

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA
Y PEROXIDASA DE *Microcoleus chthonoplastes*
(Oscillatoriaceae: Cyanobacteria) CEPA SC7B9002-1
BAJO ESTRES OXIDATIVO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA EL BIOLOGO

DARIEL TOVAR RAMIREZ

La Paz, Baja California Sur, México, 1998.

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

INDICE.

Página:

Glosario	i
Simbología	ii
Relación de tablas y figuras	iii
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción.	3
II. Antecedentes.	11
III. Justificación.	17
IV. Objetivos.	18
V. Materiales y métodos.	19
1. Soluciones amortiguadoras.	19
2. Evaluación de la producción de las enzimas SOD y AsA-POD durante el crecimiento de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	19
3. Efecto del paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	21
4. Efecto de las salinidad e intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	23
5. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	24
6. Evidenciación de las enzimas SOD, AsA-POD y CAT de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes).	25
VI. Resultados.	28
1. Evaluación de la actividad POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B-9002-1	29
2. Crecimiento de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	29
3. Efecto del paraquat sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1	30

	Página
4. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	32
5. Efecto del oxígeno sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	34
6. Efecto de la salinidad (NaCl) en la producción y/o actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	35
7. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	40
8. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1	43
9. Evidenciación de las enzimas SOD, AsA-POD y CAT de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes).	47
VII. Discusión.	51
1. Evaluación de la actividad SOD y AsA-POD durante el crecimiento de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	51
2. Efecto del paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1	53
3. Efecto de la salinidad (NaCl) sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	57
4. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	58
5. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1.	60
6. Evidenciación de las enzimas SOD, AsA-POD y CAT de <i>M. chthonoplastes</i> cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes).	61

	Página
VIII. Conclusiones.	63
Perspectivas de futura investigación	65
IX. Literatura citada.	66
Anexo I.	76
Anexo II.	77
Anexo III.	82
Anexo IV.	84

GLOSARIO

Absorbancia. Característica intrínseca de las moléculas medida por espectrofotometría al absorber éstas un haz de luz a determinada longitud de onda.

Actividad específica. Eficiencia de una enzima para transformar su sustrato por unidad de proteína.

Amensalismo. Relación entre dos especies en donde una de ellas produce factores de inhibición del crecimiento de la otra.

Catálisis. Modulación de la transformación de una molécula por acción química.

Densidad óptica. Es un valor numérico obtenido por espectrofotometría que se deriva del porcentaje de luz absorbida por una solución.

Desnaturalización proteica. Estado en el que las proteínas pierden su estructura nativa funcional.

Diálisis. Separación selectiva de iones y moléculas, de soluciones coloidales por difusión a través de una membrana.

Enzima. Catalizador orgánico que regula procesos bioquímicos.

Esferoplastos. Formas esféricas de las bacterias, con restos de pared celular y muy frágiles al choque osmótico.

Especies oxigenadas reactivas. Moléculas que poseen átomos de oxígeno con capacidad de combinarse y reaccionar violentamente con las biomoléculas.

Estrés. Estado en el que algún(os) factor(es) produce(n) cierta presión en los organismos.

Fototrofia. Capacidad que poseen los organismos para emplear la energía fotónica y transformarla en energía de enlace químico.

Fotosistemas I y II. Centros de reacción donde se lleva a cabo la captura de radiación solar y su transformación en ATP y poder de reducción.

Grupo prostético. Molécula que determina la actividad y especificidad de las enzimas.

Hiperoxia. Condición bajo la cual se presenta el oxígeno por arriba de la presión atmosférica (0.2 atm).

Isoenzima. Diferentes formas moleculares de una enzima que son determinadas genéticamente y que las podemos encontrar en un solo individuo o en diferentes miembros de la misma especie.

Microaerofilia. Condición en donde el oxígeno se encuentra a presión por debajo de 0.2 atm.

Permeabilidad celular. Condición en la que la célula permite el libre paso de moléculas a través de su membrana .

Proenzima. Forma proactiva o precursora de la enzima.

Protocooperación (sinergismo). Relación entre dos especies donde ambas se ven beneficiadas para lograr su supervivencia.

Radicales libres. Moléculas con un electrón no apareado en su orbital más externo que las hace ser altamente reactivas.

Senescencia. Envejecimiento.

Sonicación. Acción del ultrasonido.

Tilacoides. Membranas intracelulares donde se localiza el aparato fotosintético.

Ultrasonido. Sistema por medio del cual la energía eléctrica es transformada en energía mecánica por medio de la creación de burbujas, creando el fenómeno conocido como cavitación; es utilizado frecuentemente para el rompimiento celular cuando chocan las burbujas contra la pared del recipiente y las células.

Estrés. Estado desbalanceado entre condiciones normalmente encontradas en los seres vivos

Estrés oxidativo. Estado donde se favorece la presencia de sustancias oxidantes sobre las antioxidantes, con repercusiones potencialmente dañinas.

SIMBOLOGIA

ADN	ácido desoxiribonucleico.
ANDEVA	análisis de variancia.
AsA-POD	ascorbato peroxidasa.
ASN-III	agua de mar artificial para el cultivo de cianobacterias.
atm	atmósfera.
°C	grados celcius o centígrados.
BP	amortiguador de fosfatos.
CAT	catalasa.
CAT-POD	enzima híbrido de catalasa-peroxidasa.
dA/min	cambio de absorbancia por minuto.
D.O.	densidad óptica.
DX	dextrán.
e	2.7178
E.C.	código enzimático (Enzyme Code).
EDTA	ácido etiléndiamin tetraacético.
EOR	especies oxigenadas reactivas.
g	gramo.
g	unidades gravitacionales $(1.1 \times 10^{-5} \times \text{radio del rotor (cm)} (\text{rpm})^2)$.
h	constante de Planck $(1.58 \times 10^{-34} \text{ calorías-s})$.
h	hora.
k	constante de crecimiento $(\log_{10} \text{tx} - \log_{10} \text{to}) / (0.301) \text{ t}$.
lac	lactosa.
l	litro.
LPP-B	cianobacterias con morfología similar a la de los géneros <i>Lyngbya</i> , <i>Phormidium</i> o <i>Plectonema</i> .
mg	miligramos.
min	minuto.
ml	mililitros.

RELACION DE TABLAS Y FIGURAS.

Tablas.

Tabla 1. Cianobacterias en las que han sido detectadas las enzimas SOD, CAT y/o AsA-POD

Tabla 2. Condiciones por medio de las cuales han sido inducidas las enzimas SOD y POD en algunas cianobacterias y otros procariotes.

Tabla 3. Soluciones amortiguadoras.

Tabla 4. Valores de la constante de crecimiento (K) de *M. chthonoplastes*, obtenidos de las curvas de clorofila a , proteína y ácidos nucleicos

Tabla 5. Rendimiento de la proteína total extraída y actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes*, con el uso de los métodos de extracción basados en balística y ultrasonido.

Figuras.

Fig. 1. Tres posibles rutas de generación del peróxido de hidrógeno en el fotosistema reducido; FS I: fotosistema I, NADP: nicotín- adenín-dinucleótido y NADPH su forma reducida (tomado y traducido de Halliwell, 1982).

Fig. 2. Estructura química del paraquat (metil viológeno: 1, 1,- dimetil 4,4'-dicloruro de bipyridinium).

Fig. 3. Esquema general que muestra el flujo de electrones durante la fotosíntesis y la manera en que se acopla el PQ en la última porción de este proceso (tomado y traducido de Halliwell, 1982).

Fig. 4. Micrografía electrónica de transmisión de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Fig. 5. Relación de la absorbancia a 665 nm con el contenido de clorofila *a* de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 crecida a la mitad de su fase logarítmica.

Fig. 6. (A) Cinética de crecimiento y (B) actividad enzimática durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Las barras significan desviación estándar de tres réplicas.

Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de paraquat sobre el contenido total de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.* Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre el contenido total de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.* Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

Fig 9. Efecto de diferentes concentraciones de oxígeno sobre el contenido de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.* Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

Fig. 10. Efecto del NaCl a 2.5 % (A), 4.0 % (B), 8.0 % (C) y 12 % (D) en el medio de cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 sobre el contenido de clorofila *a*. Los puntos son los valores observados y las líneas representan el ajuste de los datos al modelo logístico.

Fig. 11. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en base a la extracción de proteína total (A) y de ácidos nucleicos (B). * Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

Fig. 12. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 sobre la actividad SOD y AsA-POD. * Datos con un $P < 0.05$.

Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

Fig. 13. Oscilación de la temperatura e intensidad luminosa registradas durante el experimento.

Fig. 14. Efecto de la intensidad luminosa sobre el contenido de clorofila a y proteínas de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Los puntos son promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

Fig. 15. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Los puntos son promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

Fig. 16. Eficiencia del rompimiento celular utilizando esferoplastos (barras lisas) y células intactas (barras con líneas). A) proteína extraída, B) actividad SOD y C) actividad AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Las líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar de tres réplicas.

Fig. 17. Lectura espectrofotométrica de los extractos crudos de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 tratados con lisozima (esferoplastos) (barras lisas) y de células intactas (barras con líneas) a longitudes de onda cercanas a 280 y 620 nm. A 280 nm absorben las proteínas que poseen aminoácidos aromáticos como el triptofano y fenilalanina, y, a 620 nm la ficocianina, pigmento proteico constituyente del aparato fotosintético de las cianobacterias.

Fig. 18. Electroforésis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas. A) enzimas comerciales CAT, POD y Fe-SOD, (B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y, C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α .

Fig. 19. Gel de poliacrilamida teñido para revelar actividad SOD: A) enzima comercial Fe-SOD con peso molecular de 41,700 daltones, (B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y, C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α .

Fig. 20. Gel teñido para revelar actividad AsA-POD. A) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, B) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α y, C) POD comercial.

Fig. 21. Gel de poliacrilamida teñido para revelar actividad CAT. A) CAT comercial de hígado de bovino con un peso molecular de 240,000 daltones, B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y, C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α .

RESUMEN.

En la actualidad, los eventos biológicos en donde participan las especies oxigenadas reactivas (EOR) son de sustancial importancia por sus implicaciones biomédicas y en el ámbito biotecnológico, por la posibilidad de obtener biomoléculas antioxidantes de naturaleza enzimática. Bajo este contexto, se estudió la participación del complejo enzimático superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (AsA-POD) en la eliminación de especies oxigenadas reactivas (EOR) generadas durante el crecimiento de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 aislado de tapetes microbianos laminados.

Una vez conocida la actividad enzimática a lo largo del crecimiento del microorganismo, se procedió a tratar a éste con los agentes oxidantes paraquat (0, 10, 100, 1000 y 1500 μM), peróxido de hidrógeno (0, 10, 100, 1000 y 1500 μM) y oxígeno (0, 21 y 100 %) dando como resultado modificaciones significativas en el contenido de proteínas totales bajo 100% de oxígeno con respecto al control, pero no con el peróxido hidrógeno. La actividad SOD incrementa significativamente bajo 100% de oxígeno, con 10 y 100 μM de peróxido de hidrógeno, pero no con PQ. La enzima CAT, no fué detectada con los métodos empleados por lo que se considera que *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 es una cianobacteria catalasa negativo. La actividad de la AsA-POD incrementa significativamente bajo cualquier concentración de paraquat, pero no con peróxido de hidrógeno, con el cual ocurre una disminución de esta actividad. Sin embargo, en condiciones anaerobias (0 % de oxígeno) ocurre un inexplicable aumento de la actividad AsA-POD.

Al exponer a *M. chthonoplastes* a condiciones hiperosmóticas, se observa una disminución de la actividad SOD y AsA-POD a lo largo del cultivo, sin embargo, a alta intensidad luminosa, se incrementa el contenido de proteínas, de actividad SOD y AsA-POD, con un subsecuente daño fotooxidativo crónico.

Finalmente, se estudió el rompimiento celular de *M. chthonoplastes* a través de ultrasonido como medio físico, perlas de cristal como medio mecánico y generando esferoplastos con el uso de lisozima como medio químico, lográndose los mejores rendimientos con el uso del ultrasonido en relación a los otros dos.

ABSTRACT.

The role of ROS in the biological processes have been studied since biomedical point of view and biotechnological also for the capacity to obtain antioxidant enzymes. In this sense, we determined the effect of paraquat, hydrogen peroxide (10, 100, 1000 and 1500 μM) and oxygen (0, 21 and 100%) on the superoxide dismutase and peroxidase activity of *M. chthonoplastes*, strain SC7B9002-1. In addition, the effect of different salt concentration and solar irradiance on SOD and AsA-POD of *M. chthonoplastes* strain SC7B9002-1 was tested and finally the conditions of permeabilization and cell breakage with the highest yield of enzyme activity were determined.

Once the kinetic growth of *M. chthonoplastes* strain SC7B9002-1 was established, we tested same inducers for the above enzymes. A significant increase of total extractable proteins in *M. chthonoplastes* strain SC7B9002-1 was observed under 100% of oxygen. In contrast, protein content decreased when the microorganism was exposed to hydrogen peroxide. SOD activity in *M. chthonoplastes* strain SC7B9002-1, rise with 100% oxygen, but not with PQ or hydrogen peroxide. Ascorbate dependent peroxidase (AsA-POD) activity, on the other hand, showed an increase in activity with PQ, but a drop when exposed to hydrogen peroxide. Strikingly, AsA-POD also increased under anaerobic conditions.

We also tested the effect of hyperosmotic stress and high light intensities on SOD and AsA-POD activity, finding no effect on SOD and AsA-POD under any salt concentration tested; however, changes in antioxidant enzymes during batch culture were observed related to age of culture. On another hand, the induction of SOD and AsA-POD was found to be dependent on light intensity with a severe photoinhibition observed at the highest light intensity during the day.

Finally, to facilitate the extraction of SOD and AsA-POD from *M. chthonoplastes* strain SC7B9002-1, we employed the following disruptions methods: ultrasonic, ballistic (glass beads) and lisozyme followed by cell disruption with ultrasonic. We obtained the best results by using ultrasonic cell disruption in relation to the other methods.

I. INTRODUCCION.

A pesar de que el oxígeno es necesario para la vida en el planeta, este gas posee un gran potencial tóxico al ser el precursor de especies oxigenadas reactivas (EOR) (Fridovich, 1978). Entre las EOR podemos citar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (O_2), a los complejos metálicos de transición oxigenada: los iones ferril FeO^{2+} y perferril FeO_2^{2+} y finalmente, a los radicales libres del oxígeno, ión superóxido (O_2^-), hidroxilo ($\text{HO}^\cdot$) y perhidroxilo ($\text{HO}_2^\cdot$) (Frank, 1982).

Se sabe que los radicales libres del oxígeno son especies que poseen un electrón no apareado en su orbital más externo que, como regla, hace que se incremente la reactividad de un compuesto, especialmente en reacciones de sustracción de átomos de hidrógeno y en la adición a dobles enlaces de compuestos orgánicos. La generación de los radicales libres de oxígeno en los sistemas biológicos se lleva a cabo por la reducción univalente del oxígeno en las siguientes etapas: 1) producción no enzimática durante la oxidación de sustratos naturales; tales como la oxidación espontánea de catecolaminas, hidroquinonas, leucoflavinas, de grupos tiol y ferredoxinas reducidas, 2) producción enzimática catalizada por reductasas y deshidrogenasas, tales como la xantina oxidasa, flavín deshidrogenasa, deshidro-orótico deshidrogenasa y aldehído oxidasa, 3) estimulación por compuestos químicos y drogas, y 4) la producción de radicales libres por células enteras (macrófagos y neutrófilos) estimuladas por antígenos (Afanas'ev, 1991; Cunningham y Capone, 1992).

Durante la respiración, los organismos producen especies oxigenadas capaces de generar serios daños a nivel tisular, celular e inclusive molecular; estos daños incluyen desnaturalización enzimática, despolimerización de polisacáridos y mutaciones genéticas como resultado de la oxidación del ácido desoxirribonucleico. Las moléculas lipídicas son muy sensibles a los radicales de oxígeno vía peroxidación, por lo que su interacción con éstos ocasiona la desintegración de las membranas. Uno de los mayores daños que puede ocasionar el radical superóxido, es su habilidad de generar la sustancia activa más reactiva conocida en química: el radical hidroxilo (Kong y Davison, 1980; Halliwell, 1982).

En organismos fototróficos se incrementan las posibilidades de formación de especies oxigenadas reactivas mediante diversas vías: la generación de oxígeno por fotosíntesis, fotorreducción del oxígeno singlete a superóxido y la presencia de pigmentos fotosintéticos que generan oxígeno singlete e iones hidroxilo mediante reacciones fotodirigidas (Cunningham y Capone, 1992; Schlesinger *et al.*, 1996). Específicamente, la generación del ión superóxido se lleva a cabo por autooxidación del aceptor de electrones primario y de la ferredoxina reducida en el fotosistema I, mientras que el peróxido de hidrógeno se genera por dos vías: 1) por un proceso no enzimático donde está implicada la dismutación espontánea del ión superóxido y 2) por la participación de la superóxido dismutasa (SOD) (ecuación 1, Fig. 1) (Dubinin *et al.*, 1993; Miyake *et al.*, 1991).

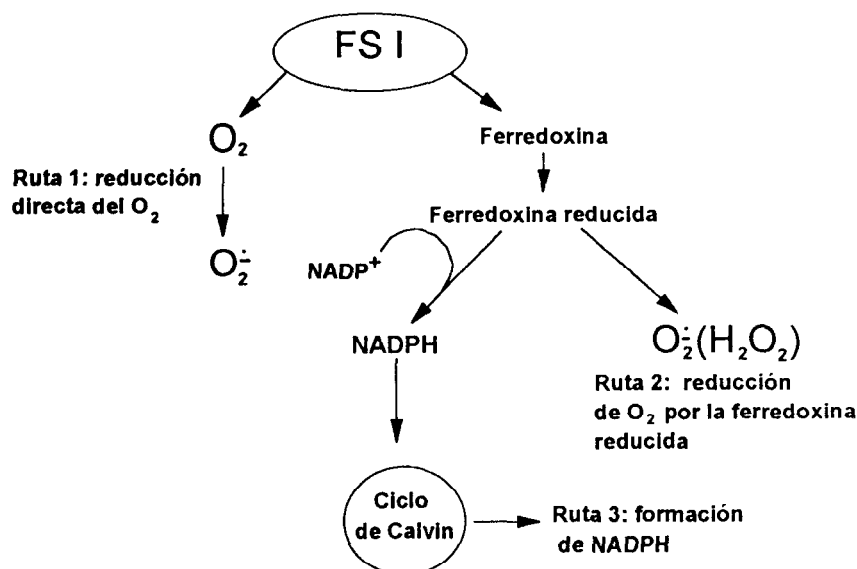


Fig. 1. Tres posibles rutas de generación del peróxido de hidrógeno en el fotosistema reducido; FS I: fotosistema I, NADP: nicotín- adenín-dinucleótido y NADPH su forma reducida (tomado y traducido de Halliwell, 1982).

Para contrarrestar los efectos dañinos de estas especies oxigenadas, los organismos respiradores están dotados de un sistema enzimático muy eficiente para transformarlas en productos menos nocivos. Este sistema enzimático puede comprender a las siguientes enzimas:

1) **Superóxido dismutasa (SOD)** (E.C. 1.15.1.1. superóxido: superóxido oxidoreductasa) es una metaloproteína con un grupo metal en su sitio activo, puede presentarse como un dímero, trímero o tetrámero; cataliza la conversión del radical libre superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno mediante la siguiente reacción (Steinman, 1982):



Hasta el momento han sido aisladas tres tipos de SOD con diferentes metales en su sitio activo:

a) CuZn-SOD, se localiza principalmente en el citoplasma de células eucariotes: protozoarios, hongos y células de mamíferos. Se incluye excepcionalmente en algunos procariotes como *Photobacter leiognathi* (Martin y Fridovich, 1981) y *Brucella abortus* (Beck *et al.*, 1990).

b) La Mn-SOD, se ha localizado en las mitocondrias de organismos eucariotes como plantas terrestres, animales y algas verdes; también se ha localizado en el citoplasma en forma de proenzima activa antes de ser importada al interior de la mitocondria; en el espacio periplásmico de bacterias y asociada a los tilacoides de algunas cianobacterias (Kono *et al.*, 1979; Parker *et al.*, 1986; Lee y Lee, 1988).

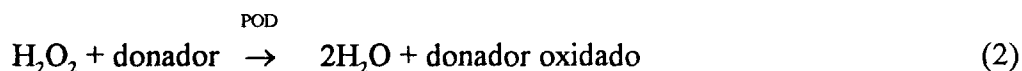
c) La Fe-SOD, se localiza en organismos eucariotes tales como *Euglena gracilis*, en algas rojas, algunas plantas superiores y en la mayoría de organismos procariotes. Desde un punto de vista evolutivo, parece ser que las isoenzimas Fe y Mn-SOD están íntimamente emparentadas, ya que se ha encontrado una similitud entre su secuencia de aminoácidos, en la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica y en la estructura de su sitio activo (Matsumoto *et al.*, 1991; Parker y Blake, 1988).

Usualmente se presentan combinadas las isoenzimas de la SOD dependiendo del grupo filogenético; por ejemplo los procariotes presentan tanto Fe-SOD como Mn-SOD, mientras que en los organismos superiores podemos encontrar usualmente CuZn-SOD y Mn-SOD. De acuerdo

a las condiciones ambientales en la que son crecidos los microorganismos, es posible encontrar híbridos de las isoenzimas de SOD tales como FeMn-SOD (Schiavone y Hassan, 1987).

