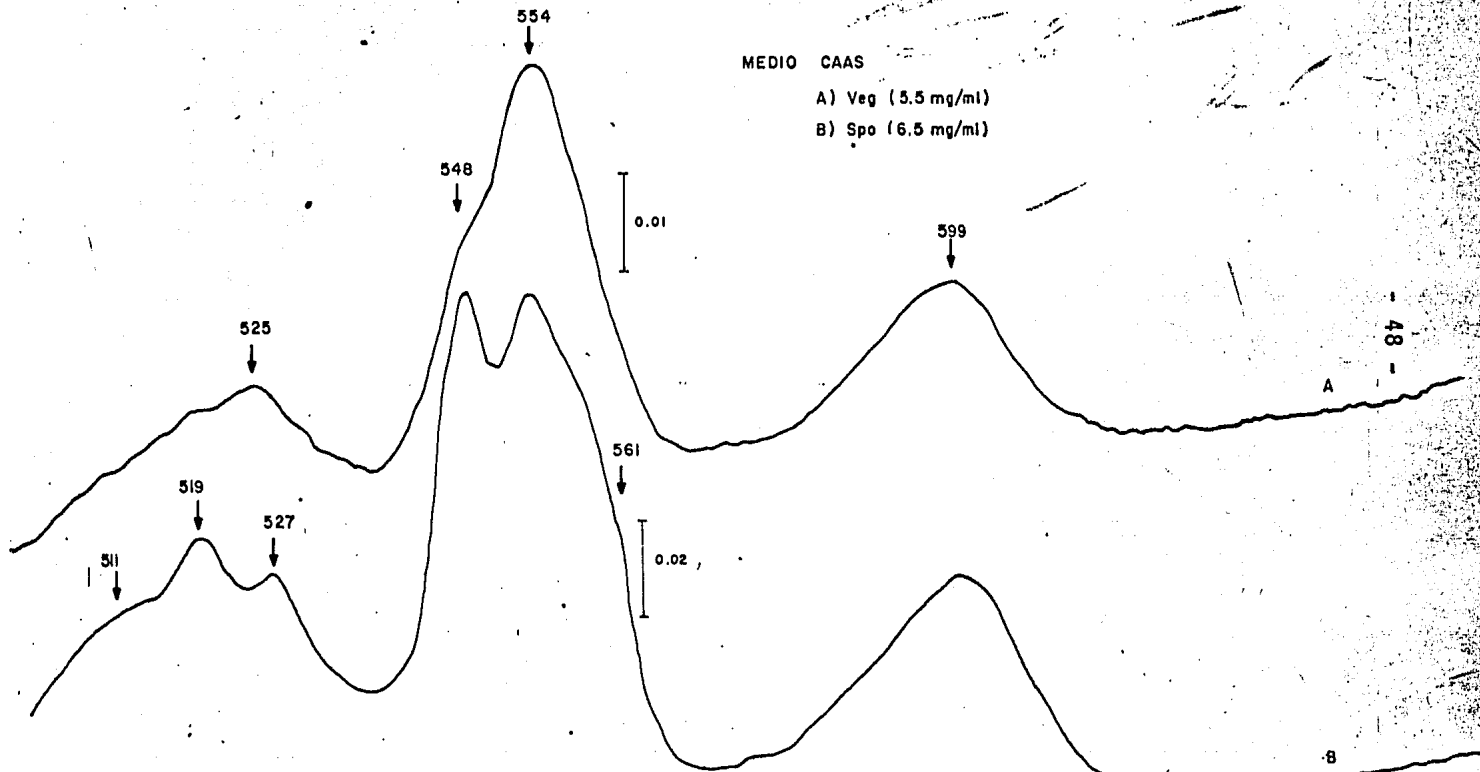


FIG. 10.

OXIDASA	VEGETATIVAS					SPO (t.3.5)		Act. Esp. SPO
	*Act. específica		% INHIB.	Act. específica		% INHIB.	Act. Esp. VEG.	
	-KCN	+KCN		-KCN	+KCN			
NADH	10	8.1	19	81.2	63.5	22	8.0	
Succinato	7.5	6.3	15.7	13.6	12.2	10.4	0.9	
Asc:TMPD	77.1	30.3	60.7	421.9	54.8	87	5.5	
Asc:DCPIP	-	-	-	516	0	100	-	

TABLA III. Oxidasas presentes en membranas de B. cereus.

Las células se obtuvieron en medio G.

*Act. esp. en nanoátomos de oxígeno/min/mg de prot.

Concentración de KCN = 0.1 mM.

de esporulación. Este hecho podría ser explicado de dos maneras: por un lado, la actividad intrínseca de la SDH es baja, o bien, la eficiencia de la enzima para reducir a la CTE es muy pobre. La primera alternativa puede ser descartada, en apoyo de la segunda, de acuerdo con las siguientes evidencias:

i) La actividad de la SDH medida como oxidorreductasa, utilizando al PMS como acarreador artificial de electrones y al DCPIP como aceptor final (Succ:PMS:DCPIP) es elevada tanto en la etapa vegetativa como en la esporulante (tabla IV) lo que sugiere que la enzima es activa oxidando al succinato pero es poco eficiente para ceder los electrones a la CTE, lo que podríamos considerar como una pobre conexión de la SDH a la cadena respiratoria. A diferencia de esta enzima, la NADH deshidrogenasa, medida como oxidorreductasa utilizando al DCPIP como aceptor final de electrones, se incrementa aproximadamente 5 veces (tabla IV) durante la esporogénesis en medio G. Este incremento podría ser el resultado de un mecanismo de desregulación enzimática una vez que se detiene el crecimiento exponencial por agotamiento de la glucosa en el medio, ya que en el medio CAAS el incremento es únicamente de dos veces, sin embargo, este mecanismo es tan solo una especulación.

ii) La adición de acarreadores artificiales de electrones como DCPIP, TMPD o PMS sobre la succinato oxidasa estimulan significativamente el consumo de oxígeno en ambos tipos de membranas (tabla V), lo que indica que no es la actividad intrínseca de la SDH el factor limitante en la oxidación del succinato y, nuevamente sugiere, que

Ensayo	MEDIO G						MEDIO CAAS					
	VEGETATIVAS			SPO (t _{3.5})			VEGETATIVAS			SPO (t _{3.5})		
	-KCN	+KCN	Veces Est. KCN	-KCN	+KCN	Veces Est. KCN	-KCN	+KCN	Veces Est.	-KCN	+KCN	Veces Est.
Succ:PMS:DCPIP	160	170	1.06	0	202.5	Total	192.6	287.5	1.5	0	258.7	Total
NADH : DCPIP	31.3	28.2	0	155	160.7	1.04	43.7	43.7	0	89.3	125	1.4
Succ : DCPIP	9.0	9.0	0	0	15	Total	--	--	--	--	--	--
Succ : cit C	0	0	0	0	2.8	Total	--	--	--	--	--	--
NADH : cit C	0	0	0	45.3	52.7	1.16	--	--	--	--	--	--

TABLA IV. Oxidorreductasas presentes en membranas de B. cereus.

La actividad se expresa en nanomolas de DCPIP o de cit. c reducidas por minuto y por mg de prot.

VEGETATIVAS			SPO (t _{3.5})	
OXIDASA	Act. Esp.	$\frac{\text{Act. acarreador}}{\text{Act. basal}}$	Act. Esp.	$\frac{\text{Act. acarreador}}{\text{Act. basal}}$
Succ. (basal)	7.5	--	7.05	--
Succ:DCPIP	69.8	9.3	45	6.4
Succ:TMPD	85.3	11.4	51	7.3
Succ:PMS	180	24	144	20.5
NADH (basal)	10	--	81.2	--
NADH:DCPIP	80	8	116.5	1.4

TABLA V. Actividad de succinato y NADH oxidasas de membranas de B. cereus frente a diferentes acarreadores artificiales.

La actividad se expresa como nanoátomos de O₂ reducidos/min/mg.

