

110
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"LOCALIZACION Y CARACTERIZACION CINETICA
DE LAS CATALASAS EN EL ESTADO VEGETATIVO
Y ESPORA DE Bacillus cereus"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LAYLA MICHAN AGUIRRE



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**FACULTAD DE CIENCIAS
RECCION ESCOLAR 1992**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Benale
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Localización y caracterización científica de las catalasas en el estado vegetativo y esporas de Bacillus cereus."

realizado por Leyla Michén Aguirre

con número de cuenta 8831399-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. José Edgardo Escamilla Narvén
Director de Tesis
Propietario

Dr. Jesús Manuel León Cázares
Propietario
Biol. José Fernando Lledias Martínez
Propietario
Biol. Fernando Hernández Sánchez
Suplente
Dra. Patricia Guevara Fefer
Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

***A todos aquellos que con su actitud y empeño han hecho algo
por engrandecer el acervo de conocimientos, y por hacernos
conscientes de lo que representa la cultura.***

***Por ellos ahora tenemos una visión mas amplia
tanto de las dudas, como de las certezas.***

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A todos los maestros que han tenido que ver con mi formación.

A los que revisaron y criticaron mi trabajo

**Agradezco a DGAPA y a la Fundación UNAM,
por el apoyo recibido para la realización de esta tesis.**

**La presente tesis fue desarrollada en
El Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M.
bajo la dirección del
Dr. José Edgardo Escamilla Marván
a quién agradezco sinceramente su apoyo.**

**Muchas gracias a Ramón y Judith por ser lo mejor que tengo,
sin ustedes yo no estaría aquí,
simplemente no sería quien soy...**

**Muchas gracias a mi hermana
Shaday
por ser una amiga y colega incondicional,
por sus consejos y por compartir las alegrías y las tristezas.**

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
-Ciclo de vida	3
-Etapa lag y crecimiento logarítmico	3
-La esporulación	6
-La espora libre	12
-El exosporio	15
-La cubierta	17
-La corteza	17
-La pared de la célula germinal	18
-El citoplasma	19
-La germinación	20
La diferenciación celular	22
-Estrés oxidativo y diferenciación	23
-Las especies Reactivas de Oxígeno	25
-Los sistemas de producción de las ERO	29
-Las características de las ERO	29
-El radical hidróxilo	29
-El oxígeno singuleto	30
-El peróxido de hidrógeno	30
-El radical superóxido	31
-La superóxido dismutasa	34
-La catalasa	36
-Isoenzimas de catalasa	39
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODO	44
-Obtención de muestras de <i>Bacillus cereus</i>	44
-Ruptura de las células	46
-Cantidad de proteínas	47
-Determinación actividad específica de catalasa	47
-Electroforesis de muestras nativas en geles de poliacrilamida	48
-Determinación de isoenzimas de catalasa por medio de zimogramas	50
-Obtención de la catalasa de los tegumentos de la espora	51

- Inhibición de la catalasa con cianuro de potasio y azida de sodio	52
-Determinación de la Km de las isoenzimas de catalasa	52
-Termorresistencia de las isoenzimas de catalasa	53
-obtención del peso molecular	53
RESULTADOS	55
-Peso molecular de Cat-1 y Cat-2 de <i>Bacillus cereus</i>	56
-Extracción y localización de la Cat-2 de la espora de <i>Bacillus cereus</i> .	62
- Extracción y localización de la Cat-1de la espora libre de <i>Bacillus cereus</i>	63
-Zimogramas de catalasa	68
-Caracterización de las isoenzimas de catalasa de <i>Bacillus cereus</i>	70
Termorresistencia	71
Km y Vmax	72
Inhibición con cianuro de potasio	73
Inhibición con azida de sodio	74
DISCUSIÓN	76
- Expresión de la catalasa durante el ciclo de vida de <i>Bacillus cereus</i>	76
-Características de las isoenzimas de catalasa de la célula vegetativa y espora libre de <i>Bacillus cereus</i>	78
-Comparación entre la Cat1- y la Cat-2 de <i>Bacillus cereus</i> con la Cat-1 y LA Cat-2 de <i>Bacillus subtilis</i>	81
-Diferencias en la movilidad electroforética de los zimogramas <i>Bacillus cereus</i> revelados para catalasa	85
-Importancia biológica probable de la existencia de isoenzimas de catalasa en <i>Bacillus cereus</i>	87
CONCLUSIONES	88
PERSPECTIVAS	89
BIBLIOGRAFÍA	90

INTRODUCCIÓN

Hace aproximadamente 3,500 millones de años en el planeta se constituyeron los primeros organismos vivos, como resultado de los procesos de evolución química y biológica. Estos organismos fueron microscópicos, heterótrofos y anaeróbicos; ahora se les clasifica dentro del reino Monera, según Margulis y Schwartz (1988) y se divide en los subreinos eubacteria y arqueobacteria.

Dentro de las eubacterias, en la división Firmicutes, Phylum Aeroendoespora, se encuentra el género *Bacillus* (Margulis y Schwartz, 1988), que está formado por un grupo de organismos heterogéneo, que comprende microorganismos en forma de bastón que miden de 2 a 7 micras de longitud y 0.3 a 1.2 micras de diámetro, son quimiotrófos aerobios e incluyen especies tanto mesófilas como termófilas, acidófilas y alcalófilas. Una de sus características principales es la de formar esporas resistentes a las condiciones adversas del medio (Dworkin, 1985).

Este género se compone por un gran número de especies de gran importancia tanto científica médica como industrial, su ciclo de vida es corto, su producción en el laboratorio no es cara, de ellas se obtienen enzimas proteolíticas y amilolíticas, antibióticos, insecticidas y otras proteínas. Son un buen modelo de estudio para realizar análisis genéticos y bioquímicos debido a que son relativamente poco complejas. También existen algunas especies patógenas al hombre (Herwood, 1989).

Las especies de *Bacillus* se clasifican en 3 grupos, de acuerdo a la morfología de la espora. *Bacillus cereus* es una bacteria esporulante Gram positiva, clasificada dentro del grupo I por su espora elipsoidal con posición central, vive en el suelo, tiene movilidad debido a que posee flagelos peritricos, es aerobia facultativa y resistente a lisozima; es una bacteria mesófila con un crecimiento óptimo a 32 °C, pH 5.7, y con 7% de NaCl. La reproducción en esta especie, es como en todos los *Bacillus*, asexual por bipartición en la que los genóforos se desplazan asociados a invaginaciones de la membrana plasmática denominados mesosomas y parasexual por conjugación (Priest, 1969).

La espora en formación de *Bacillus cereus* se denomina endoespora, porque se forma dentro de la célula madre y permanece ahí durante todo el proceso de esporulación hasta su liberación.

Desde los años 50 la esporulación en *Bacillus* ha sido reconocida como un modelo adecuado para analizar la diferenciación en organismos procariontes al estudiar los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante la conversión de la célula vegetativa en una espora latente (Doi, 1969).

CICLO DE VIDA

Durante el crecimiento de un cultivo sincrónico de *Bacillus cereus* se pueden identificar las siguientes etapas que conforman su ciclo de vida: "fase lag" o de adaptación al medio, crecimiento logarítmico, etapa estacionaria, esporulación y germinación.

ETAPA LAG Y CRECIMIENTO LOGARÍTMICO.

En la fase denominada *lag* se lleva acabo el acondicionamiento de las células a las características del medio y no hay crecimiento poblacional significativo. Después de 30 minutos, tiempo aproximado que dura esta fase, las células se reproducen por división binaria y simétrica generando el crecimiento logarítmico de la población, como resultado de la abundancia de nutrientes en el medio de cultivo.

Las células vegetativas características de la etapa logarítmica, son inmóviles y se agrupan en cadenas formando filamentos largos. Cada célula está formada del exterior al interior por la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma.

La pared es una capa constituida de peptidoglucanos que representan el 50% del peso total de la célula formados por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por oligopéptidos, y mide de 20 a 50 nm de grosor. Está asociada a la membrana físicamente, y es la responsable de dar la forma, la rigidez y la fuerza mecánica a la bacteria, tanto, que la

célula es capaz de soportar hasta 20 o 25 atmósferas de presión (Archibald, 1989); incluso cuando se pierde el protoplasto, la pared mantiene su misma forma.

La membrana plasmática es una doble capa de fosfolípidos, con un grosor de 7 a 8 nm, que contiene del 50 al 70% de las proteínas totales de la célula. Como en todas las células es la encargada de regular la permeabilidad, y en el caso de las bacterias, es donde se encuentran ancladas una gran cantidad de enzimas metabólicas (Archibald, 1989).

El citoplasma contiene aproximadamente 76.6% de agua y dos cuerpos de cromatina compactos (genóforos) (Black y Gerhard, 1962).

En lo que respecta al metabolismo, *Bacillus cereus* es aerobia facultativa, cuenta con un sistema respiratorio ramificado; cada vía termina en una oxidasa diferente que reduce al oxígeno molecular en agua de acuerdo a las condiciones del medio; alguna de las rutas puede predominar sobre las otras. Las enzimas respiratorias están ancladas a la membrana plasmática, la mayor parte como proteínas integrales (Escamilla y Benito, 1984).

Algunas enzimas intracelulares, como las que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos están reprimidas al igual que otras extracelulares como las proteasas. Cuando *Bacillus cereus* crece en un medio con glucosa, se acumulan ácidos orgánicos como pirúvico y acético lo que provoca que el pH disminuya de 7.5 hasta alcanzar valores entre 6 y 5 (Hanson *et al.*, 1963).