2) **Peroxidasa (POD)** (E.C. 1.11.1.7) también es una proteína con un grupo Fe^{3+} en su sitio activo. Existen diversas isoenzimas que pueden catalizar la reacción de la ecuación (2) utilizando distintos donadores de electrones. Entre ellas podemos incluir a la glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, citocromo c peroxidasa, las haloperoxidasas y la NADH peroxidasa. Las isoformas de la peroxidasa las encontramos en casi todos los organismos vivos pero en diferente proporción (Miyake *et al.*, 1991; Lowen y Oberley, 1982).

La POD cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua, vía oxidación de una molécula donadora de electrones:



Al igual que la SOD, existen microorganismos que pueden presentar híbridos de la CAT y POD con diferentes pesos moleculares (Yumoto *et al.*, 1990).

3) **Catalasa (CAT)** (E.C. 1.11.1.6) es una proteína compuesta por cuatro subunidades de igual peso molecular (60,000-65,000 daltons) y posee un grupo metal (Fe^{3+}) en su sitio activo. Está ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido detectada en la mayoría de los organismos aerobios estudiados hasta la fecha, aunque existen algunas excepciones donde no ha sido detectada, como es el caso de algunas cianobacterias. Sin embargo, ésta ha sido aislada y caracterizada de muy pocas fuentes microbianas tales como *Rhodobacter sphaeroides*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y de *Bacillus* sp. (Yumoto *et al.*, 1990).

La CAT transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



Dada la naturaleza oxidante de la atmósfera terrestre, sería de fatales consecuencias el excluir de los organismos aerobios a las enzimas SOD, CAT y POD. Sin embargo, la enzima SOD

ha sido detectada en muy bajas concentraciones (1-6% del total producido por *E. coli* crecida en condiciones aerobias) en organismos anaerobios estrictos tales como *Clostridium acetobutylicum*, *C. pasteurianum* (Fridovich, 1982) y en los fotótrofos anoxigénicos *Chromatium* y *Chlorobium* (Kanematsu y Asada, 1978).

Estas observaciones traen consigo diversas implicaciones biológicas y evolutivas; es decir, que a pesar de la baja concentración de oxígeno en la atmósfera primitiva, previa aparición a las cianobacterias, los microorganismos ya requerían de un complejo enzimático para contrarrestar los daños de las EOR generadas en este ambiente (Miyake *et al.*, 1991).

Actualmente, se ha demostrado que a pesar de la presencia de pigmentos carotenoides y tocoferoles en las membranas fotosintéticas de las cianobacterias, éstas requieren del grupo enzimático SOD, POD y/o CAT como primera barrera de defensa para prevenir el daño oxidativo ocasionado por las especies oxigenadas reactivas (Miyake *et al.*, 1991). Sin embargo, la combinación e isoformas de estas enzimas varía de especie a especie de cianobacterias (Tabla 1). Los daños más frecuentes que son ocasionados por las EOR en las cianobacterias son el fotoblanqueamiento de los pigmentos fotosintéticos, que una vez expuestos a condiciones oxidantes se tornan más sensibles a la degradación y subsecuente inactivación. La enzima nitrogenasa que interviene en la fijación de nitrógeno atmosférico, también puede ser inactivada por la exposición a EOR (Malin y Pearson, 1988).

El origen de las EOR en cianobacterias, lo condiciona el ambiente natural donde éstas se desarrollan ya que generalmente es un ambiente extremo caracterizado por su alta intensidad luminosa, temperatura, salinidad, períodos intermitentes de inundación-desección, pH y humedad (Potts, 1994; Ibelings, 1996; Schlesinger *et al.*, 1996). Por lo tanto, las encontramos en desiertos, aberturas termales, mar abierto, tapetes microbianos laminados expuestos a períodos intermitentes de desecación-inundación, círculo polar Ártico y Antártico, entre otros (Warwick y Roos, 1996; Potts, 1994).

Bajo las diversas condiciones naturales donde se desarrollan las cianobacterias, actúan diversos mecanismos moleculares para ver favorecida la aparición de EOR; por ejemplo, la exposición a elevadas radiaciones de fotones a las que ellas dirigen sus procesos fotosintéticos,

experimentan una reducción en el rendimiento de cuantos asimilados, conduciendo a la condición de fotoblanqueamiento (Ibelings, 1996). Cuando las cianobacterias son expuestas a periodos intermitentes de inundación y desecación, tal es el caso de los tapetes microbianos laminados, se espera que las EOR se acumulen durante la desecación, especialmente en la luz, cuando las células están expuestas a una alta intensidad luminosa (Potts, 1994). El daño oxidativo se manifiesta cuando las proteínas con grupos -SH oxidados son removidas selectivamente por catálisis, o bien, cuando proteínas oxidadas transfieren radicales por sí mismas a proteínas u otras biomoléculas normales y así sucesivamente (Dean *et al.*, 1993). El daño a nivel protéico ocurre también, cuando las células permanecen desecadas por largos periodos a bajas tasas de recambio en intenso frío, como las comunidades microbianas que colonizan la Antártida (Potts, 1994). Junto con el daño que sufren las proteínas y la peroxidación de lípidos, conduce a la pérdida de la barrera de difusión de moléculas a través de la membrana, para después sobrevenir una lisis celular, (Potts, 1994).

Así pues, las estrategias adoptadas por las cianobacterias para contrarrestar el daño oxidativo de estas especies químicas, varían de especie a especie y del hábitat donde éstas se encuentran. De tal forma que podemos encontrar a las enzimas SOD, CAT y/o POD, como sistemas de defensa hacia las EOR (Tabla 1).

Tabla 1. Cianobacterias en las que han sido detectadas las enzimas SOD, CAT, POD y/o AsA-POD (Miyake *et al.*, 1991¹; Bagchi *et al.*, 1991²; Canini *et al.*, 1992³; Dubinin *et al.*, 1993⁴, García-Pichel *et al.*, 1996⁴, Cuningham y Capone, 1992⁵, este trabajo, 1997⁵):

Especie:	SOD*	CAT	POD	AsA-POD
<i>Anabaena azzollae</i> Strasburger ³	Mn,Fe y MnFe	sd	sd	sd
<i>Anabaena cylindrica</i> Lemmermam ¹	Fe y Mn	+	+	+
<i>Trichodesmium</i> sp. ⁵	Fe	sd	sd	sd
<i>Anabaena variabilis</i> Kützinger ²	Fe y Mn	-	+	+
<i>Nostoc</i> sp. ³	Fe	sd	+	+
<i>Spirulina platensis</i> ¹	Fe	sd	sd	sd
<i>Plectonema boryanum</i> Gomont ¹	Fe y Mn	+	-	-
<i>Anacystis nidulans</i> (Richter) Drouet ³	Fe y Mn	+	sd	-
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> ⁴	Fe	-	sd	sd
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> ⁵ cepa SC7B9002-1	Fe	-	-	+

* Metales que conforman el grupo prostético de la SOD

MnFe: SOD híbrido de manganeso y fierro.

AsA-POD: Ascorbato peroxidasa.

sd: Sin determinar.

De esta forma, se han tratado de elucidar los posibles mecanismos por medio de los cuales las cianobacterias se protegen de los daños ocasionados por las condiciones ambientales en donde se desarrollan. A pesar de que existen reportes acerca de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de *Microcoleus chthonoplastes*, en el sentido de la oxidación de azufre y de la generación de energía en oscuridad y anaerobiosis, se carece de la información básica de los factores que regulan su crecimiento así como de las respuestas que éste adopta contra el estrés oxidativo.

Microcoleus chthonoplastes representa un buen sujeto de estudio ya que es una especie cosmopolita con rasgos fenotípicos y genotípicos bien conservados, formadora de comunidades microbianas tanto marinas y dulceacuícolas, que de alguna manera contribuyen a la formación y estabilización de los sedimentos intermareales (Paterson, 1994). Es una cianobacteria dominante de tapetes microbianos de sitios templados y tropicales intermareales, así como de hábitats

hipersalinos y crece adherida a los sedimentos en las zonas intermareales o en superficies sólidas en lagunas hipersalinas. En ocasiones forma comunidades microbianas exclusivas de esta especie y generalmente están sujetas a ciclos de exposición a la desecación e inundación (Karsten, 1996). Por lo que al verse sometida a las fluctuaciones del ambiente, produce metabolitos que biotecnológicamente los hacen ser atractivos para su explotación, tales como pigmentos (β -caroteno, clorofilas, y ficobliproteínas), osmoreguladores (trehalosa y glicosil glicerol), proteínas de choque térmico y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa) (López-Cortés y Tovar, 1992; Karsten, 1996; Núñez *et al.*, 1996; Tovar *et al.*, 1997).

II. ANTECEDENTES.

Con el descubrimiento de la enzima SOD por McCord y Fridovich (1969) se han explorado los mecanismos fisiológicos por los cuales son generados los iones superóxido y los daños que éstos ocasionan a los sistemas vivos, entre los que destacan la desnaturalización enzimática, despolimerización de polisacáridos, mutaciones genéticas como resultado de la oxidación del ácido desoxirribonucleico y la peroxidación de las moléculas lipídicas, que las hace más susceptibles a la desintegración de las membranas (Halliwell, 1982). Por otro lado, se incrementaron también los estudios relacionados a la participación conjunta de las enzimas SOD y POD en diversos procesos biológicos para contrarrestar los efectos de las EOR generadas durante el metabolismo de las células (Frank, 1982; Afanas'ev, 1991).

El estudio de este grupo enzimático se ha abordado desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y biotecnológico, utilizando diversos grupos biológicos que van desde las bacterias al ser humano ya que sus implicaciones trascienden más allá de una disciplina científica en particular. Por ejemplo, se han explorado y propuesto numerosos grupos de organismos pertenecientes a diferentes taxas (bacterias, levaduras, microalgas y bovinos) como posibles candidatos para la explotación de las enzimas SOD y POD, ya que ha sido muy bien documentado su uso en humanos como agentes antioxidantes, como agente antiinflamatorio, durante el tratamiento postirradiación, para isquemia del miocardio, para contrarrestar efectos del cáncer, en tratamientos de traumas causados por quemaduras, entre otros (Michelson, 1982; Downen *et al.* 1991). A pesar de que los estudios farmacológicos han sido enfocados a la CuZn-SOD (Michelson, 1982), se siguen proponiendo a las cianobacterias marinas como fuentes alternas para la obtención de estas enzimas para diversos fines tales como la industria alimentaria (Wachi *et al.*, 1996).

Por la creciente investigación enfocada a elucidar la participación del complejo enzimático SOD y POD en la desintoxicación oxidativa, se sigue estudiando la posibilidad de enlazar covalentemente este grupo de enzimas con polímeros como el PEG, con la finalidad de contrarrestar algunos eventos patológicos en humanos tales como el mal de Parkinson, aquellos

donde se producen inflamaciones del tejido y durante la reperfusión del tejido isquémico (Beckman *et al.*, 1988; McGoff *et al.*, 1988).

Por otro lado, se han descrito algunas condiciones en las que es posible inducir las isoenzimas de la SOD y la POD. Entre éstas están la hiperoxia, la inducción por exposición a paraquat (metil viológeno: 1, 1,- dimetil, 4,4'-dicloruro de bipyridinium), la exposición a peróxido de hidrógeno exógeno, a altas intensidades luminosas y a superóxido radiogénico (Fridovich, 1982; Miyake *et al.*, 1991). Se sabe también que las bacterias están sujetas a una constante presión de factores estresantes como la salinidad, temperatura, presión, intensidad luminosa, desecación, pH, oxígeno, químicos tóxicos y nutrientes, que aceleran la producción de radicales superóxido por lo que se favorece la inducción de la actividad SOD (Potts, 1994)

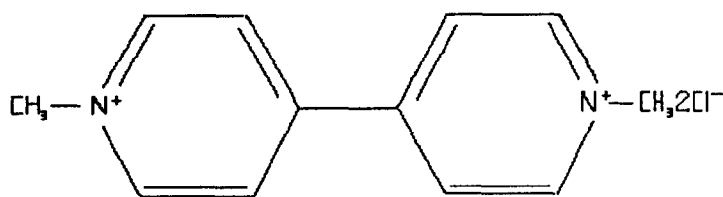
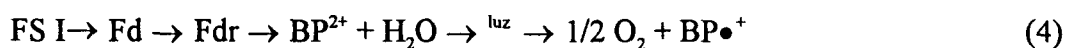


Fig. 2. Estructura química del paraquat (metil viológeno: 1, 1,- dimetil 4, 4'-dicloruro de bipyridinium).

El paraquat (Fig. 2) es un herbicida que ocasiona daños letales en los organismos fototróficos. Este compuesto actúa como aceptor de los electrones provenientes del fotosistema I, específicamente de la ferredoxina reducida, que al transferirlos directamente al oxígeno logra su reducción y transformación en superóxido en presencia de luz (Fig. 3) (ecuación 4 y 5). El producto estable de esta reacción es el peróxido de hidrógeno generado a partir de una dismutación espontánea o catalizada por la SOD (Halliwell, 1982; Dubinin *et al.*, 1993).





Donde FS I es el fotosistema I; Fd y Fdr es la ferredoxina y su forma reducida respectivamente; BP^{2+} herbicidas de bupiridilos (diquat y paraquat) y $\text{BP}\bullet^+$ y sus radicales.

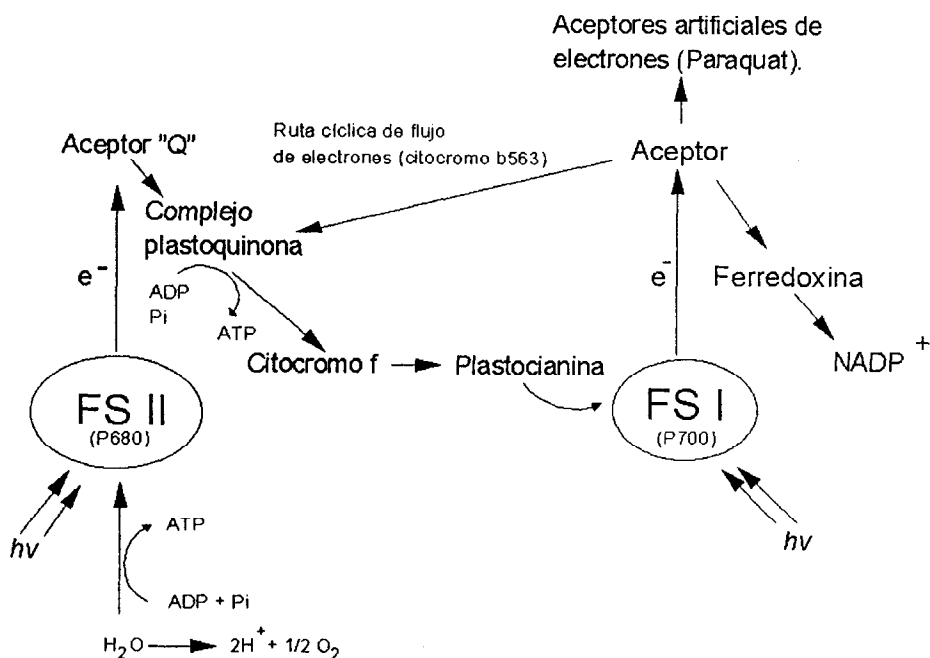


Fig. 3. Esquema general que muestra el flujo de electrones durante la fotosíntesis y la manera en la que se acopla el PQ en la última porción de este proceso (tomado y traducido de Halliwell, 1982).

Se ha reportado la inducción de la actividad SOD y AsA-POD en cianobacterias mediante diversos medios (Tabla 2) (Bagchi *et al.*, 1991¹; Caiola *et al.*, 1991²; Mittler y Tel Or, 1991³; Scott *et al.*, 1987⁴; Greenberg y Demple, 1989⁵; Sanders *et al.*, 1995⁶).

Tabla 2. Condiciones por medio de las cuales han sido inducidas las enzimas SOD y POD en algunas cianobacterias (1 y 2) y otros procariotes (3, 4 y 5).

Especies	Inductor	Enzima(s) inducida(s) y porcentaje de inducción
1. <i>Anabaena variabilis</i> ¹	paraquat, O ₂ (50%)	AsA-POD (160 %), Fe-SOD (230 %)
2. <i>Anabaena cylindrica</i> ²	140 µE m ⁻² s ⁻¹	Fe y Mn-SOD (60 %)
3. <i>Synechococcus</i> ³	H ₂ O ₂ ; intensidad luminosa	AsA-POD (400 %)
4. <i>E. coli</i> ⁴	O ₂ hiperbárico	Fe-SOD (130 %) y POD (1300 %)
5. <i>Porphyromonas gingivalis</i> ⁴	temperatura (39°C), aereación	Fe-SOD (250 % y 300 % respectivamente)
6. <i>E. coli</i> ⁵	H ₂ O ₂ , paraquat	POD, Fe-SOD
7. <i>Lactococcus lactis</i> ⁶	pH ácido, aereación	Mn-SOD (200 %)

Recientemente, se han incrementado los estudios para conocer los factores ambientales que regulan la expresión de genes que estén asociados a sistemas enzimáticos encargados de catalizar la conversión de especies oxigenadas reactivas, que son producidas bajo las condiciones estresantes (Tabla 2). Aunado a los métodos de inducción de las enzimas SOD y AsA-POD, se han probado algunas técnicas de disrupción celular para la obtención de extractos crudos con la mayor cantidad de actividad enzimática posible. Dada la rigidez de la pared celular de las cianobacterias, conferida por sus características gram (-), se han probado diferentes métodos enzimáticos y/o mecánicos para permeabilizar y romper la envoltura celular. (Caiola *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1992).

La ruptura celular por ultrasonido, aplicada directamente sobre células intactas o después de ser tratadas con lisozima ha sido ampliamente utilizada (Caiola *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1992). Mediante este tratamiento enzimático se hidrolizan los enlaces β (1-4) glucosídicos del esqueleto del polisacárido del peptidoglucano, lo que conduce a obtener células frágiles (esferoplastos) con las paredes celulares fragmentadas. Para generar esferoplastos a partir de cianobacterias tanto cocoidales como filamentosas, se ha utilizado la enzima lisozima grado I de huevo de gallina bajo diferentes concentraciones que van desde 1 mg/mg de clorofila a; hasta 5 y 10 mg/ml de cultivo (Caiola *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1992).

Para la realización del presente trabajo se utilizó una cianobacteria de la especie *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 LPP-B1, aislada de tapetes microbianos laminados marinos localizados en los canales de marea, cerca del puerto de San Carlos, B. C. S., México (Tovar, 1991; López-Cortés y Tovar, 1992) (Fig. 4).

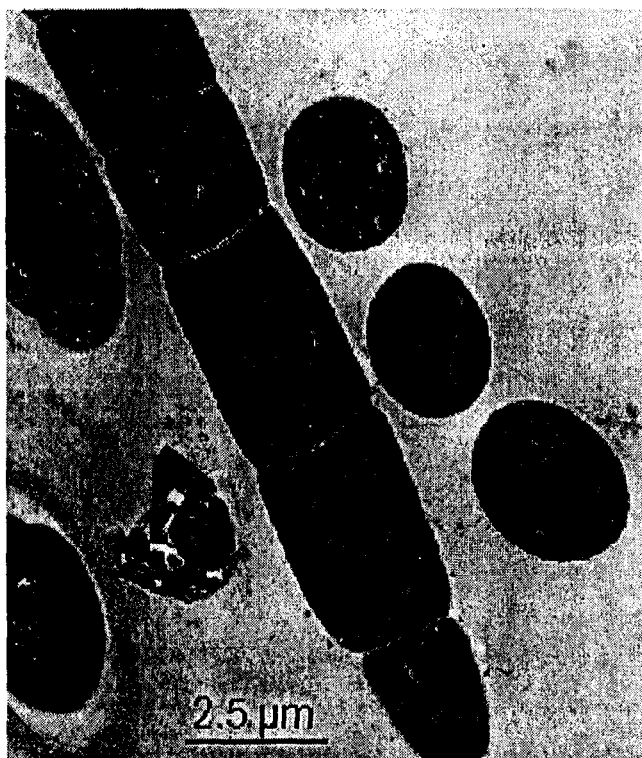


Fig. 4. Micrografía electrónica de transmisión de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Aumento 10,000 x. El proceso seguido para la obtención de la micrografía se describe en el anexo IV.

La cianobacteria filamentosa *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, es considerada un constructor principal y colonizador primario en los tapetes microbianos laminados de San Carlos, B. C. S., por lo que permanece a lo largo del año pese a las condiciones extremas generadas por eventos naturales tales como inundación, desecación; fluctuaciones de pH, temperatura y salinidad; altas intensidades luminosas e intervalos diurnos de aerobiosis-anaerobiosis generados por el metabolismo de bacterias del azufre (Stal *et al.*, 1989). Bajo estas condiciones de estrés

natural pueden ser generadas especies oxigenadas reactivas como el superóxido, el oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno e hidroxilos que a su vez estimulan la síntesis subsecuente de defensas antioxidantes como las enzimas SOD y POD (Potts, 1994).

Se sabe del incremento de SOD (319%) y AsA-POD (450%) en líneas celulares del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) que fueron expuestas a una concentración de solo 0.15 M de NaCl (Gosset *et al.*, 1996) así como el incremento de SOD (1000%), POD (400-500%) de *Halobacterium halobium* expuesto a choque hiposmótico (Brown-Peterson y Salin, 1994).