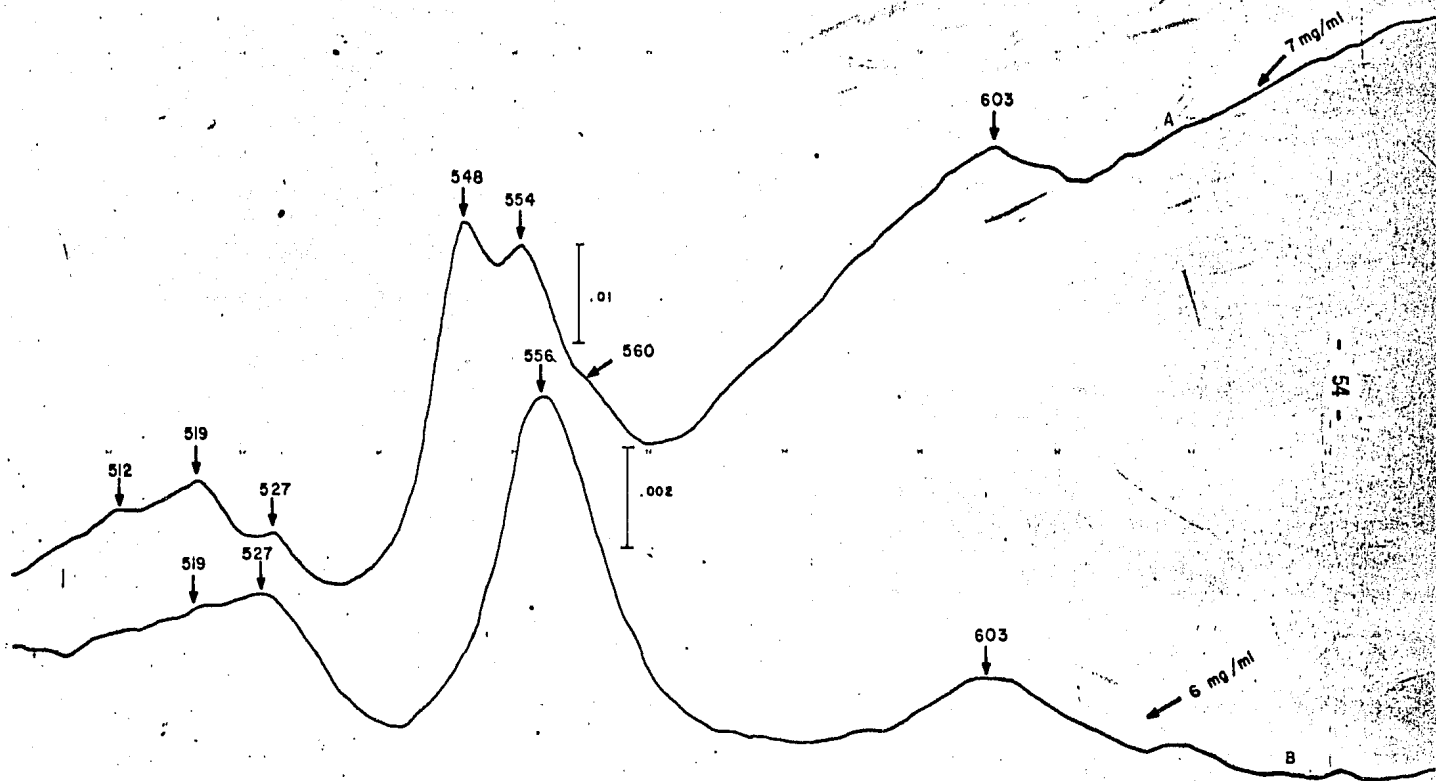
La SDH no se encuentra bien conectada a la cadena respiratoria. En este sentido, la oxidación de NADH durante el crecimiento vegetativo es estimulada significativamente por la adición de DCPIP (alrededor de 8 veces), mientras que durante la esporogénesis la estimulación disminuye a 1.43 veces lo que sugiere el incremento de la eficiencia de la cadena respiratoria para recibir electrones de la NADH deshidrogenasa durante la esporulación.

iii) Los espectros diferenciales de las membranas veg y spo reducidos con NADH o con succinato vs oxidados (figuras 11 y 12) muestran nuevamente el pobre contenido de citocromos de las membranas veg; al igual que con la ditionita, ambos sustratos evidencian solamente los picos u hombros de absorción correspondientes al citocromo b (527 y 555 nm) y al citocromo $a+a_3$ (603 nm), mientras que el citocromo c (519 y 548 nm) es poco aparente. Por el contrario, en las membranas spo el NADH evoca la reducción completa de los citocromos. Con este reductor aparecen, además de los máximos de absorción de los citocromos b, c y $a+a_3$, un pequeño pico a 512 nm que no aparece en las membranas veg, y un pequeño hombro a 562 nm, que posiblemente se encuentre enmascarado en las membranas veg, ya que la caída del pico a 555 nm no es simétrica, sino que se ensancha en su inferior. El hombro a 562 nm sugiere la presencia de un segundo citocromo del tipo b, el b_{562} , que ha sido descrito en B. megaterium (1). Reportes en la literatura (14, 15) indican que el pico a 512 nm corresponde al pico beta de absorción del citocromo c_{554} (pico alfa de absorción a 554 nm), que ha sido aislado y purificado de las membranas de B. subtilis. Se sabe

NADH vs OX

A) Memb 1 3 /2

B) Memb Veg



Succ vs Ox A) Memb Veg, 6mg/ml
 B) Memb SPO, 7mg/ml

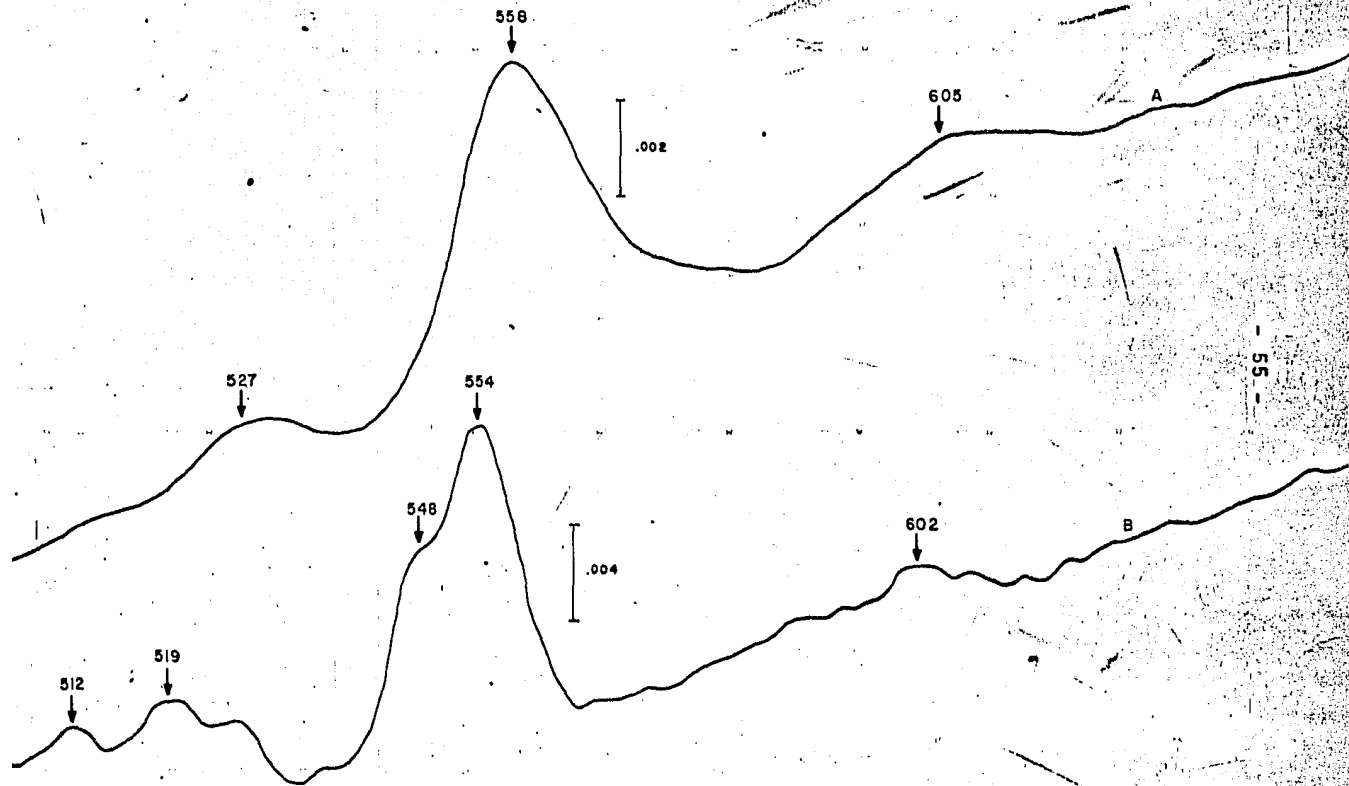


FIG. 12.

que los picos de absorción de algunos citocromos se superponen en la región alfa del espectro (16), por tanto, es muy posible que el pico a 554 de este citocromo c esté siendo enmascarado por el pico a 555 nm del citocromo b, ya que es muy difícil la resolución de dos citocromo que absorben con un nm de diferencia.

En B. cereus nunca han sido descritos estos citocromos, por lo que resulta de interés su caracterización y su ubicación dentro de la CTE. En este sentido, el grupo de Hogarth (1) ha sugerido que el citocromo b₅₆₂ de B. megaterium corresponde al citocromo o descrito por Kamen (17) en otros sistemas bacterianos, y que se comporta como una oxidasa terminal resistente al cianuro.

El espectro diferencial de la figura 12 muestra que, en las membranas spo, el succinato produce un patrón de reducción distinto al evocado por NADH; succinato solo es capaz de reducir significativamente al citocromo b₅₅₅. Hederstedt (18) en B. subtilis aisló y caracterizó un complejo de SDH-citocromo b reducible a expensas de succinato; además, en experimentos con mutantes (19) encontró evidencias que apoyan fuertemente el hecho de que el citocromo b es el sitio de unión (o parte del sitio de unión) a la membrana de la SDH, sugiriéndose que la SDH reduce directamente al citocromo b sin mediación de una quinona.

