

# OXIDACIÓN DE NADH Y SUCCINATO POR LA CADENA RESPIRATORIA DE *BURKHOLDERIA CEPACIA*

## OXIDATION OF NADH AND SUCCINATE BY THE RESPIRATORY CHAIN OF *BURKHOLDERIA CEPACIA*

*David Rosado<sup>1</sup>, Aura Martínez<sup>1</sup>, Beatriz Barraza<sup>2</sup>, Rubén Jaramillo<sup>3</sup>*

### RESUMEN

Los sistemas transportadores de electrones en bacterias, son diferentes entre especies dependiendo de las condiciones de crecimiento. No existen estudios previos acerca de los sistemas respiratorios de *Burkholderia cepacia*, bacteria perteneciente a la familia *Burkholderiaceae* caracterizada por ser un bacilo gram-negativo, aeróbico, móvil y poco exigente. El propósito de esta investigación fue conocer los sustratos endógenos usados por este microorganismo y el efecto del cianuro en su sistema respiratorio.

Los resultados permiten postular un modelo de cadena respiratoria de *B. cepacia* compuesto por NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, ubiquinol oxidasa y un tipo de citocromo oxidasa. También se observó que el KCN tiene un efecto mucho mayor sobre la actividad de succinato oxidasa que en la NADH oxidasa, mientras en el ensayo de la ascorbato+TMPD oxidasa muestra una alta sensibilidad al cianuro, lo que sugiere una oxidasa terminal sensible al cianuro.

**Palabras clave:** Bacterias, Oxidasas terminales, Cadena respiratoria, Quinonas, Succinato deshidrogenasa.

### ABSTRACT

Electron transport systems in bacteria vary from some species to another depending of the growth conditions. There are not any previous studies about *Burkholderia cepacia*'s respiratory system. This bacteria belongs to the *Burkholderiaceae* family, and is a gramnegative rod, aerobic, mobile, little exigent. The objective of this study was to know the endogenous substrates used for this microorganism and the effect of cyanide on the *B. cepacia*'s respiratory system. The results obtained, allow postulating a model of *B. cepacia*'s respiratory chain, which is composed by NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, an ubiquinol oxidase and a type of cytochrome oxidase. The KCN has a much greater effect on the activity of succinate oxidase than the NADH oxidase, while in the assay of ascorbate oxidase + TMPD shows a high sensitivity to cyanide, suggesting terminal oxidase sensitive to cyanide.

**Keywords:** Bacteria, Cytochromes, Terminal oxidase, Respiratory chain, Quinones, Succinate dehydrogenase.

**Recibido:** Marzo 1 de 2011

**Aceptado:** Julio 27 de 2011

- 1 Microbiólogos Industriales. Laboratorio de investigaciones de Biomembranas, Centro de Investigaciones, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre Seccional Barranquilla.
- 2 Biólogo, MSc. Microbiología. Laboratorio de investigaciones de Biomembranas, Centro de Investigaciones, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre Seccional Barranquilla.
- 3 Ph.D. Bioquímica. Grupo de Investigación de Biomembranas (GIBIOM), Laboratorio de investigaciones de Biomembranas, Centro de Investigaciones, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre Seccional Barranquilla. [rjaramillo@unilibrebaq.edu.co](mailto:rjaramillo@unilibrebaq.edu.co)

## INTRODUCCIÓN

*Burkholderia cepacia* es un microorganismo quimioorganótrofo poco exigente que se caracteriza por habitar una gran variedad de ambientes, un biocontrolador de plagas (1, 2), un patógeno para plantas y humanos (3) y por tener la capacidad de degradar diversos sustratos (1, 2), incluyendo compuestos tóxicos para el ser humano como los hidrocarburos clorados con el objetivo de obtener la energía necesaria para sus actividades metabólicas (2, 4, 5). Esta producción de energía es el resultado de procesos como la respiración, la cual favorece la formación de un gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP (6, 7). Los sistemas bacterianos se caracterizan por su gran diversidad en la cadena transportadora de electrones, la cual ha sido estudiada en algunos géneros de Betaproteobacterias, como *Eikenella* (8), *Alcaligenes* (9-10) y *Neisseria* (11, 12), así como en el género *Pseudomonas*, perteneciente a la clase Gammaproteobacteria, con las cuales presenta ciertas similitudes fenotípicas.

La investigación bibliográfica indica que no existen antecedentes sobre la composición, estructura y efecto de algunos compuestos como el cianuro sobre el sistema respiratorio de *B. cepacia*, razón por la cual se hace necesario realizar investigaciones que permitan conocer los distintos sustratos endógenos usados como donantes primarios de electrones, la presencia de deshidrogenasas en condiciones aeróbicas en el sistema respiratorio de este microorganismo y el efecto del KCN sobre los diferentes complejos enzimáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Proceso de recolección y procesamiento de datos

Para el presente estudio se utilizó una cepa silves-

tre de *Burkholderia cepacia*, aislada del suelo de la finca La Abundancia, localizada en el municipio de Sabanagrande, Atlántico.

### Medio de cultivo

Se utilizó un medio enriquecido que mantuvo la cepa viable, Agar Trypticase de Soya TSA a temperatura ambiente. Los cultivos se realizaron en matraces de 2 L cada uno con 1 L de medio TSA a temperatura ambiente y en agitación constante a 125 rpm. Para iniciar el cultivo, se utilizó un inóculo de 1% del volumen del medio de cultivo; el inóculo se prepara de acuerdo con la técnica de cultivo activo Collier (13), consistente en hacer por lo menos tres transferencias (1/50) seriadas en la mitad de la fase exponencial, esta técnica permite homogeneizar el crecimiento, el cual se siguió por espectrofotometría a 660 nm.