Los efectos de la salinidad sobre el crecimiento de *Microcoleus chthonoplastes* (Karsten, 1996) cepa SC7B90021-1 y su producción de pigmentos clorofila a y β -caroteno son conocidos (López-Cortés y Tovar, 1992) sin embargo, el efecto que pudiera traer consigo el choque osmótico hipo o hipersalino sobre la actividad SOD y AsA-POD aún se desconoce.

Por otro lado, Dubinin *et al.*, (1993) reportan que una cepa de la especie *M. chthonoplastes* aislada de una laguna hipersalina de la ex-Unión Soviética, posee una alta actividad SOD, que produce y excreta al medio peróxido de hidrógeno como producto de su alta actividad fotosintética, y que sin embargo, no se detecta actividad catalasa en dicha cepa. Además del trabajo anterior, García-Pichel *et al.*, (1996) hacen una revisión de las características fenotípicas y filogenéticas de 10 cepas de *M. chthonoplastes*, aisladas de diferentes ambientes del planeta, donde reportan la carencia de la enzima CAT, observación que pudo comprobarse con la cepa estudiada en este trabajo también.

Como se ha reportado previamente, el estrés oxidativo ocasionado por las condiciones ambientales ricas en oxígeno, peróxido de hidrógeno, paraquat, salinidad e intensidad luminosa, conduce a que los organismos produzcan EOR tales como el oxígeno singlete, el superóxido y el peróxido de hidrógeno, por lo que esperamos encontrar una modificación en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B90021-1 al someterla a estrés oxidativo mediado por las condiciones arriba mencionadas.

III. JUSTIFICACION.

Por la importancia que representan las enzimas SOD y POD para contrarrestar los efectos de las especies oxigenadas reactivas en los sistemas biológicos, es necesario conocer más aún su comportamiento en los procesos fisiológicos donde participan conjuntamente, con la finalidad de ampliar las expectativas de su explotación tanto de carácter científico (investigación básica referente a los procesos fisiológicos que regulan la actividad del sistema de defensa contra estrés oxidativo) como biotecnológico (biomedicina e industria de alimentos). En este sentido, son pocos los trabajos enfocados al estudio de los efectos de las condiciones ambientales que regulan la síntesis de SOD (Wachi *et al.*, 1996) y POD en cianobacterias.

Para la realización de este trabajo se eligió como modelo biológico a *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, que es una cianobacteria filamentosa importante, por ser constructora principal de las comunidades microbianas marinas conocidas como tapetes microbianos laminados. Esta cianobacteria se encuentra representada de manera importante en las comunidades microbianas de los manglares y es de suma importancia en la incorporación de nitrógeno atmosférico al ecosistema de manglar (Toledo, 1995) ya que realiza la fijación de este elemento bajo condiciones aerobias (Malin y Pearson, 1988) por lo que se ha comprobado que durante este evento se ven activados algunos mecanismos antioxidantes para evitar que el complejo nitrogenasa sufra daño oxidativo producido por EOR (Canini *et al.*, 1992).

El estudio del efecto de estos factores nos ayudará a comprender los mecanismos por medio de los cuales *M. chthonoplastes* adapta a condiciones ambientales extremas *in vitro* tales como la salinidad e intensidad luminosa. Dada la capacidad de *M. chthonoplastes* de crecer en un amplio intervalo de condiciones ambientales tales como salinidad (Karsten, 1996) e intensidad luminosa, es importante conocer los mecanismos que regulan esta capacidad al ser la cianobacteria dominante más importante de ambientes tanto marinos como dulceacuícolas.

Considerando lo anterior, se requiere estudiar las condiciones bajo las cuales se incrementa la actividad tipo SOD y POD, bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo; en este

estudio, utilizamos diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, paraquat, oxígeno, diferentes concentraciones de NaCl y la exposición a elevadas intensidades luminosas, para observar este fenómeno. La utilización de estos compuestos para la generación de EOR es ampliamente usada en organismos fototróficos como se observa en la Tabla 2.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general:

El propósito de este trabajo es conocer el comportamiento de la actividad enzimática tipo SOD y POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 bajo estrés oxidativo. Se estudiaron también algunas técnicas para la extracción de estas enzimas.

Objetivos particulares:

- 1) Conocer el efecto del peróxido de hidrógeno exógeno, paraquat y oxígeno sobre la actividad de las enzimas SOD y POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.
- 2) Observar los efectos de la salinidad e intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.
- 3) Definir las condiciones de permeabilización y rompimiento celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 bajo las cuales se extrae la mayor cantidad de actividad enzimática tipo SOD y POD.

V. MATERIALES Y METODOS.

Las sustancias químicas utilizadas fueron adquiridas en Sigma Co. (St, Louis Mo. E.E.U.U.) y fueron de pureza analítica.

1. Soluciones amortiguadoras.

Se prepararon las siguientes soluciones para utilizarse tanto en el proceso de extracción como de separación de las enzimas SOD y POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Tabla 3. Soluciones amortiguadoras.

Designación	Composición	pH
BP ₁	50 mM de KH ₂ PO ₄ - K ₂ HPO ₄	7
BP ₂	"	7.8
BP ₃	BP ₁ + 0.5 mM de ascorbato + 0.1 mM de EDTA	7
BT ₁	50 mM de Tris-HCl + 0.8 ml de glicerol + 0.2 ml de azul de Bromofenol al 0.05% + 4 ml de H ₂ O	6.8
BT ₂	0.12 M de Tris + 0.95 M de glicina	8.3
TE	Tris 10 mM + EDTA 1 mM	8

2. Evaluación de la producción de las enzimas SOD y POD durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Cinéticas de crecimiento.

Para la realización de las cinéticas de crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 fué necesario definir el tamaño del inóculo (expresado en mg de clorofila *a*/ml de cultivo) utilizado en cada una de ellas. La realización de la curva tipo consistió en tomar una alícuota de la fase de crecimiento exponencial y realizar cinco diluciones a las cuales se les extrajo la clorofila *a*, para conocer la correspondencia entre absorbancia y clorofila *a* por medio de una regresión lineal.

Condiciones de cultivo.

El cultivo se realizó en lote por triplicado en frascos de 50 ml de capacidad conteniendo 16 ml de cultivo ASN-III y un inóculo de 4 ml de suspensión celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 a una densidad de 0.274 unidades de absorbancia a 665 nm.

Se cultivó a *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 por espacio de 18 días a una intensidad luminosa de $\sim 12 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (medido con un radiómetro/fotómetro LI-COR modelo 188B, Li-Cor, Inc., Lincoln, Nebraska, U.S.A.), en agitación constante a 100 rpm en un agitador diseñado por el CIB-NOR (La Paz, México) a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en el medio ASN-III (Waterbury y Stanier, 1981) (anexo I).

Se tomaron tres matraces cada tercer día homogenizando los 20 ml de suspensión celular en un vortex VWR Scientific Industries, (Bohemia, N.Y., E.E.U.U.) durante 1 minuto. A partir del día 6 de cultivo la homogenización se llevó a cabo con un homogenizador de tejidos CAFRAMO RZR1 (Warton, Ontario, Canadá) debido a la agregación de los filamentos entre sí. Se dividió en dos el contenido de cada matraz para analizar por un lado el contenido de clorofila α , y por otro el contenido de proteínas totales y actividad SOD y POD.

La fracción destinada para la cuantificación de clorofila α , fué centrifugada a 15,000 rpm en una microcentrífuga Microfuge E, BECKMAN (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) a 5°C y el sedimento obtenido se resuspendió en metanol al 90% e inmediatamente, se rompieron las células. El homogenizado se centrifugó en las mismas condiciones arriba mencionadas y del sobrenadante se midió la cantidad de clorofila α , a una longitud de onda de 665 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU-640, (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) mediante la expresión $\text{D.O.} \times 13.9 = \mu\text{g de clorofila } \alpha/\text{ml}$ (Tandeau de Marsac *et al.*, 1988).

Para la cuantificación de proteínas, se centrifugó la fracción número dos a 15,000 rpm en una Microfuge E, BECKMAN (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) y se lavó con amortiguador de fosfatos (BP_1); el paquete celular fué resuspendido en el mismo amortiguador más ascorbato a una concentración final de 0.5 mM para posteriormente romper las células por ultrasonido en un

aparato COLE PARMER 4710 (Chicago, Illinois, E.E.U.U.) a 20 W de potencia durante tres intervalos de 30 segundos c/u. Una vez lisadas las células, se centrifugó y colectó nuevamente el sobrenadante para dializarlo en bolsa de celofán SPECTRA/POR (L.A., E.E.U.U.) con un límite de exclusión molecular de 10-14,000 daltons, contra BP₁ a 4 °C durante 12 h, y la cuantificación de proteínas se realizó con la técnica de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La cuantificación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a las técnicas descritas en el anexo II.

Para conocer el sustrato utilizado por la POD presente en el extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, se ensayaron diferentes donadores de electrones tales como el glutatión, el guaiacol, la O-dianisidina y el ascorbato.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó de la siguiente forma: se tomaron alícuotas de 500 µl de cultivo de *M. chthonoplastes*, se concentraron los filamentos por centrifugación a 10,000 x g, durante 15 min a 5 °C. El sedimento fué resuspendido en 200 µl de TE y 200 µl de la mezcla fenol: 25, cloroformo: 24, alcohol isoamílico: 1. Se rompieron las células durante 3 intervalos de 30 seg en frío (5 °C) y a 20 W de potencia. Se centrifugó la muestra y del sobrenadante se precipitaron los ácidos nucleicos con 1 ml de etanol frío (-20 °C), una vez obtenidos los ácidos nucleicos, se centrifugaron a 10,000 x g, durante 10 min. El sedimento fué resuspendido en 50 µl de TE, diluidos 1:100 con el mismo amortiguador y leídos en el espectrofotómetro Beckman, DU-640 de acuerdo a Warbur y Christian (1942).

De igual forma, se realizaron ensayos para corroborar con la literatura consultada la inexistencia de la enzima CAT en *M. chthonoplastes* por medio de espectrofotometría (anexo II) y por electroforesis, usándose como controles positivos catalasa SIGMA (St, Louis Mo. E.E.U.U.) de hígado de bovino y un extracto de *E. coli* cepa DH-5-α (Sambrook *et al.*, 1989).

3. Efecto del Paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno sobre la actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Se cultivó a *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en medio ASN-III bajo las condiciones anteriormente descritas hasta el noveno día, donde se presenta la mayor cantidad de actividad

enzimática tipo SOD y POD. Se tomaron alícuotas de 10 ml por triplicado en frascos de 40 ml con tapón de algodón y a cada una se les adicionó 10, 100, 1000 ó 1500 μM de PQ y a otras 10, 100, 1000 ó 1500 μM de H_2O_2 ; finalmente, otras tres muestras se sometieron a 0, 20 y 100% de oxígeno. Cada uno de los tratamientos fueron llevados a cabo por seis horas en un agitador a 100 rpm bajo una lámpara de luz blanca fluorescente a una intensidad luminosa de $\sim 12 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, que fué medida con un radiómetro/fotómetro LI-COR 188B; tres réplicas fueron retiradas cada dos horas de incubación. Como control se utilizó la cepa crecida en ASN-III bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura pero sin los agentes oxidantes. Para obtener un ambiente anaerobio, las muestras fueron incubadas en una cámara bajo un ambiente de CO_2 (generado mediante la combinación de borohidruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido cítrico y agua) con un sistema BBL GAS PAK, MERCK. Se consideró como 100% de oxígeno a las muestras tratadas con un burbujeo constante de oxígeno comprimido.

Para asegurar que después de la anaerobiosis no se sintetizaran cantidades importantes de proteína, en nuestro caso la SOD y la AsA-POD, de acuerdo a Schiavone y Hassan, (1987), se adicionaron 150 mg/ml de cloranfenicol a los cultivos. Una vez transcurridas los periodos de incubación, las células se concentraron en una centrifuga BECKMAN J2-MC, (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) a $10,000 \times g$, 4°C y se lavaron con 3 ml de BP_1 conteniendo 0.5 mM de ascorbato para mantener la actividad AsA-POD y 0.1 mM de EDTA como inhibidor de proteasas.

El paquete celular se resuspendió en 3 ml de BP_3 en viales de vidrio de 15 ml de volumen y las células fueron rotas por sonicación a 40 W en un aparato COLE PARMER 4710 (Chicago, Illinois, E.E.U.U.), durante 30 s, a 4°C . La suspensión se centrifugó a $10,000 \times g$, 4°C y el sobrenadante se dializó contra BP_3 durante 12 horas, a 4°C ; el contenido de proteína se midió por el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar y la actividad SOD y AsA-POD se detectó con los métodos descritos en el anexo II.

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa STATGRAPHICS versión 5.1 (1991) usando ANDEVA de una vía y multifactorial.

4. Efecto de la salinidad (NaCl) e intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Condiciones de cultivo.

El experimento concerniente al efecto de la salinidad se llevó a cabo con células de *M. chthonoplastes* crecidas a la mitad de su fase logarítmica en matraces de 1 l con 210 ml de medio ASN-III (Waterbury y Stanier, 1981) variando la concentración de NaCl a 2.5, 4.0, 8.0 y 12.0 %. Los cultivos fueron agitados constantemente a 100 rpm con una temperatura de ~25 °C controlada con un aire acondicionado integral ajustado a esa temperatura y a una intensidad luminosa de 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada dos días fueron tomadas las muestras por triplicado para medir el contenido de clorofila *a* de acuerdo a Tandeau de Marsac *et al.*, (1988), contenido de proteína (Bradford, 1976), ácidos nucleicos por medio de la técnica modificada de Hoffman y Winston, (1987) y la actividad enzimática SOD (McCord y Fridovich, 1969) y AsA-POD (Nakano y Asada, 1981), bajo condiciones estériles.

Para conocer el efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD, se midió esta actividad enzimática a lo largo de un día, con sus respectivas horas de luz y oscuridad. El cultivo se llevó a cabo en un matríz de 1 l de capacidad con 230 ml de ASN-III, agitado con un agitador magnético VORTEX y la temperatura regulada por medio del flujo continuo de agua de un tinaco. Las mediciones de clorofila *a* (Tandeau de Marsac *et al.*, 1988), proteína (Bradford, 1976) y actividad SOD (McCord y Fridovich, 1969) y AsA-POD (Nakano y Asada, 1981) fueron tomadas por triplicado cada tres h de las 0:00 h hasta las 21:00 h del mismo día, bajo condiciones estériles. En cada toma de muestras, se midió la temperatura con un termómetro digital y la intensidad luminosa con un radiómetro/fotómetro LI-COR 188B.

Bajo las diferentes concentraciones de NaCl se calculó la constante de crecimiento formando una línea recta de por lo menos tres puntos en la fase de crecimiento exponencial de *M. chthonoplastes* y utilizando la siguiente expresión de acuerdo a Brock (1979):

$$\text{Constante de crecimiento } K = (\log_{10} t_x - \log_{10} t_o) / (0.301) t$$

La constante de crecimiento es expresada como el número de replicaciones por unidad de tiempo, donde t_x es el parámetro medible en el tiempo final (por lo menos 3 puntos de la curva de crecimiento) y t_0 es el parámetro medible en el tiempo "cero"; t es el tiempo transcurrido desde t_x a t_0 expresado en horas o minutos.

Las curvas de crecimiento de *M. chthonoplastes* expresadas por el contenido de clorofila a , fueron ajustadas al modelo logístico según el modelo $N_e = 1 / (1 + e^a \times e^{-rt})$, para calcular el valor máximo de saturación bajo cada concentración de sal, en el paquete estadístico STATISTICA versión 6.0 (1996).

5. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Obtención de esferoplastos.

Para obtener esferoplastos, se utilizaron 5 mg de lisozima/ml (enzima proveniente de clara de huevo de gallina) de cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 (33.3 mg de peso seco de filamentos) y se incubó por 30 min., a 37 °C. en una incubadora VWR (Bohemia, N.Y. E.E.U.U.) (Canini *et al.*, 1991). Transcurrido el tiempo, se observó a través de un microscopio NIKON OPTIPHOT-2 (Japón) para asegurar la obtención de los esferoplastos y, posteriormente, se lavaron las células con BP₃ por centrifugación a 10,000 x g, durante 10 min, a 5 °C en una centrífuga BECKMAN J2-MC, (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) y el sobrenadante fué resuspendido en BP₃ seguido de la ruptura celular por ultrasonido a una intensidad de 20 W durante los tiempos de 10, 30, 90, y 150 s. Una vez rotas las células se procedió a cuantificar la proteína extraída con la técnica de Lowry *et al.* (1951), la actividad de la SOD con la técnica de inhibición de reducción del NBT y la actividad AsA-POD con la técnica descrita en el anexo II. Aunado a la actividad enzimática, se realizaron barridos espectrofotométricos a los extractos en el intervalo de 200 a 800 nm para medir la liberación de moléculas que nos pudieran estar indicando el grado de ruptura celular, tales como las proteínas que absorben en la región de los 280 nm y la ficocianina en los 620 nm.

Ruptura celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 utilizando balística (perlas de vidrio) y ultrasonido.

Se creció a la cepa a la mitad de la fase logarítmica (6 días) hasta una densidad óptica de 0.565 a 665 nm. Para probar la eficiencia del rompimiento por ultrasonido se tomaron tres alícuotas equivalentes a 33.3 mg de peso seco de filamentos, se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min en una centrífuga BECKMAN J2-MC, (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) lavándose tres veces con BP₃; el sedimento final se resuspendió en 500 µl de BP₃ y se expusieron a 20 W, 4 °C, durante 10, 30, 90 y 150 s. Se centrifugaron las muestras y del sobrenadante obtenido se cuantificó la proteína extraída (Lowry *et al.*, 1951) y la actividad enzimática (ver anexo II). Para balística se tomaron otras tres alícuotas de filamentos equivalentes a 33.3 mg de peso seco; se lavaron y concentraron por centrifugación en las mismas condiciones arriba mencionadas. El sedimento obtenido, se resuspendió en 250 µl de BP₃ y 238 mg de perlas de vidrio (relación recomendada 1:1 vol/vol) (com. pers. Sánchez, 1995) y se sometieron a rompimiento por agitación en vortex GENIE 2 VWR (Bohemia, N.Y. E.E.U.U.) durante 5, 10 y 15 min, a 5 °C. Se centrifugó a 10,000 x g en una Microfuge E, BECKMAN (Palo Alto, CA. E.E.U.U.) a 5 °C durante 10 min y del sobrenadante se cuantificó el contenido de proteína extraída (Lowry *et al.*, 1951) y actividad enzimática (ver anexo II). Al igual que los extractos de los esferoplastos, se realizaron barridos espectrofotométricos a los obtenidos por sonicación en el mismo intervalo de longitud de onda.

6. Evidenciación de las enzimas SOD, AsA-POD y CAT de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes).

Preparación de las muestras.

De un cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 crecido hasta el noveno día, se tomaron 10 ml para concentrarlos y lavarlos con BP₃ por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min y 5 °C. El sedimento se resuspendió en 1 ml del mismo BP₃ para lisar las células por ultrasonido en un sonicador COLE PARMER 4710 (Chicago, Illinois, E.E.U.U.) a 40 W, por 3 intervalos de 15 segundos y 1 minuto de reposo en 4 °C. El homogenizado se concentró por

centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos en una Microfuge E, BECKMAN (Palo Alto, CA, E.E.U.U.) a 4 °C y la muestra se resuspendió en BT₁.

Los estándares de las enzimas comerciales (Sigma Co. St, Louis Mo. E.E.U.U.) fueron siempre de pureza analítica. La SOD-Fe de *E. coli*, la peroxidasa de rábano y para la tinción negativa para CAT se utilizó un extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α (lac -) y una catalasa aislada de hígado de bovino.

Las muestras se diluyeron en la proporción 1:4 veces en esta solución y se aplicaron 40 μ g de proteína total a cada carril del gel.

El corrimiento de electroforésis fué llevado a cabo bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes), utilizando 2 geles al 7.5 % de poliacrilamida a temperatura ambiente por espacio de 3 h, en una cámara MINIPROTEAN II CELL de BIO-RAD (CA, E.E.U.U.) y utilizando como solución de corrimiento BT₂ según Laemmli (1970). Una vez que se corrieron las muestras, un gel se tiñó con azul de Coomassie para revelar las bandas de proteína y en el otro se detectó la presencia de las enzimas con tinciones específicas para cada una con los siguientes procedimientos:

Tinción negativa en gel para actividad SOD.

Una vez terminado el corrimiento de electroforésis, se sumergió el gel en 15 ml de una solución compuesta por 0.3 mM de NBT y 0.26 mM de riboflavina durante 20 min. en la oscuridad; transcurrido el tiempo se desechó la solución y se agregaron 15 ml de 0.086 M de TEMED durante 20 min, se eliminaron los reactivos y se expuso a una fuente de luz blanca uniforme hasta observar zonas incoloras donde se encuentra la(s) banda(s) de SOD en el gel (Flohé y Oting, 1984).

Tinción negativa en gel para actividad AsA-POD.

Terminada la electroforésis, se incubó el gel en BP₁ conteniendo 2 mM de ascorbato durante 30 min.; el amortiguador se cambió por otro fresco cada 10 min. Una vez terminado este lapso, se incubó nuevamente en BP₁ ahora con 4 mM de ascorbato y 2 mM de H₂O₂ durante 20

min. Se desechó la solución y se lavó con BP₁ durante 1 min.; después se sumergió en BP₁ conteniendo 0.086 M de TEMED y 2.45 mM de NBT, se agitó hasta que el gel se tornó oscuro y aparecieron zonas incoloras donde se localiza la banda de la AsA-POD (Mittler *et al.*, 1993).

