

**"LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES
EN HEMISPORA STELLATA Vuill.
(Sin.: SPORENDONEMA, EPIZOUM Cif. y Red.)"**

Por Francisco Javier Sala Trepat

I-1. LA CADENA RESPIRATORIA

I-1.1. *Cadena respiratoria*

Los seres vivos obtienen la mayor parte de la energía necesaria para el desarrollo de sus funciones vitales, oxidando los metabolitos derivados de la degradación de los principios inmediatos que componen su alimento. La energía liberada a lo largo del proceso oxidativo debe ser transformada en una forma fácilmente utilizable, la contenida en las moléculas de adenosín-trifosfato (ATP).

La obtención de la energía almacenada en los principios inmediatos comienza con una serie de procesos degradativos, peculiares de cada uno de ellos, que en general confluyen en un punto que actúa a modo de almacén de metabolitos intermedios capaces de ingresar en diversos mecanismos de la síntesis celular. A este lugar común de confluencia se le conoce con el nombre de «ciclo de los ácidos tricarboxílicos», «ciclo del ácido cítrico» o «ciclo de Krebs», cuyo funcionamiento convierte en CO_2 todos los átomos de carbono participantes.

A lo largo de estas primeras etapas en que no se requiere oxígeno, los principios inmediatos ceden sólo una pequeña parte de la energía que almacenan. En condiciones aeróbicas, es posible agotar mucho más profundamente los sustratos. Un buen número de etapas consecutivas del ciclo de Krebs son deshidrogenaciones catalizadas por enzimas específicas (substrato-deshidrogenasas). Existen además otras deshidrogenasas específicas de sustratos que no participan en el ciclo de Krebs. Los átomos de hidrógeno separados de los sustratos por las deshidrogenasas tienen finalmente que reaccionar con el oxígeno molecular, pero si lo hicieran en una sola etapa el proceso sería ruinoso; para que el aprovechamiento de energía sea óptimo, la reacción del hidrógeno con el oxígeno tiene que transcurrir de una manera particularmente ordenada, a través de una

serie de enzimas y aceptores de hidrógeno y electrones, a la que se ha denominado «cadena respiratoria» o «cadena transportadora de electrones».

La energía liberada en ciertos puntos de la cadena se utiliza para fosforilizar el adenosín-difosfato (ADP) y transformarlo en adenosín-trifosfato (ATP); a este proceso se le conoce con el nombre de *fosforilización oxidativa*. Las preparaciones capaces de llevarlo a efecto se dice que se hallan *acopladas* (fuertemente acopladas si el rendimiento del proceso es máximo). Las preparaciones que pueden llevar a efecto los procesos oxidativos pero son incapaces de aprovechar del modo descrito la energía desprendida, se dice que se hallan *desacopladas* y a las drogas que liberan el proceso oxidativo del fosforilizante, se las conoce con el nombre de *desacopladores*.

El esclarecimiento del mecanismo por el que actúa la cadena transportadora de electrones se ha visto grandemente facilitado por el descubrimiento de ciertos corpúsculos intraplasmáticos que se conocen con el nombre de mitocondrias.

El perfeccionamiento de las técnicas de preparación de mitocondrias (Hogeboom, Schneider y Palade, 1948), de las de microscopía electrónica en la década de 1950, la introducción en el estudio de la respiración celular de sustancias inhibidoras como el CN, azida, CO, antimicina A, BAL, 2-3 dimercaptopropanol, antimálaricos, óxidos de 2-alquil-4-hidroxiquinoléina, amital, rotenona, oxaloacetato y malonato, han facilitado en gran medida las investigaciones.

La puesta a punto de técnicas de investigación espectroscópica de las sustancias transportadoras de electrones en mitocondrias enteras, iniciadas por Chance y colaboradores conjuntamente con las de aislamiento y reconstitución realizados por investigadores como GREEN, OKUNUKI, SINGER, SLATER y otros muchos, han permitido aclarar el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y comprobar que es la formación de agua, que constituye la reacción definitiva de los procesos degradativos de la célula, la que proporciona la energía necesaria para la actividad celular.

El estudio del transporte de electrones que se inició con el descubrimiento de las deshidrogenasas por BATELLI y STERN, SCHARDINGER y THUNBERG y el descubrimiento de los citocromos por KEILIN (1925), recibió un impulso muy notable en la década de 1950-1960 merced al esfuerzo conjunto de citólogos y bioquímicos, y se halla en la actualidad considerablemente aclarado.

La cadena transportadora de electrones

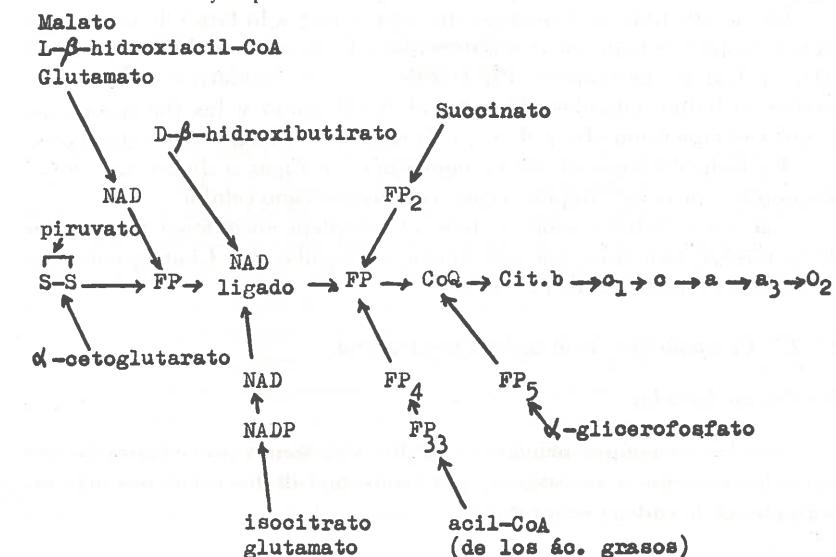
Las deshidrogenasas que actúan sobre los diversos metabolitos intermedios en el ciclo de KREBS y otros substratos, liberan átomos de hidrógeno que son captados por determinados «aceptores de hidrógeno», ca-

paces de sufrir oxidaciones y reducciones alternantes. Los átomos de hidrógeno captados por estos «aceptores de hidrógeno primarios», son transferidos luego a otros compuestos de potencial redox más electronegativo oxidándose en el proceso merced a la acción de enzimas específicos. El nuevo aceptor sirve a su vez de sustrato de una nueva deshidrogenación catalizada por un nuevo enzima y los átomos de hidrógeno pasan por este procedimiento de un «transportador de hidrógeno» a otro. Alcanzado un punto determinado de la cadena, los átomos de hidrógeno dejan de «transferirse» como tales, es decir como el conjunto de un protón y un electrón; lo que los transportadores «aceptan» y «donan» de aquí en adelante son los electrones; los protones pasan al medio acuoso que les rodea, y en que la vida se desenvuelve. El último «transportador» de la serie transfiere los electrones al oxígeno que queda así reducido para formar agua con el concurso de los protones tomados del medio.

Al conjunto constituido por las sustancias aceptoras y donadoras de hidrógeno y electrones y los enzimas que catalizan el proceso es a lo que se conoce con el nombre de «cadena respiratoria», o «cadena transportadora de electrones», que comienza a nivel de las deshidrogenasas substrato-específicas, y termina en el oxígeno molecular.

Los átomos de hidrógeno liberados por acción de las deshidrogenasas ingresan en la cadena respiratoria a tres niveles distintos: A nivel de las flavoproteínas, del NAD y de la ubiquinona.

Aunque todavía existen ciertas dudas sobre el papel de alguno de los componentes de la cadena transportadora de electrones y la secuencia exacta de los mismos, el proceso, tal como en la actualidad se concibe discurse así en la mayor parte de los sistemas:



Los átomos de hidrógeno procedentes de la degradación de las grasas son transportados a lo largo de diversas flavoproteínas (Fp) ingresando en el tronco común de la cadena a nivel de la ubiqüinona q coenzima Q (Q). Lo propio ocurre con el hidrógeno procedente del succinato y -glicerofosfato. El mediador está constituido por una flavoproteína específica para cada uno de ellos.

Los átomos de hidrógeno procedentes del malato, glutamato y L-β-hydroxiacyl-CoA ingresan a nivel del primer componente, el NAD, actuando como mediador, el NAD libre. Al mismo nivel ingresan en el tronco común de la cadena los átomos de hidrógeno procedentes del isocitrato y glutamato; su ingreso está mediado por el NAD y el NADP.

Transportadores dobles y sencillos.—Los átomos de hidrógeno ingresan de dos en dos en la cadena y pasan de este modo de unos aceptores a otros merced a la acción de enzimas específicas. A partir de la ubiqüinona estos aceptores donadores son «transportadores dobles». Cada átomo de hidrógeno pierde su electrón y cada electrón es captado por una molécula de citocromo (el más electronegativo del sistema; en los mamíferos, citocromo b) que lo transfiere al siguiente citocromo de la serie, (en los mamíferos el citocromo c₁).

Los electrones discurren después a lo largo de los restantes citocromos (en los mamíferos, cit. c, a, y a₃). El último de la serie transfiere los electrones con la ayuda de una citocromooxidasa (que a veces no puede diferenciarse del propio citocromo) al oxígeno, que queda cargado negativamente. El oxígeno así cargado reacciona, como se ha dicho, con los protones del medio, dando lugar a la formación de agua.

La energía libre de oxidación que se produce a lo largo de estas reacciones es aprovechada en tres puntos para la síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico, Pi, («fosforilación oxidativa»). Estos tres puntos se hallan situados: 1) entre el NAD-ligado y las flavoproteínas. 2) entre el citocromo «b» y el «c», y 3) entre el citocromo «c» y el oxígeno.

La fosforilación oxidativa constituye sin lugar a dudas uno de los mecanismos de mayor importancia en el metabolismo celular.

Las mitocondrias, sede de todo el complejo enzimático responsable de la misma, han sido, por esta razón, calificadas por Claude, como las «centrales energéticas» de la célula.

1.1.2. Componentes de la cadena respiratoria.

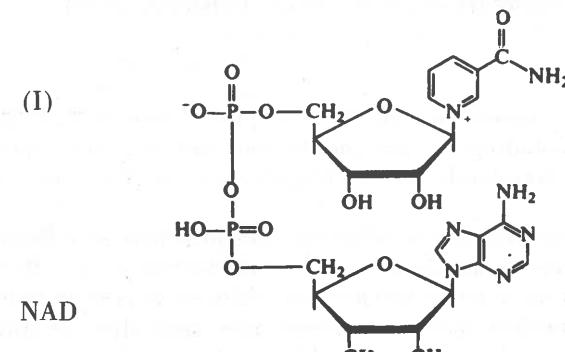
Piridín-nucleótidos

Son los «aceptores primarios» de los hidrógenos procedentes de casi todos los sustratos y constituyen por tanto, uno de los eslabones más importantes de la cadena respiratoria.

Los piridín-nucleótidos (NAD y NADP) catalizan un gran número de reacciones enzimáticas del metabolismo celular.

Los primeros «piridín-nucleótidos» conocidos fueron descubiertos por HARDEN y YOUNG (1906), al advertir que la conversión de la glucosa a etanol por los extractos libres de células preparados a partir de células de levaduras, requerían la presencia de un factor dializable al que le llamaron «cozymasa». En los eritrocitos de los mamíferos observaron WARBURG y CHRISTIAN (1935), la presencia de un cofactor dializable necesario para la oxidación aeróbica de la glucosa-6-fosfato y sus estudios permitieron conocer la estructura de estos compuestos.

El enzima estudiado por WARBURG y CHRISTIAN estaba compuesto por un mol de adenina, un mol de nicotinamida, dos de pentosa (D-ribosa) y tres de fósforo inorgánico; se trataba del trifosfopiridín-nucleótido, TPN o NADP; la «cozymasa» de HARDERN y YOUNG constaba de mononucleótido de nicotinamida y ácido adenílico (DPN o NAD) (véase I).



Al coenzima aislado por HARDEN y YOUNG se le denominó también CoI y al de WARBURG y CHRISTIAN, CoII. En la actualidad se usan casi exclusivamente los nombres de NAD y NADP y mucho menos los de DPN y TPN, habiendo caído en desuso los términos CoI y CoII. La única diferencia estructural entre ambos compuestos es la presencia del radical fosfato esterificado en el carbono 2 de la ribosa.

La molécula de nicotinamida constituye la parte prostética de la molécula enzimática y merced a los trabajos de PULLMAN y colaboradores (1954, a, b) se ha comprobado que la capacidad de oxidorreducción de este compuesto radica en el carbono 4 de su radical de nicotinamida, y se efectúa mediante una redistribución de sus dobles enlaces. La incorporación de otro átomo de hidrógeno en el carbono 4 del radical de nicotinamida puede verificarse en dos posiciones, A, y B. Se ha visto que las deshi-

drogenasas NAD-dependientes son estereoespecíficas (VENNESLAND y WESTHEIMER, 1954). Los enzimas pueden ser A específicos o B específicos. Sólo la lipoil-deshidrogenasa (diaforasa) transfiere el hidrógeno a cualquiera de las dos posiciones.

El NAD tiene una banda de absorción a 260 milimicras, cuya intensidad disminuye notablemente al reducirse, apareciendo en cambio en la forma reducida una nueva banda de absorción a 340 milimicras, que se debe a la formación de dihidro-nicotinamida. Este fenómeno es muy utilizado para seguir espectrofotométricamente el curso de diversas reacciones enzimáticas.

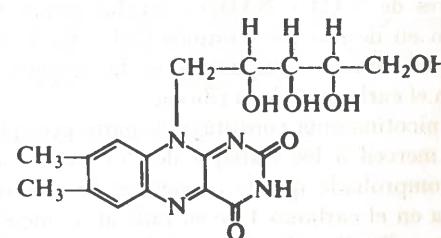
Se desconoce con certeza el verdadero mecanismo de la transferencia de un átomo de hidrógeno a la molécula de nicotinamida, pero parece que el fenómeno tiene lugar mediante la cesión directa de un ión «hidruro» (núcleo del hidrógeno con dos electrones).

El estudio del mecanismo de acción de estos compuestos, se ha visto facilitado por la preparación de análogos del NAD sustituidos en el radical piridínico de la molécula (KAPLAN, 1960; ANDERSON, 1959).

Flavoproteínas

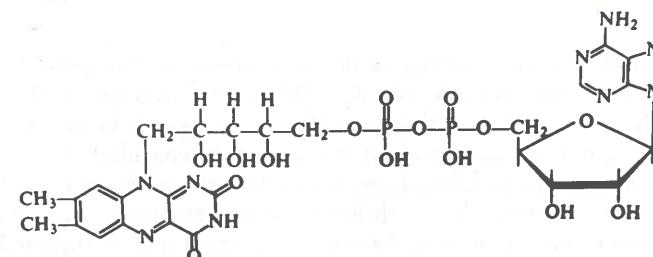
En la cadena transportadora de electrones, los átomos de hidrógeno resultantes de las deshidrogenaciones de diversos sustratos, son captados por el NAD libre y transferidos al NAD-ligado, que los cede a las flavoproteínas.

Las primeras investigaciones sobre las flavoproteínas se refieren al descubrimiento de un pigmento resinoso, el «lactocromo», por BLYTH, hacia 1879. En el primer tercio del presente siglo, se detectaron muchos otros pigmentos amarillos de estructura semejante, entre ellos; el «liocromo», la «lactoflavina» y la «ovoflavina». El conocimiento de su estructura se debe a los trabajos efectuados por KUHN y col. (1935) y por KARRER y col. (1935), que pusieron de manifiesto que la lactoflavina respondía a la siguiente fórmula:



WARBURG y CHRISTIAN (1932) demostraron la necesidad de una sustancia compuesta de una proteína y un pigmento amarillo (el «enzima amarillo») para la oxidación de la glucosa por el oxígeno atmosférico. Pronto se demostró la naturaleza flavínica del pigmento; se creyó al principio que se trataba de la riboflavina. THEORELL (1935) demostró que se trataba de la riboflavina-5-fosfato (hoy llamado flavin-mononucleótido).

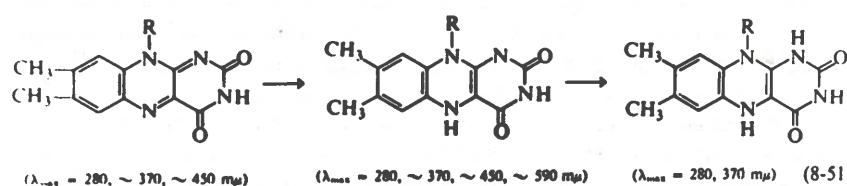
WARBURG y CHRISTIAN, en 1938, observaron que el enzima que catalizaba la oxidación de los D-aminoácidos en presencia de aire (la D-aminoacidoxidasa) también era una flavoproteína pero que no contenía FMN. La estructura del nuevo coenzima (Flavin-adenín-dinucleótido) fue establecida por TODD y colaboradores en 1954 (CHRISTIE y col., 1954), y resultó ser la siguiente:



Existen multitud de flavoproteínas de carácter enzimático que cumplen diversas funciones y que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. En la cadena respiratoria participan cierto número de ellas cuya misión consiste en introducir átomos de hidrógeno a dos niveles distintos; a nivel del NAD ligado a la cadena, y a nivel de las quinonas (en los mamíferos Q).

Los átomos de hidrógeno resultantes de la deshidrogenación de los ácidos grasos ingresan a nivel de la quinona pasando previamente a través de una cadena de flavoproteínas; los procedentes de la deshidrogenación del succinato en el ciclo de KREBS ingresan directamente al mismo nivel merced a la succinato deshidrogenasa, que es también una flavoproteína. Una flavoproteína distinta media el ingreso de los hidrógenos procedentes del α -gliceosfosfato. Los átomos de hidrógeno procedentes de los demás substratos ingresan a nivel del NAD ligado, también merced a una flavoproteína, y su transferencia del NADH₂ a la ubiquinona, está mediada por otra flavoproteína. La reducción de la flavoproteína por el substrato correspondiente tiene lugar a nivel del anillo de la isoaloxazina y se produce mediante adición de electrones en dos etapas independientes con la formación intermedia de una semiquinona (BEINERT, 1957), y va acompañada de la aparición de señales de resonancia paramagnética, y bandas de absorción en la región visible del espectro. (II).

(II)



Quinonas

El estudio de la contribución de las quinonas al transporte biológico de electrones se abre en la década de 1940 con los trabajos de WENDELL (1946) y BALL, ANFINSEN y COOPER (1947), relativos a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (pese a la incapacidad de recuperar la actividad respiratoria inhibida mediante la adición de vitamina K), y en vista de que el punto de la inhibición de sus análogos estaba situado entre los citocromos «b» y «c», éste fue el lugar en que se supuso localizada la función de la vitamina K (BALL y col., 1947).

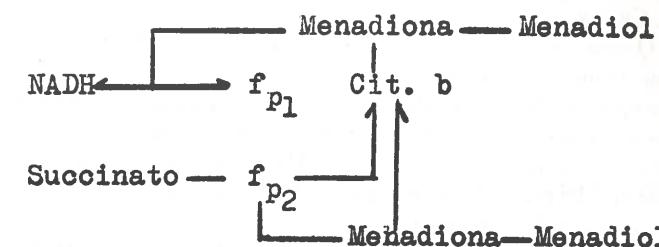
Las naftoquinonas y el transporte biológico de electrones.

La hipótesis de la participación de la vitamina K en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, fue reforzada por la demostración de la existencia de una filoquinona-reductasa en las mitocondrias (MARTIUS, STRUFFE, 1954; MARTIUS y MÄRK, 1957) que mediaba el transporte de electrones entre el NADH o NADPH y la vitamina K₁ (filoquinona). MARTIUS, (1954, 1959) llegó a proponer la participación obligada de la vitamina K en el transporte de electrones mitocondrial, si bien basándose en los datos relativos a la reducción de la vit. K por los piridín-nucleótidos reducidos, y la oxidación del quinol correspondiente por los citocromos, y modificó la posición inicialmente asignada a las naftoquinonas en la cadena respiratoria localizándola delante del citocromo b, entre éste y una flavoproteína específica (vit. K reductasa). La hipótesis de la participación obligada se vio reforzada por algunos experimentos de extracción con disolventes orgánicos. DONALDSON y colaboradores (1957) demostraron la pérdida de la actividad piridín-nucleótidos-citocromo c-reductasa mitocondrial por extracción con isoctano y la recuperación de la misma mediante adición de filoquinona.

La inespecificidad de la acción restauradora, compartida con otras sustancias lipídicas como el fitol y el escualeno, y las diversas transforma-

ciones que la extracción con disolventes induce en las mitocondrias, restaron pronto vigor a este refuerzo.

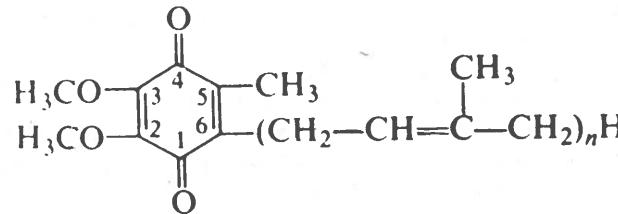
La participación obligada de las naftoquinonas en el transporte de electrones mitocondrial sufrió un duro golpe al demostrar SLATER (1958 a,b), que su reducción por el NADH o el succinato era demasiado lenta como para permitir su participación obligada en la ruta principal del transporte de electrones mitocondrial pero que sí permitía, en cambio, suponer que las naftoquinonas facilitaban la circunvalación de una buena porción de la cadena respiratoria, de acuerdo con el siguiente esquema:



Este supuesto fue posteriormente confirmado por ERNSTER (1961) al observar que la inhibición por el amital de la actividad respiratoria, con glutamato como substrato, podía superarse mediante la adición de menadiona, y que la actividad glutamato-oxidasa original era insensible al dicumarol mientras que la inhibida por el amital y recuperada por adición de menadiona era sensible al dicumarol. La participación de la vit. K en la ruta principal del transporte de electrones mitocondrial quedó así definitivamente excluida.

Ubiquinona

Las investigaciones sobre la participación de la ubiquinona en el transporte biológico de electrones fueron varios años posteriores a las relativas a la participación de la vitamina K, a consecuencia de su tardío aislamiento. Su descubrimiento fue simultáneo e independientemente realizado por el equipo de MORTON (MORTON y col., 1957) que propuso para ella el nombre de «ubiquinona», y el de CRANE (CRANE y col. 1957) que le denominó coenzima Q. Muy pronto se puso de manifiesto que se trataba de una importante familia de benzoquinonas liposolubles, ampliamente distribuidas entre los seres vivos, que respondía a la siguiente estructura básica (pág. 16). (WOLF y col., 1958), cuyos miembros poseían cadenas latera-



les con una longitud que oscilaba entre 6 y 10 unidades de isopreno (LESTER, CRANE y HATEFI, 1958) y a los que hoy se suele designar por el símbolo Q con un subíndice que indique el número de unidades de isopreno que componen su cadena lateral (Q₆, Q₇, Q₈, Q₉, Q₁₀).

La amplitud de su distribución, su concentración en los tejidos muy aeróbicos y su distribución intracelular, con una clara concentración mitocondrial en animales y vegetales, (HEMMING, PENNOCK y MORTON, 1958; CRANE, 1959; LESTER y CRANE, 1959) indujeron pronto a pensar que debía desempeñar un papel fisiológico importante.

La demostración efectuada por LESTER y FLEISCHER (1959), de que la extracción de las mitocondrias con acetona destruía su capacidad de oxidar el succinato, que esta capacidad se recuperaba mediante la adición de ubiquinona, y que la actividad recuperada era sensible a la antimicina, hizo suponer su participación en el transporte de electrones mitocondrial.

La actividad recuperada con la ubiquinona de cadena larga (Q₁₀ por ejemplo) es 100 % sensible a la antimicina. La recuperada con ubiquinona de cadena corta, más hidrosoluble, (Q₂ por ejemplo) sólo lo es en un 50 % (AMBE y CRANE, 1960).

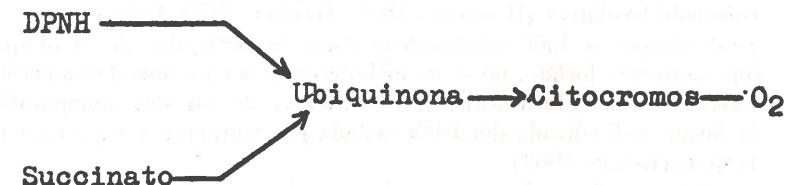
En el mismo año, HATEFI y colaboradores (1959), demostraron la reducción de la ubiquinona endógena en presencia de substrato y cianuro, y que el cianuro inhibía la oxidación de la forma reducida (QH₂) endógena y exógena. Observaciones similares, utilizando antimicina como inhibidor, fueron hechas por GREEN y colaboradores (1959) y por PUMPHREY y REDFEARN (1959), demostrándose así definitivamente que la ubiquinona puede participar en la cadena respiratoria mitocondrial como transportador de hidrógeno en virtud de su oxidación-reducción reversible.

El problema no está definitivamente saldado, ya que los experimentos de pérdida de actividad con la extracción y recuperación de la misma mediante adición de UQ carecen de un valor definitivo, porque la extracción con disolventes poco polares produce diversas alteraciones en las mitocondrias (CRANE, 1962), y la efectuada con acetona, desplazamientos muy acusados de sus componentes (REDFEARN, 1961). Se ha demostrado además la persistencia de un transporte de electrones en preparaciones submitocondriales en que no puede detectarse la existencia de ubiquinona

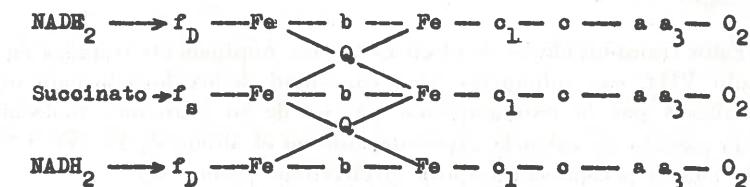
(REDFEARN y BURGOS, 1965). El balance de probabilidades es, no obstante, sumamente favorable a la participación obligada de la ubiquinona en los mecanismos ordinarios de transporte mitocondrial.

Más discutida es la posición exacta de este componente en el conjunto de la cadena respiratoria. GREEN y colaboradores (véase GREEN, 1961-1964), la colocan en una ruta única basándose en los datos de recuperación, mediante la adición de ubiquinona, de la actividad de las partículas extraídas, en el comportamiento cinético de la ubiquinona exógena (RAMASARMA y LESTER, 1960), y en datos cinéticos obtenidos a bajas temperaturas (GREEN, 1959). (III).

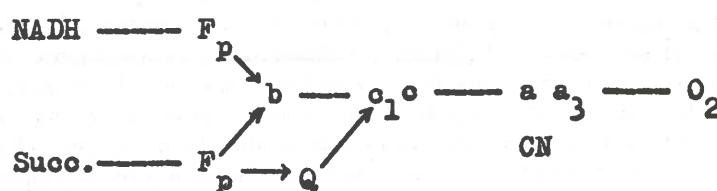
(III)



El estudio espectrofotométrico directo de la cinética de oxidación-reducción de la ubiquinona ligada a las mitocondrias, llevado a cabo por REDFEARN, CHANCE y PUMPHREY, (CHANCE, 1961; CHANCE y REDFEARN, 1961; REDFEARN y PUMPHREY 1960) han puesto de manifiesto que la velocidad de reducción de la ubiquinona representaba sólo alrededor de 1/3 de la actividad succinato-oxidasa de las mitocondrias y es por tanto incapaz de dar cuenta del flujo total de electrones a través del sistema. REDFEARN (1961), sugirió por ello su localización en una vía secundaria, y recientemente (REDFEARN, 1966) propuso además para esta sustancia un papel de enlace entre las dos fracciones de Fe «no hemo» colocadas a ambos lados del citocromo b.



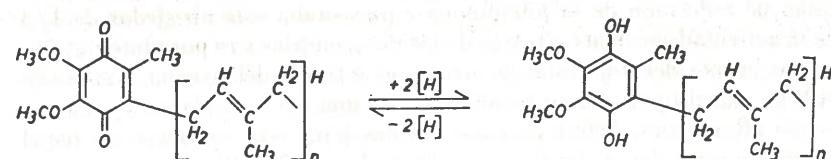
STOREY y CHANCE (1967) localizan su acción entre las flavoproteínas y el citocromo c, circunvalando también el citocromo b.



La relativa abundancia de la ubiquinona y la cinética de sus reacciones de oxidación-reducción han hecho a veces sospechar que desempeña otra función. Repetidas veces se ha sugerido su participación en la fosforilización oxidativa (HARRISON 1958; HATEFI, 1959; CHMILEWSKA, 1960) pero aunque se han sintetizado numerosos derivados de la ubiquinona que contienen fosfato, no se ha aislado todavía experimentalmente ningún intermediario de la fosforilización oxidativa de este tipo, comparable con la forma fosforilizada del DPN aislada por GRIFFITH y CHAPLAIN (GRIFFITH, CHAPLAIN, 1962).

El mecanismo de acción se basa en la capacidad de reducción de su molécula que por captación de dos átomos de hidrógeno se transforma en quinol. (IV).

(IV)

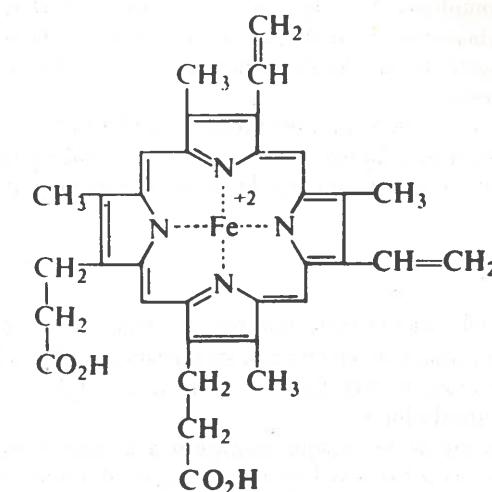


Citocromos

Estos transportadores de electrones (más ampliamente tratados en el capítulo VII), son substancias cuya capacidad de oxidorreducción está determinada por la reorganización interna de su estructura molecular por un cambio de valencia experimentado en el átomo de Fe (Fe^{+2} - Fe^{+3}) que le permite el transporte de electrones hasta el O_2 .

La molécula de los citocromos consta de un grupo prostético constituido por un anillo porfirínico denominado grupo «hemo» (V) y un grupo

(V)



proteico constituido por una proteína de elevado peso molecular. Se conocen una gran variedad de tipos de citocromos que han sido aislados de diversos materiales, que se diferencian entre sí por las características de los grupos proteicos y prostéticos de su molécula. Estos citocromos se han clasificado en tres tipos principales «a», «b» y «c», de acuerdo con la naturaleza de su grupo prostético.

El lugar de actuación de estos compuestos se halla entre la Uq y el oxígeno y su posición exacta en la cadena está determinada por su potencial de óxido-reducción que depende en parte de la estructura de la molécula proteica así como de su carga eléctrica.

Hierro «no hemo»

Se ha comprobado repetidamente que parte del Fe detectado en las mitocondrias y partículas submitocondriales no se halla asociado al grupo «hemo» (GREEN, 1956; y CRANE y colaboradores, 1956). GREEN y WHARTON (1963) han detectado la presencia de 3,3 y 5,9 átomos de Fe «no hemo», por gramo de proteína, en las mitocondrias y se ha comprobado (HATEFI, 1962 a y b) que hay una considerable cantidad de hierro «no hemo», en todos los complejos de la cadena respiratoria, a excepción del complejo IV. GREEN (1962) sugiere, por ello, que el hierro «no hemo» detectado, funciona como transportador de electrones. Los trabajos de BEINERT y colaboradores han comprobado esta hipótesis mediante técnicas de reso-

nancia paramagnética, habiendo observado que la señal correspondiente al ión férrico (Fe^{+++}) desaparece al reducir las preparaciones mitocondriales y los complejos I y II con succinato o NADH_2 . Los datos experimentales obtenidos no podían, sin embargo, justificar la participación en el transporte de electrones de más del 5 % de Fe «no hemo» presente en estas muestras.

REDFEARN y col (1965) han estudiado el papel del hierro «no hemo» en el sistema succínico-oxidasa, con inhibidores, y sólo pudieron evidenciar la participación del mismo en la porción succínico-deshidrogenasa de la cadena.

I-1.3. Inhibidores

Gran parte del conocimiento que hoy se tiene de los componentes de la cadena transportadora de electrones, su mecanismo de acción y su localización e interacción, se han logrado merced a estudios efectuados con distintos tipos de inhibidores.

Los inhibidores de la cadena respiratoria actúan fundamentalmente en cuatro puntos: a) a nivel del citocromo a_3 o citocromooxidasa, donde operan el ión cianuro, el monóxido de carbono, la azida, la filipina etc., b) un punto situado entre el citocromo b y c, lugar de acción de la antimicina, el BAL (2-3-dimercaptopropanol), las naftoquinonas antimáricas y los N óxidos de la 2-alquil-4-hidroxiquinoleína; c) un tercer lugar situado entre el NADH_2 y las flavoproteínas cuando las preparaciones se hallan acopladas y entre las flavoproteínas y el citocromo b, cuando se trata de preparaciones no fosforilizantes, donde se localiza la acción del amital sódico y la rotenona; d) la succinato-deshidrogenasa que es inhibida por el malonato y el pirofosfato.

El mecanismo de acción de los inhibidores que actúan sobre el primer punto es bastante conocido, y, con excepción de la filipina, consiste en inhibir la actividad catalítica de los metales pesados especialmente el Cu; este es precisamente uno de los argumentos que sirven para demostrar la presencia de Cu en la citocromo-oxidasa. Bastante conocido es también el mecanismo de acción del malonato y pirofosfato, pero no lo es tanto el del resto de los inhibidores.

Ion cianuro

La inhibición de la actividad respiratoria por el cianuro es conocida en su aspecto global desde los tiempos de CLAUDE BERNARD y es común a los sistemas succinato-oxidasa, NADH-oxidasa y se ejerce a nivel de una citocromo-oxidasa; ha sido considerada siempre como instantánea y reversible por dilución, diálisis o centrifugación. Bajo ciertas condiciones, Tsou (1951) ha demostrado un segundo efecto del cianuro, que inhibe

de forma progresiva e irreversible la actividad succinato-oxidasa y no la NADH-oxidasa; esta inhibición fue considerada consecuencia de la acción del cianuro sobre la succinato-deshidrogenasa, de acuerdo con los experimentos de WILSON y KING (1964). CAMERINO y KING (1965) demostraron que el cianuro inactivaba además irreversiblemente la citocromo-oxidasa.

No es de extrañar la variedad de sus efectos sobre la cadena respiratoria si se tiene en cuenta la inespecificidad de las acciones del cianuro sobre los enzimas ya que puede actuar (DIXON y WEBB, 1964): 1) combinándose con un grupo carbonilo del enzima o del sustrato; 2) inactivando un metal pesado al combinarse con él; 3) extrayendo el metal pesado del enzima; 4) rompiendo enlaces disulfuro, esenciales para el mantenimiento de la conformación estructural más favorable para la acción enzimática.

Monoóxido de carbono y azida

Las acciones del monóxido de carbono son mucho más específicas. Como inhibidor de la cadena respiratoria es anulado por las radiaciones luminosas de determinadas longitudes de onda (máximos del «espectro de acción fotoquímica») (WARBURG, 1926; CASTOR y CHANCE, 1955).

La acción inhibidora de la azida es de especificidad intermedia entre la del cianuro y el monoóxido de carbono y ha sido ampliamente estudiada (en la peroxidasa) por KEILIN y HARTREE.

Filipina

En ciertos hongos y levaduras la porción terminal de la cadena respiratoria es inhibida también por la filipina (GOTLIEB y colaboradores, 1955, 1960). Su modo de acción difiere notablemente de la del resto de los inhibidores de esta zona; actúa alterando la permeabilidad de la membrana celular.

Antimicina

La inhibición por la antimicina (estudiada fundamentalmente en mitocondrias y partículas de KEILIN HARTREE, ha sido uno de los instrumentos más valiosos en el estudio de la cadena respiratoria. A diferencia de lo que ocurre con el resto de los inhibidores, la antimicina parece «titular» un punto sensible y su acción es dependiente de la relación antimicina/proteína de la preparación, según demostraron POTTER y REIF (1952) y THORN (1956).

La inhibición por la antimicina afecta a las dos ramas de la cadena respiratoria pero no es total; las cifras que se dan como título de las preparaciones (0,2-0,2 μ moles de antimicina/mgr. de proteína), permiten en un buen número de casos un flujo reducido de electrones que fue observado

ya por REIF y POTTER (1954), utilizando como substrato NADH₂. Es TABROOK (1962) confirmó este hecho y demostró que se repetía en la succinato-oxidasa y que el porcentaje de la actividad total que suponía la fracción insensible a la antimicina era pH-dependiente y más acusado en medio alcalino. JENSEN (1966) ha puesto de manifiesto que a determinados pH (9,5-10,2) la actividad oxidasa insensible a la antimicina supone prácticamente el 100 % de la actividad total y que la oxidación antimicina-independiente conduce a la formación de H₂O₂.

Bal

La inhibición por el BAL tiene lugar en un punto muy próximo a aquel sobre el que actúa la antimicina y ha sido estudiado por SLATER (1959) que postuló la existencia en la cadena respiratoria de un factor adicional (el factor SLATER) distinto del punto de acción de la antimicina. Los datos experimentales aportados para confirmar este supuesto son, sin embargo, insuficientes. Es más probable que el punto de acción del BAL, la antimicina, el uretano y los N-óxidos de 2-alquil-4-hidroxiquinoleína sea común.

Quinonas

El efecto inhibidor de ciertas quinonas análogas a la ubiquinona, utilizadas como drogas antimicóticas, del tipo de la 2,3-dimetoxi-5-metil-p-benzoquinona, y la 2,3-dimetoxi-5-metil-6-bromo-p-benzoquinona ha sido puesto de manifiesto por JACOBS y CRANE (1960) y SMITH y LESTER (1961). Parecen actuar como inhibidores no competitivos combinándose con grupos SH esenciales. La relación entre la estructura y actividad ha sido cuidadosamente estudiada por REDFEARN y WIHTAKER (1962).

N-óxidos de 2-alquil-4-hidroxiquinoleína

El efecto inhibidor del N-óxido de 2-heptil-4-hidroxiquinoleína sobre el transporte de electrones de algunos microorganismos y preparados de KEILIN HARTREE, fue puesto de manifiesto por LIGHTBOWN y JACKSON (1956); su punto de acción parece ser exactamente el mismo sobre el que opera la antimicina.

Barbitúricos

La acción inhibidora de los barbitúricos fue ampliamente estudiada por QUASTEL y colaboradores, quienes pusieron de manifiesto que impedía la oxidación de la glucosa, el piruvato y el lactato, y que estimulaba en cambio la del succinato (QUASTEL y WHEATLEY, 1933; JOWET y QUASTEL, 1937).

Su punto de acción fue precisado por CHANCE, quien demostró espectralmente que en las mitocondrias, los barbitúricos bloquean la reducción de la flavoproteína por el NADH₂ (CHANCE y GAEBLER, 1956). En los preparados no fosforilizantes (de músculo cardíaco) inhibe la reducción de los citocromos b, c, c₁, y la oxidación de las flavoproteínas, pero no su reducción (ESTABROOK, 1957).

Los barbituratos interfieren además con la síntesis de ATP, en las preparaciones fuertemente acopladas, durante la oxidación del succinato y suprime el estímulo de la oxidación del succinato ejercido por el ADP (HATEFI y col., 1961). Este efecto no se supera con el 2,4-dinitrofenol o EDTA, sustancias que liberan el control respiratorio del ADP, pero sí con iones Ca ++ (PUMPHREY y REDFEARN, 1963).

El mecanismo de acción de los barbitúricos ha sido estudiado por GIUDITTA y CASOLA (1965), que sugieren actúan fundamentalmente por interacción con las flavinas ligadas a las deshidrogenasas, y en algunos casos con el punto de fijación del substrato en la porción proteica del enzima.

Rotenoides

La acción tóxica de la rotenona frente a los peces, es conocida desde hace mucho tiempo. LINDAHL y OBERC (1960), sugirieron que pudiera deberse a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. No modifica la oxidación del succinato pero inhibe poderosamente la rama NADH₂-oxidasa de la cadena respiratoria y se fija, como la antimicina, a su punto de acción (ERNSTER y col., 1963, BURGOS y REDFEARN, 1965). Sus efectos son compartidos por otros rotenoides y potenciados por los reactivos como la metilmaleimida y el paracloromercurobenzoato que titulan los grupos SH, lo que sugiere la intervención de éstos en el mecanismo de acción de los rotenoides, probablemente por ser esenciales para el mantenimiento de una estructura «normal» que dificulta el acceso de la rotenona a su punto de acción; este punto de acción está localizado cerca de la flavoproteína, pero del lado del oxígeno (BURGOS y REDFEARN, 1965).

Esteroides.

La oxidación de los sustratos ligados al NAD se ve también inhibida por los esteroides a bajas concentraciones (COCHRANE y DUBOIS, 1954; CHANCE y col., 1962; STOPPANI y col. 1963). Su acción se localiza en las flavoproteínas, sin que se conozca si es directa o si se ejerce alterando las estructuras y permitiendo la salida de coenzimas esenciales para la función respiratoria.

Algunos de estos esteroides (especialmente la progesterona y desoxicorticosterona) interfieren también con la transferencia de energía en

el segundo punto de la fosforilación, por lo que inhiben la oxidación del succinato en las mitocondrias activadas por el ADP, pero estas acciones requieren concentraciones mucho más elevadas (VALLEJOS y STOPPANI, 1967).

Los Tiofenos sustituidos

Recientemente se han descubierto las acciones inhibidoras de la cadena respiratoria, tanto en las mitocondrias como en preparaciones microbianas, ejercidas por los tiofenos sustituidos, cuyos efectos se parecen en numerosos aspectos a los de los agentes de quelación pero difieren en otros (FRANKLIN y col. 1967); se desconoce su mecanismo de acción pero no se puede excluir que actúen en virtud de su capacidad de formar compuestos de coordinación con el hierro «no hemo».

Agentes de quelación

La cadena transportadora de electrones posee hierro «no hemo» en diversos puntos (véase pág. 19), pero más especialmente entre la flavoproteína de la succinato-deshidrogenasa y la ubiquinona. Numerosos agentes que forman compuestos de coordinación con los metales, inhiben energicamente la succionato-citocromo-c-reductasa y la succinato-deshidrogenasa-Q-reductasa, pero sólo unos pocos (el TTA), y a concentraciones mucho menos elevadas, actúan sobre la NADH-citocromo-c-reductasa (TAPEL, 1959). Probablemente la acción de los agentes de quelación sobre la succinato-oxidasa tenga lugar en tres puntos, uno antes del punto de «empalme» del metasulfato de fenazina, otro entre éste y el del azul de metileno, y el tercero situado entre éste y la citocromo-oxidasa (REDFEARN y col. 1965).

Disolventes orgánicos y ortofenantrolina, agentes tensoactivos, etc.

La porción NADH₂ de la cadena respiratoria insensible a los demás agentes de quelación salvo a la TTA a concentraciones muy elevadas, es sensible en cambio a la ortofenantrolina, que a bajas concentraciones la estimula y la inhibe a concentraciones muy elevadas (REDFEARN y col., 1965). Sus acciones inhibitorias son potenciadas por el amital que anula el estímulo preliminar de las bajas concentraciones. La ortofenantrolina es además capaz de estimular las preparaciones inhibidas por el TTA y es poco probable que actúe en virtud de su poder de quelación.

La porción NADH₂ de la cadena respiratoria es además muy sensible a los disolventes orgánicos (DEUL y col., 1958), agentes tensoactivos (REDFEARN, PUMPHREY y FYNNE, 1960), urea (REDFEARN y KING, 1964) y al tratamiento térmico (MORRIS, 1962).

Malonato y Pirofosfato

El malonato constituye uno de los ejemplos más clásicos de inhibición competitiva. Es un poderoso inhibidor de la succinato-deshidrogenasa (QUASTEL y WOLDRAGE, 1928). Su acción se debe a la posesión de dos grupos carboxilo distanciados aproximadamente igual que en el succinato y a la falta del grupo oxidable CH₂-CH₂ entre ellos. La cinética de su inhibición ha sido estudiada por THORN (1953). El pirofosfato que posee también dos grupos ácidos distanciados aproximadamente lo mismo que en el malonato inhibe también selectivamente esta deshidrogenación (LELOIR y DIXON, 1937).

I-1.4. Mitocondrias y otras partículas transportadoras de electrones

Es difícil precisar quién descubrió las mitocondrias. Ya se había observado durante el período de 1850-1890 la existencia en el citoplasma de las células de determinados corpúsculos. KÖLLIKER delató la presencia de estos corpúsculos en el sarcoplasma. FLEMING, hacia 1880, advirtió también la existencia de estructuras filamentosas en el citoplasma de algunas células y las llamó «filas». RETZIUS, en 1880, observó la existencia de corpúsculos como los descritos por KÖLLIKER, muy abundantes en los músculos de insectos, y les denominó «sarcosomas». En 1890 ALTMAN, diseñó un nuevo método de tinción, que le permitió observar la presencia de estos orgánulos a los que consideró como estructuras autónomas y afirmó que eran las «unidades vivientes más elementales» y las llamó «bioblastos». El primero en observar su carácter funcional fue MICHAELIS, en 1898, quien detectó por primera vez su capacidad para reducir determinados indicadores de óxido-reducción como el verde JANUS. Todos los corpúsculos observados durante la segunda mitad del siglo fueron posteriormente identificados como «mitocondrias». Este término abarca las estructuras conocidas en otro tiempo como «blefaroblastos», «condriocentes», «condriomitos», «condrioplastos», «condriosomas», «condriosferas», «fila», «gránulos fushinofílicos», «cuerpos intersticiales», «körner», «fädenkörner», «mitogel», «cuerpos parabasales», «plasmosomas», «plastocondrias», «plastosomas», «esferoplastos», y «vermículos» (COWDRY, 1918).

El nombre de mitocondrias se debe a BENDA, que impulsó notablemente las investigaciones en este campo mediante la introducción de un nuevo método de tinción, con cristal violeta.

Los primeros intentos de aislamiento de las mitocondrias para la realización de análisis bioquímicos directos, resultaron infructuosos, debido probablemente a la falta de medios de suspensión adecuados. Hacia 1930 se publicaron los primeros trabajos que marcaron el principio de la confluencia entre las investigaciones en los campos de la citología y la bio-

química, entre las que destacan algunas aportaciones de BENSLEY (BENSLEY, 1934).

El dominio de los estudios bioquímicos comienza con los trabajos de CLAUDE hacia 1940, que llevó a cabo una serie de estudios sistemáticos sobre la estructura, conducta y composición química de las mitocondrias. A la misma época corresponden también las primeras microfotografías electrónicas y el registro en estos corpúsculos de actividades succinato-oxidasa y citocromo-oxidasa, y el comienzo de los trabajos conjuntos de los bioquímicos y enzimólogos del Instituto Rockefeller, que poco tiempo después publicaron el primer método de separación de mitocondrias intactas (HOGEBOOM, SCHENEIDER y PALADE, 1948). Este método fue empleado después por numerosos investigadores como LELOIR, MUÑOZ y LENHINGER, que fueron los primeros en dar a conocer que las mitocondrias poseían una actividad ácidos grasos oxidasa completa, y otros que demostraron la capacidad de las mitocondrias de llevar a cabo las reacciones catalizadas por los enzimas del ciclo de KREBS, y la fosforilización del ADP.

Las mitocondrias se constituyeron en el punto de partida para el estudio del mecanismo del transporte de electrones y de la fosforilización oxidativa en los tejidos animales.

Con el perfeccionamiento de las técnicas de microscopía electrónica, las investigaciones se extendieron a una gran variedad de células. Hacia 1952, SJÖSTRAND y PALADE utilizando las nuevas técnicas, publicaron las primeras microfotografías electrónicas de gran resolución.

La morfología y estructura de las mitocondrias, se halla hoy notablemente aclarada.

Estas partículas poseen forma diversa. En las células hepáticas son alargadas, pero su forma es variable. Su tamaño es diferente según las células, considerándose como tamaño medio el de las células hepáticas ($3 \times 0,5 - 1$ micras).

Las mitocondrias poseen dos membranas, una externa y otra interna, separadas por un espacio sin comunicación alguna. La membrana interna posee unos plegamientos cuya forma depende de cada célula, que reciben el nombre de «crestas mitocondriales». El espacio que queda entre las crestas se conoce con el nombre de «matriz». El número de mitocondrias por célula es muy variable. Hay células, como los espermatozoides, que poseen 24, en cambio, otras, como las de la amoeba gigante «Chaos-Chaos» se le calculan alrededor de 500.000.

Estructura submitocondrial

Las investigaciones de FERNÁNDEZ MORÁN (1962, 1964), han demostrado que la membrana externa de las mitocondrias no es lisa sino que posee una serie de granulaciones esféricas, de unos 80 Å de diámetro, y

que la membrana interna está asimismo constituida por unas partículas esféricas de 80-100 Å, unidas a la membrana propiamente dicha por una especie de pedúnculo; la forma de este conjunto recuerda la del pomo de una puerta («EP» = elementary particles = partículas elementales).

Las partículas esféricas observadas por FERNÁNDEZ MORÁN (1964) en la membrana externa contienen los enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y son además responsables del sistema de oxidación de los ácidos grasos. Las EP, en cambio poseen el sistema completo transportador de electrones (GREEN, 1964).

El estudio del mecanismo del transporte de electrones se ha facilitado merced al fraccionamiento de las mitocondrias con objeto de estudiar la cinética enzimática en sistemas más simples. Para ello se han utilizado diversos métodos: F. L. CRANE (1956) y B. MACKLER (1956) han utilizado álcalis diluidos, T. M. DEVLIN (1956) digitonina, A. W. LINNANE (1958) los ultrasonidos, y M. E. PULLMAN (1958), la trituración en un mortero. Estos diversos procedimientos han permitido obtener partículas submitocondriales con capacidad transportadora de electrones sensible a la antimicina. La microscopía electrónica ha permitido comprobar (D. M. ZIEGLER y col. 1958), que se trata de partículas submitocondriales constituidas principalmente por fragmentos de membrana externa y partículas elementales (EP) unidas a trozos de proteína de la matriz, o proteína estructural. Durante el proceso de preparación, la membrana externa resulta destruida y su material solubilizado; las preparaciones contienen fragmentos de membranas internas con una proporción variable de «EP» intactas. Bioquímicamente ha podido confirmarse la naturaleza de estas partículas identificadas por técnicas microscópicas, ya que carecen de las actividades enzimáticas propias del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de las que catalizan la oxidación de los ácidos grasos (GREEN, 1958).

HATEFI y col. (1962 a, b) y D. E. GRIFFITHS y D. C. WHARTON (1961) han fragmentado las EP en cuatro complejos (I-II-III-IV) y han demostrado que cada uno de ellos es responsable del transporte de electrones en una determinada porción de la cadena.

Complejo I	= NADH - Q-reductasa
II	= Succinato - Q-reductasa
III	= Q reducida - cit. c-reductasa
IV	= Cit. c -reductasa

HATEFI y col. (1962), FOWLEY y RICHARDSON (1963) y KEILIN y KING (1960), y KING (1963), han demostrado que es posible reconstruir el sistema transportador de electrones a partir de los complejos constituyentes. De acuerdo con GREEN y col. (1965) en el extremo esférico de estas

partículas internas, se halla localizado el complejo IV, que está constituido por el sistema citocrómico; a continuación y formando el pedúnculo de las mismas, se halla el complejo III constituido por flavoproteínas, y en la base, yuxtapuestos, el complejo I, que contiene el sistema succínico-deshidrogenasa, y el complejo II formado por el sistema Q-reductasa. El mecanismo del transporte de electrones, sería el siguiente: Los átomos de hidrógeno liberados por las deshidrogenasas, en las partículas de la membrana externa, pasarían al NAD de la cara interna de la membrana externa, y de ésta a través del líquido que rellena el espacio que queda entre las dos membranas, a los complejos I y II quienes las transferirían a los complejos III y finalmente, los electrones liberados en el mismo serían conducidos a lo largo de los citocromos (complejo IV), hasta el O₂, en el extremo de la porción esférica de estas partículas. Estos complejos se hallan fijos a una estructura de naturaleza lipídica, y los complejos I y II se hallan separados del III por una fracción de este material. El transporte de electrones a este último complejo, se verificaría merced a un transportador móvil, el coenzima Q o ubiquinona. Del complejo III al IV, el transporte se halla a cargo del sistema citocrómico, que los conduce al acceptor final, el O₂. Esta disposición es sumamente sugeriva pero encuentra grandes dificultades para abrirse paso y ha sido objeto de una enconada controversia. STASNY y CRANE (1964) y CHANCE y PARSONS (1963) le ponen algunas objeciones. Separan por sonicación las porciones esféricas de las EP, no observando en ellas la presencia de citocromos. Sin embargo GREEN y col. (1964) aseguran que las partículas obtenidas por CHANCE y PARSONS, y STASNY y CRANE no son EP sino otras fracciones particuladas submitocondriales. Por otra parte, RACKER y col. (1964) han desprendido tratando con urea, la porción esférica de las EP y han podido reconstituir su actividad adicionando una fracción con elevada actividad ATP-asa. Con ello intentan demostrar que lo que las partículas esféricas contienen es una proteína que acopla el transporte de electrones a la fosforilización oxidativa. CHANCE y colaboradores (1964) postulan que cada partícula esférica alberga un componente distinto de la cadena respiratoria formando su conjunto, una unidad a la que denomina oxisoma.

I-1.5.—La cadena respiratoria de los hongos

Las levaduras desempeñaron un papel importante en la aclaración de los mecanismos de la respiración celular, pero la mayor parte de los trabajos efectuados recientemente en torno al transporte biológico de electrones y la fosforilización oxidativa, se han llevado a cabo con células de mamíferos y con algunas bacterias, y son muy pocos los efectuados en los hongos. La razón principal de este hecho reside probablemente en la dificultad de romper las paredes celulares de los hongos, donde es necesario aplicar métodos drásticos de ruptura.

Los métodos de trituración empleados ordinariamente para la ruptura de las células de los hongos han sido muy variados y además del primitivo sistema de trituración en mortero con arena (SHATKIN y TATUM, 1961; REICH y TSUDA, 1961; YWASA y col. 1959), se han empleado entre otros, el homogeneizador de cuchillas (NICHERSON y FALCONE, 1956; VITOLS y LINNANE, 1961); la prensa de FRENCH (LEDERBERG y MITCHINSON, 1962); la agitación con bolas de vidrio (HAROLD y MILLER, 1962; NICHERSON y FALCONE, 1956); el desintegrador de NOSSAL (NOSSAL 1956; UTTER y col. 1958), y los ultrasonidos (EDDY, 1958; VANDERWINKEL y col. 1958).

Con objeto de obviar las dificultades originadas por la utilización de métodos tan drásticos, se han introducido otros sistemas tales como la digestión de las paredes celulares por ciertos enzimas (enzimas de caracoles-EDDY y WILLIAMSON 1957; CHAIX, 1961; AGUIRRE y VILLANUEVA, 1962).

Básicamente, la cadena respiratoria de los hongos se parece por su localización y funcionamiento a la de las células de los mamíferos.

MOORE y McALEAR (1961), llevaron a cabo un estudio microscópico con 50 especies de hongos y comprobaron la existencia de mitocondrias en todas ellas. Su presencia ha sido también comprobada microscópicamente por otros investigadores en una gran variedad de hongos entre los que se hallan los *Saccharomyces*, (LINNANE y STILL, 1955; VANDERWINKEL y col. 1958; VITOLS y LINNANE, 1961), *Cándida* (TAKAGI, 1959), *Allomyces* (B. A. BONNER y MACHLIS, 1957), *Neurospora* (TISSIÉRES y col., 1953; TURIAN 1960; SHATKIN y TATUM, 1961), *Aspergillus* (YWASA y col., 1959; KIKUCHI y BARRON, 1959; MARUYAMA y ALEXANDER, 1962), *Fusarium*, y en las ascosporas de la levadura *Nadsonia fluorescens* (KAWAKAMI, 1961).

No es probable, sin embargo, que estos orgánulos se hallen presentes en todas las especies, pues parece que su existencia está en cierto modo determinada por el tamaño de la célula en cuestión. Algunas células de los hongos, son, como las de las bacterias, considerablemente inferiores a las de los mamíferos, sin que el tamaño de las moléculas sea por ello inferior, y es dudoso, por tanto, que puedan albergar una estructura tan compleja como la de una mitocondria.

No obstante TISSIÉRES (1954), trabajando con *Aerobacter* y *Azotobacter*, obtuvo unas partículas celulares de 15 milimicras de tamaño, que contenían la mayor parte del sistema enzimático succínico-oxidasa, un sistema citocrómico y capacidad fosforilizante. Básicamente poseen pues las propiedades bioquímicas análogas a las mitocondrias. Posteriormente se han podido preparar partículas semejantes de *Neurospora crassa* tanto a partir de hifas, como de conidios (WEISS, 1963); y en levaduras por DUELL y col. (1964) y por OHNISHI y col. (1966). Es evidente, por tanto, que si bien no resulta probable la existencia de estos corpúsculos en las células de menor tamaño, el problema no está todavía resuelto.

Pese a todo, algunos hongos, especialmente las levaduras, han contribuido notablemente, como se ha dicho, al esclarecimiento de los aspectos fundamentales de la cadena respiratoria. El sistema transportador de electrones de las levaduras es por ello uno de los mejor conocidos.

El descubrimiento por KEILIN (1925) del citocromo *c*, en las células de las levaduras, constituyó el primer paso hacia el esclarecimiento del transporte biológico de electrones en los microorganismos.

Las actividades enzimáticas respiratorias de los extractos de levaduras libres de células han sido cuidadosamente examinados por diversos investigadores (CHANTRENNE, 1944; SLONIMSKI, 1953, 1955; NOSSAL y col. 1956, 1957; VANDERWINKEL y col. 1958; HEBB y SLEBODNIK, 1958; CHAIX, 1961; LINNANE y STILL, 1955; VITOLS y LINNANE, 1961; y MACKLER y col., 1962, entre otros).

Uno de los sistemas más estudiados en los hongos, ha sido el sistema citocromo-oxidasa que ha sido detenidamente investigado en hongos tales como el *Aspergillus niger* (MARTIN, 1954), *A. oryzae* (YAMAMOTO y col. 1959; YWASA, 1960), y *Neurospora crassa* (SHEPHERD, 1951; NICHOLAS y col. 1954; TISSIÉRES y MITCHELL, 1954; TISSIÉRES, 1954; TURIAN, 1960), *N. tetrasperma* (CHENG, 1954; HOLTON, 1960), *Glomerella cingulata* (SUSSMAN y MARKERT, 1953) y en conidios de *Neurospora sitophila* (OWENS, 1955). También se ha detectado la citocromo-oxidasa en algunos ficomictos acuáticos como el *Allomyces* (BONNER y MACHLIS, 1957; TURIAN, 1960). CANTINO y HYATT (1953), la han detectado en los *Rhizophlyccis rosea* y *Blastocladiella emersonii*, pero no pudieron, en cambio, detectarla en los ascosporas en estado de latencia. También ha sido registrada actividad citocromo-oxidasa en el hongo *Physarum polycephalum*.

Los análisis de citocromo-oxidasa han sido siempre llevados a cabo utilizando como dador de electrones el citocromo de las células de maíferos. YAMANAKA y col. (1962) han sido los primeros en usar el citocromo aislado de la propia célula.

En general, el sistema respiratorio del resto de los hongos se parece al de las levaduras, como lo demuestran los estudios efectuados en los *Schizophyllum comune* (NIEDERPRUEM y HACKETT, 1961), en los ureidosporos de *Puccinia graminis* (WHITE y LEDINGHAM, 1960), *Polycystis versicolor* (BOULTER y BURGESS, 1955) y en *Fusarium lini*.

Los estudios sobre la fosforilización oxidativa en los hongos se han visto notablemente dificultados por la necesidad del empleo de métodos drásticos de ruptura, a la que ya hemos aludido, para la obtención de fracciones particulares, pues si bien la utilización de sistemas como el tratamiento con acetona o hidróxido amónico, etc., resultan muy útiles para la preparación de algunos enzimas, son un grave inconveniente para la preparación de partículas con capacidad fosforilizante. La introducción de los nuevos métodos de ruptura ha permitido salvar estas dificultades.