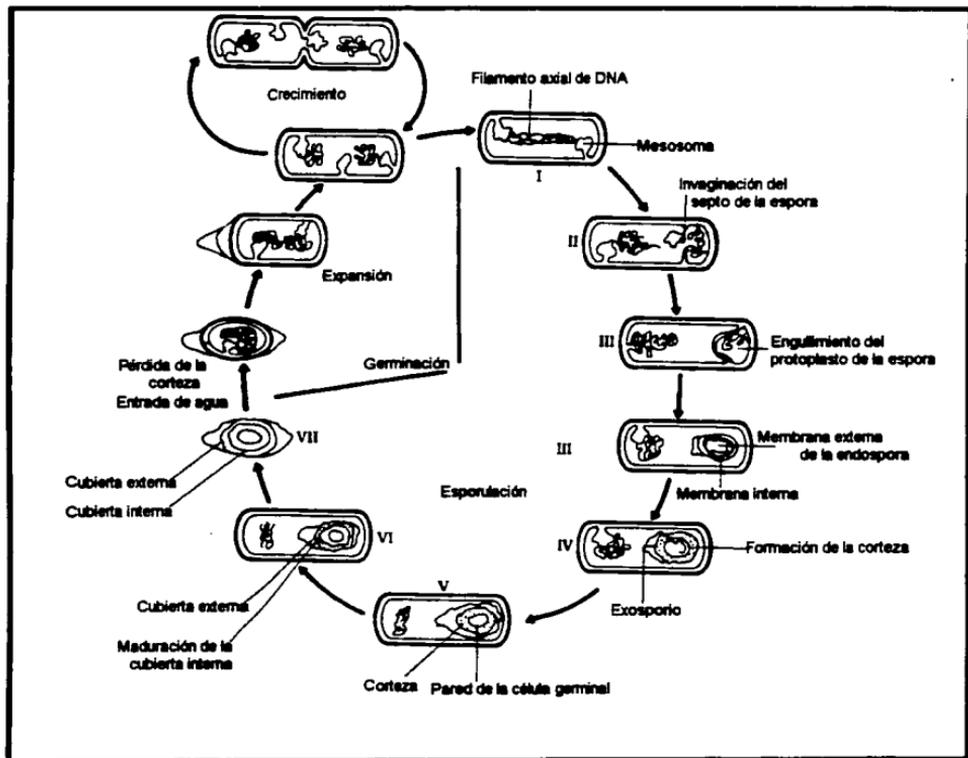


Figura 1. Ciclo de vida de *Bacillus* (Dawer y Sutherland, 1992).

ESPORULACIÓN

Por lo general en *Bacillus* la esporulación es un estado morfológicamente identificable. La formación de la espora se considera como el último recurso que tiene la célula para contender a una situación de estrés nutricional al que responde con el proceso de esporulación, durante esta etapa la célula se habilita para resistir periodos largos en condiciones poco propicias para el crecimiento, por ejemplo la carencia de metabolitos disponibles como fuentes de carbono o nitrógeno (Doi, 1989) (fig 2 y 3) .



Figura 2. Fotografía de *Bacillus cereus* en distintas etapas de esporulación. Microscopía electrónica, Instituto de Fisiología Celular.

Las ventajas de un organismo que está adaptado a vivir en ambientes con cantidades discontinuas de alimento son fáciles de entender; en el caso de algunos *Bacillus* cuando el alimento decrece, se desencadenan una serie de respuestas que producen la diferenciación celular.

La endospora fue descrita simultáneamente en 1876 por Ferdinand Cohn y Robert Koch. Hasta ahora el estudio de la esporulación bacteriana a nivel morfológico se ha detallado y completado gracias al aislamiento de mutantes con marcadores morfológicos y bioquímicos. La esporulación se divide en siete etapas basadas en las modificaciones citológicas que ocurren durante la formación de la espora. Para su estudio cada fase del desarrollo se ha relacionado con un tiempo en horas.

Así la etapa III ocurrirá hacia la tercera hora (t-3) a partir de que se inició la esporulación. El proceso de esporulación por lo general dura de 6 a 8 horas en condiciones óptimas de laboratorio (Doi, 1989).

Una descripción breve de los cambios morfofisiológicos que ocurren durante la esporulación según Dworkin (1985) se presentan en las figuras 2 y 3.

La etapa 0 se refiere a los bacilos en el estado de crecimiento estacionario, estado que se produce al final de la fase logarítmica, aproximadamente 30 minutos después de que el cultivo alcanzó el pH mínimo (Doi, 1989). En esta fase el crecimiento de la población se

detiene, debido a la ausencia de nutrientes, y se empiezan a dar los primeros cambios. Una de las primeras respuestas es la formación de flagelos y la disociación de cadenas multicelulares, así que las células se individualizan y adquieren alta movilidad. Este incremento en la movilidad permite a la bacteria buscar alimento y responder quimiotácticamente a fuentes potenciales de nutrientes. Aumentan los niveles de actividad de los citocromos, se activa la síntesis de las enzimas del ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones, así como varias enzimas extracelulares de tipo lítico. De tal forma que los ácidos orgánicos son utilizados como fuente de carbón y el pH del medio llega a valores cercanos a 7. Así, el reajuste de las enzimas metabólicas intracelulares permite a la célula utilizar otras fuentes de carbono (Doi, 1989) (Fig 3).

Entre las enzimas que se excretan en esta etapa, hay proteasas, nucleasas, amilasas, fosfatasas y otras enzimas hidrolíticas mismas que alcanzan polímeros y sustratos del microambiente, para degradarlos y convertirlos en monómeros, los cuales quedan a disposición de la célula (Srivastava y Fitz-James, 1981).

Si la célula al desplazarse encuentra suficiente alimento o sus enzimas extracelulares son capaces de hidrolizar suficientes polímeros, entonces la célula continúa reproduciéndose. De no ser así se inicia otra secuencia de procesos que dan como resultado la formación de una espora latente, capaz de germinar en pocos minutos cuando el medio es el apropiado (Freese, 1981).

En la etapa I el ADN se distribuye como un cordón axial, y afecta la tabicación simétrica, lo que inhabilita la fisión binaria habitual y permite la división asimétrica (Lutkenhaus, 1994).

Además se acumulan precursores de las proteínas de la cubierta, fosfatasa alcalina y DNAsa extracelular (fig 3).

Durante la etapa II una de las copias del ADN se condensa en uno de los polos y se lleva a cabo la formación de un septo, el cual divide asimétricamente a la célula en un compartimento pequeño denominado preespora y uno grande que se conoce como célula madre. Además hay síntesis de proteínas específicas que participan en la formación del septo y en la compartimentalización de la preespora. El septo finalmente se digiere por autólisis y se producen dos compartimentos independientes delimitados cada uno por la membrana plasmática, poco después la célula madre prolonga su citoplasma y envuelve a la preespora (fig 3).

En la etapa III la célula madre engloba completamente a la preespora y de esta manera la ahora llamada endoespora adquiere una membrana adicional con polaridad invertida (Freese y Heinze, 1963) (fig 3). Por esto la endoespora presenta una doble membrana que permite el paso de moléculas de la célula madre al citoplasma de la endoespora que se lleva a cabo por la ruta siguiente (Doi, 1969).

citoplasma de → membrana externa → membrana interna → citoplasma de
la célula madre de la endoespora de la endoespora la endoespora

Este es un estado crítico en la esporulación, pues sí, al cultivo se le adicionan nutrientes la célula ya no tiene capacidad de revertir el proceso.

En la etapa I3 se ha detectado un incremento de la actividad respiratoria de cerca de 10 veces, en el cual, el sustrato principal es el NADH (Escamilla y Benito, 1984).

Durante la etapa IV se inicia la formación de la corteza entre la membrana interna y la externa de la endoespora y se acumula el ácido 3-fosfoglicérico. Esta capa junto con la deshidratación y la alta concentración de compuestos de bajo peso molecular producen la refractibilidad de la espora que se empieza a ser evidente en esta etapa (Black y Gerhardt, 1962).

En el transcurso de la etapa V se deposita la proteína de la cubierta interna sobre la superficie de la membrana externa de la endoespora. Esta cubierta interna es una estructura de péptidos organizados en multicapas laminares.

El ácido dipicolínico (ácido dicarboxílico-2-6 piridina), es el componente bacteriano que se sugiere como participante en la latencia, resistencia al calor y germinación; se almacena desde esta fase de esporulación en adelante y es expulsado inmediatamente después de la adición de germinantes. En condiciones normales está presente en cantidades equivalentes a las del calcio y otros metales (Scott y Ellar, 1978).

En la etapa VI la cubierta externa se deposita sobre la superficie de la cubierta interna que consta también de una capa proteica. Posteriormente la endoespora es expulsada de la célula madre y entonces se le denomina espora libre (fig 3).

ESPORULACIÓN

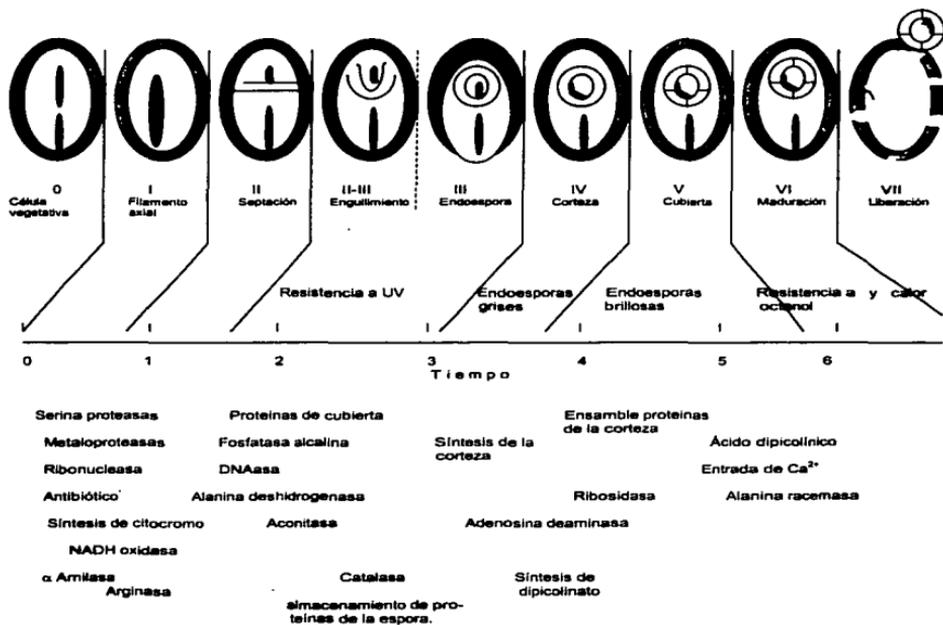


Figura 3. Esquema de las etapas morfológicas de la esporulación en *Bacillus* como se ve en el microscopio electrónico, modificado de Dworkin 1985.