Tinción negativa en gel para actividad CAT.

Terminada la electroforésis, se sumerge el gel en una solución de BP₁ conteniendo 10 U/ml de peroxidasa y 4 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina, se incubó el gel por espacio de 45 min. a temperatura ambiente y en la oscuridad. Concluido el tiempo, se lavó con agua destilada y se resuspendió en una solución de BP₁ conteniendo 20 mM de H₂O₂ y se agitó hasta que aparecieron bandas incoloras de la CAT en un fondo color café oscuro (Manchenko, 1994).

VI. RESULTADOS.

Curva tipo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Con el propósito de obtener muestras homogéneas de los cultivos de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, se obtuvo una relación entre la absorbancia del cultivo y el contenido de clorofila *a* (Fig. 5).

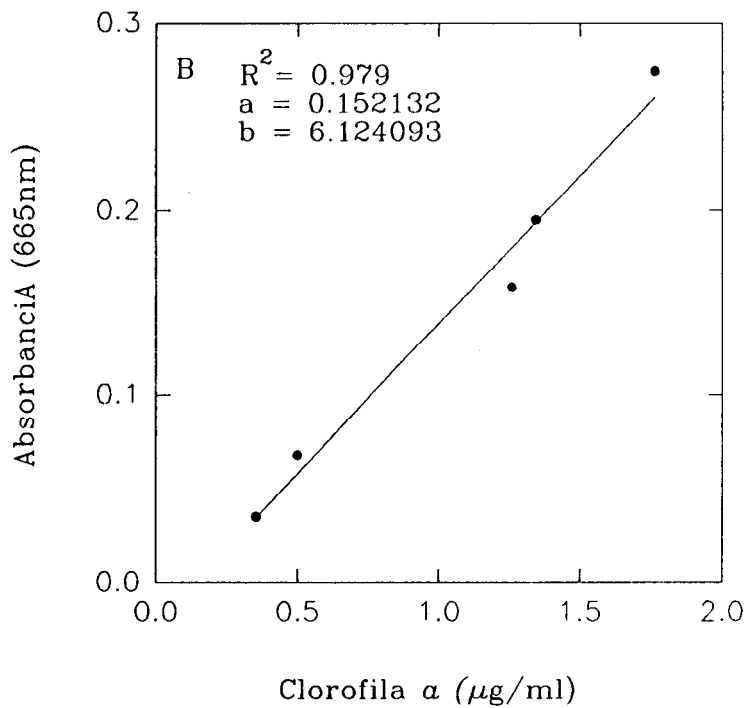


Fig. 5. Relación de la absorbancia a 665 nm con el contenido de clorofila *a* de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 crecida a la mitad de su fase logarítmica.

1. Evaluación de la actividad POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La POD de *M. chthonoplastes* reaccionó únicamente con el ascorbato como donador de electrones y no así con glutatión, O-dianisidina y guaiacol; por lo que en lo sucesivo, los ensayos enzimáticos para la actividad peroxidásica de la cepa SC7B9002-1, se hicieron siempre para la ascorbato peroxidasa (AsA-POD).

La enzima catalasa no fué detectada en la cepa SC7B9002-1 mediante el ensayo en tubo (anexo II) ni en gel de poliacrilamida (Fig. 21) sin embargo, para *E. coli* cepa DH5- α , que fué utilizada como control positivo y una catalasa comercial aislada de hígado de bovino (SIGMA, Chem. Co.) muestran una actividad total de 2,652 y 25,000 U/mg respectivamente, y se evidencia claramente esta actividad enzimática en el gel (Fig. 21).

2. Crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Se inocularon 4 ml de suspensión celular en cada frasco, equivalentes a 1.76 μg de clorofila *a*/ml de cultivo (7.024 μg totales de clorofila *a*) (ver materiales y métodos). Los resultados que se ilustran en la Fig. 6, muestran un típico crecimiento bacteriano con su respectiva fase de adaptación, de crecimiento exponencial, estacionaria y aquella donde declina la población bacteriana. De la misma manera, se muestra que la actividad SOD y AsA-POD declinan con respecto al tiempo de cultivo (Fig. 6B) como fué demostrado previamente (Borrachino *et al.*, 1994).

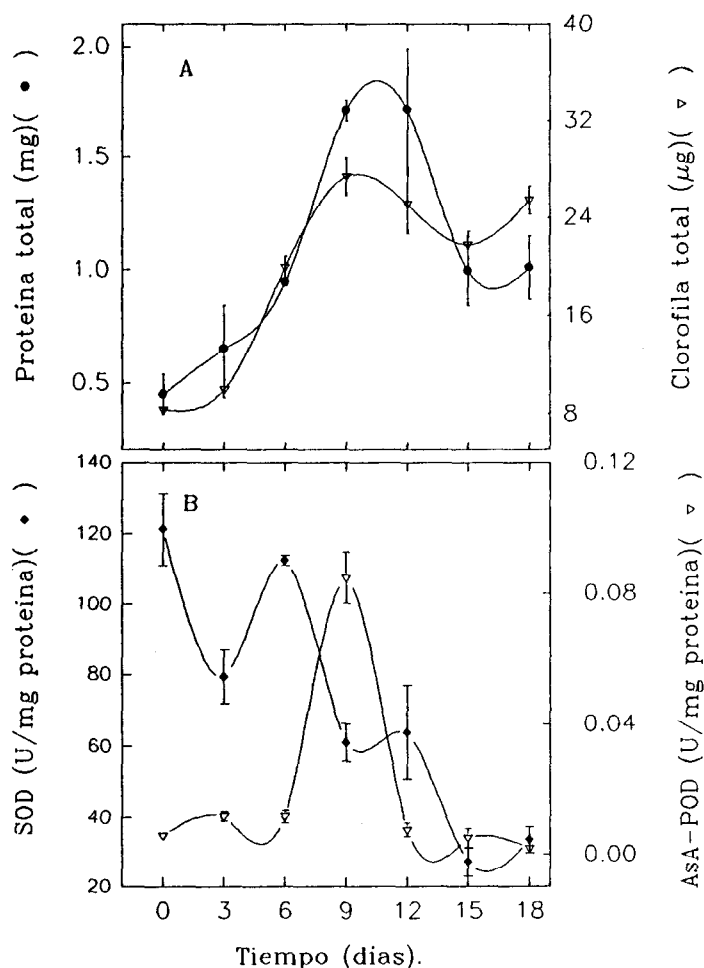


Fig. 6. (A) Cinética de crecimiento y (B) actividad enzimática durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Las barras significan desviación estándar de tres réplicas.

3. Efecto del paraquat sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Al parecer, la adición de paraquat causó únicamente un efecto notorio en la obtención de proteínas totales, cuando éste se administró a la más baja concentración (Fig. 7A). La SOD muestra una respuesta significativa al PQ a las 2 h de incubación bajo las dos concentraciones más altas (Fig. 7B). Por otro lado, la actividad AsA-POD se vió incrementada significativamente con respecto al control, cuando *M. chthonoplastes* fué expuesto a cualquiera de las concentraciones probadas (Fig. 7C).

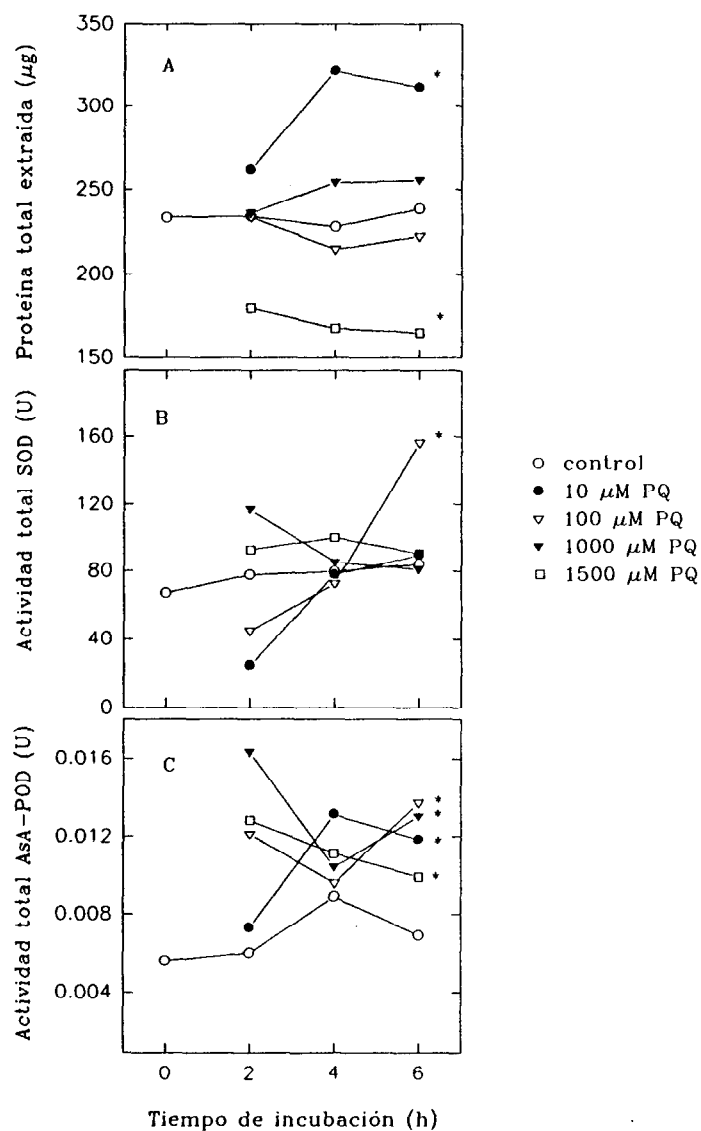


Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de paraquat sobre el contenido total de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. * Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

4. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

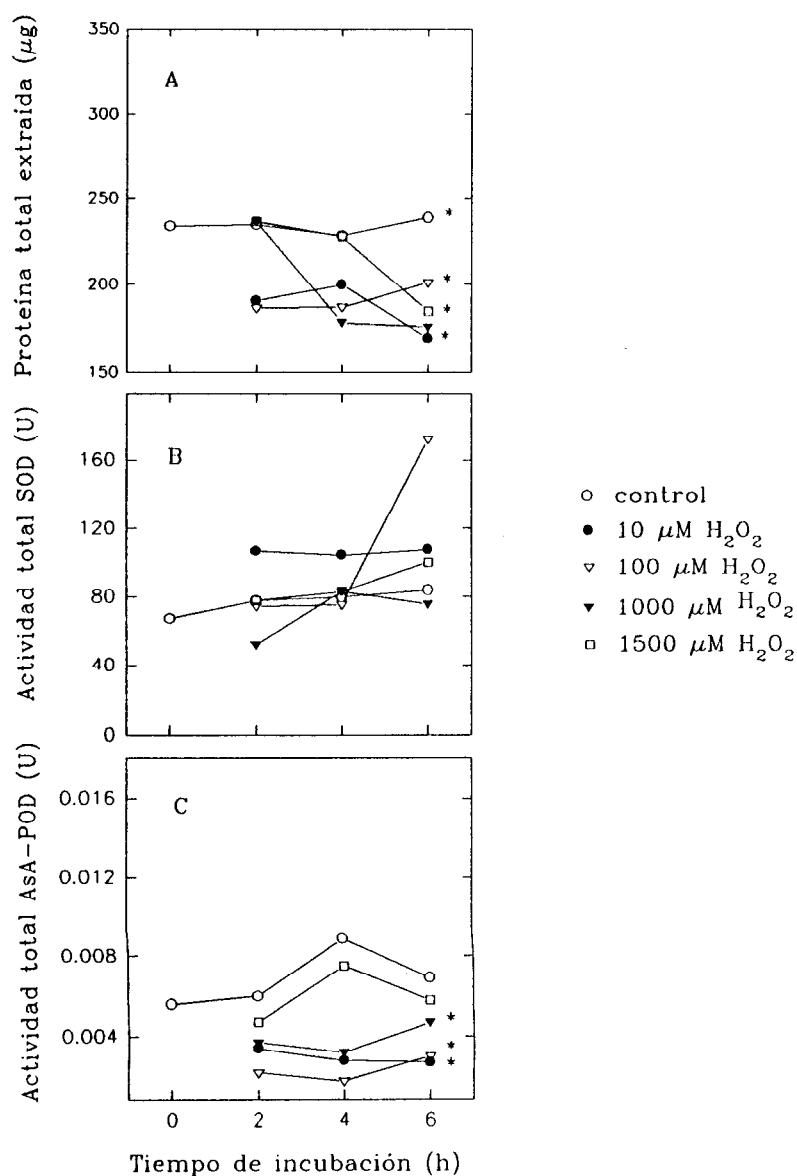


Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre el contenido total de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.* Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

La adición de peróxido de hidrógeno exógeno, muestra una clara influencia sobre el contenido de proteína total y de actividad AsA-POD de *M. chthonoplasates* cepa SC7B9002-1, al decrecer de manera significativa con respecto al control (Fig. 8). Sin embargo, 10 μ M de peróxido de hidrógeno induce un incremento significativo en la actividad SOD a lo largo del experimento con respecto al control (Fig. 8B).

5. Efecto del oxígeno sobre el contenido de proteínas y actividad de la SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

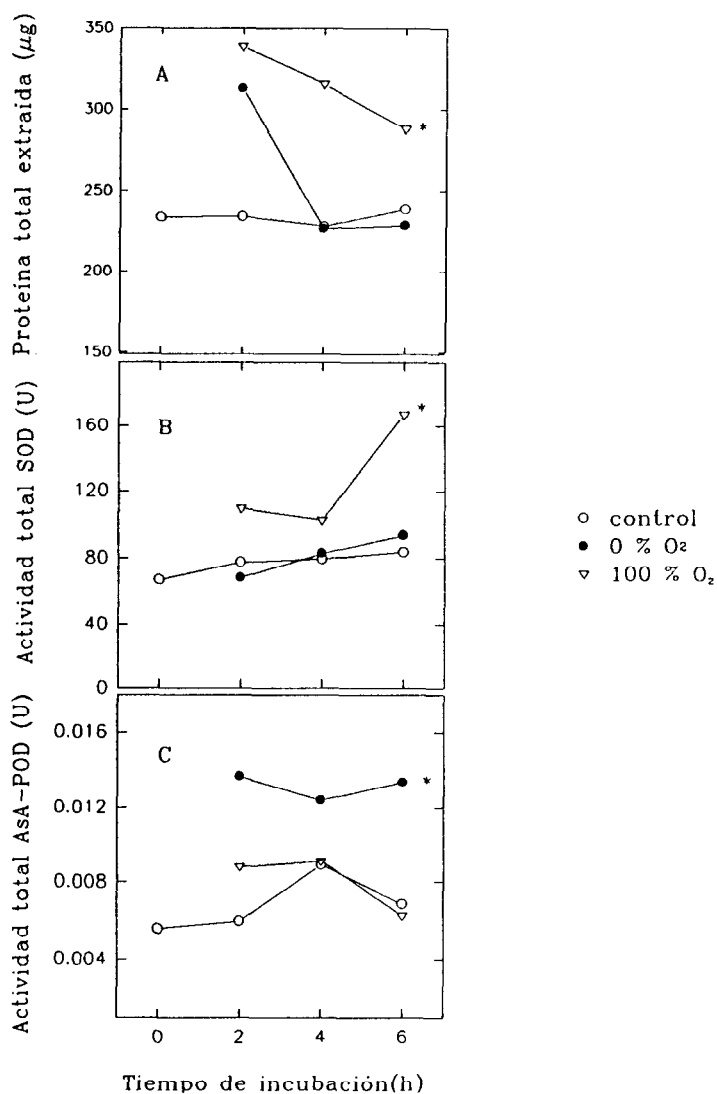


Fig 9. Efecto de diferentes concentraciones de oxígeno sobre el contenido de proteína (A), actividad total SOD (B) y AsA-POD (C) de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.* Datos con un P<0.05. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones.

La presencia de oxígeno sobre los cultivos de *M. chthonoplastes*, produce cambios significativos en la cantidad de proteína extraída y en la actividad SOD y AsA-POD, como se ve en la Fig. 9. Hay que hacer notar que un cambio interesante lo constituye el incremento de actividad AsA-POD bajo condiciones de anaerobiosis (Fig. 9C).

6. Efecto de la salinidad (NaCl) en la producción y/o actividad SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Las condiciones seleccionadas para extraer la proteína de *Microcoleus chthonoplastes* fueron el uso del ultrasonido a intervalos de 3 pulsos de 30 sec en refrigeración (~5 °C) y a una intensidad de 20 W.

Los valores máximos de clorofila *a* son alcanzados en la concentración de 8 % de NaCl a lo largo de la cinética de crecimiento de *M. chthonoplastes*, siendo éstos más altos entre el día 12 y 14, cuando la cepa entra a la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 10C). Podemos observar que en 8 % de NaCl *M. chthonoplastes*, demuestra una mayor capacidad de soporte bajo esta concentración de sal ya que la curva logística comienza a declinar el día 12 de cultivo, y no así para las otras concentraciones que lo hacen en el día 8 aproximadamente. En ese mismo día de crecimiento, *M. chthonoplastes* presenta un inesperado descenso en el contenido de clorofila *a* en todas las concentraciones de NaCl probadas, para luego presentar un nuevo ascenso entre el día 10 y 14.

Con la obtención de la velocidad específica de crecimiento a cada concentración de sal probada (Tabla 4) se demuestra que a 8 %, de NaCl, se estimula más el crecimiento de *M. chthonoplastes* cuando utilizamos los valores de clorofila *a*, proteína y ácidos nucleicos como parámetros de referencia.

En el caso de la proteína total extraída, el máximo valor obtenido se observa en la concentración de 8 % de NaCl, en el día 14, cuando la cianobacteria entra a su fase estacionaria de crecimiento, siendo igual para las de 2.5 y 4.0 % (Fig 10B). Solamente en la concentración de 12 % de NaCl la fase estacionaria se ve anticipada a los 12 días de cultivo.

La Fig. 11A y B, muestra la cantidad de proteína y ácidos nucleicos obtenidos a lo largo de la cinética de crecimiento de *M. chthonoplastes*. En ella, podemos notar que al igual que con la clorofila a , bajo 8 % de NaCl, se obtienen la mayor cantidad de proteína total alrededor del día 14 de cultivo. Y para los ácidos nucleicos, se presenta un descenso durante el día 8, donde, a diferencia de las demás concentraciones, sólo en la de 12 % de NaCl es significativo. Los valores máximos de ácidos nucleicos extraídos se obtienen en la concentración de 8 % de NaCl, a la cual la mayor velocidad de crecimiento es mayor (Tabla 5).

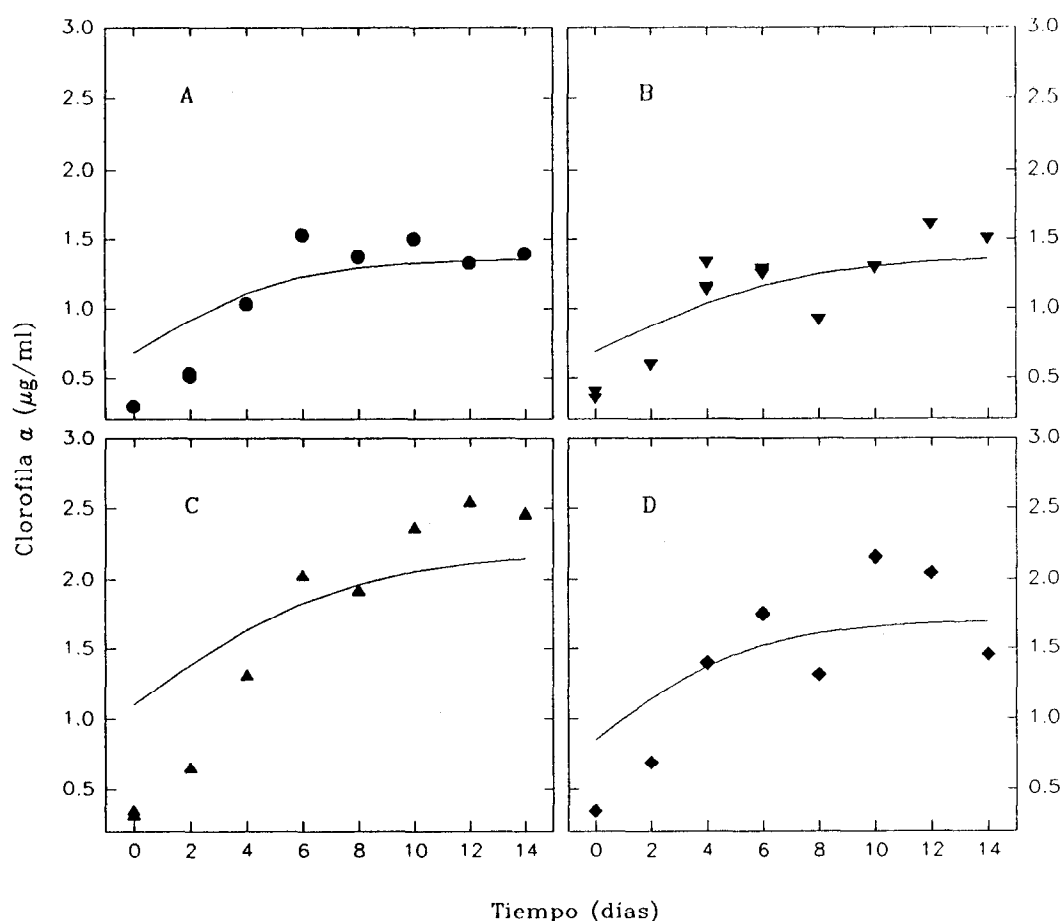


Fig. 10. Efecto del NaCl a 2.5 % (A), 4.0 % (B), 8.0 % (C) y 12 % (D) en el medio de cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 sobre el contenido de clorofila a . Los puntos son los valores observados y las líneas representan el ajuste de los datos al modelo logístico.