VITOLS y LINNANE (1961), DUELL y col. (1964), y ONISHI y col. (1966), prepararon partículas de levaduras con capacidad fosforilizante. Entre las otras especies de hongos, sólo se ha logrado detectar la fosforilización oxidativa en algunos casos, tales como en mitocondrias aisladas de *Aspergillus oryzae* (YWASA, 1960) y en las de *Allomyces macrogynus* (BONNER y MACHLIS, 1957), o en *Neurospora crassa* (WEIS, 1963), y *Aspergillus niger* (WATSON y SMITH, 1968).

I.2.—HEMISPORA STELLATA, SPORENDONEMA EPIZOUM Y EL «DUN»

En otoño, en los países de gran producción bacaladera, suele presentarse, en el bacalao que ha estado almacenado durante los meses de verano, una alteración consistente en una despigmentación de la carne del pescado, producida por un conjunto de hongos marrones que crecen en su superficie y forman colonias de este color de intensidad variable. A esta alteración se la conoce con el nombre de «dun». Es muy probable que a esta alteración del bacalao no se le concediera en otro tiempo importancia alguna, e incluso que no fuera considerada como un defecto hasta tiempos recientes.

Hace unos doscientos años, se entendía por «dun fish», un tipo de curado del pescado salado muy corriente en los países nórdicos para el que se reservaban las piezas mayores del bacalao que tomaban por este procedimiento un tenue color marrón (C. H. STEVENSON, 1899). Este bacalao era considerado de calidad superior y se consumía crudo principalmente en Cuaresma.

El primero en estudiar el «dun» fue HØYE, (HØYE, 1902, 1905, 1907, 1909), quien identificó como agente causal el *Torula epizoa* (Corda), un hongo marrón altamente halófilo que producía colonias rugosas. HØYE observó también la presencia de otro hongo, el *Torula minutum*, que poblabía el ambiente y determinado género de algas y que crecía en concentraciones salinas del (0-10 %) mostrando en ausencia de sal, un crecimiento más pobre y la formación de colonias menos rugosas. El tamaño de sus esporas era de 2,5 - 3 micras.

Hoy se suele dar como agente causal del «dun» al *S. epizoum*.

El género *Sporendonema* fue creado por DESMAZIÉRES (1827) y su significado fue enmendado por OUDEMANS (1885), basándose en su peculiar formación pseudoendogénica de conidios. Fue aceptado por numerosos micólogos como CONSTANTIN y SACCARDO, en 1888. En su versión enmendada, la especie tipo era el *S. terrestris*; el género contenía además *S. myophilum*, especie descrita por SACCARDO y PECK en 1888 y que es mucho menos conocida.

Este género fue durante mucho tiempo ignorado y es muy posible que otros géneros tales como *Glycophila* o *Glycyphyla* no sean sino sinónimos del género *Sporendonema*.

VUILLEMIN (1906), dio cuenta ante la Sociedad Micológica de Francia del descubrimiento de un nuevo hongo que se había desarrollado bajo la superficie de una colonia de *Aspergillus repens*. Por las especiales características concurrentes en el micelio reproductivo del mismo (la formación inicial de protoconidio, o proconidio, como luego fue designado por este autor, (VUILLEMIN, 1931) a partir del que se constituían los deuteroconidios o esporas fisiológicas), propuso para el mismo la creación de un nuevo género, el género *Hemispora*, y designó a la especie por él observada, *H. stellata*, por el particular aspecto ofrecido por sus colonias. El género *Hemispora* constituido por VUILLEMIN era un género monotípico, único representante del orden *Haemisporales* y familia *Hemisporaceae*.

Aunque se conocen en la bibliografía micológica otros *Hemispora* como el *H. rugosa* (CAST.) y *H. pararugosa* (CAST. y otros), se trata de hongos muy distintos, del tipo *Tricosporum*, en nada semejantes al *H. stellata*.

CIFERRI y REDAELLI (1934), estudiaron 21 cepas de diversos hongos: *Oospora d'agatae* (SACC.). *H. stellata* (VULL.) *Tórola sacchari* (CÓRDA) etc. y concluyeron que todos ellos podían agruparse dentro del género *Sporendonema*, tal y como había sido modificado por OUDEMANS (1885), en virtud de la formación de esporas pseudoendogénicas y agruparon en una sola especie (*S. epizoum*), las previamente conocidas con los nombres de *Tórola*, *Oospora*, *Penicillium*, *Caternularia*, *Scopulariopsis*, *Hemispora*, y *Sporendonema*.

Esta sinonimia ha sido ampliamente aceptada, y en la actualidad la única colección que mantiene un stock de *S. epizoum*, es la del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn-Holanda) (HAUDUROY, 1966) que lo mantiene bajo la denominación de *H. stellata*.

De acuerdo con CIFERRI y REDAELLI, el *S. epizoum* ofrece una temperatura óptima de crecimiento de 23-25 °C, no crece a 40 °C y casi nunca a 36-37 °C. Crece en soluciones de sacarosa de 1% con o sin peptona. Se desarrolla bien en medios líquidos que contengan del 1 al 10% de ClNa. Licua completamente la gelatina; desarrolla colonias de color variable siendo el marrón oscuro el más corriente.

El término *S. epizoum* abarca así, prácticamente, a todos aquellos hongos marrones halófilos de formación pseudoendogénica de conidios, que suelen encontrarse en los pescados y carnes salados.

M. FRANK y E. HESS (1941 b), llevaron a cabo un estudio comparado de 26 cepas de hongos marrones que aislaron del pescado salado, de los almacenes y del ambiente, y estudiaron su halofilismo, temperatura y pH óptimos para su crecimiento, y las clasificaron en dos grupos.

El primero estaba constituido por 19 de estas cepas, aisladas del pescado, que resultaron halófilos obligados, no crecían a 37 °C, no licuaban la gelatina y producían esporas de 4-5 micras, de color marrón de intensidad variable. Fueron clasificadas como *S. epizoum* típicos. De ellas, cinco requerían una concentración mínima de sal del 5% y las restantes catorce de un 10%.

El segundo grupo estaba constituido por las otras siete cepas aisladas de las muestras obtenidas de los almacenes y del ambiente; eran halófilos facultativos y el tamaño de sus esporas era algo menor, de 2-3 micras. Seis de ellas crecían a 37°C y su temperatura óptima era de 23-25°C en medios de cultivo con una concentración salina de 0-10%. FRANK y HESS propusieron que a estas cepas de comportamiento y morfología parecidos al *Tórola minutum* de HØYE se las denominase *Sporendonema minutum* HØYE n. com. Esta clasificación no progresó.

Al iniciar el trabajo FRANK y HESS solicitaron de CIFERRI y REDAELLI una cepa de *Sporendonema epizoum*. La cepa que recibieron estaba considerada por CIFERRI y REDAELLI como una cepa «típica» de *Sporendonema epizoum*. Por su comportamiento y morfología FRANK y HESS la incluyeron en el primero de los grupos, el formado con los hongos halófilos obligados, al que ellos consideraron como verdaderos *Sporendonema epizoum*.

Remitieron además a CIFERRI y REDAELLI tres cepas del segundo grupo, es decir, de aquél para el que habían propuesto el nombre de *Sporendonema minutum*, con objeto de que estos autores las identificasen o confirmasen sus diferencias con el *S. epizoum*. Inesperadamente, CIFERRI y REDAELLI las incluyeron también en el grupo de los *Sporendonema epizoum* «típicos».

CAPITULO II

MATERIAL, METODOS Y PRODUCTOS

II.1.—MATERIAL

II.1.1.—*Agua destilada y agua desionizada*.—Destilador de vidrio «Afora» y columna de desmineralización «SETA» mod. D/400.

2.—*Pesadas*.—Balanzas analíticas «SARTORIUS» mods. 2400 y 2600 y granatarios «OHAUS» mod. 750-S.

3.—*Esterilizaciones*.—Olla a presión «LASTER» de 14 litros, y autoclave «AVERLY» serie «Nova» n. 5.

4.—*Centrifugaciones*.—Centrífuga «CHRIST» UNIVERSAL-JU-NIOR I mod. 33000, y ultracentrífuga «BECKMAN-SPINCO» mod. L-50.

5.—*Incubaciones*.—Estufas «TARMA», «HERAEUS» mod. FB-420, y cámara de incubación provista de termostato y radiador de calor

negro «TYMESA» de 750 watos. Agitador incubador «NEW-BRUNSWICK» mod. G-25. Baño termostático «BRAUN» mod. «Thermomix-II».

6.—*Siembras y recogidas de conidios*.—Cámara de siembra equipada con dos lámparas de U. V. «PHILLIPS» de 15 watos.

7.—*Frigoríficos*.—«ODAG» mod. 228, y «WESTINGHOUSE». Congelador «HELIOS» mod. «Helifrost». Cámara fría R. E. S. E. Z. A.

8.—*Desintegraciones celulares*.—Triturador de cuchillas marca «M. S. E.» mod. 7700, y aparato de ultrasonidos de la misma marca mod. «60» watos.

9.—*Colorimetría y espectrofotometría*.—Colorímetro «BAUCH & LOMB» mod. «Spectronic-20» y espectrofotómetro «BECKMAN» mod. DB, equipado con un registrador «lin-log», y un expensor de escala de la misma marca.

10.—*Mediciones de pH*.—pH-metro «RADIOMETER» mod. «PHM-28b».

11.—*Cromatografías*.—Columnas de cromatografía del tamaño adecuado para cada caso, de vidrio «Pyrex». Cromatografías de filtración molecular y de intercambio iónico con columnas de la marca «SEPHADEX» mod. «kk 15/90». Colector de fracciones «LKB» mod. 3400-RadiRac. Cromatografías en capa fina con cromatógrafo «DESAGA». Lámpara de UV «HANOVIA» mod. «90 watos», para la detección de sustancias separadas en la cromatografía.

12.—*Baños de vapor*.—«RETCHE» mod. «Retotherm», y «GALLEN-KAMP» mod. Wk-190.

13.—*Concentraciones de volumen*.—Liofilizador equipado con bomba de vacío «EDWARD» mod. «ED-35». Pastillero para nieve carbónica, «McLeod».

14.—*Diálisis*.—Tubos de celofán «VISKING» agitados con agitadores magnéticos «PROBUS» y «METHORM».

15.—*Respirometrías*.—Aparato de Warburg «BRAUN» mod. V-85.

16.—*Microscopías*.—Microscopios «ERNST-LEITZ» mods. «SM», y «Ortholux». Cámara fotográfica «ERNST-LEITZ» mod. «Orthomat». Los recuentos se efectuaron en una cámara de «NEUBAUER». Las micrometrías se realizaron con un ocular calibrado.

II-2.—MÉTODOS Y PRODUCTOS

II-2.1.—MICROBIOLOGICOS

II-2.1.1.-Procedencia del microrganismo utilizado

A lo largo del presente trabajo, se ha empleado una cepa de *Hemispora stellata* (VUILL.; sin. *Sporendonema epizoum*, CIFERRI y REDAElli), suministrada por el «Centraalbureau voor Schimmelcultures» (Baarn-

Holanda), única colección en el mundo que la posee (comunicación personal del Prof. HAUDUROY).

2.—Esterilización y limpieza del material

El material de vidrio procedente de cultivos anteriores fue esterilizado al autoclave 15 minutos a 1 atmósfera, posteriormente lavado en agua caliente y detergente «Teepol», y aclarado con abundante agua del grifo y agua desionizada

3.—Preparación de medios de cultivo

Agar malta.—El medio de agar malta utilizado fue el descrito por E. B. VAISEY (VAISEY 1954), y se preparó del siguiente modo:

Extracto de malta (Oxoid)	30 grs.
Agar (Oxoid)	15 grs.
ClNa (Probus)	de 0-200 según los casos
Volumen total a 1 litro con agua desionizada.	

Para su preparación se pesaron los reactivos y se le adicionó el agua desionizada. El conjunto de reactivos con el agua se sometieron a ebullición unos dos minutos, con agitación continua, para una perfecta fusión del agar. Se distribuyó en tubos de ensayo de 1,5 × 15 cms., y se esterilizó durante 15 minutos a 1 Kg./cm² en la olla a presión.

Tras el enfriamiento hasta la temperatura de unos 60 C, se vertió su contenido en la cámara de siembra, en placas de Petri estériles. Las placas así preparadas, se mantuvieron en la cámara de incubación no menos de un día antes de ser inoculadas.

Agar malta con gelatina.—El agar malta con gelatina, se preparó por el mismo procedimiento anterior incluyendo en su composición un 20 % de gelatina.

Medio de cultivo de salvado.—Para la obtención de conidios se empleó un medio de cultivo constituido a base de salvado de trigo y ClNa, pobre en proteínas, excelente para la obtención de esporas. Su composición es la siguiente:

— salvado de trigo (cribado para eliminar las partículas menores)	100 grs.
— Solución de ClNa al 4,5 %	65 ml.

Este medio de cultivo se preparó cribando el salvado a través de una tela metálica de unas 40 mallas/cm²; adicionando por cada 100 grs. de salvado así preparado, 66 ml. de una solución al 4,5 % de ClNa, y

removiendo la mezcla a medida que se adicionaba la solución de ClNa para lograr una perfecta distribución de la sal. El medio de cultivo así preparado se distribuyó en los erlenmeyer y frascos de Roux en las siguientes cantidades:

erlenmeyer de 2 l.	135 grs.
erlenmeyer de 1 l.	65-70 grs.
frascos de Roux	65-70 grs.

Los recipientes se taparon luego con algodón hidrófilo y se esterilizaron en el autoclave, durante 20 minutos, a 2 atmósferas.

Medio líquido de Vaisey.—Para la producción de micelio a partir de conidios recogidos del medio de salvado, se ha utilizado un medio líquido basado en el descrito por VAISEY (1954) preparado con los siguientes reactivos en las proporciones que se indican:

Hidrolizado de caseína	(Oxoid)	10 grs.
Dextrosa	(Oxoid)	10 grs.
Sulfato magnésico	(Probus r.a.)	200 mgrs.
Sulfato ferroso	(Probus r.a.)	20 mgrs.
Fosfato bipotásico	(Probus r.a.)	1 gr.
ClNa	(Probus r.a.)	75 grs.

Agua desionizada hasta volumen total de 1 litro.

La proporción de ClNa empleada ha sido elegida a la vista de los resultados obtenidos en los experimentos descritos en la pág. 71.

El medio de cultivo de VAISEY se distribuyó en fracciones de 100 ml. en erlenmeyer de 500 ml. y se esterilizó en el autoclave 15 minutos a 1 atmósfera.

4.—Siembras

Las siembras se efectuaron siempre en la cámara estéril, sometida a la acción de los rayos ultravioleta, salvo durante el trabajo.

En placas de Petri.—Las placas de Petri se sembraron con un inóculo de 0,5 — 1 ml. de suspensión de conidios, que se extendieron por su superficie con una varilla de vidrio esterilizada a la llama y se incubaron en la cámara a 25 C.

En frascos de Roux.—Los frascos de Roux se sembraron con unos 10 ml. de una suspensión de esporas obtenidas generalmente del medio de salvado, según se describe en II-2.1.6. Se distribuyó homogéneamente en el salvado con ayuda de una varilla de vidrio estéril, agitando a mano. Los recipientes así sembrados se incubaron a 25 C.

En medio de Vaisey.—Los erlenmeyer de 500 ml. conteniendo 100 ml. de medio de cultivo de VAISEY, se sembraron con pipetas estériles a partir de una suspensión de conidios (véase II-2.1.6). Salvo expresamente indicado, el inóculo consistió en $2 \text{ a } 4 \times 10^9$ conidios/erlenmeyer.

5.—Mantenimiento de la cepa de *Hemispora stellata*

Se mantuvo la cepa utilizada sembrando cada 3-4 semanas.

No se utilizaron nunca para la siembra en salvado destinado a la obtención de conidios, esporas de más de un mes. El cultivo original se mantuvo además resembrando en tubos inclinados de agar malta, cada 3-4 semanas.

6.—Recogida de conidios

Los conidios producidos en los recipientes con medio de cultivo de salvado, tras un período de incubación de 3-5 días a 25 C, se recogieron en la cámara de siembra del siguiente modo: Se agitó el contenido de los recipientes de cultivo (con una disolución de ClNa estéril al 15-20 %, que se pasó de uno a otro utilizando la mínima cantidad posible, con objeto de concentrar al máximo la suspensión de conidios para facilitar la operación y el posterior almacenamiento. Se extrajeron así repetidas veces los recipientes, hasta que la solución salina sólo tomaba un tenue color marrón (2-3 extracciones). La extracción resulta más completa permitiendo en la



Fig.1

primera extracción de cada recipiente, que la solución salina emape durante unos minutos (3-5) el cultivo, con agitación intermitente.

Para garantizar la esterilidad, al iniciar las extracciones se cambió el tapón de algodón de los recipientes por uno de papel de aluminio que es de fácil manejo y puede ser esterilizado a la llama del mechero. El paso de las suspensiones de conidios de unos recipientes a otros se efectuó bajo la campana de un embudo estéril con objeto de evitar contaminaciones. De esta forma se obtiene una suspensión marrón (de mayor intensidad cuanto mayor es la concentración de conidios), que además de los conidios y fragmentos de hifas, contiene cierta cantidad de salvado. El salvado se eliminó de las suspensiones, por filtración a través de tres capas de gasa hidrófila estéril. (Véase en la Fig. 1 el dispositivo adoptado para la recogida y filtración inicial de los conidios).

Los recipientes con la suspensión final de conidios filtrados, se taparon con dos láminas de papel de aluminio y se almacenaron en la nevera a unos 5 °C.

7.—Almacenamiento de las suspensiones de conidios

Las suspensiones de conidios obtenidas según 6, se mantuvieron hasta su utilización en el frigorífico a 0-5 °C.

Durante el almacenamiento, los conidios se depositan en el fondo del recipiente (de 2 a 4 días), formando una capa espesa de color marrón, y el sobrenadante puede ser decantado a voluntad para lograr la concentración de conidios deseada.

8.—Recuento de las suspensiones de conidios

El recuento de las suspensiones de conidios se efectuó sin previa tinción, a 840 aumentos en una cámara de «Neubauer». Los cuadrados menores en esta cámara tienen $1/400 \text{ mm}^2$ de superficie y 0,1 mm. de espesor. El valor de los recuentos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de conidios en 25 cuadraditos} \times 160.000 = \text{conidios/ml.}$$

Para comprobar la exactitud y precisión del método de recuento empleado, se confeccionó una gráfica standard del siguiente modo: Se prepararon 100 ml. de una suspensión concentrada de conidios, que fue contada. La concentración de la suspensión original así determinada, fue considerada como «concentración real». A partir de ella se prepararon una serie de diluciones (véase Tabla 1). Los conidios que fácilmente forman agregados, se dispersaron en la solución original y sus posteriores diluciones, por sonicación durante unos segundos, para facilitar el recuento; en la Tabla 1 figuran los resultados así obtenidos que se representan en la Fig. 2, que demuestra la precisión del método.

TABLA I
Comprobación del método de recuento

Tubo N	Suspensión (ml.)	Agua (ml.)	Número teórico de conidios (millones / ml.)	Número de conidios según recuento (millones / ml.) ²
1	1	9	126	102 - 112
2	2	8	252	205 - 215
3	3	7	378	360 - 405
4	4	6	504	520 - 560
5	5	5	630	658 - 690
6	6	4	756	779 - 780
7	7	3	883	870 - 900
8	8	2	1010	980 - 1000
9	9	1	1135	1180 - 1240
10	10	0	1260	1240 - 1280

1.—Estos valores se obtuvieron considerando como concentración real la del tubo 10 (sin diluir) y efectuando en el resto de los tubos los cálculos pertinentes, de acuerdo con las diluciones realizadas.

2.—Estas cifras corresponden a los valores obtenidos en los recuentos de dos cámaras llenadas simultáneamente.

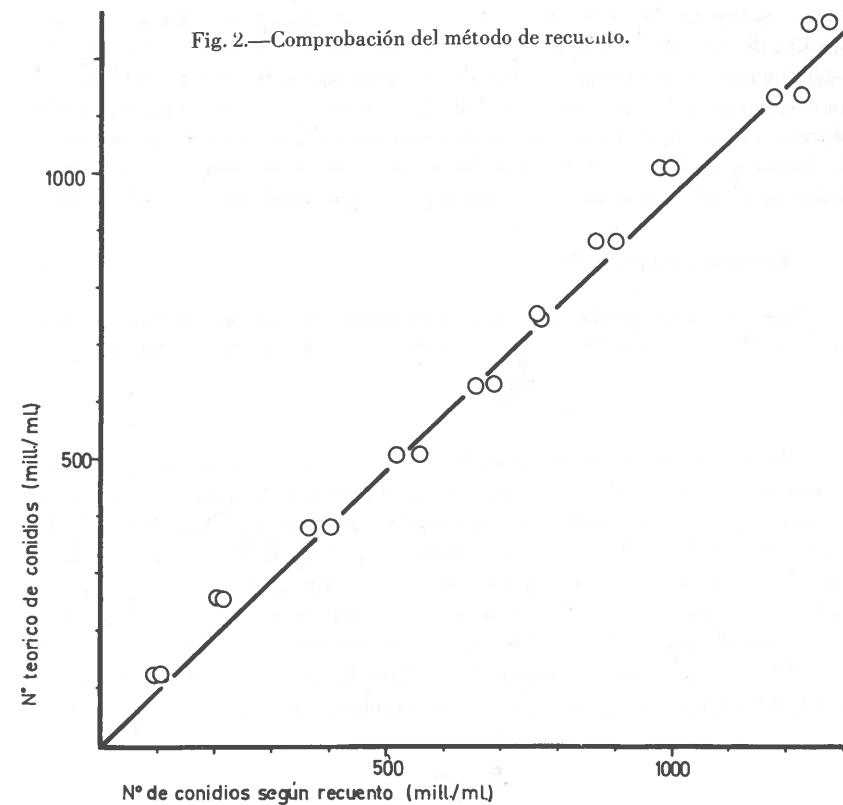


Fig. 2.—Comprobación del método de recuento.

9.—Micrometrías

Las mediciones al microscopio fueron efectuadas con un ocular micrométrico.

10.—Microscopías.

Frotis teñidos.—Las suspensiones de conidios o micelio en solución de ClNa o medio de cultivo fueron liberadas del medio de suspensión y lavados con agua, por centrifugación a 4.000 r. p. m. en la centrífuga clínica. Se prepararon frotis que se fijaron a la llama y se tiñeron con solución de azul de metileno (0,3 gr. azul de metileno + 30 ml. de alcohol del 98 % + 100 ml. de Na OH 0,01 %). Este fue el procedimiento que resultó más eficaz. El lactofenol, ampliamente utilizado con los hongos, ha dado resultados poco satisfactorios.

Frotis sin teñir.—Las observaciones microscópicas del micelio aéreo de este hongo se efectuaron en cultivos en portaobjetos, preparados al efecto del siguiente modo: Sobre una placa de Petri en cuyo interior se dispusieron dos trozos de varilla de vidrio que sirvieran de soporte del portaobjetos, se vertieron 20 ml. de una solución acuosa de glicerina al 20 %. Sobre un portaobjetos esterilizado a la llama, se colocó un cuadrado de 1,5 cms. de lado, de agar malta con el 7,5 % de ClNa cortado estérilmente de una placa de Petri; se sembraron los bordes del mismo con una suspensión de conidios; el cuadrado de agar, se cubrió con un cubreobjetos; el portaobjetos así preparado se colocó sobre las varillas de vidrio de la placa de Petri con la solución de glicerina y se incubó a 25 C efectuándose observaciones microscópicas periódicas del desarrollo del micelio.

11.—Microfotografías

Las microfotografías han sido realizadas en un microscopio Ernst-Leitz «Ortholux», con una cámara «Orthomat» de la misma marca.

12.—Obtención de micelio

Micelio cultivado en profundidad.—Salvo expresamente indicado, para la obtención de micelio cultivado en profundidad, se procedió de la siguiente manera: Se sembraron erlenmeyer de 500 ml., con 100 ml. de medio de cultivo de VAISEY que contenía el 7,5 % de ClNa, con una suspensión de conidios obtenida según 6. Se procuró que la concentración de conidios en el medio, no fuera superior a 35 millones/ml. Los erlenmeyer fueron incubados a 25°C y 230 agit./min. durante 18 horas.

Micelio cultivado en superficie.—Para la obtención de micelio cultivado en superficie, se procedió, en la siembra, como para el micelio cul-

tivado en profundidad. Los erlenmeyer sembrados fueron incubados a 25°C y 230 agit./min. durante diez horas aproximadamente y a continuación fueron retirados a la cámara de incubación, donde fueron incubados en reposo a la misma temperatura durante unos tres días. Al cabo de este tiempo, el micelio se había desarrollado en la superficie y progresado su esporulación.

II-2.2.—BIOQUIMICOS

II-2.2.1.—Composición química básica

II-2.2.1.1.—Residuo seco

a) *Preparación de las muestras.*—Para las determinaciones de residuo seco, se prepararon las muestras del siguiente modo:

Conidios.—Los conidios, obtenidos según II-2.1.6., contienen abundantes gránulos de almidón, por lo que las suspensiones obtenidas fueron sometidas al siguiente procedimiento de purificación: Se centrifugaron a 1.700 × g.. Los conidios, que constituyan la fracción menos densa en las centrifugaciones y que forman una capa de color marrón oscuro, se retiraron con ayuda de una espátula. La masa así obtenida se extendió sobre papel de filtro y se prensó suavemente a mano para eliminar el agua intersticial. El peso de la pasta en estas condiciones se consideró como peso «fresco».

Micelio.—El micelio, obtenido según II-2.1.12, fue sometido al procedimiento antes descrito para la eliminación del agua intersticial.

b) *Técnica.*—Se pesaron tres muestras del material así obtenido, en cápsulas de porcelana previamente taradas, y se mantuvieron durante toda la noche en la estufa a 100-110 C. Al final de este período se retiraron, se dejaron enfriar en un desecador sobre Cl₂Ca, y se pesaron de nuevo una vez alcanzada la temperatura ambiente; el peso así obtenido es el considerado como residuo seco.

2.—Cenizas

Para las determinaciones de ceniza, se obtuvo primero el residuo seco, del que se incineraron luego tres alícuotas en crisolitos de porcelana previamente tarados, que se mantuvieron de 15-30 minutos sobre la resistencia al rojo del baño Retotherm, con lo que se logra una combustión perfecta.

3.—Extracto lipídico

Para las determinaciones de extracto lipídico se utilizaron también muestras previamente desecadas. Se efectuaron dos extracciones mediante

ebullición a reflujo durante dos horas, con 25 ml. de disolvente por gramo de peso. El disolvente utilizado en la primera extracción fue una mezcla de etanol del 99 % (Alcoholera Española) y acetona 1 : 1 (v/v). Para la segunda extracción, se acidificó el disolvente con 1 % de ClH concentrado (Probus r.a.). Los extractos combinados se liberaron de disolventes bajo corriente de N. (Oxígeno y Acetileno de León).

4.—Proteínas.

Las determinaciones de proteína efectuadas a lo largo de este trabajo, se realizaron siguiendo el método de determinación de Nitrógeno de JOHNSON (JOHNSON, 1941).

Reactivos utilizados:

- Ácido sulfúrico conc. (Probus r.a.)
- NaOH 4 N. (Probus r.a.)
- Reactivos de Nessler (véase pág. 43)
- Agua oxigenada de 30 vols. (Foret)

(Estos reactivos fueron preparados según se indica en la confección de la gráfica standard).

Técnica.—De la suspensión o solución de proteína problema se pipetaron en el fondo de cada uno de tres tubos de ensayo perfectamente limpios, una cantidad adecuada de muestra (10-100 microgramos de nitrógeno). Se prepararon dos blancos con 0,2 ml. de agua destilada. Los tubos se secaron a la estufa a 100-110 C (3-5 horas) y una vez secos se digirieron a la llama de un mechero de Bünsen con 0,2 ml. de ácido sulfúrico concentrado; se trataron a continuación con 2-3 gotas de H₂O₂ de 30 vols. (o las gotas necesarias hasta que el digerido quedase transparente e incoloro), se añadieron 4,8 ml. de agua desionizada, se agitaron, y se adicionaron finalmente 3 ml. de NaOH 4 N. y 2 ml. de reactivo de Nessler. El contenido se homogeneizó perfectamente después de cada operación y se midió luego la absorbancia a 490 milimicras. El color amarillo que se desarrolla tras la adición del reactivo Nessler, es estable durante no menos de un día.

Los valores que figuran en las tablas, se obtuvieron refiriendo las lecturas a una gráfica standard, preparada con albúmina, del modo siguiente:

Confección de la gráfica standard

Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado (Probus r.a.)
- NaOH 4 N (Probus r.a.).

—Reactivos de Nessler: (4 gr. IK (Probus r.a.) + 4 gr. I₂ Hg (Probus r.a.) + 1,75 gr. de goma arábiga (Schuchardt) + agua destilada hasta volumen de 1 litro).

Se disolvió primero el IK en unos 200 ml. de agua destilada. Se añadió y disolvió el I₂Hg y finalmente se adicionó la goma arábiga, que se disolvió a ebullición.

—Agua oxigenada de 30 volúmenes (Foret).

—Solución standard de albúmina de huevo.

Se pesaron 312,5 mgrs. de albúmina de huevo (B.D.H.) y se disolvieron en 100 ml. de agua destilada. Para facilitar la disolución se alcalinizó con dos o tres gotas de NaOH 1 N. De esta solución original se prepararon 10 tubos con diferente concentración de N, de acuerdo con la Tabla 2.

Técnica.—Se utilizó la técnica de digestión descrita anteriormente (pág. 42). Las determinaciones se efectuaron por triplicado con 0,2 ml. de muestra. Con los valores hallados (véase la Tabla 2) se confeccionó la gráfica de la Fig. 3.

TABLA 2

Confección de la gráfica standard, para las determinaciones de proteína por el método de Johnson.

Tubo N. ^o	Solución original (ml.)	Agua destilada (ml.)	mgrs.	prot./ muestra ¹	E ₄₉₀	m ²
0	10	0	0,626	0,76 - 0,94 - 0,82		
1	9	1	0,563	0,81 - 0,86 - 0,88		
2	8	2	0,501	0,74 - 0,78 - 0,70		
3	7	3	0,438	0,66 - 0,65 - 0,67		
4	6	4	0,375	0,58 - 0,50 - 0,48		
5	5	5	0,313	0,41 - 0,45 - 0,40		
6	4	6	0,250	0,32 - 0,32		
7	3	7	0,188	0,24 - 0,22 - 0,23		
8	2	8	0,125	0,14 - 0,20 - 0,14		
9	1	9	0,063	0,06 - 0,06 - 0,07		
10	0	10	0			

¹ Cada tubo contenía 0,2 ml. de solución.

² Las lecturas corresponden a cada uno de los tubos de cada dilución.

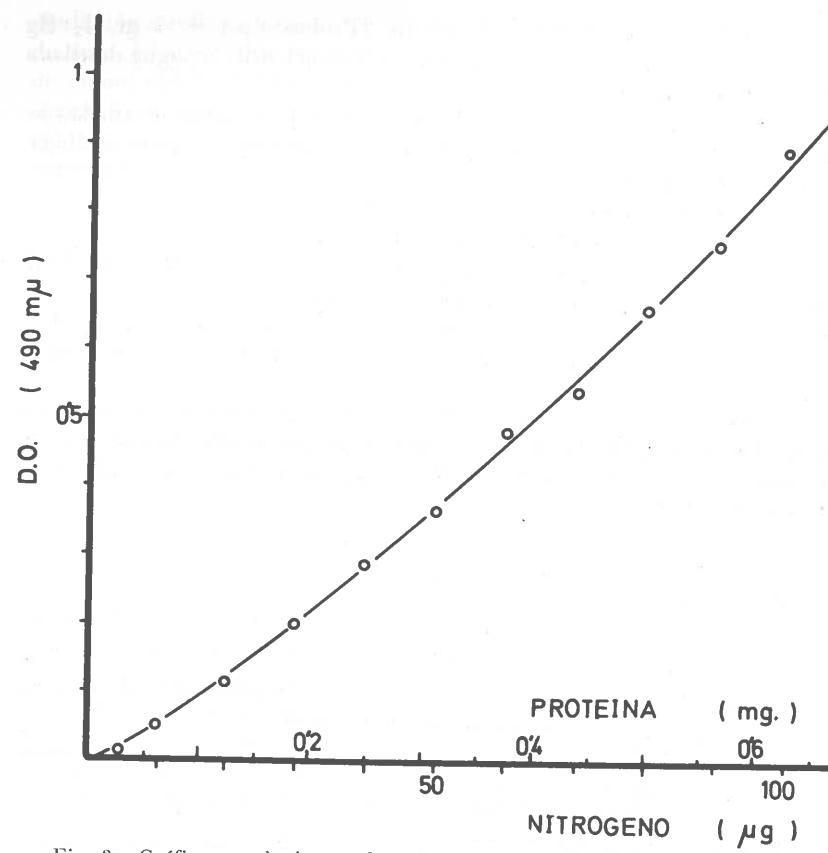


Fig. 3.—Gráfica standard para las determinaciones de proteína por el método de Johnson.

5.—Hidratos de carbono

Las cifras de hidratos de carbono, han sido halladas por diferencia entre los valores correspondientes de las determinaciones de proteína, extracto lipídico y cenizas.

2.2.2.—Substancias de interés en la cadena respiratoria

2.2.2.1.—QUINONAS

Preparación de disolventes

a) *Preparación de éter etílico (E.e.).*—El éter etílico fue deshidratado (1) y liberado de peróxidos (2) inmediatamente antes de su empleo.

(1).—Deshidratación: La deshidratación se efectuó manteniéndolo sobre alambre de sodio (Schuchardt), preparado por extrusión en una prensa, hasta que cesara la producción de burbujas.

(2).—Liberación de peróxidos: Se efectuó destilando E.e. deshidratado, sobre limaduras de hierro reducido (Schuchardt).

b) *Preparación de éter de petróleo de 40°-60°C (E/P).*—Se preparó por destilación fraccionada de gasolina-éter (C. A. M. P. S. A.), utilizando una columna de Hempel, con una camisa de vacío recubierta de un baño de mercurio, externamente aislada con amianto y rellena de anillos de Rasching. La prueba espectrofotométrica del producto obtenido, puede verse en la Fig. 4.

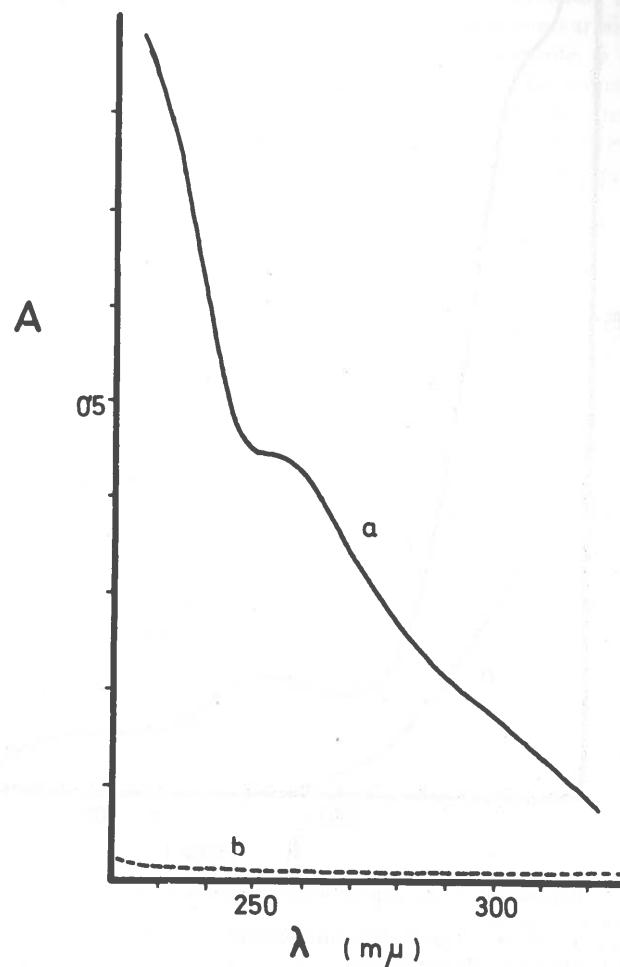


Fig. 4.—Espectros ultravioleta del éter de petróleo (40-60°C) utilizado, Referencia = ciclohexano para espectrofotometría.

(a) Espectro de la gasolina-éter de procedencia.

(b) Espectro del éter de petróleo (40-60 C) obtenido a partir de ella, por destilación.

c) *Preparación de alcohol etílico espectrofotométricamente puro.*— El etanol empleado en todos los registros espectrofotométricos, fue previamente purificado por el siguiente procedimiento: Se hirvió a reflujo durante 6 horas, 2 litros de etanol absoluto (comercial, de la Alcoholera Española) con 80 grs. de NaOH (probus r.a.), y 20 grs. de zinc en polvo (Schuchardt) o granalla, destilándose a continuación.

Véase en la Fig. 5 la pureza espectrofotométrica del alcohol así preparado.

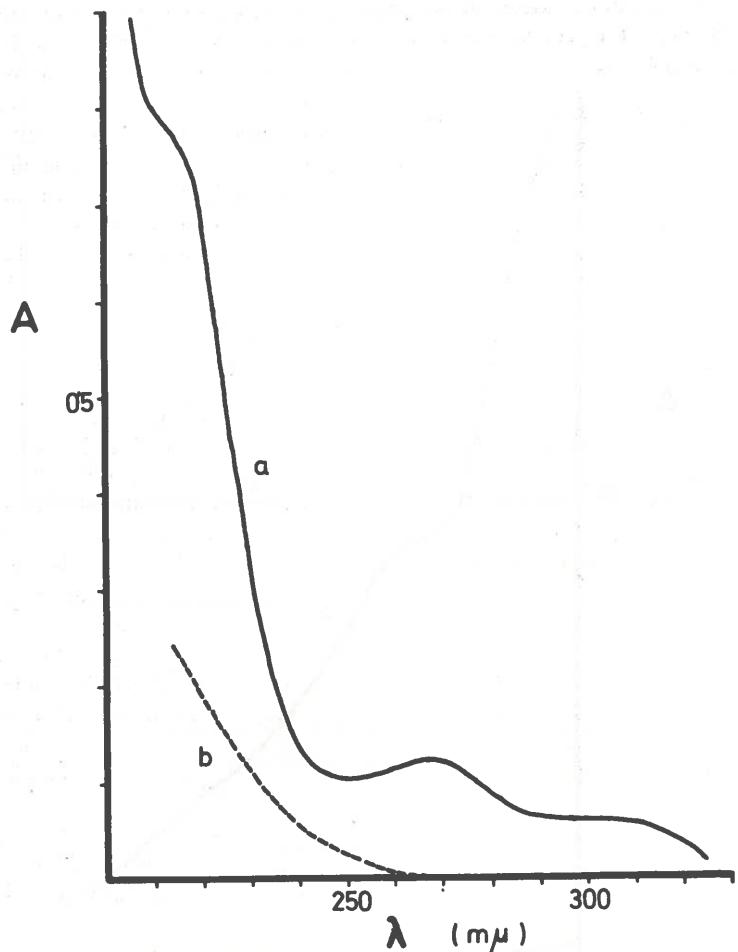


Fig. 5.—Obtención de etanol espectrofotométricamente puro.
Referencia = agua.

- (a) Espectro del etanol antes de la purificación.
- (b) Espectro del etanol purificado.

d) *Purificación de ciclohexano para espectrofotometría.*—El ciclohexano empleado en espectrofotometría se purificó siguiendo una modificación al método empleado por B. VAN DER VEN y A. P. JONGE (1957), para la preparación de éter de petróleo espectrofotométricamente puro. Para ello se hirvieron a reflujo, durante 7 horas, una mezcla de 10 : 1 : 1 (v/v) de ciclohexano (Schuchardt), ácido sulfúrico concentrado (Probus r.a.), y nítrico fumante, (Probus r.a.); se separó el agente de nitración en un embudo de separación y se lavó dos veces el ciclohexano con un décimo de su volumen de agua destilada en un embudo de decantación y ocho veces con 1/10 de su volumen de una solución al 20 % de KOH (Probus q.p.). Se sometió seguidamente a una destilación fraccionada utilizando una columna de Vigreux; se agitó después con carbón activado. El carbón se eliminó luego por centrifugación durante 5 minutos a 1.500 × g, y se pasó el ciclohexano, primero por una columna de gel de sílice (Merck), y después, por otra de alúmina (Merck); finalmente se redestiló fraccionadamente con ayuda de una columna de Vigreux.

Véase en la Fig. 6 la pureza espectrofotométrica del producto así obtenido.

Cromatografías de adsorción.

a) *Preparación de las placas.*—Las placas de vidrio para la cromatografía se lavaron previamente con detergente en caliente («Teepol»), se aclararon con agua del grifo y agua desionizada y se secaron a 100-105°C en la estufa. Una vez lavadas y secas se extendió sobre ellas una capa de gel de sílice para chromatografía en capa fina (Merck), del siguiente modo: Se pesaron 30 gr. de gel de sílice, se pasaron a un erlenmeyer de 150 ml. con tapón esmerilado, y se les añadió 60 ml. de agua desionizada. Se agitó unos momentos hasta la formación de una pasta bien homogénea (sin grumos) y se extendió una capa de 250 micras de espesor sobre las placas de vidrio previamente preparadas y dispuestas en el soporte de extensión. Se dejó que se evaporara parte del agua con objeto de no estropear la lámina durante su manipulación y se secaron durante 30 minutos a 100-105°C en la estufa. Las placas secas se guardaron hasta su empleo en un desecador, sobre Cl₂Ca.

b) *Colocación de la muestra.*—Con ayuda de un capilar o pipeta micrométrica, se depositó sobre la placa la muestra disuelta en E.P., formando una pequeña mancha, procurando no dañar la superficie de la misma.

c) *Desarrollo de la chromatografía.*—Inmediatamente después de colocada la muestra, se depositaron las placas en el tanque conteniendo cloroformo (Schuchardt) - benceno (Schuchardt), 1 : 1, recubriendo las paredes del mismo con papel de filtro empapado en estos solventes.

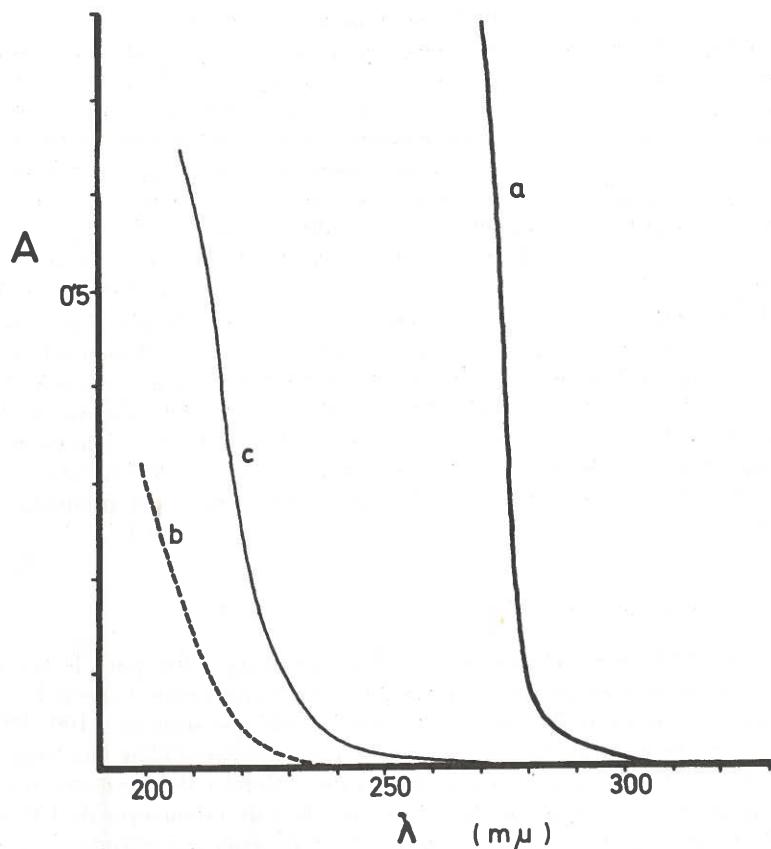


Fig. 6.—Preparación del ciclohexano espectrofotométricamente puro.
 (a) Espectro del ciclohexano q.p.
 Schuchardt, del que se partió.
 (b) Id. del ciclohexano purificado.
 (c) Id. del ciclohexano espectrofotométricamente puro, Merck.

Cromatografías de partición en fase invertida

a) *Impregnación de las placas.*—Se prepararon placas por el procedimiento descrito en la pág. 47; se introdujeron verticalmente, con el extremo en que iba a colocarse la muestra hacia abajo, en una bandeja que contenía 5 % de parafina líquida (Schuchardt) en E. P. (60-80°C) (véase pág. 49), sumergiendo el extremo inferior aproximadamente 1 cm. Se inclinó lentamente la placa con la lámina de gel de sílice hacia abajo, hasta que la parafina llegase al extremo superior de la placa. Se retiró la placa des-

pués, invirtiendo el proceso y se dejó secar a temperatura ambiente unos 60 segundos.

b) *Colocación de la muestra.*—Se efectuó disuelta en ciclohexano como se describe en la pág. 47.

c) *Desarrollo.*—Se efectuó con una mezcla de acetona (Probus r.a.) agua, 95/5 (v/v).

d) *Revelado.*—Se efectuó por pulverización de una solución de leuco-azul de metileno (preparado añadiendo 1 ml. de ácido acético glacial (Probus r.a.) a 250 mgrs. de polvo de Zn (Probus r.a.), a 5 ml. de una solución al 0,02 % de azul de metileno (Merck) en acetona. Las quinonas se hacen inmediatamente evidentes como una mancha azul. Poco después se obscurece toda la placa.

Cromatografías en columna de alúmina

a) *Preparación de la columna.*—Se pesó una determinada cantidad de alúmina (Merck) y se vertió en un mortero que contenía éter de petróleo de 40-60°C (véase pág. 44). Se añadió la cantidad de agua necesaria para ajustar la actividad del adsorbente al grado III de Brockmann y se homogeneizó con objeto de lograr la perfecta distribución del agua. La alúmina así preparada se vertió, con más éter de petróleo, sobre la columna cromatográfica adecuada a la cantidad de alúmina requerida.

—En las operaciones subsiguientes, tanto la muestra, como las fracciones obtenidas de la cromatografía, fueron protegidas de la luz con objeto de evitar la fotodestrucción de las quinonas.

b) *Colocación de la muestra.*—Las muestras a cromatografiar, se disolvieron en una pequeña cantidad de éter de petróleo (40-60°C) y se depositaron cuidadosamente sobre la superficie del lecho cromatográfico, protegido por una altura de 1-2 cms. de éter de petróleo.

c) *Desarrollo de la cromatografía.*—Una vez depositada la muestra, se desarrolló con series eluotrópicas constituidas por mezclas de éter etílico seco y libre de peróxidos (véase pág. 45), y éter de petróleo de 40-60°C. (Pág. 45).

Cálculo de la cantidad de ubiquinona presente en las muestras.

La cantidad de ubiquinona presente en las muestras, purificadas por los procedimientos cromatográficos descritos, se efectuó por el método de CRANE (CRANE, 1959) basándose en el E_{275} de la ubiquinona y ubiquinol, para lo que primero se obtuvieron los espectros de las muestras disueltas en etanol y luego las de las mismas tras la adición de unos cristalitos de borohidruro potásico. Para el cálculo del contenido en Q₉, se utilizó un

$E^{1\%} = 275$ de 158. (CRANE 1965).
 1 cm.

2.2.2.2.—CITOCROMOS Y FLAVINAS

Sonicaciones

Se efectuaron en suspensiones del micelio en tampón fosfato. El recipiente de la sonicación fue refrigerado durante la operación con una mezcla de hielo picado y agua. La molaridad del tampón, el pH, los volúmenes de sonicación y demás detalles, fueron diferentes, en muchos casos y los datos figuran en el capítulo de resultados.

Trituraciones

El micelio que estaba congelado, se permitió que descongelase en tampón fosfato y a continuación se homogeneizó con un homogeneizador de paletas, durante 30 minutos.

Las trituraciones se realizaron en suspensiones de tampón fosfato y los datos figuran en las respectivas experiencias.

Diálisis

Las diálisis se realizaron en la cámara fría a 0-5º C. Durante las mismas, el líquido de la diálisis se mantuvo en agitación con agitadores magnéticos. Los detalles de cada caso figuran en las descripciones de las experiencias.

Concentraciones

Se efectuaron conectando un matraz de fondo redondo, con la muestra, a un aparato de liofilización conectado a una bomba de alto vacío (Fig. 7). El matraz se introdujo en un baño «Büchi» termostatado a 20º C, y fue agitado manualmente durante la operación. La formación de espuma se controló reduciendo el vacío del sistema mediante una pinza. La bomba se protegió colocando una mezcla de nieve carbónica, obtenida a partir de balas de CO₂ seco, con un pastillero «McLeod» y acetona comercial (RAMIFER).

Cromatografías de filtración molecular

a) *Preparación de la columna de «Sephadex G-100».*—El Sephadex se preparó, antes de ser depositado en la columna, de la siguiente manera: Se pesaron 4 gramos de Sephadex G-100 y se suspendieron en 1 litro de agua desionizada. Se dejó que el Sephadex se hidratase durante tres días, cambiando tres veces el agua y eliminando así simultáneamente las partículas más finas. El material así preparado se depositó en una columna cromatográfica «Sephadex K 15/90», verticalmente dispuesta (en la cá-

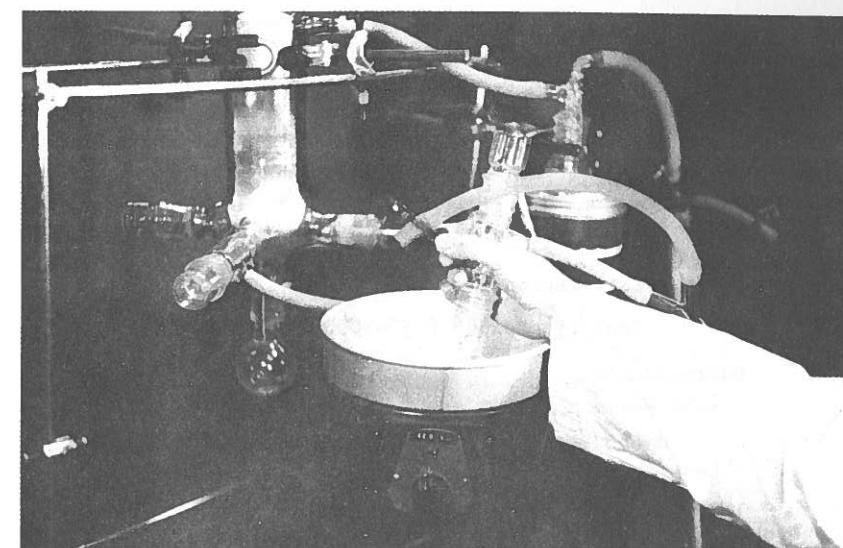


Fig. 7.—Dispositivo empleado en las concentraciones de volumen.

mara fría a 0-5º C con la ayuda de una plomada. Se formó un lecho de 27 cms. de altura que se dejó equilibrar toda la noche por elución con tampón fosfato de pH 7,5, 0,5 M.

b) *Determinación del volumen vacío de la columna.*—Con objeto de determinar el «volumen vacío» de la columna, una vez equilibrada, y no disponiendo de dextrano azul (Sephadex) para su determinación por los métodos standard, se inició la preparación de glucógeno hepático. Su molécula (p.m. 1-2 × 10⁶) debe ser excluida por el Sephadex G-100 y puede detectarse con facilidad, por su turbidez, a la salida de la columna.

Preparación del glucógeno hepático: Para la preparación del glucógeno hepático se siguió el método descrito por CLARK (1964), de acuerdo con el protocolo de la Fig. 8. Se pesaron 10 gr. del hígado de un conejo, extraído del animal inmediatamente después del sacrificio, y se pasaron inmediatamente a un mortero frío que contenía 10 ml. de ácido tricloroacético (Probus r.a.) (ATC) al 10% y 0,5 grs. de arena lavada. Se trituró durante algunos minutos manteniendo el mortero en hielo y se centrifugó a 2.000 × g. durante 5 minutos. El sobrenadante se almacenó en el frigorífico; al depósito obtenido se le añadieron 10 ml. de ATC (Merck) al 5% y se centrifugó de nuevo 2.000 × g. 5 minutos. Se adicionó a los sobrenadantes reunidos, 40 ml. de etanol del 95% (Alc. Española). La mezcla se centrifugó de nuevo, para separar el precipitado blanco formado. El precipitado se disolvió fácilmente en 5 ml. de H₂O y se reprec-

pitó con 10 ml. de etanol del 95 %. El precipitado se separó por centrifugación durante 5 minutos a 2.000 \times g. El depósito se lavó con 3 ml. de etanol del 95 % y se centrifugó 5 minutos a 2.000 \times g., dos veces conse-

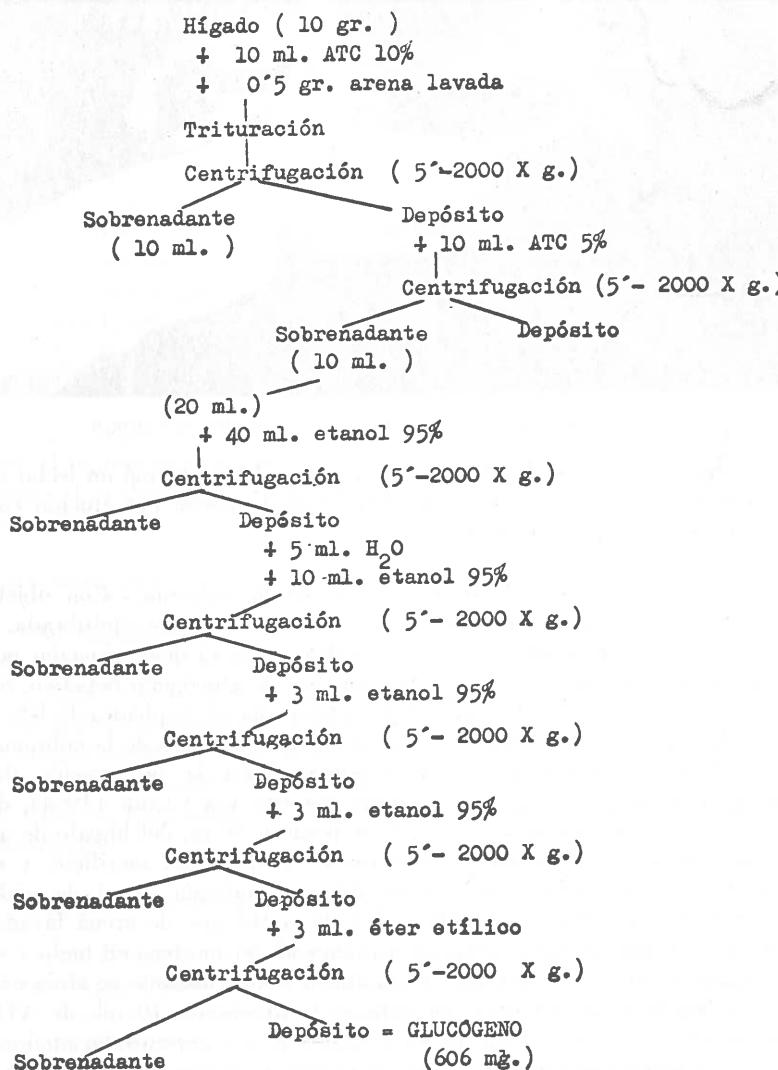


Fig. 8.—Marcha seguida en el aislamiento de glucógeno hepático. ATC = ácido tricloroacético.

cutivas. El depósito del segundo lavado se lavó con 3 ml. de éter etílico (Probus r.a.), se centrifugó de nuevo, y se secó al aire. Se aislaron así 606 mgrs. de glucógeno en forma de un polvo sumamente blanco, de esta última centrifugación.

Determinación del volumen vacío: Se tomó una pequeña cantidad de glucógeno (unos 50 mgrs.) preparado según se indica en el apartado anterior, y se disolvió en 2 ml. de agua desionizada. Al conjunto se le añadió sacarosa (Merck), para formar una solución muy densa. Cuando el tampón fosfato con que se equilibró la columna formaba una capa de unos 5 cms. sobre el lecho del Sephadex, se depositó cuidadosamente la solución de glucógeno, (con una pipeta capilar de punta curvada en ángulo recto, provista en su otro extremo, de un tubo de goma) inmediatamente por encima del Sephadex, bajo la capa de 5 cms. de eluyente. La muestra quedó así depositada sobre la superficie del gel, formando una capa claramente separada por su mayor densidad, del resto del líquido de la columna.

Se conectó luego el eluyente (tampón fosfato pH 7,4, 0,5 M), (Fig. 9), y el colector de fracciones, recogiéndose muestras de 2 ml. El glucógeno apareció en el tubo 5, con lo que el volumen vacío resultó ser de 10 ml.

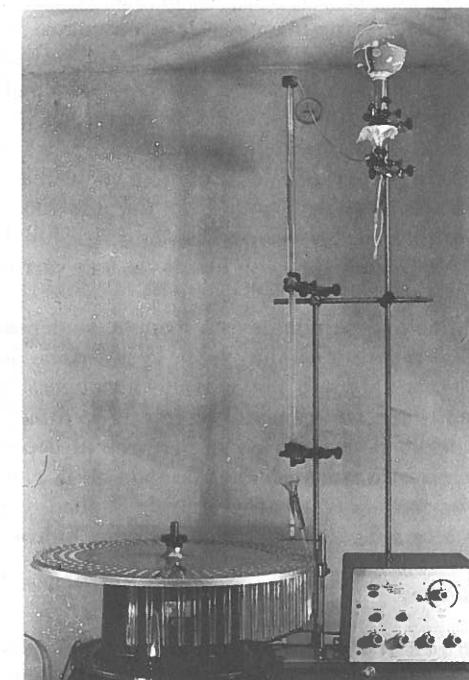


Fig. 9.—Dispositivo utilizado para las cromatografías de filtración molecular y las de intercambio iónico.

c) *Desarrollo de la cromatografía.*—Para el depósito de la muestra y el desarrollo de la columna se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación del «volumen vacío».

Cromatografías de intercambio iónico

Las chromatografías de intercambio iónico fueron realizadas sobre resinas DEAE-22 (Whatman). Las resinas se prepararon del siguiente modo:

Se pesaron 15 grs. de DEAE, se suspendieron en unos 400 ml. de ClH 0,5 N (Probus r.a.); 30 minutos después se decantó el sobrenadante y se lavaron las resinas con agua desionizada en un embudo de placa de vidrio filtrante, hasta que el pH del líquido eluyente se aproximó a 4. Se trataron luego las resinas con unos 400 ml. de NaOH 0,5 N. (Probus r.a.), que se dejó actuar durante 30 minutos. Al término de esta operación se decantó el sobrenadante y se lavó la celulosa con agua desionizada, en un embudo de decantación, hasta pH 8.

Para equilibrar las resinas al pH deseado, se lavaron en una probeta con tampón fosfato de pH 7,4, 1M., hasta que el pH del sobrenadante alcanzó un valor de 7,4 y finalmente se lavaron cuatro veces con tampón fosfato de pH 7,4 de la molaridad a que se deseaba equilibrar. Al término de esta operación, se eliminó la mayor parte del sobrenadante manteniéndose un volumen de unos 100 mls. que se vertieron en la columna de chromatografía dispuesta verticalmente en la cámara fría a 0-5°C. como se ha descrito para la chromatografía de filtración molecular. Se conectó el tampón de la elución y se dejó equilibrar durante toda la noche.

Una vez equilibradas las resinas, se colocó sobre la superficie del lecho un disco de papel de filtro con ayuda de una varilla de vidrio y un tapón de corcho perforado.

Sobre la columna preparada de esta manera, se depositaron las muestras con ayuda de una pipeta capilar, sobre la superficie del papel de filtro sobre el que se había colocado previamente una ligera capa del tampón utilizado para equilibrar las resinas. Por este procedimiento se logra que la superficie del lecho de resinas no se perturbe al depositar la muestra.

Colocada la muestra, se conectó el tampón de la elución mediante el dispositivo descrito para las chromatografías de Sephadex. La columna preparada tenía una altura de 50 cms., y una columna hidrostática de 30 cms.

Espectros diferenciales

Los espectros diferenciales (citocromo reducido - citocromo oxidado) fueron obtenidos siguiendo la técnica de CHANCE y WILLIAMS (CHANCE y WILLIAMS, 1955), colocando en la cubeta de referencia la muestra que iba a ser oxidada, y en la de muestra la que iba a ser reducida.

Las oxidaciones, cuando fueron necesarias, se realizaron añadiendo a la muestra, en la cubeta, una gotita de una solución de ferricianuro potásico (Merck) al 0,5 % y las reducciones con una pequeña cantidad de ditionito (Merck) (2-5mgrs.).