El tiempo que dura el proceso la esporulación, bajo condiciones experimentales, depende de la cepa de *Bacillus* y del medio utilizado. La esporulación corre de manera sincrónica y es más eficiente cuando las células han crecido en un medio rico en nutrientes por un mínimo de seis a siete generaciones que se denominan transferencias y consisten en diluciones consecutivas del cultivo en crecimiento, para seleccionar a los organismos que crecen más rápido (Collier, 1957).

ESFORA LIBRE

Las esporas son formas de resistencia y dispersión producidas por muchas bacterias, protoctistas y hongos, no son células reproductoras, son más resistentes al calor, desecación, pH extremos y otras condiciones adversas en las que las células vegetativas no sobreviven. La formación de la espora es un proceso de división celular en el que ocurre diferenciación. (Parish, 1979).

La espora es una estructura unicelular, totipotencial que no se divide. Tiene la propiedad de sobrevivir a tratamientos que matarían a la célula en su forma vegetativa, de letargo y germinación. Letargo se refiere a la capacidad que tiene la espora de convertirse de latente a activa y germinar en presencia de sustratos exógenos. Son los tipos celulares que mantienen el nivel más bajo en su metabolismo (Dworkin, 1985).

En *Bacillus cereus* la espora es esférica, está formada por varias capas rodeando a un protoplasto que contiene sustratos de reserva rápidamente procesables y los elementos necesarios para realizar la biosíntesis y el metabolismo. Esta estructura tiene una alta concentración de Ca^{++} (del 1% al 3% del peso seco de la espora); mientras que el 10% del peso corresponde al ácido dipicolínico. Las proteínas de bajo peso molecular son abundantes, representan del 40% al 50% del total de proteína y presenta niveles bajos de ácido 3 fosfoglicérico (Dworkin, 1985) y 64.8% de agua (Black y Gerhardt, 1962).

El estado hipometabólico y las propiedades de resistencia se logran como resultado de la formación de una serie de tegumentos que rodean el protoplasto y que producen la inactivación de las macromoléculas. Unos cuantos compuestos de peso molecular bajo y algunas proteínas específicas del citoplasma de la espora, contribuyen a la estabilidad del estado de latencia y a las propiedades de resistencia de las esporas. La estructura y los compuestos presentes en la espora madura, a excepción del exosporio, muestran gran similitud entre las distintas especies aunque se postulan diferentes funciones y propiedades para algunas de ellas (fig 4 y 5).

Para explicar la resistencia de las esporas al calor se han propuesto dos teorías; ambas como resultado de procesos de adaptación. La primera postula que es consecuencia de la deshidratación y la segunda explica que es resultado de la reacción de estabilización producida por el calcio y el ácido dipicolínico almacenado (Gould, 1983 y Black y Gerhardt, 1962).

La estructura examinada de afuera hacia adentro por microscopía electrónica presenta secciones, las cuales se dividen según Dworkin 1985 en: exosporio, cubiertas, membrana externa, corteza, pared, membrana interna y citoplasma (fig 3 y 4).

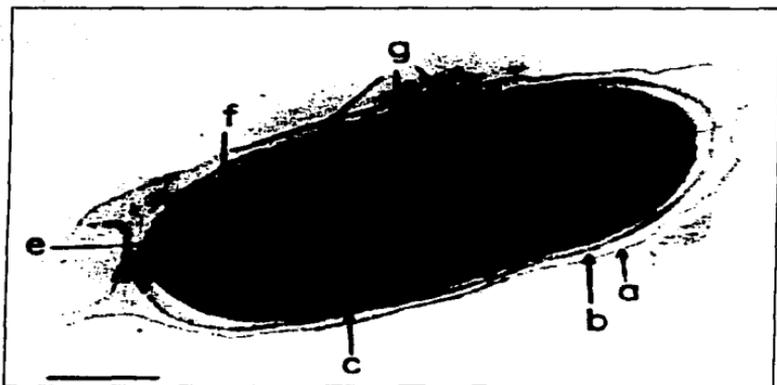


Figura 4. Micrografía electrónica de la espora de *Bacillus cereus* liberada en un estadio temprano ($T4^{1/2}$) a) exosporio, b) citoplasma de la célula madre que quedó atrapado entre el exosporio y la membrana externa, c) membrana externa, d) membrana interna, e) corteza, f) citoplasma, g) estados iniciales de formación de las cubiertas (Andreoli *et al.*, 1973). La escala de la línea representa $0.25 \mu\text{m}$.

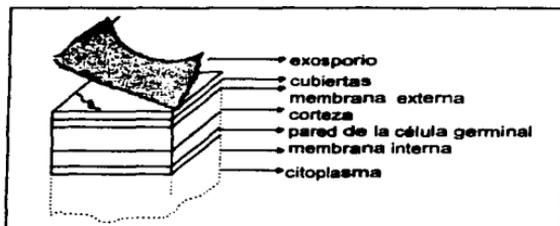


Figura 5. Modelo de un corte transversal de una espora madura de *Bacillus cereus*, se muestra las formas de organización de los tegumentos (Freese y Heinze, 1983).

Exosporio

El exosporio es una estructura transparente de apariencia membranosa que rodea totalmente a la espora de *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Clostridium sp.* es menos aparente en las esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* (Hanson, 1979).

Este tegumento en *Bacillus cereus* mide aproximadamente 500 Å, se encuentra formado por dos capas, una externa constituida por proyecciones velosas distribuidas irregularmente que tiene un grosor de 250Å, y está colocada sobre una cubierta intermedia de 60Å de profundidad y de apariencia similar; la capa interna consta de una superficie con poros hexagonales idénticos, con 75Å de centro a centro, formada por cuatro láminas que se pueden fragmentar como cristales y una membrana basal de 190Å de ancho; la permeabilidad del exosporio intacto corrobora que su superficie es porosa pues fácilmente la pueden atravesar diversas moléculas (Gerhardt y Ribí, 1964) (fig 6).

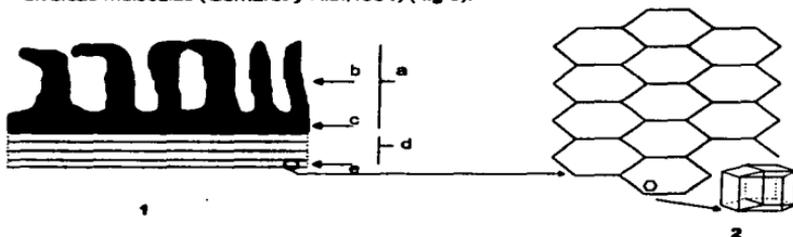


Figura 6. 1-Diagrama del exosporio de *Bacillus cereus* visto por microscopía electrónica. Está constituido por dos capas principales (a) y (d). (a) es una capa irregular formada por proyecciones velosas (b), y una capa intermedia (c) y la membrana basal (d) en donde se encuentra una de las cuatro láminas (e). El espesor de cada capa es: a=310Å, b=250Å, c=60Å, d=190Å y e=45Å.

2-Estructura de la membrana basal del exosporio obtenida por difracción de rayos x en donde se ve la perforación en hexágonos y comprimida en 4 láminas las cuales se pueden fragmentar en cristales (Gerharth y Ribí, 1964).

El exosporio constituye la entidad entre la célula y el medio, representa el 2% del peso seco de la spora intacta, contiene 52% de proteínas, 20% de polisacáridos, 12.5% de lípidos neutros, 5.5% de fosfolípidos y 20 % de ceniza (Matz *et al*, 1970).

En *Bacillus cereus* el exosporio se forma poco tiempo después del englobamiento de la spora, y la envuelve gradualmente. Las cubiertas de la spora se forman dentro del exosporio en desarrollo. Su función es probablemente la de concentrar las subunidades proteicas de las cubiertas, a medida que son sintetizadas, y para asegurar así su polimerización en la superficie de la endospora y no en otro sitio de la célula madre. Las proteínas que se encuentran en el exosporio son resistentes a proteasas como pronasa, tripsina y pepsina; y a otras enzimas como lipasa y lisozima y a reactivos como deoxicolato y 3 mercaptoetanol, lo que indica que es una estructura de defensa de la spora contra los efectos de las enzimas hidrolíticas (Cabrera *et al*, 1971).

El proceso de manipulación y lavado de las esporas así como su liberación, fuerzas físicas, tratamientos de sonicación, fricción y abrasión, producen la ruptura del exosporio que es muy delicado, quedando así como la zona de difusión efectiva la envoltura siguiente: la cubierta (Gerhardt y Ribí, 1964) (Cabrera *et al*, 1971).

Si el exosporio se trata con 1% dodecil sulfato de sodio (SDS) incubado a 37°C por 1 hora, se obtienen por electroforesis dos bandas principales, que corresponden al 15% del contenido original existente de péptidos en el exosporio (Cabrera *et al*, 1971).

Cubierta

La cubierta representa del 30% al 60% del peso seco de la espora, y cerca del 50% de su volúmen; además contienen más del 80% de las proteínas totales de la espora (fig 4 y 5).

Los estudios realizados en bacterias sin cubierta han demostrado que esta no es necesaria para la retención del ácido dipicolínico, ni para producir la refractibilidad o, la termorresistencia, pero su presencia hace al organismo resistente a la lisozima y a los solventes como el octanol y el cloroformo (Dworkin, 1985).

La composición química y la morfología de las capas de la cubierta de las esporas varían entre las especies. Al examinar las esporas de *Bacillus cereus* en secciones finas, al microscopio electrónico, se pueden observar tres capas distintas entre el exosporio y la corteza: una capa externa que forma parches, la segunda es una capa con orificios y por último la interna, esta capa consiste de un solo polipéptido que tiene un peso molecular de 12 kDa; rico en cisteínas, lo que produce la estructura terciaria al establecer puentes de disulfuro, interacciones hidrofóbicas y puentes iónicos entre el polipéptido (Dworkin, 1985).