### Obtención de biomasa

Se colectaron las células al inicio de la fase estacionaria por centrifugación a 10000 rpm a 4°C y 10 minutos. El paquete celular se lavó cada vez por tres veces con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y centrifugación a 10000 rpm a 4°C por 10 min. La biomasa obtenida se almacenó a -70°C.

### Obtención de membranas

Las células se resuspendieron en el amortiguador (Tris-HCl 50 mM -EDTA 5mM pH 7,5 = TES pH 7,5), se incubaron con lisozima a 37°C por 30 minutos; posteriormente, se resuspendieron en amortiguador TES pH 7,5 en presencia de PMS-f (Fenasina metasulfato - inhibidor de proteasas) y se fraccionaron mecánicamente por sonicación, centrifugando a 10000 rpm a 4°C por 20 minutos, para luego recolectar el sobrenadante; inmediatamente, se volvió a centrifugar a 25000 rpm a 4°C por tres horas, con el fin de sedimentar las membranas, las cuales se lavaron por tres veces con 60 mL

del amortiguador de fosfato pH 7,2; finalmente, las membranas se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser utilizadas posteriormente en los ensayos enzimáticos. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry modificado (14), en el cual se usó la albúmina como estándar.

### Ensayos enzimáticos de oxidasas y oxidorreductasas

#### Oxidasas

Las actividades se midieron por el método polarográfico a  $37^{\circ}\text{C}$  como se describe por Jaramillo *et al.* (8), con un electrodo tipo Clark cubierto con una membrana ultrafina de teflón (*YSI model 53 Oxygen-meter, Yellow Spring Instruments*). El medio de la reacción, en un volumen final de 2,2 mL, estaba compuesto por fosfato de potasio 100 mM con pH 7,4 para los ensayos de NADH y succinato oxidasa y con un pH 6,8 para Ascorbato + TMPD oxidasa y 1,0 mg de proteína de membranas celulares. Las actividades se expresan como  $\text{nAtO}_2$  consumidos por minutos por mg de proteína ( $\text{nAtO}_2/\text{min}/\text{mg}$  proteína).

**NADH y succinato oxidasa.** La reacción de NADH oxidasa inició con la adición del sustrato NADH a concentración final de 0,5 mM al medio de reacción. Para medir la succinato oxidasa, a la mezcla de reacción se le agregaron 15 mL de succinato 0,6 M, se incubó durante 5 minutos y se desencadenó la reacción con succinato a una concentración final de 40 mM.

**Citocromo c oxidasa (Ascorbato + TMPD oxidasa).** La actividad se midió utilizando una mezcla de TMPD 8 mM y ascorbato de sodio 0,8 M pH 7,0; a la actividad resultante se le resta el pequeño consumo de oxígeno que ocurre en ausencia de membranas, debido a la auto-oxidación de los sustratos.

#### Oxidorreductasas

Las actividades de las oxidorreductasas presentes en membranas celulares se determinaron por espectrofotometría a temperatura ambiente. Se utilizó el compuesto diclorofenolindofenol (DCPIP, azul) que cambia a leuco cuando ocurre la reacción de óxido-reducción. Estos ensayos se realizaron de acuerdo con lo descrito por Escamilla *et al.* (15); la reducción del DCPIP se siguió a 600 nm con un coeficiente de extinción molar de  $21 (\text{mM}\cdot\text{cm})^{-1}$  para un volumen total de 1 mL. La actividad se expresó en nanomoles de DCPIP reducidos por minuto por mg de proteína.

**NADH: DCPIP oxidorreductasa.** La reacción enzimática es la siguiente:  $\text{NADH} + \text{DCPIP (azul)} \rightarrow \text{NAD} + \text{DCPIP H}_2 \text{ (leuco)}$ . La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 100 mM a pH 7,4 KCN 0,1 mM DCPIP 0,08 mM, NADH 0,2 mM y la reacción se comenzó con la adición de 1 mg de proteínas de membranas.

**Succinato: PMS + DCPIP oxidorreductasa.** La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 100 mM a pH 7,4 KCN 1 mM succinato 42 mM, material biológico (mg de proteína), se pre-incubó durante 5 min. y se inició la reacción con PMS 1,0 mM y DCPIP 0,08 mM.

#### Actividades de oxidasas y oxidorreductasa en presencia de KCN

Las actividades de la NADH oxidasa y succinato oxidasa en presencia de KCN, se evaluaron usando concentraciones de inhibidor desde 10 a 300  $\mu\text{M}$ . La actividad de la ascorbato + TMPD oxidasa se estudió empleando concentraciones de KCN desde 10 a 100  $\mu\text{M}$ . Con respecto a los ensayos de las actividades de la NADH oxidorreductasa y succinato oxidorreductasa, se utilizaron concentraciones de KCN desde 25 a 100  $\mu\text{M}$ .

El KCN se disolvió en buffer  $K_2HPO_4$  50 mM pH 7,4, este se conservaba durante los ensayos a una temperatura de 4°C, sumergido en hielo para evitar su descomposición.