Cálculo de los citocromos presentes en la muestra

El cálculo de los citocromos presentes en la muestra, se efectuó por el método de WILLIAMS JR. (1964), adoptando un $E_{1\text{ cm}}^1$ para (550-535 m μ) en el espectro diferencial, obtenido, según se ha descrito antes, de 21.000.

Cálculo de las flavinas

Las flavoproteínas se calcularon también a partir del espectro diferencial (oxidado-reducido), adoptando un valor de $E_{1\text{ cm}}^1$ (465-510 m μ) = 11.000, que es el habitualmente aceptado para las partículas respiratorias de mamíferos (CHANCE y WILLIAMS, 1955).

2.2.3.—Preparación de tampones

Los tampones utilizados en la presente tesis, fueron todos de fosfato potásico, de distintas concentraciones y pH, y fueron calculados de acuerdo con las tablas publicadas por GOMORI (1946).

Cuando fue necesario se ajustó el pH con ayuda de un pH-metro mediante la adición de más PO₄K₂ ó PO₄HK.

II.2.2.3.—Determinaciones manométricas.

La mayor parte de las determinaciones manométricas del presente trabajo han sido efectuadas midiendo el consumo de O₂ por el «método directo» (UMFREIT, BURRIS y STAUFFER, 1964) en un respirómetro de WARBURG, cuyas constantes fueron calculadas al efecto.

La respirometría es un método de análisis, basado en la ecuación de los gases perfectos $\frac{P \times V}{T} = \frac{P' \times V'}{T'}$, consiste en la medida de la cantidad de gas consumido o liberado en un sistema cerrado de volumen constante, a partir de los cambios de presión introducidos en el mismo.

En la práctica el sistema cerrado está constituido por unos matracitos (matracitos de Warburg) de volumen variable (12 ml. aproximadamente), unidos herméticamente a la rama cerrada de un manómetro que contiene un líquido especial (líquido de Brodie).

Se utiliza el líquido de Brodie en lugar del mercurio, por ser mucho menos denso que éste y mucho más sensible, por tanto, a los cambios de presión. Este líquido que es acuoso, contiene un detergente para disminuir el posible error introducido en las lecturas por la tensión superficial y un colorante para facilitar las mismas.

Es evidente que la presión desarrollada en diversos sistemas cerrados, por la introducción de un volumen constante de un gas determinado, dependerá del volumen del citado sistema. Si éste consta además de dos fases, líquida y gaseosa, habrá que tener en cuenta la tensión de vapor del líquido que compone una de las fases y la solubilidad en el mismo de la fase gaseosa. Con objeto de corregir todas estas variables, se utiliza la siguiente ecuación:

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

K es una constante

V_g = volumen de la fase gaseosa

T = Temperatura de ensayo

P_0 = presión normal expresada en milímetros

V_f = volumen de la fase gaseosa

α = constante de solubilidad del gas que se mide, a la temperatura del ensayo.

Como el volumen de cada sistema matraz-manómetro es distinto, la constante K es específica de cada uno de ellos y recibe el nombre de «constante del matraz». Esta constante dependerá por lo tanto, como puede apreciarse en la fórmula I, de la temperatura T y de los volúmenes de las fases líquida (V_f) y gaseosa (V_g) implicadas.

Para el cálculo de esta constante es preciso averiguar el volumen total (V_t) del matraz y manómetro hasta la división de 150 mm.; las demás variables se conocen de antemano, o pueden calcularse con facilidad a partir de V_t .

3.1.—Determinación de V_t

Se efectuó por el método del calibrado con mercurio en el que se obtiene la medida exacta del volumen total del sistema (matraz + manómetro hasta la división de 150 mm.) basándose en el peso del mismo, relleno de mercurio. Se utiliza el mercurio y no el agua por la gran densidad del metal, lo que facilita la pesada.

Se procede con cada matraz y su manómetro correspondiente, de la siguiente forma:

a) Se coloca el tubito tapón y escape de gases del recipiente lateral, en la posición de cerrado; se sujetó con una goma. Se vierte el mercurio en el matraz hasta aproximadamente la mitad del cuello, de forma que al aplicarlo al manómetro, el nivel llegase hasta las divisiones más próximas al matraz. Se marca el nivel alcanzado por el mercurio en el manómetro y una vez retirado éste se determina la temperatura del mercurio en el propio matraz y el peso en un vaso de precipitados previamente tarado. El volumen del sistema constituido por el matraz y la porción del manómetro situado entre éste y la marca efectuada, se obtuvo dividiendo el peso por la densidad del mercurio a la temperatura registrada.

b) Se repitió la operación anterior, en esta ocasión con el mercurio necesario para alcanzar las divisiones más lejanas del manómetro.

c) Se restaron los dos volúmenes obtenidos en los cálculos de (a) y (b), y se dividió la diferencia por el número de divisiones (milímetros) que separaban los niveles alcanzados por el mercurio en la rama del manómetro en las dos operaciones anteriores. El valor obtenido, volumen correspondiente a cada división del manómetro, se multiplicó por el número de divisiones que separaba el nivel alcanzado por el mercurio en (a), de la división de 150 mm. El volumen total del sistema constituido por el matracito y el manómetro hasta la raya de 150 mm. se obtuvo sumándole al valor obtenido en (a) el valor de (c). Con este valor y el de V_f , se obtuvo V_g ($V_g = V_t - V_f$).

3.2.—Cálculo de la constante

La constante del sistema matraz-manómetro hasta la división 150 mm. se calculó mediante la fórmula de la pág. 56, substituyendo en ella V_t y V_g por los valores obtenidos según se ha descrito, P_0 por su valor, 10.000, y T por la temperatura a que se efectuaron los ensayos (273 + 25) K.

3.3.—Medida del consumo de O_2 - Método «directo» de Warburg.

Este ha sido el procedimiento empleado en todas las respirometrías efectuadas a lo largo del presente trabajo. Se denomina así porque los experimentos se llevan a cabo de forma que las lecturas efectuadas en el manómetro representan únicamente los cambios de presión introducidos por el consumo de O_2 , ya que el CO_2 producto final de la respiración, se anula al quedar este gas captado por la disolución de KOH ó NaOH al 20 %, colocada en el pocillo central.

Temperatura: Los ensayos se efectuaron siempre a 25 C.

Volumen de la fase líquida: Fue en todos los casos de 3 ml.

Los consumos de gas se miden por la diferencia de presión entre las dos ramas del manómetro; sobre la rama abierta actúa la presión atmos-

férica que puede cambiar en el transcurso del experimento, por lo que se hace imprescindible corregir los efectos de sus fluctuaciones, introduciendo en el ensayo, un manómetro, el «termobarómetro» (T-B), que corrige también las imprecisiones introducidas por las posibles fluctuaciones de la temperatura del baño durante la experiencia.

El «termobarómetro» se introdujo en el baño con idéntica cantidad de tampón y agua que los matraces de ensayo.

Técnica.—Las suspensiones enzimáticas (células enteras, triturados, o fracciones celulares) se mantuvieron refrigeradas con hielo picado, hasta su distribución en los matraces. En el pocillo central se colocaron 0,2 ml. de KOH al 20 % y sobre su borde superior se extendió una ligera capa de lanolina. Se introdujeron a continuación los reactivos correspondientes en el compartimiento lateral y luego los del compartimiento principal. En todos los casos fue pipetada en último lugar la suspensión enzimática. Finalmente se introdujeron en el pocillo central un papelito de filtro de 2 × 2,5 cms., plegado en forma de acordeón. Se cerraron los compartimientos laterales con sus tubitos respectivos previamente engrasados, y se conectaron los matraces a sus correspondientes manómetros. Se colocaron los respirómetros y el termobarómetro en el aparato de Warburg y se sometieron a 144 agitaciones por minuto. Se mantuvieron así 10 minutos para lograr equilibrar las fases.

Se detuvo la agitación, se enrasó la columna de la rama interna de cada manómetro a 150 mm., se cerraron las llaves de paso y se tomaron las lecturas correspondientes en la rama externa. Se reinauguró la agitación, y generalmente se mantuvieron así los respirómetros unos 10 minutos para comprobar que no se producían cambios significativos en las lecturas manométricas; se detuvo la agitación, se sacaron uno a uno los diversos respirómetros y se volcó el contenido del compartimiento lateral, que se lavó dos o tres veces con el del compartimiento principal, con un cuidadoso movimiento de vaivén. Se volvieron los matraces al baño, se puso de nuevo en marcha el sistema de agitación y se fueron anotando los niveles alcanzados por las columnas externas de todos los manómetros a intervalos de tiempo determinados (1-20 minutos) de acuerdo con las circunstancias concurrentes en cada caso, para lo que se detuvo la agitación y se enrasaron las ramas internas a 150 mm.

Se calcularon las cantidades de O₂ consumido, al tiempo «t», mediante las ecuaciones:

$$X_t = A_t - A_0$$

$$B_t = A_t - A_0$$

$$C_t = B_t - X_t$$

$$D_t = C_t - K_{O_2}$$

siendo:

A₀ = lecturas en la rama del manómetro en el tiempo 0 min.

A_t = lecturas en la rama del manómetro en el tiempo «t».

B_t = milímetros de descenso de la columna manométrica en el tiempo «t».

X_t = Aumentos (+) o descensos (-) de la columna del termobarómetro en el tiempo «t» con respecto al tiempo 0 min.

C_t = descenso de la columna del manómetro en el tiempo «t» corregida para los cambios experimentados en la columna del T-B en el mismo tiempo (presión, temperatura).

D_t = Cantidad de O₂ consumido durante el tiempo «t», en μl .
K_{O_2} = Constante de cada matraz para medida de consumo de O₂

Véanse en la Fig. 10 el protocolo utilizado, y los cálculos efectuados en un experimento de este tipo.

TABLA 3

Técnicas manométricas utilizadas para las determinaciones de las diversas actividades enzimáticas en el respirómetro de Warburg

Actividad Enzimática	Compartimento principal	Pocillo central	Compartimento lateral
— Respiración endógena	Suspensión enzimática + tampón fosfato	0,2 ml. de KOH a 20 %	
— Glucosa-oxidasa	» »	» 0,3 mls. glucosa 0,3 M.	
— Succinato-oxidasa	» »	» 0,3 mls. succinato 0,3 M.	
— Malato-oxidasa	» »	» 0,3 mls. malato 0,3 M.	
— α -cetoglutarato-oxidasa	» »	» 0,3 mls. α -cetoglutarato 0,3 M.	
— Fumarato-oxidasa	» »	» 0,3 mls. fumarato 0,3 M.	
— Citrato-oxidasa	» »	» 0,3 mls. citrato 0,3 M.	
— Parafenilendiamina-oxidasa	Suspensión enzimática + 0,3 mls. de P. P. D. 0,186 M. + (P. P. D.-ox.)	» 0,2 mls. de ascorbato sódico 1 M.	

¹—Salvo expresamente indicado, las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M.

— El volumen de la fase líquida (V_f) fue siempre de 3 mls.

— La temperatura de los ensayos fue siempre de 25 C. y los manómetros fueron agitados a 144 agitaciones/minuto.

TABLA 3
(Continuación)

Actividad Enzimática	Compartimento principal	Pocillo central	Compartimento lateral
— Succinato-deshidrogenasa	Suspensión enzimática + tampón fosfato + 0,1 ml. cianuro potásico 0,3 M. 0,1 ml. succinato potásico 1 M.	0,2 mls. de KOH al 20 %	0,1 ml. metasulfato de fenazina
— Citocromo-oxidasa	Suspensión enzimática + tampón fosfato + 0,3 ml. citocromo c (6×10^{-4} M.)	»	0,3 ml. ascorbato sódico 0,1 M.

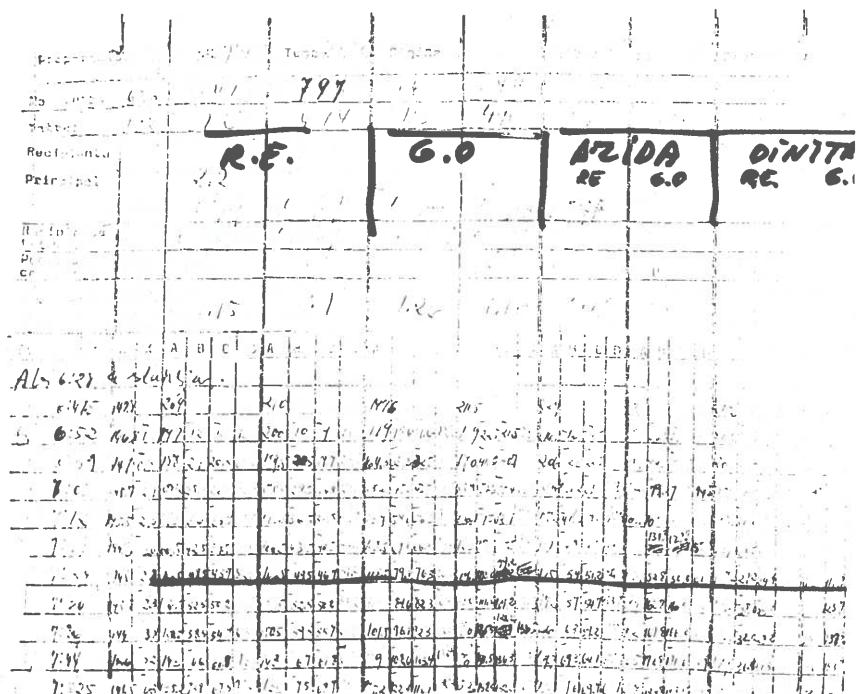


Fig. 10.—Ejemplar de hoja de protocolo empleada para los registros manométricos.

— 60 —

3.4.—Técnicas para la determinación de las diversas actividades enzimáticas.

Véanse en la Tabla 3, las actividades enzimáticas determinadas, los tampones y reactivos utilizados, y la técnica seguida para cada determinación.

3.5.—Cálculo de las actividades enzimáticas

Tanto las actividades enzimáticas como los efectos producidos por los inhibidores, se determinaron por el consumo de O_2 registrado por los procedimientos descritos.

En virtud de las dificultades impuestas por la respiración endógena, en ciertos casos, se registró el consumo de oxígeno durante un período inicial de 15-30 minutos, sin substratos ni inhibidores, al cabo del cual, se comprobó el efecto sobre las pendientes de las «curvas de consumo», obtenidas representando el oxígeno consumido (Δt) en función del tiempo (t) (véase pág. 58). En otras ocasiones, el consumo del substrato y el efecto de los inhibidores se calcularon por diferencia entre las pendientes de las «curvas de consumo» de los matraces sin substrato ni inhibidores, de los que tenían unos u otros.

Los valores que figuran en las tablas y que representan velocidades de consumo de O_2 , se han obtenido del valor de la pendiente de la «curva de consumo» o de la tangente a la misma en un punto determinado.

CAPITULO III

III.—ALGUNOS ASPECTOS BIOLOGICOS BASICOS DEL HEMISPORA STELLATA

III-1.—Introducción

Existen algunos estudios en torno al *Sporendonema epizoum* relativos a sus temperaturas óptimas de desarrollo, intervalo de pH, fuentes de nitrógeno e hidratos de carbono utilizables por el mismo, concentraciones óptimas de ClNa para su crecimiento en profundidad con agitación y aireación, color del micelio desarrollado en medios sólidos, resistencia a las radiaciones ultravioleta, tamaño y forma de sus esporas, así como también sobre la inhibición de su crecimiento por formalina, propionato sódico, ácido ascórbico, nitritos, etc. (FRANK y HESS, 1941a, 1941b; HJOR-JANSEN 1939; BOYD & TARR, 1954; VAISEY 1954 a, b, c).

El confusionismo que reina en la taxonomía de los hongos agrupados en el género *Sporendonema*, (véase en la pág. 33), y la evidente diversidad

de las numerosas cepas clasificadas por CIFERRI y REDAELLI como *Sporrendonema epizoum* (FRANCK y HESS, 1941b), hacen imposible deducir de los datos bibliográficos existentes, cuáles corresponden al microrganismo originalmente denominado *Hemispora stellata*. No se poseen más datos realmente aplicables a éste, que los contenidos en las publicaciones de VUILLEMIN (1906 y 1931), y en la de CIFERRI y REDAELLI (1934). En lo que a la morfología y morfogenia se refiere, existe entre estos autores una clara divergencia de criterios.

El interés que en sí mismo tiene el esclarecimiento de las características biológicas básicas de cualquier microorganismo y la necesidad de lograr el sistema más útil para la cómoda obtención de un material abundante y relativamente homogéneo con que llevar a cabo los experimentos tendientes a aclarar el mecanismo del transporte de electrones de este hongo, estimuló el planteamiento de los experimentos descritos en este capítulo.

2.—Material, metodología y productos

2.1.—Microorganismos.

Se partió de una cepa de *H. stellata* en tubo inclinado de agar malta, suministrado por el «Centra albureau voor Shimmelcultures» (Baarn-Holanda), que se sembró en agar malta, agar malta con gelatina, medio líquido de VAISEY y medio de cultivo de salvado, por los procedimientos descritos en la metodología general.

2.2.—Observaciones microscópicas

Las observaciones microscópicas del micelio aéreo se realizaron en cultivos en portaobjetos, y las del micelio cultivado en profundidad, en extensiones teñidas (pág. 40).

2.3.—Microfotografías y micrometrías

Las microfotografías del micelio aéreo fueron realizadas «in vivo», y las del micelio cultivado en profundidad, previa tinción con azul de metileno.

Las determinaciones de tamaño se efectuaron por las técnicas de micrometría standard.

2.4.—Composición química básica.

Las determinaciones de proteína se realizaron previa digestión de las muestras, determinando el nitrógeno por el método de JOHNSON (1941) y refiriendo las lecturas a una gráfica patrón (véase pág. 39).

El contenido lipídico se calculó por extracción con metanol-acetona antes y después de la acidificación, según se indica en la página 41.

Las cenizas se determinaron por incineración y pesada (véase pág. 41).

3.—Resultados.

3.1.—Morfología y ciclo evolutivo.

Morfología.

La cepa de *H. stellata* con que hemos trabajado, crece en la superficie de las placas de agar malta formando colonias redondeadas y abultadas en forma de botones, de aspecto felposo y color marrón de tonalidad variable de acuerdo con las condiciones de cultivo, siendo más intenso cuanto menor es la concentración salina. La superficie de estas colonias, que en un principio es lisa, se vuelve rugosa a medida que envejecen, por unos plegamientos que se producen en sentido radial.

Estas colonias están formadas por filamentos, unidos a la masa de agar por un sistema de hifas, de 1-1,5 micras de grosor que se adentran en el mismo a modo de raíces, y que constituyen el soporte del micelio aéreo. El micelio aéreo está formado por una complicada trama de hifas profusamente ramificadas. En el extremo de algunas de ellas se observa el conidióforo, (Fig. 14) provisto de largas cadenas de esporas, generalmente redondeadas, de 1,5 micras de diámetro y de color marrón.

Las esporas o conidios, observadas «in vivo» al microscopio, a 675 aumentos, en los cultivos de agar malta, ofrecen un aspecto rugoso (Fig. 13) y su forma, que al principio es cilíndrica, va haciéndose más esférica a medida que progresa la maduración, por lo que la presencia de siluetas rectangulares en las extensiones teñidas, se debe probablemente a la existencia en las mismas de conidios, que se han desprendido del conidióforo en un estado más atrasado de maduración.

Ciclo evolutivo en medio de cultivo de agar malta.

El proceso germinativo posee características semejantes en ambos medios de cultivo, sólidos y líquidos, pero no así el desarrollo del micelio.

Las esporas sembradas sobre la superficie del agar, tras un periodo de incubación, (que varía de acuerdo con las condiciones de cultivo en el sentido en que puede verse en la pág. 68, que a 25°C en agar malta con el 7,5 % de ClNa es de 18-24 horas, se redondean por sufrir probablemente en adelgazamiento o pérdida de consistencia de su pared celular, que les permite sufrir un cambio de forma e incluso de tamaño (Fig. 15). En determinado momento se inicia en los conidios un crecimiento zonal, formándose una gema (Fig. 15, 10-12 h.), que al continuar el crecimiento

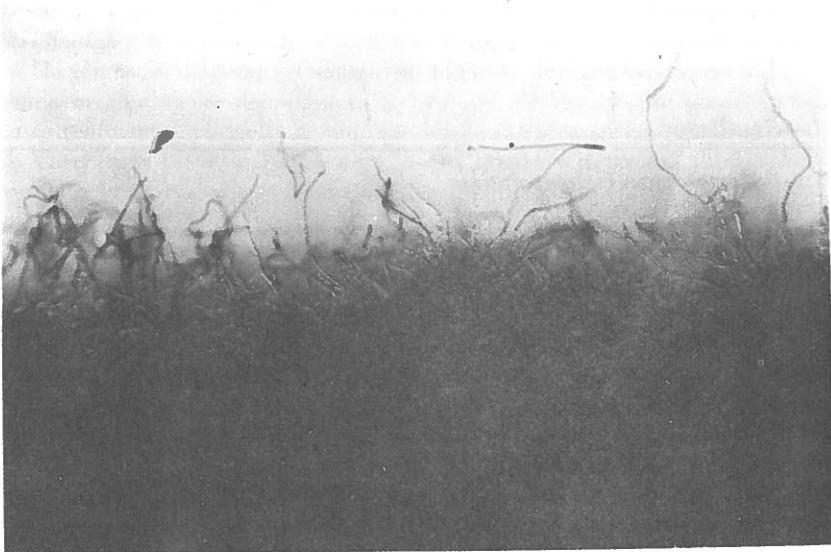


Fig. 11.—Micelio aéreo de un cultivo de *Hemispora stellata* en medio de agar málta. (136 X).

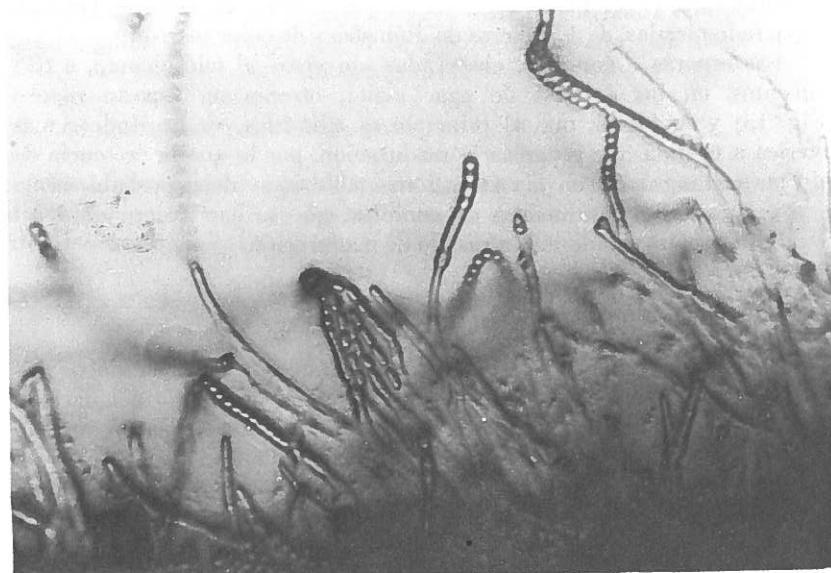


Fig. 12.—Micelio aéreo de un cultivo de *Hemispora stellata* en medio de agar málta. (685 X).

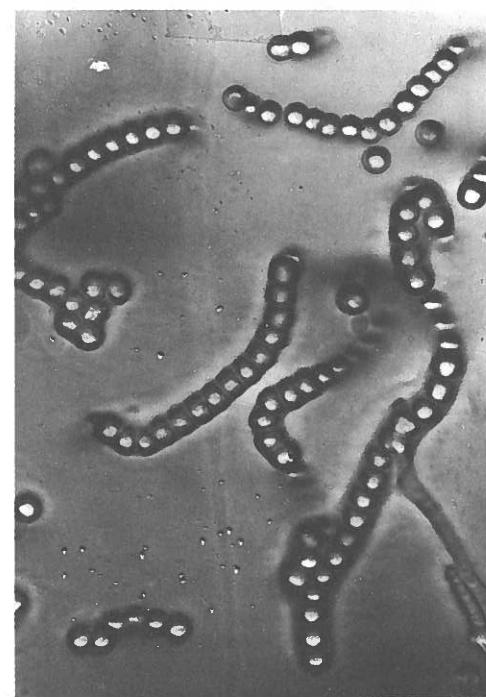


Fig. 13.—Conidios de *Hemispora stellata* (1360 X).

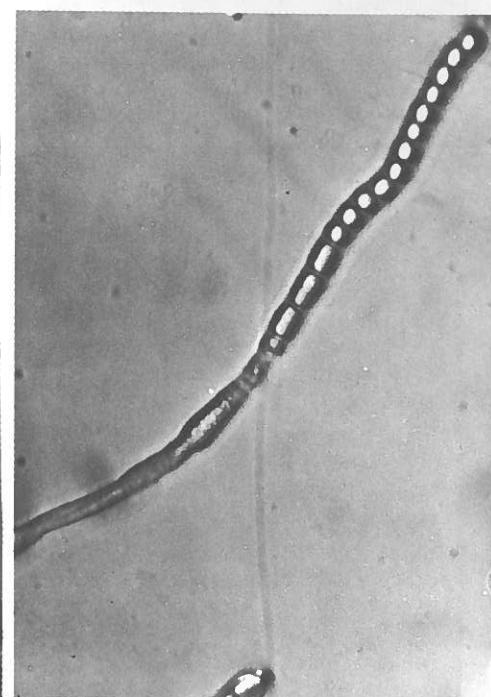
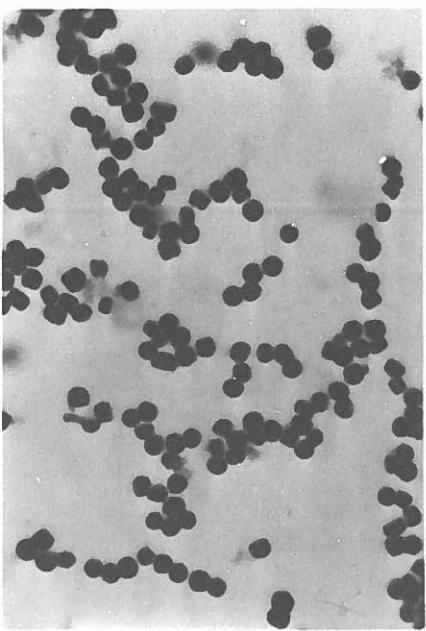


Fig. 14.—Conidióforo (1360 X).

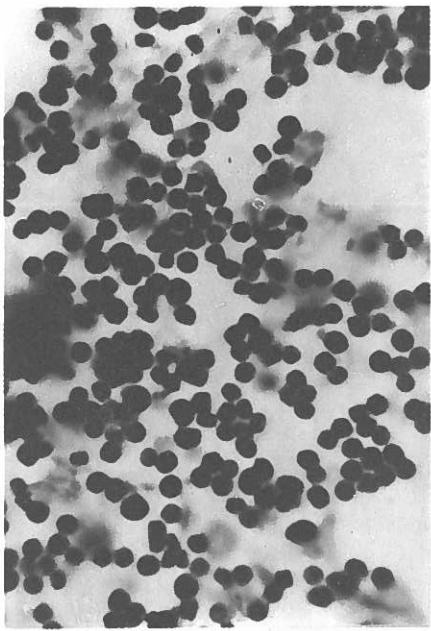
da lugar a la formación de un micelio incipiente que conserva todavía en su extremo basal el abultamiento del conidio que lo originó (Fig. 14-20 h.). Cuando la longitud del micelio llega a ser de unas 20 micras, se inicia la primera ramificación. Una de las dos hifas formadas crece hacia el interior de la masa del medio de cultivo, y la otra en sentido ascendente, dando lugar al micelio aéreo, que sufre a su vez múltiples ramificaciones.

El micelio aéreo está constituido por una trama de hifas ramificadas, de 1-1,5 micras de grosor, en las que puede observarse la presencia de septos cada 5-15 micras. En el momento de su desarrollo máximo, las hifas alcanzan una longitud de unas 300 micras.

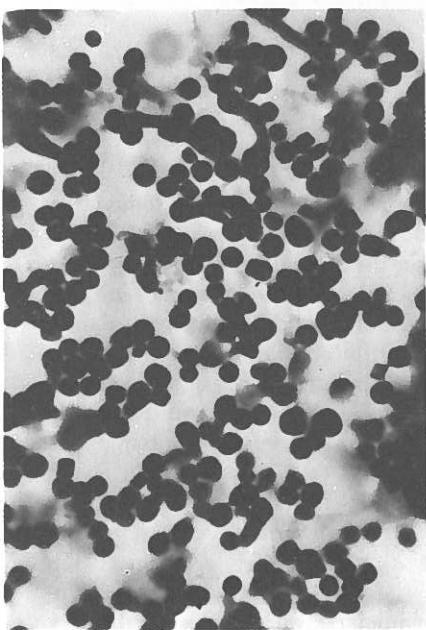
A las 48 horas de incubación se produce en un punto de la porción distal de algunas hifas una estrangulación y subsiguiente engrosamiento de la pared celular, que constituye el primer síntoma de la formación del conidióforo. A partir de este momento se van formando nuevas estrangulaciones en el conidióforo, que suele iniciarse en el extremo distal y progresan hacia la base del mismo, mientras el conidióforo continúa creciendo. La formación de conidios puede tener lugar inicialmente, sin em-



8 horas

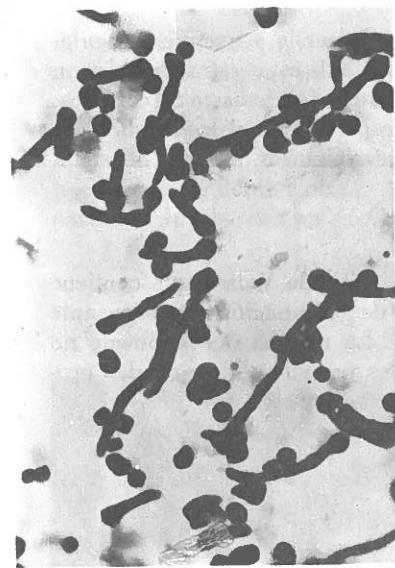


10 horas

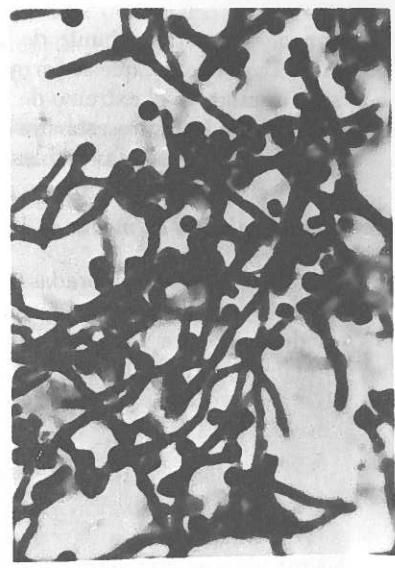


12 horas

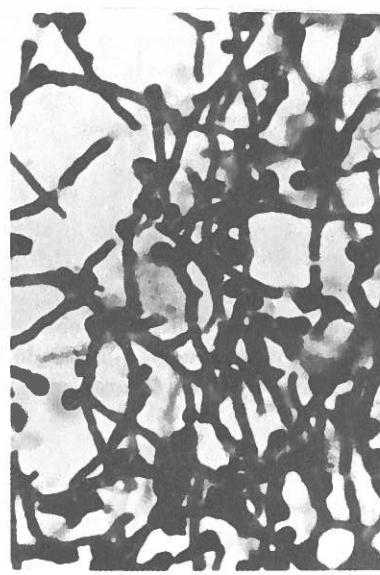
Fig. 15.—Germinación de esporas de *Hemispora stellata* cultivadas en medio de Vaisey. (1360 \times).
Concentración de ClNa 7,5 %.
Temperatura de cultivo 25 C.
230 agit./minuto.



16 horas



18 horas



20 horas

Fig. 16.—Germinación de esporas de *Hemispora stellata* cultivadas en medio de Vaisey. (1360 \times).
Concentración de ClNa, 7,5 %.
Temperatura de cultivo 25 C.
230 agit./minuto.

bargo, en cualquier punto de la hifa delimitada por la primera estrangulación. Las esporas, que se forman como resultado de estas estrangulaciones, se acumulan en el extremo de la hifa, formando series de hasta 50 conidios. Cuando los conidios están ya maduros se desprenden y, si las condiciones ambientales les son favorables, inician un nuevo ciclo.

Ciclo evolutivo en medio de Vaisey

Las esporas sembradas en medio de cultivo de Vaisey que contiene el 7,5 % de ClNa, experimentan un proceso de germinación muy semejante al descrito para los medios de agar malta. La marcha del fenómeno no funciona a igual ritmo en todos los casos; las variaciones que pueden producirse, se deben probablemente a factores no controlados (edad de las esporas, etc.).

Las esporas cultivadas en estas condiciones, adoptan, hacia las 6-10 horas, una forma redondeada, debido probablemente a un fenómeno de adelgazamiento de la pared celular. Hacia las 12 horas se forman las primeras gemas, y a las 14-18 horas, las primeras ramificaciones (véase Fig. 15).

El micelio en medio líquido continúa su crecimiento y ramificación y, hacia las 18-20 horas, comienza a acumularse en la pared del recipiente en agitación, en la zona apenas bañada por el medio de cultivo. Solamente allí, si no se destruye el micelio formado, se pueden observar, al cabo de 2-3 días, indicios de esporulación.

Micelio cultivado en superficie

Si a las diez horas de incubación, a 25 C y 230 agit. por minuto, de un cultivo de esporas en medio de Vaisey, que contiene el 7,5 % de ClNa, se suspende la agitación, se registra, a los 3-5 días de la siembra, un crecimiento abundante en la superficie, con claras muestras de esporulación.

Cultivos en agar gelatina

No licua la gelatina.

3.2.—Influencia de la concentración de ClNa sobre el crecimiento y esporulación en medio de agar malta.

Se prepararon seis lotes de tres placas de Petri con medio de cultivo «agar-malta», y distintas concentraciones de ClNa (0-3-7,5-9-12- y 15 %);

se sembraron con 0,5 ml. de una suspensión de conidios que contenía 300 millones / ml. y se incubaron 3 días a 25 C.

Como puede apreciarse en la Fig. 17, hubo crecimiento en todo el intervalo probado de concentración salina, aunque a 0, y 15 % el crecimiento es muy débil. Entre el 3 y el 9 %, es vigoroso. El desarrollo óptimo parece alcanzarse con un 7,5 % de ClNa.



Fig. 17.—Influencia de la concentración de ClNa sobre el crecimiento y esporulación en medio de «agar-malta».

3.3.—Influencia de la concentración de ClNa sobre la germinación en medio de Vaisey.

Se prepararon 15 erlenmeyer de 500 ml. con 100 ml. de medio de Vaisey, y se agruparon en lotes de 3 erlenmeyer. La concentración de ClNa en cada uno de los lotes se ajustó según se indica en la Tabla 4.

TABLA 4
Influencia de la concentración de ClNa sobre la germinación en medio de Vaisey

Incubación (horas)	GERMINACION (%)				
	Concentración de ClNa				
	2,5	5	10	15	20
7	11-14	0,8	0,7		
9		43-47-56	42-51	0,8	
11	48	73-76	86-89	42	
14	51	81	93	81	4
18	91	91		91	78
25					91
30					

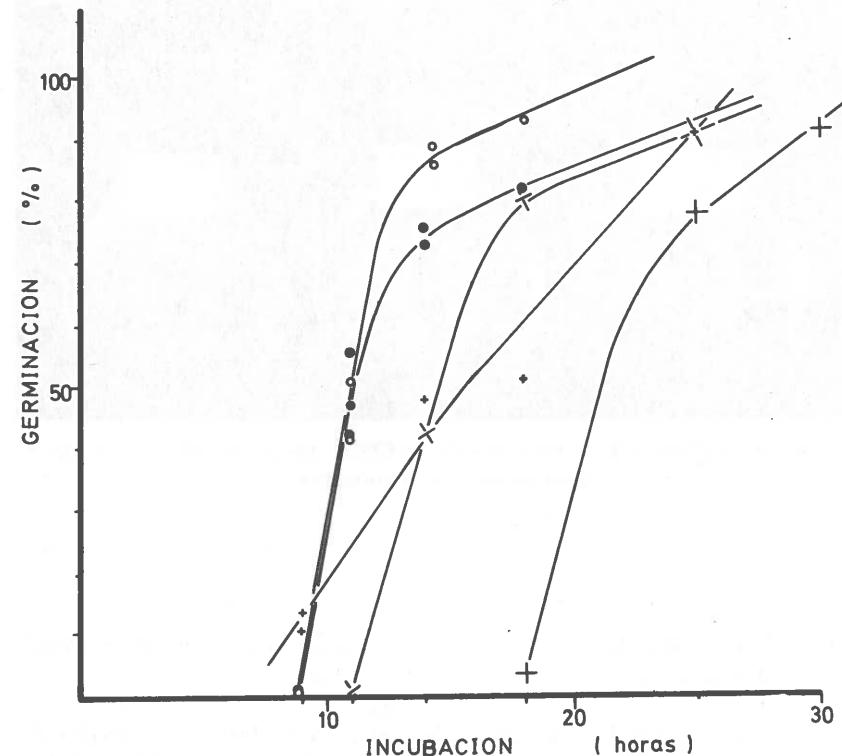


Fig. 18.—Influencia de la concentración de ClNa sobre la velocidad de germinación en medio de Vaisey.

— 70 —

Cada erlenmeyer se sembró con 130 millones de conidios y se incubaron a 25 C y 230 agit./min.

Se efectuaron recuentos periódicos de los conidios germinados y sin germinar, en muestras constituidas por la mezcla de tres alícuotas de igual volumen de cada uno de los recipientes componentes del lote. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4.

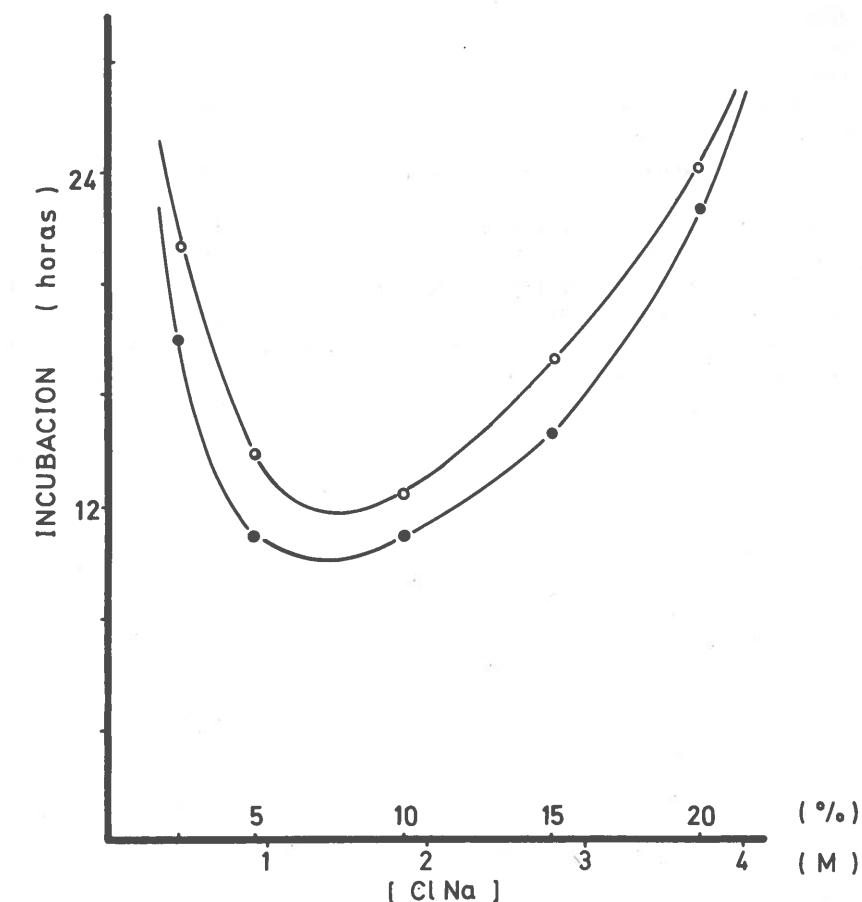


Fig. 19.—Influencia de la concentración de ClNa en el medio de Vaisey sobre la velocidad de germinación.

Tiempo necesario para la germinación del 50 %.

Tiempo necesario para la germinación del 75 %.

— 71 —

3.4.—*Influencia de la concentración de ClNa sobre la producción de conidios en medio de salvado.*

Se prepararon cinco lotes, de tres erlenmeyer (100 ml.) cada uno. En cada erlenmeyer se pusieron 3,75 grs. de salvado y 2,85 ml. de una solución de ClNa al 20, 15, 10, 5 y 0 % respectivamente. Cada erlenmeyer fue sembrado con 1 ml. de una suspensión de conidios que contenía 160 millones/ml., y se incubaron a 25 C.

A los tres días, se añadió a cada erlenmeyer, 50 ml. de una solución diluida de «Teepol», y se agitaron para suspender las esporas. La adición de «Teepol» se efectúa por haberse comprobado que facilita considerablemente el arrastre de las mismas.

Las suspensiones se filtraron a través de gasa y se mezclaron las de los erlenmeyer componentes del mismo lote.

Se tomó una alícuota de cada mezcla y se contó el número de conidios.

En la Tabla 5 figuran los resultados obtenidos. Las cifras de la segunda columna se hallan ajustadas para la dilución introducida por el inóculo de la siembra.

Con los datos de esta tabla se ha confeccionado la Fig. 20, que demuestra que el rendimiento máximo de esporas se obtiene humedeciendo el salvado con disoluciones de ClNa al 3,5 % aproximadamente, por lo que teniendo en cuenta la disolución habitualmente realizada por la siembra, se eligió para el posterior acopio de esporas, el método descrito en la página 35.

TABLA 5

Influencia de la concentración de ClNa sobre la producción de esporas en medio de salvado.

Erlenmeyer (N.)	ClNa (%)	Esporas millones/erlen.
1-2-3	0	4.090
4-5-6	3,7	1.020
7-8-9	7,4	7.300
10-11-12	11,1	5.600
13-14-15	14,8	4.450

3.5.—*Influencia del almacenamiento de las suspensiones de conidios en el frigorífico, sobre la germinación en medio de Vaisey.*

Se preparó una suspensión de conidios con 260 millones/ml.; que se mantuvo entre 0° y 5° C. a lo largo de todo el experimento.

Periódicamente se fueron sembrando dos erlenmeyer cada vez, de medio de Vaisey con 7,5 % de ClNa, utilizando un inóculo de 4 ml. de la citada suspensión. Los erlenmeyer así inoculados, se incubaron a 25 C y 230 agit./min. A las 13 horas de la inoculación, se tomaron al cuotas, se efectuaron recuentos de las suspensiones para determinar el porcentaje de germinación, y con ellos se ha confeccionado la Fig. 21 que representa el % de germinación en función del per odo de almacenamiento.

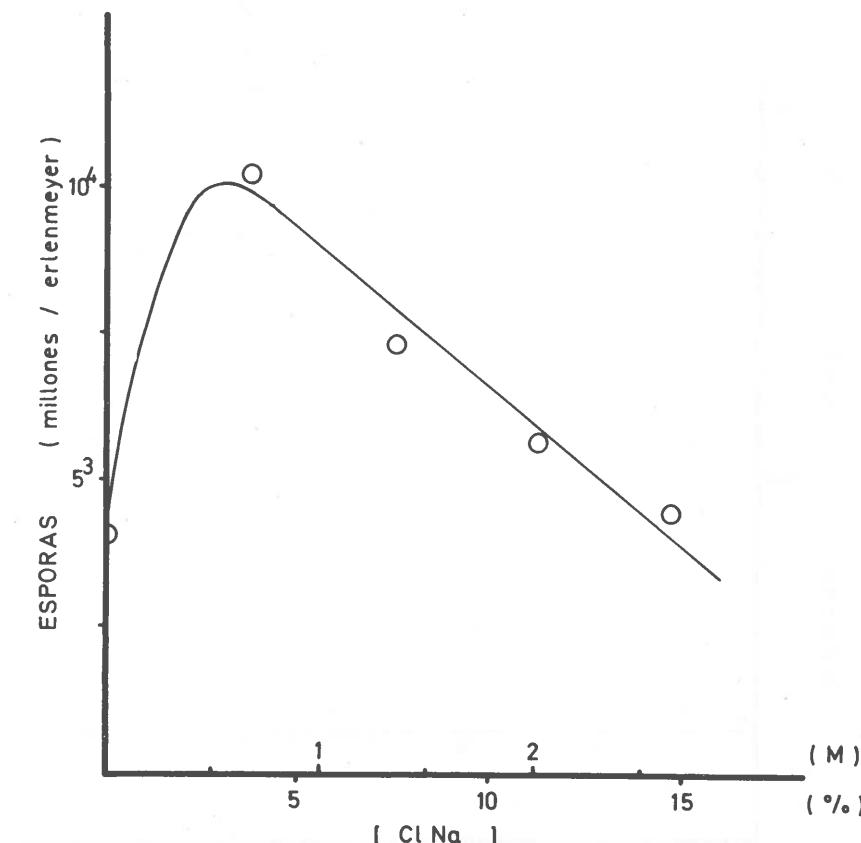


Fig. 20.—Influencia de la concentración de ClNa sobre el crecimiento y esporulación en medio de salvado.

Incubación = 3 días.

Temperatura = 25 C.

TABLA 6

Influencia del tiempo de almacenamiento de las esporas, sobre la germinación en medio de Vaisey

Almacenamiento (días)	Germinación (%)
1	16,2
4	17,5
9	12,6
16	11,9
21	13,6
25	14,8
36	17,0

— Temperatura de almacenamiento = 0 -5 C.

— Concentración de ClNa en el medio de Vaisey = 7,5 %.

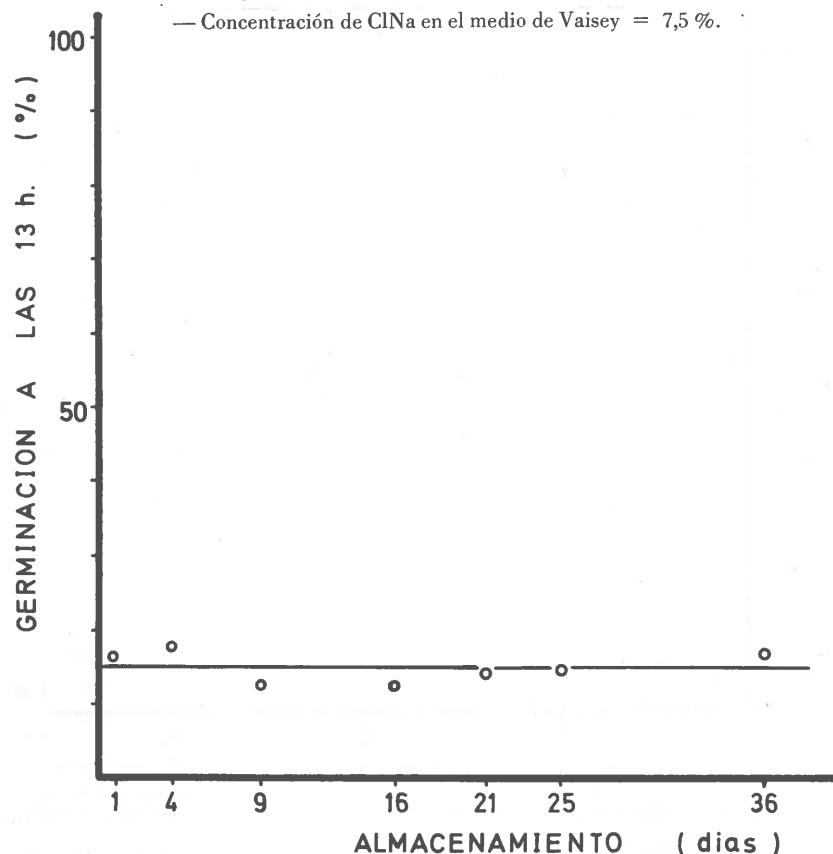


Fig. 21.—Influencia del tiempo de almacenamiento de las suspensiones de conidios sobre la germinación.

— Temperatura de almacenamiento = 0 -5 C.

— Concentración de ClNa en el medio de Vaisey = 7,5 %.

3.6.—*Influencia de la concentración de conidios en el medio sobre la velocidad de germinación.*

Se prepararon cinco erlenmeyer de 500 ml., con 100 ml. de medio de Vaisey, preparado con 7,5 % de ClNa. Se sembraron con cantidades crecientes de conidios que habían permanecido 14 días en el frigorífico (0-5 C). Los erlenmeyer sembrados, se incubaron a 25 C y 230 agit./min. A las 15 horas de incubación se efectuaron recuentos del número total de conidios, y del porcentaje de germinación.

En la Tabla 7 pueden verse los resultados obtenidos, y en la Fig. 22 la representación gráfica del porcentaje de germinación en función de la concentración de conidios.

TABLA 7

Influencia de la concentración de conidios en el medio sobre la germinación

Concentración de conidios (millones / ml.)	Germinación (%)
4,82	55,47
13,45	48,70
22,75	45,50
43,75	37,27
84,25	33,80

— Medio de Vaisey con el 7,5 % de ClNa.

— Recuentos efectuados a las 15 horas de incubación.

3.7.—*Comparación del proceso germinativo de los conidios obtenidos en placas de agar-malta y en medio de salvado.*

Se sembraron placas de Petri de agar-malta y erlenmeyer con medio de salvado, según se describe en la metodología general. Al cabo de tres días, se recogieron los conidios del salvado por el procedimiento standard, y de las placas de Petri inundándolas con una pequeña cantidad de agua estéril, y agitándolas suavemente por rotación.

Los conidios así obtenidos del salvado, y de las placas de Petri, se inocularon en erlenmeyer con medio de Vaisey (7,5 % de ClNa), que se incubaron a 25 C y 230 agit./min. (El inóculo fue en ambos casos de 3.000 millones de conidios/erlenmeyer).

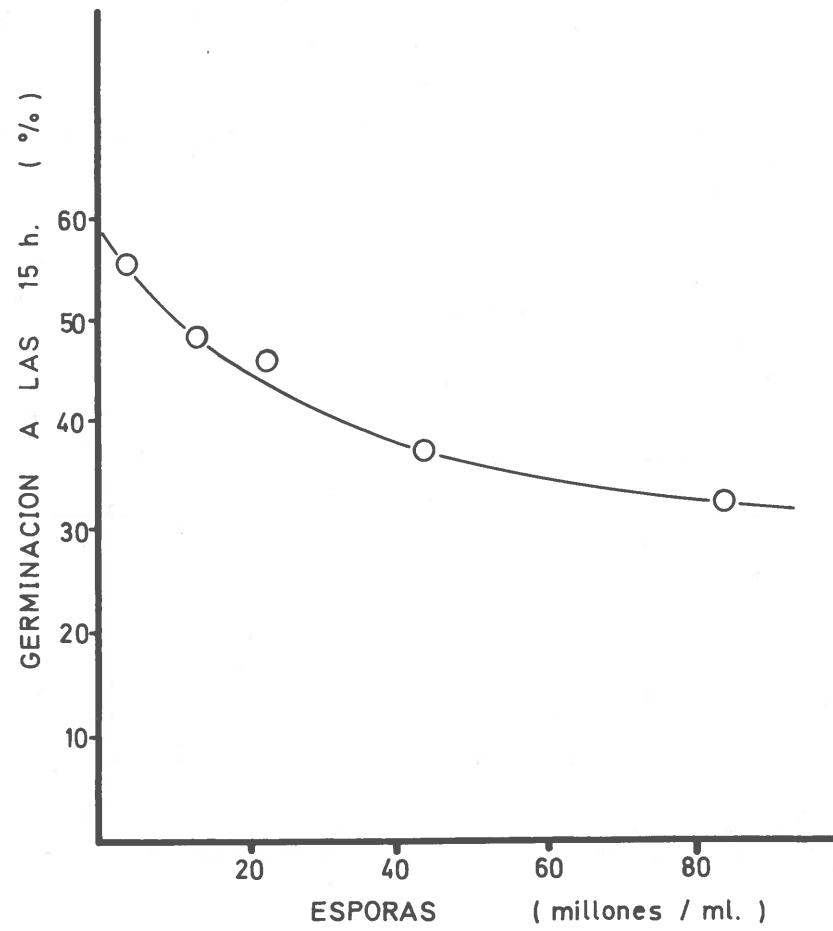


Fig. 22.—Influencia de la concentración de esporas en el medio de cultivo sobre la velocidad de germinación.

Se tomaron periódicamente alícuotas, en las que se determinaron los porcentajes de germinación.

Los datos obtenidos se representan gráficamente en la Fig. 23, donde puede observarse que los conidios crecidos en agar-malta germinan antes y de manera más uniforme.

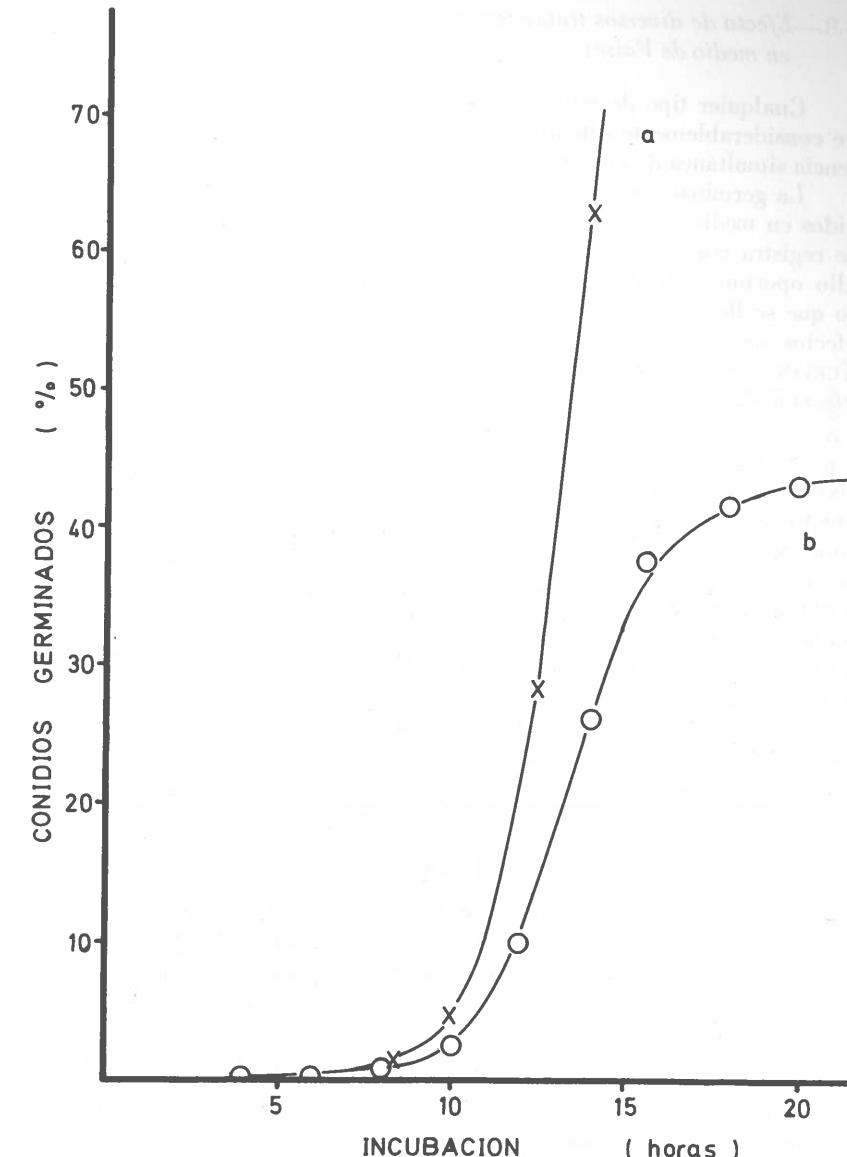


Fig. 23.—Comparación del proceso germinativo de conidios obtenidos en placas de agar malta, y de los obtenidos en medio de salvado.

a = Procedentes de agar-malta.

b = Procedentes de medio de salvado.

3.8.—Efecto de diversos tratamientos sobre la germinación de los conidios en medio de Vaisey.

Cualquier tipo de estudio fisiológico o bioquímico de los hongos, se ve considerablemente dificultado, en su aspecto cuantitativo, por la existencia simultánea de numerosos estados de desarrollo.

La germinación en medio de cultivo de Vaisey de los conidios producidos en medio de cultivo de salvado, es más lenta e irregular que la que se registra con los conidios producidos en agar malta. Se consideró por ello oportuno intentar una sincronización del proceso germinativo, para lo que se llevó a cabo la siguiente experiencia en la que se probaron los efectos de la congelación y el shock térmico, que como demostraron TURIAN y CANTINO (1959) sincronizan el desarrollo de *Blastocladiella emersonii*.

Se prepararon 5 lotes de 2 erlenmeyer de 500 ml., con 100 ml. de medio de cultivo de Vaisey con 7.5 % de ClNa, y se sembraron con una suspensión de conidios de 6 días que contenían 1015×10^6 conidios/ml. El lote «control» no recibió tratamiento alguno; el segundo lote se congeló a -20 °C y descongeló; el tercero se mantuvo durante 5 minutos agitando a mano en un baño de agua a 35 °C; el cuarto y quinto fueron sometidos por el mismo procedimiento a 50 °C y 70 °C respectivamente. Los tres lotes, sometidos a tratamiento térmico, fueron inmediatamente enfriados a 25 °C e incubados a 230 agit./min. a esta misma temperatura. Se tomaron, durante la incubación, muestras a diferentes tiempos y se efectuaron recuentos de conidios germinados.

Los resultados obtenidos se hallan en la Tabla 8 y Fig. 24.

TABLA 8

Efecto de diversos tratamientos de activación sobre la germinación de los conidios en medio de cultivo de Vaisey (7,5 % ClNa).

Lotes	Germinación (%)		
	13 : 45	Horas de incubación 15 : 50	17 : 00
Control	47,0	57,8	58,5
Congelado y descongelado a -20 °C	46,2	55,0	60,0
5 min. a 30 °C	62,4	65,2	65,7
5 min. a 50 °C	15,1	46,9	51,5
5 min. a 70 °C	1,1	1,0	0,6

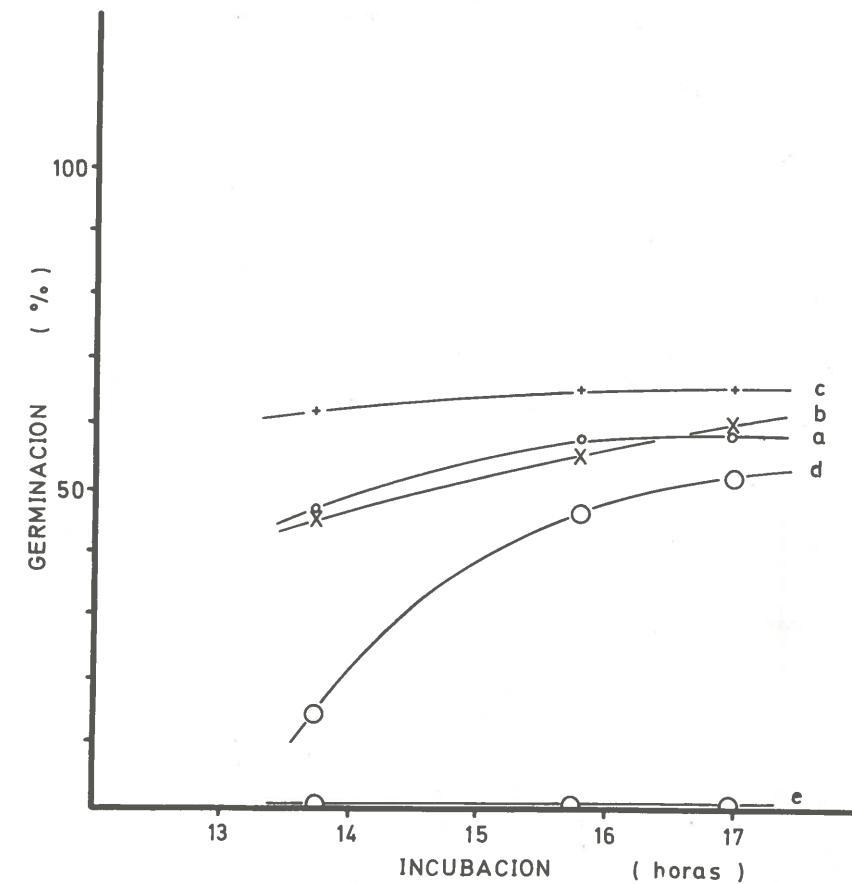


Fig. 24.—Efecto de diversos tratamientos de activación sobre la germinación de los conidios en medio de cultivo de Vaisey (7,5 % ClNa).

a = Control; b = Congelado y descongelado
a -20 °C; c = 5 min. a 30 °C; d = 5 min. a 50 °C; e = 5 min. a 70 °C.