Corteza

Como siguiente envoltura se encuentra la membrana, que separa a la cubierta de la corteza, está formada por una doble capa de fosfolípidos y tiene una polaridad inversa a la de la célula madre (Dworkin, 1985) (fig 4 y 5).

La corteza se ve al microscopio electrónico, como una región transparente limitada por la cubierta de la espora, es probable que cuando se depositan las capas de la cubierta en el exosporio quede atrapado material citoplasmático de la célula madre que se localiza entre la membrana externa y las cubiertas (fig 4 y 5).

En su mayoría la corteza está compuesta por un péptidoglucano modificado, con estructura diferente a la que forma la pared celular. Aparentemente, en la espora esta capa se sintetiza por la polimerización de disacaridopéptidos de manera semejante a la polimerización de la pared en la célula vegetativa (Dworkin, 1985).

La corteza es una estructura crítica para que se mantenga la esporulación y la estabilidad de la espora. Produce refractibilidad, da resistencia al calor y permite la retención del ácido dipicolínico y del calcio. La corteza se hidroliza por la acción de enzimas líticas durante el proceso de germinación, mientras que la pared persiste (Pearce y Fitz-James, 1971).

Pared de la célula germinal

Inmediatamente después de la corteza y sobre la membrana plasmática, está localizada la pared, que se sintetiza a partir de precursores provenientes del citoplasma, que se transportan a través de la membrana, está formada por péptidoglucano similar al de la pared de

la célula vegetativa; incluso se ha sugerido que al germinar la espora, ésta pared se desarrolla y da lugar a la pared de la célula vegetativa. La pared celular del protoplasto y la de la célula vegetativa son estructural y funcionalmente equivalentes (Dworkin, 1985) (fig 4).

La última capa colocada debajo de la pared es la membrana plasmática o interna, que tiene composición y función similar a la de la célula vegetativa (fig 4 y 5).

Citoplasma.

En el citoplasma se presentan enzimas, el aparato biosintético, coenzimas, nucleótidos y metabolitos, además de un solo genóforo. Las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que se encuentran en ella son esenciales para su viabilidad. Además, contiene una alta concentración de ácido dipicolínico y de calcio (fig 4 y 5).

En la espora latente hay pocas cantidades de nucleótidos de trifosfato, azúcares, nucleótidos de piridina, acetil-CoA, una carga energética muy baja y niveles altos de ácido 3 fosfoglicérico, así como las enzimas necesarias para convertir éste compuesto a acetato y CO₂ (Setow, 1981).

GERMINACIÓN

Este proceso se ha dividido en 3 etapas: activación, germinación y expansión (Setlow, 1963).

La activación es un proceso reversible, es el final de la latencia y resulta de la acción de tratamientos que por sí mismos no producen la germinación; pero capacitan a la espora para que germine más rápido. La activación se puede inducir con calor en niveles subletales, debido a que produce cambios en la estructura terciaria de las proteínas que mantienen el letargo (Keynan *et al* 1964). También la propician los detergentes, la exposición a pH bajos y los compuestos que contienen grupos sulfhidrilo o agentes oxidantes fuertes. No se conocen aún con detalle los cambios estructurales críticos que ocurren durante la activación (Dworkin, 1965).

La germinación se define como la conversión de la espora latente en una célula metabólicamente activa y sensible a condiciones extremas de pH, temperatura, desecación y falta de nutrientes. Comprende una serie de fenómenos degradativos irreversibles que se inician con la presencia de agentes específicos llamados germinantes (Hashimoto y Conti, 1971).

Las sustancias que se requieren para germinar esporas de *Bacillus* en el laboratorio son simples, difieren de una especie a otra. Un solo compuesto como la L-alanina, adenosina o

ribosa, más un amortiguador, son suficientes para una germinación óptima en muchas especies (Gould, 1983).

Existen germinantes nutrientes y no nutrientes. Dentro de los segundos se han reportado iones metálicos, agentes tensoactivos, dipicolinato de calcio y enzimas hidrolíticas como la lisozima; y tratamientos como la abrasión o deformación y la presión hidrostática a cientos de atmósferas. Estos factores físicos y químicos depolimerizan o dañan la estructura que requiere la espora para mantener el letargo y la resistencia (Gould, 1983).

En pocos minutos la resistencia al calor se pierde, cerca del 90% del calcio acumulado se libera (Yuan-Tay y Foegeding, 1991), el ácido dipicolínico y el ácido sulfoláctico son expulsados, los tegumentos se pierden, el péptidoglucano cortical es hidrolizado por la activación de nuevas enzimas líticas y los fragmentos solubles se arrojan al medio. El fosfoglicerato es metabolizado antes de que se inicie la síntesis *de novo* y se produce ATP antes de que se presente la síntesis de macromoléculas (Gould, 1983).

Durante este tiempo entra agua, la pared de la célula se adhiere al citoplasma de la espora germinada y la rodea. La célula se hincha y se vuelve metabólicamente activa; este proceso se conoce como expansión (Hashimoto y Conti, 1971).

DIFERENCIACIÓN CELULAR

La diferenciación celular es la transformación de un tipo de célula en otra, por la modificación de su forma y función, resultado de la interacción genoma-ambiente.

La diferenciación puede ser parte de un proceso de adaptación que permite al organismo sobrevivir en un medio crítico; aunque también se le considera como una parte integral de un ciclo de vida especializado que posibilita la realización de una tarea metabólica específica (Parish, 1979).

Cuando se expone un organismo a condiciones de estrés, éste responde rápidamente y adapta su metabolismo a las nuevas condiciones del medio. En microorganismos se ha observado que la diferenciación celular es inducida por diferentes niveles de estrés metabólico (Dowds *et al.*, 1987).

La diferenciación celular ha sido estudiada muy ampliamente debido al gran interés biológico y médico, desde muchos puntos de vista y se han propuesto muchas teorías; desde las que conceden mayor importancia a los genes hasta las que atribuyen el papel central al ambiente, o bien las que dan a los dos elementos el mismo peso.

ESTRÉS OXIDATIVO Y DIFERENCIACIÓN

Hansberg y Aguirre en 1990, proponen una explicación al fenómeno de la diferenciación celular en microorganismos. En el proceso de conidiación de *Neurospora crassa* existe un estado hiperoxidante relacionado con el proceso morfogénico. Al iniciarse la adhesión de las hifas, generarse el micelio aéreo y formarse las conidias, se ha detectado una oxidación general de proteínas, entre ellas algunas enzimas específicas. Así mismo se ha observado la pérdida del poder reductor celular, la emisión de luz relacionada a la generación de algunas especies reactivas de oxígeno y diversos cambios en los mecanismos antioxidantes de la célula (fig 7) .

Esto indica que las condiciones de tensión metabólica propician la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno, que al producirse por arriba de la capacidad antioxidante de la célula, generan un estado inestable (hiperoxidante) que induce a la célula a aislarse del oxígeno ambiental. Al responder a la condición hiperoxidante, la célula alcanza un estado estable diferente al que se le reconoce como un estado diferenciado (Hansberg y Aguirre, 1990).

Se postula que los organismos, a partir de su exposición a una atmósfera rica en O₂, desarrollaron sistemas antioxidantes capaces de contrarrestar el efecto de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Además, la estructura celular tiene características de protección antioxidante tales como: la alta eficiencia de la citocromo oxidasa en donar simultáneamente 4

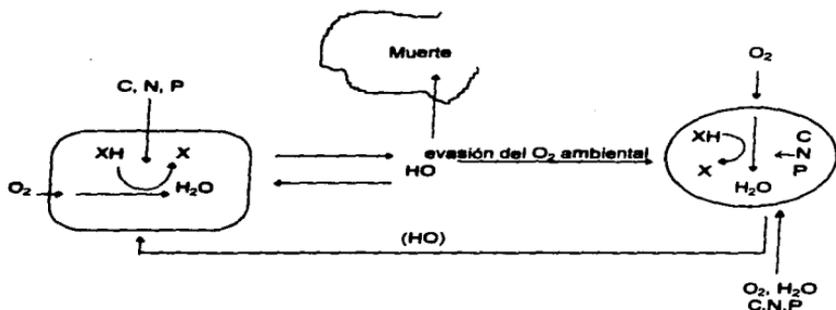


Figura 7. Modelo del ciclo de vida simple de un microorganismo de acuerdo con la teoría de Hansberg y Aguirre (1990). Símbolos: C, carbono, N nitrógeno, y P fuentes de fosfato. XH, disponibilidad de los scarreadores de electrones reducidos; X, scarreadores de electrones oxidados, HO estado hiperoxidante; (HO) posible estado hiperoxidante.

electrones al O_2 que lo transforman en H_2O ; el confinamiento de las enzimas generadoras de peróxido de hidrógeno en peroxisomas; la existencia de enzimas citosólicas y extracelulares con alta capacidad de formar complejos con el Fe^{2+} , Cu^{2+} y otros metales que forman radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Cuando se produce un desbalance entre la producción de ERO y la capacidad del organismo de neutralizarlos mediante los procesos antioxidantes, se genera un aumento en la concentración de las ERO, definido como una situación de estrés oxidativo. Esto puede ser resultado de que los sistemas de protección son insuficientes o están deteriorados, o bien de que las células se encuentran expuestas a factores externos que promueven la generación de las ERO (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las bacterias presentan sistemas adaptativos que contrarrestan los cambios drásticos producidos en el ambiente, por ejemplo: cuando se da un estrés oxidativo, se induce la expresión de algunos genes que sintetizan para enzimas, así como los mecanismos de reparación del DNA (Dempsey y Cuevas, 1991).