## RESULTADOS

### Diseño del medio de cultivo

La composición de un medio de cultivo que favoreciera el crecimiento óptimo de *B. cepacia* en condiciones aeróbicas se estableció utilizando como medio base el caldo tripticasa de soya (TSA) (Ver tabla 1). Sin embargo, los componentes caseína peptona y peptona de soya fueron reemplazados por hidrolizado de caseína y extracto de levadura debido a la disponibilidad de insumos del laboratorio GIBIOM, definiéndose como medio de trabajo el caldo TSA modificado (Ver tabla 2).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo líquido Tripticasa de soya

Componentes	g/L
Caseína peptona	17
Peptona de soya	3,0
NaCl	5,0
Glucosa	2,5
Di-hidrógeno fosfato de potasio	2,5
pH 7,2	

Fuente: Base de datos del proyecto.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo líquido Tripticasa de soya modificado

Componentes	g/L
Hidrolizado de caseína	8,0
Extracto de levadura	3,0
NaCl	5,0
Glucosa	2,5
Di-hidrógeno fosfato de potasio	2,5
pH 7,2	

Fuente: Base de datos del proyecto.

Los ensayos llevados a cabo con el medio TSA modificado (Ver tabla 2) demostraron que el crecimiento obtenido no satisfacía las necesidades en la cantidad de biomasa requerida para ejecutar la meto-

dología planteada; razón por la cual se realizaron diferentes experimentos variando las concentraciones de algunos componentes del medio como el hidrolizado de caseína, el cual contiene 54% de aminoácidos libres y 36% de péptidos de 2 a 4 aminoácidos; extracto de levadura, que contiene una mezcla de péptidos, aminoácidos libres, bases nitrogenadas, además de vitaminas del complejo B, glucosa como fuente de carbono de fácil asimilación y fosfato de monopotasio. Los resultados son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Ensayos de variación en la concentración de los componentes del medio TSA

Componente	Concentración ensayada (%)	Densidad óptica 640 nm
Hidrolizado de caseína	1	1,1620
	1,25	1,2865
Extracto de levadura	0	0,1817
	0,15	0,1865
	0,3	0,1929
	0,6	0,1790
Glucosa	3	1,2865
	4	1,0882
Di-hidrógeno fosfato de potasio	0	1,29
	0,125	1,20
	0,25	1,099
	0,5	1,14
	1	0,0752

Fuente: Base de datos del proyecto.

Con base en los resultados anteriores, se pudo concluir que la bacteria *B. cepacia* presentó un crecimiento óptimo con las concentraciones del medio TSA modificado a temperatura ambiente (Ver tabla 4).

Tabla 4. Medio de cultivo Tripticasa de soya modificado

Componentes	g/L
Hidrolizado de caseína	12,5
Extracto de levadura	3,0
NaCl	5,0
Glucosa	30
Di-hidrógeno fosfato de potasio	1,25
pH 7,2	

Fuente: Base de datos del proyecto.

### Mantenimiento y obtención de biomasa

El mantenimiento de la cepa de *B. cepacia* se realizó en agar nutritivo suplementado con el antibiótico Novobiocina, específico contra bacterias grampositivas en una concentración de 3 mg/L, con el objetivo de evitar la contaminación del cultivo durante el proceso de obtención de biomasa (16, 17). Las colonias observadas en este medio de cultivo se caracterizan por ser de color blanco, textura lisa, cremosas, de tamaño mediano. Al microscopio se visualizan bacilos gram negativos, móviles, agrupados en cadenas de nueve a doce células. Para la producción de biomasa celular se utilizó un inóculo joven o en fase logarítmica del cultivo sembrado en medio líquido Trypticase de soya modificado (Ver tabla 4), el cual permitió obtener cantidades de biomasa (peso húmedo) de  $3 \pm 1,3$  g/L. Las células fueron fraccionadas y se obtuvo una concentración de 41 mg de proteínas/mL.

### Actividades de las oxidasas y deshidrogenasas

Las actividades observadas en las membranas de la bacteria *B. cepacia* obtenidas de cultivos recolectados al final de la fase exponencial de crecimiento y en condiciones aeróbicas, muestran un comportamiento de la succinato oxidasa de 112 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas y de la NADH oxidasa de 125 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas (Tabla 5), lo cual indica que tanto el succinato y el NADH son sustratos endógenos en el sistema de transporte de electrones de *B. cepacia*. Los datos anteriores sugieren la presencia de complejos de la cadena respiratoria que permiten

su oxidación, la existencia de un flujo de electrones hasta el aceptor final y la expresión de oxidasas terminales en las condiciones de cultivo antes mencionadas. En lo referente al comportamiento de la ascorbato + TMPD oxidasa se encontró una actividad promedio de 265 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas, lo cual sugiere la presencia de un complejo en el sistema respiratorio que recibe electrones cuando se oxida el TMPD y posteriormente los transfiere a la oxidasa terminal.

Las mediciones enzimáticas de las deshidrogenasas llevadas a cabo utilizando los sustratos succinato y NADH evidencian una actividad de SDH y NDH promedio de 11 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas y 30 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas (Tabla 5), respectivamente. Lo anterior sugiere la presencia de complejos respiratorios I y II que permiten la entrada de protones y electrones al sistema respiratorio de *B. cepacia*, aun en actividades bajas de las dos deshidrogenasas.