A la vista de los resultados obtenidos, se concluyó que la congelación, lejos de activar, retrasaba la germinación de los conidios y no sólo no sincronizaba el fenómeno, sino que lo hacía más heterogéneo.

El tratamiento térmico a 75 °C durante 5 minutos inactiva totalmente a las esporas. El tratamiento a 55 °C aunque tal vez sincroniza algo la germinación, la retraza considerablemente, y el de 35 °C - 5 minutos, la acelera.

Para confirmar este extremo y aclarar si el crecimiento era o no sincronizado simultáneamente, se planteó otra experiencia.

* * *

Se sembraron dos lotes de 2 erlenmeyer de medio de Vaisey (7,5 % de ClNa) con un ml. de suspensión de conidios que contenía 2.486×10^6 conidios/ml. El primer lote se consideró como «control» y no recibió tratamiento alguno. El segundo fue sometido a incubación en un baño de agua a 35 °C durante 5 minutos. + después de este tratamiento, los erlenmeyer fueron enfriados a la temperatura ambiente (20 °C) antes de su incubación. La incubación se realizó a 25 °C y 230 agit./min., y se efectuaron recuentos de muestras extraídas de los erlenmeyer «control» y «muestra», a diferentes tiempos de incubación (véase Tabla 9 y Fig. 25).

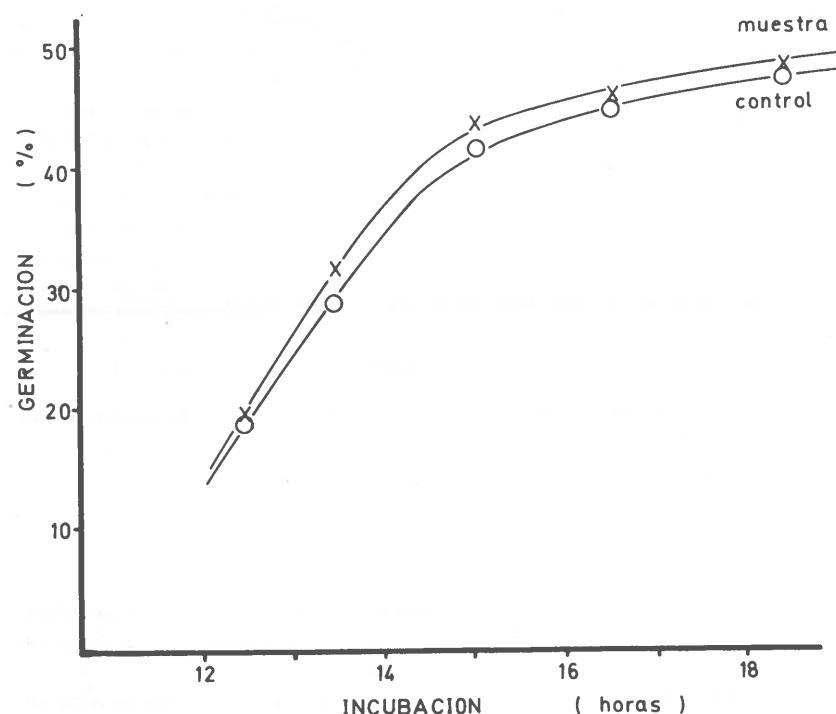


Fig. 25.—Efecto de la incubación a 35 °C durante 5 minutos, sobre la germinación de los conidios en medio de Vaisey (7,5 % ClNa).

— 80 —

Esta experiencia confirma la activación de los conidios por el tratamiento a 35 °C durante 5 minutos y sincroniza ligeramente el proceso. El efecto, es, sin embargo, tan poco marcado, que se consideró que no valía la pena utilizarlo experimentalmente.

TABLA 9
Efecto de la incubación a 35 °C durante 5 minutos sobre la germinación de los conidios en medio de Vaisey

Lote	Germinación (%)				
	Horas de incubación				
	12 : 25	13 : 25	15 : 00	16 : 35	18 : 25
Control	19,1	33,0	41,5	44,5	47,0
Muestra	19,4	34,2	43,5	46,0	48,2

Las cifras de la tabla indican la media aritmética de dos recuentos

—Composición química básica.

Se llevó a cabo un estudio de la composición química básica de los conidios, micelio cultivado en profundidad, y micelio cultivado en superficie. Se procedió primero a la obtención de residuo seco, y se efectuaron luego las determinaciones de cenizas, extracto lipídico y proteína, sobre al cuotas del mismo (véase la metodología general).

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 10.

TABLA 10
Composición química básica de conidios, micelio cultivado en profundidad, y micelio cultivado en superficie.

Residuo seco	Conidios		Miselio	
	En profundidad	En superficie	En profundidad	En superficie
	30 %	18,6 %	26,2 %	
Cenizas	3,4	6,4	20,8	
Ext. lipídico	34,6	25,7	36,7	
Proteína	32,8	65,7	38,0	

Los valores de la tabla están expresados como porcentaje del residuo seco.

— 81 —

Discusión.

Nuestras observaciones relativas a la morfología de las colonias están plenamente de acuerdo con VUILLEMIN (1906). También lo están en lo que concierne al engrosamiento de la pared de la hifa en la parte de la misma que va a constituir la porción basal del conidióforo y en la presencia de una estrangulación inicial en el punto donde se constituye el primer septo, en lo que difieren claramente de las descripciones de CIFERRI y REIAELLI (1934).

La formación de conidios parece tener lugar por segmentación progresiva de la porción de la hifa delimitada previamente por el primer septo o estrangulación de un modo, por lo demás semejante a la formación de las artrosporas, en tanto que sigue creciendo el conidióforo, o la porción de la hifa separada por el primer septo.

Sin que esto suponga admitir los conceptos de protoconidio y deuteroconidio, es evidente que existe cierta diferencia entre la formación de artrosporas y la espórogénesis del *Hemispora stellata*.

Las modificaciones observadas en el color de las colonias con los cambios de la concentración salina, confirman las observaciones de FRANK y HESS (1941b) relativas al color de los hongos marrones halófilos.

La ausencia de licuación de la gelatina está en abierta contradicción con las observaciones de CIFERRI y REIAELLI (1934), que afirman que las cepas de *S. epizoum* por ellos estudiadas, entre las que se encuentra la original de *Hemispora stellata* de VUILLEMIN, licuan casi completamente la gelatina. En este aspecto es evidente también la diferencia entre nuestra cepa de *H. stellata* y las halófilas facultativas aisladas por FRANK y HESS (1941b).

El tamaño de los conidios producidos por nuestra cepa, es considerablemente inferior al citado por VUILLEMIN e inferior también a los valores que FRANK y HESS (1941b) dan para todas las cepas de hongos marrones halófilos obligados o facultativos incluidos en el género *Sporendonema*.

Nuestra cepa de *Hemispora stellata* es un hongo halófilo facultativo, capaz de crecer en ausencia de ClNa, y que debería por este concepto ser agrupado con las cepas para las que FRANK y HESS proponían el nombre de *Sporendonema minutum*. Las divergencias citadas en el comportamiento frente a la gelatina y en el tamaño de las esporas, ponen claramente de manifiesto la desigualdad entre nuestra cepa de *H. stellata* y las del propuesto *S. minutum* estudiado por los citados autores.

Nuestra cepa difiere también claramente en este aspecto de la cepa de *S. epizoum* aislada por VAISEY (VAISEY 1954c), que no se desarrolla a concentraciones de cloruro sódico inferiores al 3 %, a menos que se sustituya la sal por las concentraciones de glucosa de igual presión osmótica.

La germinación no se ve afectada por el almacenamiento de los conidios a 3-5 °C al menos durante períodos de un mes. Sí lo está, en cambio,

por la concentración de conidios presentes en el medio de germinación; la velocidad de germinación es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de conidios, y se reduce a la mitad aproximadamente, al multiplicar por 20 la concentración. Esto pudiera ser una consecuencia del menor grado de aerobiosis que crean las suspensiones de conidios más concentradas; es menos probable que sea consecuencia de las sustancias autoinhibidoras arrastradas por los conidios como ocurre con los uredinales (ALLEEN, 1955) o el *Erysiphe graminis* (LOMISCH, 1954), ya que nuestra técnica de recogida, purificación y siembra implica numerosos lavados sucesivos. También puede tratarse de sustancias inhibidoras liberadas durante el proceso germinativo, entre las que podría encontrarse el propio anhídrido carbónico, como se ha sugerido en otros casos (STOCK, 1931; MAGIE, 1935).

La superior uniformidad y mayor rapidez del proceso germinativo de los conidios obtenidos en agar-malta, frente al de los obtenidos en medio de salvado (véase fig. 23), parece más bien reflejo de las distintas condiciones de recogida a que han sido sometidos. El procedimiento de recogida a partir de salvado es más drástico y sin duda arrastra no sólo las esporas totalmente maduras, sino también las que aún no han completado el proceso de maduración, las cuales probablemente nunca germinan. Es probable que la recogida a partir de las placas de Petri, arrastre únicamente las esporas maduras.

A diferencia de lo que ocurre con un buen número de hongos saprofitos (WELSFORI, 1907; LOGE, 1912 y KREITLOV, 1943), el tratamiento por calor (35-55 °C, 5 minutos), no activa los conidios, sino que por el contrario retarda su germinación, aunque en cierto grado parece sincronizarla. Tampoco parece lograrlo la congelación.

CAPITULO IV

IV.—MODIFICACIONES QUIMICAS Y METABOLICAS SUFRIDAS POR EL HEMISPORA STELLATA DURANTE EL PROCESO GERMINATIVO

IV.1.—Introducción.

Los hongos suelen sufrir, durante el proceso germinativo, notables cambios químicos y metabólicos que permiten incluso distinguir distintas etapas metabólicas durante la germinación. Los cambios metabólicos son en algunas ocasiones tan acusados, que para poner fin al período de latencia precisan la presencia de sustancias que no pueden ser luego utilizadas por la espora germinada y son innecesarias, por tanto, para el desarrollo de la hifa (SCHOPFER, 1942).

Las modificaciones sufridas por el contenido en lípidos e hidratos de carbono han sido detalladamente estudiados en *Neurospora tetrasperma* por SUSMAN y LINGAPA (SUSMAN y LINGAPA, 1959; LINGAPA y SUSMAN, 1959), pero no existe ningún estudio similar en ninguno de los hongos clasificados como *Sporendonema epizoum*.

La composición química citada en el capítulo precedente, de las esporas de *H. stellata*, el micelio de 48 horas cultivado en profundidad y el micelio cultivado en superficie, evidencia que también en este hongo existen diferencias muy profundas entre la composición química básica en las distintas etapas de su desarrollo.

Tal vez los cambios metabólicos más importantes, (y sin duda de mayor importancia para nuestro estudio) son los experimentados por la actividad respiratoria, que suele ser mínima en las esporas latentes y sufrir incrementos muy notables durante el proceso germinativo, como han demostrado GODDARD, SUSMAN y SMITH en *N. tetrasperma* (GODDARD, 1935; GODDARD y SMITH, 1938; SUSMAN y col. 1953); RUDOLPH y otros en *Phycomyces blakesleavus* (RUDOLPH, 1960, 1961); MANDELS en *Myortheicum verrucaria* (MANDELS y NORTON, 1948; MANDELS y TABARY, 1953) y TERNI y MOCHIZUKI en *A. orizae* (TERNI y MOCHIZUKI, 1955).

Esta regla no es, sin embargo, universalmente válida, y no la cumplen, por ejemplo, las esporas de *Puccinia graminis tritici* (SHU, 1954), ni las de *Fusarium solani phaseoli* con ciertos sustratos (V. W. COCHRANE y col. 1963 a, b).

Las variaciones de la actividad respiratoria tienen que ser fiel reflejo de cambios semejantes sufridos por algún enzima componente de la cadena respiratoria, que en determinado momento del ciclo evolutivo puede hallarse en cantidades insuficientes, o en condiciones inadecuadas para una actividad plena.

En el presente capítulo se describen algunos experimentos tendentes a explorar los cambios sufridos por *H. stellata* en su composición química básica y en algunas de sus actividades respiratorias, durante el proceso de germinación.

IV.2.—Métodos.

Las determinaciones de residuo seco, proteína y extracto lipídico, se realizaron según se describe en el capítulo anterior, y en la metodología básica general.

Las de nitrógeno lipídico se efectuaron por el método de JOHNSON, en muestras de extracto lipídico.

Los hidratos de carbono totales, se calcularon por diferencia hasta 100 de la suma ceniza + proteína + lípidos (corregida para evitar contar dos veces el N soluble de los lípidos).

La respiración endógena se determinó midiendo el consumo de oxígeno en ausencia de sustrato por el método directo de WARBURG. Las actividades succinato y glucosa oxidasa se midieron a través del consumo de oxígeno en presencia de glucosa y succinato según se describe en el capítulo II.

Las determinaciones de porcentaje de esporas germinadas, por el sistema descrito en la metodología general.

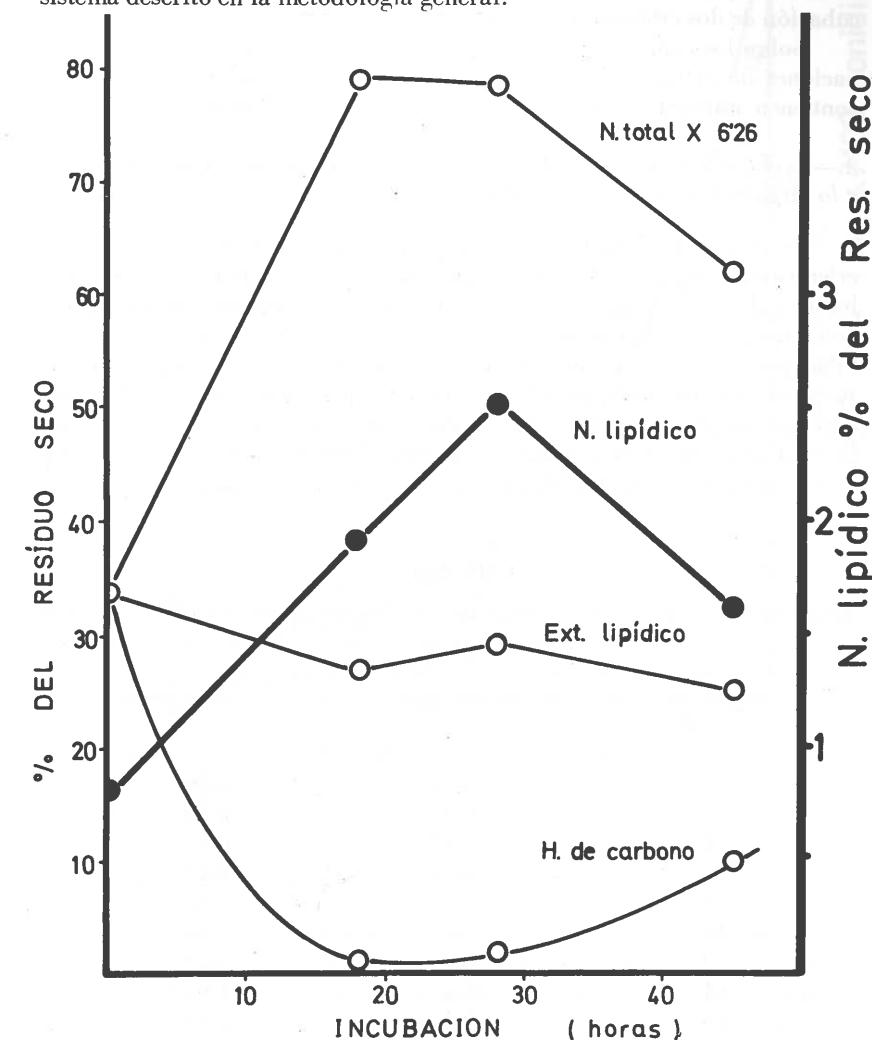


Fig. 26.—Variaciones en la composición química del *H. stellata* a lo largo del proceso germinativo.

IV.3.—Resultados.

3.1.—Variaciones en la composición química.

Se sembraron 6 erlenmeyer con una suspensión de conidios que contenía 400 millones/ml., mantenida durante 35 días en el frigorífico. Se incubaron a 25°C y 230 agit./min. A las 18 : 28 y 45 horas se detuvo la incubación de dos erlenmeyer y se separó el micelio.

Sobre los conidios de procedencia y los micelios, se hicieron determinaciones de extracto seco, ceniza, proteína, lípidos totales, y lípidos que contienen nitrógeno. Los resultados obtenidos se recogen en la Fig. 26.

2.—Evolución de las actividades, respiración endógena y glucosa oxidasa a lo largo del proceso germinativo.

Se incubaron, con la misma suspensión de conidios citada en 1, 35 erlenmeyer con medio de Vaisey que contenía 7,5% de ClNa, y se incubaron a 25°C y 230 agit./min. Periódicamente se suspendió la incubación de cierto número de matraces (los necesarios para la obtención de la cantidad adecuada de micelio). Con el micelio así obtenido, se prepararon suspensiones adecuadas para las determinaciones respirométricas, realizándose en las mismas, recuentos totales y de porcentaje de germinación. En una alícuota, se determinó el contenido proteico. Los datos obtenidos de los recuentos y las determinaciones de proteína figuran en la Tabla 11.

TABLA 11

Relación existente entre período de incubación, germinación, y síntesis proteica en las esporas

Incubación (horas)	Germinación (%)	Proteína (mgrs./100 ₁ esp.)
0	0,50	0,40
2	0,66	0,75
4	0,68	0,47
6	0,99	0,62
8	1,1	0,50
10	2,5	0,93
12	10,0	1,19
14	26,5	1,61
16	35,2	2,99
18	41,7	3,15
20	42,8	5,82

La síntesis proteica y la evolución de la R.E. y la glucosa-oxidasa, se representan en la Fig. 27 y Tabla 12.

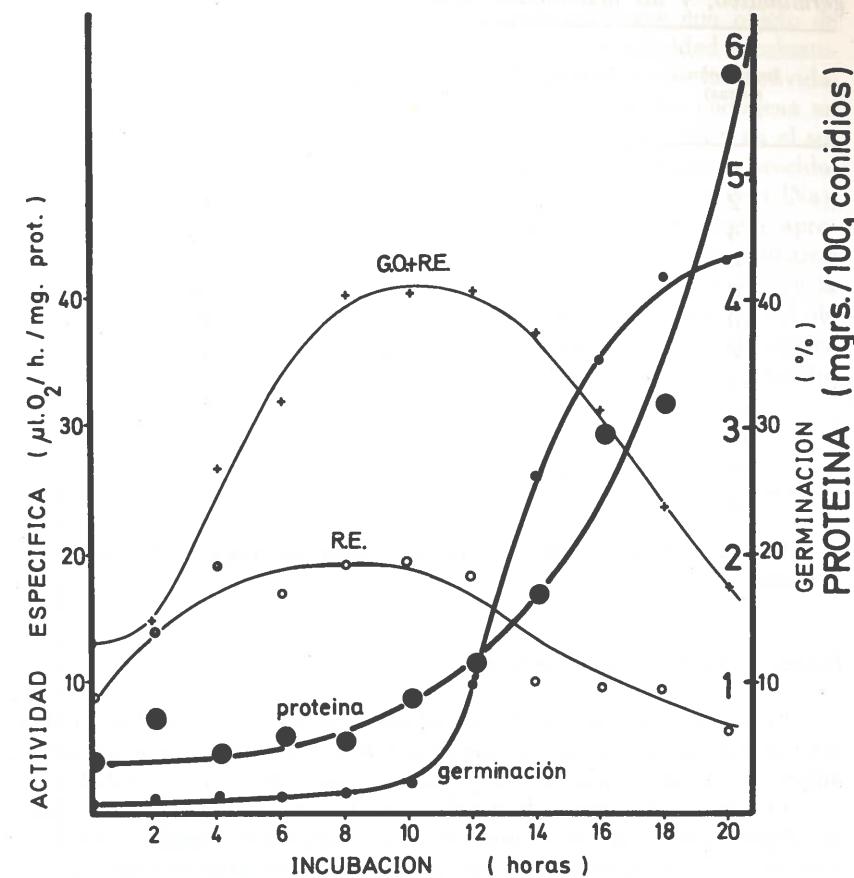


Fig. 27.—Síntesis proteica y evolución de las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa durante la germinación de las esporas de *H. stellata*.

3.—Evolución de la actividad succínico-oxidasa durante la germinación.

Los hongos filamentosos ofrecen considerables dificultades para el registro manométrico de sus actividades metabólicas, por tener velocidades de respiración endógena sumamente elevadas. A falta de técnicas radioisotópicas, sólo se han encontrado dos métodos de hacer frente a este problema: a) el agotamiento del sustrato endógeno, y b) el uso de inhibidores de la respiración endógena.

TABLA 12

Relación existente entre el desarrollo celular durante el proceso germinativo, y las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa

Incubación (horas)	Germinación (%)	Actividades específicas ($\mu\text{l O}_2/\text{h. /mgr. prot.}$)	
		Resp. endógena	Resp. endog. + Glucosa oxidasa
0	0,50	8,9	13,45
2	0,66	14,3	14,55
4	0,68	19,6	27,00
6	0,99	17,2	32,20
8	1,1	19,4	40,60
10	2,5	19,8	40,60
12	10,0	18,3	40,80
14	26,5	10,1	37,50
16	35,2	9,8	31,50
18	41,7	9,6	33,70
20	42,8	6,3	17,70

El efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria, se estudia en el capítulo 8.

Intento de agotamiento de la R. E.

El agotamiento del sustrato endógeno ofrece notables dificultades derivadas de la posibilidad de que el metabolismo de las células agotadas difiere del de las células frescas (BLUMENTHAL, 1963; MOSES, 1959).

Los primeros intentos de detección de la actividad succinato-oxidasa en células enteras dieron resultados poco convincentes debido al oscurecimiento de los mismos por las elevadas respiraciones endógenas. Se pensó que el agotamiento del sustrato endógeno pudiera aclarar el problema. Para lograrlo se probaron dos sistemas: a) mantener las células en el aparato de Warburg, como para la detección de la respiración endógena, efectuando lecturas periódicas, y b) incubando el micelio durante períodos diversos, en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., en ausencia de sustrato.

Ambos métodos pusieron de manifiesto la imposibilidad de agotar el sustrato endógeno de una manera apreciable en unas 10-20 horas, momento en que el consumo de oxígeno aumenta de una manera dramática que, pese a guardar en esta operación una cuidadosa asepsia, parece deberse a la proliferación microbiana, a juzgar por el análisis microscópico de las suspensiones de células utilizadas en los ensayos.

Evolución de la actividad succinato-oxidasa a lo largo del proceso germinativo y condiciones óptimas para la determinación de esta actividad.

Este experimento se llevó a cabo fundamentalmente con objeto de determinar el momento óptimo para el registro de la actividad succinato-oxidasa, basándose en la acusada diferencia existente entre las actividades glucosa-oxidasa + respiración endógena y respiración endógena en las fases finales del proceso germinativo (véase en la Fig. 28) y en el supuesto de que con esta actividad se produjera un fenómeno parecido.

Se sembraron 9 erlenmeyer de medio de Vaisey (7,5 % de ClNa), con una suspensión de conidios (30×10^6 conidios/ml. de medio, aproximadamente) mantenida durante 30 días en el frigorífico. Se incubaron a 25 C y 230 agit./min. Al cabo de 12, 15 y 17 : 30 horas, se detuvo la incubación, se recogió y lavó el micelio y se resuspendió en 10 ml. de tampón fosfato (pH 7,4, 0,1 M.), 5 ml. fueron utilizados para el registro de las actividades glucosa-oxidasa, respiración endógena y succinato-

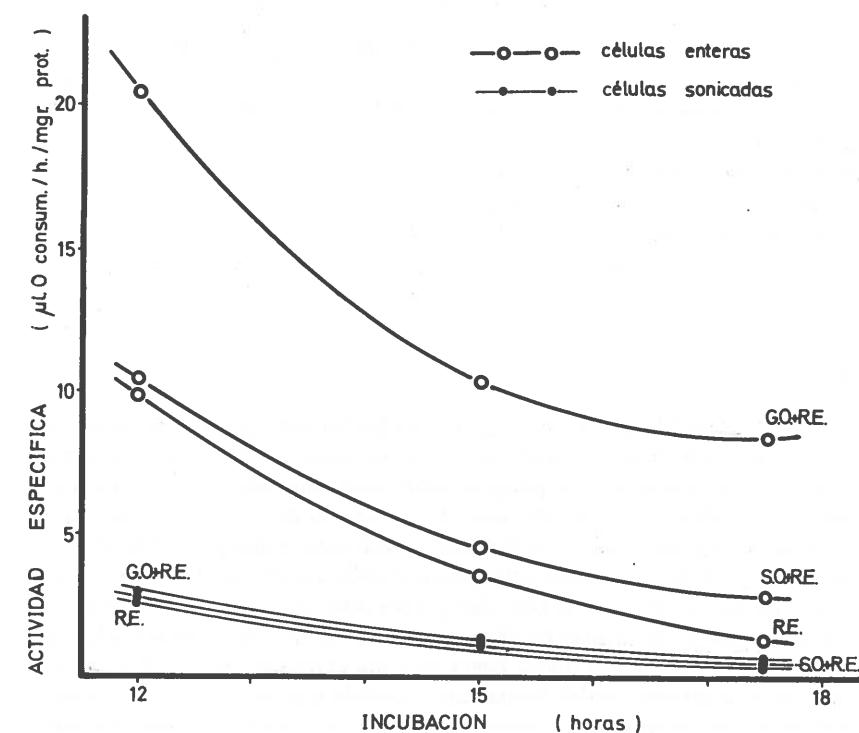


Fig. 28.—Evolución de las actividades: respiración endógena, glucosa-oxidasa y succinato-oxidasa, en las fases finales del proceso germinativo.

oxidasa, y los otros cinco mililitros se sonicaron durante 30 minutos, procediéndose a continuación al registro de las actividades succinato-oxidasa, respiración endógena y glucosa-oxidasa en el sonicado total.

Los datos recogidos figuran en la Tabla 13 y se representan gráficamente en la Fig. 28.

TABLA 13

Actividades específicas respiración endógena, glucosa-oxidasa + respiración endógena, y succinato-oxidasa + respiración endógena de células enteras en función de diversos períodos de incubación, y efecto de la sonicación (30 minutos).

	Actividades específicas (μ l O ₂ consumido / h./mgr. proteína)					
	Células enteras			Células sonicadas		
Incubación (horas)	12	15	17 : 30	12	15	17 : 30
Respiración endógena	10	3,25	1,23	2,52	1,09	0,35
Glucosa-oxidasa + respiración endógena	23	10,36	8,23	2,56	1,40	0,44
Succinato-oxidasa + respiración endógena	12	5,65	2,97	2,86	1,40	0,58

IV—4 Discusión

La síntesis de proteína, y la de sustancias nitrogenadas solubles en alcohol-acetona (biuret negativas), parecen estar estrechamente correlacionadas; su porcentaje asciende notablemente durante el proceso germinativo y desciende en cuanto cesa la producción de gemas, y progresó el crecimiento de las hifas. Esto no quiere decir, sin embargo, que la síntesis de proteína y de sustancias nitrogenadas solubles en alcohol-acetona sea particularmente activa durante las etapas que preceden a la gemación. La observación de la gráfica (Fig. 27) muestra que la síntesis global no comienza a tener importancia hasta que las gemas no se han formado y que sigue luego con notable intensidad a medida que las hifas van creciendo. Los incrementos en el porcentaje de estas sustancias en las etapas iniciales de la formación del micelio debe ser reflejo, no sólo de su síntesis sino también del agotamiento de otros componentes, hidratos de carbono y

lípidos, que suministran la energía necesaria para las distintas actividades implicadas en el proceso germinativo (la propia síntesis de proteína entre ellas). De igual modo, la disminución del porcentaje que suponen del extracto seco total, debe ser consecuencia del incremento posterior en la síntesis de lípidos y sobre todo de hidratos de carbono. Si la síntesis global de proteína no es muy acusada durante las etapas iniciales del proceso germinativo (Fig. 27), sí debe serlo en cambio en lo que se refiere a determinados enzimas necesarios sin duda para el comienzo de la germinación entre los que se hallan los componentes de la cadena respiratoria, las deshidrogenasas de los sustratos endógenos y productos derivados de las mismas, y las de los metabolitos derivados de la glucosa.

Esta síntesis proteica preferente se refleja en un incremento inmediato de la respiración endógena; el de la glucosa-oxidasa se retrasa un par de horas, tiempo sin duda necesario para la inducción de la glucosa permeable o de algún otro enzima limitante del metabolismo aeróbico de la glucosa, y continúa con su carácter preferencial durante 8-10 horas, por lo que las actividades específicas siguen creciendo. Cuando las primeras gomas comienzan a formarse y la síntesis global alcanza valores importantes, las actividades específicas bajan «por dilución».

El contenido en lípidos e hidratos de carbono de las esporas, es muy parecido; no así el de las gomas (micelio de 18 horas), en el que casi no existen sustancias hidrocarbonadas.

Aunque el descenso en el porcentaje del residuo seco representado por los hidratos de carbono no refleja únicamente su consumo sino también la activa síntesis proteica durante la formación de gomas y la elongación de las hifas, parece evidente que los hidratos de carbono constituyen la fuente energética endógena utilizada durante el proceso germinativo. En este sentido, las esporas de *H. stellata* se asemejan a las de *Neurospora tetrasperma* que utilizan como fuente primordial de energía durante la germinación, algunos hidratos de carbono y sólo comienzan a utilizar lípidos cuando aquéllos han sido agotados (LINGAPA y SUSSMAN, 1959).

La evolución de la actividad respiratoria se parece considerablemente a la observada por RUDOLPH (1961) en *Phycomyces blakesleanus*, por HOLTON (1960) en *Neurospora tetrasperma*, y por MANDELS (1963) en *Myrothecium verrucaria*. El incremento de la misma tiene que llevar consigo el de los componentes de la cadena respiratoria. Sumamente importante a este respecto, es destacar las profundas variaciones sufridas por el contenido en ubiquinona, mucho más alto en las gomas que en las esporas (que se estudia en el capítulo VI) y la imposibilidad en que el autor se ha encontrado de poner de manifiesto ningún citocromo soluble en las esporas, que contrasta abiertamente con lo que ocurre en las gomas (véase Cito-cromos y Flavinas, Capítulo VII).

CAPITULO V

V.—FRACCIONAMIENTO CELULAR. PREPARACION DE PARTICULAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES, Y DISTRIBUCION DE DISTINTAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES.

V.1.—Introducción.

En las células de los animales y vegetales superiores, los componentes de la cadena respiratoria, se hallan localizados en estructuras definidas de las mitocondrias (véase pág. 27). Su existencia en algunos hongos fue demostrada ya en la década de 1940 (GUILLERMONT, 1941), y ha sido confirmada en muchas especies (MOORE y Mc ALEAR, 1961). En la mayor parte de los microrganismos, es dudoso, sin embargo, que existan auténticas mitocondrias. Los enzimas y demás componentes de la cadena respiratoria se hallan localizados en ellos en fragmentos membranosos que probablemente sean porciones de la pared celular, y cuya preparación y empleo han resultado sumamente útiles para el estudio de la cadena respiratoria microbiana.

Los experimentos descritos en este capítulo estuvieron dirigidos a la preparación de partículas subcelulares transportadoras de electrones y al estudio de la localización de las actividades enzimáticas componentes de la cadena respiratoria.

V.2.—Métodos.

2.1.—Micelio.

Se utilizó micelio de 18 horas, obtenido incubando a 25 C y 230 agit./min., medio de Vaisey con 7,5 % de ClNa, inoculado con una suspensión de conidios (ajustando su concentración a 30-40 millones de conidios por mililitro de medio de cultivo); centrifugando a 1.800 X g. durante 5 minutos para eliminar el medio de cultivo, y lavando tres veces con tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M.

2.—Fragmentación celular.

Se llevó a cabo por sonicación en tampón de fosfato de pH 7,4, 0,1 M., a 0 - 2 C.

3.—Fracciones subcelulares.

Se obtuvieron por centrifugación en la ultracentrífuga SPINCO L-50, a 0 - 5 C, durante los tiempos y en los campos centrífugos que se citan.

4.—Medida de las actividades enzimáticas.

Las determinaciones de proteína y de las actividades enzimáticas : respiración-endógena, glucosa-oxidasa, succinato-oxidasa, α -cetoglutarato-oxidasa, fumarato-oxidasa, citrato-oxidasa, y p-fenilenodiamino-oxidasa, se llevaron a cabo por los métodos descritos en la parte general.

V.3.—Resultados.

3.1.—Efectos de la sonicación sobre las distintas actividades enzimáticas.

Los experimentos descritos en el capítulo IV pusieron de manifiesto la labilidad de los sistemas succinato-oxidasa y respiración endógena frente a la sonicación. Se consideró conveniente, por lo tanto, estudiar, antes de intentar la preparación de partículas transportadoras de electrones, el efecto de la sonicación sobre las actividades succinato-ox. y respiración endógena.

3.1.1.—Análisis preliminar de los efectos de la sonicación sobre la respiración endógena y la succinato-oxidasa.

El micelio procedente de 18 h. de incubación, de 4 erlenmeyer con medio de Vaisey (41,5 % de germinación) se suspendió en 12,5 ml. de tampón fosfato (pH 7,4, 0,1M.). Sobre una alícuota de la suspensión se determinó el contenido proteico, la respiración endógena, y la suma resp. end. + succinato oxidasa.

TABLA 14
Efecto de la sonicación sobre las actividades respiración endógena y succinato-oxidasa

	Actividades específicas (μ l O ₂ /hora/mgr. proteína)	
	Resp. endógena	Succin.-ox. + resp. end.
Células enteras	1,23.	2,82
Sonicación 15 min.		
Sonicado total	0,93	4,07
Sobren. 800 X g.-2,5 min.	0	2,43
Sonicación 30 min.		
Sonicado total	0,77	1,81
Sobren. 800 X g.-2,5 min.	0	1,06

— Volumen de sonicación = 7,5 ml.

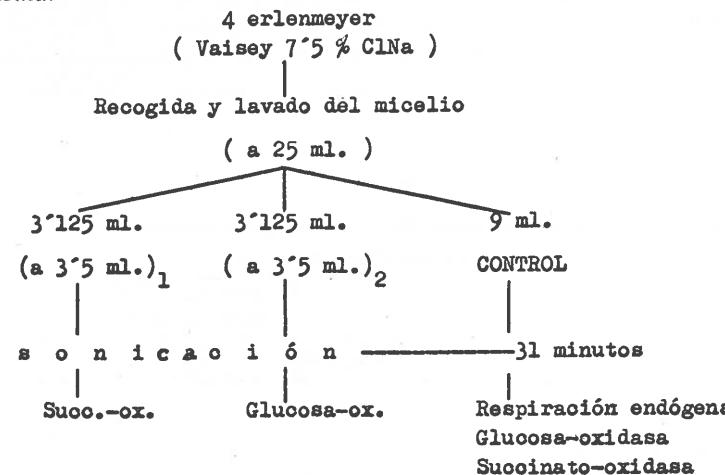
El resto fue sonicado durante 15 y 30 minutos en fracciones independientes de 7,5 ml., y se determinó la actividad respiración endógena y succinato-ox. + resp. end., en alícuotas de los sonicados totales. Los sonicados fueron luego centrifugados a $800 \times g$. durante 2,5 minutos, separándose un sedimento y un sobrenadante sobre el que se efectuaron nuevas determinaciones de las actividades antes citadas. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 14.

2.—Influencia de la presencia de sustratos sobre los efectos de la sonicación.

Teniendo en cuenta la protección que los sustratos ejercen sobre los enzimas, y el efecto de la sonicación sobre la succinato-oxidasa, se investigó la posibilidad de proteger la S. O. (succinato-ox.) y la glucosa-ox, sonicando en presencia de glucosa y succinato.

El experimento se desarrolló según el protocolo de la Fig. 29.

Se sembraron 5 erlenmeyer con medio de Vaisey que contenía 7,5 % de ClNa, con una suspensión de conidios de 15 días (de permanencia en el frigorífico) (concentración de conidios en el medio de cultivo = 20-40 millones / ml.), y se incubaron a 25 C y 230 agit./ min. durante 17 horas y media.



1) con succinato K 0'3 M.

2) con glucosa 0'3 M.

Fig. 29.—Marcha experimental.

Recogido y lavado el micelio, se resuspendió en 25 ml. de tampón fosfato (pH 7,4 — 0,1 M). Se tomaron alícuotas para los recuentos y determinaciones de proteína, y el resto se dividió en tres fracciones, dos de 3,125 ml. y una de 9 ml. A las fracciones de 3,125 ml. se les añadió glucosa o succinato, ajustando su volumen a 3,5 ml. con fracciones de 0,375 ml. de una solución de succinato potásico (0,3 M.) o glucosa (0,3 M.). Las dos suspensiones así preparadas y la de 9 ml. que iba a servir de control, fueron sonicadas durante 31 minutos. Al término de la sonicación, se retiraron alícuotas con las que se efectuaron recuentos y determinaciones de proteína y se analizaron las actividades respiración endógena, glucosa-oxidasa y succinato-oxidasa de las suspensiones sonicadas. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 15 y la Tabla 16.

TABLA 15

Efecto de la presencia de sustratos durante la sonicación, sobre la actividad succinato-oxidasa y glucosa oxidasa del sonicado total.

Sustrato	Actividades específicas ($\mu\text{l O}_2/\text{h.}/\text{mgr. proteína}$)		
	Resp. end.	R. end. + Gluc.-ox.	R. end. + Suc.-ox.
Glucosa 0,04 M.		0,49	
Succinato K 0,04 M.			0,45
CONTROL	0,65	0,97	1,69

— Los registros de las actividades glucosa-oxidasa y succinato-oxidasa de las suspensiones sonicadas en presencia de succinato o glucosa, se efectuaron sin ninguna adición de nuevo sustrato en el matraz de Warburg.

— Volúmenes de sonicación : control = 9 ml.: muestras = 3,5 ml.

3.—Efecto del tiempo y volumen de sonicación sobre la actividad succinato-oxidasa en los extractos libres de células.

Se procedió de acuerdo con el esquema de la Fig. 30.

TABLA 16

Efecto de la sonicación en diferentes volúmenes y medios de suspensión, sobre las células germinadas y sin germinar

	Células enteras	Células sonicadas (31 min.)		
		3,5 ml. succinato ₁	3,5 ml. glucosa ₂	9 ml. Tamp. fosfato ₃
% esporas germinadas	38 %	12 %	10,1 %	21,0 %
Células (millones / ml.)				
Total	467,0	230,0	216,0	249,0
Germinadas	177,5	27,6	21,8	52,3
Sin germinar	289,5	202,4	194,2	196,7
% de células rotas				
Germinadas	84,5 %	87,7 %	70,6 %	
Sin germinar	30,0 %	32,9 %	32,0 %	

¹ Glucosa 0,3 M; ² Succinato potásico 0,3 M. ² Tampón fosfato pH 7,4, 0,1 M.

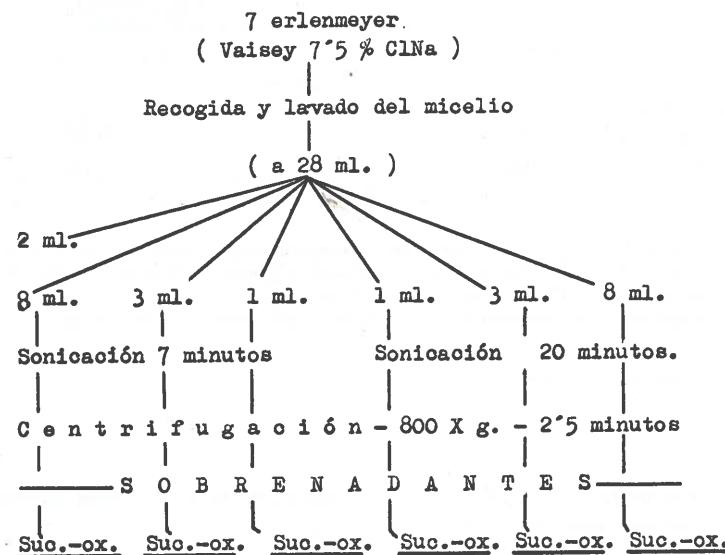


Fig. 30.—Marcha experimental.

El micelio de 7 erlenmeyer se resuspendió en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M. hasta un volumen de 28 ml. Se apartó una alícuota de 2 ml. para recuentos y determinaciones de proteína, y el resto se dividió en dos lotes de 3 fracciones (8, 3, y 1 ml.). Las fracciones del primer lote se sonicaron durante 7 minutos, y las del segundo, 20 minutos. Todas las fracciones fueron luego centrifugadas a 800 × g. durante 2,5 minutos. De los sobrenadantes se separaron alícuotas para las determinaciones de proteína, y se analizaron las actividades succinato-oxidasa. Los resultados figuran en la Tabla 17 y Fig. 31.

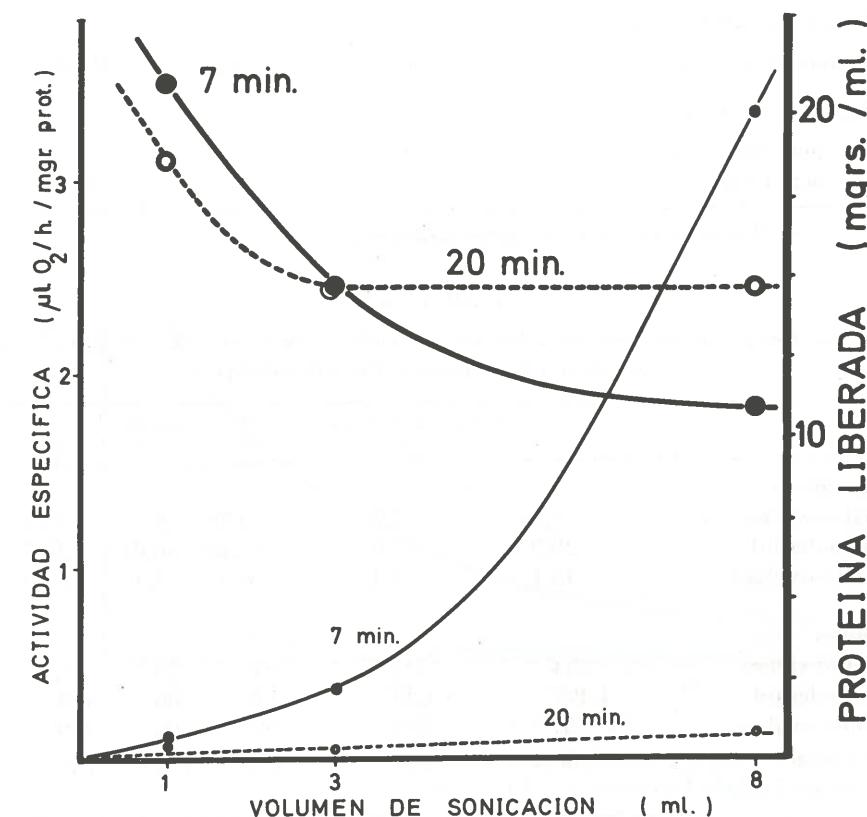


Fig. 31.—Efecto del tiempo y volumen de sonicación sobre la liberación de proteína, y la actividad succinato-oxidasa del extracto libre de células.

TABLA 17

Efecto del tiempo y volumen de sonicación sobre la actividad succinato-oxidasa de los extractos libres de células.

	Volumen de sonicación 1	3	(ml.) 8
<i>Sonicación, 7 minutos</i>			
Proteína total (mgrs./fracción)	21,1	44,25	88
<i>Succinato-oxidasa:</i>			
act. específica	0,16	0,37	3,59
act. total	3,36	16,4	316,00
<i>Sonicación, 20 minutos</i>			
Proteína total (mgrs./fracción)	18,7	44,5	118,4
<i>Succinato-oxidasa</i>			
act. específica	0,12	0,05	0,14
act. total	2,24	2,25	16,60

— Micelio con el 36,9 % de conidios germinados.

TABLA 18

Efectos del tiempo de sonicación sobre las actividades succ.-ox., succ-deshid., y cit.-ox. presentes en los extractos libres de células.

	2	Tiempos de sonicación 5	10	(minutos) 20	40
<i>Act. específicas</i>					
Succinato-oxidasa	5,9	2,9	0,88	0,17	0,13
Succinato-deshid.	29,9	16,0	11,16	6,04	2,37
Citocromo-oxidasa	15,1	8,4	6,5	3,4	1,40
<i>Act. totales</i>					
Succinato-oxidasa	254	301	935	20,3	20,5
Succinato-deshid.	1.495	1.620	1.182	708	388
Citocromo-oxidasa	757	855	690	396	229
Proteína total (mgrs. en los 5 mls.)	50,4	101,2	106	118	164

— Volumen de sonicación = 5 ml.

— % de germinación = 41,4 %.

— Concentración de conidios durante la sonicación 307,5 mill./ml.

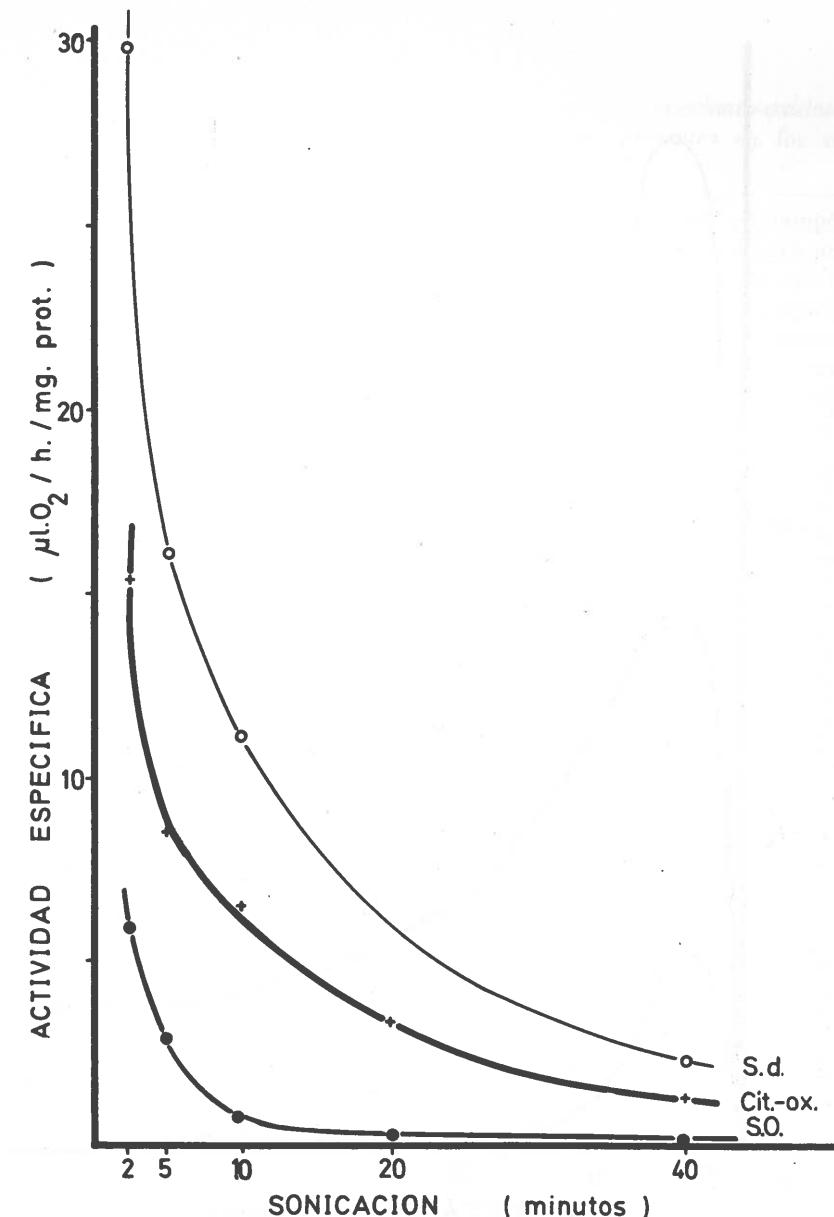


Fig. 32.—Efecto del tiempo de sonicación, sobre la «actividad específica»: succinato-oxidasa (S. O.), succinato-deshidrogenasa (S. d.), y citocromo-oxidasa (Cit.-ox.) en el extracto libre de células.

— Volumen de sonicación = 5 ml.

— % de germinación = 41,4 %.

— concentración de conidios en el medio de sonicación = 307,5 millones/ml.

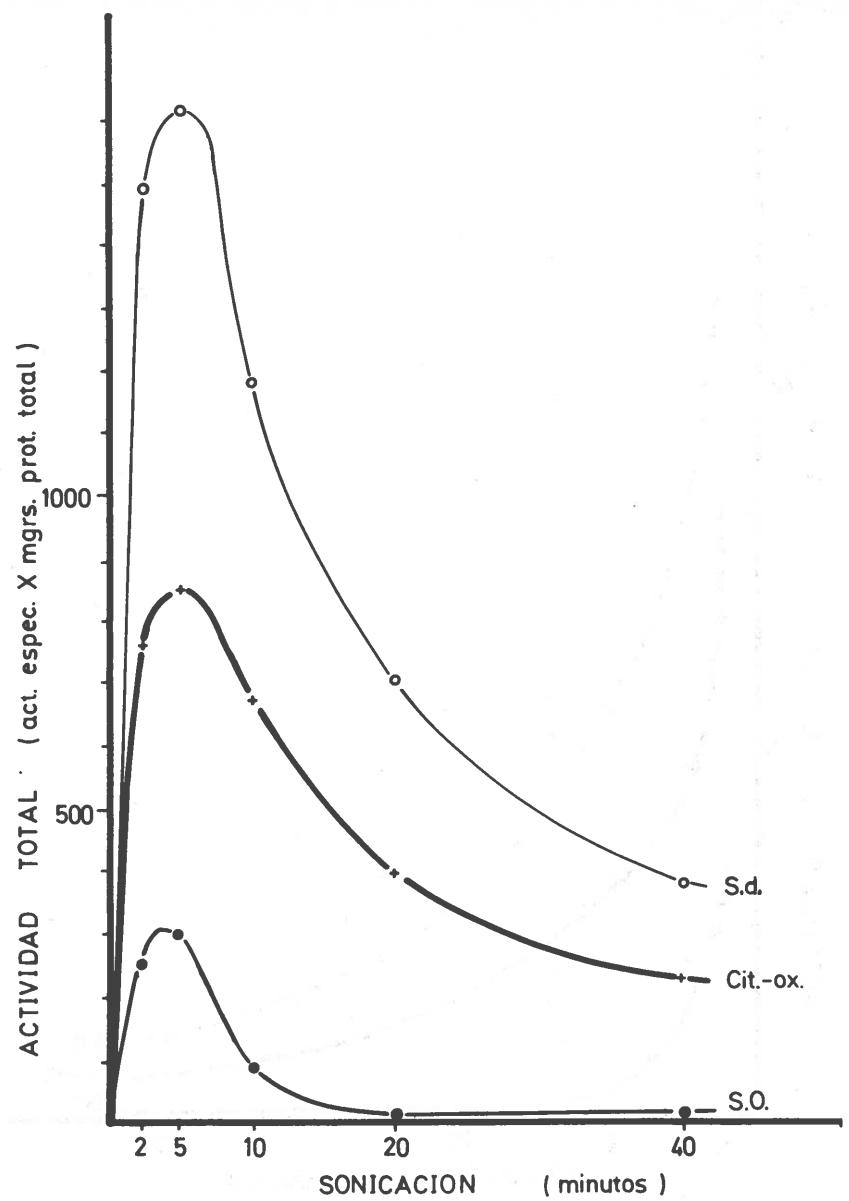


Fig. 33.—Efecto del tiempo de sonoración, sobre la «actividad total». Succinato-oxidasa (S. O.), Succinato-deshidrogenasa (S. d.) y citocromo (Cit.-ox.) en el extracto libre de célula.

— Volumen de sonicación = 5 ml.

— % de germinación = 41,4 %

— Concentración de conidios en el medio de sonicación = 307,5 millones/sul.

4.—Efecto del tiempo de sonicación sobre las actividades succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa, y citocromo-oxidasa, presentes en los extractos libres de células.

El micelio obtenido de 7 erlenmeyer fue resuspendido en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., y el volumen se enrasó a 26 ml. Se separó una alícuota de 1 ml. para recuentos, y el resto se dividió en 5 fracciones de 5 ml., que fueron sonicadas durante 2, 5, 10, 20 y 40 minutos respectivamente. Las fracciones sonicadas, se centrifugaron a $800 \times g$, 2,5 minutos, y se analizaron las actividades succinato-ox., succinato-deshid. y cito-cromo-ox. en los sobrenadantes. Los resultados obtenidos se hallan en la Tabla 18 y Figs. 32 y 33.

5.—Otras actividades enzimáticas en los extractos libres de células.

Ha sido imposible detectar en células enteras (incluso en las mejores condiciones para el registro de la actividad succinato-oxidasa + resp.

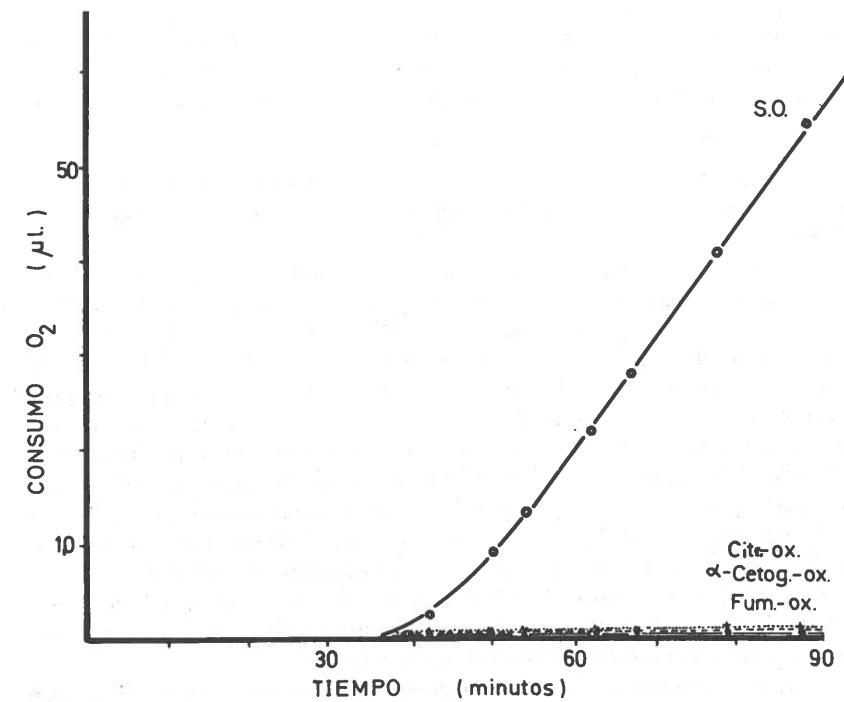


Fig. 34.—Actividades: succinato-oxidasa (S.O.), citrato-oxidasa (Citr-ox.), [α -cetoglutarato-oxidasa (α -Cetog-ox.) y fumarato-oxidasa (Fum.-ox.) en el extracto libre de células.

endógena), actividades α -cetoglutarato-oxidasa, fumarato-oxidasa o citrato-oxidasa.

Suponiendo que la sonicación tendría tan dramáticos efectos sobre estas actividades como sobre la succinato-oxidasa, se hizo un estudio comparado de la oxidación del succinato, α -cetoglutarato, fumarato y citrato en extractos libres de células obtenidos por sonicación.

Se resuspendió en 15 ml. de tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., el micelio de 6 erlenmeyer. Se retiró una alícuota para recuentos (50 % de germinación), y el resto se sonicó durante 5 minutos en volúmenes de 5 ml. El sonicado fue centrifugado a $800 \times g.$ durante 2,5 minutos. El depósito fue desecharo, y se analizaron en el sobrenadante las siguientes actividades: succinato-oxidasa, α -cetoglutarato-oxidasa, fumarato-oxidasa, citrato-oxidasa. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 34.

A pesar de los repetidos intentos realizados, no se ha podido detectar actividad alguna α -cetoglutarato-oxidasa, fumarato-oxidasa, o citrato-oxidasa, en los extractos libres de células. Se consideró por tanto inútil su estudio en las distintas fracciones obtenidas por centrifugación.

6.—Obtención de partículas transportadoras de electrones. Distribución de las actividades: respiración endógena, succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa, y citocromo-oxidasa, en las distintas fracciones subcelulares.

El micelio procedente de 7 erlenmeyer se resuspendió en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., y se procedió según se describe en el esquema de la Fig. 35.

Se separó una alícuota de 1 ml. para los recuentos, y se sonicó el resto durante 7 minutos en volúmenes de 5 ml. (la concentración de conídios en el medio de sonicación era de 163×10^6 conídios/ml.; el % de conídios germinados de 33,2 %). El micelio sonicado se centrifugó a $800 \times g.$ durante 2,5 minutos; se desecharó el depósito, y del sobrenadante (sobnte. $800 \times g.$) (21 ml.), se separó una alícuota (6,5 ml.), que se guardó para los análisis enzimáticos. Los 15,1 ml. restantes, se centrifugaron a $25.000 \times g.$ durante 30 minutos. El depósito obtenido (deplo. $25.000 \times g.$) se ajustó a 8,5 ml., y se utilizó para las determinaciones enzimáticas. El sobrenadante (sobnte. $25.000 \times g.$) se centrifugó durante 90 minutos a $100.000 \times g.$ El depósito de la centrifugación (D- $100.000 \times g.$) se resuspendió y se ajustó el volumen a 9 ml. con tampón fosfato; esta suspensión se utilizó para las determinaciones enzimáticas, lo mismo que el sobrenadante (sobnte. $100.000 \times g.$) (13,4 ml.).

Los resultados de las determinaciones de las actividades respiración endógena, succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa y citocromo-oxidasa de las diversas fracciones, figuran en la Tabla 19, y se representan en las Figs. 36, 37, 38 y 39.

7.—Distribución de la actividad parafenilenodiamina-oxidasa (PPD-ox.) en las diversas fracciones subcelulares.

JACOBS y colaboradores (JACOBS, 1960; PACKER y JACBOS, 1962) y otros, han utilizado la oxidación de las parafenilenodiaminas para el estudio de las porciones finales de la cadena respiratoria, y JURTSHUK y colaboradores (JURTSHUK, 1967) proponen que la actividad p-fenilenodiamino-

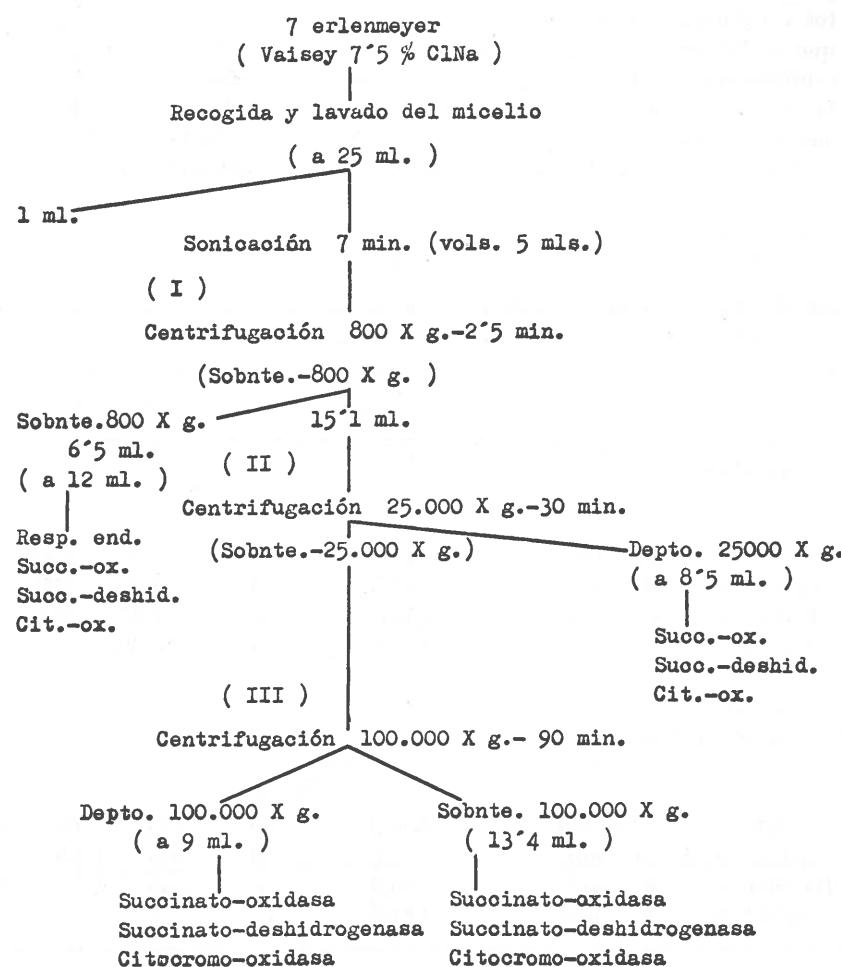


Fig. 35.—Marcha experimental

oxidasa es un fiel reflejo de la actividad citocromo-oxidasa de cualquier sistema.