Las principales mecanismos antioxidantes son la catalasa, la superóxido dismutasa, las diferentes peroxidasa, las glutatión reductasa y los sistemas regeneradores del NADPH.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Un radical libre (R.L) es cualquier especie química, atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados. Ese o esos electrones generan un campo eléctrico que no es anulado, lo que ocasiona que la especie química sea paramagnética y por ende altamente reactiva. De los radicales que se producen como derivados de los elementos químicos, son importantes para los organismos vivos, los que generan el hidrógeno, el oxígeno, el carbono, el nitrógeno y los de metales de transición como el cobre y el hierro (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los R.L pueden obtenerse por la pérdida o ganancia de electrones de una especie no radical. Una molécula con enlace covalente, al romperse de manera homolítica también puede generar radicales libres cuando cada uno de los elementos unidos emigra con su propio electrón (Halliwell y Gutteridge, 1989)

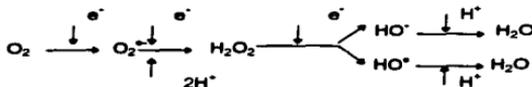
Según Halliwell y Gutteridge (1989), el oxígeno tiene una abundancia atómica en el planeta de 53.8%, corresponde al 21% del aire seco y está disuelto en todos los cuerpos acuíferos; se originó de la fotosíntesis oxigénica de cianobacterias hace más de 3,500 millones de años.

La molécula de oxígeno es considerada un birradical, debido a los dos electrones desapareados que se encuentran en los últimos orbitales (Farr y Kogoma, 1991). La disposición paralela que presentan dichos electrones disminuyen la habilidad de aceptar un par de electrones de otra molécula en la cual éstos se encuentran antiparalelos. Así la reducción del oxígeno se retarda por la aceptación de electrones de uno en uno y genera especies reactivas de oxígeno (ERO) (Halliwell y Gutteridge, 1989) (fig 8).

A pesar de que es uno de los elementos más abundantes en los seres vivos, es nocivo, debido a que a partir de él se generan las ERO. Esta teoría la propusieron R. Gershman y D. L. Gilbert en 1954 en los Estados Unidos de América; postula que el oxígeno es tóxico y que el mayor efecto dañino de este elemento se produce por medio de los radicales libres que se forman y propone que la formación del radical superóxido es el factor potencial del daño y que la superóxido dismutasa constituye la defensa esencial contra éste (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Es muy importante el estudio de las ERO debido al grave daño celular que causan, ya que todas las células de los organismos aerobios están sometidas a la generación endógena de radicales libres, los que provienen en su mayoría de la reducción parcial del O_2 utilizado por las células. El 21 % del O_2 tiene una pequeña manifestación de efectos dañinos (Halliwell and Gutteridge, 1984), entre un 2 y un 5% del oxígeno consumido, para las funciones metabólicas, genera radicales libres, los que pueden oxidar diferentes componentes celulares y afectar la estructura y/o función celular de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, azúcares, tanto dentro como fuera de las células, lo que conlleva a la destrucción de membranas y orgánulos (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Los intermediarios reactivos que se pueden generar por reducción parcial de éste elemento son: el superóxido O_2^- , radicales hidróxilo OH^\bullet , ión peróxido HO^- y peróxido de hidrógeno H_2O_2 (fig 8).



Los radicales libres por su reactividad existen en concentraciones muy bajas en las células (10^{-4} a $10^{-9}M$) y no viajan muy lejos del sitio donde se forman. Por ejemplo el radio promedio de acción del radical hidróxilo -el más reactivo- es de 30Å.

Pueden actuar como oxidantes y reductores. Cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical, puede formar otros radicales libres e inducir una reacción en cadena, lo que amplifica el fenómeno miles de veces (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Orbital

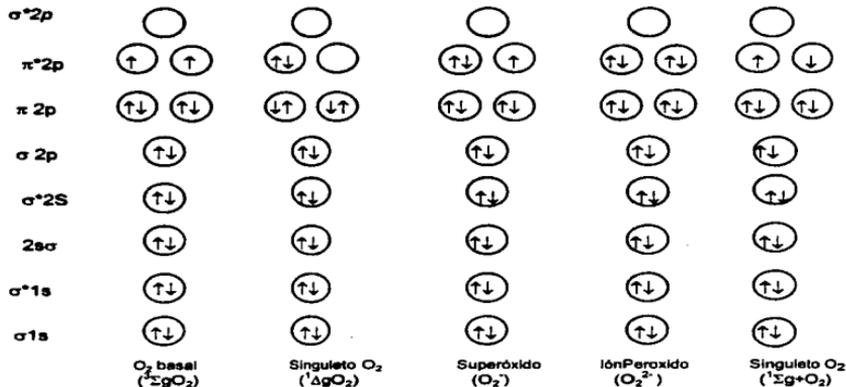


Figura 8. Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989).

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los agentes externos que generan ERO son: los metales de transición, rayos x, las radiaciones ionizantes, la luz y los rayos gamma, que actúan sobre el agua y las reacciones metabólicas en las que interviene el oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989). Los metales de transición son cofactores en el sitio activo de las enzimas de tipo oxigenasas y oxidasas, proteínas que facilitan los arreglos electrónicos que permiten la producción de las ERO.

También por el proceso de fosforilación oxidativa en el metabolismo celular, que conduce a la formación de agua, se forman las ERO, mismas que son transformados por la citocromo oxidasa. (Halliwell y Gutteridge, 1989).

CARACTERÍSTICAS DE LAS EROS

Radical hidróxilo

El radical hidroxilo es resultado de la reacción del peróxido de hidrógeno con un electrón y un protón, y por la ruptura homolítica del mismo que da lugar a dos radicales hidróxilo, por reacciones ionizantes o por calor. Su vida media es de 10^{-9} segundos y es un radical altamente electrofílico. Es uno de los compuestos más reactivos, reacciona en microsegundos con cualquier molécula cercana como: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y ácidos orgánicos, con los que forman R.L a partir de los elementos con los que reaccionó. Las células no cuentan con sistemas enzimáticos para usarlo como sustrato, sino que tienen mecanismos para prevenir su formación o para deshacerse de los que ya se han formado.

debido a esto, la mejor forma de evitar sus efectos es desechar el peróxido de hidrógeno con ayuda de catalasas o peroxidases (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Oxígeno singuleto

El oxígeno singuleto se produce mediante reacciones que invierten la rotación de uno de los electrones solitarios de la molécula. Por definición éste no es un radical libre, es una ERO que en los sistemas biológicos presenta alta reactividad (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 no es un radical pero es el principal promotor del radical hidróxilo. Su rompimiento está mediado por la catalasa y las peroxidases. Proviene principalmente de la dismutación del radical superóxido, además, es uno de los productos de las reacciones de la glucoato oxidasa, D y L-amino oxidasa y urato oxidasa (fig 9).

La reducción divalente del oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno ocurre en peroxisomas, orgánulos celulares especializados en plantas y animales que poseen, entre otras enzimas, amino oxidasas. Difunde a través de membranas con facilidad por lo que está en todos los compartimentos celulares. Reacciona con el Fe II y Cu I y forma el radical hidróxilo en la llamada reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1989). La formación de peróxido de hidrógeno por una oxidasa terminal, fue reportada por Denis *et al.*, 1989, en *Pseudomonas nautica* una bacteria marina (Denis *et al.*, 1989).

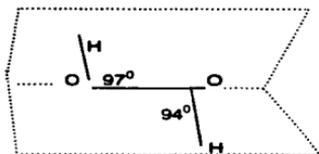


Figura 9. Estructura del peróxido de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Radical superóxido

El radical superóxido es producto de la incorporación de un electrón a una molécula de oxígeno. Se produce normalmente durante la fosforilación oxidativa. Por la dismutación que lleva a cabo la superóxidodismutasa se obtiene normalmente peróxido de hidrógeno y agua (con la participación de un electrón y dos protones). Varias enzimas catalizan la reducción univalente del oxígeno y dan lugar a este radical, como xantina oxidasa, glucoato oxidasas, urato oxidasa, NADPH oxidasa, aldehído oxidasa, flavin deshidrogenasa y algunas peroxidasas. Compuestos no enzimáticos como el par hidroquinona-semiquinona, mediante reacciones de autooxidación, que incluyen a las relacionadas con las catecolaminas, flavinas y las ferredoxinas, también son capaces de generar radical superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El O_2^- es muy estable en solución acuosa y en este medio tiene reactividad limitada, se dismuta espontáneamente en O_2 y H_2O a pH 7.4 a $2 \times 10^5 \text{ M sec}^{-1}$. (Roberts et al, 1991). Difunde a través de membranas y a distancias relativamente grandes. Cualquier sistema generador de O_2^- puede producir H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La mayor fuente de producción del radical $O_2^{\cdot -}$ en los seres vivos, es la cadena respiratoria principalmente en el complejo NADH-coenzima Q reductasa (ubiquinona) y en las formas reducidas de la coenzima Q (fig 11).

En la cadena de transporte de electrones el NADH es oxidado a NAD por un complejo multienzimático llamado "NADH-coenzima Q reductasa", en el que dos electrones pasan simultáneamente a la coenzima Q. El complejo reductasa contiene flavoproteínas (FMN en su sitio activo y no proteínas hemo-ferro, como los citocromos). La coenzima Q acepta electrones de la semiquinona y de las formas completamente reducidas, así como también de flavoproteínas reducidas, generadas por el ciclo de Krebs y de la β -oxidación de los ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge 1989) (fig 11).

De la coenzima Q los electrones pasan a través de otro complejo multienzimático (Coenzima Q citocromo c reductasa), que contiene citocromos b, y de ahí a otros citocromos para llegar al oxígeno que es el aceptor final.

Los citocromos son hemoproteínas que aceptan electrones por medio del Fe III, colocado en el centro del grupo hemo, que se reduce a Fe II; finalmente el citocromo c es oxidado por un complejo multienzimático "citocromo c oxidasa". Por cada 4 electrones consumidos por este complejo se reduce una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua (Halliwell y Gutteridge, 1989).