### Efecto del cianuro sobre la actividad de las oxidasas

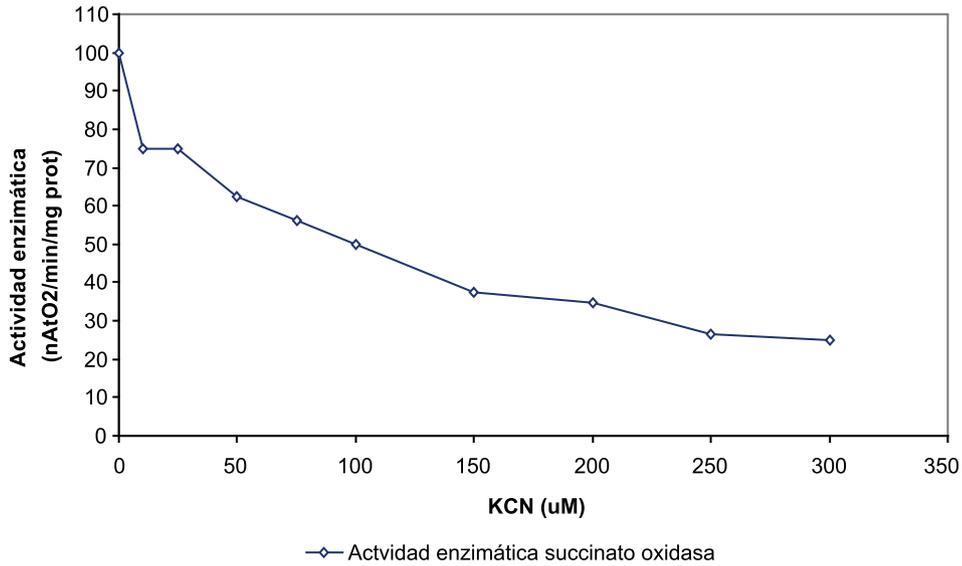
Los ensayos realizados con KCN sobre la cadena respiratoria de *B. cepacia* permitieron ver el efecto sobre las oxidasas. El estudio del efecto inhibitorio del cianuro sobre la actividad de la succinato oxidasa muestra una inhibición al parecer monofásica (Figura 1), donde se inhibe el 50% con KCN 100 μM y una actividad remanente 25% con KCN 300 μM. El efecto del cianuro sobre la actividad de la NADH oxidasa (Figura 2) muestra una inhibición del 50% con KCN 200 μM y una actividad remanente del 45% en presencia de KCN 300 μM. La actividad de ascorbato + TMPD oxidasa (Figura 3) muestra una inhibición del 64% y 86% en presencia de KCN 10 μM y 100 μM, respectivamente, lo que sugiere una oxidasa muy sensible a cianuro. Al comparar los porcentajes de inhibición de las actividades de

Tabla 5. Actividades enzimáticas obtenidas en membranas de *B. cepacia* cultivadas en condiciones de agitación

Sustratos	Actividades enzimáticas	
	Oxidasas (nAtO <sub>2</sub> /min/mg prot)	Deshidrogenasas (nmoles DCPIP red/min/mg prot)
Succinato	112	11
NADH	125	30
Ascorbato + TMPD	265	---

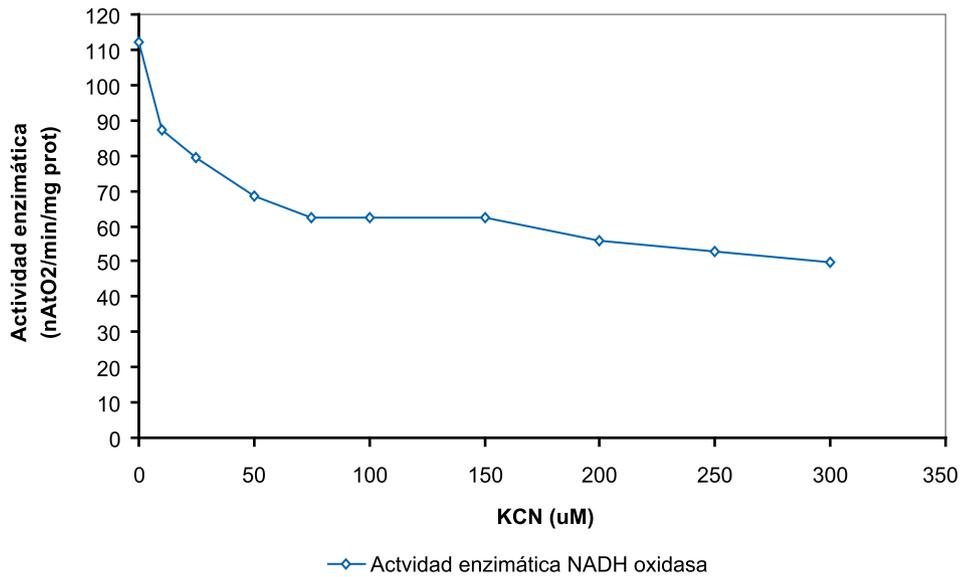
Fuente: Base de datos del proyecto.

**Figura 1. Efecto del cianuro de potasio sobre la actividad enzimática de la succinato oxidasa. El mayor efecto inhibitorio del KCN sobre la actividad de la succinato oxidasa observado fue de 25 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas a una concentración de 300 μM**



Fuente: Base de datos del proyecto.