En este experimento se ha intentado averiguar si las células de *H. stellata* son capaces de oxidar la p-fenilenodiamina, y la distribución de esta actividad en nuestro sistema de fraccionamiento.

El micelio obtenido de 10 erlenmeyer se resuspendió en 35 ml. de tampón fosfato de pH 6,5, 39,85 mM, y se efectuó un recuento de conidios germinados (36 %). Se separaron 3 ml. que fueron diluidos a 7,5 ml. (*células enteras*), y los 32 ml. restantes se sonicaron en períodos de 5 minutos y volúmenes de 5 ml. De la suspensión resultante se separaron 3 ml. que se diluyeron a 7,5 ml. (*células sonicadas*). Los 29 ml. restantes se centrifugaron a 800 \times g. durante 2,5 minutos. El depósito se resuspendió en 36 ml. con tampón fosfato. El sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 25.000 \times g. El depósito de esta centrifugación (depto. 25.000 \times g.) se resuspendió en 14,7 ml. El sobrenadante se centrifugó por último

TABLA 19

Distribución de las actividades: respiración endógena, succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa, y citocromo-oxidasa en diversas partículas subcelulares.

	Proteína (mgrs. en fracción)	Resp. end.	Succ.-ox.	Succ.-desh.	Cit.-ox.
<i>Actividades específicas</i> (μ l O ₂ /h./mgr. protéina)					
Sobnte. 800 \times g.- 2,5 min.	349,0	0	3,37	20,6	11,7
Dept. 25.000 \times g.- 30 min.	51,5	0	4,00	29,9	15,9
Dept. 100.000 \times g.- 90 min.	136,0	0	1,95	34,9	10,6
Sobnte. 100.000 \times g.- 90 min.	137,4	0	0,00	5,1	2,1
<i>Actividades totales</i> (act. específicas \times mgr. prot. en la fracción)					
Sobnte. 800 \times g.- 2,5 min.	349,0	0	1.175	7.190	4.080
Dept. 25.000 \times g.- 30 min.	51,5	0	206	1.540	818
Dept. 100.000 \times g.- 90 min.	136,0	0	265	4.750	1.440
Sobnte. 100.000 \times g.- 90 min.	137,4	0	0	700	286

— Micelio con 33,3 % de germinación; sonicación = 7 minutos en volúmenes de 5 ml.

— Concentración de conidios en el medio de sonicación = 163,3 millones/ml.

a 100.000 \times g. durante 90 minutos. Los 20,4 ml. de sobrenadante obtenidos se guardaron, y el depósito (depto. 100.000 \times g.) se resuspendió hasta volumen de 5,5 ml.

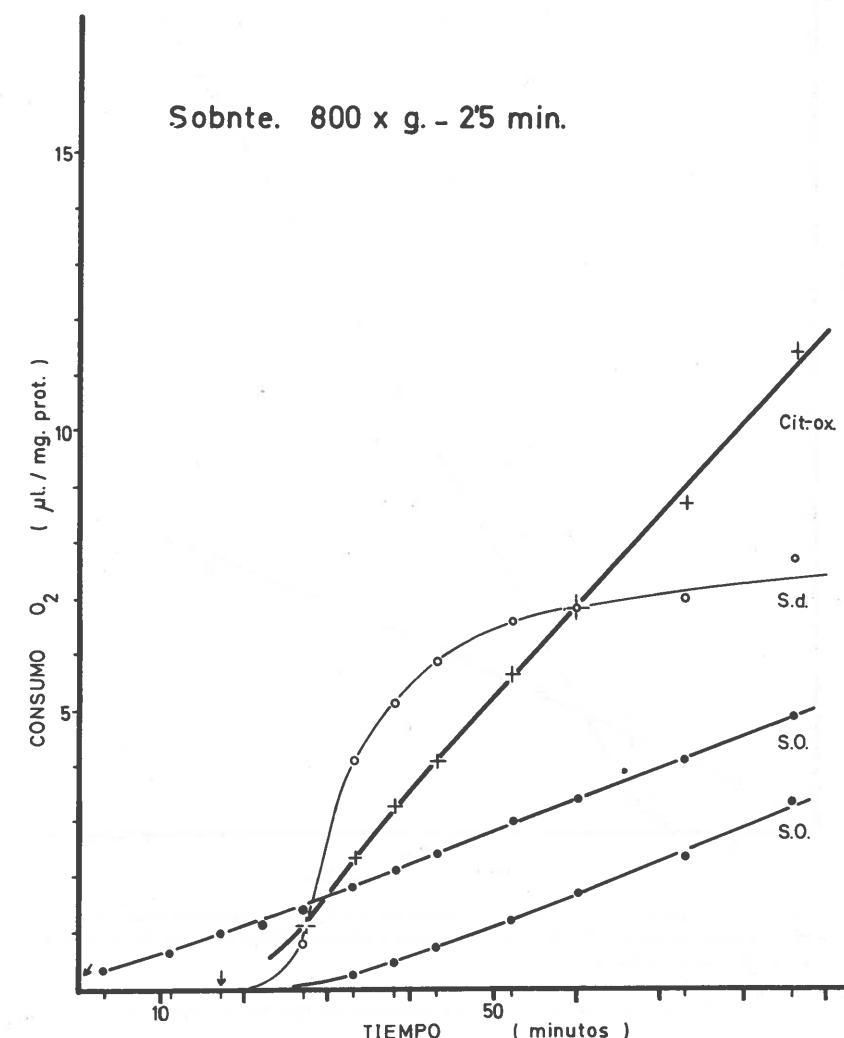


Fig. 36.—Actividades: respiración endógena (R.E.), succinato-oxidasa (S. O.), succinato-deshidrogenasa (S. d.) y citocromo-oxidasa (Cit.-ox.), en la fracción «Sobnte» 800 \times g.-2,5 min.».

— Las flechas de la gráfica indican el momento en que se vertió el sustrato.

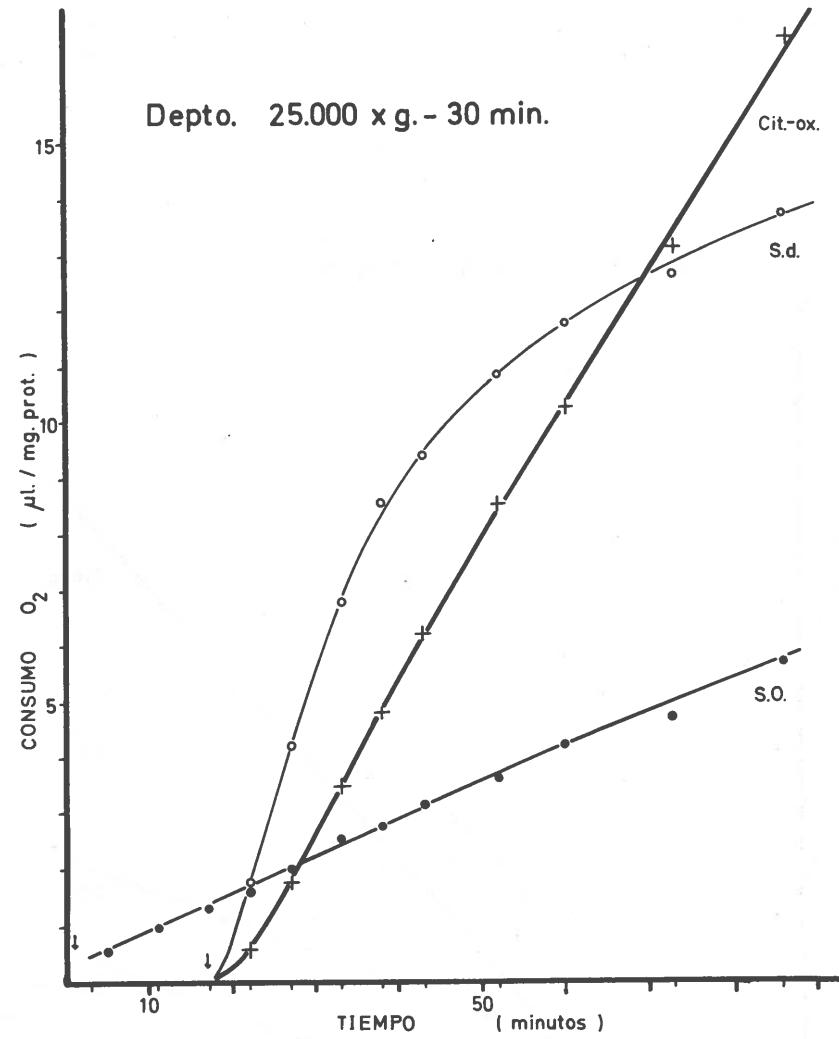


Fig. 37.—Actividades : respiración endógena (R. E.), succinato-oxidasa (S. O.), succinato-deshidrogenasa (S. d.), y citocromo-oxidasa (Cit.-ox.), en la fracción «Dept. 25.000 x g.-30 min.».

— Las flechas de la gráfica indican el momento en que se vertió el sustrato.

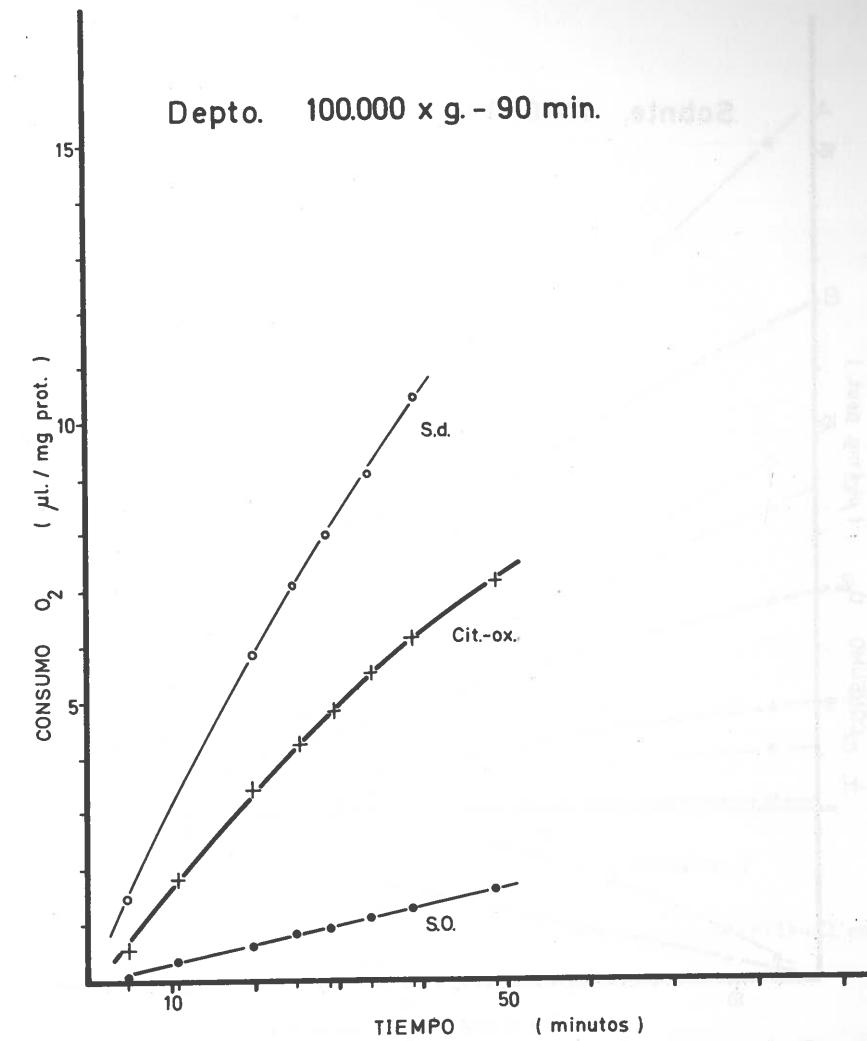


Fig. 38.—Actividades : succinato-oxidasa (S. O.), succinato-deshidrogenasa (S. d.) y citocromo-oxidasa (Cit.-ox.) en la fracción «Dept. 100.000 x g.-90 min.».

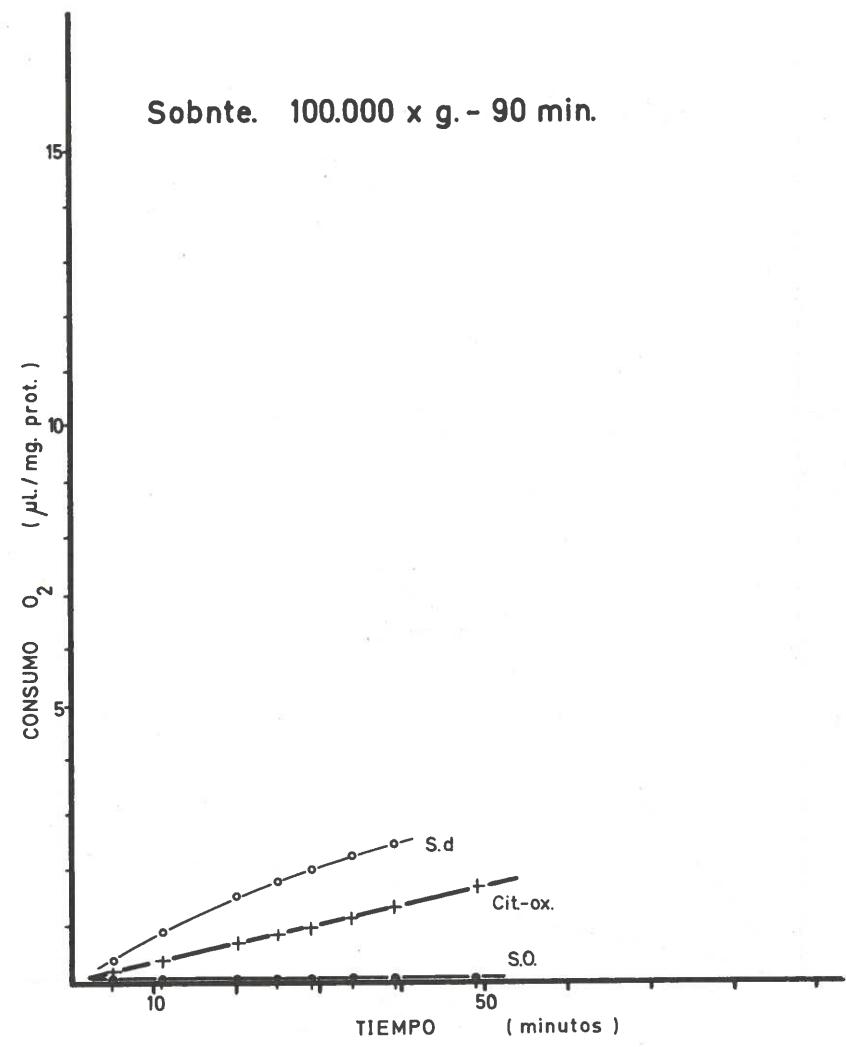


Fig. 39.—Actividades : succinato-oxidasa (S. O.), succinato-deshidrogenasa (S. d.), y Citocromo-oxidasa (Cit.-ox.) de la fracción «Sobnte, 100.000 × g. - 90 min.».

— 108 —

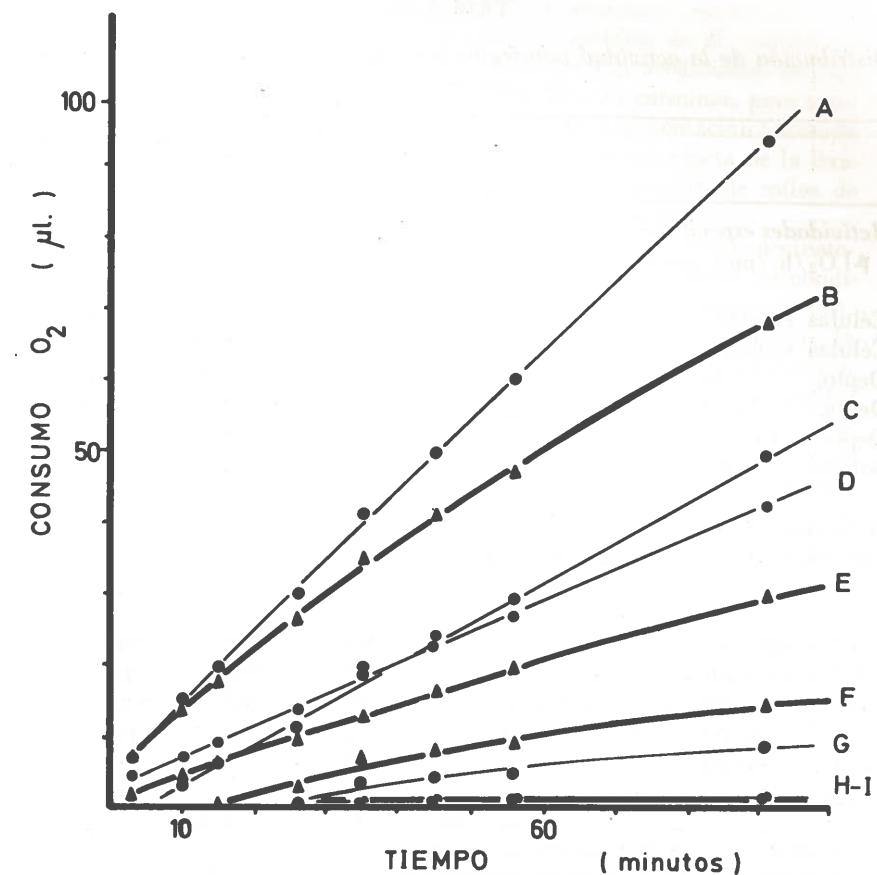


Fig. 40.—Distribución de la actividad p-fenilenodiamina-oxidasa (PPD-ox.) en las distintas fracciones subcelulares.

- A = PPD-ox. en células enteras.
- B = Resp. endógena en células enteras.
- C = PPD-ox. en células sonicadas.
- D = PPD-ox. en la fracción «Dept. 800 × g.-2,5 min.
- E = Resp. endógena en las células sonicadas.
- F = Resp. endógena en la fracción «Dept. 800 × g. 2,5 min.
- G = PPD-ox. en la fracción «Dept. 25.000 × g.-30 min.».
- H = PPD-ox. en la fracción «Dept. 100.000 × g.-90 min.».
- I = PPD-ox. en la fracción «Sobnte. 100.000 × g.-90 min.

— 109 —

TABLA 20

Distribución de la actividad parafenilenodiamina-oxidasa en diversas fracciones subcelulares

	Proteína (mgrs.)	Res. end.	Res. end. + PPDox
<i>Actividades específicas</i> (μ l O ₂ /h./mgr. proteína)			
Células enteras.			
Células sonicadas.		3,45	4,06
Dept. 800 × g.- 2,5 min.		1,57	2,23
Dept. 25.000 × g.- 30 min.		1,83	3,03
Dept. 100.000 × g.- 90 min.		0	0,90
Sobnte. 100.000 × g.- 90 min.		0	0
<i>Actividades totales</i> (act. específicas × mgrs. prot. en la fracción)			
Células enteras	428	1.478	1.740
Células sonicadas	420	660	935
Dept. 800 × g.- 2,5 min.	275	505	832
Dept. 25.000 × g.- 30 min.	68,1	6,7	60,6
Dept. 100.000 × g.- 90 min.	35,5	0	0
Sobnte. 100.000 × g.- 90 min.	25,1	0	0

— Micelio con el 36 % de conidios germinados

— Sonicación = 5 minutos en volúmenes de 5 ml.

Se analizaron las actividades respiración endógena y PPD-ox. de todas las fracciones. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 20, y Fig. 40.

Los valores correspondientes a la PPD-ox. de la tabla, indican la suma de las actividades respiración endógena y PPD-ox. de cada una de las fracciones.

V.4.—Discusión.

Los resultados descritos muestran que la sonicación, que se emplea en algunos procedimientos de preparación de partículas transportadoras de electrones a partir de mitocondrias de mamíferos (UMBREIT y col., 1964) (LINNANE y ZIEGLER, 1958), y que ha sido utilizado para la preparación de partículas similares de *Mycobacterium phlei* por BRODIE (1958), y por EDDY (EDDY, 1958) y VANDERWINKEL y colaboradores (1958) en

algunos hongos, es un procedimiento de fragmentación celular útil para la preparación de partículas respiratorias de conidios de *H. stellata* en proceso germinativo. Es mucho más eficaz como procedimiento de ruptura frente a las gemas que frente a los conidios sin germinar, pero rompe también éstos. La eficacia del procedimiento de fragmentación (causado por la alternancia cíclica de tensión y presión, a consecuencia de la irradación de ultrasonidos que producen cambios de presión de miles de atmósferas), depende del tiempo y el volumen de sonicación.

Las gemas de *H. stellata* tienen una considerable actividad succinato-oxidasa, pero apenas puede observarse en las células enteras en las condiciones más favorables (17 1/2 horas de incubación, 35 % de germinación). La sonicación la pone claramente de manifiesto, de un lado porque la simple fragmentación elimina gran parte de la respiración endógena (en los extractos libres de células, preparados fragmentando así y centrifugando a 800 × g. durante 2,5 minutos, desaparece); por otra parte, parece hacer más asequibles los enzimas del sistema, al sustrato, lo que es puesto de manifiesto por la superior suma succinato-ox + resp. endógena del sonicado total, frente al de las células enteras (véase la Tabla 14; sonicado total, 15 minutos). Es muy posible que en la misma experiencia se hubiera logrado una actividad específica succinato-ox. mucho más elevada con tiempos de sonicación más breves.

El tratamiento con ultrasonidos debe realizarse muy cuidadosamente, en condiciones perfectamente definidas, si se quieren mantener actividades específicas altas. Los efectos de la sonicación son progresivos, y la sonicación, que inicialmente rompe las células y fragmenta las membranas de una forma compatible con el transporte de electrones, acaba destruyendo la actividad respiratoria de los fragmentos, sin duda por subfragmentación. El proceso liberador de fragmentos con actividad respiratoria y el destructor de esta actividad, son simultáneos. El punto (tiempo) donde el balance es más favorable, depende del volumen de sonicación. La actividad succinato-oxidasa dependiente de la integridad de una porción mucho mayor de la cadena respiratoria, es más sensible que la succinato-deshidrogenasa y la citocromo-oxidasa, aunque todas ellas van siendo destruidas desde el comienzo de la sonicación (como pone de manifiesto la actividad específica de los extractos libres de células en el tiempo. Tabla 18 y Fig. 32).

La presencia de sustrato no protege los sistemas succinato-oxidasa, o glucosa-oxidasa, contra la disruptión por ultrasonidos. Trabajando con volúmenes de sonicación de 5 ml., se logra la actividad total más alta, a los cinco minutos, tanto en lo que al sistema succinato-oxidasa, como a la succinato-deshidrogenasa se refiere.

Los análisis de las Fig. 32 y 33 y Tabla 18 sugieren que se lograrían extractos libres de células con actividades totales más altas, compatibles

con elevadas actividades específicas, si la sonicación se realizara durante períodos de duración no superiores a 2 minutos.

No se han podido lograr resultados similares con otros sustratos de oxidasa. La α -cetoglutarato, fumarato, malato, y citrato oxidasa, que no pueden ponerse de manifiesto en las células enteras, tampoco pueden observarse en los extractos libres de células, preparadas por sonicación durante 5 minutos en volúmenes de 5 mililitros; es probable, sin embargo, que su labilidad frente a la sonicación, sea muy elevada, y que períodos de sonicación más breves (1-2 minutos) permitieran detectarla en extractos libres de células.

Mediante la centrifugación diferencial de los extractos libres de células, obtenidos por sonicación, se logran dos tipos de partículas, con la cadena transportadora de electrones íntegra, y desprovistas de respiración endógena; unas de tamaño medio ($25.000 \times g.$ 30 minutos), y otras de pequeño tamaño ($100.000 \times g.$ 90 minutos). Las de $25.000 \times g.$ son las que ofrecen actividades succinato-oxidasa más altas; la elevada actividad succinato-deshidrogenasa y citocromo-oxidasa comparada con la actividad succinato-oxidasa, sugieren la posibilidad de que sean deficientes en alguno de los componentes intermedios (¿Q?, ¿citocromos?).

Las partículas más pequeñas poseen una gran capacidad succinato-deshidrogenasa pero escasa actividad citocromo-oxidasa.

La fracción soluble (o particulada más ligera), carece de actividad succinato-oxidasa. Todas las fracciones carecen de actividad Succinato-oxidasa, Fumarato-oxidasa, malato-oxidasa, y citrato-oxidasa.

Los conidios de *H. stellata* en proceso de gemación son capaces de oxidar la parafenilenodiamina, actividad que conservan los extractos libres de células; y las partículas de tamaño intermedio ($25.000 \times g.$). Las partículas más ligeras carecen de actividad p-fenilenodiamino-oxidasa. La persistencia de actividades citocromo-oxidasa en las fracciones más ligeras que carecen de p-fenilenodiamino-oxidasa, ponen seriamente en duda la posibilidad de aceptar (al menos en este microrganismo) la tesis de JURTSHUK y col. (1967), que proponen la oxidación de la parafenilenodiamino-oxidasa como medida de la actividad citocromo-oxidasa.

CAPITULO VI

VI.-QUINONAS

VI-1.—Introducción

Son numerosos los investigadores que se han ocupado de la presencia de naftoquinonas y benzoquinonas en los microrganismos: LESTER y

CRANE (1959), KASKET y BRODIE (1960 a, b), BISHOP y colaboradores (1962), WHISTANCE y colaboradores (1969), LAVATE y col. (1964), etc. Sus trabajos nos permiten clasificar las bacterias en cuatro grupos: 1) las que sólo contienen ubiquinona (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii* N. C. I. B. 8660, etc.); 2) las que sólo contienen menaquinona (*Mycobacterium phlei*, *Mircrococcus lysodeikticus*, etc.); 3) las que contienen quinonas de ambos tipos (*E. coli*, *Proteus vulgaris*, etc., finalmente, 4) las que carecen de ambas, como el *Clostridium sporogenes*, y el *Lactobacillus casei*.

El funcionamiento de estas quinonas en la cadena transportadora de electrones de los microrganismos ha sido repetidas veces confirmado. A partir de *E. coli*, KASKET y BRODIE (1963), prepararon dos tipos de partículas, unas de gran tamaño, que sólo contienen ubiquinona, que oxidan casi exclusivamente succinato, y otras de tamaño más pequeño que también oxidan NAD^+ y los sustratos cuya oxidación media este coenzima, que contenían ambas quinonas. La oxidación del NAD^+ en estos microrganismos es sensible al dicumarol y a la radiación ultravioleta de 360 m μ (KASKET y BRODIE, 1962). La actividad así destruida por la radiación ultravioleta es recuperable mediante la adición específica de naftoquinona. En estos y otros estudios (KASKET y BRODIE, 1962 a, b, y 1963 a, y b) quedó incontrovertiblemente demostrada la participación de una menaquinona-reductasa en el transporte de electrones desde los sustratos ligados al NAD hasta el O_2 .

De las partículas transportadoras de electrones de *M. phlei* BRODIE y col. aislaron una naftoquinona (MK₉ (H)) que demostraron era funcional en las oxidaciones de NAD^+ acopladas a la fosforilización oxidativa (BRODIE, 1958, 1961; BRODIE y RUSSELL, 1961; RUSSELL y BRODIE, 1960).

El funcionamiento de la ubiquinona en el transporte de electrones entre la succinato-deshidrogenasa y el O_2 molecular en *E. coli* fue plenamente demostrado por KASKET y BRODIE (1963 a, b), mediante experimentos cinéticos, y de destrucción de la actividad respiratoria por radiación y recuperación por adición de ubiquinona. ITAGAKI (1964), demuestra en la misma especie, el carácter funcional de la ubiquinona mediante la destrucción de la actividad respiratoria por extracción con acetona y recuperación de la misma por adición de Q₈.

La distribución en los hongos, de las quinonas que participan en el transporte de electrones, ha sido mucho menos estudiada que en las bacterias, en los vegetales, o en los animales superiores, pero los estudios realizados nos permiten conocer que la mayor parte de los hongos contienen una o varias ubiquinonas, y que sólo unos pocos la sustituyen por otra quinona funcional (vitamina K en *Streptomyces griseus*, y una desconocida en *Blastocladiella emersonii*).

LESTER y CRANE (1959) aislaron Q₆ en *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cavalieri* y *S. fragilis*, Q₉ en *Mucor corymbifer* y *Candida utilis*, y Q₁₀ en *Neurospora crassa*, especies en las que no fue detectado ningún tipo de menaquinona. No encontraron en cambio ubiquinona en *Streetomyces griseus*, pero sí filoquinona. PAGE y colaboradores (1960), detectaron Q₆ y Q₇ en *S. cerevisiae*, Q₆ en *S. ludwigii*, *Ashyba gossypii* y *Zigosaccharomyces barkerii*, Q₇ en *Endomyces lindneri*, *Endomycopsis fibuliger* y *Mycoderma monoxya* y Q₈ en *Mycoderma monoxya*; pero no observaron menaquinona en ninguno de ellos. ERICKSON y colaboradores (1960) detectaron Q₉ en *Agaricus campestris*, y una mezcla de Q₉ y Q₁₀ en *Ustilago zae*, donde tampoco se detectaron otras quinonas. GALE y colaboradores (1963), observaron la presencia de Q₁₀ en *Giberella fuckasoi*.

PACKTER y GLOVER (1960), detectaron Q₅₀ junto con un derivado de la misma (ubichromenol, (LAIDMAN y col., 1959)), en *Aspergillus fumigatus fresenius*, un hongo que también sintetiza otra quinona, fumigatina (ANSLOW y RAISTRICK, 1938).

LAVATE y colaboradores (LAVATE y col., 1962, 1964) demostraron la presencia de Q₁₀ en *A. fumigatus* y *Cl. fulvum*, Q₉ en *Aspergillus niger*, *Mucor abundans*, *P. brevicompactum*, *P. Chrysogenum*, *P. notatum*, y dehidro-Q₁₀ en *A. flavus*, *A. orizae*, *A. quadrilineatus*, *A. terreus*, *P. stipitatum*, *Neurospora crassa*, *Alternaria solani*, *Cephalosporium* sp., *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, y *Gibberella fujikuroi*.

El carácter funcional de la filoquinona no ha sido todavía demostrado en los hongos. Sí lo ha sido en cambio el de la ubiquinona, en preparaciones de *Claviceps purpurea*, donde se ha demostrado la pérdida de la actividad respiratoria al extraer con disolventes orgánicos, y la recuperación de la actividad perdida al añadir Q₁₀ (Anderson, 1964).

VI-2.—Material, metodología y productos.

2.1.—Cultivo.

La procedencia del germen, los sistemas utilizados para la obtención de conidios, gemas, micelio en superficie y profundidad se han descrito en el capítulo II.

2.—Extracción de lípidos.

La extracción del material lipídico se realizó esencialmente de acuerdo con el método n.^o 2 de los descritos por BISHOP y colaboradores (1962), mediante ebullición a reflujo, tres veces durante una hora, con cinco volúmenes de metanol con 0,25 % de pirogalol. A los extractos reu-

nidos se les adicionó tres volúmenes de agua y el conjunto se extrajo cuatro veces con éter libre de peróxidos, preparado según se describe en el capítulo II. El éter fue subsiguientemente lavado 4 veces con agua, deshidratado sobre sulfato sódico anhidro y evaporado bajo corriente de nitrógeno.

3.—Purificación cromatográfica.

El extracto lipídico fue cromatografiado sobre alúmina lavada con ácido, de grado Brockmann III, en la relación aproximada de 1 mg. de lípido por gramo de alúmina. Las muestras se aplicaron disueltas en éter de petróleo y la elución se efectuó generalmente con la siguiente serie eluotrópica:

— E. P., 2 % E. e./E. P., 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 15 %, 30 % y 100 % de E. e.

Los volúmenes utilizados de estos eluyentes fueron de 10 : 1 (v/p) respecto del adsorbente usado.

Las fracciones eluidas fueron espectrofotométricamente examinadas disueltas en ciclohexano.

4.—Determinación de ubiquinona.

Las fracciones que se presumía contenían ubiquinona, fueron disueltas en etanol espectrofotométricamente puro y sometidas a reducción con borohidruro para el cálculo del contenido en ubiquinona, según se describe en la metodología general.

5.—Identificación de la ubiquinona.

Se efectuó por cromatografía en capa fina en gel de sílice impregnado en parafina líquida, (véase Cap. II), precedida de una cromatografía en lámina fina de sílice gel no impregnado (véase la Metodología general).

6.—Saponificación del éster de ergosterol.

Se disolvió la muestra en 0,25 mls. de éter etílico. Se le añadieron 4 mls. de etanol y 0,5 ml. de KOH al 60 %. Se hirvió a reflujo durante 10 minutos; se le añadieron 3 volúmenes de agua y se extrajo cuatro veces con éter etílico libre de peróxido.

VI-3.—Resultados.

3.1.-Conidios sin germinar

1.—Experimento n.^o 1

A partir de 5 grs. con un residuo seco de 1,5 grs. de los que se obtuvieron 14,6 mgrs. de extracto lipídico.

Ante la dificultad de su disolución en éter de petróleo, se disolvió el extracto, de nuevo en metanol, al que se añadió un 5 % de agua y se le sometió a una triple extracción con éter de petróleo, obteniéndose así 13,6 mgrs. que fueron cromatografiados.

No se detectaron indicios de la presencia de naftoquinonas. La fracción del 4 %, que presentaba indicios de la presencia de Q, fue reducida con borohidruro (véase pág. 53) calculándose así su contenido en ubiquinona, en 0,01725 μ moles de Q.

2.—Experimento n.^o 2

Los intentos de determinación de Q por este método, y con cantidades menores de conidios, no permitieron siquiera demostrar su presencia. Se intentó también realizar una determinación de Q por el método de REDFEARN y PUMPHREY (REDFEARN y PUMPHREY, 1960) a partir de una suspensión de conidios que contenía 400 millones/ml. El espectro obtenido, no mostraba indicios demasiado claros de Q, ni antes, ni después de la reducción con borohidruro.

3.—Experimento n.^o 3.

Se partió de 14 grs. de conidios (4,20 grs. de residuo seco) que liberaron un extracto lipídico de 49,0 mgrs.; 8 mgrs. resultaron totalmente insolubles en éter de petróleo. Los 41,4 grs. restantes fueron cromatografiados sobre 5 grs. de alúmina. Los detalles cromatográficos aparecen en la tabla 21.

Lo más característico de la cromatografía es la ausencia de una fracción con muestras claras de la presencia de ubiquinona. No obstante, las fracciones obtenidas con el 4 - 6 % de éter etílico en éter de petróleo, se disolvieron en etanol y se redujeron con borohidruro. La fracción del 4 % disolvieron en etanol y se redujeron con borohidruro. La fracción del 4 % no mostró modificaciones que pudieran acharcarse al cambio de Q a QH_2 . La fracción 6 % contenía trazas de Q que se calcularon en 0,05 μ mols.

No se observaron indicios de la presencia de naftoquinonas. Es en cambio destacable la presencia en las fracciones 2 y 4 % de una sustancia con máximos a 242 y 282 milimicras, y puntos de inflexión a 224, 265 y 312 milimicras.

TABLA 21

Cromatografía en alúmina del extracto lipídico de conidios de «*H. stellata*». (alúmina = 5 grs.; Extracto lipídico cromatografiado = 41,4 grs.)

	Fraccion	Peso	
1	Eter de petról.	1,2 mgrs.	Céreo incoloro.
2	2 % E. e./E. P.	1,6 mgrs.	Amarillento oleoso, céreo.
3	4 % E. e./E. P.	1,9 mgrs.	Amarillento oleoso, céreo.
4	6 % E. e./E. P.	0,9 mgrs.	Oleoso céreo.
5	8 % E. e./E. P.	0,2 mgrs.	Céreo
6	10 % E. e./E. P.	0,8 mgrs.	Sólido, blanqueo.
7	15 % E. e./E. P.	Trazas	Sólido, blanqueo.
8	30 % E. e./E. P.	Trazas	Sólido, blanqueo.
9	Eter etílico.	Trazas	Sólido, blanqueo.

El bajo contenido en ubiquinona de las esporas de *H. stellata*, ha sido confirmado por LÓPEZ (1969), quien a partir de 60 grs. de conidios liofilizados, obtiene 800 microgramos de Q_{45} , es decir, 0,017 micromoles/grs. de residuo seco.

3.2.—Gemas.

1.—Experimento n.^o 1.

Se partió de 6,098 grs., de los que se obtuvieron 60,3 mgrs. de extracto lipídico que fue disuelto en metanol y sometido a partición con éter de petróleo; se obtuvieron así 25,1 mgrs. que fueron cromatografiados. No se observaron indicios de naftoquinonas. Del E_{275} (oxidado-reducido) con borohidruro potásico de la fracción que mostraba indicios de presencia de ubiquinona, se calculó su contenido que resultó ser de 0,1287 micromoles.

2.—Experimento n.^o 2.

Se partió de 44 grs. de gemas de las que se obtuvo un extracto lipídico de 452 mgrs. De éstos, sólo 245,5 mgrs. pudieron disolverse en éter de petróleo, que se cromatografiaron sobre una columna de 20 gramos de alúmina.

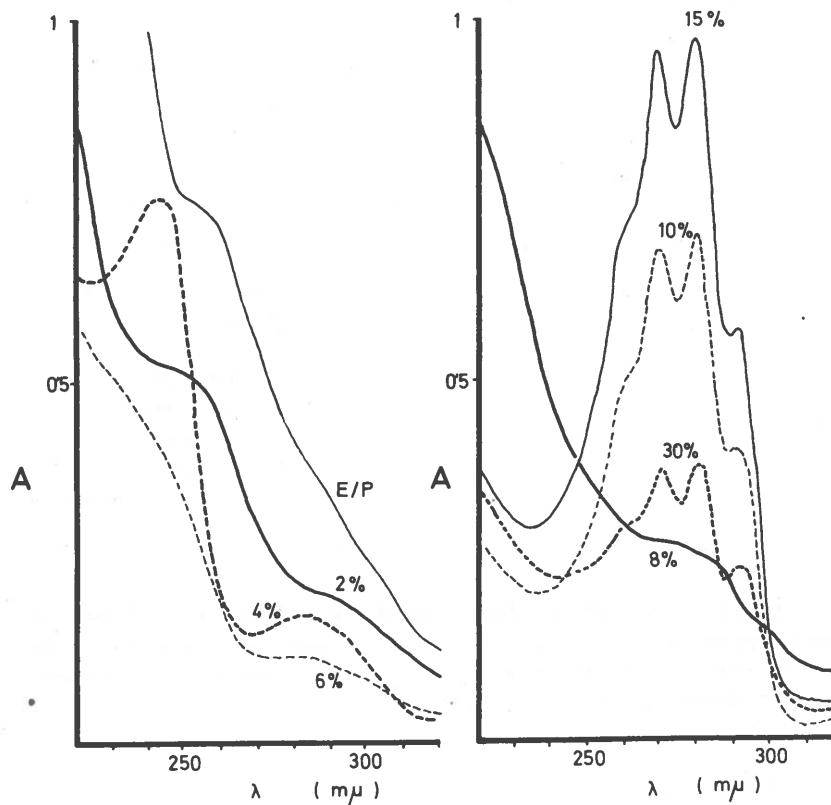


Fig. 41.—Espectros, en ciclohexano, de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de conidios sin germinar (residuo seco = 6,44 grs.).

Fracción	Ml.	Fracción	Ml.
E/P	5	8 %	3
2 %	5	10 %	15
4 %	30	15 %	8
6 %	12.5	30 %	5
		100 %	2,5

Los detalles de la cromatografía aparecen en la tabla 22.

Tampoco se observan indicios de la presencia de naftoquinonas, pero sí claras de ubiquinona, en las fracciones 4, y 6 %, que disueltas en etanol dieron los espectros oxidados y reducidos de la Fig. 43, a partir de los que se calculó un contenido en ubiquinona de 2,093 micromoles.

TABLA 22

Cromatografía del extracto lipídico, soluble en éter de petróleo, de 44 grs. de gemas.

(Extracto cromatografiado, soluble en éter de petróleo = 245,5 mgrs., procedente de 44 gramos de gemas; alúmina = 20 grs.; fracciones de 200 mls.).

Fracción	Peso	Aspecto
Eter de petróleo	10,4 mgrs.	Céreo incoloro.
2 % E. e./E. P.	7,5 mgrs.	Céreo amarillo
4 % E. e./E. P.	23,9 mgrs.	Céreo amarillo.
6 % E. e./E. P.	13,3 mgrs.	Céreo amarillo.
8 % E. e./E. P.	1,0 mgrs.	Céreo amarillo.
10 % E. e./E. P.	1,1 mgrs.	Céreo crema.
15 % E. e./E. P.	14,0 mgrs.	Sólido blanco.
30 % E. e./E. P.	9,1 mgrs.	Sólido blanco.
Eter etílico.	5,0 mgrs.	Sólido blanco.

TABLA 23

Cromatografía en alúmina del extracto lipídico del micelio cultivado en superficie

(alúmina = 40 grs.; extracto lipídico cromatografiado = 483,6 mgrs.)

Fracción	Peso	Aspecto
E. P.	16,0	
2 % E. e./E. P.	4,7	Coloración rosada.
4 % E. e./E. P.	24,4	Oleoso, rojizo.
6 % E. e./E. P.	59,4	Céreo, naranja.
8 % E. e./E. P.	6,1	Céreo, naranja.
10 % E. e./E. P.	5,2	Céreo, naranja.
15 % E. e./E. P.	22,1	Sólido blanquecino
30 % E. e./E. P.	30,7	Sólido blanquecino.
Eter etílico.	10,6	Céreo rojo.

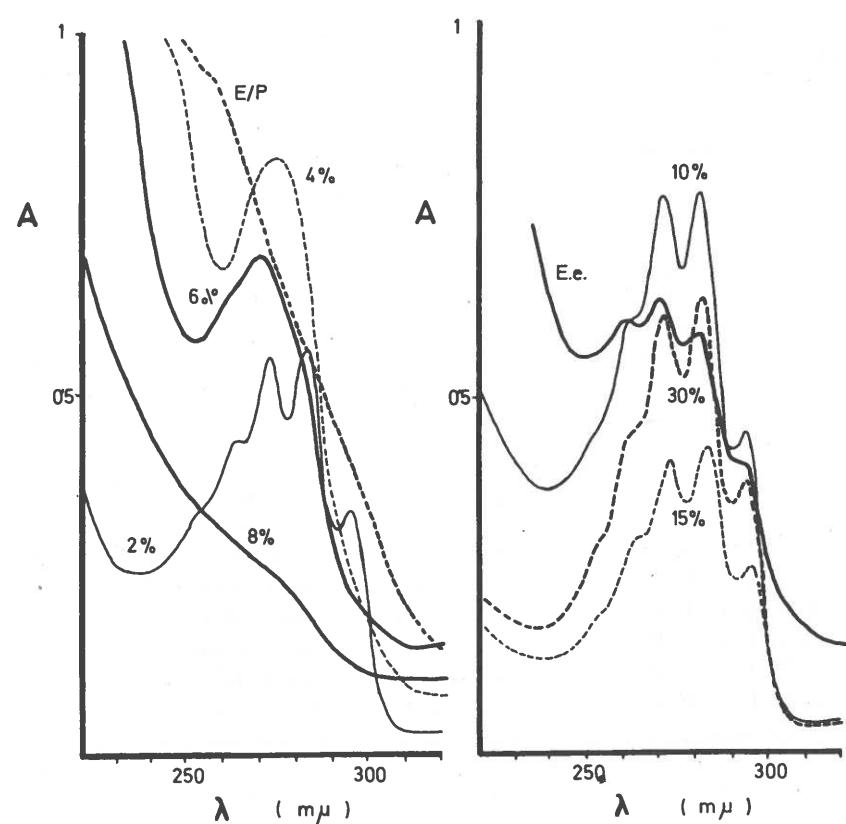


Fig. 42.—Espectros (en ciclohexano), de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de gemas.

Fracción	Ml.	Fracción	Ml.
E/P	18,0	10 %	15
2 %	11,2	15 %	500
4 %	50,0	30 %	270
6 %	75,0	Eter etílico	18 (en etanol)
8 %	7,0		

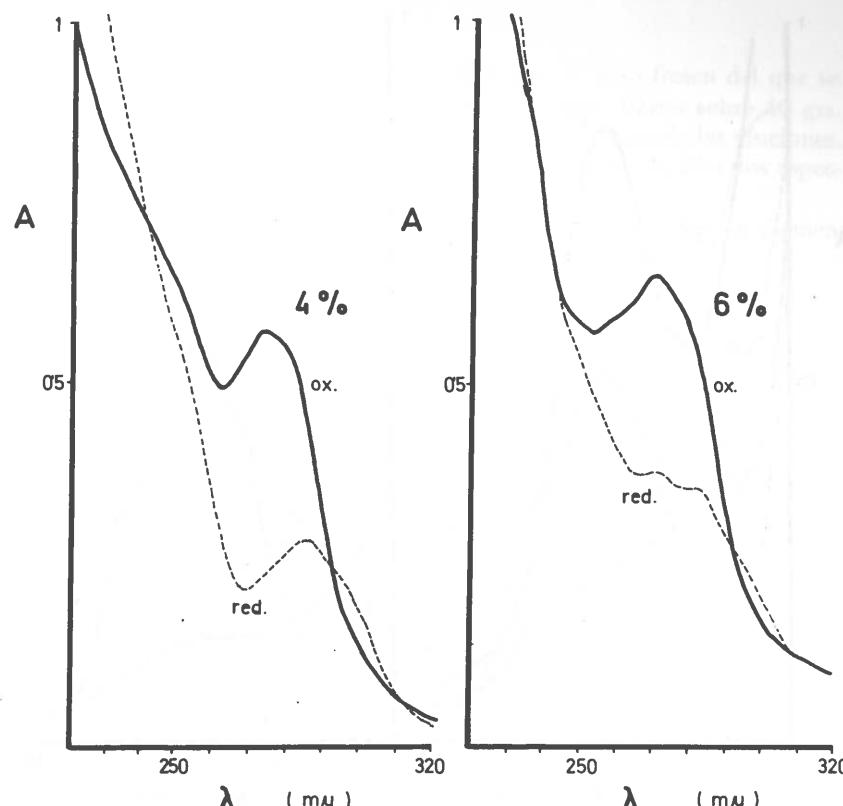


Fig. 43.—Espectros (en etanol) oxidados, y reducidos con borohidruro, de las fracciones cromatográficas 4 % y 6 %.

Fracción	Ml.
4 %	72
6 %	10

3.3.—Micelio de cultivos en superficie.

Inicialmente se realizaron tres experimentos.

El micelio se obtuvo sembrando el medio de cultivo de Vaisey con el 12 % de ClNa, con conidios obtenidos sobre agar malta, incubando 14 h. a 28°C y 90 agit./min., y manteniéndolos luego en reposo a esta temperatura durante 10 días. La recogida de micelio se efectuó por filtración a través de papel de filtro de pelo grueso, y se lavó con 5 litros de ClNa al 20 %. El micelio fue fuertemente prensado a mano entre hojas de papel de filtro; al peso en estas condiciones, es al que se le denomina aquí peso fresco.

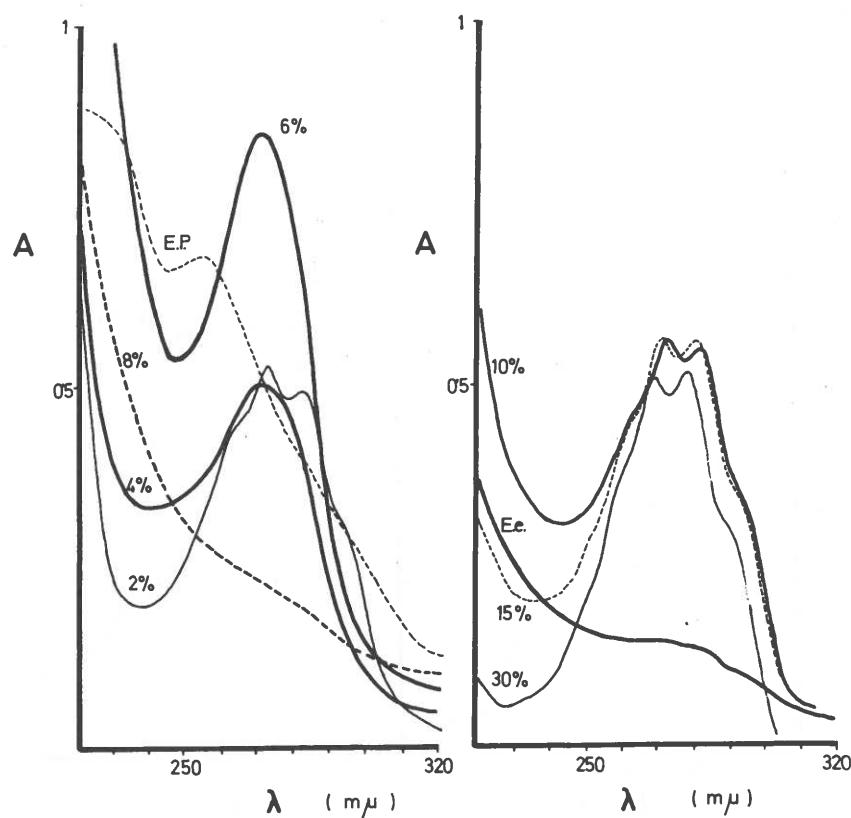


Fig.44.—Espectros, en ciclohexano, de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de micelio cultivado en superficie.

Fracción	ml.	Fracción	ml.
E./P.	100	10 %	25
2 %	290	15 %	300
4 %	50	30 %	720
6 %	254	Et. et.	65
8 %	25		

1.—Experimento n.º 1.

En este experimento se partió de 32,5 grs. de peso fresco del que se obtuvieron 483,6 mgrs. de lípidos que se cromatografiaron sobre 40 grs. de alúmina, recuperándose sólo 178 mgrs. en el producto de las eluciones. Los detalles de la cromatografía pueden verse en la Tabla 23 y los espectros de las distintas fracciones en la Fig. 44.

Las fracciones 8 %, 10 %, 15 %, y éter etílico, contenían un pigmento, cuyo espectro visible puede verse en la Fig. 45.

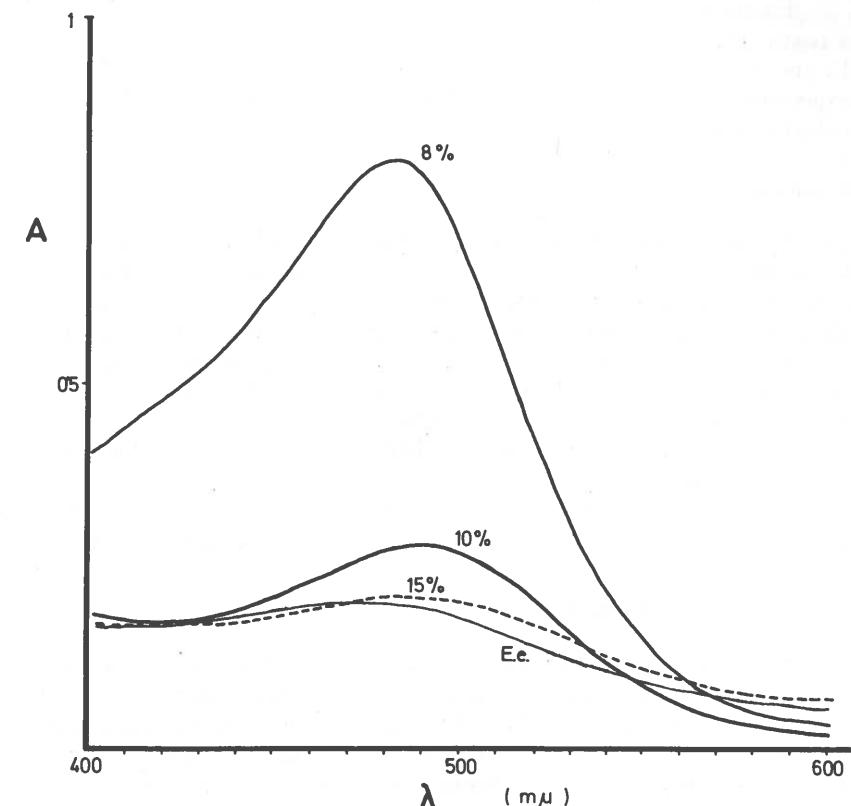


Fig.45.—Espectro visible, en ciclohexano, de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de micelio cultivado en superficie.

Fracción	ml.
8 %	2,5
10 %	2,5
15 %	5
Eter etílico	2,5

No se observaron pues, tampoco, indicios de la presencia de naftoquinonas, pero sí de ubiqüinona. Las fracciones de 4 % y 6 %, cuyo espectro se parece bastante al de la ubiqüinona, fueron disueltas en etanol espectrofotométricamente puro y reducidas con borohidruro. Se obtuvo así un ΔE_{275} (oxidado - reducido) de 255, que suponen 1,910 micromoles de ubiqüinona.

2.—Experimento n.^o 2.

En el experimento n.^o 2, se obtuvieron 249 mgrs. de extracto lipídico, a partir de 15 grs. de micelio, que se cromatógrafió en una columna de 15 grs. de alúmina. Se obtuvieron fracciones en todo semejantes a las del experimento anterior. No se observó indicio alguno de naftoquinona y se calcularon en 0,892, los micromoles de Q contenidos.

3.—Experimento n.^o 3.

En este experimento se partió de 43 grs. de micelio, del que se obtuvo un extracto lipídico de 648 mgrs. que fueron cromatografiados en una columna de 50 grs. de alúmina. Tampoco se observó indicio alguno de naftoquinona, y se calcularon en 2,84, los micromoles de Q contenidos.

Posteriormente se hicieron determinaciones en micelio muy joven (cultivado en superficie; de 4 y 6 días). Del micelio de cuatro días se usó 9,56 grs. que dieron un extracto lipídico de 99 mgrs., que cromatografiados en una columna de alúmina, dieron un contenido en ubiqüinona de 0,868 micromoles.

De 2 grs. de micelio de seis días, se obtuvieron 32 mgrs. de lípidos que tratados de igual modo, dieron un contenido en Q de 0,12 micromoles.

3.4.—Micelio cultivado en profundidad.

Se realizaron dos experimentos en los que las siembras se efectuaron en recipientes de 12 litros de capacidad, que contenían 9 litros de medio de cultivo de Vaisey con el 12 % de CINA; la aireación se efectuó por succión a través de dos placas de vidrio poroso (de poro grueso, 150-200 micras). El cultivo se mantuvo a 25°C durante 60 horas, en un baño de agua. La recogida se efectuó por sedimentación y centrifugación.

1.—Experimento n.^o 1.

En el primer experimento, se recogieron 51 grs. de micelio que dieron 1,152 mgrs. de lípidos, de los que 224 no se aplicaron a la columna por su insolubilidad en éter de petróleo. Los 958 restantes, se cromatógrafiaron sobre 60 grs. de alúmina. No se observó señal alguna de la presencia de

naftoquinonas y sólo indicios de ubiqüinona en las fracciones eluidas con el 4 % y 6 % de E. e./E. P., cuyos espectros demostraban que se trataba de fracciones excesivamente impuras para intentar el cálculo directo del contenido en Q. Estas fracciones se reunieron y fueron recromatografiadas sobre 7 grs. de alúmina Brockmann grado I, y eluidas con 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, y 50 % de E. e./E. P. Las fracciones 2 %, 4 % y 12 % mostraban una absorción inespecífica; las de 6 % y 8 % dieron un espectro con máximas a 262, 272, 282 y 292 m μ , que aparece en todas las cromatografías. La fracción eluida con 16 % E. e./E. P., mostraba el espectro característico de la ubiqüinona. De la diferencia entre los espectros oxidado y reducido, en etanol, se calculó su contenido en Q, en 0,252 micromoles.

2.—Experimento n.^o 2.

Se recogieron 36 grs. de micelio, del que se obtuvieron 693 mgrs. de lípidos que se cromatógrafiaron sobre 15 mgrs. de alúmina verificando la elución con la serie eluotrópica standard. Los detalles cromatográficos más destacados aparecen en la Tabla 24 y los espectros de las distintas fracciones, en la Fig. 46. Las fracciones eluidas con 4 % y 6 % fueron recromatografiadas sobre alúmina Brockmann I que fue sometida a la serie eluotrópica descrita en el experimento anterior. Se calculó el contenido en ubiqüinona en 0,0756 micromoles.

TABLA 24
Cromatografía del extracto lipídico de 36 gramos de micelio cultivado en profundidad.
(alúmina = 15 grs.; extracto lipídico = 193 mgrs.)

Fracción	Peso	Aspecto
Eter de petróleo	17 mgrs.	Céreo amarillento.
2 % E. e./E. P.	4,6 mgrs.	Amarillento oleoso.
4 % E. e./E. P.	2,4 mgrs.	Rosado.
6 % E. e./E. P.	4,3 mgrs.	Rosado.
8 % E. e./E. P.	10,5 mgrs.	Sólido blanquecino.
10 % E. e./E. P.	28,5 mgrs.	Sólido blanquecino.
15 % E. e./E. P.	5,6 mgrs.	Sólido blanquecino.
30 % E. e./E. P.	9,2 mgrs.	Sólido blanquecino.
Eter etílico.	3,4 mgrs.	Sólido blanquecino.

En la Tabla 25 se recogen los datos del peso seco y se expresa el contenido en ubiqüinona en términos de micromoles por gramo de peso seco.

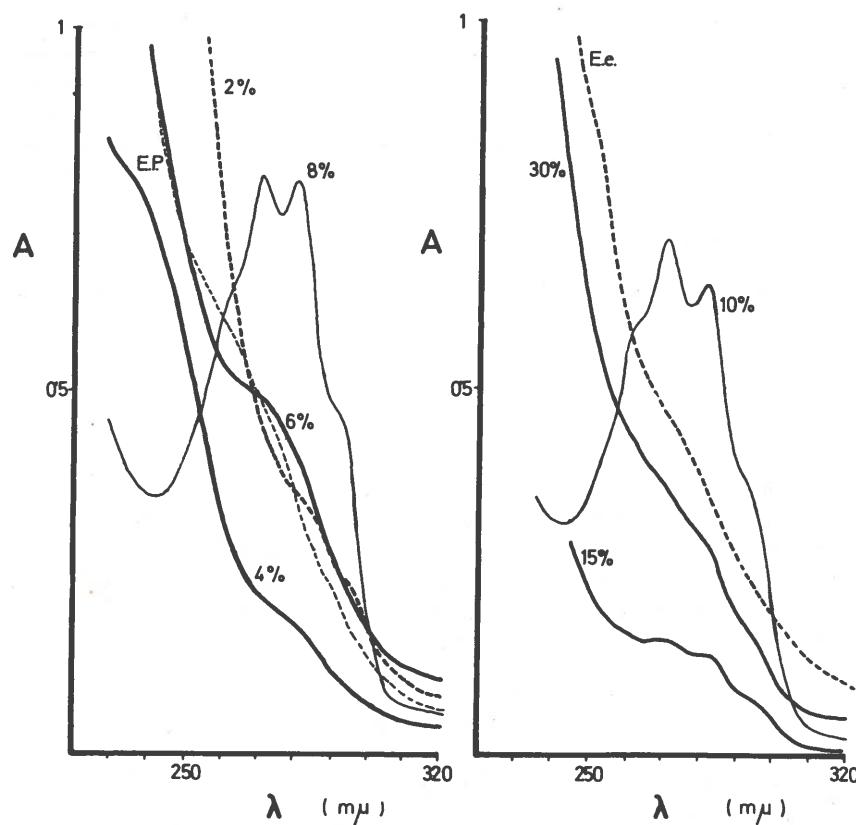


Fig. 46.—Espectros (en ciclohexano), de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de micelio cultivado en profundidad.

Fracción	ml.	Fracción	ml.
E/P	42	8 %	42
2 %	30	10 %	42
4 %	50	15 %	30
6 %	15	30	15
Et. et.			

3.5.—Identificación de la ubiquinona.