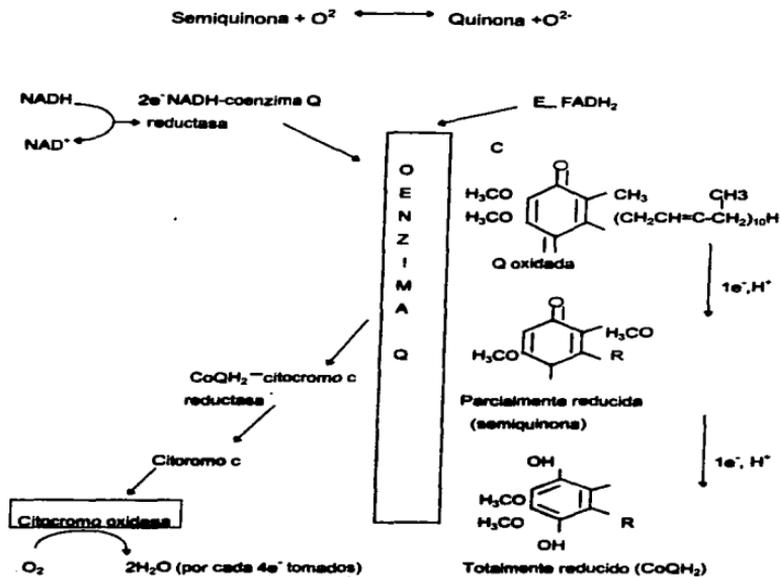


Figura 11. La cadena transportadora de electrones en el complejo NADH-Coenzima Q reductasa (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La ubiquinona es un complejo transportador de electrones no protéico, presenta gran movilidad dentro de la membrana y consta de un núcleo de 1, 4-benzoquinona. A diferencia del citocromo c que es muy eficiente como aceptor de electrones, la ubiquinona sólo acepta un

electrón a la vez, para llegar a dos, siendo por lo tanto generador de una gran cantidad de radicales superóxido.

El radical superóxido no es una especie particularmente reactiva, pero es potencialmente tóxica, debido a que es un sistema generador de peróxido, como resultado de dismutación no enzimática y por su capacidad de producir el radical hidróxido.

SUPERÓXIDO DISMUTASA

Fue descubierta en eritrocitos por Mc Cord y Fridovich en 1968. Es una proteína ubicua en los organismos aerobios, permite contrarrestar los efectos tóxicos del radical superóxido al eliminarlo por la dismutación en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Tiene como cofactor un metal de transición que facilita la transferencia de electrones (Roberts *et al*, 1991).

Su actividad depende de la concentración de O_2^- y del porcentaje de O_2 utilizado para hacer radical superóxido. La ecuación general de la reacción es la siguiente (Mc Cord y Fridovich, 1969):



Esta proteína ha sido clasificada en tres grupos: las que tienen como cofactor hierro, manganeso y cobre-zinc; las dos primeras se encuentran principalmente en procariotes y la

tercera en eucariotos. Los tres tipos parecen tener un mecanismo bioquímico y actividad similar aunque su estructura es diferente (Bannister *et al*,1991).

Las que presentan Fe y Mn son diméricas o tetraméricas y están formadas por subunidades de peso molecular cercano a 20,000 daltones (180 a 200 aminoácidos) y un Mn o Fe (Roberts *et al*, 1991), mientras que la de Cu/Zn se presenta en forma de dímero y pesa 34,000 con 0.34% de Cu (Mc Cord y Fridovich, 1989).

Únicamente se han reportado 3 casos en los que no hay superóxido dismutasa en algunas bacterias lácticas, *Lactobacillus garreri*, micoplasmas y ureoplasmas (Meier y Habermehl, 1991).

La evolución de la SOD está asociada a la integración del oxígeno en la atmósfera y a la presencia de los metales de transición en la biósfera, por lo tanto posiblemente esta enzima representó una de las primeras formas para contrarrestar la toxicidad del oxígeno en los organismos vivos (Bannister *et al*,1991).

La SOD, esencial para la vida aerobia, se induce cuando hay estrés oxidativo o térmico, el producto de su reacción es degradado por la catalasa por lo que están muy relacionadas funcionalmente (Bowler *et al*, 1992).

CATALASA

La catalasa es una enzima ubicua que está presente en los organismos aerobios con sistemas de citocromos, son excepciones los casos de *Euglena*, *Gleocapsa*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Bacillus popilliae* y varios parásitos helmintos que no la tienen, y se presenta en algunos organismos anaerobios estrictos como *Acetobacter peroxidans*, *Shigella dysenteriae* y *Propionibacterium shermanii*. Es principalmente una enzima intracelular (Halliwell y Gutteridge, 1989). Funcionalmente es similar a las peroxidasas y solo difiere de éstas en que únicamente es capaz de utilizar H_2O_2 como sustrato, su reacción general es la siguiente (Sharma et al, 1989).



La catalasa bovina purificada y cristalizada presenta una apariencia acicular, prismática o láminar, es una proteína tetramérica con peso molecular de 220 a 350 kDa. En cada una de sus subunidades de 60 kDa; presenta un grupo prostético de protoporfirina (protohemo) IX y una molécula de NADPH que le proporciona estabilidad. En forma de monómero presentan poca actividad catalítica y peroxidativa para una amplia gama de sustratos que incluyen NADH. Tiene una tirosina que actúa ligando al hierro del grupo hemo (Sharma et al, 1989).

El número de moléculas de peróxido de hidrógeno transformadas por molécula de catalasa bovina en un minuto es de 3.5×10^6 veces por segundo, lo cual indica su eficiencia (Deisserot y Dounce, 1970).

La catalasa destruye el peróxido de hidrógeno mediante dos tipos de reacciones, la primera lleva a cabo la formación de un complejo primario entre el peróxido de hidrógeno y el hierro del grupo prostético (Dounce, 1983).



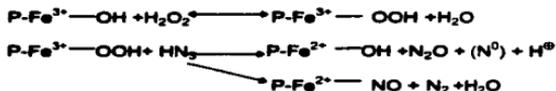
En la segunda reacción el llamado complejo primario reacciona con la segunda molécula de peróxido de hidrógeno, para producir la enzima libre, agua y oxígeno molecular como sigue:



La catalasa es una enzima que no se satura con sustrato dentro de un intervalo de concentración mayor de 5M de peróxido de hidrógeno y en contraste se inactiva rápidamente a concentraciones mayores de 0.1M de su sustrato. Debido a esto, la determinación de la Km es prácticamente imposible, pero se han propuesto algunos protocolos que permiten obtener medidas para comparar las cinéticas entre las distintas catalasas (Feuers *et al*, 1993 y Aebi, 1984).

Esta proteína se inhibe por azida de sodio, cianuro de potasio y más específicamente por 3-amino-1, 2, 4- triazol; es resistente a cloroformo. El cianuro de potasio compite con el peróxido de hidrógeno por la reacción de coordinación en la posición 6 del hierro de la hematina. Al aumentar la concentración de cianuro de potasio se puede incrementar la cantidad del complejo primario formado, si se aumenta la concentración de H₂O₂ pueden

desplazarse los componentes del cloruro de potasio existentes. Si lo que se agrega es azida de sodio la catalasa se reduce como indica la siguiente reacción.



La catalasa bovina se disocia por almacenamiento, cambios drásticos de temperatura, exposición a bajas temperaturas por tiempos prolongados y por acción de ácidos o álcalis (Deisseroth y Dounce 1970).

Las catalasas son un grupo de proteínas altamente conservadas. La forma más común es semejante a la que se presenta en los bovinos pero hay algunas excepciones como en *Escherichia coli* (Loewen y Switala, 1986) y *Bacillus subtilis* (Loewen y Switala 1988) donde se ha reportado que son hexaméricas con un hemo d-isómero, o como en *Lactobacillus plantarum* (Kono y Fridovich, 1983) que tiene un cofactor de manganeso en lugar de hierro.

ISOENZIMAS DE CATALASA EN LOS SERES VIVOS.

La hipótesis propuesta por Hansberg y Aguirre (1990) es apoyada por las siguientes observaciones realizadas en organismos que están expuestos al estrés oxidativo en los que se ha identificado la expresión diferencial de isoenzimas de catalasa.

En *Escherichia coli* hay 2 catalasas: la HP1(*kat G*) presente en el crecimiento y la HP11 (*katE*) que se induce en la fase de crecimiento estacionario por tensión metabólica (Hengge-Aronis, 1993).

En *Bacillus subtilis* se ha observado la presencia de 2 catalasas, Cat-1 identificable en el crecimiento y que se induce al final de la etapa exponencial (Loewen y Switals, 1987³); así como la Cat-2 que se induce en la esporulación. Las esporas sólo contienen Cat-2, las cepas mutantes que no esporulan, no presentan Cat-2 (Loewen y Switals, 1987²). Las dos enzimas han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente por Loewen y Switals (1987³ y 1988). La Cat-1 es un homohexámero de un peso molecular de 395 kDa, cada subunidad pesa 65kDa, su grupo hemo es protohemo IX, el intervalo de pH óptimo de actividad es en un intervalo de 5 a 11; la inhibición con cianuro de potasio es del 50% con 0.1mM y con azida de sodio se inhibe 50% con 0.002 mM. La Km es de 40.1mM y su termorresistencia de inactivación es del 100% a 65°C por 20 minutos (Loewen y Switals 1987³ y 1988).

La Cat-2 es un homohexámero con peso molecular de 504 kDa, el peso por subunidad es de 81 kDa, con un grupo hemo D, unido covalentemente a la proteína; el pH óptimo de actividad es de 4 a 12; la Km es de 78. Se inhibe el 50% con azida de sodio 0.006mM mientras que con cianuro se inactiva un 50% con 0.01 mM. Su termoresistencia es de 50% de inactivación a 93 °C por 4 minutos.

Tabla 1. Caracterización bioquímica de Cat-1 y Cat-2 de *Bacillus subtilis* (Loewen y Switals 1987³ y 1988).

Característica	Cat-1	Cat-2
Peso molecular (kDa)	395	504
Estructura cuaternaria	Homohexámero	Homohexámero
Peso por subunidad (kDa)	65	81
Grupo hemo	protohemo IX	hemo-D unido covalentemente a la proteína
Km para H ₂ O ₂ (mM)	40.1	78
Termoresistencia	100% inactivada a 65°C por 20 minutos	50% inactivada a 93°C por 4 minutos
Intervalo de pH óptimo de actividad	5 a 11	4 a 12
Inhibición por cianuro de potasio	50% con 0.1 mM	50% con 0.01mM
Inhibición por azida de sodio	50% con 0.002 mM	50% con 0.06 mM

En *Neurospora crassa* hay 3 catalasas, Cat-1 localizada durante el crecimiento, Cat-2 inducible en cultivos estacionarios y Cat-3 también encontrada en el estado estacionario pero con actividad principal en las conidias (Chary y Nativig, 1989).