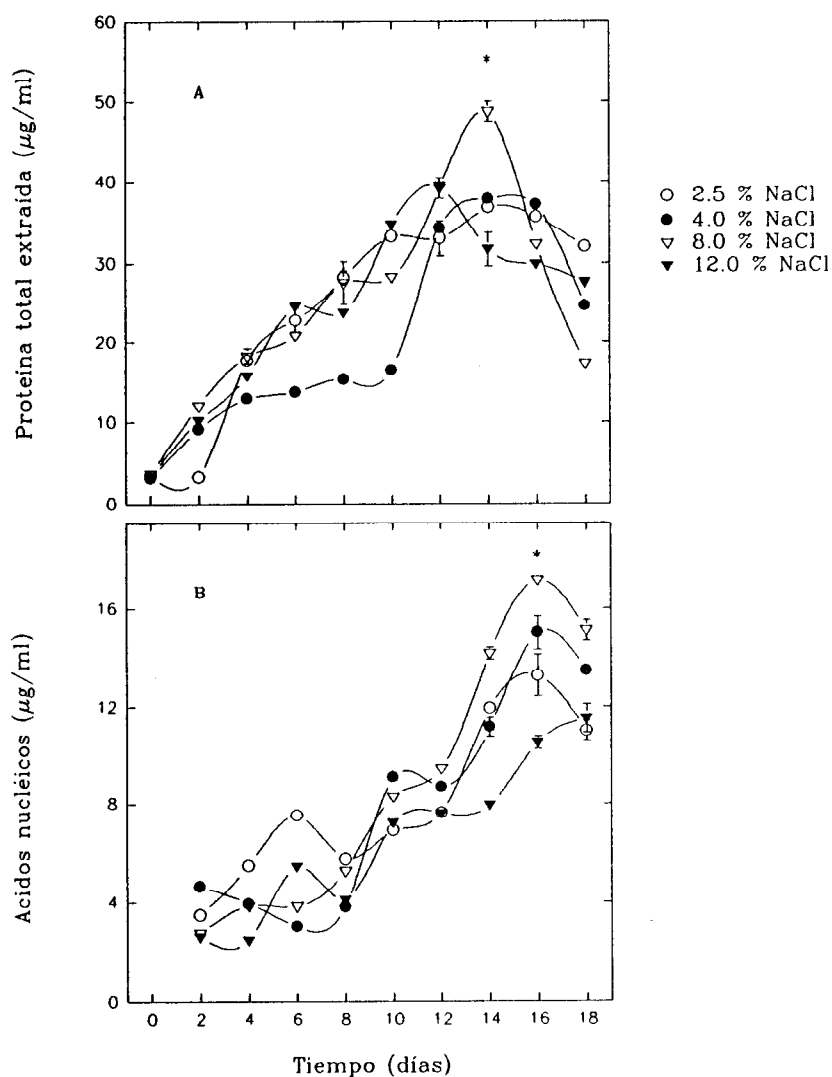


Fig. 11. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en base a la extracción de proteína total (A) y de ácidos nucleicos (B). * Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

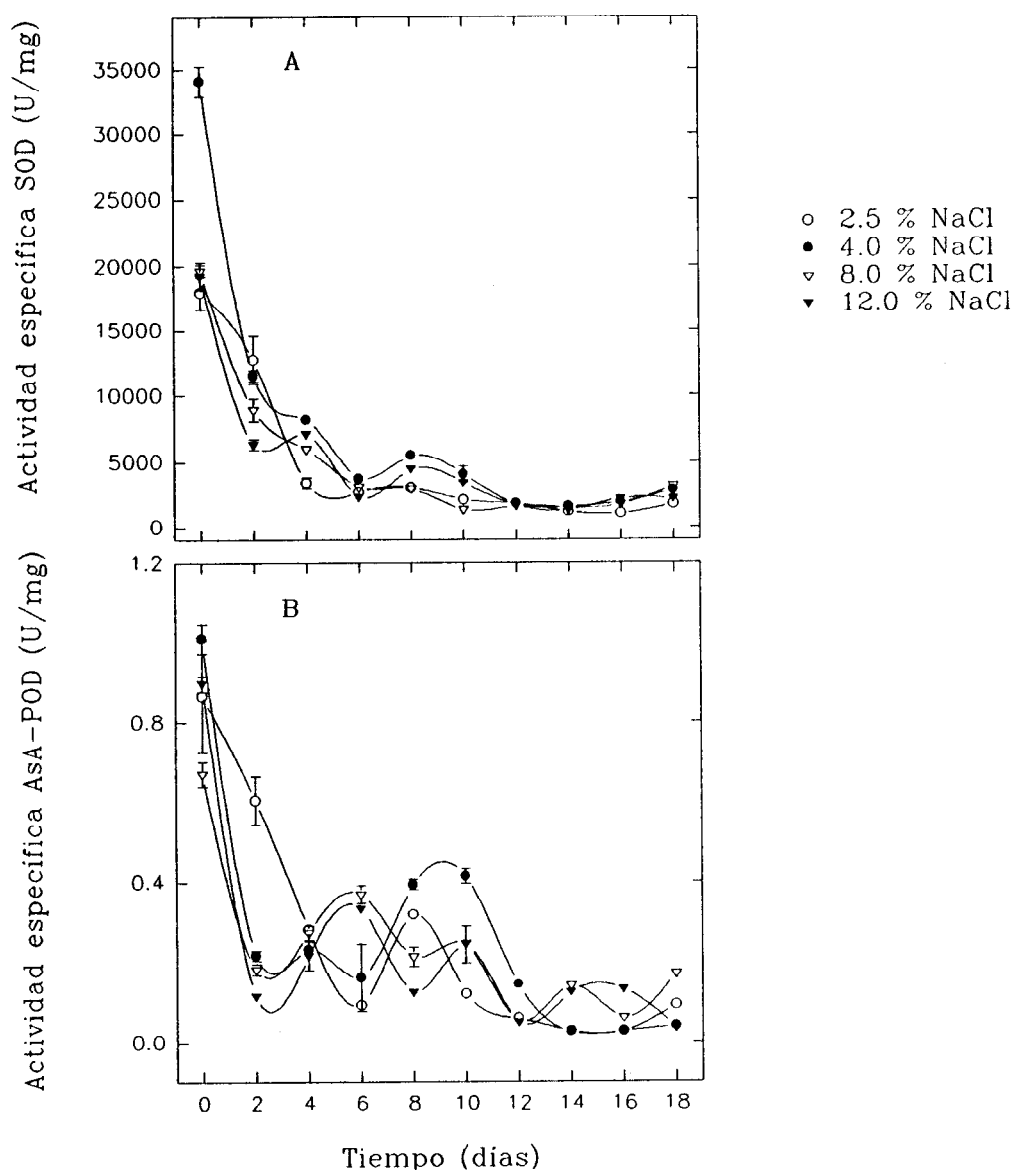


Fig. 12. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 sobre la actividad SOD (A) y AsA-POD (B). * Datos con un $P < 0.05$. Los puntos de cada gráfica son el promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

La Fig. 12A ilustra la actividad SOD en las células cultivadas bajo las diferentes concentraciones de salinidad. En ella podemos observar un claro descenso en la actividad específica (U/mg de prot.) a lo largo del cultivo, independientemente de la concentración de NaCl. Un dato importante es la obtención de un ligero incremento de actividad enzimática en el día 8 de cultivo, coincidente con la disminución de clorofila α y de ácidos nucleicos (Figs. 10A y 11)

Tabla 4. Valores de la constante de crecimiento (K) de *Microcoleus chthonoplastes*, obtenidos de las curvas de clorofila α , proteína y ácidos nucleicos.

Concentración de NaCl	Clorofila α *	Proteína*	Acidos nucleicos*
2.5	0.037	0.013	0.01
4	0.025	0.006	0.018
8	0.039	0.017	0.02
12	0.032	0.017	0.012

* μ g replicados de este componente por hora.

7. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La Fig. 13 muestra las variaciones de temperatura diurna del medio de cultivo, que fué controlada mediante agua corriente de un tinaco. Así mismo, se muestra la variación de la intensidad luminosa durante el mismo ciclo, que muestra los picos máximos al media día.

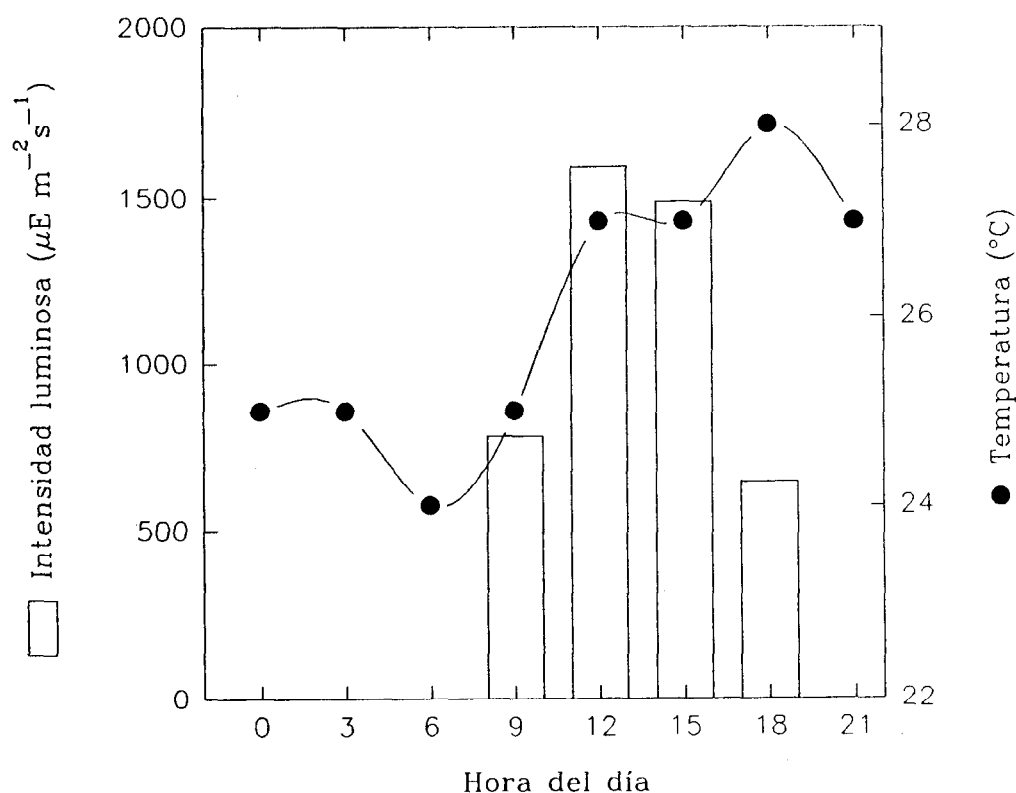


Fig. 13. Oscilación de la temperatura e intensidad luminosa registradas durante el experimento.

Para el caso de la clorofila α , la cantidad se incrementa conforme transcurre el día hasta las 6:00 hs para posteriormente declinar cuando la intensidad luminosa llega a su máximo. Demuestra un clásico comportamiento de fotoblanqueamiento ocasionado por la alta intensidad luminosa alcanzada a las 12 hs del día (Fig. 13).

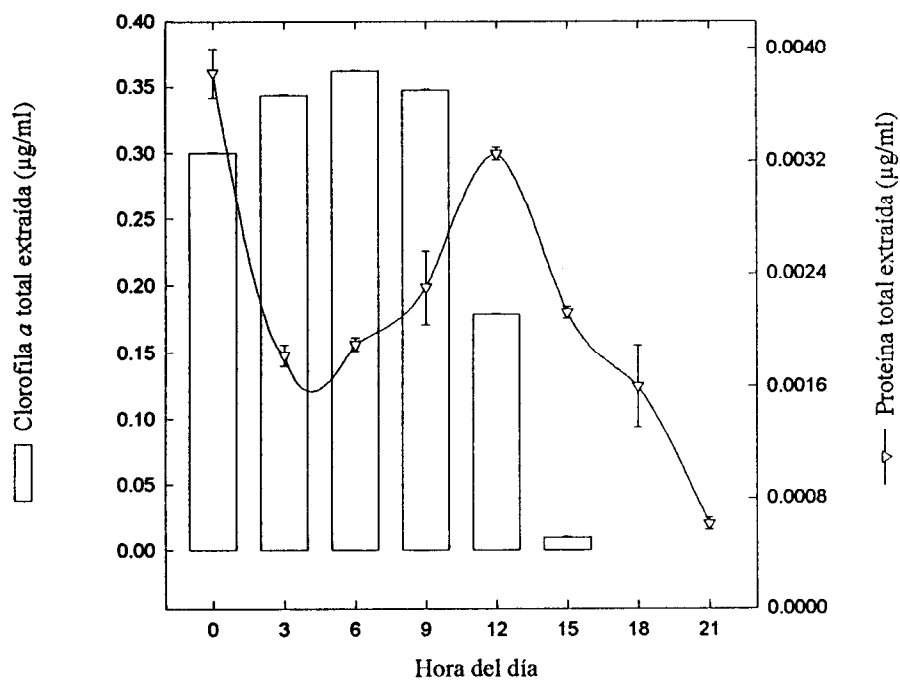


Fig. 14. Efecto de la intensidad luminosa sobre el contenido de clorofila *a* y proteínas de *M. chthonoplastes* cepa SC7B 9002-1. Los puntos son promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

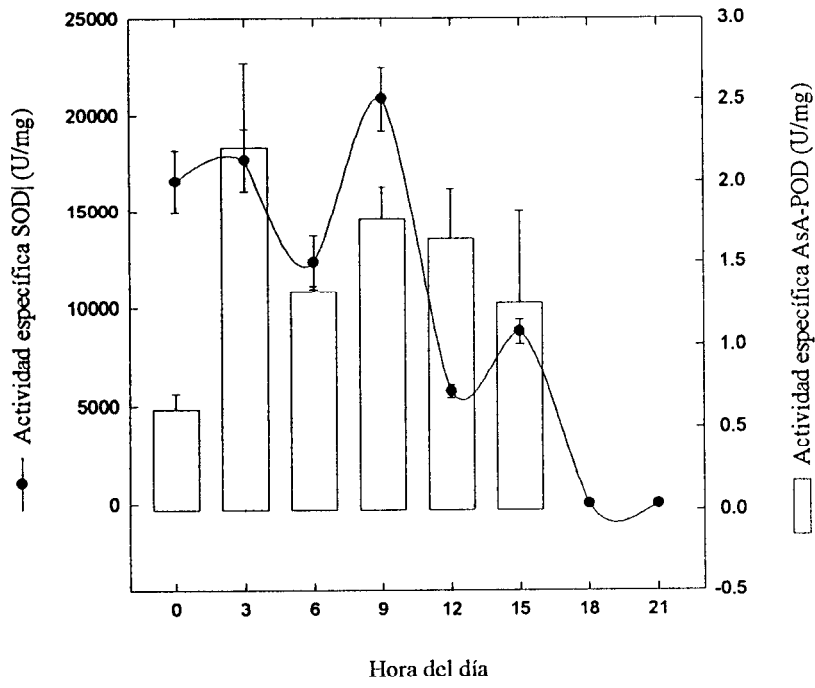


Fig. 15. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Los puntos son promedio de tres mediciones y las barras son su desviación estándar.

En cuanto a la actividad específica de la SOD, se observa una clara disminución a lo largo del día con excepción de un pico máximo presentado a las 9:00 hs y que posteriormente continúa disminuyendo, hasta llegar a cero (Fig. 15).

La actividad AsA-POD registrada durante el día se presenta también en la Fig. 15. El cambio de las condiciones ambientales del inóculo a las experimentales, ocasiona un incremento significativo de la actividad AsA-POD desde las 3:00 hs. Al transcurrir el día, coincidentemente con el incremento de la intensidad luminosa, se observa una clara tendencia a su disminución hasta la inhibición de la actividad AsA-POD.

8. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Obtención de esferoplastos.

La finalidad de generar esferoplastos, es decir, bacterias con la pared celular fragmentada, nos evitaría utilizar condiciones agresivas de rompimiento celular y evitar así la destrucción de la actividad enzimática. Sin embargo, observamos que estas condiciones no se cumplen favorablemente como se ve en la Fig. 16, es decir, se obtiene la misma actividad enzimática de los extractos de células intactas y de esferoplastos.

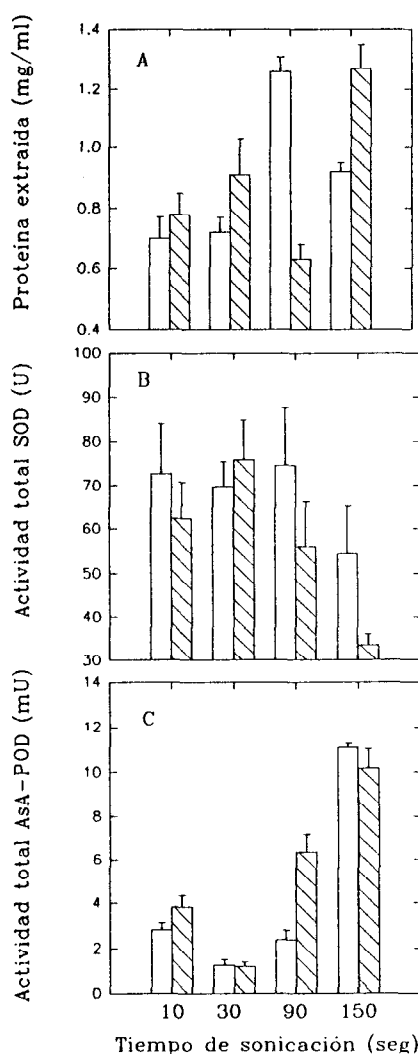


Fig. 16. Eficiencia del rompimiento celular con ultrasonido utilizando esferoplastos (barras lisas) y células intactas (barras con líneas). A) proteína extraída, B) actividad SOD y C) actividad AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Las líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar de tres réplicas.

Al realizar los barridos espectrofotométricos en el intervalo de 200 y 800 nm, podemos observar que los extractos obtenidos con células intactas poseen mayor cantidad de moléculas que absorben a los 280 nm y que se consideran de naturaleza protéica, en relación a los extractos de esferoplastos (Fig. 17A). El mismo comportamiento lo podemos observar con la ficocianina obtenida con células intactas y aquella de esferoplastos (Fig. B).

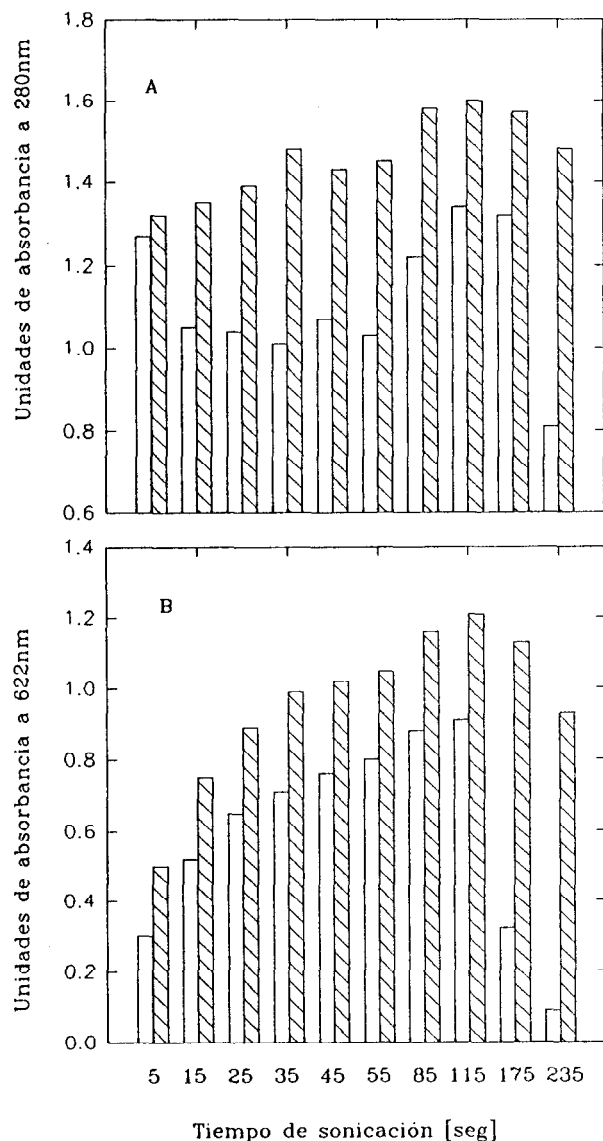


Fig. 17. Lectura espectrofotométrica de los extractos crudos de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 tratados con lisozima (esferoplastos) (barras lisas) y de células intactas (barras con líneas) a longitudes de onda cercanas a 280 y 620 nm. A 280 nm absorben las proteínas que poseen aminoácidos aromáticos como el triptofano y fenilalanina, y, a 620 nm la ficocianina, pigmento proteico constituyente del aparato fotosintético de las cianobacterias.