**Figura 2. Efecto del cianuro de potasio sobre la actividad enzimática de la NADH oxidasa. El mayor efecto inhibitorio del KCN sobre la actividad de la NADH oxidasa observado fue de 50 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas a una concentración de 300 μM**



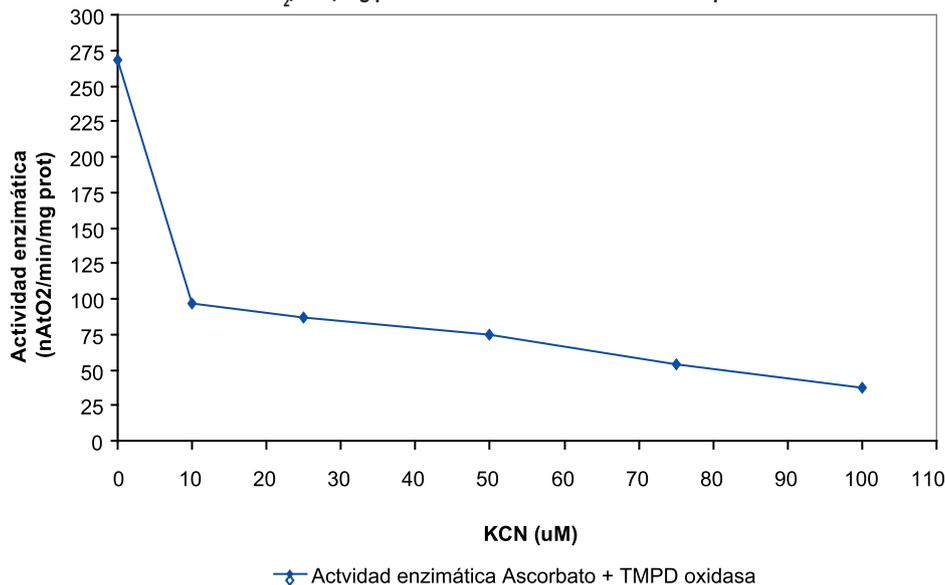
Fuente: Base de datos del proyecto.

oxidasas, se puede observar una mayor resistencia en la actividad de la NADH oxidasa respecto a las actividades de la succinato y ascorbato + TMPD oxidasa (Figura 4), lo que sugiere la presencia de una oxidasa muy sensible a cianuro y la oxidación del succinato y ascorbato + TMPD.

### Efecto del cianuro sobre la actividad de las deshidrogenasas

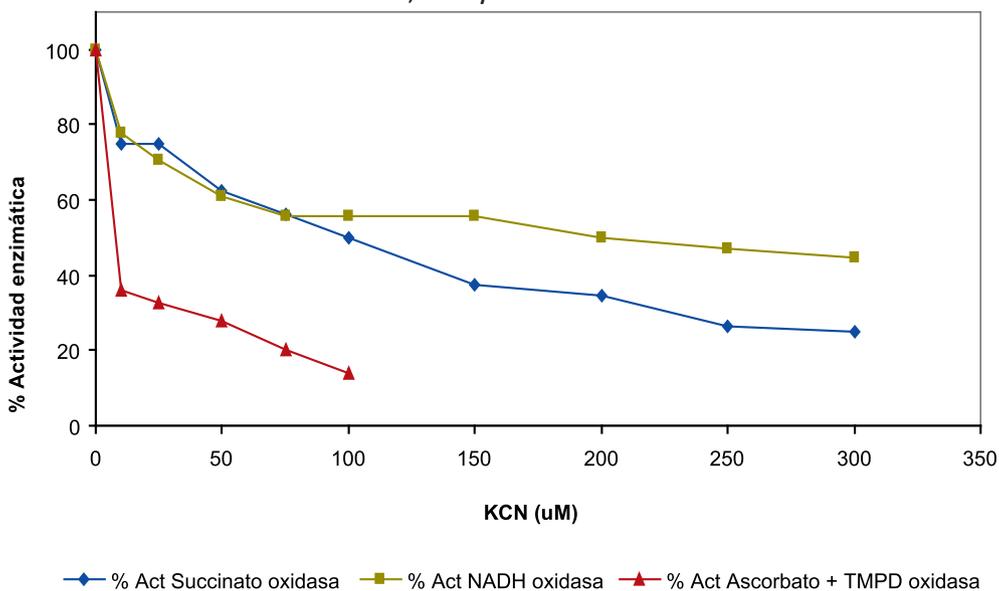
El estudio del efecto del KCN 100 μM sobre la succinato deshidrogenasa muestra una actividad máxima de 32 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas, a diferencia de los ensayos realizados sin inhibidor,

**Figura 3. Efecto del cianuro de potasio sobre la actividad enzimática de la Ascorbato + TMPD oxidasa. El mayor efecto inhibitorio del KCN sobre la actividad de la Ascorbato + TMPD oxidasa observado fue de 37 nAtO<sub>2</sub>/min/mg proteínas a una concentración de 100 μM**



Fuente: Base de datos del proyecto.

**Figura 4. Efecto del cianuro de potasio sobre la actividad enzimática de la succinato, NADH y ascorbato + TMPD oxidasa**



Fuente: Base de datos del proyecto.

asimismo se observa una actividad de 16 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas al utilizar concentraciones de cianuro desde 25 a 100 μM (Ver tabla 6). El efecto del KCN 100 μM sobre la NADH deshidrogenasa muestra una actividad máxima de 300 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas, a diferencia

**Tabla 6. Efecto del KCN sobre la actividad enzimática de la NADH y succinato deshidrogenasa**

Concentración KCN (μM)	Actividad (nmoles DCPIP red/min/mg prot)	
	NDH	SDH
25	126	16
50	175	18
100	300	32

Fuente: Base de datos del proyecto.