Por otra parte, llama la atención el hecho de que el cianuro no sea eficiente inhibiendo las actividades de NADH y succinato oxidasas (tabla III), mientras que el consumo de oxígeno promovido por los sustratos de sitio III, ascorbato:TMPD y ascorbato:DCPIP, es fuertemente inhibido (87 y 100% respectivamente) por este compuesto. Esto

sugiere la posibilidad de que, cuando se utilizan reductores de sitio I y de sitio II (NADH y succinato), los electrones fluyan hasta el oxígeno por otra vía además de la citocromo c oxidasa. La presencia de cadenas alternas es un fenómeno altamente distribuido en las especies bacterianas (20, 21, 22). Con el objeto de caracterizar estas cadenas en nuestro sistema, decidimos ensayar el efecto de inhibidores de los tres sitios frente a la capacidad reductora de NADH, succinato y ascorbato:TMPD y analizar espectralmente la composición de citocromos.

La figura 13 muestra las curvas del efecto de la concentración de rotenona (sitio I), antimicina y HOQNO (sitio II) sobre la NADH oxidasa de membranas spo ($t_{3.5}$). Debido a la baja eficiencia inhibitoria de la rotenona en sistemas bacterianos, no es posible discutir su efecto. En el caso de antimicina y HOQNO se observan inhibiciones del orden de 78 y 73%, respectivamente. Como inhibidores de sitio III probamos azida de sodio, KCN y DCCD. El caso de la azida es similar al de la rotenona en cuanto a que no es un buen inhibidor de la citocromo c oxidasa en bacterias; a elevadas concentraciones (40 mM) solo es capaz de inhibir en un 13% a la NADH oxidasa. El KCN logra inhibir en un 57% esta actividad (figura 14) a concentraciones por arriba de 2.0 mM. Los resultados obtenidos con HOQNO y antimicina y con el cianuro, permiten sugerir la presencia de una ramificación en la CTE primaria a nivel del citocromo b y la presencia de una segunda oxidasa poco sensible al cianuro. El DCCD promueve un 80% de inhibición sobre la NADH oxidasa (figura 15). Reportes recientes (23) indican que el DCCD actúa directamente sobre las subunidades III y IV de la citocromo c oxidasa obtenida

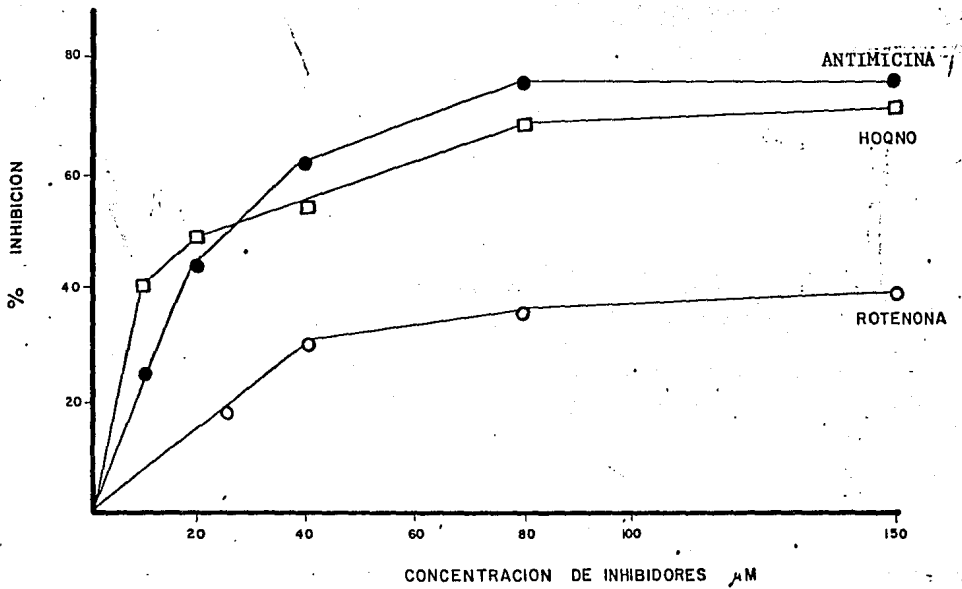


FIG. 13. EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA NADH OXIDASA DE MEMB. SPO (t_4).

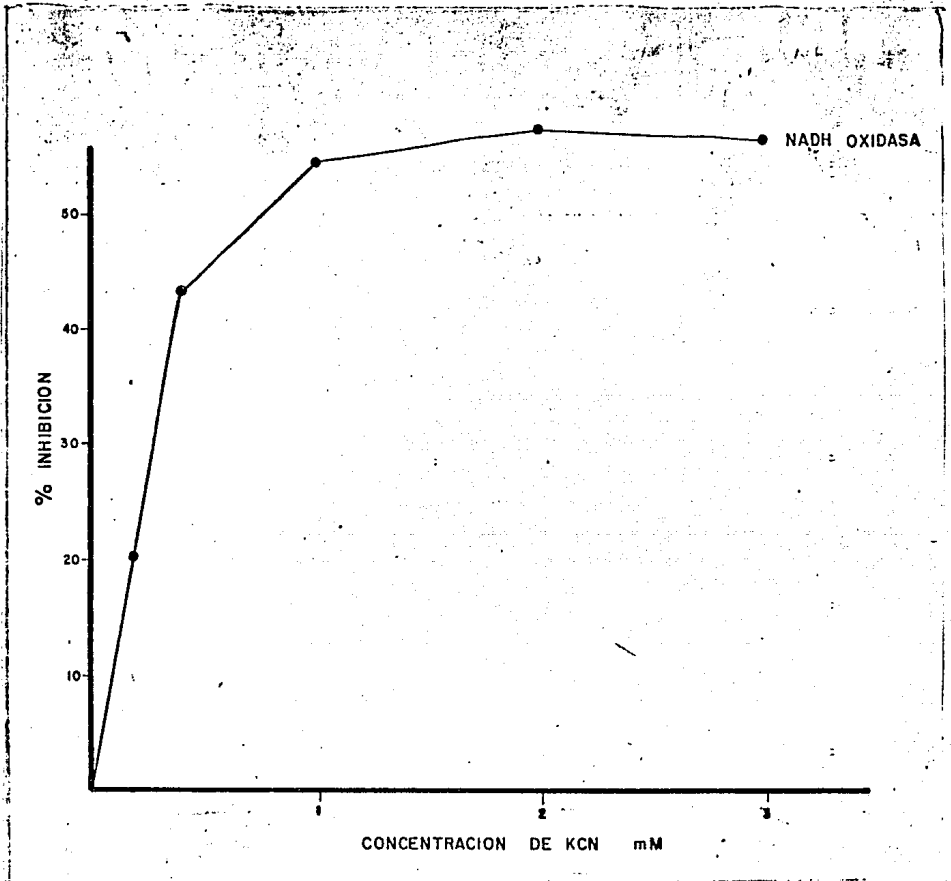


FIG. 14. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CIANURO SOBRE LA NADH OXIDASA DE MEMBRANAS SPO (t_4).

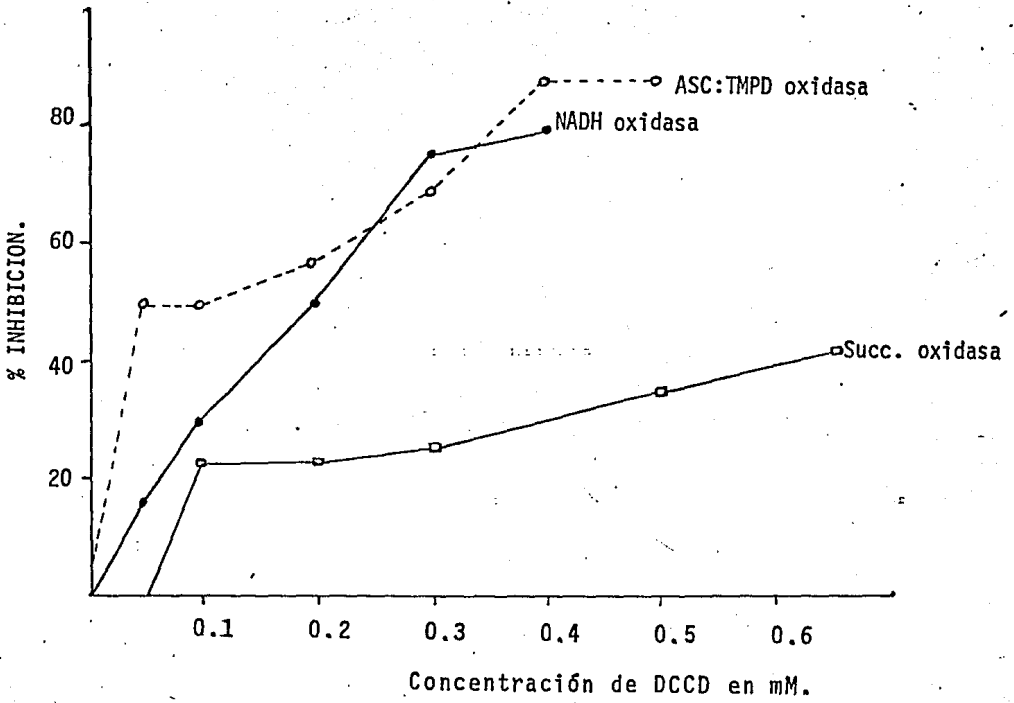


FIG. 15. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DCCD SOBRE OXIDASAS DE MEMBRANAS SPO₂.

nida de mamíferos, aunque también se conoce que puede producir efectos colaterales sobre sitios secundarios debido a que se reparte entre la membrana, lo que a su vez hace difícil la interpretación de los resultados.