Ruptura celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 utilizando balística (perlas de cristal) y ultrasonido.

Tabla 5. Rendimiento de la proteína total extraída y actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes*, con el uso de los métodos de extracción basados en balística y ultrasonido.

	t min	Proteína total (mg)	±	SOD Ut	±	AsA-POD mUt	±	Rendimiento (%)*
Balística	5	0.26	0.005	13.74	0.97	2	0.01	0.78
	10	0.28	0.005	21.84	1.11	2.5	0.03	0.84
	15	0.35	0.003	19.37	4.3	4	0.05	1.05
Ultrasonido	t seg							
	10	0.78	0.007	62.41	8.34	3.83	0.52	2.34
	30	0.91	0.01	75.79	9.21	4.33	0.02	2.73
	90	0.63	0.021	56.04	10.31	6.35	0.82	1.89
	150	1.27	0.024	33.5	2.56	10.19	0.86	3.81

* Porcentaje de proteína extraída con respecto al peso de la biomasa utilizada al inicio del rompimiento.

± desviación estándar de tres réplicas.

Las discrepancias en tiempos son debido a la comparación de un método de disrupción establecido para levaduras marinas (Sánchez, 1997) y el utilizado en este trabajo con ultrasonido.

9. Evidenciación de las enzimas SOD, CAT y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas.

El propósito de este experimento fué el poner en evidencia la presencia de las enzimas en *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, mediante electroforésis comparando las bandas de enzimas comerciales con las del extracto crudo de la cepa SC7B9002-1.

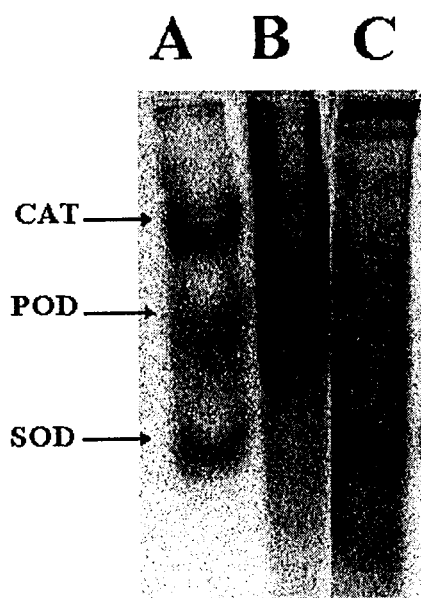


Fig. 18. Electroforésis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas.

A) enzimas comerciales CAT, POD y Fe-SOD, (B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y (C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5 α .

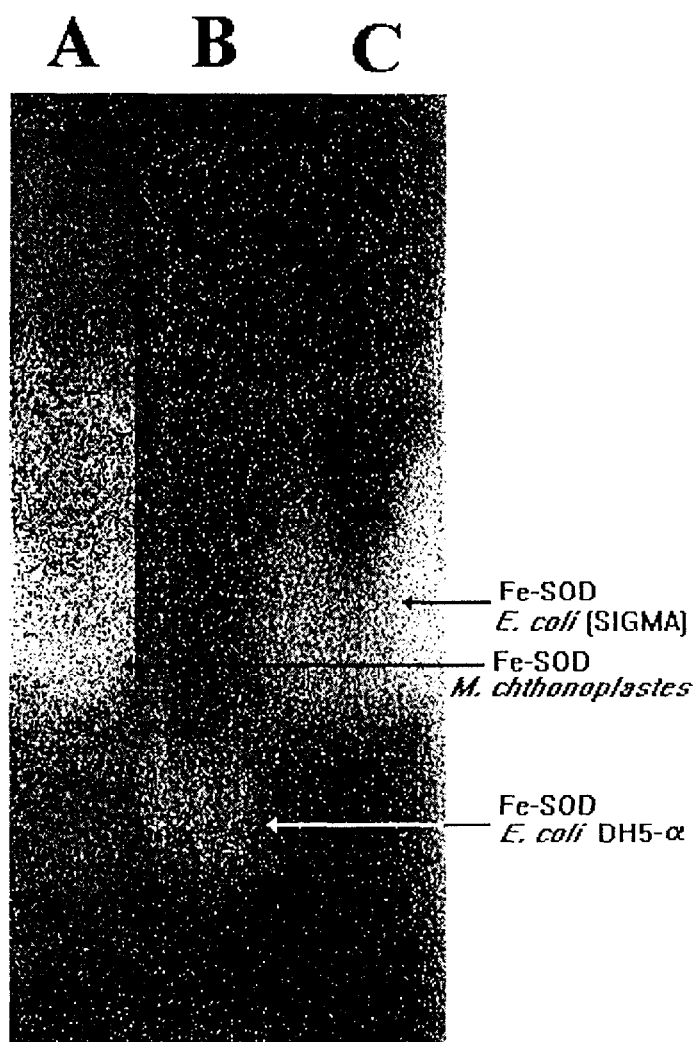


Fig. 19. Gel de poliacrilamida teñido para revelar actividad SOD: A) enzima comercial Fe-SOD con peso molecular de 41.700 kilodaltones, (B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5α.

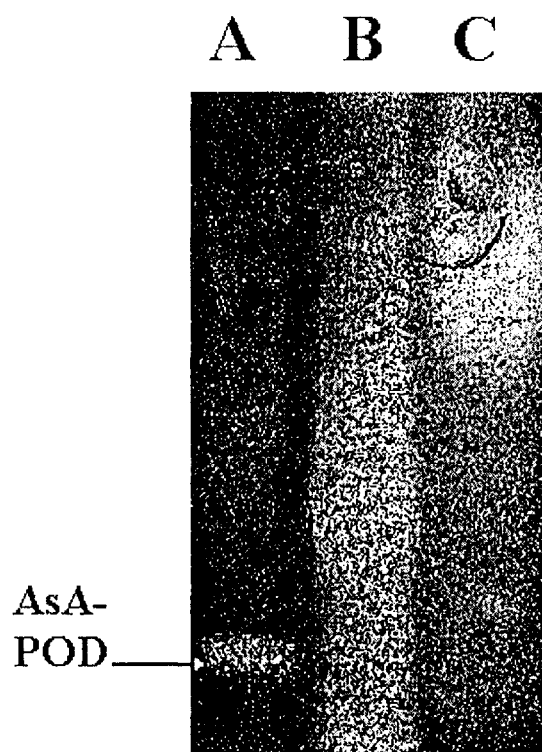


Fig. 20. Gel teñido para revelar actividad AsA-POD. A) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, B) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5- α . y C) POD comercial.

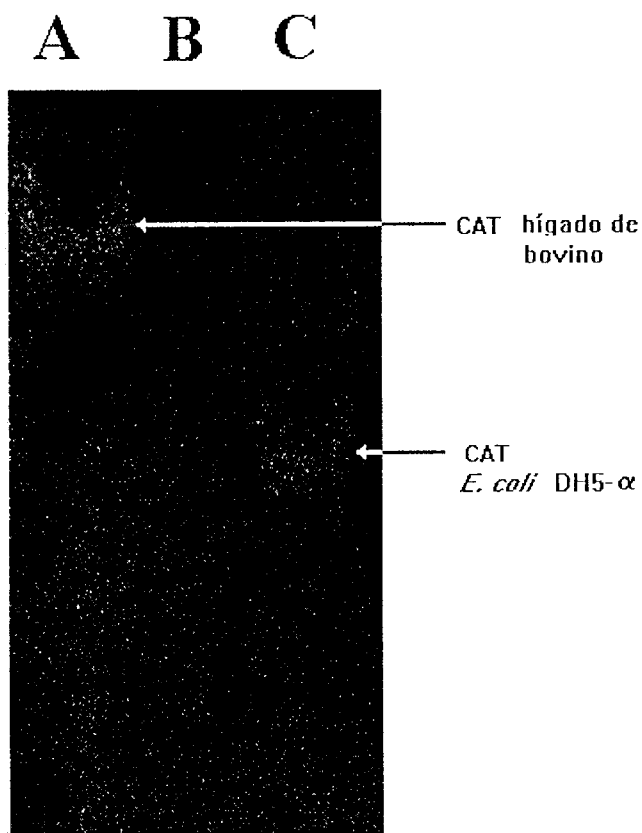


Fig. 21. Gel de poliacrilamida teñido para revelar actividad CAT. A) CAT comercial de hígado de bovino con un peso molecular de 240 kilodaltones, B) extracto crudo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, C) extracto crudo de *E. coli* cepa DH5 α .

VII. DISCUSION.

Cinéticas de crecimiento.

El comportamiento observado en la curva de crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, es similar a la de *M. chthonoplastes* reportado por De Wit y Gernerden (1989). Con respecto a la duración de su fase de crecimiento, la fase logarítmica abarca aproximadamente hasta los nueve días y posteriormente se presenta la fase estacionaria que aparentemente dura dos días; finalmente, se presenta una disminución en el contenido de proteína a partir del día doce de crecimiento (Fig. 6A). En relación a la cantidad de proteína producida, el pico máximo, es ~25 veces menor la cantidad generada por la cepa SC7B9002-1 que la cepa utilizada por De Wit y Gernerden, ya que se desconoce el volumen de cultivo utilizado por estos autores.

Las bacterias cultivadas en lote presentan generalmante una disminución en el contenido de proteínas y clorofila debido a que existen factores de inhibición del crecimiento o carga del sistema (consumo de los nutrientes del cultivo, cambio de pH, salinidad, evaporación del cultivo, consumo de oxígeno, etc.) que regulan la población de microorganismos (Brock, 1979).

1. Evaluación de la actividad SOD y AsA-POD durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La ausencia de catalasa en la cepa SC7B9002-1 (Fig. 21) coincide con los reportes de Dubinin *et al.*, (1993) y García-Pichel *et al.*, (1996), por lo que al parecer es otra característica intrínseca de *M. chthonoplastes*.

Analizando la actividad de la SOD durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, podemos observar que ésta oscila a lo largo del cultivo en forma decreciente hasta disminuir en un sexto de su actividad inicial (Fig. 6B). Para el día 9 ocurre el incremento simultáneo de actividad AsA-POD y SOD, lo cual coincide con el inicio de lo que corresponde a la fase estacionaria del cultivo. Estos resultados concuerdan con los de Schnell y Steinman (1995) quienes reportan un incremento de actividad POD de cien veces al entrar *Caulobacter crescentus* a

su fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, Wang y Schellhorn (1995), reportan también un incremento de actividad CAT durante esta fase con *Deinococcus radiodurans* y *E. coli*, que son parcialmente contrarios a los obtenidos por Borraccino *et al.*, (1994) quienes observan que durante la senescencia de tejidos vegetales y animales se incrementa únicamente la actividad AsA-POD, mientras que la actividad de la SOD y CAT disminuye.

Así pues, parece ser que el desarrollar defensas antioxidantes con enzimas tales como la SOD y POD, durante la fase estacionaria de crecimiento, es un comportamiento típico bacteriano (Schnell y Steinman, 1995) que sugiere la existencia de diferentes condiciones o factores que regulan su inducción.

El aumento de actividad AsA-POD que ocurre en la fase estacionaria de la cepa SC7B9002-1, concuerda con el observado por Schnell y Steinman (1995), y ellos explican que parece ser que es aquí cuando aparecen una serie de condiciones que de alguna forma inhiben o retardan el crecimiento de la cepa, como lo son la falta de nutrientes y la excreción de metabolitos secundarios tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno (Dubinin *et al.*, 1993) que pueden reactivar o inducir probablemente una síntesis *de novo* de la enzima AsA-POD (Borraccino *et al.*, 1994; Chamnongpol *et al.*, 1995). Dado que no fueron utilizados bloqueadores de la síntesis proteica (tales como el cloranfenicol o rifampina) durante la fase estacionaria del crecimiento de *M.chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, existe la posibilidad de que las enzimas pudieran estarse reactivando por productos del metabolismo, o bien por una síntesis *de novo*, o ambos.

Después del día 12 de cultivo, la actividad total de cada una de las enzimas tiende a disminuir, particularmente la SOD, lo que indica el comienzo de envejecimiento celular. Como consecuencia final, se detecta la reducción del contenido de clorofila *a* y de proteínas totales a partir del día 12 de cultivo (Fig. 6A), fenómeno que se ha identificado como síntoma de senescencia de los cultivos (Borraccino *et al.*, (1994). Este proceso de envejecimiento, conduce a un proceso degenerativo de los fotosistemas en los organismos fototróficos y es conocido como fotoblanqueamiento, que como su nombre lo indica, se refiere a la pérdida de los pigmentos que participan en la fotosíntesis (Halliwell, 1992).

Finalmente, se puede observar que durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, los máximos de actividad para ambas enzimas se presentan en el día 9 del cultivo (Fig. 6B).

2. Efecto del paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno sobre la actividad SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La cantidad de proteína extraída de *M. chthonoplastes* SC7B9002-1 se ve modificada por efecto de los agentes oxidantes paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno (Figs. 7A, 8A y 9A).

El aumento de proteínas totales en la concentración de 10 μ M de PQ (Fig. 7A) refleja que estos niveles de toxicidad aún son tolerables para *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 y que posiblemente existe un mecanismo de protección para prevenir el daño oxidativo ocasionado por las especies reactivas generadas. Este mecanismo de protección podría significar el aumento de actividad AsA-POD (hasta ~2 veces más con respecto al control) (Fig. 7C). En 1,500 μ M de PQ se observa ya el daño a *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, dada la disminución significativa de proteína extraída. (Fig. 7A).

La disminución de proteína extraída bajo diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (Fig. 8A), puede ser reflejo de un daño oxidativo en estas biomoléculas, ya que se ha demostrado que una vez expuestas a especies oxigenadas reactivas son más susceptibles a una proteólisis (Bagchi *et al.*, 1991) y a una remoción catabólica (Dean *et al.*, 1993). Sin embargo, a pesar de la disminución de la proteína total extraída, se observa un interesante incremento de actividad SOD durante el ensayo bajo 10 μ M de peróxido de hidrógeno y a las 6 horas de incubación con 100 μ M. Se sabe que bajo estas condiciones de estrés oxidativo, se pueden estar activando algunos grupos de genes entre los que podemos encontrar tanto el de la SOD como el de la CAT y la POD (Greenberg y Demple, 1989).

Por otra parte, la actividad SOD se mantiene constante o disminuye ligeramente con respecto al control en las concentraciones de PQ en las que fué llevado el experimento. Una posible explicación a esta observación se pudiera basar en que los estímulos utilizados para lograr la

inducción de esta enzima no hayan sido suficientes. La intensidad luminosa empleada ($\sim 12 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no ocasionó daños fotooxidativos mediados por el radical superóxido que pudieran inducir la actividad de la SOD. Otros estudios reportan un incremento de 25-60% de actividad SOD cuando las células de *A. cylindrica* son crecidas primero a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego cambiadas a $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Caiola *et al.*, 1991). En reportes similares se observa la utilización de intensidades luminosas que van de los 600 a $1,500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con la finalidad de generar daños a nivel fotooxidativo que traen consigo la inducción de las enzimas SOD, CAT y/o POD (Bagchi *et al.*, 1991; Caiola *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1992).

Mediante los experimentos realizados en este estudio se observó que la acción del oxígeno (100 %) ocasiona un incremento significativo en el contenido de proteínas con respecto al control (Figs. 9A) seguido del incremento significativo de la actividad SOD (~ 1.6 veces) (Fig. 9B). Así pues, la participación del oxígeno refleja su importancia para lograr la inducción de las enzimas SOD y AsA-POD, ya que es la molécula precursora de las especies reactivas más dañinas para las células (Dubinin *et al.*, 1993).

La relación entre la toxicidad del oxígeno y la SOD ha sido extensivamente estudiada y existen numerosas evidencias que apoyan la participación de esta enzima en la protección integral celular en diversas cianobacterias; se sugiere la participación de la SOD en la protección del sistema nitrogenasa, involucrado en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico llevado a cabo bajo condiciones aeróbicas en cianobacterias (Caiola *et al.*, 1991); en la cianobacteria *Anabaena cylindrica* se incrementan los niveles de actividad SOD al elevar las concentraciones de O_2 hasta un 60 % (Cunningham *et al.*, 1992); *E. coli* cepa B, incrementa el contenido de SOD al cultivarla bajo 100 % de O_2 y por lo tanto se hacen más tolerantes a estas condiciones de estrés (Gregory y Fridovich, 1973) y *Bacteroides gingivalis* incrementa hasta dos veces el contenido de SOD-Mn expuesta a oxígeno (Amano *et al.*, 1990; Mackey y Smith, 1983).

Greemberg y Demple (1989) reportaron un incremento significativo en la cantidad de proteínas de *E. coli* después de haberla expuesto a paraquat y peróxido de hidrógeno. Entre estas proteínas destacan la SOD y 33 proteínas más no identificadas, así como algunas enzimas que reparan el daño oxidativo en el ADN cuando se expone al PQ; se inducen también peroxidasas y

todo un grupo de genes estimulados por exposición al peróxido de hidrógeno. Al igual que *E. coli*, parece ser que *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 responde de forma similar en cuanto a la actividad SOD cuando es expuesta a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (10 μ M), esto es, la actividad se ve incrementada significativamente con respecto al control (~70 %) (Fig. 8 B).

Sin embargo, los valores de actividad SOD pudieran incrementarse aún más en *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, ya que la presencia de peróxido de hidrógeno, generado mediante la dismutación del ión superóxido producido por el paraquat, inhibe la actividad de la Fe-SOD, no así a la Mn-SOD (Dubinin *et al.*, 1993).

Con todo lo expuesto podemos poner de manifiesto que, a pesar de que el oxígeno participa de una manera desfavorable para el desarrollo de muchas cianobacterias (Dubinin *et al.*, 1993) y de ser el precursor de las EOR, éstas también pueden participar en una forma reguladora del metabolismo y crecimiento de las cianobacterias. Se cree que el peróxido de hidrógeno participa de manera importante en la regulación de la fotosíntesis por el siguiente mecanismo: cuando existe una deficiencia de bióxido de carbono se induce a la síntesis de peróxido de hidrógeno, quien a su vez inhibe a una serie de enzimas del ciclo de Calvin y de la ruta oxidativa de las pentosas, principalmente las bifosfatasa y fosforibonucleasas, por lo que al existir una deficiencia de bióxido de carbono en el medio, se activa el mecanismo celular (Dubinin *et al.*, 1993).

Además, se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno participa como "antibiótico" en la regulación del crecimiento de bacterias heterótrofas acompañantes en las comunidades microbianas naturales de *Microcoleus chthonoplastes*. Aunado al complejo enzimático SOD y AsA-POD que *M. chthonoplastes* posee, las bacterias heterótrofas pudieran estar contribuyendo a disminuir la saturación de oxígeno para que éste no sea un factor inhibitorio de la fijación aeróbica de nitrógeno como se ha reportado previamente (Marschall, 1989). Durante esta relación, las bacterias heterótrofas intercambian oxígeno por bióxido de carbono como producto del metabolismo aerobio, evitando así un daño fotooxidativo a las cianobacterias. Las bacterias proveen también vitaminas y factores de crecimiento para la comunidad cianobacteriana (Marschall, 1989).

Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que cultivos axénicos de *Microcoleus chthonoplastes* producen peróxido de hidrógeno (Dubinin *et al.*, 1993) que probablemente explica la autoinhibición en su crecimiento y tiempo de duplicación (7 horas) (Tovar, 1991). Este hecho trae consigo que esta cianobacteria posea mecanismos de defensa efectivos para contrarrestar los efectos de las especies oxigenadas derivadas de la producción del peróxido tanto en condiciones naturales como en cultivo y también la ausencia de la enzima CAT (Dubinin *et al.*, 1993).

Con base al análisis estadístico ANDEVA, se pudo conocer el efecto del PQ, peróxido de hidrógeno y oxígeno en la cantidad de proteínas totales extraídas y de las enzimas SOD y AsA-POD, observándose que el oxígeno y el PQ aumentaron significativamente los valores de proteína y de AsA-POD para *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1. Estas observaciones reflejan la importancia que revisten las enzimas antioxidantes cuando las cianobacterias se ven expuestas a diferentes tensiones de oxígeno y de PQ, ya que son estos dos factores en especial, quienes dañan en forma primaria a los fotosistemas I y II cuando los genes que codifican para las enzimas antioxidantes de estos microorganismos han sido reprimidos (Herbert, 1992).

En consecuencia, se pone de manifiesto que los mecanismos por medio de los cuales es regulada la expresión, represión o inactivación de las enzimas SOD y AsA-POD varía según la fase de crecimiento en que es encontrado el microorganismo y que efectivamente, se pueden clasificar en grupos fisiológicos de acuerdo a la respuesta hacia diferentes estímulos oxidantes, como ha sido propuesto en otros trabajos por Miyake *et al.*, (1991).