Las fracciones de los distintos experimentos, que contenían ubiquinona fueron independientemente cromatografiadas en láminas de gel de sílice de 250 micras, impregnadas en vaselina (según se describe en la metodología general), junto con patrones de Q₄₅, Q₅₀ y Q₂₅. Las cromatografías se desarrollaron con acetona: agua, 9 : 1 (v/v), saturada de parafina, y fueron reveladas con leuco-azul de metileno, según la técnica descrita por GOODWIN (1964).

Las muestras corrían consistentemente menos que todos los patrones. Véase en la Fig. 48, la cromatografía correspondiente a una muestra pro-

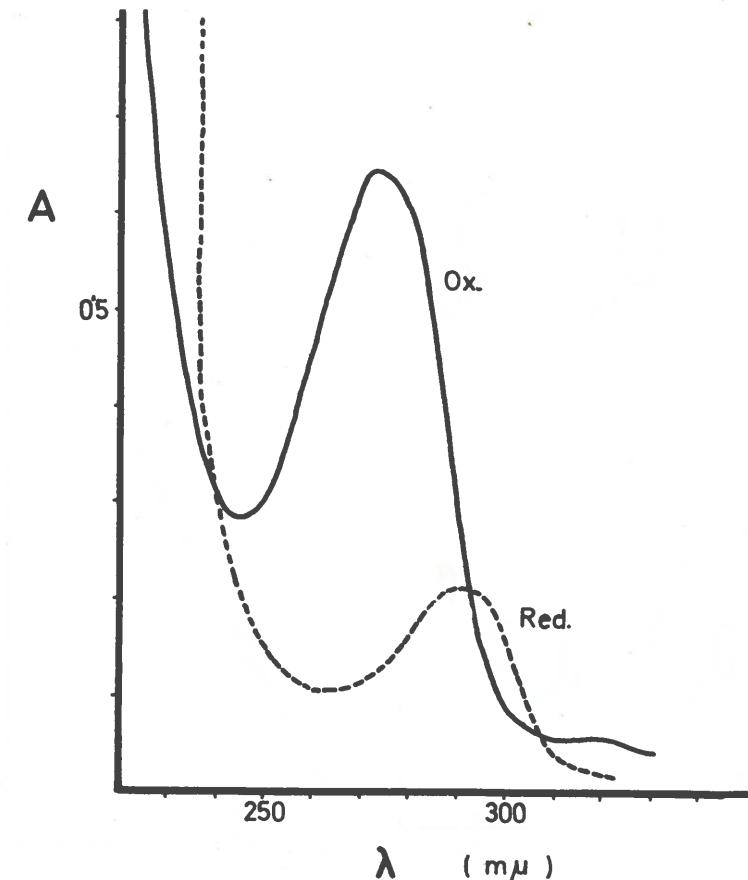


Fig. 47.—Espectros oxidado y reducido de una muestra de ubiquinona, purificada en lámina fina, utilizada para la identificación del homólogo correspondiente. (Espectros en etanol).

cedente del experimento número 1 de micelio cultivado en superficie, de la que podría deducirse que se trataba de una quinona de cadena con más de 10 restos de isopreno. Es un fenómeno bastante corriente que las muestras de ubiquinona insuficientemente purificadas den un R_f inferior al que les corresponde (véase JONES y REDFEARN, 1966). Se sometieron por ello, las fracciones reunidas, a una purificación previa por cromatografía en lámina fina de gel de sílice (250 micras) no impregnada. Las láminas se prepararon según se describe en la metodología general.

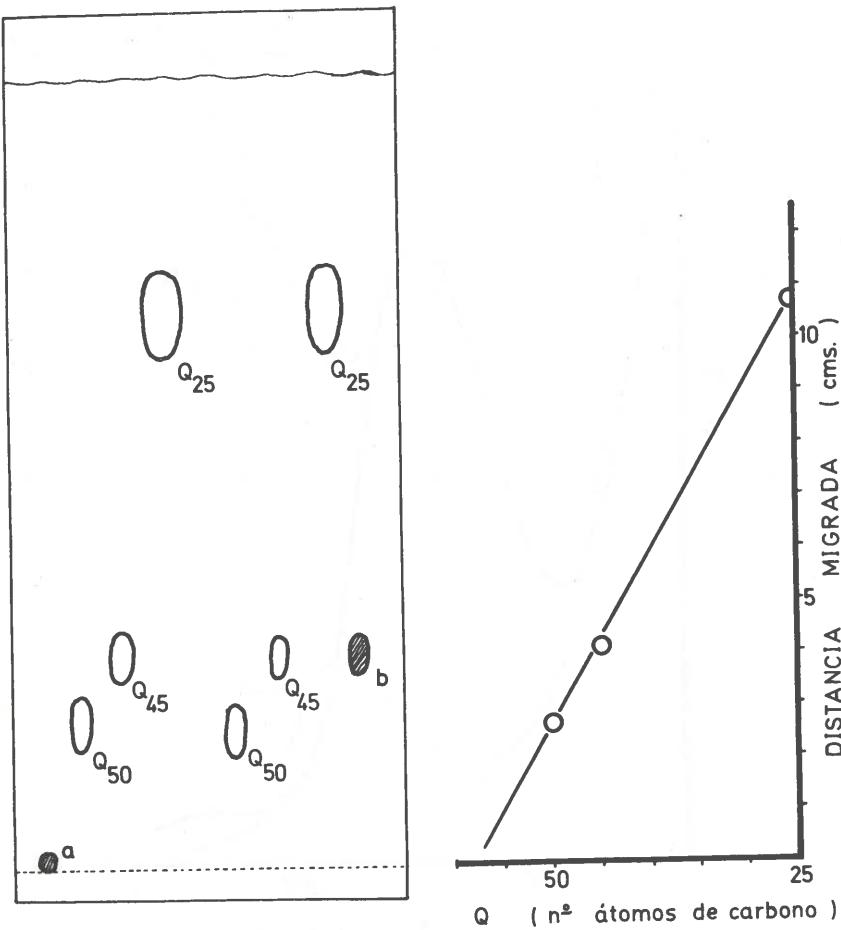


Fig. 48.—Cromatografía en lámina fina, de gel de sílice impregnada en vaselina, de las muestras de Q, sin purificar (a), y purificadas (b), y patrones de Q_{25} , Q_{45} , Q_{50} .

La ubiquinona (perfectamente visible) fue eluida con éter etílico libre de peróxidos. Véase en la Fig. 47 un espectro en etanol.

Una muestra de la ubiquinona así preparada fue cromatografiada en láminas impregnadas en parafina líquida, con patrones de Q_{45} , Q_{50} y Q_{25} . En la Fig. 48 puede verse el cromatograma correspondiente, que demuestra que se trata de Q_{45} .

3.6.—Identificación de las sustancias responsables de la extinción a 262, 271, 282 y 293 milimicras.

Los espectros de absorción de las fracciones eluidas con 2 % de éter etílico en éter de petróleo, correspondiente a las cromatografías de los extractos lipídicos de gemas y de micelio en superficie, y los de las fracciones eluidas después de la ubiquinona en las demás, están dominados por las máximas citadas, características de los esteroides Δ 5 : 7 dieno.

TABLA 25
Contenido en quinonas en *H. stellata* en diversas fases de desarrollo.

Residuo seco (g.)	Lipidos (mgr.)	Q_{45}		Otras quinonas	Ext. lip. Residuo seco (%)	Quinonas Ext. lip. (%)
		μ gr.	μ mol./resid. seco			
Conidios	1,50	14,6	13,8	0,0115	NO	0,973 0,0945
	4,20	49,0	39,0	0,0116	NO	1,165 0,0796
Gemas	1,26	60,3	162,3	0,1620	NO	4,780 0,2693
	9,25	452,0	1.660,0	0,2260	NO	4,890 0,3670
Micelio cult. en profund.	10,25	1.152,0	197,0	0,0245	NO	11,25 0,0171
	7,20	693,0	59,0	0,0104	NO	9,62 0,0025
Micelio cult. en superfic.	4 días	2,60	99,0	690,0	0,334	NO 3,81 0,6975
	6 días	0,524	32,0	99,2	0,237	NO 6,11 0,3101
	10 días	11,27	648,0	2.219,0	0,252	NO 5,77 0,3420
	10 días	3,93	249,0	711,0	0,227	NO 6,35 0,2860
	12 días	8,51	483,6	1.557,0	0,230	NO 5,68 0,3220

Las fracciones más polares que la ubiqüinona fueron cristalizadas cinco veces en éter de petróleo. Los cristales, examinados al microscopio, mostraban forma de agujas, y su punto de fusión era de 162°C., propiedades ambas, características del ergosterol.

Las fracciones menos polares, se supuso eran ésteres del ergosterol; para confirmarlo, se procedió a saponificar una muestra, que fue cromatografiada después sobre alúmina Brockmann III. Las fracciones eluidas antes del 8 % de éter en éter de petróleo, no mostraban indicio alguno de esta sustancia; las de 10-15 % sí, lo que confirma la hipótesis.

VI-4.—Discusión.

El *H. stellata*, como todos los hongos examinados hasta ahora, con excepción de *Streptomyces griseus* (LESTER y CRANE, 1959), carece de naftoquinonas, pero posee ubiqüinona.

Al igual que los *Penicillium brevicompactum*, *P. Chrysogenum*, *P. notatum*, *Aspergillus niger*, *Mucor abundans*, y *Mucor corymbifer*, sólo posee el homólogo Q₉.

Se observan con toda claridad profundas transformaciones en el contenido en ubiqüinona a medida que el micelio progride.

Los valores hallados en los conidios (0,012 micromoles/gramo de peso seco) son muy inferiores a los valores descritos por LESTER (LESTER y CRANE, 1959), PAGE (PAGE y col., 1960), LAVATE y BENTLEY (1964), y CRANE (1965) en los micelios de otros hongos. Durante el proceso de germinación, esta cifra se eleva de un modo considerable alcanzando valores unas 10 veces superiores; más adelante, en los cultivos en profundidad, la cifra vuelve a descender de un modo muy acusado.

Las cifras más discutibles entre las que aquí se presentan, son las referentes al estudio del desarrollo que hemos denominado de gemas, dadas las grandes dificultades que presenta la sincronización del crecimiento de estos hongos. En el momento en que el cultivo fue detenido para el análisis (18 horas), se calcula que el 60-70 % de los conidios se hallan aún sin germinar (véase pág. 77) en tanto que algunas hifas han alcanzado longitudes de hasta 20 micras. Teniendo en cuenta estos hechos se puede calcular que el incremento en el contenido de ubiqüinona durante el proceso de germinación, es considerablemente superior al que las técnicas experimentales usadas permiten detectar.

Por razones parecidas, el desarrollo en el contenido en ubiqüinona durante fases más avanzadas del crecimiento en profundidad debe ser más acusado que el que aquí se ha puesto de manifiesto. Sin duda el proceso de germinación va acompañado de una considerable síntesis de ubiqüinona imprescindible para hacer frente a las nuevas exigencias energéticas; esa síntesis debe, por alguna razón, cesar luego en los cultivos en profundidad. Apenas si existen datos bibliográficos relativos a estudios

similares con los que puedan cotejarse nuestros resultados. Es bien sabido, sin embargo, que la tasa de ubiqüinona alcanzada en los tejidos de los distintos organismos varía considerablemente con múltiples circunstancias ambientales. HEMMING y PENNOCK (1965), han recogido los datos correspondientes a estas variaciones en el reino animal. En el mundo de los microorganismos, TAKEDA y col. (1968), han puesto de manifiesto un incremento progresivo con la edad, de los niveles de ubiqüinona en *Achromobacter*, y CRANE (1962) observa un proceso semejante en *Tetrahymena pyriformis*. KNOWELS y REDFEARN (1968), observan ciertas modificaciones en el contenido, en los distintos componentes de la cadena respiratoria al modificar la fuente de nitrógeno utilizada para los medios de cultivo, y C. WHITE (1967), los que acompañan a las modificaciones de la fuente carbonada.

Las variaciones experimentales en los niveles de ubiqüinona en las distintas fases de crecimiento de *H. stellata* guardan una correlación bastante estrecha con las variaciones observadas en la aptitud respiratoria, que se describen en el capítulo II. Es posible que las oscilaciones en el contenido de ubiqüinona sean los causantes de las variaciones experimentadas por su capacidad respiratoria aunque también es posible, por el contrario, que la síntesis de ubiqüinona cese, al dejar de ser necesaria como consecuencia de la menor actividad respiratoria del micelio adulto.

Se observa también una notable divergencia entre el contenido de ubiqüinona de las hifas según el sistema de cultivo. En las hifas crecidas en superficie, alcanzan valores de 15 a 30 veces superiores a los que se hallan en los cultivos en profundidad con aireación abundante. SUCIMURA y RUDNEY (1960), LESTER y CRANE (1959), BISHOP y col. (1962), demostraron considerables variaciones en el contenido en Uq de *Saccharomyces* y *Staphylococcus aureus* desarrollados en aerobiosis y anaerobiosis, y LESTER y CRANE (1959), no hallan Q en *E. coli B*₉ anaeróbicamente desarrollado, y encuentran hasta 0,24 micromoles/gramo de peso seco cultivado en aerobiosis.

Es de creer, por tanto, que los niveles muy altos alcanzados por los niveles de Q₄₅ en el micelio cultivado en superficie, sean un reflejo de su superior disponibilidad de oxígeno que debe dirigir su metabolismo por rutas mucho más aeróbicas.

Los cultivos en superficie muestran claramente también, un incremento del contenido en ubiqüinona con la edad.

Aunque al margen del interés principal de este estudio, son dignas de anotarse algunas otras modificaciones sufridas por los lípidos a lo largo del progreso del micelio. En las esporas existe una cantidad notable de éster de ergosterol, que también abunda mucho en las gemas y en los cultivos en superficie. En las esporas, en cambio, se presenta una sustancia, cuya caracterización no hemos intentado, con máximas (en

ciclohexano) a 245 y 285, que no se observa en los espectros de ningún otro estadio de desarrollo del hongo. En cierta medida, la no observación de la misma, es consecuencia de la presencia del éster de ergosterol. Las cromatografías del producto de saponificación de las fracciones que contienen el éster del ergosterol, separan ambas sustancias y sólo en ocasiones, en los cultivos en profundidad, se observan trazas de la misma, que muy bien pudieran ser consecuencia de la presencia de esporas sin germinar.

CAPITULO VII

VII.—CITOCROMOS Y FLAVINAS

VII-1.—INTRODUCCION.

El nombre de «citocromos» fue utilizado por primera vez por KEILIN (1925), para designar un grupo de hemoproteínas, descubiertas por él en el músculo del corazón del caballo, que en su forma reducida presentaban un espectro característico en la zona visible.

En la actualidad, se entienden por tales, de acuerdo con la «Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry» (1961), las hemoproteínas cuya función biológica principal es el transporte de electrones y/o de hidrógeno, en virtud de un cambio de valencia reversible en el átomo de hierro de su grupo «hemo»; y por «hemoproteínas», «las proteínas cuyo grupo prostético está formado por un anillo tetrapirrólido unido a un átomo de hierro». Es decir, se consideran citocromos, todas las hemoproteínas celulares, a excepción de la hemoglobina, mioglobina, peroxidasa y catalasa.

Estos compuestos han suscitado un enorme interés, y han sido investigados en multitud de sistemas biológicos, conociéndose en la actualidad unos 20 citocromos, aislados de orígenes muy diversos.

Se han propuesto múltiples sistemas de clasificación (R. SCARISBRICK, 1947; F. EGAMI y col., 1957, etc...), adoptándose finalmente el esquema propuesto por la mencionada Comisión de Enzimas, que se basa en la estructura del grupo prostético de la molécula. De acuerdo con estas normas, los citocromos han sido clasificados en cuatro grupos: A, B, C, y D, que representan la especial distribución y características de los radicales en el anillo tetrapirrólido que constituye la fracción prostética de la molécula.

A pesar de las normas establecidas por la Comisión de Enzimas, para la clasificación de los citocromos, existe todavía la dificultad de que como la estructura molecular de algunos de ellos es aún desconocida, se han clasificado de acuerdo con su origen, peso molecular, características de

su espectro (situación de la banda « α », que está muy influida por la naturaleza del grupo prostético, y de la banda « γ » o banda de Soret), solubilidad, capacidad autoxidativa a diferentes pH, potencial de oxidoreducción, reacciones con el CO, CN, H₂O₂, ditionito, cisteína, polifenoles, ascorbato, etc...

Los citocromos del tipo «a» suelen tener su banda « α » a longitudes de onda superiores a 590 m μ , los del tipo «b» a partir de 554 m μ , y los del tipo «c», más allá de 550 m μ . El espectro de absorción del citocromo c del corazón de caballo se considera como espectro «típico» de los citocromos.

Su reactividad frente al O₂ es muy diversa; los del tipo «b», suelen ser autoxidables, mientras que los del tipo «a» y «c» son estables en presencia de O₂. Sin embargo, existen excepciones a estas normas generales, pues los citocromos «a₂», «c₃» y «CD», son autoxidables y también el «c» a pH inferiores a 4 y superiores a 12.

La mayoría de los citocromos, son muy poco solubles, y se requieren procedimientos drásticos de extracción.

El citocromo «c», a excepción de lo que ocurre con el resto de los citocromos, es muy soluble, y quizás sea éste el motivo de que fuera el primero en ser descubierto. (KEILIN, 1925).

La función típica de los citocromos en el metabolismo celular, está perfectamente aclarada (véase pág. 19).

El estudio de los citocromos se ha visto considerablemente facilitado en los últimos tiempos, por el perfeccionamiento de las técnicas analíticas.

Para su determinación, se han introducido nuevas técnicas espectrofotométricas como las de obtención de los espectros diferenciales (citocromo-reducido — citocromo-oxidado), que son característicos (CHANCE, 1952), (SMITH, 1954, a, b, y c), y los registros a temperatura del aire o nitrógeno líquidos (D. KEILIN y E. F. HARTREE, 1949; ESTABROOK, 1961; CHAIX y PETIT, 1956), que aumentan enormemente la capacidad resolutiva de los instrumentos.

Para el cálculo del contenido en citocromos, se han empleado índices como los descritos por CHANCE (1952), MARGOLIASH (1954), MASSEY (1959) y WILLIAMS (1964).

La primera dificultad con que se tropieza en el estudio de los citocromos, es la dificultad de su solubilización, lo que exige la ruptura previa de las paredes celulares. Los procedimientos más difundidos son: la rotura por ultrasonidos (KATOH, 1959; HONDA y col., 1961; HOLTON y MYERS, 1967, etc...) y mediante la prensa de French (JONES y REDFEARN, 1966 etc...). En algunos casos en los que los citocromos son muy solubles, han dado buenos resultados, la simple extracción acuosa de los materiales de origen (YAMANAKA y col., 1967). En otras ocasiones han sido necesarias manipulaciones previas como la extracción de las grasas (POSTGATE,

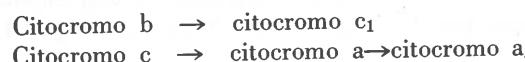
1956; ISHIMOTO y col., 1954; NEWTON y KAMEN, 1956), la solubilización por butanol (TISSIÉRES y BURRIS, 1956; TISSIÉRES, 1956; MORTON, 1958), el tratamiento por detergentes, o la extracción alcalina (KAMEN y VERNON, 1954). Para la subsiguiente purificación se han utilizado técnicas diversas que van desde las clásicas precipitaciones por el sulfato amónico, hasta las técnicas más modernas y refinadas como son las cromatografías de intercambio iónico con polímeros de la celulosa (SHETNA y col. 1966; PERINI y col. 1964; YAMANAKA, 1967; y KAWAI, 1961), y las filtraciones moleculares (SHETNA, 1966).

Utilizando estas técnicas, HAGIHARA, OKUNIKI y col. (1956, 1957, 1958 y 1959), han logrado purificar y obtener en estado cristalino, citocromo c de diversos tejidos animales, levaduras y semillas de trigo. En estado cristalino se ha obtenido el citocromo b_2 de las levaduras (APPLEBY y MORTON, 1959). En elevado estado de pureza, se han aislado también muchos otros citocromos (HOLTON y MYERS, 1967; YAMANAKA, KLERK y KAMEN, 1967; PERINI y KAMEN, 1964, etc...).

De este modo se han podido estudiar detalladamente las propiedades físico-químicas de los diversos citocromos y hasta la secuencia de aminoácidos de su fracción proteica (MARGOLASH, EMIL SMITH, KREIL and TUPPY, 1961; AMBLER, 1962).

La identificación de los citocromos «in situ», en las células enteras o en las partículas celulares en que están localizados (mitocondrias y fragmentos de membranas) se ha visto facilitada por la existencia de espectrofotómetros provistos de dispositivos que eliminan los problemas de la dispersión lumínosa (LINDENMAYER y SMITH, 1964; BRAGG y POLGLASE, 1963; SMITH, 1954). WILLIAMS (1964) ha desarrollado una técnica que permite la determinación simultánea de citocromos «a», «b», «c₁» y «c».

Los primeros citocromos descubiertos fueron los de las células de los mamíferos, que contienen por lo menos cinco tipos de citocromos que por sus potenciales de oxidorreducción y secuencia de actuación se ordenan así:



El sistema citocrómico de los diversos microorganismos se halla considerablemente sujeto a variaciones específicas y ambientales (sistemas de cultivo, nutrientes, aireación, etc...) (SMITH, 1961). Las variaciones son tan acusadas que en tanto algunos microrganismos como el género *Nitrobacter*, o el *Ustilago zeae* tienen un contenido muy elevado en citocromo c, otros carecen de él (SMITH, 1954).

Los sistemas citocrómicos mejor estudiados, son los de algunas bacterias, como *Azotobacter vinelandii* (TISSIÉRES, 1956; TISSIÉRES y BURRIS, 1956; JONES y REDFEARN, 1966), *Micrococcus denitrificans* (KAMEN

y VERNON, 1954), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas denitrificans* (KAMEN y VERNON, 1954), *Pseudomonas fluorescens* (LENHOFF y KAPLAN, 1956), y otros muchos, habiéndose observado la existencia de innumerables tipos de citocromos a los que se suele conocer con la letra correspondiente a su grupo «hemo» y la longitud de onda del pico de su banda « α ».

El sistema citocrómico de los hongos es muy semejante al de las células de los mamíferos y aves, y difiere bastante del de las bacterias y las plantas (CONN, 1960; DOLIN, 1961).

Los estudios llevados a cabo con hongos, se han centrado principalmente sobre dos especies, el *Saccharomyces cerevisiae* y los *Neurospora*, pero también se han detectado citocromos en otras especies. BOULTER y DERBYSHIRE (1957), estudiaron el espectro visible de 45 hongos diferentes, que resultó ser muy semejante al de las levaduras. Se han encontrado también citocromos en el *Mycoderma vini* (CHAUDET, 1943), *Physarum polycephalum* (OHTA, 1954), *Fusarium lini* (KIKUCHI y BARRON, 1959), *Penicillium notatum* y *Neurospora crassa* (KEILIN y TISSIÉRES, 1953) y otros. Se desconoce totalmente el sistema citocrómico del *Sporendonema epizoum*.

VII-2.—FLAVOPROTEINAS

Introducción.

Las primeras flavoproteínas descubiertas (WARBURG y CHRISTIAN, 1932), fueron flavoproteínas transportadoras de electrones.

Las flavoproteínas son sustancias de color amarillo fluorescente formadas por un grupo prostético constituido en la mayoría de los casos por flavin-adenin-mononucleótido (FMN) y en algunos por riboflavina-5-fosfato, y por un grupo proteico específico para cada una de ellas. Su peso molecular es variable (240-700.000) y algunas poseen en su molécula, iones metálicos.

Algunas de estas sustancias desempeñan un papel importante en el transporte de H de diversas rutas metabólicas.

Poseen un espectro de absorción con una máxima a 450 m μ , responsable del color amarillo fluorescente, la cual sufre una pérdida considerable de extinción al reducirse, fenómeno en el que se basa el método espectrofotométrico de análisis cuantitativo de CHANCE y WILLIAMS (1955).

VII-3.—METODOS.

3.1.—*Obtención y almacenamiento del micelio.*

El micelio utilizado se obtuvo en erlenmeyer de 500 mls. con 100 ml. de medio de Vaisey, sembrados con una suspensión de conidios de 20-40

millones/ml., e incubados a 25°C. y 230 agit./minuto durante 18 horas. La recogida del mismo se efectuó por centrifugación ($1.800 \times g$.-5 minutos), lavándolo dos veces con tampón fosfato (0,1 M. pH 7,4). El micelio se almacenó a -20°C. hasta el acopio de una cantidad suficiente (2-3 semanas).

2.—Rupturas celulares.

Se efectuaron por trituración y tratamiento con ultrasonidos, según se describe en la pág. 50.

3.—Purificación de los citocromos solubilizados.

Se efectuó fraccionando la proteína solubilizada, por precipitación con sulfato amónico, eliminando éste por diálisis, y cromatografiando las fracciones en Sephadex G-100 y DEAE-celulosa.

4.—Determinación cuantitativa de citocromos y flavinas.

Se realizó mediante espectrofotometría diferencial, (espectros, reducido — oxidado) utilizando las técnicas de CHANCE y WILLIAMS (1955). Los detalles de la técnica pueden verse en la pág. 55.

VII-4.—RESULTADOS.

4.1.—Solubilización de los citocromos.

1.a.—Elección del sistema de ruptura.

Para la elección del mejor procedimiento de ruptura y solubilización, se compararon las cantidades de citocromo presentes en el sobrenadante de $100.000 \times g$.-90 minutos, tras la trituración, durante treinta minutos, y la sonicación durante el mismo tiempo.

Se tomaron 3,6 grs de micelio de 18 horas, que se suspendieron en tampón fosfato (pH 7,4, 0,1 M.) hasta un volumen de 12 ml. 6 mls. de la suspensión así obtenida se trituraron durante 30 minutos en el homogeneizador de cuchillas, y los otros seis se sonicaron, durante el mismo tiempo. Las suspensiones así obtenidas fueron centrifugadas durante 90 minutos a $100.000 \times g$. Los depósitos de la centrifugación se descartaron.

Véanse en la Fig. 49 los espectros correspondientes a los sobrenadantes obtenidos.

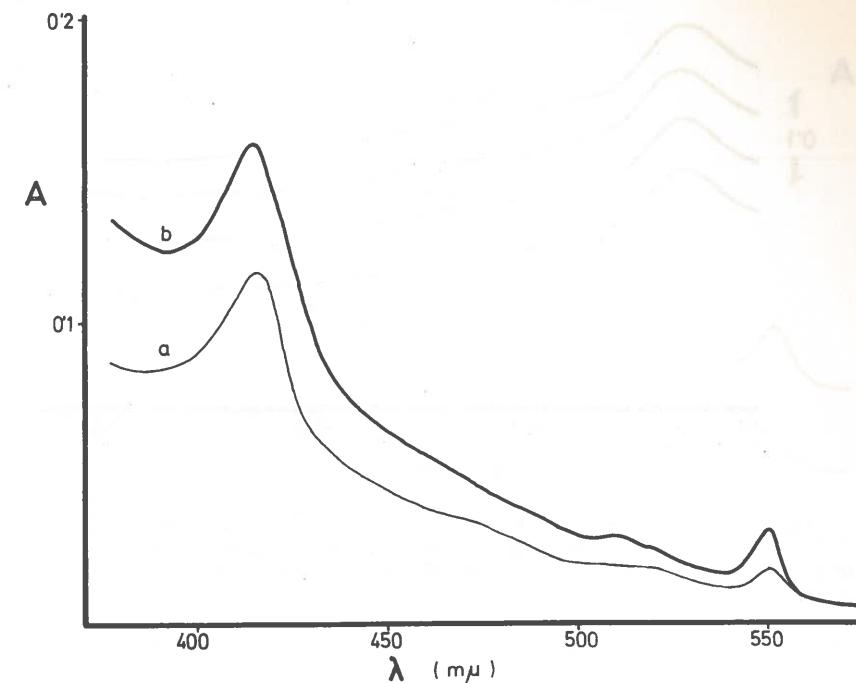


Fig. 49.—Solubilización de los citocromos de *H. stellata*.

— Espectros de los sobrenadantes de $100.000 \times g$.-90 minutos, de 1,8 grs. de micelio de 18 h. sometido durante 30 minutos a trituración (a) y sonicación (b), en 6 mls. de tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M.

Los sobrenadantes se ajustaron a 9 mls. de volumen.

Como la capacidad de extracción de ambos procedimientos no parecía justificar el empleo de ultrasonidos, que es mucho más engoroso para tratar grandes cantidades de material, el resto de las experiencias se efectuaron rompiendo las células con el homogeneizador de cuchillas

b.—Tiempo óptimo de trituración.

Se tomaron 24,78 grs. de micelio de 18 horas, que había permanecido en el congelador 5 días a -20°C., y se suspendieron en tampón fosfato pH 7,4, 0,1 M. a volumen final de 30 mls. Se separaron cuatro fracciones de 6 mls., que fueron trituradas en el homogeneizador de cuchillas, 2 minutos, 5, 12, y 30 minutos.

Se ajustó a 22 ml. el volumen de cada fracción, con el mismo tampón y se centrifugaron 90 minutos a $100.000 \times g$. Véanse en la Fig. 50 los espectros correspondientes.

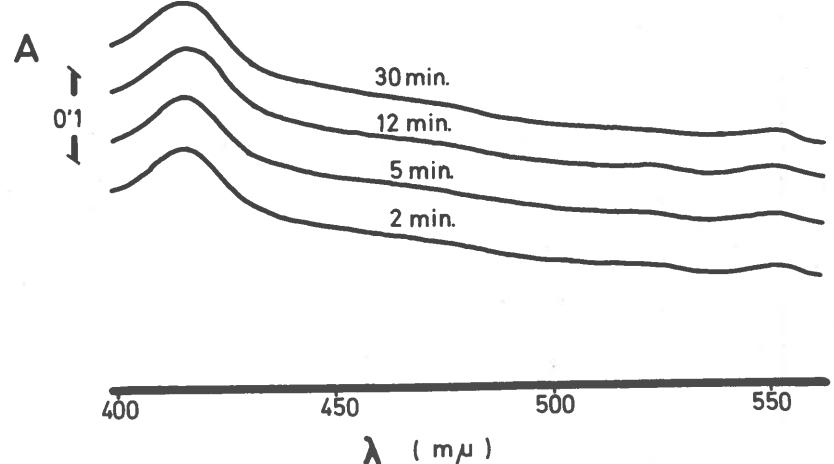


Fig. 50.—Solubilización de los citocromos de *H. stellata* por trituración.
—Espectro del sobrenadante de $100.000 \times g.$ 90 min. de 4 grs. de micelio de 18 horas, triturado en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., en volumen de 6 mls., durante : 2, 5, 12 ó 30 minutos.

c.—Influencia del medio de trituración en la solubilización de los citocromos.

Experimento n.º 1.—Se pesaron tres fracciones de 5 grs. de micelio, que se suspendieron en 12 mls. de agua destilada, tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., y tampón 0,2 M. Se tomaron 6,5 mls. de cada una de ellas, que se trituraron durante 3 minutos y seguidamente se centrifugaron 90 minutos a $100.000 \times g.$ enrasándolas previamente a volumen de 22 mls. Véanse en la Fig. 51, los espectros correspondientes a los sobrenadantes.

Experimento n.º 2.—Se tomaron 23,88 grs. de micelio que había permanecido en el congelador a $-20^{\circ}\text{C}.$ 4 días, y se prepararon cuatro fracciones de 3,5 grs. que se suspendieron en 8,7 mls. de tampón fosfato de pH 7,4, de las siguientes molaridades: 0,2 M., 0,4 M., 0,7 M., y 1 M. Se trituró cada fracción durante 3 minutos con el homogeneizador de cuchillas; se igualaron los volúmenes a 22 ml. con el mismo tampón y se centrifugaron seguidamente a $100.000 \times g.$, durante 90 minutos. Véase en la Fig. 52 los espectros diferenciales de los sobrenadantes, y en la Tabla 26, la concentración de citocromos, calculados como citocromo c por el método de CHANCE y WILLIAMS (1955).

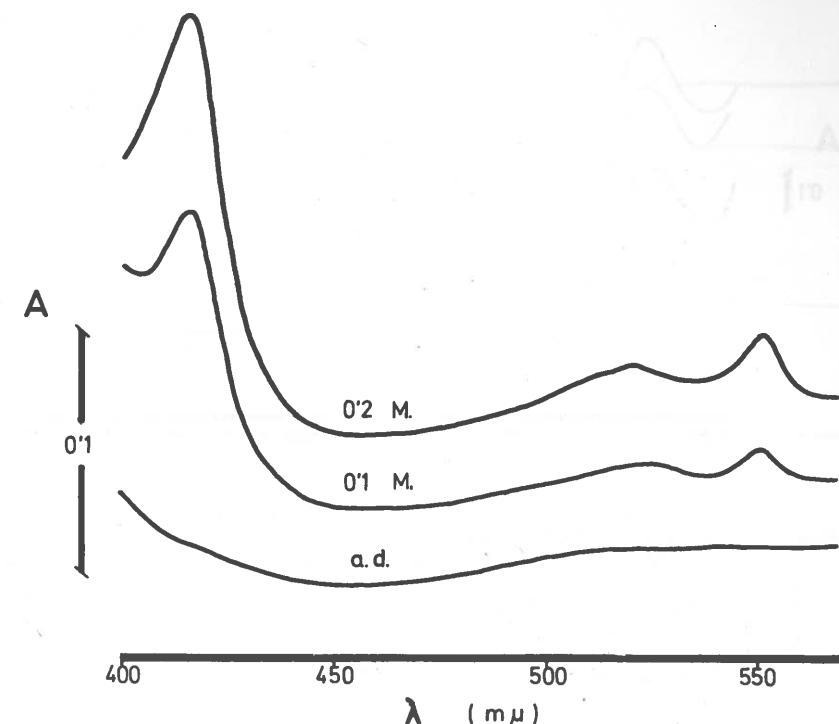


Fig. 51.—Efecto del medio de trituración sobre la solubilización de los citocromos de *H. stellata*.
—Espectros diferenciales (oxidado con agua oxigenada - reducido con ditionito).

Tiempo de trituración = 3 minutos.
Centrifugación $100.000 \times g.$ 90 minutos.
Medios de trituración : agua destilada (a.d.), tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., 0,1 M. y 0,2 M., (0,2 M.).

TABLA 26

Influencia de la molaridad del tampón fosfato (pH 7,4) sobre la solubilización de los citocromos y flavinas de *H. stellata*.

Molaridad del tampón	Concentración de citocromos		Concentración de flavinas μmoles / ml.
	μmoles / ml.	mgrs. / ml.	
0,2	$6,4 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-3}$	$3,14 \times 10^{-3}$
0,4	$5,9 \times 10^{-4}$	$7,7 \times 10^{-3}$	$1,83 \times 10^{-3}$
0,7	$7,8 \times 10^{-4}$	$10,1 \times 10^{-3}$	$2,64 \times 10^{-3}$
1	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$0,74 \times 10^{-3}$

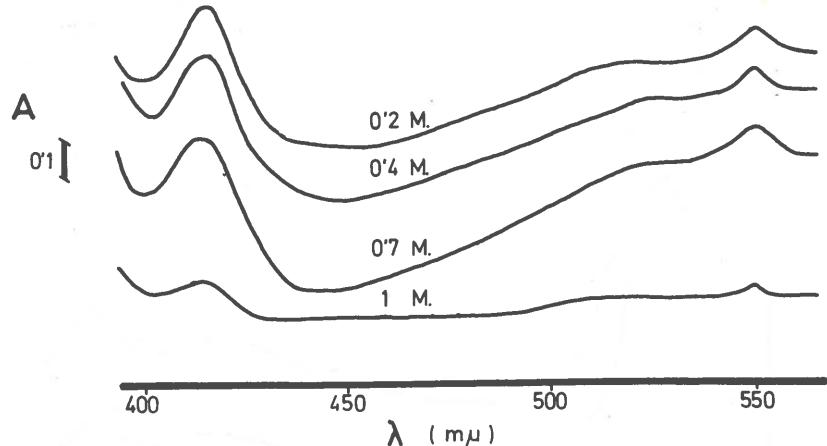


Fig. 52.—Influencia de la molaridad del tampón fosfato (pH 7,4), sobre la solubilización de los citocromos de *H. stellata*.

— Espectros diferenciales (oxidado con agua oxigenada - reducido con ditionito).

Tiempo de trituración = 3 minutos.

Volumen de trituración = 8,7 mls.

Centrifugación $100.000 \times g$. 90 minutos.

Medios de trituración : tampón fosfato de pH 7,4, 0,2 M., 0,4 M., 0,7 M., y 1 M.

Con objeto de comprobar el grado de extracción conseguido en el experimento anterior, los depósitos obtenidos en las trituraciones con tampón 0,2 y 1 M. fueron extraídos de nuevo por el mismo procedimiento. Se resuspendieron en 8,7 mls., se trituraron de nuevo durante tres minutos, y se centrifugaron a continuación durante 90 minutos a $100.000 \times g$. Véanse en la Fig. 53 los espectros de los sobrenadantes contra los blancos respectivos.

4.2.—Purificación de los citocromos de *H. stellata*, solubles en tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M.

2.1.—Extracción y precipitaciones.

293,7 grs. de micelio (18 horas de incubación), conservados a -20°C ., fueron descongelados y triturados con el homogeneizador de cuchillas, en presencia de 400 mls. de tampón fosfato (0,5 M, pH 7,4), en lotes de 60 mls., durante 5 minutos a $0-5^{\circ}\text{C}$. La suspensión de micelio triturado fue luego mantenida durante 2 horas y media en la cámara refrigerada ($0-4^{\circ}\text{C}$) removiendo la mezcla con un agitador mecánico. Al final de este período, el triturado, que tenía un color pardo oscuro, fue

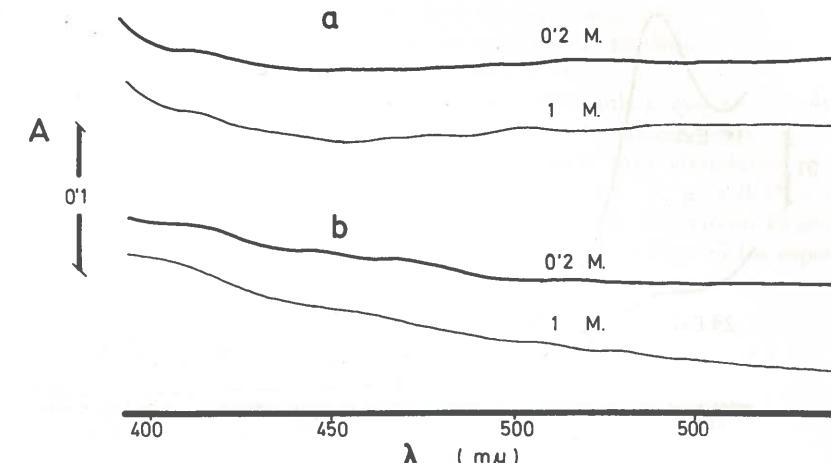


Fig. 53.—Grado de extracción de los citocromos de *H. stellata*, logrado con tampones fosfato (pH 7,4), 0,2, y 0,1 M. mediante trituración durante 3 minutos.

(a) Espectros diferenciales (oxidado con agua oxigenada - reducido con ditionito).

(b) Espectros contra los blancos respectivos.

centrifugado a $40.000 \times g$. durante 60 minutos. Se recogieron 440 mls. de sobrenadante de un color amarillo rojizo bastante intenso, que se almacenaron a $0-5^{\circ}\text{C}$. Al depósito, de color pardo muy oscuro, muy denso, se le añadieron 240 mls. del mismo tampón que se utilizó para la primera extracción y fue triturado y agitado de nuevo, por el mismo procedimiento. La suspensión fue igualmente centrifugada a $40.000 \times g$. durante 60 minutos, obteniendo 310 mls. de sobrenadante, que se reunieron con los 440 mls. de la primera extracción. Véase en la Fig. 54 los espectros correspondientes a los sobrenadantes de ambas extracciones. Se tomó como citocromo oxidado, el sobrenadante tal cual había sido obtenido de la centrifugación y como citocromo reducido, el mismo sobrenadante al que se adicionó una pequeña cantidad de ditionito.

Los 750 mls. de sobrenadante obtenidos en total de las dos extracciones, se saturaron al 45 % con 210 grs. de sulfato amónico, que les fue añadido lentamente en estado sólido, con agitación constante. La suspensión se dejó reposar unos 30 minutos y se centrifugó durante 1 hora a $40.000 \times g$. El depósito de la centrifugación (abundante y blanco), se resuspendió en 93 mls. de tampón fosfato pH 7,4, 0,5 M. y se conservó a $0-5^{\circ}\text{C}$.

Los 800 mls. de sobrenadante de la precipitación del 45 %, que tenían un color amarillento muy rojizo, se saturaron al 65 % por el mismo procedimiento anterior, con 128 grs. de sulfato amónico. Se obtuvo así

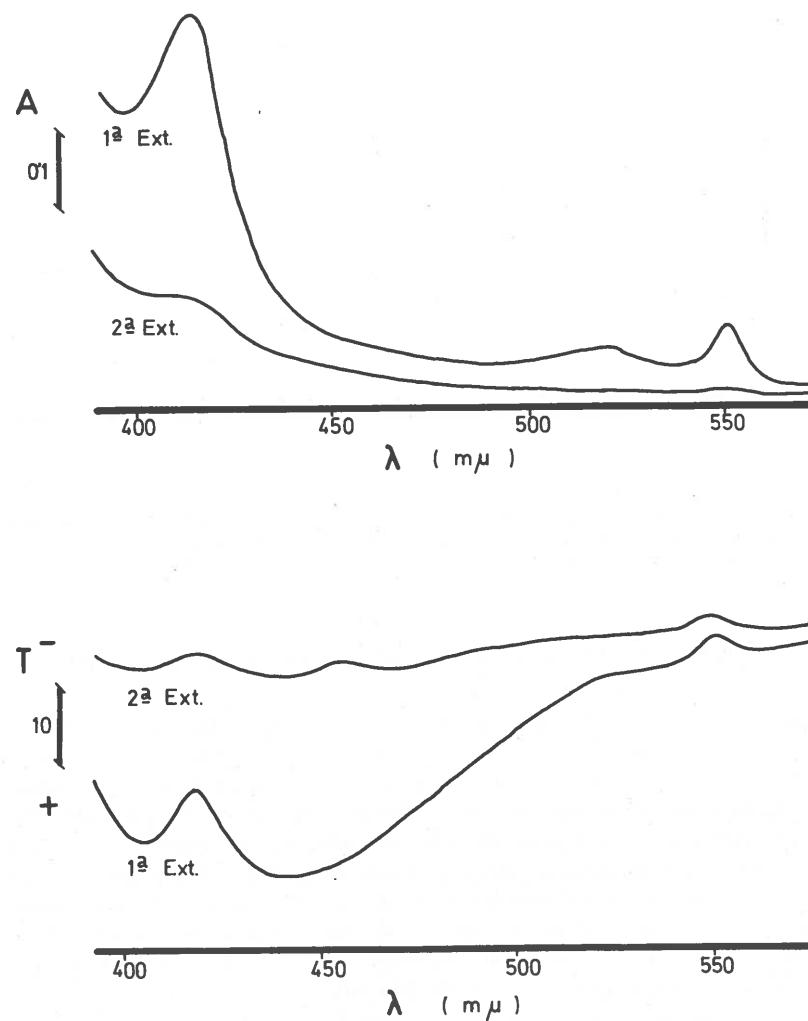


Fig. 54.—Espectros correspondientes a los sobrenadantes de $40.000 \times g.$ de dos extracciones consecutivas de micelio de *H. stellata* con tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M.

—(a) Espectros contra tampón correspondiente.

—(b) Espectros diferenciales (oxidado por la oxidación natural - reducido con ditionito).

Micelio triturado = 293,7 grs. suspendidos en tampón fosfato (volumen total = 400 ml.).

Tiempo de trituración = 5 minutos.

Volumen de la trituración = 6 mls.

un precipitado blanquecino que se dejó reposar durante 30 minutos y se centrifugó luego como en la precipitación anterior. El depósito se resuspendió en 45 mls. de tampón y se almacenó a $0-5^{\circ}\text{C}$.

Al sobrenadante de esta centrifugación (850 mls.), que tenía igual color al de la anterior, se le fue añadiendo muy lentamente más sulfato amónico, hasta saturación. Se formó un precipitado muy abundante (que se separó por centrifugación durante una hora a $40.000 \times g.$, a $0-5^{\circ}\text{C}$) de color rosa, perfectamente soluble en tampón fosfato. Se disolvió en 45 mls. dando una solución de color rosa intenso. Véanse en la Fig. 55 los espec-

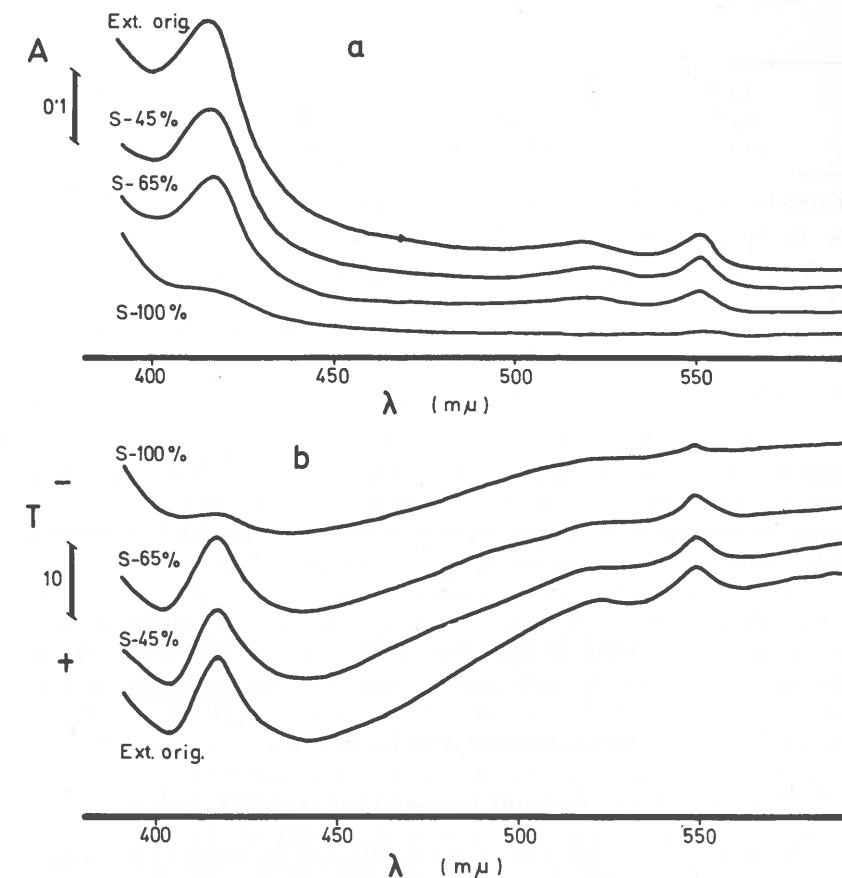


Fig. 55.—Purificación de los citocromos solubles de *H. stellata*.

— Espectros de los sobrenadantes de $40.000 \times g.$ -60 min. de las precipitaciones con sulf. amónico al 45 %, 65 % y 100 % de saturación.

a) Espectros contra tampón fosfato (pH 7,4 - 0,1 M.).

b) Espectros diferenciales (oxidados con agua oxigenada-reducidos con ditionito).

tros correspondientes a las distintas fracciones sobrenadantes, y en la Tabla 27 el contenido en citocromos y flavinas de los depósitos.

TABLA 27

Purificación de los citocromos solubles de «H. stellata».
Fraccionamiento del extracto con sulfato amónico.

Concentración de sulf. amónico	Citocromos en el precipitado		Flavoproteínas en el precipitado μ moles.
	μ moles	mgrs.	
45 %	0,212	2,760	0,136
65 %	0,242	0,315	0,047
100 %	0,416	5,405	0,040

Extracto original $1,3 \times 10^{-3}$ μ mols./ml.; 0,0174 mgr./ml.; $7,24 \times 10^{-3}$ mmols.
Sobnte. 100 % - $4,1 \times 10^{-4}$ μ mols./ml.: 0,0053 mgrs./ml.; $3,70 \times 10^{-3}$ mmols.

2.2.—Diálisis y concentraciones

El depósito de la precipitación a 100 % de saturación que se había disuelto en 4,5 mls. de tampón, se dializó a 0-5°C., durante cinco días en agitación, contra 2 litros de agua destilada con seis cambios, comprobando la marcha de la diálisis según se describe en pág. 50. El contenido del tubo de diálisis se concentró al vacío (véase pág. 50).

El residuo de la concentración se disolvió en 30 mls. de tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M. y se dializó de nuevo de igual modo, durante 20 horas, contra 2 litros de agua desionizada, y un cambio. Tras la última diálisis, se concentró de nuevo por el mismo procedimiento anterior y se disolvió el residuo en 4,7 mls. de tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M. con cuya solución se obtuvo el espectro de la Fig. 56.

2.3.—Cromatografía de filtración molecular por Sephadex - G-100.

Se preparó la columna de cromatografía, con Sephadex G-100, según se indica en la pág. 50 y se comprobó su «volumen vacío» (véase pág. 51) que resultó ser de 10 ml.

Se pasaron por la misma 4,3 mls. (de los 4,7 en que se redissolvió el depósito de la precipitación con 100 % de saturación de sulfato amónico), que fueron arrastrados con tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M. a una velo-

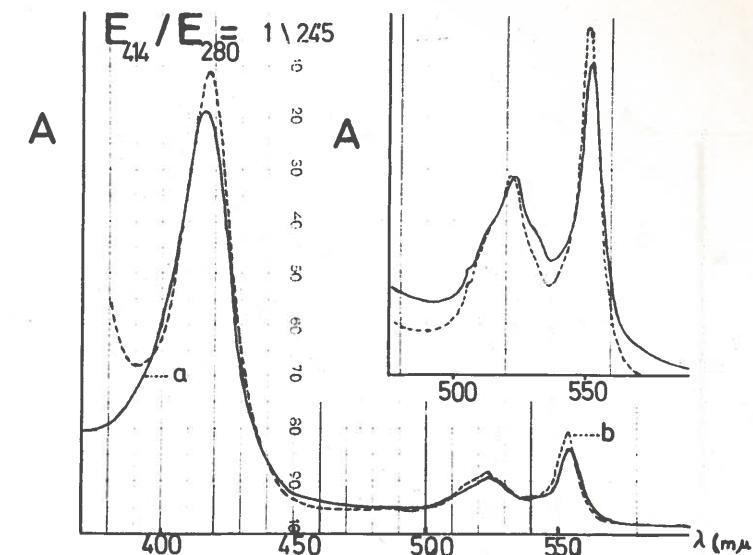


Fig. 56.—Espectro visible de la fracción precipitado con 100 % de saturación de sulfato amónico, tras la diálisis y concentración (a), y espectro reducido con ditionito (b).

cidad de 11 ml./hora, recogiendo muestras de 2,2 mls. de volumen mediante un colector de fracciones (véase Fig. 9). Todos los tubos, del 10 al 30 mostraban signos de la presencia de citocromos, como puede verse en los espectros de la Fig. 57.

2.4.—Cromatografías de intercambio iónico con DEAE-22.

1.ª Cromatografía.

El contenido de los tubos de la banda central de la filtración por Sephadex G-100 (tubos 14, 15, 16, 17, 18 y 19), se reunió y dializó durante 24 horas, contra 2 litros de agua desionizada.

El contenido del tubo de la diálisis, al término de la misma, se concentró a sequedad a vacío (véase pág. 50), y el residuo, de color rosa intenso, se disolvió en 2,5 ml. de tampón fosfato pH 7,4 0,0025 M. y se centrifugó a $25.000 \times g$. durante 15 minutos para clarificarlo y evitar así el taponamiento de la columna. El material así obtenido mostraba una relación $E_{414}/E_{280} = 19,6$. Dos mililitros del mismo, se colocaron en la columna de DEAE-22 (que se preparó según se indica en la pág. 54) en la cámara

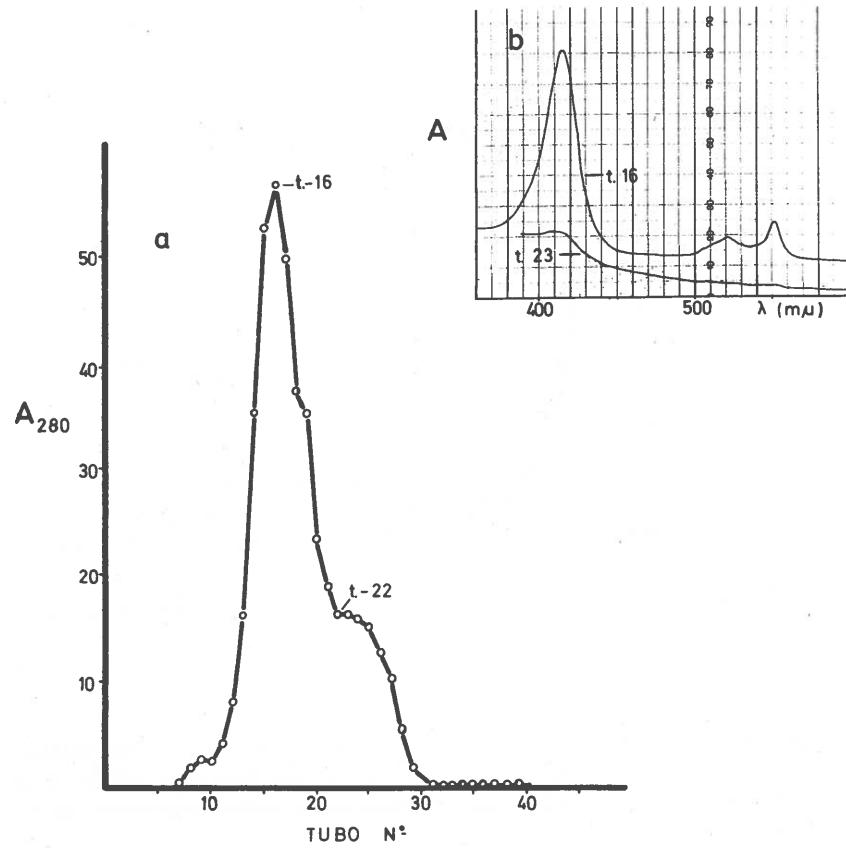


Fig. 57.—Purificación de los citocromos solubles de *H. stellata*.
—Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción del extracto en tampón fosfato del micelio, precipitada con el 100 % de saturación de sulfato amónico.
a) Distribución de la proteína en las diversas fracciones cromatográficas.
b) Espectros de los tubos n.º 16 y 22.

Blanco = tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M.
Lecho cromatográfico = 27 cms.; Velocidad de elución = 11 ml/h. Columna hidrostática = 45 cms.

fría a 0,5°C. La muestra fue eluida con 90 ml. de tampón fosfato de pH 7,4 - 0,025 M.; y 90 ml. de tampón 0,5 M. tomándose muestras de 3 mls. Véase en la Fig. 58 la marcha de la cromatografía en la Tabla 28 la relación E_{414}/E_{280} de los distintos tubos y en la Fig. 59 los espectros de los tubos 23, 54 y de la muestra original.

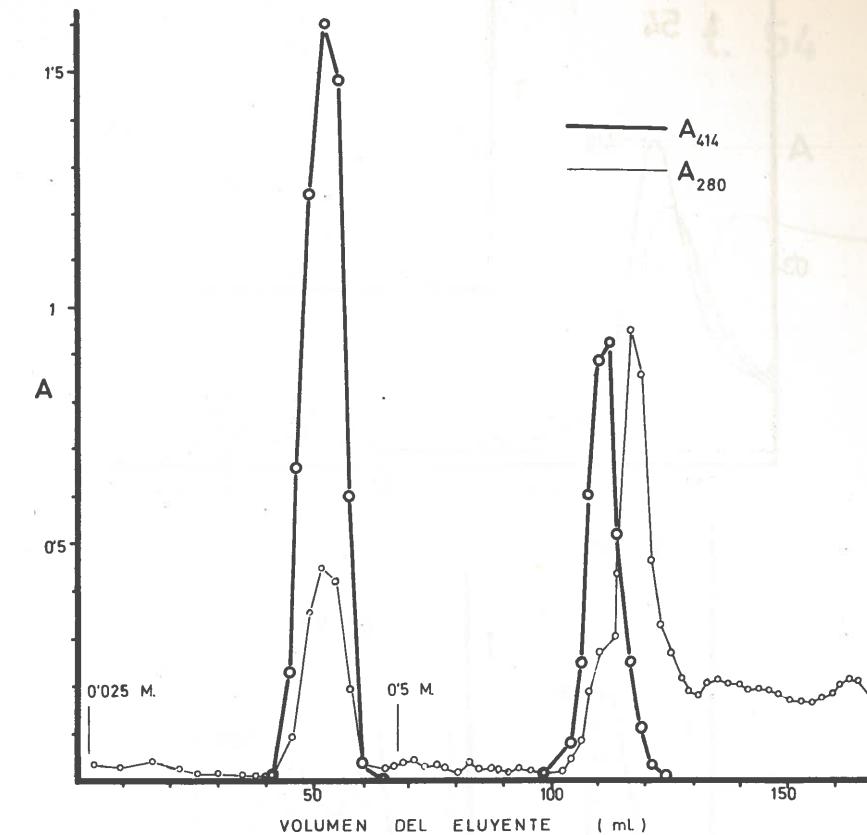


Fig. 58.—Purificación de los citocromos solubles de *H. stellata*.
—Cromatografía en DEAE-22 del extracto en tampón fosfato, del micelio, previamente purificado por precipitación con sulfato amónico y filtración por Sephadex.
Lecho cromatográfico = 45 cms.: Sección de la columna = 1,5 cms.; Columna hidrostática = 30 cms.; Velocidad de elución = 36 mls./hora.

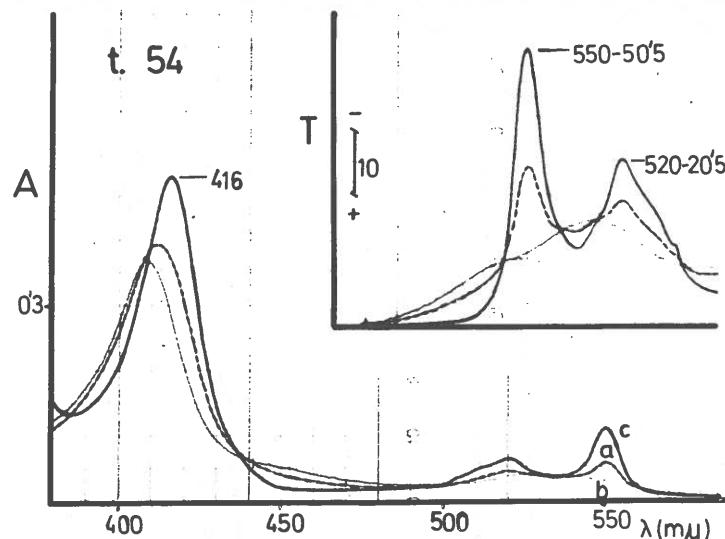


Fig. 59.—Características espectroscópicas de los citocromos solubles de *H. stellata*.

— Espectros de los tubos 23, y 54 de la cromatografía en DEAE-22 del extracto en tampón fosfato, del micelio de *H. stellata* previamente purificado por precipitación con sulfato amónico y filtración por Sephadex.

- (a) Estado de oxidación del citocromo a la salida de la columna.
- (b) Espectro del citocromo oxidado con ferricianuro potásico.
- (c) Espectro del citocromo reducido con ditionito.