El efecto de inhibidores sobre la succinato oxidasa resulta difícil de interpretar dada su baja capacidad para reducir a la CTE, - como puede observarse en los espectros diferenciales de la figura 12.

Los resultados obtenidos con ascorbato:TMPD y ascorbato:DCPIP - muestran que ni HOQNO ni antimicina son capaces de inhibir el consumo de oxígeno, lo que está de acuerdo con el hecho de que esta mezcla dona los electrones a nivel del citocromo c; por otra parte, el cianuro promueve inhibiciones muy elevadas, como se mencionó anteriormente y como se muestra en la figura 16, a muy bajas concentraciones. Estos sugiere que los electrones que ingresan a la cadena a través del citocromo c siguen, como única vía plausible, el camino hacia el oxígeno vía citocromo $a+a_3$, el cual se muestra como una oxidasa altamente sensible al cianuro. En la figura 17 se muestran los espectros diferenciales reducidos con ascorbato:TMPD y con ascorbato:DCPIP vs oxidados. En ellos se observa la eficiente reducción del citocromo c_{548} y del citocromo $a+a_3$ (602 nm); lo que es notable en estos espectros es la aparición más clara del hombro a 562 nm (b_{562}) y el incremento del pico a 512 nm, que corresponde al citocromo c_{554} . La presencia del pico pequeño a 527 nm (pico beta del citocromo b_{555}) nos hace pensar que el pico registrado a 554 se debe a la contribución tanto del citocromo c_{554} como del b_{555} que puede ser parcialmente reducido por el flujo reverso de los electrones.

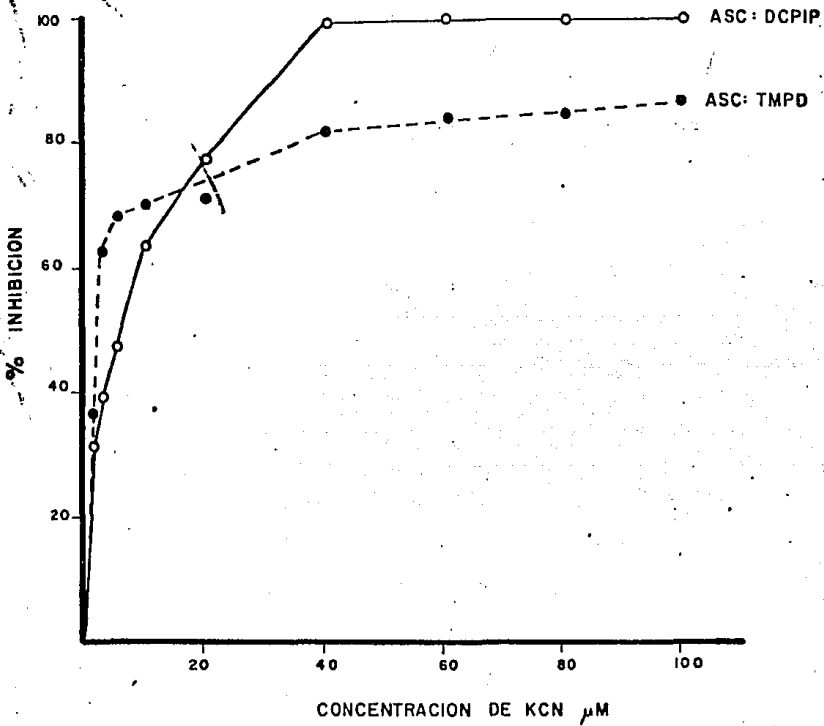


FIG. 16. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CIANURO SOBRE ASC:TMPD Y ASC:DCPIP OXIDASAS DE MEMB. SPO. ($t_{3.5}$).