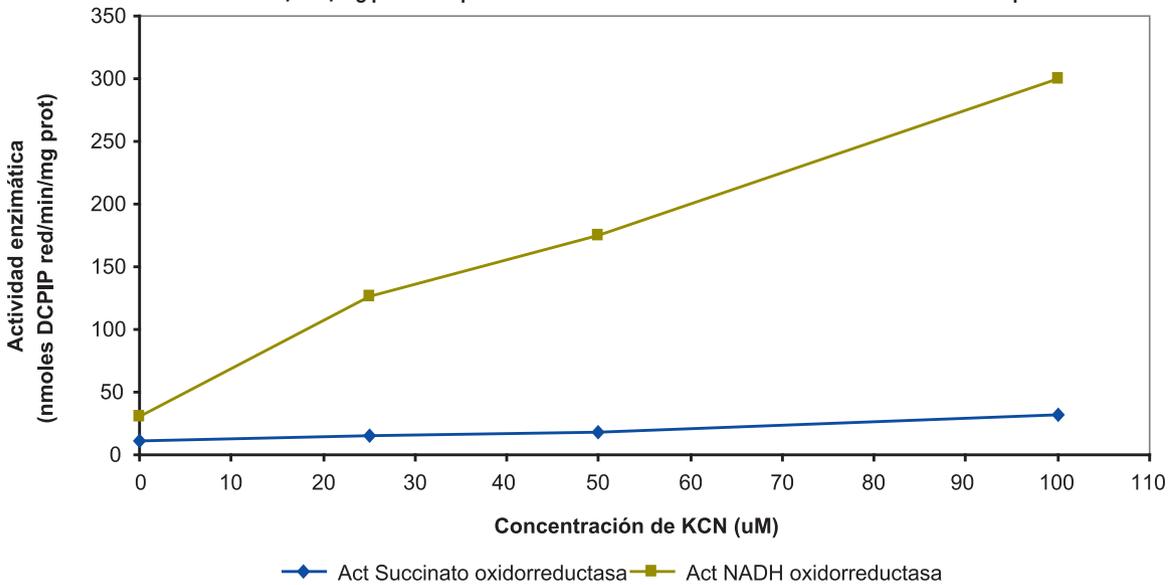
de los ensayos realizados sin cianuro; además, se observa una actividad de 126 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas en presencia de KCN 25  $\mu$ M (Ver tabla 6 y figura 5). Los datos anteriores indican que los ensayos de las deshidrogenasas deben desarrollarse en presencia de cianuro.

### DISCUSIÓN

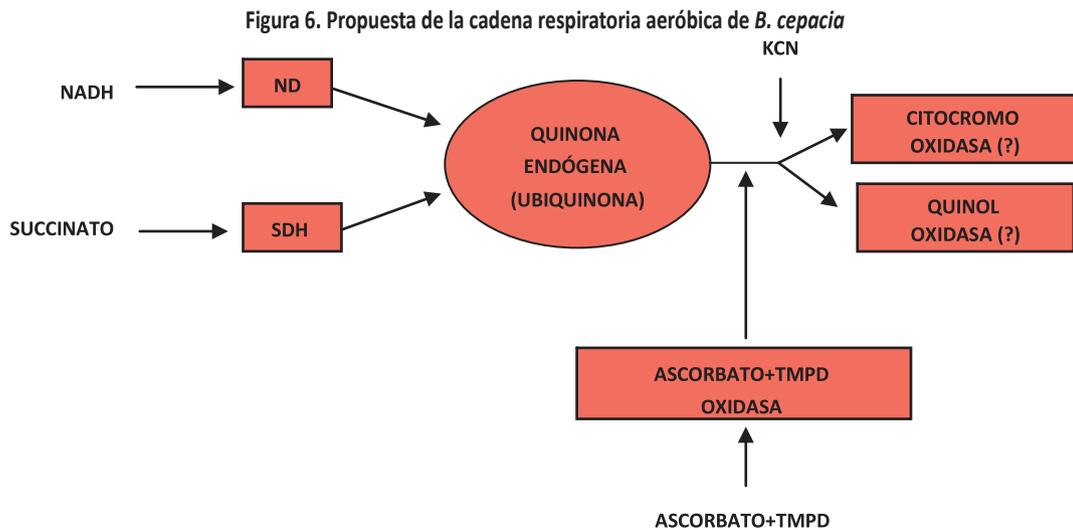
Durante el proceso de mantenimiento de una cepa

en estudio es indispensable conocer la fisiología del microorganismo, en particular del sistema respiratorio bacteriano, cuando la expresión de diversos componentes del mismo depende de la disponibilidad de los sustratos y de los factores externos presentes durante el cultivo, tales como tensiones de O<sub>2</sub>, pH, temperatura y presión osmótica. El crecimiento de *Burkholderia cepacia* en el medio TSA modificado y en condiciones de aerobiosis favorece el estudio de las actividades de oxidasas y des-

Figura 5. Efecto del cianuro de potasio sobre la actividad enzimática de la NADH oxidorreductasa y de la succinato oxidorreductasa. La mayor actividad de la NADH oxidorreductasa en presencia del KCN fue de 300 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas y de 32 nmoles DCPIP red/min/mg proteínas para la succinato oxidorreductasa a una concentración de 100  $\mu$ M



Fuente: Base de datos del proyecto.