En *Aspergillus niger* se han detectado 2 catalasas, una presente durante el crecimiento y otra que se induce durante la conidiación (Fowler *et al*, 1993).

La catalasa es una proteína altamente conservada, que potencialmente es aplicable en las reconstrucciones filogenéticas.

Con respecto a su origen y evolución se plantea que apareció hace aproximadamente 2,000 millones de años. Como resultado de los análisis moleculares, la genealogía de la catalasa, por el método de máxima parsimonia y por la distancia obtenida, muestran que todas las catalasas tienen un origen común y se pueden clasificar en dos grandes grupos de catalasas: las de los hongos y animales, que tienen un ancestro común y las de las plantas. En ambos casos se supone que se derivaron de ancestros procariotes diferentes. Por otra parte en las bacterias estas enzimas forman un grupo con origen polifilético bastante heterogéneo (Osowski *et al*, 1993).

Según Osowski *et al* (1993) se puede explicar porque la enzima, en los eucariotes, está en los peroxisomas lo que le proporciona un ambiente más controlado; en contraposición con la enzima en procariotes que se localiza en el citosol, en donde está sujeta a mayores variaciones "ambientales". Así que en los procariotes ha divergido más rápido, debido a que tiene mayor presión de selección que en los eucariotes.

HIPÓTESIS

Durante la esporulación y germinación de *Bacillus cereus* se presenta un incremento notable en la actividad de las rutas metabólicas oxidativas lo que da como resultado un aumento en el consumo de O_2 y en la producción de las ERO. Si existe variación en la concentración de las ERO en esas etapas, entonces se espera encontrar cambios significativos, en la naturaleza, localización y expresión de las posibles isoenzimas de catalasas existentes en la célula en crecimiento logarítmico y espora de *Bacillus cereus*.

Puesto que en *Bacillus subtilis* se ha reportado la expresión de dos catalasas, en *Bacillus cereus* posiblemente existan también dos isoenzimas de catalasa.

OBJETIVOS

- Identificar la posible existencia de isoenzimas de catalasa en la célula vegetativa y la espora de *Bacillus cereus*.
- Definir la localización de las isoenzimas de catalasa en la célula vegetativa y la espora de *Bacillus cereus*.
- Comparar las isoenzimas de catalasa presentes en la célula vegetativa y espora de *Bacillus cereus*.
- Caracterizar bioquímicamente las isoenzimas de catalasa presentes en la espora y en la célula vegetativa de *Bacillus cereus*.

MATERIAL Y MÉTODO

OBSTENCIÓN DE MUESTRAS DE *Bacillus cereus*.

Las células en etapa logarítmica y las esporas libres se produjeron a partir de la cepa silvestre de *Bacillus cereus* aislada y caracterizada por Andreoli (1973).

Para lograr el crecimiento de las bacterias en el laboratorio se utilizó el medio G (fermentable) descrito por Hanson (1963) y con el propósito de mejorar el rendimiento de la masa celular se aumentó al doble la concentración de sacarosa, levadura y fosfatos. Los componentes del medio fueron:

0.2% de extracto de levadura

0.2% de sacarosa

0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.1% de K_2HPO_4

0.02% de MgSO_4

0.005% de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.0025% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.0005% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.00002% de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.0005% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Los cultivos se hicieron en un biofermentador construido por el Centro de Instrumentos de la UNAM de 25 litros de capacidad, bajo condiciones aerobias, a temperatura de 30°C, con flujo de aire de 8 a 12 litros por minuto y una agitación de 250 rpm.

Para sincronizar los cultivos se siguió el método de Collier (1957) que consiste en dejar crecer el bacilo hasta la etapa logarítmica, de ésta se toma una alícuota y se transfiere a un matraz con medio G doble. Lo anterior se repite de 3 a 4 veces, con objeto de seleccionar así a los organismos que crecen más rápido y al mismo tiempo se sincroniza el crecimiento de las células en el cultivo. Con estas bacterias se inócula el 4% del volumen total del fermentador.

Durante el crecimiento bacteriano se midieron: la turbidez a 540 nm, el pH del medio y se observaron al microscopio óptico de contraste de fases.

La fase logarítmica se obtuvo a las 2 horas de haber inoculado el biofermentador. La etapa estacionaria se determinó cuando se registró el pH mínimo, que en este caso fue 6.3. El comienzo de la esporulación (fase t0) se consideró a los 30 minutos después de que el cultivo alcanzó el pH mínimo y se cosecharon células en la fase t3 del proceso de esporulación (3 horas después) y esporas (20 horas después). En los cuatro casos se obtuvieron 2 litros de muestra.

Para concentrar las muestras se centrifugaron en una centrífuga Beckman, en un rotor J2-21 a 5,000 rpm durante 10 minutos, se lavaron con agua destilada 3 veces y se almacenaron en congelación.

RUPTURA DE LAS CÉLULAS

Las células se rompieron por dos métodos según la etapa en la que se encontraba la célula. El primero se utilizó para bacterias en fase vegetativa o que se encuentran en las primeras etapas de esporulación, esta técnica consta de un proceso de descompresión, en el cual las bacterias se someten a presiones elevadas (30,000 lb/pulgada²) e inmediatamente después se pasan a presión atmosférica, esto se logra por medio del fraccionador de células RIBI.

El segundo método resulta efectivo para romper esporas libres, se realiza por medio del efecto de balística provocado al licuarse las esporas con perlas de vidrio de 150 a 212 μm de diámetro. Para esto se dieron pulsos de licuado de 30 segundos por 2 minutos de descanso hasta completar 10 ciclos. Con el uso de los aditamentos de la licuadora "Bead Beater" se pudo mantener el sistema a 4°C.

En ambos casos las esporas se suspendieron en amortiguador TCM (50 mM tris, 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2) y se les agregó 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonil) para evitar el efecto de las proteasas. Para eliminar la viscosidad de las muestras, provocada por la presencia de grandes cantidades de ácidos nucleicos, se añadió unos granulos de deoxirribonucleasa pancreática (DNA-100 Sigma Chemical Co.).

Se centrifugó a 166,000 g en una Ultracentrifuga Beckman L-60 y se recuperó el sobrenadante libre de membranas en el cual se encontraba la fuente de las catalasas.

CANTIDAD DE PROTEÍNA

La concentración total de proteína de las muestras se determinó como lo describe Lowry *et al* (1951) y modificado como lo reporta Markwell *et al* (1981), el cual tiene una sensibilidad de detección de 0.005 a 0.02 mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CATALASA

El método usado para conocer la actividad de la catalasa fue el descrito por Rorth y Jansen en 1967 y consistió en determinar la velocidad de producción del oxígeno molecular a partir peróxido de hidrógeno. Esto se logró con un oxígrafo Yellow Spring Modelo 57, conectado a un electrodo de Clark montado en una cámara de 3 ml de capacidad, y mantenida a una temperatura de 30 °C. El electrodo de Clark es sensible a la concentración (% de saturación) de O₂ disuelto.

Los ensayos que permitieron detectar la dismutación del peróxido se llevaron a cabo adicionando a la cámara lo siguiente:

- 1) 3 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 7.0, previamente burbujeadado con nitrógeno con el fin de disminuir lo más posible la cantidad de oxígeno presente en la cámara.
- 2) Un volúmen de la muestra a analizar (10 a 100 µl según el caso).
- 3) H₂O₂ a una concentración final en la cámara de 0.30 mM.

La actividad específica de la catalasa fue definida como la cantidad de nanoátomos gramo de oxígeno (natgO_2) que fueron producidos en un minuto por cada miligramo de proteína a 30°C .

ELECTROFORESIS DE MUESTRAS NATIVAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se hicieron geles nativos continuos a pH 8.1 según el método descrito por Davis (1964) y modificado por Hedrick y Smith (1968). En una cámara para electroforesis marca Hoeffer de 8 cm de ancho por 7 de alto.

El gel inferior o de separación se preparó a una concentración final de poli(acrilamida) de 8.5 % y el superior o concentrador, a 4.5%. Los geles fueron polimerizados a partir de una solución de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, amortiguador Tris 1.5 M, pH 8.1, a una concentración final, en ambos casos, de 0.35 M y agua destilada necesaria hasta alcanzar las concentraciones adecuadas.

Para catalizar la polimerización de la acrilamida se agregaron 75 μl de persulfato de amonio al 10 % y 10 μl de TEMED. El amortiguador que se puso en la cámara para el corrimiento estaba compuesto por TRIS 0.025 M y glicina 0.192 M a pH 8.5 .

Las muestras por analizar se diluyeron 1:1 con la siguiente solución: 10% de glicerol, amortiguador Tris 1.5 M pH 8.1 y 2.9 μM de azul de bromofenol con el fin de aumentar su

densidad y evitar que se diluyeran en el amortiguador de la cámara, así como para marcar el frente del corrimiento.

El campo eléctrico que se generó en las electroforesis fue a partir de una corriente constante de 3 miliamperios por centímetros de longitud del gel (21 a 25 miliamperios) por 3.5 horas.

Los geles fueron analizados con dos fines distintos: el primero para observar la presencia de isoenzimas de la catalasa en las distintas muestras y el segundo para visualizar las proteínas presentes.

Para las pruebas en las que se utilizó amortiguador de fosfatos, las concentraciones para el gel superior fueron de 0.75 M, para el inferior 0.217 M y para el amortiguador de corrida 0.217 M a pH 8.1. Para las electroforesis corridas con borato, se utilizaron las mismas concentraciones y condiciones que para las de fosfatos.