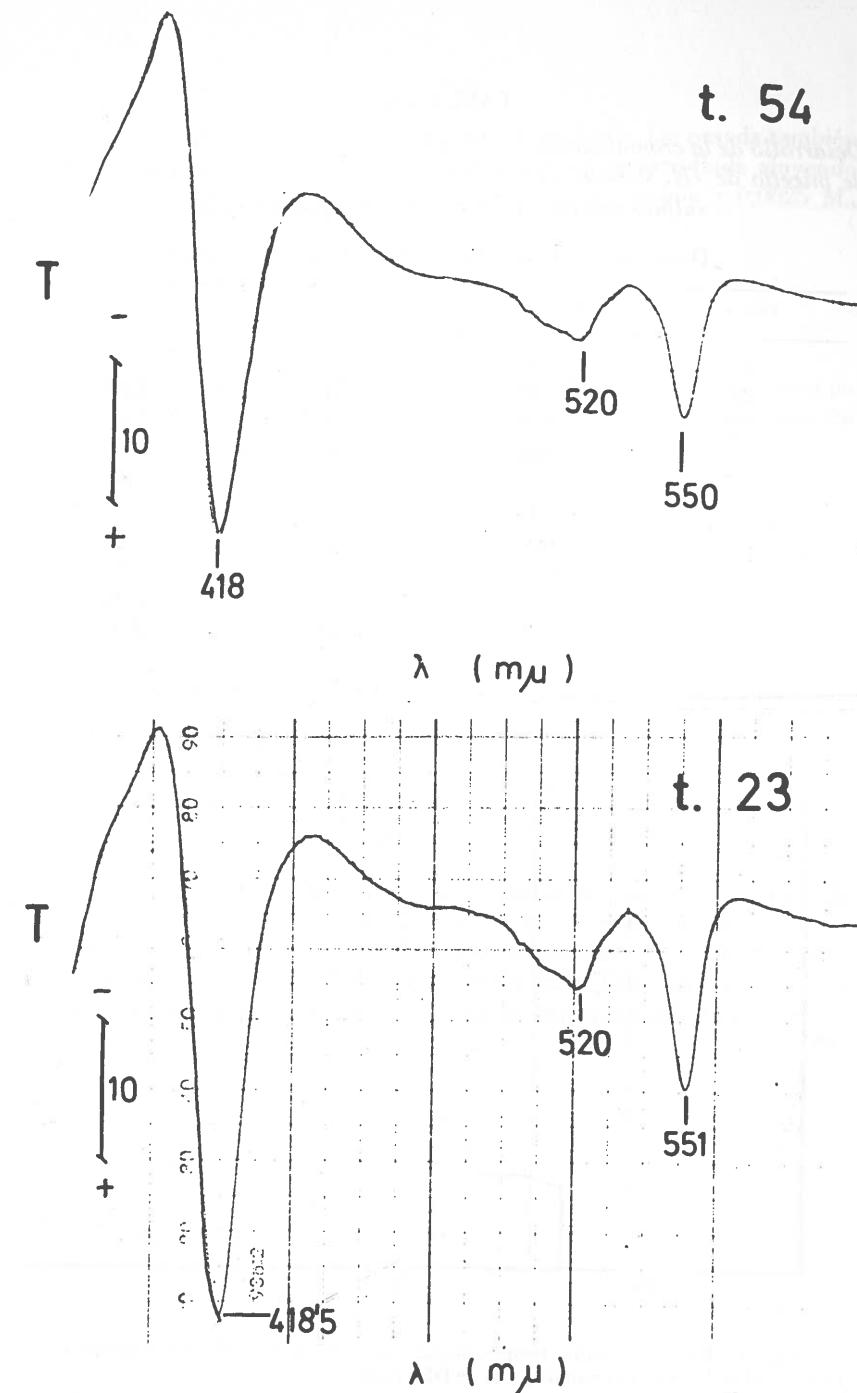


Fig. 60.—Características espectroscópicas de los citocromos solubles de *H. stellata*.

— Espectros diferenciales (oxidado con ferricianuro reducido con ditionito) de los tubos 23 y 54 de la cromatografía en DEAE-22 del extracto en tampón fosfato del micelio de *H. stellata* previamente purificado por precipitación con sulfato amónico y filtración por Sephadex.

TABLA 28

Desarrollo de la cromatografía en DEAE-22 del extracto en tampón fosfato, de micelio de «H. stellata», previamente purificado por precipitación por sulfato amónico y filtración por Sephadex G-100.

Distribución de la relación E₄₁₄/E₂₈₀ en los tubos.

Tubo n. ^o	E ₄₁₄ /E ₂₈₀	Tubo n. ^o	E ₄₁₄ /E ₂₈₀
20	2,46	50	1,82
21	3,49	51	2,87
22	3,56	52	3,01
23	3,52	53	3,26
24	3,14	54	2,00
25	3,14	55	1,17
26	0,14	56	0,54
27	0	57	0,12
		58	0,08
		59	0,05
		60	0,06

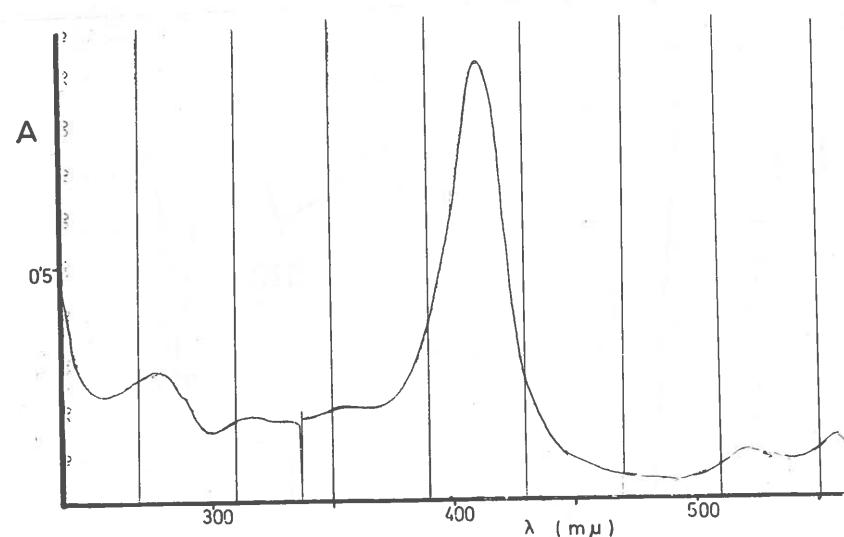


Fig. 61.—Espectro contra tampón fosfato de pH 7,4, 0,5 M., del contenido del tubo n.^o 22 de la primera cromatografía en DEAE-22.

2.^a Cromatografía de intercambio iónico.

Otra muestra del mismo origen, disuelta en 2 mls. fue pasada también por una columna de DEAE. La cromatografía fue desarrollada eluyendo con 130 mls. de las siguientes concentraciones de tampón : 0,0025 M., 0,1 M., 0,3 M., 0,5 M., y 1 M.

TABLA 29

Desarrollo de la cromatografía en DEAE-22, del extracto en tampón fosfato, del micelio de H. stellata previamente purificado por precipitación con sulfato amónico y filtración por Sephadex.

Distribución de la relación E₄₁₄/E₂₈₀ en los distintos tubos.

Tubo n. ^o	E ₄₁₄ /E ₂₈₀	Tubo n. ^o	E ₄₁₄ /E ₂₈₀
26	2,81	75	2,13
27	3,18	76	2,74
28	3,12	77	2,02
29	2,73	78	0,93
30	1,00	79	0,43
31	0,10	80	0,24
		81	0,15

En la Fig. 62 puede observarse el desarrollo de la cromatografía, y en la Tabla 29 la relación E₄₁₄/E₂₈₀ de las diversas fracciones.

Las características espectrofotométricas fundamentales de los citocromos solubles de *H. stellata* pueden verse en la Tabla 30 y en las Figs. 59 y 60, en las que se observa el estado de oxidación del citocromo a la salida de la columna.

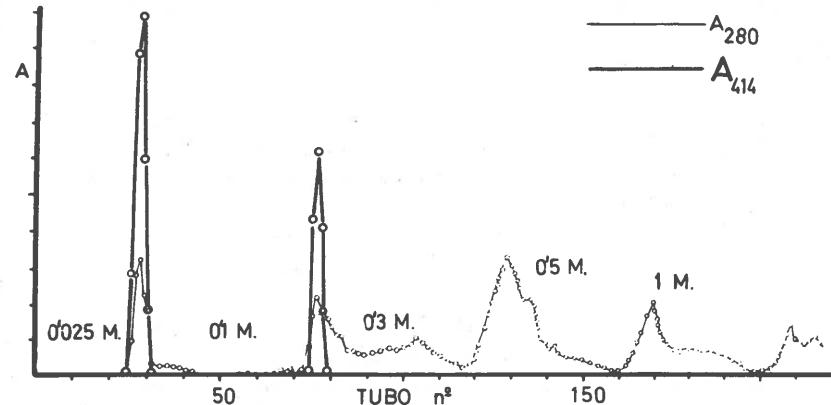


Fig. 62.—Cromatografía en DEAE-22 del extracto de micelio de *Hemispora stellata* (de 18 horas de incubación) en tampón fosfato.

— Lecho cromatográfico = 45 cms.; Sección de la columna = 1,5 cms.; Columna hidrostática = 30 cms. Velocidad de elución = 36 mls./hora.

TABLA 30

Características espectrales de los citocromos solubles de H. stellata.

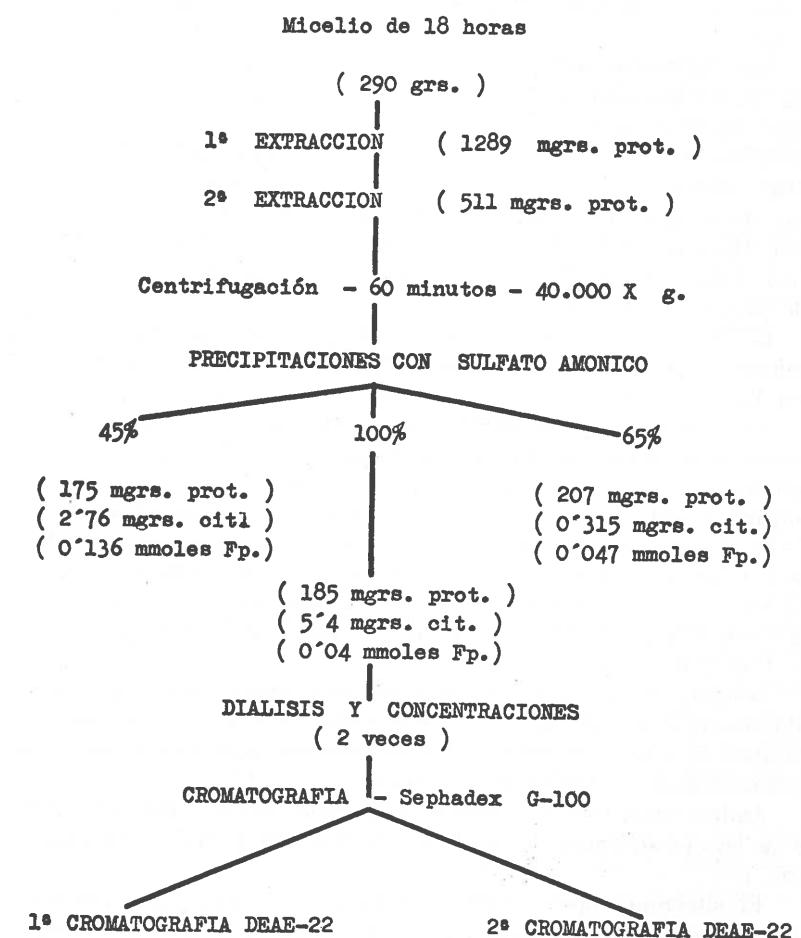
Citocromo tipo C (550 H. stellata)

Máximos del espectro reducido	280	316	416	520	550
Máximos del espectro oxidado	275-80	355-60	409	530	560
Cocientes:	— $416_{\text{red}}/550_{\text{red}}$	(Soret / α) = 4,61			
	— $550_{\text{red}}/520_{\text{red}}$	(α / β) = 1,74			
	— $550_{\text{red}}/280_{\text{red}}$	= 0,84			
	— $409_{\text{red}}/416_{\text{red}}$	= 0,74			

Citocromo tipo C (552 H. stellata)

Máximos del espectro reducido	273-80	313-18	416	522	552
Máximos del espectro oxidado			410	531	563-66
Cocientes:	— $416_{\text{red}}/552_{\text{red}}$	(Soret / α) = 4,73			
	— $552_{\text{red}}/522_{\text{red}}$	(α / β) = 1,7			
	— $552_{\text{red}}/280_{\text{red}}$	= 0,92			
	— $410_{\text{ox}}/416_{\text{red}}$	= 0,71			

ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE LOS CITOCROMOS DE *H. stellata*



VII-7.—DISCUSION.

Los resultados presentados en este capítulo ponen de manifiesto la existencia de dos citocromos solubles en el *H. stellata*. La posición de las bandas « α » de su espectro de absorción obliga a su clasificación dentro del tipo c.

Son fácilmente solubles en agua destilada y en tampón fosfato (pH 7,4, 0,1 M.) pero mucho más solubles en este último, siendo casi totalmente extraídos mediante un breve tratamiento con ultrasonidos o trituración con homogeneizador de cuchillas. Su comportamiento frente al sulfato amónico difiere considerablemente del de otros citocromos solubles: *Azotobacter vinelandii* (SHETNA, WILLSON y BEINERT, 1966), caracol, (KAWAI, 1961), *Anacystis nidulans* (HOLTON y MEYERS, 1967), y el del corazón de caballo; y es muy semejante en cambio a los citocromos c de *Navicula pelliculosa*.

La cromatografía en Sephadex G-100 purifica considerablemente el conjunto de citocromos solubles multiplicando por un factor de 20 la relación E_{414}/E_{280} pero es incapaz de resolver el sistema.

La cromatografía en DEAE, resulta de una eficacia muy superior, permite la separación de dos fracciones que difieren además, aunque sólo ligeramente, en sus características espectrales, uno con máximos en estado reducido a 280, 316, 416, 520 y 550 milimicras, y en estado oxidado a 275-80, 355-60, 409, 530 y 560 milimicras, al que podemos denominar tipo C (550 *H. stellata*); y otro con máximos en estado reducido a 273-80, 313-18, 416, 522 y 552 milimicras, y con sus bandas de Soret, « β » y « α » oxidadas a 410, 531 y 563-66 milimicras, al que puede denominarse tipo C (552 *H. stellata*).

Ninguno de los citocromos es fácilmente autooxidable; salen de las columnas cromatográficas parcialmente reducidos y no se oxidan mediante burbujeo de oxígeno a través de sus disoluciones; ambos se oxidan por el agua oxigenada y el ferricianuro potásico.

Ambos citocromos son evidentemente muy distintos del citocromo c de las levaduras, estudiado por KEILIN y HARTREE (1949), y ESTABROOK, (1957).

El citocromo tipo c (552), resulta muy parecido al citocromo C (552 *Euglena*) (PERINI, KAMEN y SCHIFF, 1964). El estado de pureza de nuestra preparación a juzgar por la relación E de la banda « α »/ E_{280} es tan elevada como el obtenido por PERINI y col. y la relación « α »/« β » es idéntica. La posición de las bandas de Soret oxidada y reducida, coinciden, pero no la relación entre ellas.

El citocromo C (550), se parece en algunos aspectos, al citocromo C (550) de *Navicula pelliculosa* de YAMANAKA (1962) pero las bandas de Soret y « β », se encuentran desplazadas dos milimicras hacia la región ultravioleta del espectro. La relación « α »/« β » del citocromo C (550)

de *H. stellata* es más elevada, al igual que la relación banda de Soretred/ E_{280} . La reducción no provoca cambios tan acusados en la extinción de la banda de Soret. El cit. C (550 *Navicula pelliculosa*) precipita además entre 40-50 % de saturación de sulfato amónico, en tanto que el de *H. stellata*, precipita entre 65-100 % de saturación.

Aunque no está definitivamente descartada la posibilidad de que uno de los citocromos derive del otro por desnaturalización, parece, sin embargo sumamente improbable dada la constancia de la relación entre ellos en las distintas cromatografías, y lo poco favorable al proceso de desnaturalización, de las condiciones a que fueron sometidos en el proceso de purificación.

El sistema citocrómico de *Hemispora stellata* debe incluir indudablemente otros citocromos. Las partículas obtenidas por sonicación y centrifugación a 25.000 $\times g$.-30 minutos, y a 100.000 $\times g$.-90 minutos, presentan espectros diferenciales (oxidado con ferricianuro-reducido con ditionito) que evidencia la existencia de citocromos insolubles.

CAPITULO VIII

VIII.—INHIBIDORES

VIII-1.—Introducción.

Uno de los sistemas de estudio más fructíferos de la cadena respiratoria consiste en el empleo de inhibidores que detienen el flujo de electrones en determinado punto de la misma (véase pág. 23). Su uso ofrece ciertas dificultades (HILL y HARTREE, 1953; SMITH y CHANCE, 1958), entre las que se encuentran la posible incapacidad de penetración cuando se utilizan células enteras, y la probabilidad de que el inhibidor sea fijado por determinadas sustancias presentes en la preparación.

La susceptibilidad de los distintos sistemas biológicos a los inhibidores de la cadena respiratoria es muy variada (SMITH, 1961). En el presente capítulo se estudia la sensibilidad de diversas actividades enzimáticas a distintos inhibidores.

VIII-2.—Material y métodos.

2.1.—Preparaciones enzimáticas.

Se utilizó siempre como medio de suspensión el tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M.

Se utilizaron: a) *Células enteras*: conidios con 16-18 horas de incubación (30-40 % de germinación).

b) *Extractos libres de células*, logrados a partir de conidios de características idénticas a los anteriores, mediante sonicación (tratamiento de 5 minutos en volúmenes de 5 mls.), con una concentración de conidios en el medio de 1.200 millones/ml.) y centrifugación a $800 \times g$. durante 3 minutos.

c) *Sonicado total*, preparado por sonicación ultrasónica, con el mismo tratamiento indicado en (b).

2.2.—Determinaciones enzimáticas.

Se llevaron a cabo por los métodos manométricos descritos en la metodología general.

2.3.—Inhibidores.

Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su uso. Las disoluciones etanólicas se añadieron en volúmenes de 10-20 microlitros (amital y antimicina), 0,1 — 0,2 mls. (ditizona), 0,3 mls. (clorhidrato de hidroxilamina, introduciendo en la serie de determinaciones, los controles adecuados.

Las disoluciones acuosas se prepararon en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., y se añadieron en volúmenes de 0,3 mls. Salvo expresamente indicado, todos los inhibidores se pipetaron en el compartimento lateral.

- Amital sódico (Sigma).—Solución etanólica.
- Antimicina A (Sigma).—Solución etanólica.
- Clorhidrato de fenilhidracina (Merck).—Solución acuosa.
- Clorhidrato de ortofenantrolina (Schuchardt).—Solución acuosa.
- Clorhidrato de hidroxilamina (Merck).—Solución etanólica.
- Sorbato sódico.—Solución acuosa preparada neutralizando con NaOH, ácido sórbico (Schuchardt).
- Ditizona (B. D. H.).—Disolución etanólica.
- Cupferrón (B. D. H.).—Solución acuosa.
- Malonato sódico.—Se preparó en solución acuosa, por neutralización con NaOH de ácido málico (B. D. H.)
- α - α - dipiridilo (B. D. H.).—Solución acuosa.
- EDTA (Schuchardt).—Solución acuosa.
- Azida sódica (B. D. H.).—Solución acuosa.
- Paracloromercurobenzoato.—Se preparó en solución acuosa, por neutralización con NaOH, de ácido paracloromercurobenzoico. (B. D. H.).

VIII-3.—RESULTADOS.

3.1.—Resistencia de la actividad succínico-oxidasa, del extracto libre de células, a la sonicación, congelación y almacenamiento a $0-5^{\circ}C$.

Con objeto de explorar la posibilidad de utilizar una misma preparación durante estas experiencias, se estudió la estabilidad de la actividad succinato-oxidasa de la fracción sobrenadante de la centrifugación a $800 \times g$.-2,5 minutos, frente a diversos factores.

TABLA 31

Efecto de la sonicación, congelación y almacenamiento a $0-5^{\circ}C$., sobre la actividad succinato-oxidasa de la fracción Sobnte. $800 \times g$.-2,5 min.

	Proteína total (mgrs. en la fracción)	Actividad específica
Control	84,9	2,48
Congelación y descongelación-2 veces.	»	1,95
Sonicación-10 min.	»	0,28
Almacenamiento ($0-5^{\circ}C$.)	»	
22 horas	»	2,48
91 horas	»	1,09

— Germinación del micelio = 38,7 %.

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 16 mgrs./ml.

A partir del micelio procedente de la incubación de 6 erlenmeyers sembrados con 20-40 millones de conidios/ml., se preparó un extracto libre de células, que se dividió en cuatro fracciones. Una de ellas se tomó como control, y se analizó inmediatamente su actividad succinato-oxidasa, y las restantes fueron sometidas a sonicación (durante 10 minutos), congelación y descongelación brusca (por dos veces), y a almacenamiento en el frigorífico a $0-5^{\circ}C$. De esta última fracción, se tomaron dos muestras, una a las 22 horas, y la otra a las 91 horas.

Los resultados obtenidos se reúnen en la Tabla 31 y Fig. 63.

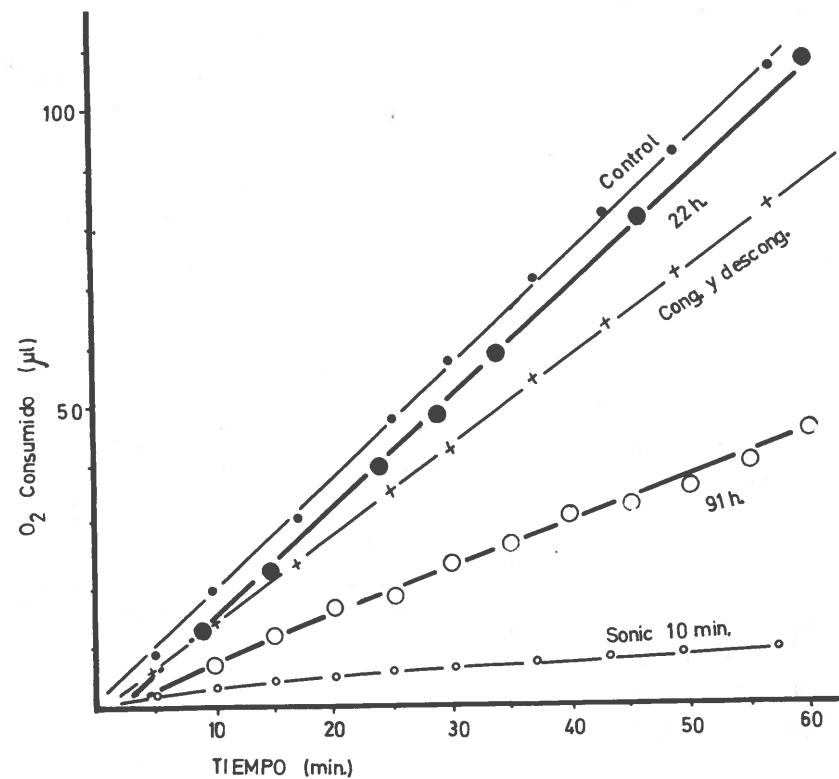


Fig. 63.—Efecto de la sonicación, congelación-descongelación y almacenamiento, sobre la actividad succinato-oxidasa de la fracción Sobnte. $800 \times g$ -2,5 min.

— Germinación del micelio = 38,7 %.

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 16 mgrs./ml.

3.2.—Sensibilidad de las células enteras frente a distintos inhibidores.

a) Efecto del amital, antimicina A, clorhidrato de ortofenantrolina, y cianuro potásico, sobre la actividad glucosa-oxidasa.

El micelio procedente de cuatro erlenmeyers (medio de Vaisey con 7,5 % de ClNa, 18 horas de incubación) fue recogido y resuspendido en 25 mls. de tampón fosfato. De esta suspensión se retiró una alícuota para recuentos y determinaciones de proteína y el resto fue utilizado para las determinaciones de las actividades enzimáticas en presencia de clorhidrato de ortofenantrolina (10^{-3} M.), antimicina A ($3,6 \times 10^{-7}$ M.), amital ($5,5 \times 10^{-4}$ M.) y cianuro potásico (10^{-3} M.).

TABLA 32

Efectos del amital, antimicina A, clorhidrato de ortofenantrolina, y cianuro potásico, sobre la actividad glucosa-oxidasa de las células enteras.

	Actividades específicas		
	Respiración endógena	Resp. endógena + gluc.-oxidasa	% de la actividad control
Control	2,1	5,8	100
Clorh. de ortof. (10^{-3} M.)		1,9	34
Antimicina A ($3,6 \times 10^{-7}$ M.) (0,93 gr./mgr. prot.)		6,8	117
Amital ($5,5 \times 10^{-4}$ M.)		6,8	117
Cianuro potásico (10^{-3} M.)		0,9	15,5

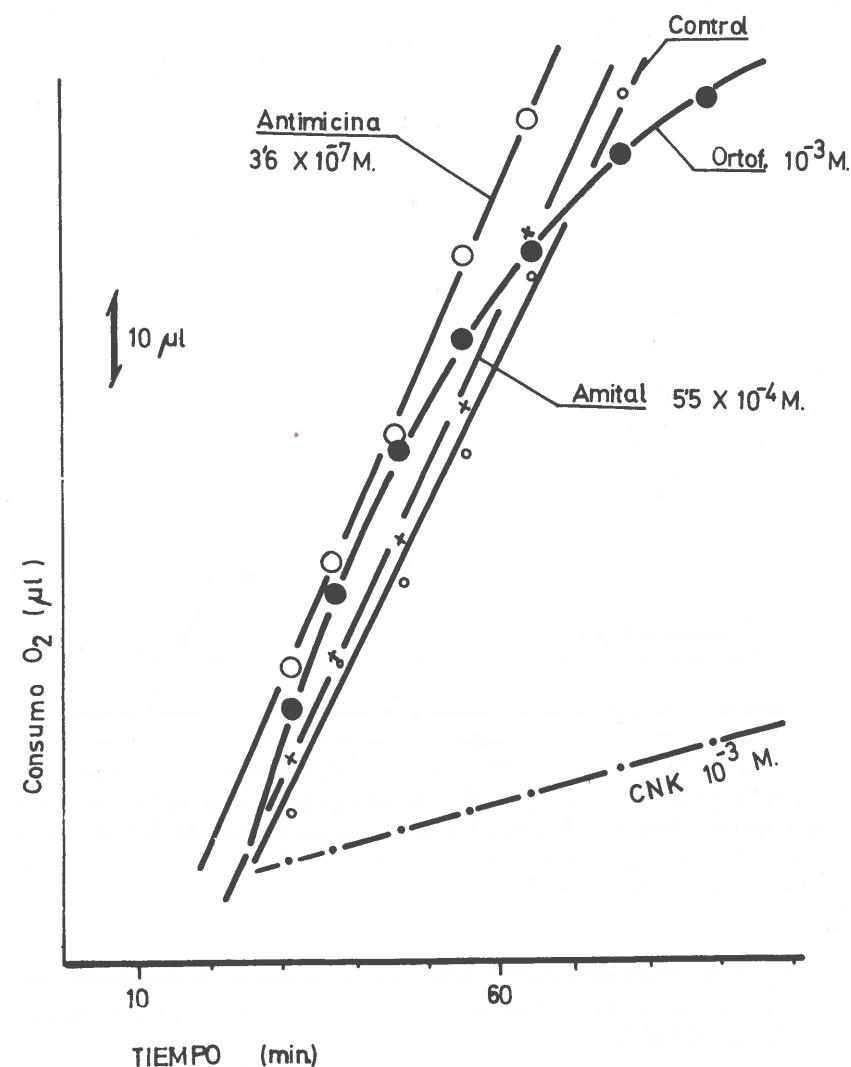
— Germinación del micelio = 33 %.

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 17,9 mgrs./ml.

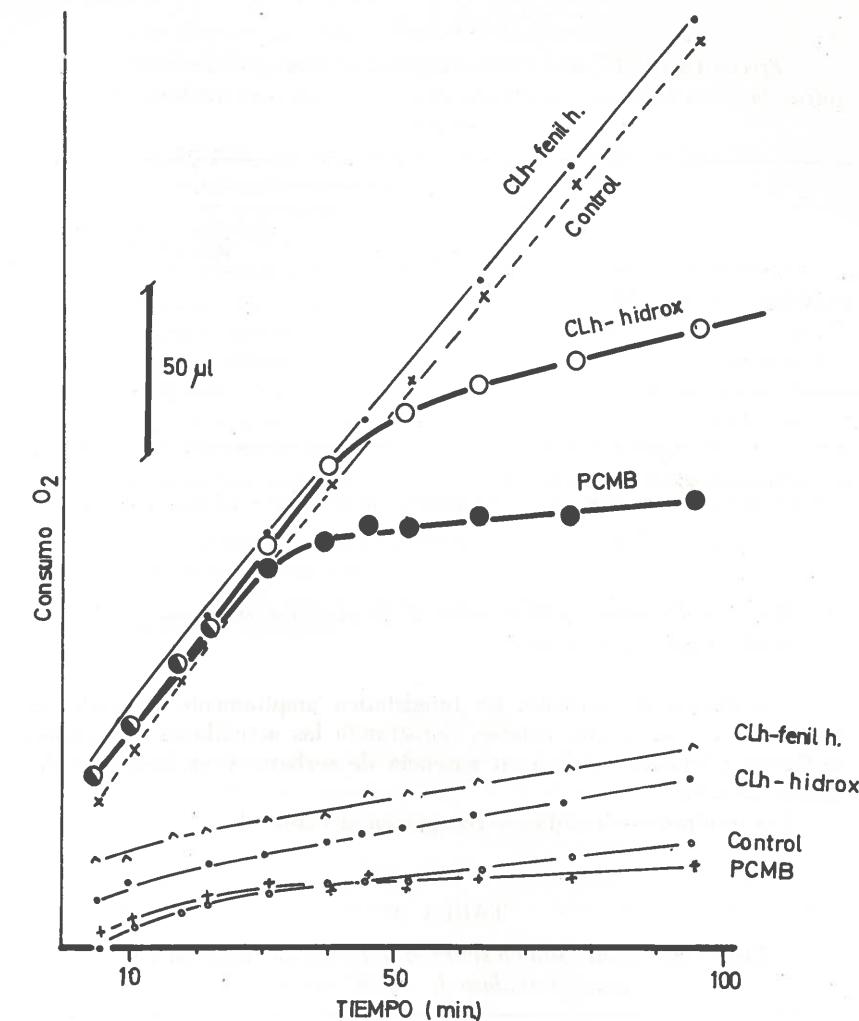
Durante los primeros 25 minutos se registró la actividad respiración endógena y respiración endógena + glucosa-oxidasa de los controles y los matraces muestra, sin mezclar el contenido de los compartimentos laterales. A continuación se vertió el contenido de éstos en todos los matraces (que tenían idéntico volumen, 0,3 mls.) y eran de glucosa 0,3 M. en el control de glucosa-oxidasa, y de las soluciones de los respectivos inhibidores en los matraces muestra.

b) Efecto del paracloromercurobenzoato, clorhidrato de fenilhidracina, y clorhidrato de hidroxilamina, sobre la respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.

Con el micelio de dos erlenmeyers cultivados según se ha descrito en el experimento anterior, se preparó una suspensión en tampón fosfato, con un volumen total de 47 mls. De esta suspensión se separó una alícuota para recuentos (23,1 % de germinación) y determinaciones de proteína. El resto fue utilizado para el estudio de los efectos sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa, de los siguientes inhibidores: PCMB (7×10^{-3} M.), clorhidrato de fenilhidracina (10^{-6} M.), y clorhidrato de hidroxilamina (10^{-5} M.).



— 160 —



— 161 —

TABLA 33

Efecto del PCMB, clorhidrato de fenilhidracina y clorhidrato de hidroxilamina, sobre la respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.

	% de la actividad control	
	Respiración endógena	Respiración endógena + glucosa-oxidasa
PCMB (7×10^{-3} M.)	37	7,5
Clorh. de fenilhidr. (10^{-6} M.)	111	103,0
Clorh. de hidroxilam. (10^{-5} M.)	113	24,0

— Germinación del micelio = 23,1 %

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 2,5 mgrs./ml.

c).—*Efecto del sorbato sódico sobre la respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

Los efectos del sorbato, un fungistático ampliamente utilizado, se estudiaron en las células enteras, registrando las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa en ausencia de sorbato, y en presencia del mismo, 0,06 M.

Los resultados obtenidos, se recogen en la Tabla 34.

TABLA 34

Efecto del sorbato sódico sobre la respiración endógena y la glucosa-oxidasa de células enteras.

	Actividades específicas ($\mu\text{lO}_2/\text{hora}/\text{mgr. proteína}$)	
	Respiración endógena	Respiración endógena + glucosa-oxidasa
Control	2,0	2,7
Sorbato (0,06 M.)	1,5	1,9

— Germinación del micelio = 30 %.

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 4,87 mgrs./ml.

d).—*Efecto de diferentes concentraciones de clorhidrato de ortofenantrolina sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

El clorhidrato de ortofenantrolina sólo inhibe la sección NADH-oxidasa de la cadena respiratoria de las mitocondrias, en concentraciones $1-1,5 \times 10^{-3}$ M., y la estimula a concentraciones del orden de $10^{-4}, 10^{-5}$ M. (REDFEARN, y col. 1965).

Dada la eficacia inhibidora mostrada por la ortofenantrolina en la experiencia anterior (pág. 158), se intentaron estudiar sus acciones en un intervalo amplio de concentraciones.

El micelio obtenido a partir de cinco erlenmeyer, fue resuspendido en tampón fosfato de pH 7,4, 0,1 M., hasta volumen de 30 mls. Una alícuota fue usada para recuentos y determinaciones de proteína y en la suspensión restante, se analizó el efecto de diversas concentraciones de clorhidrato de ortofenantrolina sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa.

Los resultados obtenidos se hallan en la Tabla 35 y fig. 66. La dispersión del valor correspondiente a la concentración 10^{-4} M., en la gráfica de la fig. 66 parece ser un error experimental, pues ya se manifestaba antes de actuar el inhibidor.

TABLA 35

Efecto del clorhidrato de ortofenantrolina sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.

Clorhidrato de ortofenantrolina M	Actividades específicas		
	Respiración endógena	Glucosa-oxidasa + Resp. end.	Inhibición de la glucosa oxidasa (%)
0	26,0	106	0
5×10^{-5}	—	98	7,6
10^{-4}	25,5	68	35,8
5×10^{-4}	25,5	58	45,3
10^{-3}	20,0	18	83,0
5×10^{-3}	25,5	55	94,8

— Germinación = 13,5 %; Proteína en el matraz de Warburg = 22,8 mg.

El clorhidrato de ortofenantrolina no ejerce efecto alguno sobre la resp. endógena y deprime la gluc.-oxidasa con una intensidad proporcional al log. de su concentración molar.

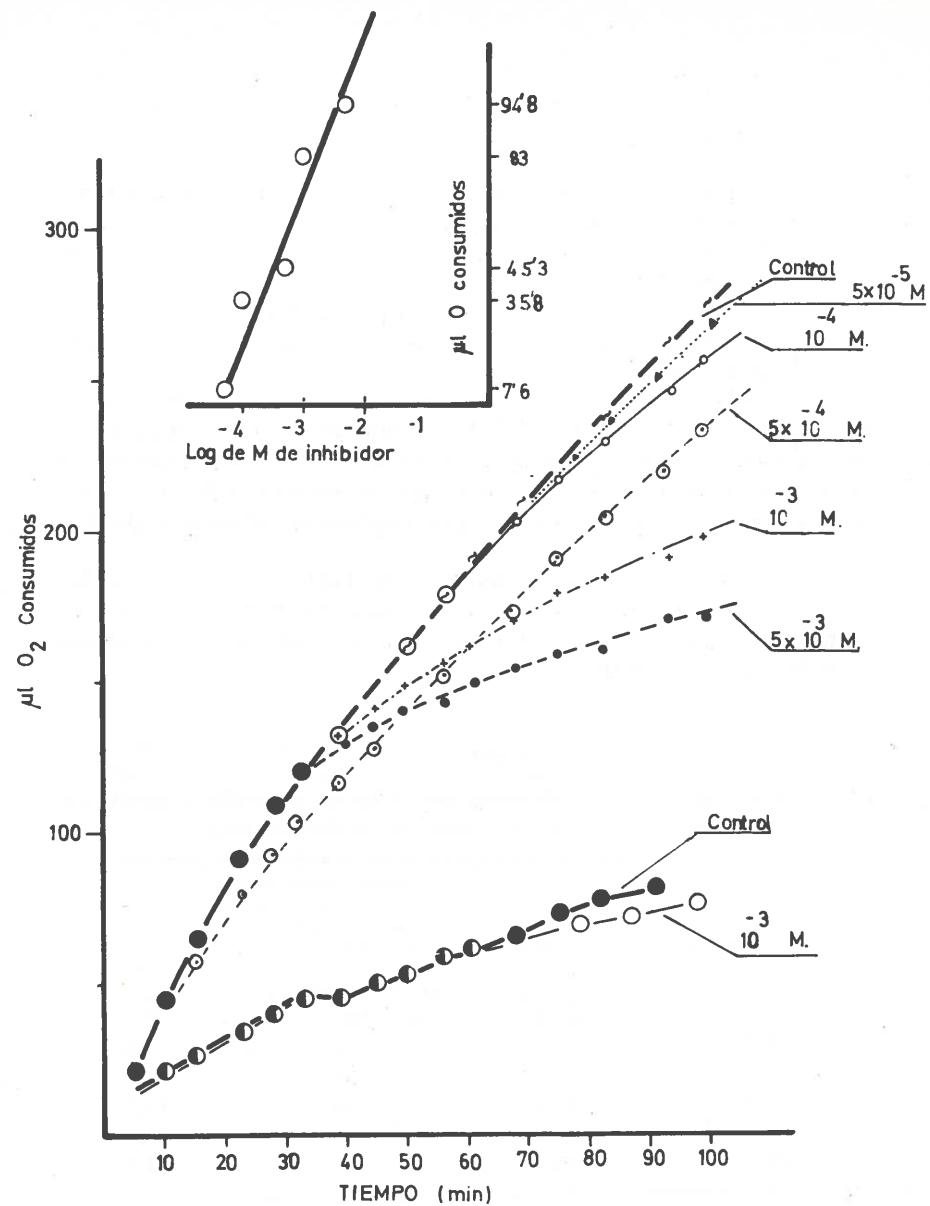


Fig. 66.—Efecto del clorhidrato de ortofenantrolina sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.

— Germinación del micelio = 13,5 %

— Concentración de proteína en el compartimento de reacción = 22,8 mgrs./ml.

e) *Efecto de diversos iones (Fe., Zn., Mg., y Ca.), sobre la inhibición de la glucosa-oxidasa por el clorhidrato de ortofenantrolina*

Aunque parece muy probable que los efectos estimulantes de bajas concentraciones de ortofenantrolina sobre la actividad NADH-oxidasa, e inhibidora a concentraciones altas, en las preparaciones de KEILIN HARTREE, no se deba a la acción quelante de la ortofenantrolina (REDFEARN, WITHAKER y BURGOS, 1965), es bien conocida la acción inhibidora de la ortofenantrolina sobre diversas metaloflavoproteínas enzimáticas, como consecuencia de su capacidad de quelación, y la reversibilidad de la misma por distintos iones metálicos.

Con objeto de estudiar si el claro efecto inhibidor sobre el sistema glucosa-oxidasa ejercido por la ortofenantrolina, es, o no, debido a la acción quelante, se intentó reactivar las preparaciones con diversos iones metálicos.

El micelio procedente de la incubación de cuatro erlenmeyer por el procedimiento standard, se resuspendió en 27 mls. de tampón fosfato, y se retiraron alícuotas para las determinaciones de proteína y de porcentaje de germinación. El resto se utilizó para la determinación de la capacidad

TABLA 36
Efecto de diversos iones sobre la actividad glucosa-oxidasa deprimida por el clorhidrato de ortofenantrolina

Ortofenantrolina	Actividad específica	
	Iones metálicos	Respiración endógena + glucosa-oxidasa (% de la actividad control) (1)
0	Fe ⁺⁺ 2,5 × 10 ⁻³ M.	97,2
0	Zn ⁺⁺ »	103,2
0	Mg ⁺⁺ »	99,0
0	Ca ⁺⁺ »	84,7
2,5 × 10 ⁻³ M.	ninguno	30,5
»	Fe ⁺⁺ 2,5 × 10 ⁻³ M.	38,0
»	Zn ⁺⁺ »	18,1
»	Mg ⁺⁺ »	17,5
»	Ca ⁺⁺ »	17,2

(1) 55 minutos después de la adición de los iones.

— Germinación del micelio = 13 %.

— Concentración de proteínas en el compartimento de reacción = 8 mgrs./ml.

de oxidación de la glucosa tras el tratamiento con ortofenantrolina, antes y después de la adición de Fe^{++} , Zn^{++} , Mg^{++} y Ca^{++} . Para ello se registró durante 25 minutos, la actividad glucosa-oxidasa con y sin ortofenantrolina ($2,5 \times 10^{-3}$ M.) en ausencia de iones metálicos, vertiéndose a continuación éstos, desde los compartimentos laterales, y observando su efecto sobre el consumo de O_2 .

Los resultados obtenidos se hallan en la Tabla 36.

f) *Efecto del EDTA, α - α' - dipiridilo, cupferrón y ditizona, sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

El efecto inhibidor de otros agentes de quelación fue estudiado sobre otra preparación que poseía el 25,6% de germinación. Véanse en la Tabla 37 los resultados obtenidos.

TABLA 37

Efecto del EDTA, α - α' - dipiridilo, cupferrón y ditizona sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.

	% de la actividad control	
	Respiración endógena	Glucosa-oxidasa + respiración endog.
EDTA 10^{-3} M.	96,1	88,5
α - α' - dipiridilo, 10^{-3} M.	128,0	88,0
Cupferrón 5×10^{-3} M.	100,0	112,7
5×10^{-3} M.	100,0	103,2
Ditizona 5×10^{-4} M.	112,0	27,7

— Germinación = 25,6%

Proteína en el compartimento de reacción = 10 mgrs./ml.

g) *Inhibición por la azida sódica, de las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

La azida sódica es uno de los inhibidores de la porción final de la cadena respiratoria cuyas acciones varían más en los distintos sistemas biológicos (SMITH, 1961).

Sus efectos sobre el metabolismo aeróbico de la glucosa exógena y los sustratos endógenos se estudiaron sobre gemas procedentes de la incubación durante 17 horas, de 4 erlenmeyers cultivados por el procedimiento standard (25,6% de germinación).

La adición de la azida, que tuvo lugar desde el compartimento lateral, se efectuó 37 minutos después del comienzo de la incubación. Sus efectos pueden observarse en la Tabla 38 y Fig. 67.

TABLA 38

Efecto de la azida sódica sobre la oxidación del sustrato endógeno y la glucosa, por células recién germinadas de H. stellata.

Concentración de azida	% de la actividad control	
	Respiración endógena (1)	Respiración endógena + glucosa-oxidasa (2)
10^{-7} M.	98,5	102
10^{-5} M.	100,0	110
10^{-3} M.	110,0	142
5×10^{-2} M.	49,6	26

(1).—15 minutos después de la adición del inhibidor.

(2).—80 minutos después de la adición del inhibidor.

— Germinación = 25,6%; proteína en el compartimento de reacción = 4,9 mgrs./ml.

h) *Efecto de la antimicina sobre las actividades respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

La antimicina, que inhibe tan pronunciadamente el flujo de electrones en las mitocondrias de los mamíferos, es en cambio ineficaz frente a los sistemas bacterianos (SMITH, 1954; BRUENMMER y col., 1957; LICH-TBOWN y JACKSON, 1956). En algunos experimentos con hongos se ha mos-

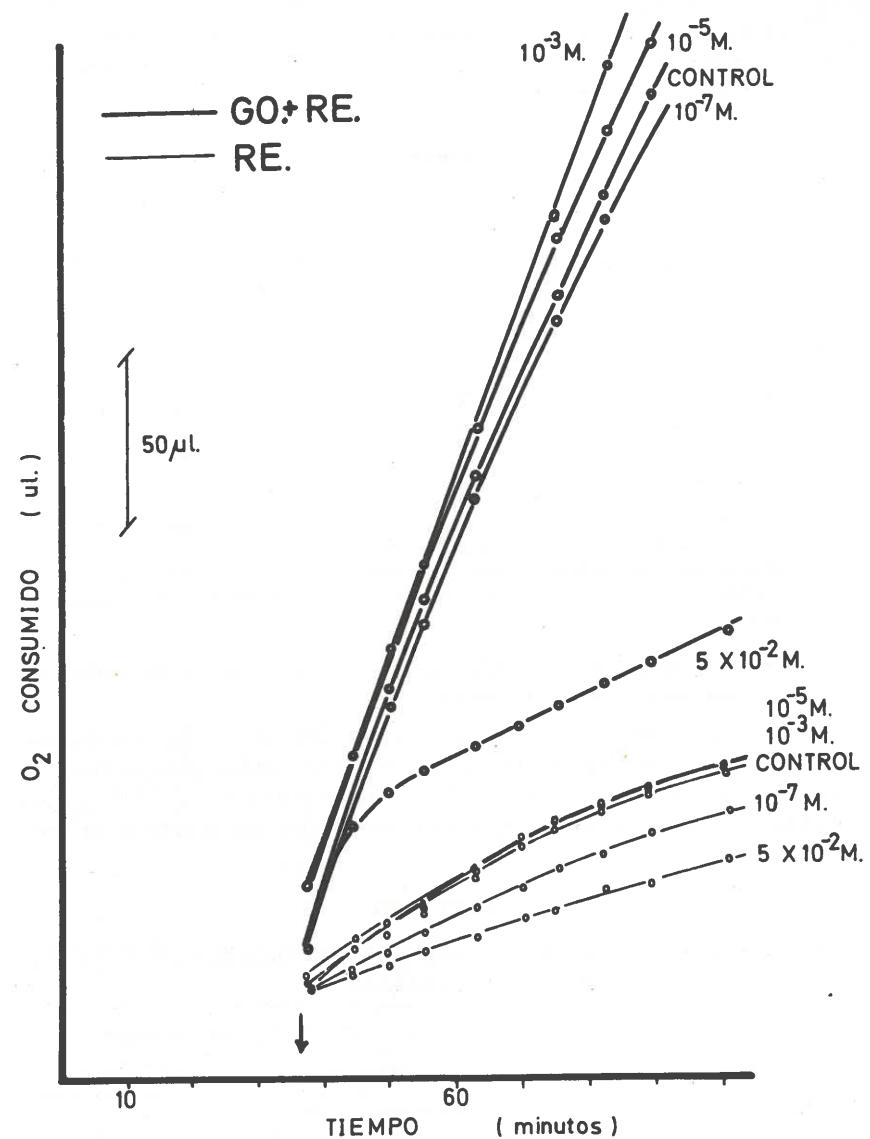
TABLA 39

Efecto de la antimicina sobre el metabolismo aeróbico de la glucosa y el sustrato endógeno.

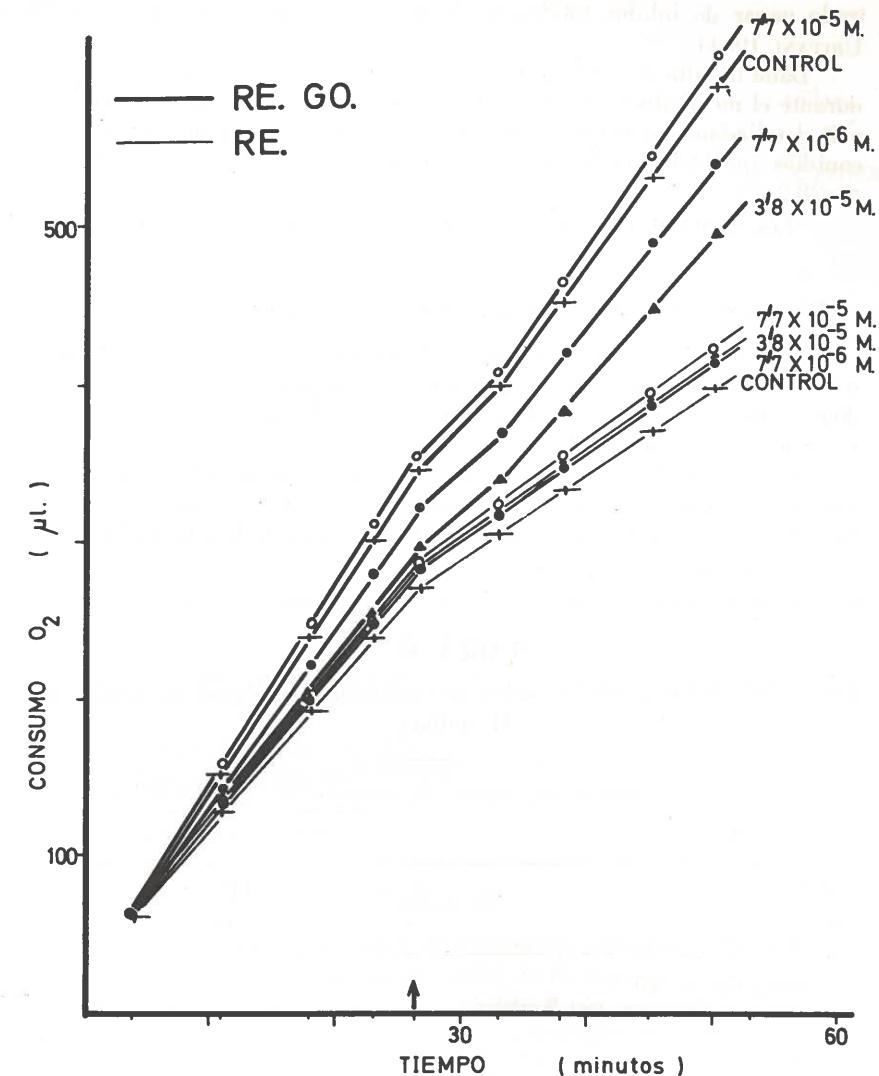
Concentración de antimicina	% de la actividad control			
	M	$\mu\text{g}/\text{mgr. prot.}$	Respiración endógena	Respiración endógena + glucosa-oxidasa
$7,7 \times 10^{-6}$ M.	0,173	105	96,0	
$3,8 \times 10^{-5}$ M.	0,865	105	98,0	
$7,7 \times 10^{-5}$ M.	1,730	107	102,5	

— Germinación del micelio = 28,2%.

— Proteína en el compartimento de reacción = 20,5 mgr./ml.



— 168 —



— 169 —

trado capaz de inhibir totalmente la actividad respiratoria (SCHICHI y URITANI, 1964).

Dada la falta de inhibición y ligero estímulo del consumo de oxígeno durante el metabolismo de la glucosa, observado en a), se decidió estudiar más detalladamente sus acciones. Se utilizó para ello una preparación de conidios incubados 17 horas, por el método standard (germinación = 28,2 %).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 39 y Fig. 68.

i) *Efecto del malonato sobre la respiración endógena de células enteras.*

El malonato es un poderoso inhibidor competitivo de la oxidación del succinato, frecuentemente utilizado para suprimir la respiración endógena (BRYLA KANIUGA y FRACKOWIAK, 1967). Sus acciones sobre la respiración endógena de las gemas de *H. stellata* fueron estudiadas sobre una preparación de conidios que había sido incubada por el procedimiento standard, durante 14 horas, y que poseía el 15 % de conidios germinados. Se registró el consumo de oxígeno antes y después de la adición del malonato y se mantuvo un control.

TABLA 40

Efecto del malonato sódico sobre la respiración endógena de gemas de H. stellata.

Malonato [M]	% de la actividad control	
	Respiración endógena	
10^{-2}	115	
10^{-1}	164	

— Germinación = 22,5 %.

— Proteína = 14,6 mgrs./mat. Warburg.

j) *Efectos del 2-4-dinitrofenol sobre la respiración endógena y glucosa-oxidasa de células enteras.*

El 2-4-dinitrofenol es un desacoplador de la fosforización oxidativa que a bajas concentraciones, al liberar la oxidación de la carga que supone la fosforilización, estimula el consumo de oxígeno. Este efecto ha sido comprobado en los hongos (Schichi y Uritani, 1964). A concentracio-

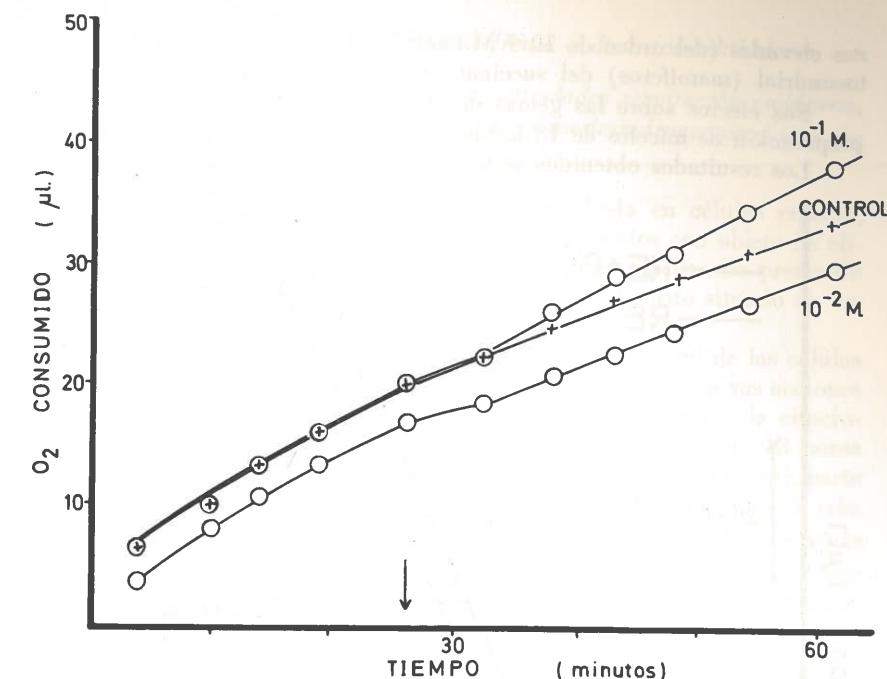


Fig. 69.—Efecto del malonato sódico sobre la respiración endógena de gemas de *H. stellata*.

— Germinación del micelio = 15 %.

— Proteína = 14,6 mgrs./mat. Warburg.

— La flecha indica el momento de vertido del inhibidor.

TABLA 41
Efectos del 2-4-dinitrofenol sobre la respiración endógena y la oxidación de la glucosa por gemas de H. stellata.

2-4-dinitrofenol	% de la actividad control	
	Respiración endógena	Respiración endógena + glucosa-oxidasa
10^{-4} M.	95,5	100
2×10^{-2} M.	80,2	56

— Germinación del micelio = 25,6 %.

— Proteína = 11,5 mgrs./mat. Warburg.

nes elevadas (del orden de 10^{-3} M.) inhibe el metabolismo aeróbico mitocondrial (mamíferos) del succinato (Van Sam, 1967).

Sus efectos sobre las gemas de *H. stellata* se estudiaron sobre una preparación de micelio de 18 horas que poseía el 25 % de germinación.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 41 y en la Fig. 70.

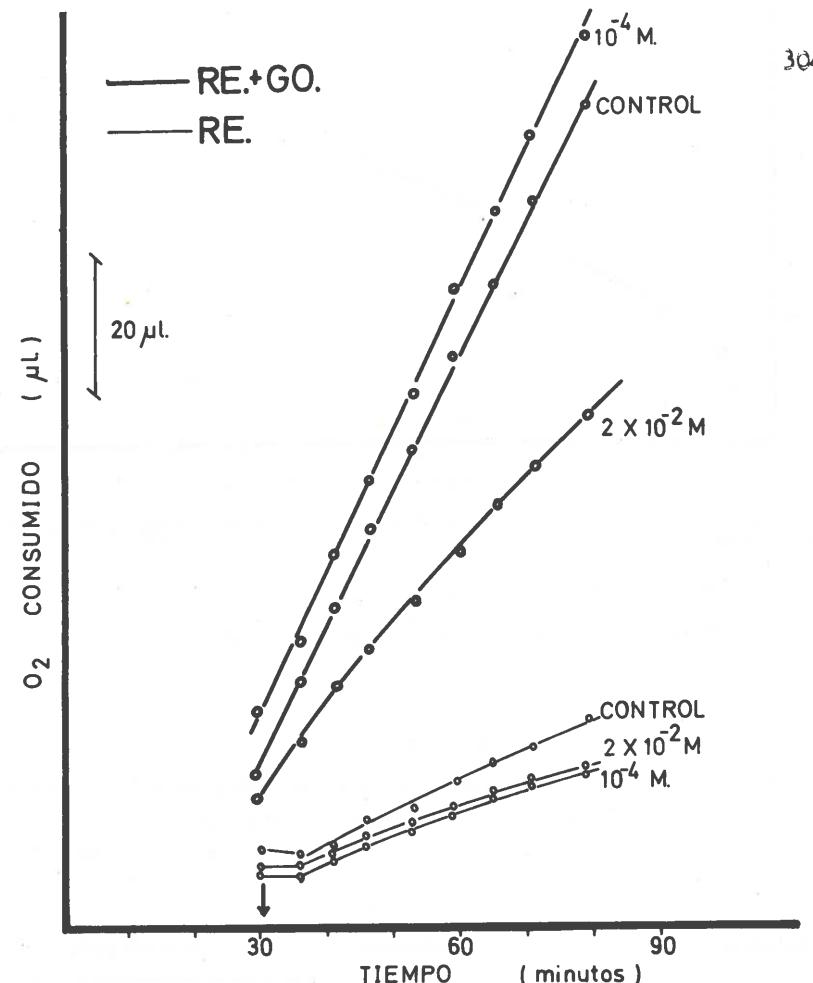


Fig. 70.—Efectos del 2,4-dinitrofenol sobre la respiración endógena y la oxidación de la glucosa por las gemas de *H. stellata*.

- Germinación = 25,6 %
- Proteína = 11,5 mgrs./mat. Warburg.
- La flecha indica el momento de vertido del inhibidor.

3.3.—Sensibilidad de las células rotas frente a distintos inhibidores.

- a) *Efecto del sorbato sódico sobre las actividades respiración endógena, glucosa-oxidasa, succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa y citocromo-oxidadasa de células rotas.*

La acción inhibidora del sorbato, comprobada en células enteras, se estudió también en células tratadas con ultrasonidos con objeto de eliminar las barreras que pudieran oponerse a su penetración. Se pretendió además localizar su punto de acción que ha sido descrito situado en las deshidrogenasas.

Se estudiaron sus efectos sobre el consumo de oxígeno de las células durante el metabolismo de la glucosa y el succinato junto con sus acciones sobre la respiración endógena, la succinato-deshidrogenasa, y la citocromo-oxidadasa. Para ello se tomaron conidios incubados durante 18 horas 45 minutos, por el procedimiento standard (41,6 % de germinación), parte de los cuales se sonicaron durante 5 minutos en volúmenes de 5 mls. (1.200 millones de conidios/ml.). Sobre las células enteras se registró la actividad respiratoria endógena y la glucosa-oxidasa en presencia y ausencia de sorbato; y con las células rotas, las actividades succinato-oxidasa,

TABLA 42

Efectos del sorbato sódico sobre la respiración endógena y la glucosa-oxidasa de las células enteras, y sobre la succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa y citocromo-oxidadasa de células sonicadas.

—Actividad en presencia de 0,803 % de sorbato sódico—	
	(% de la actividad control)
<i>Células enteras</i>	
—Respiración endógena	75,0
—Respiración endógena + glucosa-oxidasa	70,0
<i>Células rotas</i>	
—Respiración endógena + glucosa-oxidasa	81,2
—Succinato-oxidasa	69,0
—Succinato-deshidrogenasa	45,0
—Citocromo-oxidadasa	89,6

- Germinación del micelio = 41,6 %.
- Proteína; células enteras = 26,20 mgrs./mat. Warburg.
células rotas = 24,40 mgrs./mat. Warburg.

succinato-deshidrogenasa, citocromo-oxidasa, respiración endógena y glucosa-oxidasa, también en presencia y ausencia de sorbato (0,803 %).

Los resultados obtenidos se hallan en la Tabla 42 y Fig. 71 y 72.