Fuente: Base de datos del proyecto.

hidrogenasas de este microorganismo, y con ello, permite establecer un primer esquema acerca del comportamiento de su sistema transportador de electrones.

Con base en lo anterior, podemos afirmar que *B. cepacia* es capaz de utilizar como sustratos endógenos para su sistema respiratorio el NADH y el succinato, lo cual demuestra la presencia de un sistema de transporte de electrones constituido por la succinato y NADH deshidrogenasa y por lo menos una oxidasa terminal. En la literatura y bases de datos de genomas bacterianos, han sido reportadas en *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia mallei* mediante estudios de proteómica, la presencia de una oxidasa terminal insensible al cianuro, una citocromo *d* ubiquinol oxidasa y una citocromo *c* oxidasa (18-20), sin embargo, no ha sido reportada la existencia de estos complejos respiratorios en *B. cepacia*.

En especies del género *Burkholderia* como *B. ambifaria*, *B. cenocepacia*, *B. mallei*, *Burkholderia multivorans*, *B. phymatum*, *B. pseudomallei* se han descrito en diversas bases de datos la presencia de las enzimas succinato, NADH y NADPH deshidrogenasa; el hallazgo de estas enzimas ha sido afirmada por homología con genomas de otros géneros bacterianos (20, 21). En consecuencia, a partir de los resultados obtenidos se propone al NADH y succinato como sustratos endógenos para el sistema transportador de electrones en membranas de *B. cepacia* (Ver figura 6), el cual se encontraría constituido por un sector de entrada, formado por la succinato y NADH deshidrogenasa, un sector intermedio, que transporta electrones y protones, formado por una quinona endógena, posiblemente una ubiquinona, en analogía con otras especies de *Burkholderia* (18, 19), y por último, un sector de salida, conformado por oxidasas terminales del

tipo ubiquinol oxidasa y/o citocromo oxidasa, esto último basándose en resultados de estudios en especies relacionadas (18-20).

Por otra parte, los ensayos realizados en presencia de KCN demuestran que la respiración con succinato es muy susceptible, presentando una inhibición del 75% de la actividad de la succinato oxidasa, a diferencia de la respiración con NADH que fue inhibida en un 55%, en la que se evidencia una menor susceptibilidad al KCN cuando se emplean las mismas concentraciones de cianuro. Esta menor susceptibilidad de la NADH oxidasa frente al KCN está relacionada con la indicada en *Bacillus cereus* KCTC 3674, en la cual concentraciones similares de KCN causaron aproximadamente el mismo porcentaje de inhibición de la actividad enzimática (22). Lo anterior indica que posiblemente tanto los electrones donados por el NADH como por el succinato siguen una misma vía a partir de sus respectivas deshidrogenasas hasta la oxidasa terminal, sin embargo, la menor inhibición de la NDH se debe a la mayor afinidad del sustrato NADH como donante de electrones en la cadena respiratoria de *B. cepacia*.

Respecto al efecto del KCN sobre la oxidasa terminal, reflejado en la actividad de la Ascorbato + TMPD oxidasa, se demuestra una sensibilidad extremadamente alta cuando se adiciona KCN al sistema respiratorio en una concentración de tan solo 10  $\mu$ M, dando como resultado una inhibición de la actividad enzimática de un 64% y, usando concentraciones mayores de KCN desde 25  $\mu$ M hasta 100  $\mu$ M se logra una inhibición de 67-86%, sugiriendo la existencia de una oxidasa terminal altamente sensible al KCN.

Este comportamiento de la oxidasa terminal difiere de lo que ha sido reportado en bases de datos de genomas bacterianos, en las cuales se ha descrito

la presencia de una oxidasa terminal resistente a la acción del cianuro en otras especies de *Burkholderia* como *B. mallei* y *B. pseudomallei* (18, 19). Además, la existencia de oxidasas terminales con resistencia al cianuro también ha sido descrita en especies que presentan similitud fenotípica con *B. cepacia* como *Pseudomonas aeruginosa*, en la cual la actividad de la enzima se mantiene al 100% en concentraciones de cianuro de hasta 1 mM, dicha expresión se debe a que en ciertas condiciones de crecimiento este microorganismo es capaz de producir HCN en concentraciones de 200  $\mu$ M-300  $\mu$ M (23).

Lo anterior sugiere que la expresión de dichas enzimas puede darse también en especies del complejo *Burkholderia cepacia* en las que también ha sido reportada la capacidad de producir compuestos de cianuro como el HCN bajo ciertas condiciones de crecimiento (24) y la posibilidad que la cepa de *B. cepacia* estudiada sea capaz de expresar oxidasas insensibles al KCN cuando es suplementado el medio de cultivo con dicho compuesto durante su crecimiento, como se ha descrito en *Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344*, que expresa una cadena de transporte de electrones resistente a su efecto inhibitorio (25), cuando se suplementa un medio de cultivo mínimo mineral con diferentes formas de cianuro; obligando de esta forma al microorganismo a desarrollar una vía alterna que le permita la producción de energía para sus procesos metabólicos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigaciones de la Universidad Libre (CIUL) Seccional Barranquilla, en el marco del proyecto "Cadena respiratoria de *Burkholderia cepacea*". Los autores expresan un aprecio profundo a José Villarreal, Evelin