Finalmente, podemos decir que los mecanismos de respuesta involucrados para contrarrestar el daño oxidativo de las EOR generadas bajo condiciones usuales y mediadas por los compuestos PQ, peróxido de hidrógeno y oxígeno, son reflejo del ambiente extremo de donde fué aislado *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

3. Efecto de la salinidad (NaCl) sobre la actividad SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Son ya conocidos los efectos de la salinidad en el crecimiento de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 (López-Cortés y Tovar, 1992). En la concentración de 8% de NaCl, *Microcoleus* exhibe un mayor crecimiento medido por peso seco, producción de clorofila α , y, a diferencia de las demás concentraciones de NaCl es ahí también donde se incrementa la síntesis de β -caroteno, que al parecer participa en la estabilización de la membrana celular debido a la presión osmótica ejercida por el NaCl (López-Cortés y Tovar, 1992). Se sabe que *M. chthonoplastes* crece en un amplio intervalo de salinidad con diferentes velocidades específicas de crecimiento (López-Cortés y Tovar, 1992; Karsten, 1996) por lo que es considerado un microorganismo eurihalino. En 8.0 % de NaCl, la cepa SC7B9002-1 exhibe el mayor crecimiento cuando es medido por la producción de clorofila α , proteínas y ácidos nucleicos (Tabla 4) (Tovar, 1991) y esto pudo ser comprobado al demostrar que esta cianobacteria posee una capacidad de soporte mayor cuando se expone a 8 % de NaCl (Fig. 10C).

En 8.0 % de NaCl, *M. chthonoplastes* muestra una mayor cantidad de proteína extraída y ácidos nucleicos durante los días 14 y 16 respectivamente (Figs. 11A y B). Se sabe que esta cianobacteria posee mecanismos de osmoregulación, como la síntesis de glicosil glicerol y trehalosa (Karsten, 1996) sin embargo, el incremento en la cantidad de proteína total extraída nos pudiera indicar un mecanismo adicional por medio del cual se adapta a amplios intervalos de salinidad. Es decir, que por la exposición al NaCl se puede estar favoreciendo la activación y/o represión de genes involucrados en la adaptación a esas condiciones ambientales. Previos reportes indican que *Phormidium ambiguum* (Gom), varía su contenido de proteínas cuando se somete a intervalos de salinidad entre 0.0 y 2.0 % de NaCl (Anantani y Vaidya, 1983). Esta variación en el contenido de proteínas se explica por la aparición de isoenzimas de la peroxidasa, como posible estrategia para evitar la desactivación de estas enzimas bajo condiciones hiperosmóticas (Anantani y Vaidya, 1983).

La disminución de la actividad SOD y AsA-POD durante el crecimiento de *M. chthonoplastes* bajo condiciones hiperosmóticas, podría ser producto del propio envejecimiento

celular, dado que éste se presenta en todos los organismos vivos que poseen este sistema de protección contra radicales superóxido en las etapas avanzadas de su ciclo de vida (Fig. 12 A y B) (Borraccino et al. 1993).

Es cierto que con nuestro trabajo, por el hecho de incrementarse la actividad SOD y AsA-POD a la mitad del ciclo de vida de la cianobacteria (Fig. 12 A y B) nos es difícil saber si estas enzimas participan de alguna forma en la desintoxicación de las especies oxigenadas reactivas generadas por el estrés salino. Por lo que para el futuro sería importante conocer el efecto de la salinidad sobre los patrones de composición específica de proteínas y, específicamente, de las enzimas encargadas de la desintoxicación oxidativa para saber el papel que éstas pudieran estar jugando en la adaptación a condiciones extremas de salinidad.

4. Efecto de la intensidad luminosa sobre la actividad SOD y AsA-POD de *Microcoleus chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

Al parecer la intensidad luminosa ejerce un efecto directo y estadísticamente significativo sobre la síntesis de proteínas de *Microcoleus chthonoplastes* (Fig. 14). El cambio de las condiciones ambientales del inóculo, de 30 a 0 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocasiona una significativa disminución de la proteína total extraída, sin embargo, cuando la intensidad luminosa es excesiva, ocasiona el fenómeno de fotoinhibición del proceso fotosintético con ulterior degradación de los pigmentos fotosintéticos, fenómeno conocido como fotoblanqueamiento. Este fenómeno puede ser de dos formas: dinámico, el cual no induce ningún daño al aparato fotosintético y es parte del proceso de adaptación fisiológica de las células a condiciones moderadamente altas en intensidad luminosa, y, crónico, cuando el exceso de energía de excitación no es efectivamente disipada, entonces ocurre un daño al aparato fotosintético del que se recupera lentamente la célula (Osmond, 1994).

En el caso de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, observamos que ocurrió un fotoblanqueamiento del tipo crónico, ya que logró recuperar su capacidad fotosintética en un lapso de 20 días, incubado a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y a una baja intensidad luminosa ($\sim 6\text{-}10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Se ha demostrado, que durante la exposición a excesiva irradiación de fotones, actúan algunos mecanismos de fotoprotección como la aparición de la proteína D1 del centro de reacción del fotosistema II (Ibelings, 1996). Aunado a lo anterior, existen mecanismos de fotoadaptación hacia un incremento o disminución de la intensidad luminosa y cambio de longitud de onda de la luz, basados en la variación del contenido y relación entre pigmentos fotosintéticos (Post *et al.*, 1989). Tal y como fué demostrado en nuestros resultados, al observar un incremento de clorofila *a* durante el período de oscuridad y una disminución cuando la intensidad luminosa se incrementa (Fig. 14).

Bajo condiciones extremas de intensidad luminosa, se han podido detectar cambios en el contenido de pigmentos en poblaciones naturales de cianobacterias dominadas por *M. chthonoplastes*; y, particularmente las que se ubican sobre los canales de marea de San Carlos, B.C.S., que presentan coloraciones de verde claro en el verano por las intensidades alcanzadas en ese período ($\sim 1,500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como posible sistema de protección adicional (López-Cortés y Tovar, 1992).

Sin embargo, en el proceso de fotoadaptación a condiciones extremas de luz, participan también complejos enzimáticos que desactivan especies oxigenadas reactivas producto de reacciones fotobiológicas, y, entre ellas tenemos a la SOD-CuZn y AsA-POD que han sido detectadas en el fotosistema I donde son generados los radicales superóxido y posteriormente dismutados a peróxido de hidrógeno como sustrato para la peroxidasa (Ogawa *et al.*, 1995).

De acuerdo a Ananyev *et al.*, (1994) y Bielski (1978), se logró reproducir el fenómeno de la inducción de SOD a través de la exposición de *M. chthonoplastes* a altas intensidades luminosas. Por los antecedentes de estos autores, *M. chthonoplastes* podría estar generando gran cantidad de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno al fotoexcitar el centro de reacción clorofiliano y logrando así la reducción univalente del oxígeno, fotoproducido en el fotosistema II por fotólisis del agua. Como lo demuestra la Fig. 17, la actividad SOD se incrementa a las 9:00 horas del día cuando *M. chthonoplastes* es expuesto a una intensidad luminosa muy por arriba de la usada para lograr el inóculo del experimento ($\sim 30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Al parecer, el efecto de las variaciones de temperatura observadas en la Fig. 13 son insignificantes ya que se ha comprobado que la interacción entre los factores intensidad luminosa y temperatura, se acentúan de forma perjudicial para las cianobacterias cuando ésta última se incrementa por arriba de los 30 ó 35 °C (Ibelings, 1996). Esta hipótesis también está apoyada por Havaux (1994) quien afirma que al parecer a baja irradiación solar se protege también del efecto de los efectos dañinos de la temperatura, sin embargo, la base molecular de esta protección es desconocida.

5. Determinación de las condiciones más apropiadas para la ruptura celular de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La obtención de esferoplastos no muestra aparentemente ventaja alguna sobre la disrupción ultrasónica directa sobre las células en cuanto a la obtención de proteína; los valores de actividad SOD no se ven incrementados significativamente entre los tratamientos pero sí disminuyen a lo largo del tiempo de exposición en cada proceso (Fig. 16B). De estos resultados podemos concluir que no existe diferencia alguna entre ambos procesos de extracción referidos tanto a la cantidad de proteína extraída como de actividad SOD, sin embargo, en lo que se refiere a la actividad AsA-POD ésta se incrementa a lo largo del tiempo con ambos tratamientos con valores muy semejantes entre ambos (Fig. 16C). Estos resultados pudieron ser corroborados por medio del barrido espectrofotométrico, donde observamos que los extractos tratados con la lisozima poseen una menor cantidad de alguna(s) proteína(s) detectada(s) a 280 nm de longitud de onda, que es donde absorben los aminoácidos aromáticos, y de ficocianina, pigmento accesorio constituyente del aparato fotosintético de *M. chthonoplastes* que absorbe en los 620 nm. Ahora bien, existe un incremento en la absorbancia a lo largo del tiempo de exposición al ultrasonido para ambos procesos de extracción, hasta los 115 s, y una posterior disminución de tales valores que bien pudieran estarse degradando, dada su naturaleza protéica, por la exposición a la luz ambiental y al calor generado por la acción del ultrasonido.

A pesar del uso frecuente del ultrasonido y de la balística para el rompimiento y extracción de organelos intracelulares, enzimas, etc, en diversos microorganismos, observamos que el mejor método lo constituye el rompimiento de células intactas por ultrasonido a intervalos de 30 s (Tabla

5); sin embargo y a diferencia del rompimiento de esferoplastos, se ven incrementadas las posibilidades de obtener una carga mayor de proteína(s) proveniente(s) quizás de la pared o membrana celular de la cianobacteria, como se observa en los resultados del barrido espectrofotométrico (Fig. 17A).

En cuanto al rompimiento por medio de perlas de cristal, los rendimientos de proteína total extraída fueron inferiores (3.62 veces) a los obtenidos por ultrasonido, aunado a que en este primer método, se consume más tiempo durante la extracción (15 min por muestra, en comparación de 3 min por ultrasonido).

6. Evidenciación de las enzimas SOD, CAT y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas.

Una vez realizados los corrimientos electroforéticos, pudimos localizar en los geles a las enzimas SOD, CAT y AsA-POD, mediante las técnicas de detección para cada una de ellas como es reportado en la literatura.

En lo que respecta a la tinción específica para la SOD, se puede decir que ésta puede ser observada con resultados confiables ya que no se obtuvieron interferencias por alguna otra enzima. La actividad en gel para la AsA-POD se vió favorecida también, ya que se pudo detectar sin ningún problema la POD de *M. chthonoplastes* tal y como lo mencionan Mittler y Zilinskas (1993). Sin embargo, en el mismo gel donde se reveló la actividad AsA-POD de la cepa SC7B9002-1, se vieron tenuemente las bandas de la CAT y POD comercial y la CAT de *E. coli*, ya que éstas utilizan el peróxido de hidrógeno como sustrato común, por lo que se debe tener en cuenta la ubicación de las bandas reveladas con azul de Coomasie, para evitar alguna confusión. Para la observación de la actividad CAT en gel nos dimos cuenta que la región incolora de la inhibición de la oxidación de la diamninobencidina, coincide con la banda de la enzima comercial observada con la tinción de azul de coomasie, aunque ésta difiera en distancia de migración con la del extracto de *E. coli* cepa DH5- α ; por otro lado, para *M. chthonoplastes* no se detectó por ser un microorganismo CAT (-) y

por la ausencia del desprendimiento de oxígeno durante la adición de peróxido de hidrógeno, indicado en la técnica.

VIII. CONCLUSIONES.

Se determinaron los máximos de actividad SOD y AsA-POD durante la cinética de crecimiento de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, reconociéndose que la máxima actividad se presenta entre los días 9 de cultivo, que corresponden al inicio de su fase estacionaria y que el desarrollar este sistema de defensas antioxidantes en esta etapa, es un comportamiento típico bacteriano.

Con la exposición de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 al paraquat, peróxido de hidrógeno y oxígeno, se confirma que las enzimas SOD y AsA-POD son de suma importancia para la eliminación de especies oxigenadas reactivas en cianobacterias y que el efecto que ocasiona cada uno de estos compuestos lo hace en proporciones y formas diferentes.

La capacidad que posee *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 para prevenir o contrarrestar los daños ocasionados por su exposición a compuestos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno y oxígeno, pudiera ser reflejo del ambiente de donde fueron aisladas.

La intensidad luminosa, juega un papel importante en la regulación del contenido de proteínas y específicamente de las enzimas SOD y AsA-POD de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1, reflejado en la actividad de éstas.

El efecto de la salinidad sobre las enzimas SOD y AsA-POD no es totalmente claro; al parecer, la disminución de la actividad enzimática observada en este trabajo está influenciada por mecanismos relacionados con la edad de cultivo de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1.

La expresión de enzimas antioxidantes como la SOD y AsA-POD varía de especie a especie, de la etapa de crecimiento del microorganismo cultivado en lote y del factor por el que se induzca esta actividad enzimática.

La disrupción con ultrasonido de células intactas resulta ser el método que mejor favorece la extracción de proteínas de *M. chthonoplastes* cepa SC7B9002-1 incluyendo la SOD y AsA-POD.

Finalmente, se pone de manifiesto la importancia que representa para los organismos vivos el complejo enzimático SOD y POD, especialmente para las cianobacterias que se desarrollan en ambientes extremos donde se ve favorecida la generación de especies oxigenadas reactivas.

Perspectivas futuras de investigación.

Es importante definir el papel que juegan las enzimas SOD y AsA-POD en la protección de las cianobacterias que son expuestas a condiciones de estrés oxidativo, como posibles mecanismos adaptativos mediante experimentos *in situ*. Dentro de este rubro, se considera importante medir las fluctuaciones de actividad enzimática durante un ciclo circadiano, para saber el nivel de actividad basal de las cianobacterias.

Es necesario realizar mediciones de actividad y localización intracelular de las enzimas SOD y AsA-POD en las cianobacterias, por medio de técnicas de inmunología o biología molecular, para establecer relaciones cuantitativas más exactas entre el sitio de generación de las especies oxigenadas reactivas y la presencia de las enzimas antioxidantes.

Finalmente, es de vital importancia elucidar los mecanismos moleculares de activación e inhibición de los procesos en los cuales se ve involucrada la actividad enzimática tipo SOD y AsA-POD, con la finalidad de obtener microorganismos hiperproductores de estas biomoléculas biotecnológicamente importantes y comprender mejor las bases genéticas y moleculares de la expresión y significado funcional de estas enzimas en la protección de los organismos contra el estrés oxidativo.

IX. LITERATURA CITADA.

- Afanas'ev, I. B. 1991. Superoxide ion: chemistry and biological implications. CRC PRESS, vol. II pp. 1-4, 135-204.
- Amano, A., Shizukuishi, S., Tamagawa, H., Ikawura, K., Tsunasawa, S. y Tsunemitsu, A. 1990. Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. Journal of Bacteriology, vol. 172, No. 3, pp. 1457-1463.
- Anantani, Y.S. y Vaidya, B.S. 1983. Halotolerance in a blue green alga: shifts in electrophoretic patterns of soluble proteins and enzyme peroxidase under salt stress. Phycos, vol. 22, pp. 108-112.
- Ananyev, G., Renger, G., Wacker, U. y Klimov, V. 1994. The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of photosystem II. The possible involment of cytochrome b559. Photosynthesis Research, vol. 41, pp. 327-338.
- Bagchi, S.N., Ernst, A. y Böger, P. 1991. The effect of activated oxygen species on nitrogenase of *Anabaena variabilis*. Z. Naturforsch., vol. 46, pp. 407-415.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, vol. 44, pp. 276-287.
- Beck, B.L., Tabatabai, L.B. y Mayfield, J.L. 1990. A protein isolated from *Brucella abortus* is a CuZn Superoxide Dismutase. Biochemistry, vol. 29, pp. 372-376.
- Beckman, J.S., Minor, R.L., White, C.W., Repine, J.E., Rosen, G.M. y Freeman, B.A. 1988. Superoxide dismutase and catalase conjugated to Polyethylene Glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. Journal of Biological Chemistry, vol. 263, pp. 6884-6892.

Bielski, B.H.J. 1978. Reevaluation of the spectral and kinetic properties of HO₂ and O₂- free radicals. Photochem. Photobiol., vol. 28, pp. 645-649.

Boehringer, 1975. Biochemica Information II, Mannheim, West Germany.

Borraccino, G., Mastropasqua, C., De Leonardis, S., y Dipierro, S. 1994. The role of ascorbic acid system in delaying the senescence of oat (*Avena sativa*) leaf segments. J. Plant. Physiol. vol. 144, pp. 161-166.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical Biochemistry, vol. 72, pp. 248-254.

Brock, T.D. 1979. Biology of microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J. pp. 741-747.

Brown, P. N. y Salin, M. L. 1993. Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. Journal of Bacteriology, vol. 175, No. 13, pp. 4197-4202.

Caiola, M.G., Canini, A., Galianzo, F. y Rotilio, G. 1991. Superoxide dismutase in vegetative cells and akynetes of *Anabaena cylindrica* Lemmerman. FEMS, Microbiol. Lett., vol. 80, pp. 161-166.

Canini, A., Galianzo, F, Rotilio, G. y Caiola, M. G. 1991. Superoxide dismutase in the symbiont *Anabaena azollae* Strasburg. Plant Physiol., vol. 97, pp. 34-40.

Canini, A., Caiola, M.G., Civitareale, P. y Galianzo, F. 1992. Superoxide dismutase in symbiotic, free-living and wild *Anabaena* and *Nostoc* (Nostocales, cyanophyta). Phycologia, vol. 31, No. 314, pp. 225-230.

Cunningham, K.A. y Capone, D.G. 1992. Superoxide dismutase as a protective enzyme against oxygen toxicity: an overview and initial studies in *Trichodesmium*. Carpenter, E.J. *et al.* (Eds.), Marine Pelagic Cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs, pp. 331-341.

Chamnongpol, S., Mongkolsuk, S., Vattanaviboon, P. y Fuangthong, M. 1995. Unusual growth phase and oxygen regulation of oxydative stress protection enzymes, catalase and superoxide dismutase, in the phytopatogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, No. 1, pp. 393-396.

Dean, R.T., Gieseg, S. y Davies, M.J. 1993. Reactive species and their accumulation on radical-damage proteins. TIBS 18-Nov., pp. 437-441.

De Witt, R. y Gernerden, H.V. 1989. Growth responses of the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* with sulfide as an electron donor. Microbial Mats, Physiological ecology of benthic microbial communities, (Cohen, Y. y Rosemberg, E. Eds.) American Society of Microbiology, pp. 320-325.

Downen, J.M., Omar, B.A., Ooiwa, H. y McCord, J.M. 1991. Superoxide dismutase therapy for myocardial ischemia. Free Radical Res. Comms. 12-13, pp. 703-720.

Dubinin, A.V., Zatriznnaya, O.M. y Gusev, M.V. 1993. Hydrogen peroxide production by the halophilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. Mikrobiologiya, vol. 61, No.3, pp. 384-390.

Flohé, L. y Otting, F. 1984. Superoxide dismutase assays. Methods in Enzimology, vol. 105, pp. 93-104.

Frank, L. 1982. Oxygen toxicity in eukaryotes. Superoxide Dismutase, vol. III Oberley, L.W. (ed.) CRC PRESS Inc., pp. 1-43

Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science, vol. 202, pp. 875.

- Fridovich, I. 1982. Oxygen toxicity in prokaryotes: the importance of superoxide dismutase. *Superoxide Dismutase*, vol. II (Oberley, L.W. ed.) CRC PRESS Inc., pp. 79-88.
- García-Pichel, F., Prufert-Bebout, L. y Muyzer, G. 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 9, pp 3284-3291.
- Golubic, S. 1979. Organisms that built stromatolites. Walter M.R. (Ed.) *Stromatolites*, Elsevier Scientific Publishing Company, N.Y. pp. 113-126.
- Gosset, D. R., Banks, S. W., Willhollon, E. P. y Lucas, M. C. 1996. Antioxidant response to NaCl stress in a control and a NaCl-tolerant cotton cell line grown in presence of paraquat, buthionine sulfoximine and exogenous glutathione. *Plant Physiol.*, vol. 112, No. 2, pp. 803-809.
- Greenberg, J.T. y Demple, B. 1989. A global response induced in *E. coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, vol. 171, No. 7 pp. 3933-3939.
- Gregory, E.M. y Fridovich, I. 1973. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *Journal of Bacteriology*, vol. 114, pp. 1193-1197.
- Halliwell, B. 1982. The toxic effect of oxygen in plant tissues. Oberley, L.W.(Ed.) *Superoxide Dismutase*, vol. I CRC PRESS Inc., pp. 89-123.
- Havaux, M. 1994. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. *Plant Cell Physiol.* vol. 35, pp. 757-66.
- Herbert, S. K., Samson, G., Fork, O. C. y Lauderbach, D. E. 1992. Characterization of damage to photosystem I and photosystem II in a cyanobacterium lacking iron SOD activity. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sciences of the USA*, vol.89, No. 18, pp. 8716-8720.

- Hoffman y Winston. 1987. Isolation of chromosomic DNA for southern. *Gene*, vol. 57, pp. 267-272.
- Ibelings, B. W. 1996. Changes in photosynthesis in response to combined irradiance and temperature stress in cyanobacterial surface waterblooms. *J. Phycology*, 32, 549-557.
- Kanematsu, S. y Asada, K. 1978. Superoxide dismutase from an anaerobic photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 185, pp. 473.
- Karsten, U. 1996. Growth and inorganic osmolytes of geographically different isolates of *Microcoleus chthonoplastes* (Cyanobacteria) from benthic microbial mats: response to salinity change. *J. Phycol.* vol., 32, pp.501-506.
- Kong, S. y Davison, A.J. 1980. The role of interaction between O_2 , H_2O_2 , OH_2 and $O_2^{\cdot -}$ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 204, pp. 18-29.
- Kono, Y., Takahashi, M. y Asada, K. 1979. Superoxide dismutase from Kidney bean leaves. *Plant & Cell Physiology*, vol. 20, No. 7, pp. 1229-1235.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, Londres*, vol. 227, pp. 680-685.
- Lee, H.T. y Lee, O.S. 1988. Purification and properties of superoxide dismutase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, vol. 52(6) pp. 1361-1368.
- López-Cortés, A. 1990. Microbial mats in tidal channels at San Carlos, B.C.S., México. *Geomicrobiology Journal*, vol. 8, pp. 69-85.
- López-Cortés, A. y Tovar, D. 1992. Population changes in cyanobacterial mats and the role of NaCl on β -carotene production in *Microcoleus* strain SC7B9002-1. *Geomicrobiology Journal*, vol. 10, pp 115-123.