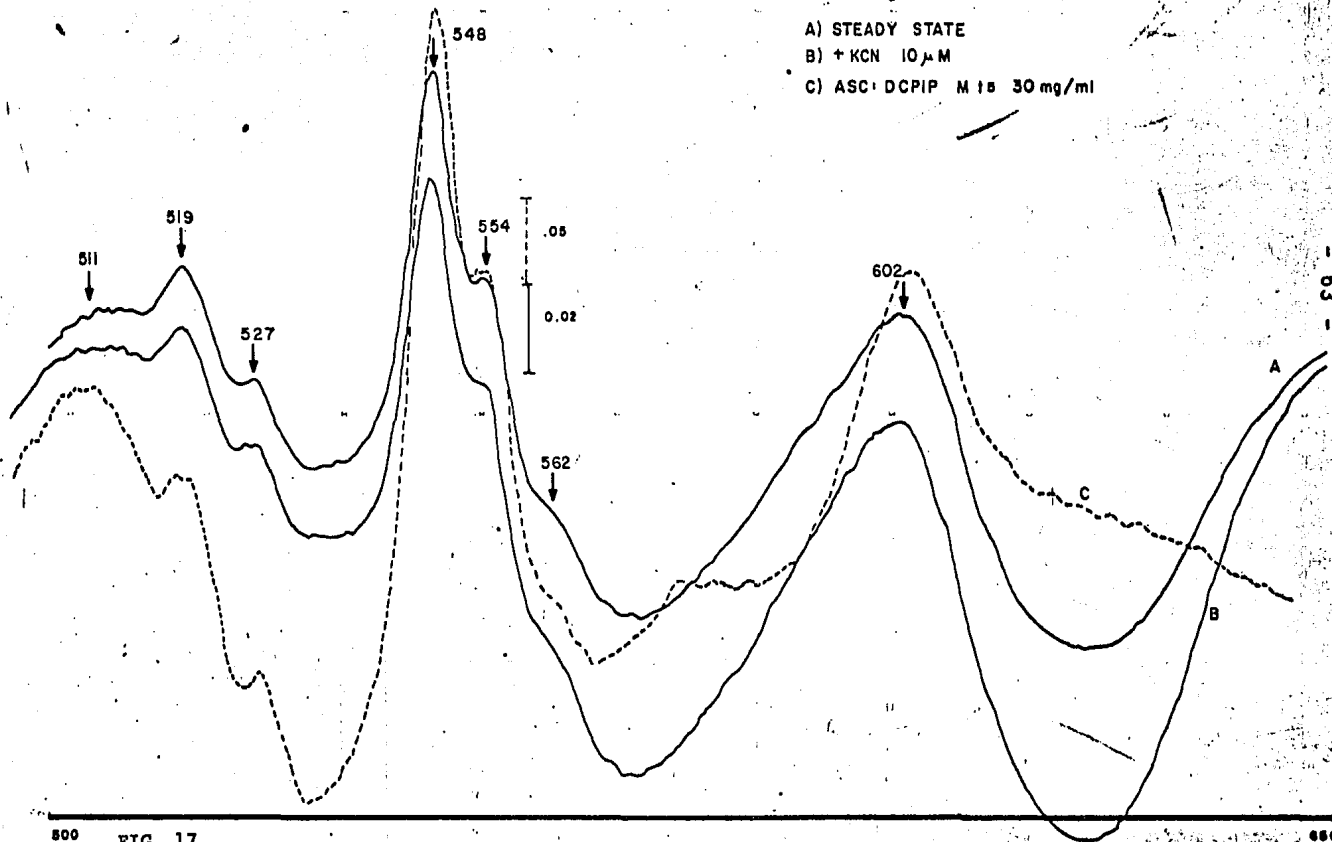
ASCORBATE 2 mM + TMPD 0.3 mM

M. 1 1/2 (13 mg/ml)

A) STEADY STATE

B) + KCN 10 μ M

C) ASC + DCPIP M 1/2 30 mg/ml



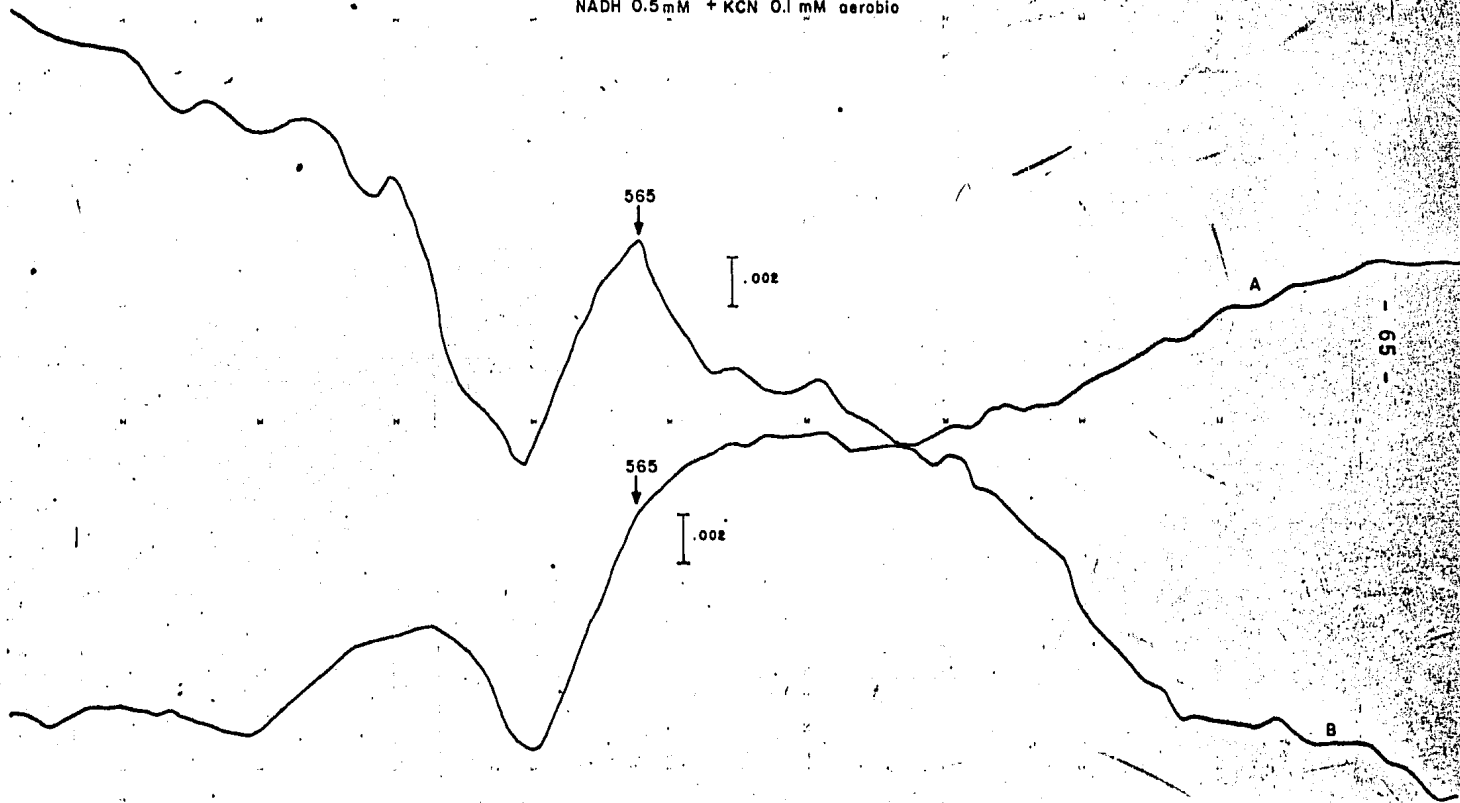
800 FIG. 17.

Con el objeto de evidenciar en forma más clara al citocromo b_{562} decidimos realizar los espectros diferenciales reducidos en condiciones de anaerobiosis vs reducidos aeróbicamente en presencia de KCN; - en estos espectros solamente aparecerán los picos de los citocromos que se oxidan en presencia de cianuro (referencia aeróbica), dado que los demás citocromos reducidos se anulan con la referencia. Los espectros obtenidos de esta manera se muestran en la figura 18. El trazo A corresponde a la reducción con succinato, en el cual se observa un pico a 565 nm que probablemente corresponde al b_{562} ; el valle registrado a 555 nm aparentemente no corresponde a este citocromo (no hemos encontrado datos en la literatura a este respecto). El trazo B corresponde a la reducción con NADH, en este espectro es mucho menos evidente el pico a 562 nm. Una posible explicación a esta diferencia sería la entrada directa de los electrones al citocromo b_{555} cuando el reductor es el succinato, lo que probablemente facilitaría la reducción del b_{562} .

En nuestro laboratorio se han realizado espectros diferenciales reduciendo con NADH y burbujando CO a las membranas vs membranas reducidas aeróbicamente. En estos espectros se han encontrado un pico de absorción a 412 nm y un valle a 430 nm, ambos característicos de citocromo o (24), que probablemente corresponde al b_{562} de nuestro sistema. La utilización de CO en los espectros permite analizar la posibilidad de que un citocromo interactúe con el O_2 ; si el citocromo no fija CO puede concluirse que no interactúa con el O_2 . Desgraciadamente no es posible hacer la aseveración contraria, ya que no todos los citocromos que fijan CO son oxidasas terminales.

Memb SPO 1 3/2 (7mg PROT/ml)

- A) SUCC. 34 mM + KCN 0.1 mM anaerobio vs
SUCC. 34 mM + KCN 0.1 mM aerobio
B) NADH 0.5 mM + KCN 0.1 mM anaerobio
NADH 0.5 mM + KCN 0.1 mM aerobio



Con estos resultados hemos planteado un esquema hipotético de la cadena respiratoria de B. cereus, el cual se muestra en la figura 19. En este esquema proponemos que los electrones derivados del NADH llegan al citocromo b_{555} , vía menaquinona, de donde pueden seguir diferentes caminos: (i) la cadena principal hasta el oxígeno a través de los citocromos c_{554} , c_{548} y $a+a_3$. Esta es la secuencia propuesta para el flujo de los electrones en B. subtilis (14). (ii) Los electrones pueden fluir desde el citocromo b_{555} al c_{548} y de ahí al oxígeno a través de $a+a_3$, o bien, a través de c_{554} al oxígeno, vía b_{562} . Por otro lado, una pequeña parte de los electrones derivados del citocromo b_{555} puede fluir directamente al oxígeno vía citocromo b_{562} . En el caso del succinato, los electrones ingresan a la cadena a nivel del citocromo b_{555} , de donde pueden seguir cualquiera de los caminos propuestos para el NADH.

Una herramienta valiosa para dilucidar la secuencia correcta de los citocromos en la cadena sería la disponibilidad de inhibidores específicos que permitieran evidenciar el orden de reducción. Por otra parte, la medición de los potenciales de óxido-reducción de cada uno de los citocromos también arrojaría información sobre el orden correcto.

El esquema propuesto en la figura 19, si bien corresponde a la composición de citocromos de las células en etapa esporulante, parece no corresponder a la composición de citocromos de las células en etapa logarítmica. La diferencia estriba, fundamentalmente, en la presencia de ambos tipos de citocromo c; en la etapa vegetativa el c_{548} se en-

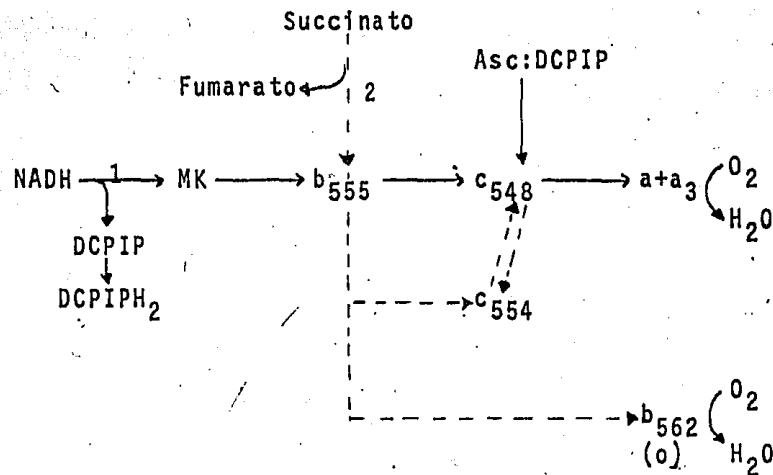


Figura 19. Esquema probable de la cadena respiratoria de B. cereus.

MK, menaquinona.

1, NADH deshidrogenasa

2, Succinato deshidrogenasa.

cuenta en concentraciones muy limitadas, mientras que el c_{554} (que puede seguirse por su absorción a 512 nm) no es evidenciado. Este hecho permite sugerir que es durante el proceso de la esporulación que se incrementa la síntesis del citocromo c_{548} y se inicia la del c_{554} , lo que parece plausible dado que se requiere de una vía oxidativa terminal para la formación de endosporas.

Otra diferencia notable entre las membranas de ambos tipos de células es la actividad de la succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa. En la tabla IV se observa que la actividad de esta enzima no es detectable en las membranas spo, a menos que se adicione cianuro al ensayo de actividad y este efecto se demuestra en todas las oxidorreductasas dependientes de succinato, en cambio, en las membranas veg no se requiere de la adición de cianuro para evocar la actividad. Además, la concentración de cianuro requerida para desenmascarar la actividad de la SDH de membranas spo es muy pequeña (figura 20), presentando una Km de 2.7 micromolar. Por otro lado, la actividad de NADH:DCPIP oxidorreductasa de membranas spo tampoco requiere de cianuro para evocar su actividad. Esto indicaría que el DCPIP reducido por la SDH no es equivalente al DCPIP reducido por la NADH deshidrogenasa.