Mendoza y Hernando Bolívar por sus sugerencias. A Beatriz Barraza y a la administración de la finca La Abundancia por donar la cepa silvestre de *Burkholderia cepacia*.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Coenye TV, Peter V. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Clin Microbiol*, 2001. 39: 3427-36.
2. Coenye T, Vandamme P. *Burkholderia*: Molecular Microbiology and Genomics. Horizon Bioscience. Bélgica: Universidad de Gent. 2007. 304.
3. Govan RW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 1996. 60: 539-74.
4. Xun L. Purification and Characterization of Chlorophenol4-Monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol*. 1996. 178: 2645-9.
5. Punj V, Rachna ZO. Energy-Generating Enzymes of *Burkholderia cepacia* and Their Interactions with Macrophages. *J. Bacteriol*. 2003.185: 3167-78.
6. Qusheng BC. Kinetics of Electron Transfer through the Respiratory Chain. *J. Biophys*. 2002. 83: 1797-1808.
7. White D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. Segunda edición. Oxford University Press. 2000. 103-29.
8. Jaramillo R, Barraza B, Polo A, Sará M, Contreras M, Escamilla E. The aerobic electron transport system of *Eikenella corrodens*. *Can. J. Microbiol*. 2002. 48: 895-902.
9. Shidara S. Components of the Cytochrome System of *Alcaligenes* sp. N.C.I.B., 11015<sup>1</sup> with Special Reference to Particulate Bound C-Type Cytochromes. *J. Biochem*. 1980. 87: 1177-84.

10. Massanz Ch, Schmidt S, Friedrich B. Subforms and in Vitro Reconstitution of the NAD-Reducing Hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 1998. 180: 1023-9.
11. Yu EK, Devoe IW. Terminal Branching of the Respiratory Electron Transport Chain in *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol. 1980. 142: 879-87.
12. Winter D, Morse S. Physiology and Metabolism of Pathogenic Neisseria: Partial Characterization of the Respiratory Chain of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 1975. 123: 631-6.
13. Collier RE. An approach to synchronous growth for spore formation in *Clostridium roseum*. In spores, H.O. Haborson ed. Am. Soc. for Microbiol, Washington. D.C. 1967. pp 10-17.
14. Markwell AK, Hass SM, Tolbert NE, Bieber LL. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. Methods Enzymol. 1981.72: 296-303.
15. Escamilla E, Contreras M, Flores M. Los sistemas respiratorios bacterianos. Mensaje Bioquímico. México. 1999. 23: 69-73.
16. Wren MW, Eldon CP, Dakin GH. Novobiocin and the differentiation of peptococci and peptostreptococci. J. Clin. Pathol. 1977. 30: 620-2.
17. Jensen AN, Sorensen G, Baggesen DL, Bodker R, Hoorfar J. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rapaport-Vassiliadis. J. Microbiol. Methods. 2003; 55:249-55.
18. Pathema.jcvi.org. [página web en Internet]. California: Pathema - Bioinformatic Resource Center - *Burkholderia*. TIGRFAM/Pfam Search Report: TIGR00203 [actualizado 23 de abril de 2009; citado 11 de abril 2011]. Disponible en: [http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/EvidenceSearch.cgi?sub\\_org\\_val=gbp1655!&search\\_chooser=hmm&search\\_string=TIGR00203](http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/EvidenceSearch.cgi?sub_org_val=gbp1655!&search_chooser=hmm&search_string=TIGR00203)
19. Pathema.jcvi.org. [página web en Internet]. California: Pathema - Bioinformatic Resource Center Burkholderia. *Burkholderia*. COG Search Report: COG1271. [actualizado 23 de abril de 2009; citado 11 de abril 2011]. Disponible en: [http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/EvidenceSearch.cgi?sub\\_org\\_val=gbm!&search\\_chooser=cog&search\\_string=COG1271](http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/EvidenceSearch.cgi?sub_org_val=gbm!&search_chooser=cog&search_string=COG1271)
20. *Burkholderia* Genome Database. [base de datos en Internet] US: Putative orthologs of Bamb\_3313. [actualizado 15 mayo 2008; citado 21 julio 2011]. Disponible en: <http://www.expasy.ch/uniprot/A4JGC2.txt>
21. Uniprotkb - Protein Knowledge Base - [base de datos en Internet] US: Swiss-Prot Q39EF3 (NUOI\_BURS3). [actualizado Sep 2008; citado 30 mayo 2011]. Disponible en: [http://uniprotkb.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/GeneList.cgi?sub\\_role=112&sub\\_org\\_val=gbp1710b](http://uniprotkb.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/GeneList.cgi?sub_role=112&sub_org_val=gbp1710b).
22. Kim MS, Kim YJ. Enzymatic Properties of the Membrane-bound NADH Oxidase System in the Aerobic Respiratory Chain of *Bacillus cereus*. J. Biochemistry and Molecular Biology. 2004. 37:753-6.
23. Cooper M, Tavankar GR, Williams HD. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2003. 149. 1275-84.
24. Adjei MD, Ohta Y. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. World J. Microbiol. Biotechnol. 1999. 15:699-704.
25. Quesada AG, Merchá M, Faustino BB. Essential role of cytochrome *bd*-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Appl. Environ. Microbiol. 2007.73: 5118-24.