- Lowen, P.D. y Oberley, W.L. 1982. Free radicals, insulin action and diabetes. Superoxide Dismutase, vol. II Oberley, L.W. (Ed.) CRC PRESS Inc., pp. 151-189.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., vol. 193 pp. 265-275.
- Mackey, E.J. y Smith, G.G. 1983. Adaptation of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to high oxygen tensions. FEBS Letters, vol. 156, pp. 108-112.
- Malin, G. y Pearson, H. W. 1988. Aerobic nitrogen fixation in aggregate-forming cultures of the nonheterocystous cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. Journal of General Microbiology, 134, pp. 1755-1763.
- Manchenko, G. P. 1994. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels, CRC, Press, Inc., Boca Raton, Fl. USA, p. 341.
- Marschall, K.C. 1989. Cyanobacterial-heterotrophic bacterial interaction. Microbial Mats, Physiological ecology of benthic microbial communities, (Cohen, Y. y Rosemberg, E Eds.) American Society of Microbiology, pp. 239-245.
- Martin, J.P. y Fridovich, I. 1981. Evidence for a natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescence bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. J. Biol. Chem., vol. 256, pp. 6080-6089.
- Matsumoto, T., Kumiko, T., Isobe, T., Matsuoka, K. y Yamakura, F. 1991. Iron and manganese-containing superoxide dismutases from *Methylomonas* J: Identity of the protein moiety and amino acid sequence. Biochemistry, vol. 30, pp. 3210-3216.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). The Journal of Biol. Chem., vol. 244, no. 22, pp. 6049-6055

McGoff, P., Baziotis, A. C. y Maskiewicz, R. 1988. Analysis of poliethylene glycol modified superoxide dismutase by chromatographic, electrophoresis, light scattering, chemical and enzymatic methods. *Chem. Pharm. Bull.* vol. 36, no. 8, pp. 3079-3091.

Mercer, E.H. y Birbeck, M.S.C. 1979. *Manual de microscopía electrónica para biólogos*, H. Blume Ediciones, 2a. edición, Madrid, España, p. 134.

Michelson, A. M. 1982. Clinical use of superoxide dismutase and possible pharmacological approaches. *Pathology of oxygen*, Academic Press Inc., Ch. 17, pp. 277-302.

Mittler, R. y Tel-Or, E. 1991. Oxidative stress responses and shock proteins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* R2 (PCC-7942). *Archives of Microbiology*, vol. 155, pp. 125-130.

Mittler, R. y Zilinskas, B. A. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, vol 212, pp. 540-546.

Miyake, Ch., Michihata, F. y Asada, K. 1991. Scavenging of hydrogen peroxide in prokaryotic and eukaryotic algae: Acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiology*, vol. 32, no. I, pp. 33-43.

Morales, I., Batuecas, S. y de la Rosa, F.F. 1992. Storage of solar energy by production of hydrogen peroxide by the blue-green alga *Anacystis nidulans* R2: stimulation by azide. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 40, pp. 147-150.

Nakano, Y. y Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, 22, No. 5, 867-880.

- Núñez, V.E., Tovar, D. y Ochoa, J.L. 1996. Criopreservación y supervivencia de *Microcoleus* sp. (Oscillatoriaceae: cianobacteria) cepa SC7B9002-1. XI Simposium Internacional de Biología Marina, La Paz, B.C.S, México.
- Osmond, C. B. 1994. What is photoinhibition? some insights from comparisons of shade and sun plants, in Baker N.R. & Bowyer, J. R. (eds.) Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field. Bios. Scientific Publishers, Oxford, pp. 1-19.
- Parker, M.W., Bossa, F., Barra, D., Bannister, W.H. y Bannister, J.V. 1986. Structural and evolutionary relationships between the eukaryotic superoxide dismutases, en Elsevier Science Publishers B.V. Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, Biology and Medicine; G. Rotilio, Ed. pp. 237-245.
- Parker, M.W. y Blake, C.C.F. 1988. Iron and manganese containing superoxide dismutase can be distinguished by analysis of their primary structures. FEBS Lett., vol. 229, no. 2, pp. 377-382.
- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiological Reviews, vol. 58, no. 4, pp. 755-805.
- Sanbrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd. edition, Tomo III, USA.
- Sánchez, A. S. P. 1997. Identificación y clasificación de levaduras marinas de la costa occidente de B. C. S. mediante técnicas electroforéticas. Tesis de licenciatura, UABCS.
- Sanders, J.W. Leenhouts, J., Haandrikman, J., Venema, G. y Kok, J. 1995. Stress responses in *Lactococcus lactis*: cloning, expression, analysis and mutation of the Lactococcal superoxide dismutase gene. J. of Bacteriology, Sept. pp. 5254-5260.
- Schiavone, J.R. y Hassan, H.M. 1987. Biosynthesis of superoxide dismutase in eight prokaryotes: effect of oxygen, paraquat and an iron chelator, FEMS Microbiol. Lett, vol. 42, pp. 33-38.

- Scott, M.D., Meshnick, S.R. y Eaton, J.W. 1987. Superoxide dismutase rich-bacteria, paradoxical increase in oxidant toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 8, pp. 3640-3645.
- Schlesinger, P., Shimson, B. y Boussiba, S. 1996. Sodium deprivation under alkaline conditions causes rapid death of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Phycology*, vol. 32, pp. 608-613.
- Schnell, S., y Steinman, H. 1995. Function and stationary-phase induction of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase and catalase/oxidase in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, vol. 177, No. 20, pp. 5924-5929.
- Shan, L., Xiao-Ning, Z., Zhi, L. y Hao-Jan, ch. 1996. A salt induced-chloroplast protein in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. of Phycology*, supplement, vol. 32, No. 3,
- Stal, L., Heyer, H., Bekker, S., Villbrandt y Krumbein, W.E. 1989. Aerobic-anaerobic metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limosa*, en *Microbial Mats, Physiological ecology of benthic microbial communities*, (Cohen, Y. y Rosenberg, E Eds.) American Society of Microbiology, pp. 255-276.
- Steinman, H. M. 1982. Superoxide dismutases: Protein chemistry and structure-function relationships, *Superoxide Dismutase*, vol. III Oberley, L.W. (Ed.) CRC PRESS Inc., pp. 11-68.
- Tandeau de Marsac y Houmard, J. 1988. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Methods in Enzymology*, vol. 167 pp. 318-328.
- Toledo, G.V.G. 1995. Actividad diazotrófica de cianobacterias asociadas a raíces de mangle negro (*Avicennia germinans*). Tesis de Maestría en Ciencias, CICIMAR, IPN, La Paz, B.C.S.
- Tovar, R.D. 1991. Aislamiento y caracterización de *Microcoleus* (Oscillatoriaceae:cianobacteria) de los tapetes microbianos de los canales de marea de San Carlos, B.C.S., México. Tesis de lic. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

- Tovar, R. D., Gonzalez, A. B., López-Cortés, A. y Ochoa, J. L. 1997. Effect of salinity and light intensity on Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase activity from *Microcoleus chthonoplastes* SC7B9002-01 Strain. International symposium on Marine cyanobacteria and related organisms, París, Francia.
- Vázquez-Juárez, R., Vargas-Albores, F. y Ochoa, J.L. 1993. A computer program to calculate superoxide dismutase activity in crude extracts. J. of Microbiol. Methods.
- Wachi, Y., Burgess, J.G., Takahashi, J., Nakamura, N. and Matsunaga, T. 1996. Production of superoxide dismutase by marine cyanobacteria. J. of Marine Biotechnology, vol. 3, pp. 258-261.
- Walter, H., Johansson, G. y Brooks, D. 1991. Partition in aqueous two-phase systems: recent results, an overview, Anal. Biochem., vol. 197, pp. 1-18.
- Wang, P. y Schellhorn, H. E. 1995. Induction to resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. Canadian Journal of Microbiology, vol. 41, pp. 170-176.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation gärungsfermen enolase. Biochem. Z. vol. 310, p. 384-421.
- Warwick, F., V. y Roos, J. C. 1996. Sensitivity to ultraviolet radiation in the polar environment: temperature-UV effects on the growth of antartic cyanobacteria. J. Phycology, supplement of vol. 32, no. 3, p. 49
- Waterbury, J. y Stanier, R. 1981. Isolation and growth of cyanobacterial from marine and hypersaline environments. Starr, M., Stol, P., Trüpper, H., Balows, A. y Schegel, H. (Eds.) The Prokaryotes a handbook on habitats, isolation and identification of cyanobacteria, pp. 220-223.
- Yumoto, I., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. 1990. Purification and characterization of catalase from facultative alkalophilic *Bacillus*. J. Biochem., vol. 108, pp. 583-587.

Anexo I.

Medio de cultivo ASN-III (Waterbury y Stanier, 1981).

Reactivos:	g/l
NaCl	25.0
MgCl ₂ 6H ₂ O	2.0
KCl	0.5
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.02
MgSO ₄ 7H ₂ O	3.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5
Acido cítrico H ₂ O	0.003
Citrato férrico de amonio	0.003
EDTA disódico	0.0005
NaCO ₃	0.02
Agua deionizada	1000 ml
pH	7.5

Metales traza A5 + Co	g/l
------------------------------	------------

H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ 4H ₂ O	2.419
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.494

Algunas cianobacterias, especialmente las marinas requieren de la vitamina B₁₂, por lo que fué utilizada para el cultivo de las cepas de este trabajo.

Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	10 µg/l
--	---------

Anexo II.**Ensayos enzimáticos.****Superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1).**

1) Técnica basada en la inhibición de la reducción del cloruro de azul p-nitrotetrazolio (NBT) ejercida por la SOD; esta reacción es seguida por espectrofotometría a 560 nm (Beauchamp y Fridovich, 1971).

Soluciones:

- 1) Amortiguador de fosfatos (titular 50 mM KH_2PO_4 con 50 mM KH_2PO_4 hasta alcanzar un pH de 7.8) 50 mM.
- 2) EDTA 1 mM
- 3) Metionina 0.13 mM
- 4) Riboflavina 0.2 mM
- 5) NBT 7.5 mM

Ensayo:

- Para preparar 100 ml de la mezcla de reacción se agregan 60 partes de la solución 1 y 10 partes de cada una de las soluciones restantes en un frasco obscuro.
- Se realizan diluciones de la muestra por duplicado utilizando la solución 1, de la siguiente forma:

solución 1 (µl)	muestra (µl)
100	0
90	10
75	25
50	50
25	75
0	100

- A cada dilución se le agregan 2 ml de la mezcla de reacción en la oscuridad.
- Se calibra el espectrofotómetro con la mezcla + 100 µl de la sol. 1 a 560 nm.
- Se leen todas las series a la misma longitud de onda (dato 1).

- Las soluciones se exponen a un campo luminoso uniforme de luz blanca hasta que el control (dilución sin muestra) alcance entre 0.20 y 0.25 de absorbancia.
- Se vuelven a leer las diluciones después de la fotorreacción (dato 2).
- Se restan los valores del dato 1 a los del dato 2 y con este resultado y la cantidad de proteína (mg/ml) se obtiene la actividad específica (Unidades/mg de proteína) de la muestra utilizando un programa de computación reportado por (Vázquez *et al.*, 1993).
- Una unidad se define como la cantidad necesaria de muestra para inhibir un 50% la reducción del NBT.

2) Técnica basada en la inhibición de la reducción del citocromo *c* por la SOD (McCord y Fridovich, 1969).

Soluciones:

1) Amortiguador de fosfatos (titular 50 mM K_2HPO_4 con 50 mM KH_2PO_4 hasta alcanzar un 7.8 de pH) 50 mM.

EDTA 0.1 mM

Xantina 50 μ M

Citocromo *c* 10 μ M

2) Xantina oxidasa, preparar antes de usar en agua deionizada fría con aproximadamente 0.05 unidades.

Ensayo:

- Calibrar el espectrofotómetro con celdas de plástico y agua destilada a una longitud de onda de 550 nm.
- Poner en la cuveta A 1,980 μ l de la solución 1 + 20 μ l de la solución 2, agitar y graficar el cambio de absorbancia por minuto (dA/min).
- El valor obtenido del cambio de absorbancia/min. será el control.
- El dA/min del control deberá estar entre 0.025 ± 0.005 , si no es así ajustar la concentración de xantina oxidasa.
- Poner en la cuveta B 1,970 μ l de la sol. 1 + 10 μ l de muestra y graficar al dA/min. Si el dA/min fuera un valor positivo restárselo a la siguiente medición.

- A la misma muestra agregar 20 µl de la sol. 2, agitar y volver a graficar.

Cálculo de la actividad de la muestra:

$$\% \text{ de inhibición} = A-B/A \times 100$$

$$\text{Unidades/ml} = \% \text{ de inhibición} / (50\%) (\text{ml de muestra})$$

$$\text{Unidades/mg} = (\text{Unidades/ml}) / \text{mg/ml de proteína de la muestra}$$

Una unidad se define como la cantidad necesaria de muestra para inhibir en un 50% la reducción del citocromo *c*.

Catalasa (E.C. 1.11.1.6).

La actividad catalasa fué detectada mediante la desaparición del peróxido de hidrógeno en solución amortiguadora y seguida a una longitud de onda de 240 nm (Boehringer, 1975).

Soluciones:

- 1) Amortiguador de fosfatos 50 mM, (50 mM K_2HPO_4 + 50 mM KH_2PO_4 hasta alcanzar 7.0 de pH).
- 2) 8 mM de H_2O_2 . 50 ml de la Sol. 1 + 600 µl de H_2O_2 al 30%, ajustar la concentración de peróxido en el espectrofotómetro a una absorbancia de 0.5 ± 0.01 a 240 nm.

Ensayo:

- Calibrar el espectrofotómetro en 240 nm con la solución 1.
- Agregar a una celda de cuarzo 1 ml de la solución 2 + 20 µl de muestra, agitar y graficar dA/min.
- Obtener el tiempo (segundos) necesario para que la absorbancia disminuya de 0.450 a 0.400.

Cálculo de la actividad de la muestra:

$$\text{Unidades/ml} = 5.66 \times 4.36 / t(\text{seg.}) \times 0.02$$

$$\text{Unidades/mg} = (\text{U/ml}) / \text{mg/ml de proteína}$$

Peroxidasa (E.C. 1.11.1.7).

La actividad peroxidasa se detectó por la velocidad de oxidación de un compuesto donador de electrones (guaiacol) en presencia de peróxido de hidrógeno y en solución amortiguadora (Boehringer, 1975).

Soluciones:

- 1) Amortiguador de fosfatos 100 mM, (100 mM K_2HPO_4 + 100 mM KH_2PO_4 hasta alcanzar 7.0 de pH).
- 2) Guaiacol 18 mM. 223 μl de guaiacol/100 ml de agua destilada.
- 3) Solución de H_2O_2 8 mM. 80 l de H_2O_2 al 30% en 30 ml de la solución 1.

Ensayo:

- Calibrar el espectrofotómetro con 3 ml de la solución 1 a 436 nm en cuveta de vidrio.
- Agregar a la cuveta 50 μl de la solución 2, 20 μl de muestra y comenzar la reacción con 40 μl de la solución 3, agitar y graficar dA/min.

Cálculo de la actividad de la muestra:

$$\text{Unidades/ml} = (3.11 \times 4/25.5 \times 0.02) \times \text{dA/min}$$

$$\text{Unidades/mg} = (\text{U/ml})/\text{mg/ml de proteína}$$

Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11).

La actividad ascorbato peroxidasa se detectó por medio de la técnica reportada por Nakano y Asada (1981), basada en la velocidad de oxidación del ascorbato en presencia de peróxido de hidrógeno y seguida a una longitud de onda de 290 nm.

Soluciones:

- 1) Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0.
- 2) H_2O_2 10.0 mM disuelto en agua destilada.
- 3) Ascorbato 5.0 mM (ácido L-ascórbico disuelto en la solución 1)

Ensayo:

- Calibrar el espectrofotómetro con la solución 1 a 290 nm.
- Agregar 840 μl de la solución 1
- 10 μl de la solución 3.
- 100 μl de muestra.
- Iniciar la reacción con 50 μl de la solución 2, agitar y graficar cambio de absorbancia/ min.

La actividad se reporta como dA/min y la actividad específica como (dA/min)/ mg de proteína.

Peroxidasa dependiente de O-dianisidina.

Soluciones:

- 1) Solución de 1 mg/ml de peroxidasa en agua; diluir 0.1 ml en 250 ml de agua antes de usarla.
- 2) Sustrato: se prepara un stock de peróxido de hidrógeno 30% diluyendo 1 ml en 100 ml de BP a 10 mM, pH 6.0 antes de usarse.
- 3) 1 % de O-dianisidina en metanol (hacerlo antes de usarlo y almacenarlo en frasco ámbar).

Ensayo:

- Agregar en un vial 50 μl de la solución 3 a 6 ml de la solución 2.
- Se utilizan 2.9 ml para el ensayo y el sobrante para calibrar el espectrofotómetro a 460 nm.
- Se agregan 100 μl de enzima diluída o muestra.
- Mezclar y graficar el cambio de absorbancia durante 1-2 min a intervalos de 15-20 s.

Cálculos de actividad de la muestra:

$$\text{U/mg} = \text{dA}_{460} \text{ nm/min} / 11.3 \times \text{mg de enzima/ml de mezcla de reacción}$$

Anexo III.**Determinación de proteína en base a la técnica de Lowry *et al.* (1951).****Soluciones:**

- 1). NaCO_3 al 2% en NaOH 0.1 N.
- 2). Tartrato de Na y K al 2% en agua destilada.
- 3). $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%.
- 4). Reactivo de Folin-Cicalteaus diluido una vez (v/v) con agua destilada.
- 5). Solución patrón de proteína (albúmina sérica bovina, BSA).

Mezcla de reacción: 98 partes de la solución 1, 1 parte de la solución 2 y 1 parte de la solución 3.

Realizar una curva tipo con la proteína patrón en los siguientes intervalos de concentración:

25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, colocar 200 μl de cada concentración en tubos de ensayo limpios. Al tubo testigo agregar 200 μl de agua destilada.

Agregar a cada tubo 1 ml de la mezcla de reacción, agitar evitando la espuma y dejar reposar 10 min.

Agregar 100 μl de la solución 4 y agitar nuevamente y reposar a temperatura ambiente durante 30 min.

Calibrar el espectrofotómetro en "cero" a 750 nm y leer las muestras.

En base a la curva tipo, calcular el contenido de proteína en cada muestra.

Determinación de proteína en base a la técnica de Bradford (1976).**Soluciones:**

- 1). Mezcla de reacción elaborada con 0.1 g de azul brillante de Coomassie G250 en 50 ml de etanol al 95 %, 100 ml de ácido fosfórico al 85 % y aforar hasta 800 ml con agua destilada.
- 2). Para realizar una curva tipo con esta técnica se utiliza también albúmina sérica bovina hasta una concentración máxima de 50 $\mu\text{g/ml}$ en intervalos de 10 μg .

Se colocan 250 μ l de muestra en tubos de ensayo y 1 ml de la solución 1, se mezcla y se lee en el espectrofotómetro a 595 nm, usando agua destilada en el tubo testigo.

Anexo IV.**Microscopía electrónica de transmisión.**

- 1) La cepa de *M. chthonoplastes* SC7B9002-1 fué crecida en agitación constante a 144 rpm, a 25 °C y una intensidad luminosa de $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 2) Por medio de centrifugación fué eliminado el medio de cultivo ASN-III y se fijó en la siguiente solución (Karnovsky, 1965) por 1 h a 4 °C: paraformaldehído 1.2 g, agua 20 ml, amortiguador de cacodilatos 15 ml, glutaraldehído (2.5 %) 5 ml y solución de calcio 0.4 ml (Mercer y Birbeck, 1979).
- 3) Se lavó en amortiguador de cacodilatos 0.1 M con pH de 7.3 durante 1 h a 4 °C.
- 4) La postfijación se llevó a cabo en Tetraóxido de Osmio al 1 % en amortiguador de cacodilatos (idem 2) durante 1 h a 4 °C, y después fué lavado rápidamente en agua destilada.
- 5) Deshidratación en etanol 70 % 10 min
 80 % 10 min
 95 % 10 min
 absoluto 3 x 20 min, a temperatura ambiente.
- 6) Impregnación en óxido de propileno 2 x 30 min. Oxido de propileno-medcast 1:1 3 h o toda la noche; medcast solo 3 h o toda la noche a temperatura ambiente.
- 7) Inclusión en Medcast nuevo.
- 8) Polimerización en una estufa a 60 °C por 12 a 24 h.
- 9) Contraste. Los cortes ultrafinos obtenidos, se trataron con acetato de uranilo al 2% durante 20 min, para posteriormente lavarse con agua destilada durante 2 min; un segundo agente de

contraste utilizado fué el citrato de plomo durante 20 min en una cámara de hidróxido de sodio para posteriormente lavar con agua destilada durante 2 min. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 100 B.