La disociación, por medio de detergentes, de la SDH de las membranas spo es capaz de abolir la dependencia de la enzima por el cianuro; en la tabla VI se observa que la actividad obtenida en el sobrenadante de solubilización no es dependiente de cianuro; la actividad recuperada en el precipitado, después de la solubilización, tampoco se muestra totalmente dependiente y esto es debido a que el detergente remueve en forma inespecífica los constituyentes de la membrana. Estos resultados

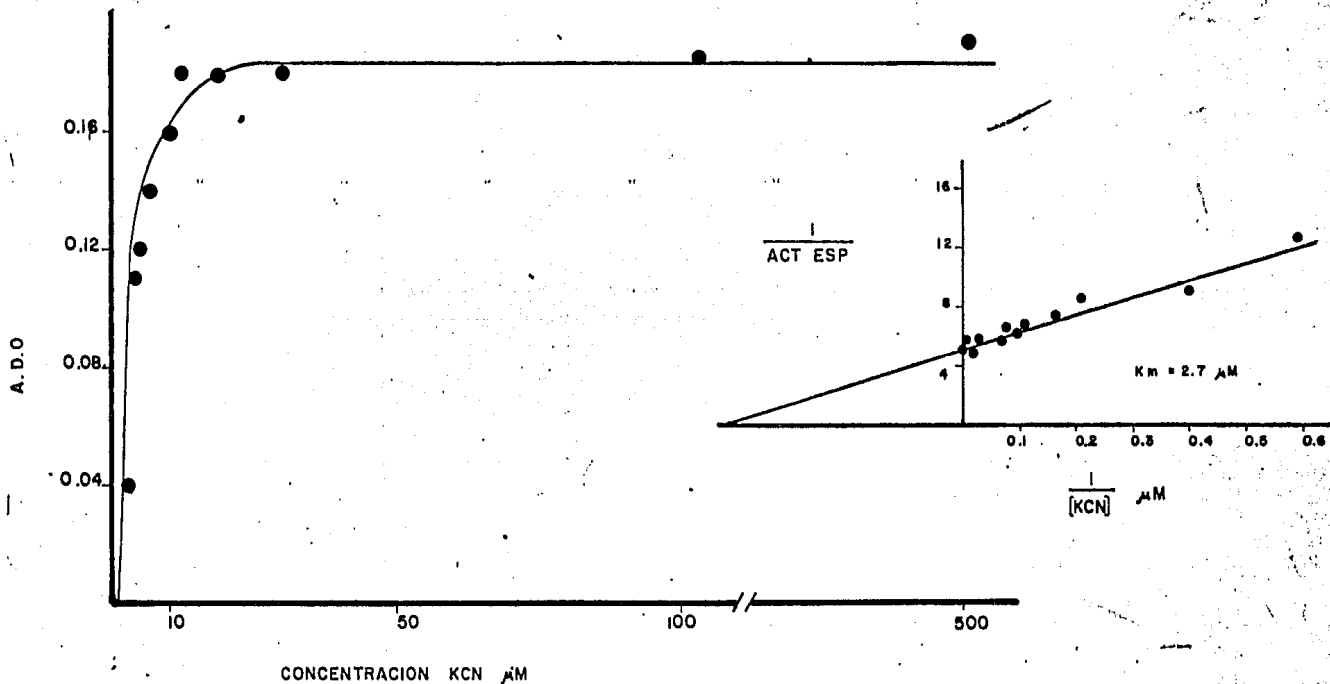


FIG. 20. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CIANURO SOBRE LA ACTIVIDAD DE SUCCINATO:PMS:DCPIP OXIDORREDUCTASA DE MEMB. SPO ($t_{3.5}$).

PREPARACION	^a ACT. TOTAL		VECES EST.
	-KCN	+KCN	^b KCN
Memb. spo sin tratar	0	1080	TOTAL
Sobrenad. Brij 0.3%	252	372	1.5
Precipit. Brij 0.3%	298.3	709.6	2.4

TABLA VI. Actividad de succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa durante su solubilización de membranas spo ($t_{3.5}$).

^aActividad específica en micromolas de DCPIPH₂/min/mg x proteína total en mg.

^bConcentración de KCN, 0.1 mM.

FRACCION	^a ACT. TOTAL		VECES EST.
	-KCN	+KCN	^b KCN
1. Enz. veg. soluble	18.7	21.2	1.13
2. Memb. spo inact.	0	0	-
^c p.p. reconst. (1+2)	0	8.3	TOTAL
^d S.N. reconst. (1+2)	6.1	7.7	1.24

3. Enz. spo. soluble	35.1	59.1	1.7
4. Memb. veg. inact.	0	0	-
^c p.p. reconst. (3+4)	9.43	16.1	1.7
^d S.N. reconst. (3+4)	8.74	12.4	1.4

TABLA VII. Actividad de succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa en membranas reconstituidas.

a y b igual que para la Tabla VI.

c y d. Los precipitados de reconstitución corresponden a la pastilla obtenida después de centrifugar el dializado de la enzima soluble con las memb. inactivadas; los sobrenadantes son los obtenidos después de la centrifugación a 100,000 g. (Ver Materiales y Métodos).

sugieren que el (o los) componente(s) responsables del efecto desenmascarador del cianuro reside en las membranas. Para confirmar esta idea decidimos reconstituir a la SDH solubilizada de las membranas veg en membranas spo previamente inactivadas por tratamiento alcalino (ver Materiales y Métodos). En estos experimentos fuimos capaces de reconstituir la enzima veg soluble en las membranas spo, así como - también la dependencia de la enzima por el cianuro (tabla VII). En el experimento complementario, reconstituimos la enzima spo soluble en membranas veg inactivadas por tratamiento alcalino y encontramos que la actividad de SDH spo que se reconstituye en las membranas es independiente de la adición de cianuro. Por tanto, estos resultados apoyan la idea de que durante el proceso de la esporulación aparece(n) el componente(s) en la membrana que actúa como responsable de la dependencia de la enzima por el cianuro.

Con esta idea en mente, decidimos dilucidar cuál era este componente, para lo cual ensayamos el efecto de otros inhibidores sobre la actividad de la succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa de membranas spo; encontramos que los inhibidores de sitio I y II (tabla VIII) no evocan su actividad; mientras que el DCCD logra desenmascarar un 45% de la actividad; concentraciones mayores a la indicada promueven un efecto inhibitorio.

Un hallazgo interesante fue el hecho de que la anaerobiosis (tabla VIII) desenmascara alrededor de un 20% más de la actividad evocada por el cianuro, lo que a su vez confirma la presencia de una segunda oxidasa terminal, dado que en ausencia de oxígeno los electrone no -

INHIBIDOR	ACT. MAXIMA RELATIVA A KCN 0.1 mM
KCN 0.1 mM	1.0
ROTENONA 0.005 - 0.08 mM	0
ANTIMICINA 0.01 - 1.0 mM	0
HOQNO 0.001 - 0.4 mM	0
AZIDA DE SODIO 0.1 - 10 mM	0
DCCD 0.4 mM	0.45
ANAEROBIOSIS	1.22

TABLA VIII. Efecto de inhibidores de la CTE y de la anaerobiosis sobre la succinato:PMS:DCPIP oxidorreductasa de membranas spo.

tienen otra alternativa que la de reducir al DCPIP. Estos resultados sugieren que el componente que buscamos se encuentra en la porción terminal de la CTE, por lo que decidimos analizar espectralmente el efecto del cianuro y del DCCD sobre la reducción de citocromos cuando se utiliza succinato como reductor.

La figura 21 muestra los espectros diferenciales reducidos con succinato vs oxidados en ausencia (trazo A) y en presencia (trazo B) de KCN 0.25 mM. En el trazo A solo se observa la reducción del citocromo b_{555} ; la adición de cianuro modifica considerablemente el espectro, evidenciándose los picos de reducción del citocromo c (a 519 y 548 nm) y de citocromo $a+a_3$ (601 nm), el cual se observa poco definido probablemente debido a que no se reduce totalmente. Se observa también el pico a 512 nm correspondiente a citocromo c_{554} . Es notable el hecho de que en presencia de cianuro se aumenta mucho el pico a 548 nm, mientras que el pico a 555 nm es pequeño. Esto podría sugerir que en presencia de cianuro el citocromo b es susceptible de ser reoxidado por otra vía cuando se utiliza succinato como reductor, o bien, que el citocromo b actúa como paso limitante para la reducción de los demás citocromos.