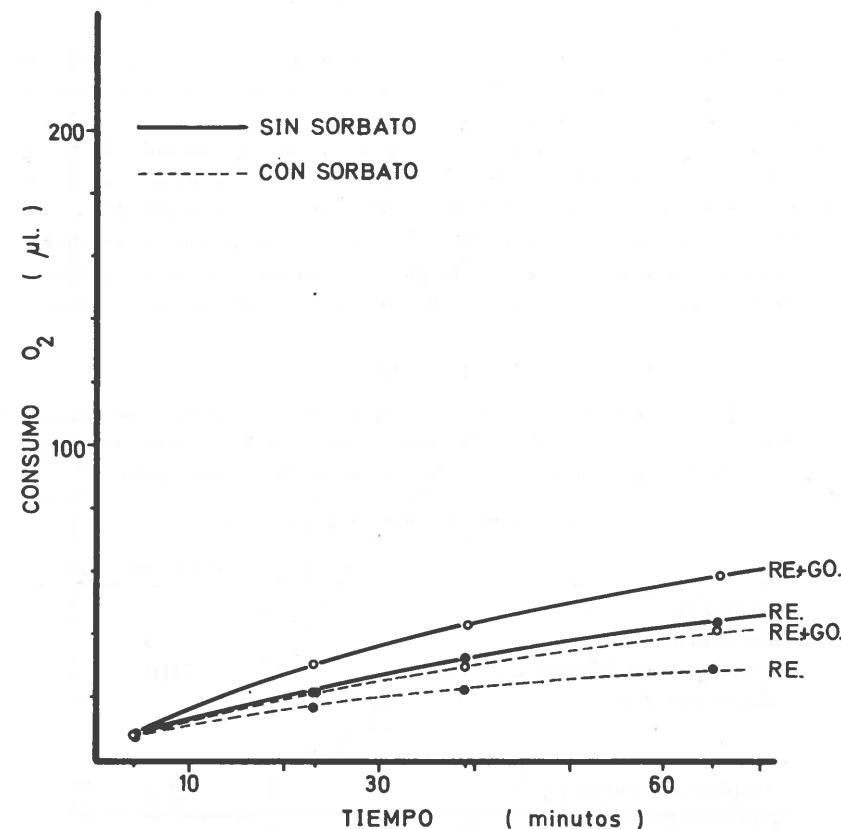


Fig. 71.—Efecto del sorbato sódico sobre la respiración endógena y la glucosa-oxidasa de las células enteras.

— Germinación del micelio = 41,6 %.
— Proteína en el matraz de Warburg = 26,20 mgrs.

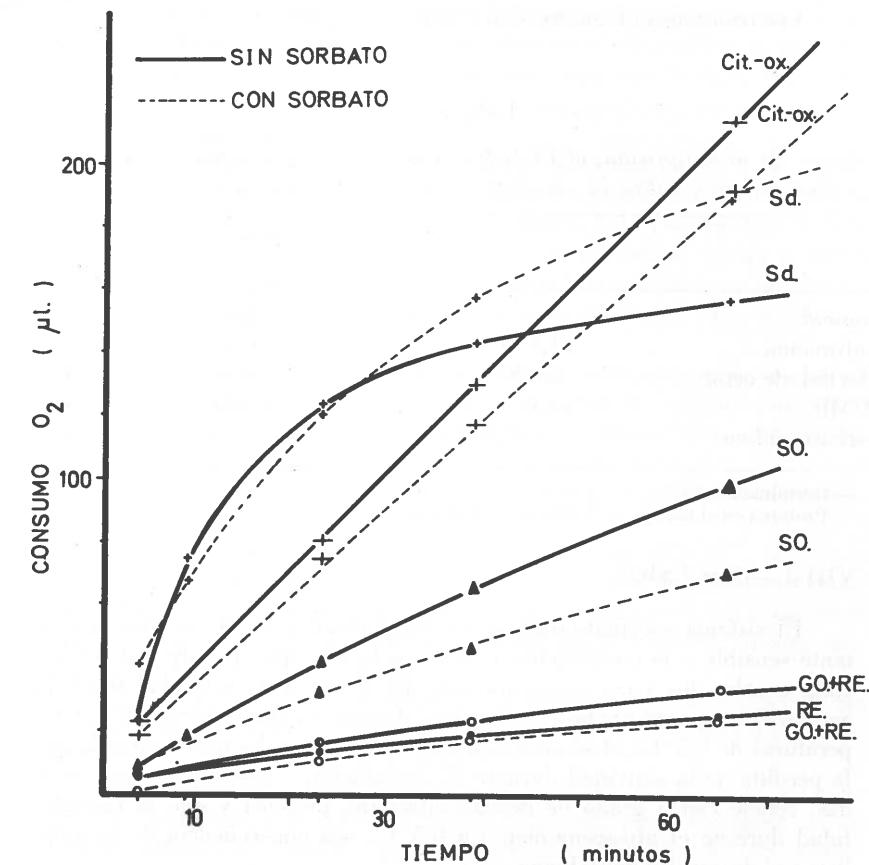


Fig. 72.—Efectos del sorbato sódico sobre la succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa y citocromo-oxidasa de las células sonicadas.
(Concentración de sorbato = 0,803 %).
— Germinación del micelio = 41,6 %.
— Proteína en el matraz de Warburg. 24,40 mgrs.

3.4.—Efecto de la antimicina, el PCMB, el clorhidrato de ortofenantrolina y el sorbato sódico, sobre la succinato-oxidasa del extracto libre de células.

El estudio de los efectos de la antimicina, el PCMB, el clorhidrato de ortofenantrolina, y el sorbato sódico sobre la succinato-oxidasa del extracto libre de células, se efectuó utilizando una preparación de conidios incubados 17 horas, por el procedimiento standard (43 % de germinación).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 43.

TABLA 43

Efecto de la antimicina, el PCMB, el clorhidrato de ortofenantrolina y el sorbato sódico, sobre la succinato-oxidasa del extracto libre de células.

	Succinato-oxidasa	Inhibición (%)
Control	2,65	
Antimicina ($1,5 \times 10^{-5}$ M.)	0,47	84
Clorhid. de ortof. (5×10^{-3} M.)	0,47	84
PCMB ($4,7 \times 10^{-3}$ M.)	0,24	92
Sorbato sódico 0,838 %	1,44	46

— Germinación 43 %.

— Proteína en el matraz de Warburg = 50,8 mgrs.

VIII-4.—DISCUSION.

El sistema succinato-oxidasa en las partículas de *H. stellata* es bastante sensible a la congelación y descongelación, que destruye, al ser llevada a cabo dos veces sucesivas, más del 20 % de la actividad total; la actividad succinato-oxidasa se destruye durante el almacenamiento a temperaturas de 0-5 °C., si se prolonga más de 24 horas. Es muy probable que la pérdida de la actividad durante la congelación y descongelación repetidas, refleje cierto grado de desnaturalización proteica y que la inestabilidad durante el almacenamiento a 0-5 °C., sea consecuencia de la autolisis y el desarrollo microbiano.

El amital, a concentraciones del orden de 5×10^{-4} M., estimula ligeramente la respiración de las gomas de *H. stellata* consumiendo glucosa; en cierto modo el comportamiento de este hongo, es por tanto, contrario al originalmente descrito por QUASTEL y Col. (QUASTEL y WHEATLEY, 1933; JOWET y QUASTEL, 1937). Aunque el efecto estimulante no es muy marcado, sobre todo si se tiene en cuenta que la adición de este inhibidor tiene lugar en disolución etanólica, su sensibilidad al amital es sin duda muy distinta de la ofrecida por otros hongos como los estudiados por SCHICHI (SCHICHI y URITANI, 1964).

El paracloromercurobenzoato a concentraciones entre 10^{-2} y 10^{-3} M inhiben considerablemente la respiración endógena y totalmente el consumo de oxígeno debido a la oxidación de la glucosa por las células enteras. Este efecto es evidentemente ejercido sobre los componentes de la cadena respiratoria ya que la succinato-oxidasa de los extractos libres de

células quedan también totalmente inhibidos por estas concentraciones de PCMB. También en este sentido se comporta el *H. stellata* de un modo muy distinto a *Ceratocystis fimbriata* estudiado por Schichi y Uritani, aunque hay que tener en cuenta que las concentraciones por ellos utilizadas eran considerablemente inferiores.

El cianuro potásico a concentraciones del orden de 10^{-3} M., no inhibe totalmente la porción final de la cadena respiratoria permitiendo la persistencia de un 15 % de la actividad control. Esta resistencia a la inhibición por el ion cianuro parece ser una característica común a varios hongos, y refleja indudablemente importantes diferencias entre su sistema citocromo-oxidasa y el de los mamíferos y las bacterias, muy sensibles a este inhibidor.

La fenilhidracina, a las concentraciones ordinariamente usadas no inhibe ni la respiración endógena ni el consumo de oxígeno durante el metabolismo de la glucosa. Tampoco la hidroxilamina afecta en absoluto a la respiración endógena, muy poco a la oxidación de la glucosa, contrastando marcadamente con su acción en otros microrganismos (JURTSCHUK, ASTON y OLD, 1967).

La azida sódica a concentraciones del orden de 10^{-3} M. e inferiores, no sólo no inhibe, sino que estimula tanto la respiración endógena como la oxidación de la glucosa y se necesita llegar a concentraciones próximas a 10^{-2} M. para que se manifieste un notable efecto inhibidor (menos marcado sobre la respiración endógena).

En conjunto, la porción final de la cadena respiratoria, parece ser particularmente resistente a los inhibidores y no es muy fácil que esa resistencia se deba a barreras de difusión.

Ninguno de los agentes de quelación probados, el EDTA, el α - α' -dipiridilo, cupferrón y la ditizona afectan a la respiración endógena de las células enteras. El EDTA, α - α' -dipiridilo, y el cupferrón, no afectan tampoco a la oxidasa de la glucosa. La ditizona y la ortofenantrolina, en cambio, producen una acusada inhibición del metabolismo aeróbico de la glucosa.

Es curioso que sean precisamente estos dos agentes de quelación que tan acusadamente difieren en una propiedad tan importante para su acción como la liposolubilidad de sus quelatos (TAPPEL, 1959), los menos eficaces y que lo sean tanto, si se comparan sus efectos con los producidos sobre preparaciones de mamíferos (TAPPEL, 1959; REDFEARN y col., 1965). Dado que el punto de acción de los quelantes se halla fundamentalmente localizado entre las flavoproteínas y la ubiquinona, es evidente que la diferencia entre el comportamiento ofrecido por la glucosa y el sustrato endógeno reflejan la distinta sensibilidad de la porción que precede a los puntos de entrada de los electrones, que de ellos deriva en el tronco común de la cadena transportadora.

Parece razonable suponer que los efectos de la ortofenantrolina sobre la oxidación de la glucosa sean fundamentalmente consecuencia de las acciones de este agente de quelación sobre la porción NADH-Q-oxidoreductasa. Es digno de tener en cuenta sin embargo, que inhibe la succinato-oxidasa en una extensión del 92 % a concentraciones no superiores a aquéllas para las que en las preparaciones de mamíferos no manifiesta acción alguna. En abierta oposición a lo que ocurre en las preparaciones de KEILIN HARTREE, (REDFEARN, y col, 1965), no estimula en absoluto la respiración a bajas concentraciones, sino que su acción inhibidora es, en todo el intervalo probado, proporcional al logaritmo de la concentración, alcanzándose inhibiciones completas a concentraciones del orden de 5×10^{-3} M.

La inhibición de las metalflavoproteínas por la ortofenantrolina suelen ser reversibles, recuperando sus actividades enzimáticas mediante la adición de iones Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Ca⁺⁺, ó Mg⁺⁺ (SINGER y KEARNY, 1964), a lo que no parece haber excepción de NADH-Q - oxidoreductasa de los mamíferos (REDFEARN y col. 1965). La inhibición por la ortofenantrolina, de la oxidación de la glucosa, no se recupera sin embargo por adición de iones metálicos. Tal vez tanto las acciones de la ditizona, como las de la ortofenantrolina resulten independientes de su poder de quelación.

La actividad respiratoria de las gomas de *H. stellata* enteras, resulta insensible a la antimicina; este inhibidor, que a concentraciones del orden de 0,07 µg./mgr. de proteína inhibe casi un 100 % de la respiración de las mitocondrias de mamíferos y que resulta también bastante eficaz frente a diversos hongos, no afecta en absoluto ni aun a concentraciones 20-30 veces más elevadas, la respiración endógena ni la oxidación de la glucosa por las gomas de *H. stellata*.

Esta resistencia puede deberse en parte, sin embargo, a barreras de difusión ya que el sistema succinato-oxidasa de las partículas de los extractos libres de células queda inhibida en un 84 % por concentraciones del orden de 0,1 µgrs./mgr. de proteína. En cualquier caso parece indudable que su cadena respiratoria es particularmente resistente a la antimicina.

A las concentraciones habitualmente usadas, no ha sido posible poner de manifiesto el efecto estimulante de la respiración ejercido por el 2,4-dinitrofenol pese a que una de las concentraciones usadas está muy próxima a la que ejerce el estímulo máximo de la respiración en las mitocondrias de mamíferos (VAN DAM, 1967). Es posible que, como observan SCHICHI y URITANI (1964), fuera necesario utilizar aun concentraciones más bajas. El efecto depresor de las concentraciones más altas (2×10^{-2} M.) resulta, en cambio, claramente manifiesto, lográndose en una extensión más alta sobre la oxidación de la glucosa que sobre la respiración endógena.

IX.—CONCLUSIONES

1.—La especie *Sporendonema epizoum* creada por CIFERRI y REDAELLI (CIFERRI y REDAELLI, 1934) agrupando numerosas cepas consideradas hasta entonces como especies diferentes, entre las que se halla *Hemispora stellata*, es sumamente heterogénea. La sinonimia *Hemispora Stellata* Vuill.—*Sporendonema epizoum* CIF y RED., sólo está justificada si para su clasificación se considera exclusivamente la esporogénesis; en efecto, *Hemispora stellata* forma esporas pseudoendogénicamente al igual que el resto de las cepas clasificadas como *Sporendonema epizoum* y no es posible observar la formación de protoconídios descrita por VUILLEMIN (1906); difiere sin embargo de las características citadas por CIFERRI y REDAELLI como propias de *Sporendonema epizoum* en su halofilismo (facultativo), en el tamaño de sus esporas (1,5 micras en lugar de 3 micras) y en su comportamiento frente a la gelatina (no la licua).

Se impone una clasificación más detallada del grupo, atendiendo no sólo a la esporogénesis sino también a otras características morfológicas y funcionales. FRANK y HESS (1941, b) abogaban ya por una posición semejante distinguiendo un *Sporendonema epizoum* y un *Sporendonema minutum* en virtud del halofilismo, el tamaño de las esporas y el comportamiento frente a la gelatina. *Hemispora stellata* se halla más próximo a su propuesto *Sporendonema minutum* que a *Sporendonema epizoum* y sólo difiere significativamente de la especie propuesta por FRANK y HESS en su comportamiento frente a la gelatina.

Difiere también marcadamente en su halofilismo del microrganismo que bajo el nombre de *Sporendonema epizoum* utilizó Vaisey (1954).

2.—La velocidad de germinación de las esporas de *Hemispora stellata* se ve sumamente influída por su método de obtención y el número de conídios presentes en el medio de incubación; la sincronización del proceso germinativo es difícil; de los procedimientos intentados sólo resulta parcialmente eficaz un tratamiento térmico suave (35°C, 5 minutos) que retrasa el proceso además de sincronizarlo. Parece previsible que un tratamiento térmico ligeramente más alto (40° - 45° C.) resulte en una sincronización más eficaz.

3.—El proceso germinativo no va acompañado en sus etapas iniciales de una síntesis proteica global muy activa, que sólo comienza, en las condiciones de germinación utilizadas a lo largo de esta tesis, al cabo de 14 horas cuando las hifas comienzan a alargarse. Durante las horas que preceden a la formación de las primeras gomas, aumenta notablemente el consumo de oxígeno por miligramo de proteína resultante del metabolismo aeróbico de los sustratos endógenos y de la glucosa exógena. Estas actividades específicas decrecen luego. Parece obligado concluir

que durante las etapas que preceden a la germinación, se sintetizan preferentemente determinadas proteínas enzimáticas y otros componentes necesarios para el propio proceso germinativo, entre los que deben encontrarse los componentes de la cadena respiratoria, las deshidrogenasas de los sustratos endógenos y productos de ellos derivados y las deshidrogenasas de los metabolitos de la glucosa. El posterior descenso de las actividades respiratorias específicas debe tener lugar fundamentalmente por «dilución» ya que sigue siendo necesario el aporte de energía para los procesos biosintéticos.

4.—Las variaciones de la composición porcentual experimentadas por proteínas, lípidos e hidratos de carbono a lo largo del ciclo biológico de *H. stellata* sugieren que este hongo utiliza sus propios hidratos de carbono durante el proceso germinativo.

5.—*Hemispora stellata* como la mayor parte de los hongos, sólo posee uno de los dos tipos de quinonas que intervienen en el transporte biológico de electrones. En ninguna de las fases de su ciclo evolutivo, cualquiera que sean las condiciones de cultivo, se detectan indicios de naftoquinonas. En todas ellas se presenta una benzoquinona que ha sido caracterizada como ubiquinona 45 (Q_{45}).

6.—La concentración de Q_{45} varía con la fase del ciclo evolutivo y con las condiciones de cultivo: es de 10 a 20 veces superior en las gemas y en el micelio cultivado en superficie que en las esporas y en el medio cultivado en profundidad.

En el micelio cultivado en superficie la tasa de ubiquinona aumenta a medida que éste envejece, de modo semejante a lo observado por TAKEDA y col. (1968) en *Achromobacter* y CRANE (1962) en *Tetrahymena*.

Las variaciones experimentadas por los niveles de ubiquinona en las distintas fases de desarrollo de *H. stellata* guardan una correlación bastante estrecha con las sufridas por las aptitudes respiratorias y es muy probable que contribuyan poderosamente a crear estas últimas.

7.—La cadena transportadora de electrones de *H. stellata* contiene además de otros insolubles, dos nuevos citocromos solubles que han sido purificados por precipitación con sulfato amónico y cromatografías de tamizado molecular e intercambio iónico. Hemos denominado en principio a estos nuevos citocromos, C(550 *H. stellata*) y C(552 *H. stellata*).

Los citocromos C (550 *H. stellata*) y C (552 *H. stellata*), no son autooxidables; son eluidos de la columna chromatográfica en estado de casi completa reducción. Tampoco son oxidados por el burbujeo durante 3 minutos de una corriente de oxígeno pero sí por el H_2O_2 y el ferricianuro potásico. El ditionito los reduce con facilidad.

El examen de sus características espectrales, pone de manifiesto que aunque el citocromo C (550 *H. stellata*) guarda cierto parecido con el citocromo C (550 *Navicula pelliculosa*) de YAMANAKA (1962), la banda

de Soret y β están desplazadas dos milimicras hacia la región del ultravioleta. La relación α/β del citocromo C (550 *H. stellata*), es más elevada así como también la relación banda de Soretred/ E_{280} . La reducción no provoca cambios tan acusados en la extinción de la banda de Soret. El citocromo C (550 *Navicula pelliculosa*) precipita además entre 40-50 % de saturación de sulfato amónico en tanto que el de *H. stellata* lo hace entre el 65 y el 100 % de saturación.

8.—El estudio sistemático de la cadena respiratoria en las células enteras de *H. stellata* se ve dificultado por la existencia de una respiración endógena muy alta y la incapacidad de las células enteras de metabolizar el succinato, α -cetoglutarato, citrato, fumarato y malato. Esta dificultad parece ser fundamentalmente reflejo de la incapacidad de estos sustratos para atravesar la pared celular y puede superarse mediante la ruptura de las células.

El tratamiento por ultrasonidos permite preparar extractos libres de células, provistos de actividades succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa, citocromo-oxidasa y parafenilenodiamina-oxidasa.

9.—La cadena respiratoria de *H. stellata* es particulada. Si se quieren poner de manifiesto las diversas actividades respiratorias, en los extractos libres de células, se precisa llevar a efecto el tratamiento por ultrasonidos, que debe ser muy breve. Su prolongación destruye, probablemente por subfraccionamiento, las partículas en las que originalmente se halla integrada la totalidad de la cadena respiratoria. Esta afirmación está sustanciada por la superior sensibilidad de la actividad succinato-oxidasa a los ultrasonidos, si se compara con la succinato-deshidrogenasa o la citocromo-oxidasa. La imposibilidad de poner de manifiesto en los extractos libres de células, actividades malato-oxidasa, citrato-oxidasa, fumarato-oxidasa y α -cetoglutarato-oxidasa, parece ser debida a que la superior complejidad de organización de los correspondientes sistemas les confiere una mayor labilidad.

10.—Mediante centrifugación de las células rotas por tratamiento con ultrasonidos, pueden prepararse fracciones particuladas que presentan distintas actividades enzimáticas.

Las partículas obtenidas a 25.000 $\times g$. durante 30 minutos poseen actividades específicas succinato-oxidasa y citocromo-oxidasa, máximas, y las sedimentadas a 100.000 $\times g$. durante 90 minutos la máxima actividad específica succinato-deshidrogenasa.

La actividad parafenilenodiamina-oxidasa se deposita en campos gravitatorios mucho menos intensos (800 $\times g$.-2,5 minutos).

11.—La actividad parafenilenodiamina-oxidasa registrada en *H. stellata* no puede ser considerada como un índice de la actividad citocromo-oxidasa como propone JURTSCHUK (1967).

12.—La sensibilidad de la cadena respiratoria de *H. stellata* frente a diversos inhibidores difiere notablemente de la de las mitocondrias de los mamíferos y numerosos microorganismos, lo que refleja, sin duda, notables diferencias en su composición y funcionamiento.

a) La actividad respiratoria de *H. stellata* derivada del consumo aeróbico de la glucosa exógena, es resistente al amital; concentraciones de 5×10^{-4} la estimulan ligeramente.

b) El paracloromercurobenzoato a concentraciones de 10^{-2} M. es un eficaz inhibidor de su actividad «glucosa-oxidasa» y en parte de la respiración endógena.

c) La cadena respiratoria de *H. stellata* es muy resistente frente al ion cianuro. El 15 % de su actividad respiratoria persiste ante una concentración de cianuro de 10^{-3} M.

d) El consumo de oxígeno durante el metabolismo aeróbico de la glucosa por *H. stellata*, a diferencia de lo que ocurre con otros microrganismos, es muy resistente a la fenilhidracina y a la hidroxilamina en las concentraciones normalmente utilizadas.

e) La azida sódica, a concentraciones de 10^{-3} M. ejerce un efecto estimulante de las actividades respiración endógena y «glucosa-oxidasa» y a concentraciones de 10^{-2} M. un efecto marcadamente inhibidor, más acusado sobre la respiración endógena.

f) Algunos agentes de quelación (EDTA, α - α' -dipirilo, cupferrón y ditizona) no afecta a la respiración endógena de las células enteras. El EDTA, α - α' -dipiridilo y cupferrón, tampoco afectan al consumo de oxígeno durante el metabolismo aeróbico de los sustratos endógenos.

La ditizona y el clorhidrato de ortofenantrolina son fuertemente inhibidores del consumo de oxígeno durante el metabolismo aeróbico de la glucosa. La acción inhibidora del clorhidrato de ortofenantrolina es proporcional al logaritmo de la concentración en el intervalo $10^{-3} - 10^{-5}$ M. La inhibición es completa a concentraciones de 5×10^{-3} M.

La actividad inhibida no se restablece con iones de Fe^{++} , Zn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} , lo que sugiere que las acciones de este compuesto son ajenas a su poder de quelación.

g) La antimicina a concentraciones de 10-20 veces superiores a las que produce la total inhibición de la actividad respiratoria en las mitocondrias de mamíferos, no afecta, en absoluto, al sistema respiratorio de las células enteras de *H. stellata*. Parte de esta resistencia parece debida a barreras de difusión, pues la actividad succinato-oxidasa de los extractos libres de células resulta inhibida en un 84 % con concentraciones del orden de 0,4 microgramos/mg. de proteína. La cadena respiratoria de este microrganismo es particularmente resistente a la antimicina.

h) El 2,4-dinitrofenol no ejerce, a las concentraciones en las que produce en el sistema respiratorio de los mamíferos el estímulo máximo,

efecto estimulante alguno sobre el consumo de oxígeno derivado del metabolismo de los sustratos endógenos y de la glucosa exógena. Es muy marcado en cambio su efecto inhibidor a concentraciones elevadas (2×10^{-2} M.), siendo más acusado sobre la actividad «glucosa-oxidasa» que sobre la respiración endógena.

RESUMEN

Se han estudiado diversos aspectos bioquímicos y biológicos en *H. stellata*.

El comportamiento de este moho en medios con ClNa y gelatina difiere del descrito por otros autores para cepas de *Sporondonema epizoum* considerado como sinónimo.

Se describe un método para el suministro abundante de esporas y gemas muy útil para la realización de estudios bioquímicos.

Se ha estudiado la evolución de su composición química durante la germinación.

Los estudios sobre los componentes de su cadena respiratoria han puesto de manifiesto la presencia de Q₄₅. Se ha determinado su nivel en las diversas fases de su desarrollo y se ha observado una evolución del mismo paralela a la de su actividad respiratoria. No ha podido en cambio detectarse la presencia de naftoquinonas.

Se han detectado y obtenido en estado de elevada pureza, dos citocromos, 550 *H. stellata* y 552 *H. stellata*.

Se ha determinado la distribución intracelular de diversas actividades enzimáticas y se ha estudiado el efecto sobre las mismas de la ruptura celular por ultrasonidos y su susceptibilidad frente a diversos inhibidores.

RÉSUMÉ

On a étudié plusieurs aspects biochimiques et biologiques dans *H. stellata*.

La conduite de ce fongus dans des milieux contenant du ClNa et de la gélatine diffère de celui qui a été décrit pard'autres auteurs pour des souches de *Sporondonema epizoum* considéré comme synonyme.

On décrit une méthode pour la fourniture abondante de spores et de gemmes très utile pour faire des études biochimiques.

On a étudié l'évolution de sa composition chimique pendant la germination.

Les études sur les composants de sa chaîne respiratoire ont démontré la présence de Q₄₅. On a déterminé son niveau dans les différentes phases

de son développement et l'on a observé que son évolution est parallèle à celle de son activité respiratoire. Au contraire, on n'a pas pu détecter la présence de naphtoquinones.

On a détecté et obtenu dans un état de grande pureté deux cytochromes, le 550 *H. stellata* et le 552 *H. stellata*.

On a déterminé la distribution intercellulaire de différentes activités enzymatiques et l'on a étudié l'effet de la rupture cellulaire sur ces activités enzymatiques par des ultra-sons et leur susceptibilité en rapport avec plusieurs inhibiteurs différents.

SUMMARY

Some biological and biochemical aspects of a strain of *H. stellata* have been studied.

Halophilism and growth on gelatin medium does not agree with the results obtained by other authors with strains of *Sporendonema epizoum* considered to be synonymous.

A procedure for the steady supply of spores and gemmae, suitable for biochemical studies is described.

The evolution of the chemical composition of this fungus along germination has been established.

Studies on its respiratory chain components have shown the existence of Q₄₅. Its level at the various growth phases has been determined and this evolution has proved to parallel respiratory activity.

Two cytochromes (550 *H. stellata* and 552 *H. stellata*) have been detected and highly purified.

The intracellular distribution of various enzymatic activities has been established and the effect upon them of ultrasonic cell rupture and susceptibility to several compounds has been determined.

BIBLIOGRAFIA

- AGUIRRE M. J. R. y VILLANUEVA J. R. (1962).—*Nature* **196** 693.
 ALLEN P. J. (1955).—*Phytopathology* **45** 259.
 AMBE K. S. y CRANE F. L. (1960).—*Biochim. biophys. Acta* **43** 30.
 AMBLER R. P. (1962).—*Biochem. J.* **82** 30.
 ANDERSON B. C., CIOTTI J. y KAPLAN N. O. (1959).—*J. Biol. Chem.* **234** 1219.
 ANDERSON J. A. (1964).—*Biochim. biophys. Acta* **89** 540.
 ANSLOW W. K. y RAINSTRICK H. (1938).—*Biochem. J.* **32** 687.
 APPLEBY C. A. y MORTON R. K. (1959).—*Biochem. J.* **77** 462.
 ARMSTRONG J. M. D., COATES J. H. y MORTON R. K. (1961).—En «*Haematin Enzymes*». (Eds. J. A. Falk, R. Lemberg y R. K. Morton). Pergamon Press, N. Y. (1965).
 BALL E. G., ANFINSEN C. B. y COOPER O. (1947).—*J. Biol. Chem.* **168** 257.
 BEINERT H. (1957).—*J. Biol. Chem.* **225** 465.

- BEINERT H., HEINEN W. y PALMER G. (1962).—*Brookhaven Symposia in Biol.* **15** 229.
 BENSLEY R. R. y HOERR N. (1934).—*Anat. Recor* **80** 449.
 BISHOP D. H. L., PANDYA K. P. y KING H. K. (1962).—*Biochem. J.* **83** 606.
 BLUMENTHAL H. J. (1963).—*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102** 688.
 BONNER B. A. y MACKLIS L. (1957).—*Plant Physiol.* **32** 291.
 BOULTER D. y BURGESS A. (1955).—*Experiencia* **11** 188.
 BOULTER D. y DERBISHIRE (1957).—*J. Exptl. Botany* **8** 313.
 BOYD J. W. y TARR H. L. A. (1954).—*Fish. Res. Bd. Canadá. Prog. Repts. Pacific Coast Stas.* **99** 22.
 BRAGG P. D. y POLGLASE W. J. (1963).—*J. Bacteriology* **86** 544.
 BRODIE A. F. (1956).—*J. Biol. Chem.* **219** 853.
 — (1958).—*Fed. Proc.* **17** 196.
 — (1961).—*Fed. Proc.* **20** 995.
 BRODIE A. F. y RUSSEL P. J. (1961).—*Fifth Int. Cong. of Bisoch.*—Moscow - (Ed. C. Slater) - Pergamon Press, Londres (1961) pág. 89.
 BRUENMER J. H., WILSON P. W., GLENN J. L. y CRANE F. L. (1957).—*J. Bacteriology* **73** 113.
 BURGOS J. y REDFEARN E. R. (1965).—*Biochim. biophys. Acta* **110** 475.
 BRYA J., KANIUGA Z. y FRACKOWIAK B. (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **143** 285.
 CAMERINO P. W. y HYATT M. T. (1953).—*J. Bacteriology* **66** 712.
 CAMERINO P. W. y KINK T. E. (1965).—*Biochim. biophys. Acta* 603.
 CANTINO E. C. y HYATT M. T. (1953).—*J. Bacteriol.* **66** 712.
 CASTOR L. N. y CHANCE B. (1955).—*J. Biol. Chem.* **217** 453.
 CIFERRI R. y REDDELLI P. (1934).—*The Journ. of Trop. Med. and Hyg.* **37** n.º 11 167.
 CLARK J. K. (1963).—«*Experimental biochemistry*» - (W. H. FREEMAN and Co., San Francisco (1963) pág. 23.
 COCHRA K. W. y DUBOIS K. P. (1954).—*Endocrinology* **55** 10.
 COCHRANE V. W., BERRY S. J., SIMON F. G., COCHRANE J. C., COLLINS C. B. y LEVY J. A., y HOLMES P. K. (1963)a.—*Plant Physiol.* **38** 533.
 COCHRANE V. W., COCHRANE J. C., VOGEL J. M., y COLES R. S. (1963)b; *J. Bacteriology* **86** 312.
 COWDRY E. V. (1918).—*Contrib. Embryol.* **8** 39.
 CRANE F. L. (1959).—*Plant Physiol.* **34** 128.
 CRANE F. L. (1961).—En «*Quinones in Electron Transport*» - (Eds. G. E. Wolsenthalme y C. M. O'Connor) - Churchill, Londres (1961) pág. 48.
 CRANE F. L. (1962).—*Biochemistry* **1** 510.
 CRANE F. L. (1965).—En «*Biochemistry of Quinones*» - (Ed. R. A. Morton) - Academic Press, Londres (1965) págs. 183-204.
 CRANE F. L., GLENN J. L. y GREEN D. E. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **22** 475.
 CRANE F. L., HATEFI Y., LESTER R. L. y WIDMER C. (1957).—*Biochim. biophys. Acta* **25** 220.
 CHAIX P. (1961).—Citado en «*Haematin Enzymes*» por J. E. Falk, R. Lemberg, y R. K. Morton (Eds.) - Pergamon Press, N. Y. (1961) pág. 225.
 CHAIX P. y PETIT J. F. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **22** 66.
 CHANCE B. (1952a).—*J. Biol. Chem.* **197** 567.
 CHANCE B. (1952b).—*Nature* **169** 215.
 CHANCE B. (1961).—En «*Quinones in Electron Transport*» - (Eds. G. E. Wolsenthalme y C. M. O'Connor) - Churchill, Londres (1961) pág. 327.
 CHANCE B. y GAEBLER O. H. (1956).—En «*Enzymes: Limits of Biological Structure and Function*» - Academic Press, N. Y. (1956) pág. 447.
 CHANCE B. y HESS B. (1962).—*J. Biol. Chem.* **234** 2404.
 CHANCE B., HOLLUNGER G. y HAGIGARA B. (1962).—*Biochim. biophys. Res. Comm.* **8** 180.

- CHANCE B. y PARSONS D. F. (1963).—*Science* **142** 1176.
- CHANCE B., PARSONS D. K. y WILLIAMS G. R. (1964).—*Science* **143** 136.
- CHANCE B. y REDFERN E. R. (1961).—*Biochem. y* **80** 632.
- CHANCE B. y WILLIAMS G. R. (1955).—*J. Biol. Chem.* **217** 395.
- CHANTRENNE H. (1944).—*Enzymología* **11** 213.
- CHAUVET J. (1943).—*Enzymología* **11** 57.
- CHENG S. C. (1954).—*Plant Physiol.* **29** 458.
- CHMILEWSKA J. (1960).—*Biochim. biophys. Acta* **39** 170.
- CHRISTIE S. M. H., KENNER G. W. y TODD A. R. (1954).—*J. Chem. Soc.* pág. 46.
- DESMAZIÉRES J. B. H. J. (1827).—*Ann Sc. Nat. Bot.* xi 246.
- _____. (1827).—*Rec. Trav. Soc. d'Anat. Sci. Agr. Arts.* (Lille) 185.
- DEUL D., SLATER E. C. y VELDSTRA L. (1958).—*Biochim. biophys. Acta* **27** 133.
- DEVLIN T. M. y LEHNINGER A. L. (1956).—*J. Biol. Chem.* **219** 507.
- DIXON M. y WEBB E. (1964).: «Enzymes» - Longmans, Londres (1964) pág. 340.
- DODGE B. O. (1912).—*Bull. Torrey Botan.* **39** 139.
- DOMSCH K. H. (1954).—*Archiv. Mikrobiol.* **20** 163.
- DONALDSON K. O., NASON A., MOORE K. B. y GARRET R. H. (1957).—*Biochim. biophys. Acta* **26** 665.
- DUELL E. A., INOUE S. y UTTER M. F. (1964).—*J. Bacteriology* **88** 1762.
- EDDY A. A. (1958): en «The chemistry and Biology of Yeasts» - (Ed. A. H. Cook) - Academic Press, N. Y. (1958) pág. 157.
- EDDY A. A. y WILLIAMSON D. H. (1957).—*Nature* **179** 1252.
- EGAMI F., ISHIMOTO M., MORI, Z., OCURA J., OKUNUKI K. y SATO R. (1957).—*J. Bioch. (Tokyo)* **44** 619.
- ERICKSON R. E., BROWN K. S., WOLF D. E. y FOLKERS K. (1960).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **90** 314.
- ERNSTER L. (1961): en «Biological Structure and function» - (Eds. T. W. Goodwin y O. Lindberg)-Academic Press, Londres (1961) pág. 138.
- ERNSTER L., DALLNER G. y AZBONE G. F. (1963).—*J. Biol. Chem.* **238** 1124.
- ESTABROOK R. W. (1957).—*J. Biol. Chem.* **223** 781.
- ESTABROOK R. W. (1957).—*J. Biol. Chem.* **227** 1093.
- ESTABROOK R. W. (1961): en «Haematin Enzymes» - (Eds. J. E. Falk, R. Lemberg y R. K. Morton)-Pergamon Press, N. Y. (1961) pág. 436.
- ESTABROOK R. W. (1962).—*Biochim. biophys. Acta* **60** 236.
- FERNÁNDEZ MORÁN H. (1962).—*Circulation* **26** 1039.
- FERNÁNDEZ MORÁN H., ODA T., BLAIR P. V. y GREEN D. E. (1964).—*J. of Cell Biol.* **131** 240.
- FOWLER L. R. y RICHARDSON S. H. (1963).—*J. Biol. Chem.* **238** 456.
- FRANK M. y HESS E. (1941)a: Fish. Res. Bd. of Canada 5 (3) 276.
- _____. (1941)b: Fish. Res. Bd. of Canada 5 (3) 287.
- FRANKLIN T. J., JONES C. W. y REDFEARN E. R. (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 240.
- GALE P. H., ANSON B. H., TRENNER N. R., PAGE A. C. y FOLKER K. (1963).—*Biochemistry* **2** 196.
- GIUDITTA A., y CASOLA L. (1965).—*Biochim. biophys. Acta* **110** 17.
- GODDARD D. R. (1935).—*J. gen. Physiol.* **19** 45.
- GODDARD D. R. y SMITH P. E. (1938).—*Plant Physiol.* **24** 241.
- GOMORI (1946).—*Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* **62** 33.
- GOODWIN T. W. (1964).—*Laboratory Practice*, april.
- GOTTLIEB D., AMMAN A. y CARTER E. H. (1955).—*Plant Disease Rptr.* **20** 219.
- GOTTLIEB D., CARTER H. E., LUNG-CHIWU y SLONEKER J. H. (1960).—*Phytopathology* **50** 594.
- GREEN D. E. (1958): «The Harvey Lectures». Series LII, Academic Press, N. Y. (1958) pág. 177.
- _____. (1959): «Discussions Faraday Soc.» **27** 206.
- _____. (1961): en «Quinones in Electron Transport» (Eds. E. W. Wolstenholme y C. M. O'Connor) Churchill, Londres (1961).
- _____. (1963): «Plenary Lecture». V International Congress of Biochemistry, Moscow - Pergamon Press, Londres (1963) pág. 9.
- GREEN D. E., BASFORD R. E. y MACKLER B. (1956): en «Inorganic Nitrogen Metabolism» (Eds. Mc Elroy y B. Glass)-The Johns Hopkins Press, Baltimore (1956).
- GREEN D. E., HATEFI Y. y FECHNER Y. S. (1959).—*Biochim. Biophys. Res. Comm.* **145**.
- GREEN D. E. y WHARTON D. C. (1963).—*Biochem. Z.* **338** 335.
- GREEN D. E., WHARTON D. C., TZAGOLOFF A., RIESKE J. S. y BRIELEY G. P. (1965): en «Oxidases and Related Redox Systems» (Eds. Tsou E. King, H. S. Mason, y M. Morrison)-John Wiley and sons, N. Y. (1965) pág. 1033.
- GRIFFITS D. E. y WHARTON D. C. (1961).—*J. Biol. Chem.* **236** 1850.
- GRIFFITS D. E. y CHAPLAIN R. A. (1962).—*Biochim. Biophys. Res. Comm.* **8** 501.
- GUILLIERMONT A. (1941).—*Chronica Botanica* Waltham, Massachusetts p. 247.
- HAGIHARA B., HORIO T., YAMASHITA J., NOGAKI J., OFUNUKI K. (1956).—*Nature* **178** 629.
- HAGIHARA B., SEKUZU J., TAGAWA K., YONEDA M. y OKUNUKI K. (1958).—*Nature* **181** 1588.
- HAGIHARA B., TAGAWA K., NOGAKI M., MORIKAWA J., YAMASHITA J. y OKUNUKI K. (1957).—*Nature* **179** 249.
- HAGIHARA B., TAGAWA K., SEKUZU J., MORIKAWA y OKUNUKI J. (1959).—*J. Biochem. (Tokyo)* **46** 11.
- HARDEN A. y YOUNG W. (1906).—*J. Proc. roy. Soc. B.* **77** 405.
- HAROLD F. M. y MILLER A. (1962).—*Biochim. Biophys. Acta* **55** 104.
- HARRISON K. (1958).—*Nature* **181** 1131.
- HATEFI Y., HAAVIK A. G. y GRIFFITS D. E. (1962)a: *J. Biol. Chem.* **237** 1676.
- HATEFI Y., HAAVIK A. G. y GRIFFITS D. E. (1962)b: *J. Biol. Chem.* **237** 2661.
- HATEFI Y., JURTSHUK y HAAVIK A. G. (1961).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **94** 198.
- HATEFI Y., LESTER R. L., CRANE F. L. y WIDMER C. (1959).—*Biochim. biophys. Acta* **31** 490.
- HATEFI Y. y QUIRÓS PÉREZ (1959).—*Biochim. biophys. Acta* **31** 502.
- HAUDUROY P. (1966): Comunicación personal, 1 de junio.
- HEBB, PANET C. y SLEBDONIS J. (1958).—*Exptl. Cell. Res.* **14** 286.
- HEMING F. W. y PENNOCK J. F. y MORTON R. A. (1958).—*Biochem. J.* **68** 29.
- HILL R. y HARTREE E. P. (1953).—*Rev. Plant. Physiol.* **4** 115.
- HJORTH-HANSSEN (1939).—*Aarsberet Norges Fisk.* 3 26.
- HOCEROOM G. H., SCHNEIDER W. C. y PALADE G. H. (1948).—*J. Biol. Chem.* **172** 619.
- HÖLTON R. W. (1960).—*Plant Physiol.* **35** 757.
- HOLTON R. W. y MYERS (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 362.
- HOLTON R. W. (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 375.
- HONDA S. I., BAKER J. E. y MUENSTER A. M. (1961).—*Plant Cell Physiol.* (Tokyo) **2** 151.
- HØYE (1902).—*Bergens Mus. Aarb.* 1901 (2) n.º 7 pág. 1.
- _____. (1905).—*Bergens Mus. Aarb.* 1904 (3) n.º 9 pág. 1.
- _____. (1907).—*Bergens Mus. Aarb.* 1906 (2) n.º 12 pág. 1.
- _____. (1909).—*Bergens Mus. Aarb.* 1908 (1) n.º 4 pág. 1.
- ISHII R. y MIYAMOTO T. (1954).—*J. Ferment. Technol.* **22** 276.
- ISHIMOTI M., KOYAMA J., OHNURAT, y NOGAI J. (1954).—*J. Biochem. (Tokyo)* **41** 537.
- ITAGAKI E. (1964).—*J. Biochem. (Tokyo)* **55** 432.
- JACOBS E. E. (1960).—*Biochim. Biophys. Res. Comm.* **3** 536.
- JACOBS E. E. y CRANE F. L. (1960).—*Biochim. Biophys. Res. Comm.* **3** 333.
- JENSEN P. K. (1966).—*Biochim. biophys. Acta* **122** 157.
- JOHNSON M. J. (1941).—*J. Biol. Chem.* **137** 575.
- JONES C. W. y REDFEARN E. R. (1966).—*Biochim. biophys. Acta* **113** 467.
- JOWETT M. y QUASTEL J. H. (1937).—*Biochem. J.* **31** 565.

- JURTSHUK P., ASTON P. R. y OLD L. (1967).—*J. Bacteriology* **93** 1069.
- KAMEN M. D. y VERNON L. P. (1954).—*J. Bacteriology* **67** 617.
- KAPLAN N. O., CIOTTI M. M., HAUROFSKY M. y BIEBER R. E. (1960).—*131* 392.
- KAREL VAN DAM (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 407.
- KARRER P., SCHÖPP K. y BENZ F. (1935).—*Helv. Chim. Acta* **18** 426.
- KASKET E., y BRODIE A. F. (1960a).—*Biochim. biophys. Acta* **40** 550.
- _____. (1960b).—*Bact. Proc.* p. 166.
- _____. (1962a).—*J. Bacteriology* **83** 1094.
- _____. (1962b).—*Bact. Proc.* pág. 99.
- _____. (1963a).—*Biochim. biophys. Acta* **78** 52.
- _____. (1963b).—*J. Biol. Chem.* **238** 2564.
- KATOH S. (1959).—*J. Biochem. (Tokyo)* **46** 629.
- KAWAI K. (1961).—*Biochim. biophys. Acta* **52** 248.
- KAWAKAMI N. (1961).—*Exptl. Cell. Res* **25** 179.
- KEILIN H. y HARTREE E. F. (1949).—*Nature* **164** 254.
- KEILIN D. (1925).—*Proc. roy. Soc., London, Serie B* **98** 312.
- KEILIN D. y KING T. E. (1960).—*Proc. roy. Soc., London, Serie B* **152** 163.
- KEILIN D. y TISSIERES A. (1953).—*Nature* **172** 393.
- KIKUCHI G. y BARRON E. S. (1959).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **84** 96.
- KINK T. E. (1963).—*J. Biol. Chem.* **238** 4037.
- KNOWELS K. y REDFEARN E. R. (1968).—*Biochim. biophys. Acta* **162** 348.
- KREITLOV K. W. (1934).—*Phytopathology* **33** 1055.
- KUHN R., REINEMUND K., WEYGAND F. y STROBELE (1935).—*R. Ber. dtsh. chem. Ges.* **68** 1765.
- LAIDVIAN D. L., MORTON R. A., PATERSON J. Y. y PENNOCK J. F. (1959).—*Chem. and Ind* pág. 1019.
- LAVATE W. V. y BENTLEY R. (1964).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **108** 287.
- LAVATE W. V., DYER J. R., SPRINGER C. M. y BENTLEY R. (1962).—*Biochem. J.* **237** 2715.
- LEDERBERG S. y MITCHINSON J. M. (1962).—*Biochim. biophys. Acta* **55** 104.
- LELOIR L. F. y DIXON M. (1937).—*Enzymología* **2** 81.
- LESTER R. L., CRANE F. L. y HATEFI Y. (1958).—*Chem. Soc.* **80** 4751.
- LESTER R. L. y CRANE F. L. (1959).—*J. Biol. Chem.* **234** 2169.
- LESTER R. L. y FLEISCHER S. (1959).—*Archiv. Biochem.* **80** 470.
- LIGHTBOWN J. N. y JACKSON F. L. (1956).—*Biochem. J.* **63** 130.
- LINDENMAYER A. y SMITH L. (1964).—*Biochim. biophys. Acta* **93** 445.
- LINDHAL P. E. y OBERG K. (1960).—*Nature* **187** 784.
- LINGAPA B. T. y SUSSMAN A. S. (1959).—*Plant Physiol.* **34** 466.
- LINNANE A. W. y STILL J. L. (1955).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **56** 264.
- LINNANE A. W. y ZIEGLER D. M. (1958).—*Biochim. biophys. Acta* **29** 630.
- LÓPEZ A. (1969).—Comunicación personal.
- MACKLER B. y GREEN D. E. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **21** 6.
- MACKLER B., COLLIPP P. J., DUNCAM H. M., APPAJI RAO N. y HAEMEKENS E. M. (1962).—*J. Biol. Chem.* **237** 2968.
- MAGIE R. O. (1935).—*Phytopathology* **25** 131.
- MANDELS G. R. (1963).—*An. N. Y. Acad. Sci.* **102** 724.
- MANDELS G. R. y DARBY R. T. (1953).—*J. Bacteriology* **65** 16.
- MANDELS G. R. y NORTON A. B. (1948).—*Quartermaster Gen. Lab. Res. Respt. Microbiol. Ser.* **111**.
- MARGOLIASH (1954).—*Biochem. J.* **56** 529.
- MARGOLIASH, SMITH E., KREIL, y TUPPY (1961).—*Nature* **192** 1125.
- MARTIN S. M. (1954).—*Can. J. Microbiol.* **1** 6.
- MARTIUS C. (1954).—*Biochem. Z.* **326** 26.
- MARTIUS C. (1959).—En «Symposium Foundation on Regulation of Cell Metabolism»-(Eds. G. E. Wolstenholme y C. M. O'Connor) - Churchill, Londres (1959) pág. 312.
- MARTIUS C. y MARKI F. (1957).—*Biochem. Z.* **329** 450.
- MARTIUS C. y STRUFFE R. (1954).—*Biochem. Z.* **326** 24.
- MARUYAMA Y. y ALEXANDER M. (1962).—*J. Bacteriology* **84** 307.
- MASSEY V. (1959).—*Biochim. biophys. Acta* **34** 1094.
- MOORE R. I. y McALEAR J. H. (1961).—*Abst. 8th Intern. Congrs. Microbiol.*, Montreal (1961) pág. 31.
- MORTON R. O. y KING T. E. (1962).—*Biochemistry* **1** 1017.
- MORTON R. A., WILSON G. M., LOWE F. S. y LEAT W. M. F. (1957).—*Chem. & Ind.* **1649**.
- MORTON R. A. (1958).—*Nature* **182** 1764.
- MOSES V. (1959).—*J. gen. Microbiol.* **20** 184.
- NEWTON J. W. y KAMEN M. D. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **21** 71.
- NICHERSON W. y FALCONE G. (1956).—*SCIENCE* **124** 318.
- NICHOLAS D. J. D., NASON A. y MC. ELROY W. D. (1954).—*J. Biol. Chem.* **207** 341.
- NIEDERPRUEM D. J. y HACKETT D. P. (1961).—*Plant Physiol.* **36** 79.
- NOSSAL P. M., HANSEN I. A. y LADD J. N. (1957).—*Biochim. biophys. Acta* **23** 103.
- NOSSAL P. M., KEECH D. B. y MORTON D. J. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **22** 412.
- OHNISHI T., KAWAGUCHI K. y HAGIHARA (1966).—*J. Biol. Chem.* **241** 1797.
- OHTA J. (1954).—*J. Biochem. (Tokyo)* **41** 489.
- OUDEMANS C. A. J. (1885).—Mededeel. d. Kon. Akad. van Netensh., Afd. Natuurk, 3, ii, 115.
- OUDEMANS C. A. J. (1886).—*Arch. Néerl. d. Ac. Exacts et Nat.* XX 419.
- OWENS R. G. (1955).—*Contrib. Boyce Thompson Inst.* **18** 145.
- PACKTER N. M. y GLOVER J. (1960).—*Nature* **187** 43.
- PACKER L. y JACOBS E. E. (1962).—*Biochim. biophys. Acta* **57** 371.
- PACE A. C., GALE P., WALICK J., WALTON R. B. y MC. DANIEL L. E. (1960).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **89** 318.
- PERINI F., y KAMEN M. D. y JEROME A. SCHIFF (1964).—*Biochim. biophys. Acta* **88** 76.
- POSTGATE J. R. (1956).—*J. gen. Microbiol.* **14** 545.
- POTTER V. R. y REIF A. E. (1952).—*J. Biol. Chem.* **194** 287.
- PULLMAN M. E. y COLOWICK S. P. (1954a).—*J. Biol. Chem.* **206** 121.
- PULLMAN M. E., SANPIETRO A. y COLOWICK S. P. (1954b).—*J. Biol. Chem.* **206** 129.
- PULLMAN M. E., PENEFSKY H. y RACKER E. (1958).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **76** 227.
- PULPHREY A. M. y REDFEARN E. R. (1960).—*Biochem. J.* **76** 61.
- PULPHREY A. M. y REDFEARN E. R. (1959).—*Biochem. J.* **72** 2.
- PULPHREY A. M. y REDFEARN E. R. (1963).—*Biochim. biophys. Acta* **74** 317.
- QUASTEL J. H. y WHEATLEY A. H. M. (1933).—*Proc. roy. Soc., London Ser. B*, **112** 60.
- QUASTEL J. H. y WOLDRAGE W. R. (1928).—*Biochem. J.* **22** 689.
- RAMASARMA T. y LESTER R. L. (1960).—*J. Biol. Chem.* **235** 3309.
- RACKER E., CHANCE B. y PARSONS D. F. (1964).—*Federation Proc.* **23** 431.
- REDAELLI P. y CIFERRI R. (1934).—*Atti dell'Ins. Bot. dell'Univ. de Pavia* serie IV Vol. V.
- REDFEARN E. R. (1961).—En «Quinones in Electron Transport» - (Eds. E. W. Wolstenholme y C. M. O'Connor)-Churchill, Londres (1961) pág. 346.
- REDFEARN E. R. y BURGOS J. (1965).—*Nature* **209** 711.
- REDFEARN E. R., PUMPHREY A. M. y FYNNE G. H. (1960).—*Biochim. biophys. Acta* **44** 404.
- REDFEARN E. R. y KING T. E. (1964).—*Biochem. J.* **90** 29.
- REDFEARN E. R., WHITTAKER P. A. (1962).—*Biochim. biophys. Acta* **56** 440.

- REDFEARN E. R., WIHTAKER P. A. y BURGOS J. (1965).—En «Oxidases and Related Redox Systems» Vol. II (Eds. Tsoo E. King, S. Mason y M. Morrison) - John Wiley and Sons, N. Y. (1965) pág. 943.
- REICH E. y TSUDA J. (1961).—*Biochim. biophys. Acta* **53** 574.
- REIF A. E. y POTTER V. R. (1954).—*Abst. Biochem. Biophys.* **48**.
- REPORT OF THE COMMISSION ON ENZYMES OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY.—*Pergamon Press*, N. Y. (1961) vol. 5 pág. 57.
- RUDOLPH H. (1960).—*Plant* **55** 424.
- _____. (1961).—*Plant* **57** 284.
- RUSSELL P. J. y BRODIE A. F. (1960).—*Fed. Proc.* **19** 38.
- SCARISBRICK R. (1947).—*Ann. Rept. Prog. Chem.* **44** 226.
- SCHICHI H. y URITANI I. (1964).—*J. Biochem. (Tokyo)* **55** 11.
- SCHOPFER W. H. (1942).—*Verhandl Schweiz Naturforsch Ges.* p. 122.
- SHATKIN A. J. y TATUM E. L. (1961).—*J. Botany* **48** 760.
- SHEPHERD C. J. (1951).—*Biochim. J.* **48** 483.
- SHETHNA Y. I., WILSON P. W. y BEINERT H. (1966).—*Biochim. biophys. Acta* **113** 225.
- SHU P., TANNER K. G. y LEDINGHAM G. A. (1954).—*Can. J. Botany* **32** 16.
- SINGER T. P. y KEARNEY E. B. (1964).—Proc. of the Fifth International Congr. of Biochem. i IV - Pergamon Press, Londres (1964) pág. 206.
- SLATER E. C. (1958)a.—*Advances in Enzymology* **20** 147.
- SLATER E. C. (1958)b.—Proceedings of the Fourth Intnl. Congr. of Biochem.; Viena, II pág. 316.
- SLATER E. C. (1959).—*Advances in Enzymology* **21** 73.
- SLONIMSKI P. P. (1955).—Proc. of the 3rd. International Congress of Biochemistry, Brussels - Academic Press-N. Y. (1955) pág. 242.
- SLONIMSKI P. P. (1953).—*Actualites Bioch.* **17** 203.
- SMITH L. (1954)a.—*Archiv. Biochem. Biophys.* **50** 285.
- _____. (1954)b.—*Archiv. Biochem. Biophys.* **50** 299.
- _____. (1954)c.—*Archiv. Biochem. Biophys.* **50** 315.
- SMITH L. (1954).—*Bacteriol. Rev.* **18** 106.
- SMITH L. (1961).—En «The Bacteria» (Eds. I. C. Gunsalus y R. Stanier)-Academic Press, N. Y. (1961) 2 pág. 370.
- SMITH L. y CHANCE B. (1958).—*Ann. Rev. Plant. Physiol.* **9** 449.
- SMITH L. y LESTER R. L. (1961).—*Biochim. biophys. Acta* **48** 547.
- STASNY J. I. y CRANE F. L. (1964).—*Federation Proc.* **23** 322.
- STEVENSON C. H. (1899).—*U. S. Fish Comm. Bull.* 1898 396.
- STOCK T. (1931).—*Phytopathology Z.* **3** 231.
- STOPPANI A. O. M., BRIGNONI J. A., BRIGNONE C. C. y BADANO B. N. (1963).—En «Perspectives in Biology»-(Eds. C. F. Cori, V. G. Foglia, L. F. Leloir y S. Ochoa)-Elsevier, Amsterdam (1963) pág. 331.
- STOREY B., CAHNE B. (1967).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **121** 279.
- SUGIMURA T. y RUDNEY H. (1960).—*Biochim. biophys. Acta* **37** 560.
- SUSSMAN A. S. y LINGAPA B. T. (1959).—*Science* **130** 1343.
- SUSSMAN A. S. y MARKET C. L. (1953).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **45** 31.
- TAKAGI S. (1959).—*Osaka Daigaku Igaku Zasshi* **11** 523.
- TAKEDE I., TSUCHIMOTO N. y MIWA S. (1968).—*App. Microbiol.* **16** 1806.
- TAPPEI E. L. (1959).—*Pharm. Biochem.* **3** 289.
- TERNI H. y MUCHIZUKI T. (1955).—*Technol. Rept. Osaka Univ.* **5** 219.
- THEORELL H. (1935).—*Biochim. Z.* **278** 263.
- THORN M. B. (1953).—*Biochim. J.* **54** 540.
- THORN M. B. (1956).—*J. Biochem.* **63** 420.
- TISSIERES A. (1954).—*Biochim. y.* **58** 142.
- TISSIERES A. (1956).—*Biochim. J.* **64** 582.
- TISSIERES A. y BURRIS R. H. (1956).—*Biochim. biophys. Acta* **20** 436.
- TISSIERES A., MITCHELL H. K. y HASKINS F. A. (1953).—*J. Biol. Chem.* **205** 423.
- TISSIERES A. y MITCHELL H. K. (1954).—*J. Biol. Chem.* **280** 241.

- TSOO CH. (1951).—*Biochem. J.* **49** 512.
- TURIAN G. (1960).—*Pathol. Microbiol.* **23** 687.
- TURIAN G. y CANTINO E. C. (1959).—*J. gen. Microbiol.* **29** 721.
- UMBRETT W. W., BURRIS R. H. y STAUFFER J. F. (1964).—«Manometric Techniques» 4.º ed.-Burgess Publishing Co. (1964).
- UTTER M. F., KEECH D. B. y NOSSAL P. H. (1958).—*J. Biochem.* **68** 431.
- VAISEY E. B. (1954)a.—Fish. Res. Bd. of Canada. Progs. Repts. Pacific Coast Stas. **58** 32.
- _____. (1954)b.—Fish. Res. Bd. of Canada. Progs. Repts. Pacific Coast Stas. **60** 4.
- _____. (1954)c.—Fish. Res. Bd. of Canada. Progs. Repts. Pacific Coast Stas. **11** 901.
- VALLEJOS R. Y. y STOPPANI A. O. M. (1957).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 295.
- VAN DAM K. (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **131** 407.
- VAN DER VEN B. y JONGE A. P. (1957).—Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. T **76** n.º 2.
- VANDERWINKEL E., BOURGOIS S. y WIANE J. M. (1958).—*Arch. Intern. Physiol. Biochem.* **66** 129.
- VENNESLAND B. y WESTHEIMER F. H. (1954).—En «The mechanism of Enzyme Action» (Eds. W. O. Mc Elroy y B. Glass.) - Baltimore, Johns Hopkins. Pub. (1954).
- VITOLS E. y LINNANE A. W. (1961).—*J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9** 701.
- VUILLEMIN P. (1906).—Bulletin de la Société Mycologique de France T. **XII** 125.
- VUILLEMIN P. (1931).—«Les champignons Parasites et les Mycoses de l'Homme» Lechevalier, Paris (1931).
- WARBURG O. (1926).—*Biochem. Z.* **178** 471.
- WARBURG O. y CHRISTIAN W. (1932).—*Biochem. Z.* **254** 438.
- WARBURG O., CHRISTIAN W. y BRIESE A. (1935).—*Biochem. Z.* **282** 157.
- WARBURG O. y CHRISTIAN W. (1938).—Citados por H. R. Mahler, E. H. Cordes en «Biological Chemistry» - Harper and Row, N. Y. (1968) pág. 360.
- WATSON K. y SMITH J. E. (1968).—*J. Bacteriology* **96** 1546.
- WEISS B. (1963).—*J. gen. Microbiol.* **39** 85.
- WELSFORD E. (1907).—*New Phytologist* **6** 156.
- WENDELL W. B. (1946).—*Fed. Proc.* **5** 406.
- WHITE G. A. y LEDINGHAM G. A. (1960).—*Plant Physiol.* 35 xi.
- WHITE D. C. (1967).—*J. Bacteriology* **93** 567.
- WILLIAMS J. N. Jr. (1964).—*Archiv. Biochem. Biophys.* **107** 537-543.
- WILSON D. F. y KING T. E. (1964).—*Biochim. biophys. Acta* **92** 173.
- WHISTANCE G. R., DILLOU J. F. y THRELFALL D. R. (1969).—*Biochem. J.* **111** 461.
- WOLF D. E., HOFF C. H., TRENNER N. R., ANSONB H., SHUNK C., LINN B. O. McFHERSON J. F. y FOLKERS K. (1958).—*J. Amer. Chem. Soc.* **80** 4752.
- YAMANAKA T., DE KLERK H. y KAMEN M. D. (1967).—*Biochim. biophys. Acta* **143** 416.
- YAMANAKA T., NAKAJINA H., OKUNUKI K. (1962).—*Biochim. biophys. Acta* **63** 510.
- YAMAMOTO F., YWASA K. y OKUNUKI K. (1959).—*J. Biochem. (Tokyo)* **46** 113.
- YWASA K. (1960).—*J. Biochem. (Tokyo)* **47** 445.
- ZIEGLER D. M., LINNANE A. W., GREEN D. E., DASS M. S. y RIS H. (1958).—*Biochim. biophys. Acta* **28** 524.