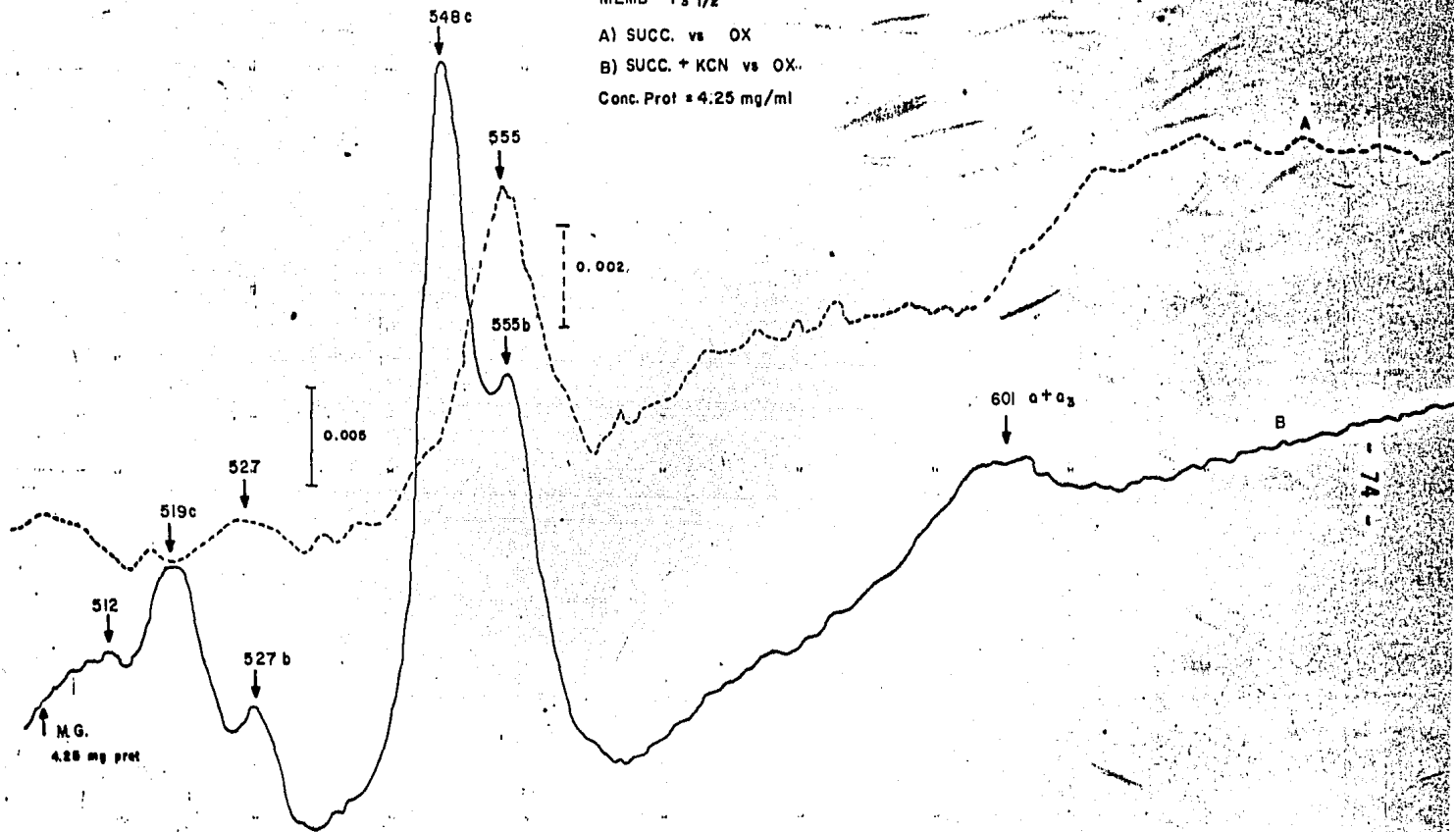
Contrariamente a lo que ocurre con el succinato, la adición de cianuro a las membranas reducidas con NADH no cambia significativamente el patrón de reducción de los citocromos (figura 22), observándose únicamente un incremento de alrededor del 10% en la altura de los picos, lo que sugiere el paso preferencial de los electrones a través de la cadena primaria cuando es la NADH deshidrogenasa la que provee los electrones. Parecería pues, de acuerdo con Hederstedt (19), que -

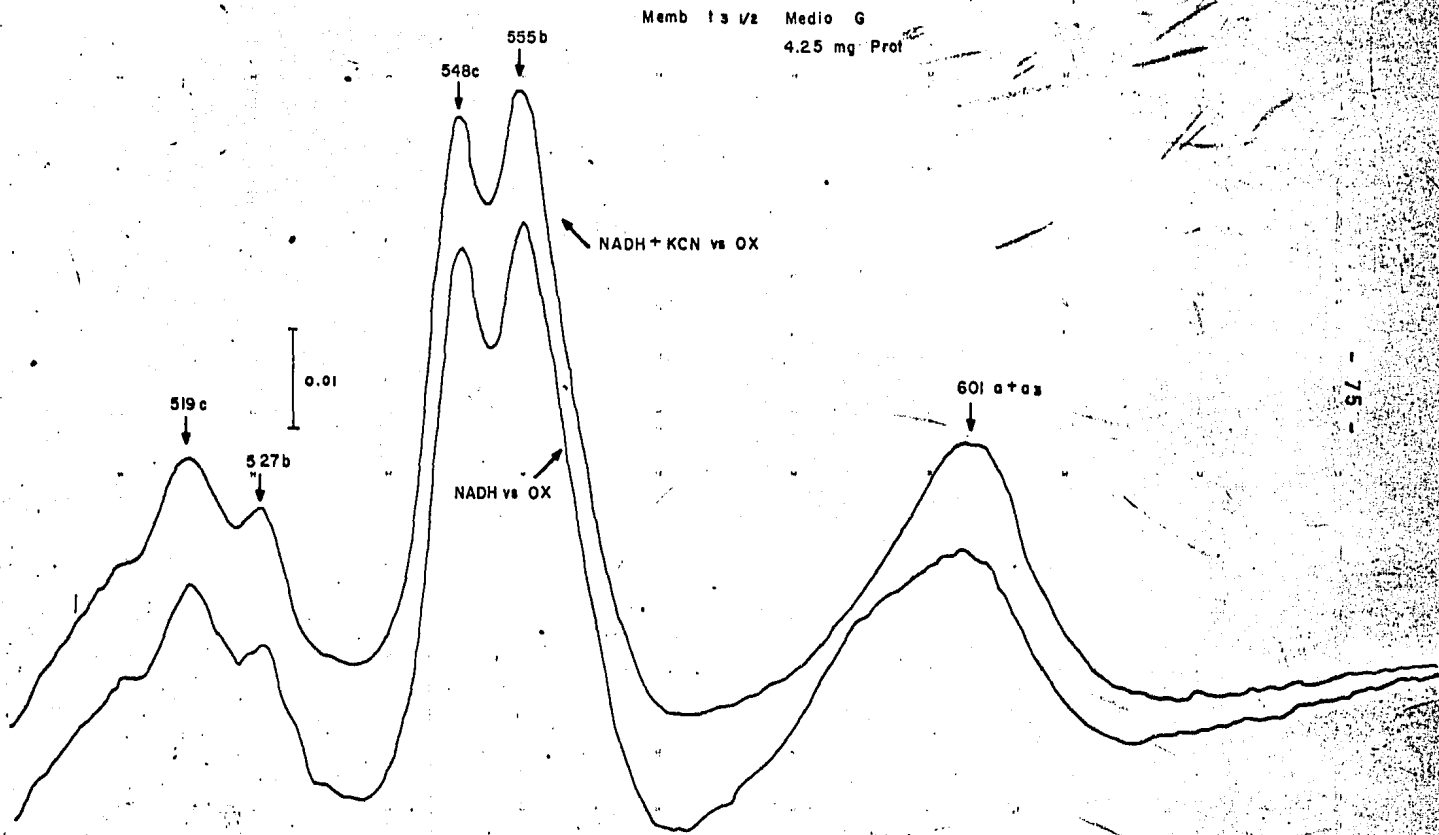
MEMB 13 1/2

A) SUCC. vs OX

B) SUCC. + KCN vs OX.

Conc. Prot = 4.25 mg/ml





800 FIG. 22.

La SDH está directamente conectada al citocromo b y que los electrones derivados del succinato pueden ser llevados al b_{562} .

La figura 23 muestra los espectros diferenciales reducidos con succinato vs oxidados en ausencia (trazo A) y en presencia (trazo B) de DCCD 0.5 mM. Puede observarse que este compuesto modifica el patrón de reducción de los citocromos en forma idéntica al que promueve el cianuro, lo que indica que ambos compuestos interactúan en el mismo sitio aunque por diferentes mecanismos.

Estos resultados nos han permitido plantear una hipótesis de trabajo que explica la dependencia al cianuro de la SDH de membranas spo. Esta hipótesis considera el establecimiento de un "by pass" entre los electrones derivados del succinato y el citocromo c, mediado por el PMS y por el DCPIP: la SDH es una enzima pobremente conectada a la CTE por lo que la reduce con muy baja eficiencia, permitiendo que los electrones fluyan hacia el DCPIP, vía PMS. El DCPIP reducido de esta manera ($DCPIPH_2$) es reoxidado a gran velocidad por el citocromo c, que se encuentra prácticamente libre de electrones, lo que impide la acumulación del colorante reducido y, por tanto, la detección de la actividad. La adición de cianuro inhibe a la citocromo c oxidasa, impidiendo la reoxidación del citocromo c y favoreciendo de esta manera la acumulación del $DCPIPH_2$ manifestándose así la actividad de la SDH. En el caso de la NADH deshidrogenasa, esta enzima no requiere de la inclusión de cianuro al ensayo de actividad debido a que se encuentra bien conectada a la CTE y es capaz de reducir paralelamente a la cadena y al DCPIP; este último se acumula en forma reducida evocando la actividad.

SUCCINATO 30 mM

Spo. *lg* (30 mg/ml)

- DCCD ----

+ DCCD ———

548

555

0.006

0.01

577

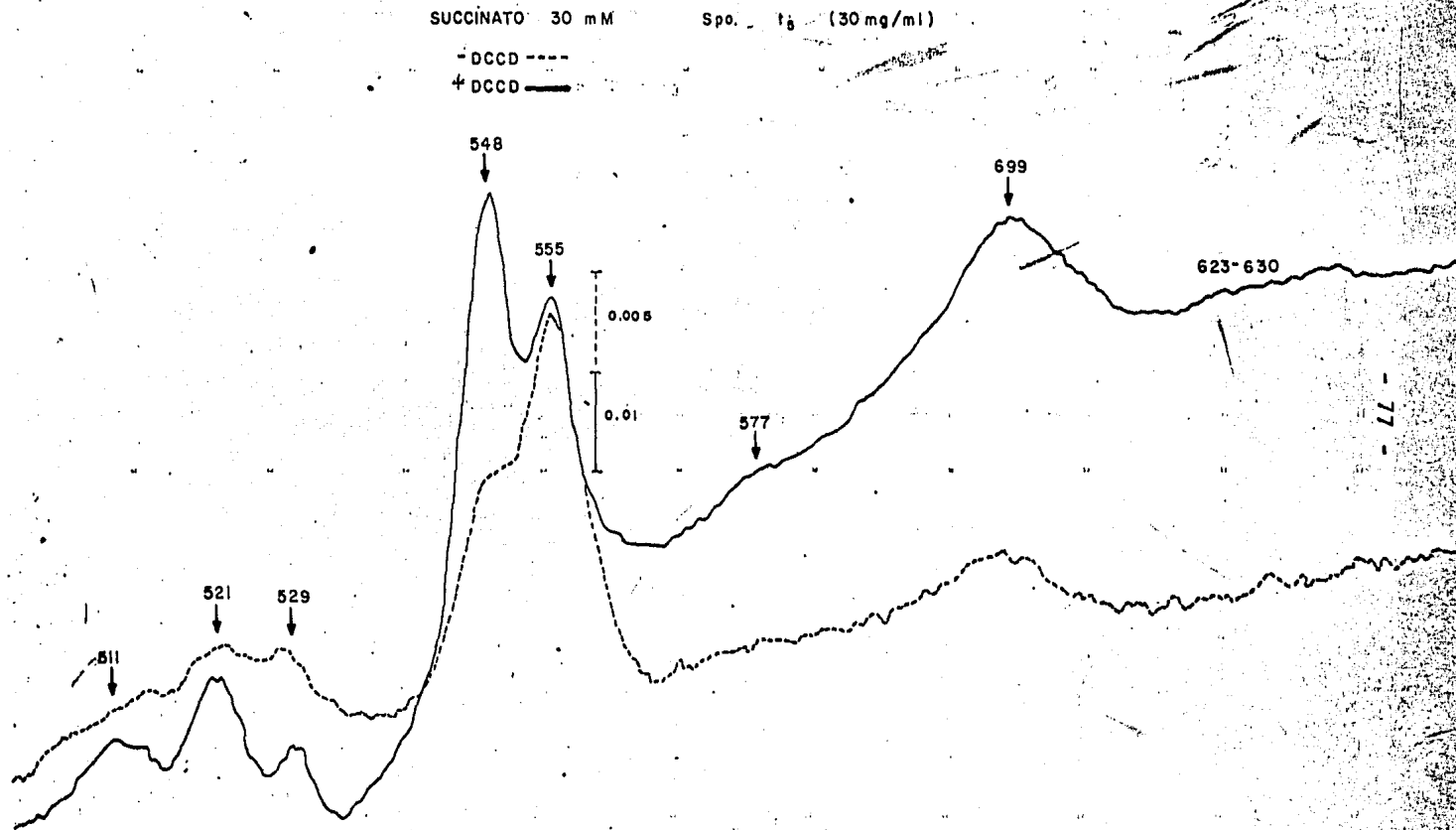
699

623-630

521

529

511



En las membranas veg no se requiere de la adición de cianuro para evocar la actividad de SDH debido a que el componente que reoxida al DCPIPH₂, el citocromo c, se encuentra en cantidades muy limitadas lo que ha sido discutido con anterioridad.

Finalmente, un resultado experimental que permite confirmar es la hipótesis es la dependencia parcial al cianuro de las membranas vegetativas obtenidas de células crecidas en ausencia de glucosa. En la tabla IV se muestran las actividades de SDH de membranas veg obtenidas en presencia de glucosa (medio G) y en su ausencia (medio CAAS). Se observa que en el primer caso la actividad de SDH es estimulada solamente en un 6% por el KCN 0.1 mM, mientras que en las membranas obtendidas de medio CAAS el cianuro promueve un 50% de estimulación. - En los espectros mostrados en la figura 7 se observa un incremento - considerable en la concentración del citocromo c, lo que evidentemente demuestra que el componente responsable del efecto desenmascarador del cianuro es el citocromo c.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE AQUÍ

ABREVIATURAS.

CTE, cadena de transporte de electrones.

DCCD, dicitohexilcarbodiimida.

DCPIP, 2,6-diclorofenolindofenol.

HOQNO, 2-heptil-4-hidroxiquinolina,N óxido.

Membranas spo, membranas obtenidas de células en etapa de esporulación.

Membranas veg, membranas obtenidas de células en crecimiento exponencial.

PMS, metasulfato de fenazina.

SDH, succinato deshidrogenasa.

TMPD, N,N,N,N-tetrametil-p-feniléndiamina.

REFERENCIAS.

1. Hogarth, C., Wilkinson, B.J. and Ellar, D.J. 1977. Cyanide resistant electron transport in sporulating *Bacillus megaterium*, *Biochim. Biophys. Acta.* 461:109-123.
2. Tochikubo, K. 1971. Changes in terminal respiratory pathways of *Bacillus subtilis* during germination, outgrowth and vegetative growth. *J. Bacteriol.* 108:652-661.
3. Halvorson, H.O. 1957. Rapid and simultaneous sporulation. *J. Appl. Bacteriol.* 20:305-314.
4. Felix, J.A. and Lundgren, D.G. 1973. Electron transport system associated with membranes of *Bacillus cereus* during vegetative growth and sporulation. *J. Bacteriol.* 115:552-559.
5. Lang, D.R., Felix, J. and Lundgren, D.G. 1972. Development of a membrane bound respiratory system prior to and during sporulation in *Bacillus cereus* and its relationship to membrane structure. *J. Bacteriol.* 110:968-977.
6. Fortnagel, P. and Freese, E. 1968. Analysis of sporulation mutants. II. Mutants blocked in the citric acid cycle. *J. Bacteriol.* 95:1431-1438.
7. Andreoli, A.J., Saranto, J., Baecker, P.A., Suehiro, S., Escamilla, E. and Steiner, A. 1975. in *Spores VI*, Gerhardt P., Costilow R. and Sadoff H.L., eds. American Society for Microbiology, 1975.
8. Hanson, R.S., Srinivasan, V.R. and Halvorson, H.O. 1963. Biochemistry of Sporulation, I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. *J. Bacteriol.* 85:451-460.
9. Collier, R.E. 1957. An approach to synchronous growth for spore formation in *Clostridium roseum*. in H.O. Halvorson eds. *Spores*. Amer. Inst. Biol. Sci. Washington, D.C. pp. 10-17.
10. Sterlini, J.M. and Mandelstam, J. 1969. Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* 113:29-37.
11. Arrigoni, O. and Singer, T.P. 1962. Limitations of phenazine methosulphate assay for succinic dehydrogenase. *Nature.* 193:1256-1259.

12. King, T.E. 1963. Reconstitution of respiratory chain enzyme system. *J. Biol. Chem.* 238:4032-4036.
13. Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
14. Miki, K., and Okunuki, K. 1969. Cytochromes of *B. subtilis*. II. Purification and spectral properties of cytochrome c-550 and c-554. *J. Biochem.* 66:831-844.
15. Miki, K. and Okunuki, K. 1969. Cytochromes of *Bacillus subtilis*. III. Physicochemical and enzymatic properties of cytochromes c-550 and c-554. *J. Biochem.* 66:845-854.
16. White, D.C. and Sinclair, P.R. 1971. Branched electron transport systems in bacteria. *Adv. in Microbial. Phys.* 5:173-211.
17. Kamen, M.D. and Horio, T. 1970. Bacterial cytochromes I. Structural aspects. *Annu. Rev. Biochem.* 39:673-700.
18. Hederstedt, L. 1980. Cytochrome b reducible by succinate in an isolated succinate dehydrogenase-cytochrome b system from *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* 144:933-940.
19. Hederstedt, L. and Rutberg, L. 1980. Biosynthesis and membrane binding of succinate dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 144:941-951.
20. Michele-France, H. and Ed-Jacques, N. 1975. Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. *Sub. Cell. Biochem.* 4:1-65.
21. Horio, T. and Kamen, M.D. 1970. Bacterial Cytochromes II. Functional aspects. *Ann. Rev. Microbiol.* 24:399-428.
22. Gel'man, N.S., Lukoyanova, M.A. and Ostrovskii, D.N. 1975. The respiratory chain and its organization in the bacterial membrane. In *Bio membranes*, Vol. 6:129-215.
23. Prochaska, L.J., Bisson, R., Capaldi, R.A. and Steffens, G.C.M. and Buse, G. Inhibition of cytochrome c oxidase function by dicyclohexyl carbodiimide. 1981. En impression.
24. Smith, L. 1978. Bacterial cytochromes and their spectral characterization. *Meth. in Enzymol.* 53:202-212.

BIBLIOGRAFIA GENERAL.

Gebhard von Jagow. 1980. b-Type cytochromes. Ann. Rev. Biochem. 49:281-314.

Gould, G.W. and Hurst, A. The Bacterial Spore. Academic Press. 1969.

Haddock, B.A. and Jones, C.W. Bacterial Respiration. 1977. Bacteriol. Reviews.

Mandelstam, J. and McQuillen, K. Biochemistry of Bacterial Growth. Blackwell Scientific Publications. 1973.

White, D.C. and Sinclair, P.R. Branched Electron-Transport Systems in Bacteria. Advances in Microbial Physiology. Academic Press. 1971.

Young, M. and Mandelstam, J. Early Events During Bacterial Endospore Formation. Advances in Microbial Physiology. Academic Press. 1979.