Para las electroforesis con los tres amortiguadores utilizados, también se probó precomerlas por 12 horas a 10 miliamperios a -4°C , para evitar cualquier variable que pudiera producir el persulfato de amonio. Precomer consiste en dejar el gel corriendo a corriente muy baja antes de añadir las proteínas.

DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS DE CATALASA POR MEDIO DE ZIMOGRAMAS.

Para obtener la actividad de las isoenzimas de catalasa se siguió la técnica descrita por Harris y Hopkinson (1976) modificado por Chary y Natving (1989), que consiste en la formación de bandas incoloras en un fondo azul oscuro relacionadas con la actividad de catalasa.

Ya extraído el gel de la cámara de electroforesis se enjuagó con agua destilada y se dejó incubando 15 minutos en una solución 30 μM de H_2O_2 , a temperatura ambiente. Por otra parte, al momento se prepararon dos soluciones; una con ferricianuro de potasio y otra con cloruro férrico; ambas de 1 gramo en 50 ml de agua destilada. Después se enjuagó el gel una vez con agua destilada y se le añadieron las dos soluciones anteriores previamente mezcladas.

El ferricianuro de potasio y el cloruro férrico precipitan en presencia del peróxido de hidrógeno que tinte de azul el fondo del gel. En las zonas donde no existía H_2O_2 , debido a la acción de la catalasa, no hubo precipitación y las bandas quedaron incoloras. Así cada banda incolora manifiesta la presencia de actividad de catalasa y cuando hay más de una banda, la presencia probable de isoenzimas.

Una vez obtenido el contraste deseado, la tinción se detuvo con una solución de ácido acético 10% y metanol al 30%, para evitar la precipitación del colorante.

OBTENCIÓN DE LA CATALASA DE LOS TEGUMENTOS DE LA ESPORA.

Las esporas se obtuvieron a partir de un cultivo de 5 litros de células, se centrifugaron a 9,000 rpm por 10 minutos para sedimentar las esporas; se lavaron 5 veces con agua destilada y se resuspendieron en amortiguador TCM. Posteriormente fueron tratadas con varios tipos de detergentes como: AOT (dioctil sulfosuccinato) al 2%, tritón al 2%, 0.5% SDS (Dodecil sulfato de sodio), 2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), colato de sodio al 2% y una sal billar, peryodato de sodio al 2%.

Para la obtención de la catalasa de los tegumentos, se probaron 3 técnicas: En la primera se prepararon 5 gramos de esporas en 10 ml de la solución con amortiguador TCM con 1% del agente perturbador de membrana (detergente o sal billar que afecta a las membranas celulares) y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos. El segundo método usado fue por sonicación. La misma cantidad de esporas se suspendieron en amortiguador y en los mismos agentes perturbadores de membrana al 1%, se trataron en un sonicador Fisher Scientific 550 a 10 de potencia por 30, 60, 90, 120 y 150 segundos y se centrifugaron en una centrifuga clínica.

El tercer método consistió en poner la misma cantidad de esporas en las mismas soluciones pero se agitaron durante una hora, a temperatura ambiente y se centrifugaron en una centrifuga clínica.

En los tres casos al sobrenadante se le midió actividad específica y se corrió en electroforesis.

INHIBICIÓN DE LA CATALASA CON CIANURO DE POTASIO Y AZIDA DE SODIO

La caracterización con cianuro de potasio y azida de sodio se realizó determinando la actividad de la catalasa a partir de la producción de oxígeno según el método de Rorth y Jansen 1967. Se usaron como inhibidores, ya fuera cianuro de potasio a 0, 0.5, 5, 10, 50 y 200 μM ó azida de sodio a 0, 0.1, 0.5, 1 y 10 μM concentración final en amortiguador de fosfatos. La inhibición a cada concentración del inhibidor, se calculó a partir de la actividad resultante comparada con un control sin inhibidor.

DETERMINACION DE LA K_m DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA.

La K_m se determinó con la misma técnica mencionada en la obtención de la actividad específica de la catalasa con las siguiente modificación; se midió la actividad a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mM. Los resultados se procesaron en el programa de computación de regresiones no lineales "Enzfiter" y por regresión lineal.

TERMORRESISTENCIA DE LAS ISOENZIMAS DE LA CATALASA

La termorresistencia se determinó por la actividad específica de la catalasa por oximetría, después de someter la preparación de catalasa a tratamientos de calor a 60° C, a intervalos de 0 a 10 minutos. La inactivación resultante se calculó de la misma manera que se hizo con la inhibición con cianuro de potasio o azida de sodio.

OBTENCIÓN DEL PESO MOLECULAR

El peso molecular aparente fue obtenido por cromatografía, se usó una columna de filtración molecular de 1m de largo por 0.8 cm de diámetro, que contenía Ultrogel-ACA 34, con un intervalo de separación para moléculas de 20 kDa a 350 kDa, equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 4. La elución fue montada en un espectrofotómetro Uvicord de flujo continuo, con un filtro de 277 nm. Se calibró para peso molecular con azul de dextrano (2,000,000 kDa), citocromo c (12 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) catalasa bovina (240 kDa) y ferritina (443 kDa). Todo el proceso se llevo a cabo a 4 °C.

Para la determinación del peso molecular, los resultados se procesaron de acuerdo a la siguiente fórmula: $K_{av} = (V_1 - V_0) / (V_t - V_0)$, donde V_1 es igual al volúmen de elución de la muestra, V_0 es el volúmen de elución del azul de dextrano y V_t es el volúmen total de la columna ($\pi r^2 h$).

El valor de K_{av} se graficó contra el logaritmo del peso molecular de cada una de las proteínas usadas en la calibración. A partir de la curva se calculó la regresión lineal y así se determinó el peso molecular de las isoenzimas.

Las fracciones obtenidas por este método se sometieron a la prueba de actividad específica de catalasa por el método de Rorth y Jansen (1967). Para el zimogramas se utilizó la técnica de Chary y Natving (1989).

RESULTADOS

Para identificar el número de isoenzimas presentes en *Bacillus cereus* se hicieron cultivos de las fases inicial, media y final del ciclo de vida. Así, se cosecharon células en crecimiento logarítmico (3 horas posteriores de la inoculación); células en t0 y t3 de esporulación y esporas libres obtenidas al cabo de 18 horas de inoculado el medio, las etapas se determinaron a partir de la cinética de crecimiento del cultivo (fig 12).

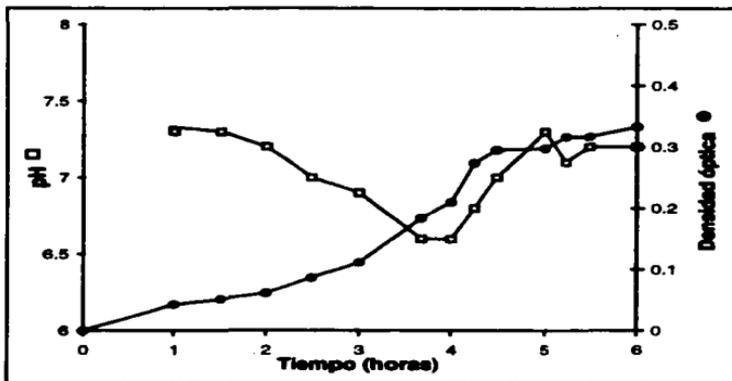


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Bacillus cereus* en medio G doble, a 30 °C, agitado a 250 rpm, con flujo 8 litros de aire por minuto.

Los tres extractos obtenidos se corrieron en electroforesis y se revelaron para hacer evidente la catalasa. Se detectaron dos isoenzimas de catalasa, la banda con mayor movilidad electroforética se presentó en los extractos de células logarítmicas t0 y t3, y se denominó Cat-1. En las esporas se observó una segunda banda a la que se le llamó Cat-2 (fig 13). Esta nomenclatura se hizo de acuerdo a la utilizada por Loewen y Switala (1988), para las catalasas de *Bacillus subtilis*.

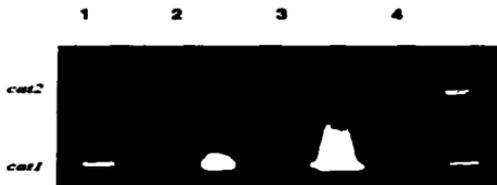


Figura 13. Zimograma de las catalasas presentes en diferentes etapas del ciclo de vida de *Bacillus cereus*. Las muestras fueron preparadas a partir de células cosechadas en las siguientes etapas: carril 1-crecimiento logarítmico, carril 2-t0, carril 3-t3 de esporulación y carril 4-esporas libres.

Con base en estos primeros resultados se procedió a estudiar con más detalle a las catalasas presentes en la etapa inicial y terminal del proceso de diferenciación celular, que corresponden a la célula vegetativa y la espora libre respectivamente, en donde fue evidente una expresión diferencial de las isoenzimas de catalasa (fig 13).

PESO MOLECULAR DE Cat-1 Y Cat-2 DE *Bacillus cereus*.

Para caracterizar las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*, se determinó el peso molecular de ambas proteínas. Para esto se utilizó una columna ACA-34 la cual fue previamente calibrada con proteínas de peso molecular conocido; así, se midió el volumen de

elución para cada una de las siguientes proteínas: citocromo c de caballo, ovoalbúmina, catalasa bovina, y ferritina (tabla 2 y fig 14).

Posteriormente se aplicó 1.5 ml del extracto de células en crecimiento logarítmico (diluido 1:2 con amortiguador), con el fin de obtener el peso molecular de Cat-1.

Una de cada 10 fracciones colectadas fueron analizadas para medir la actividad de la catalasa. Cuando se detectó actividad en una fracción; se midió también con detalle la actividad de las muestras más próximas. La curva de actividad relativa y los zimogramas se presenta en las figuras 15,16, 17 y 18.

El volúmen de elución de la catalasa se consideró como el volúmen de la fracción que contenía la mayor actividad de esta enzima. El análisis zimográfico (electroforesis en gel de poliacrilamida) se inició con las fracciones que conformaron el pico de la actividad eluida a partir de la columna (fig 15). Se tomaron alícuotas de las siguientes fracciones: 210 ml, 212 ml, 214 ml, 218 ml y 220 ml. Los zimogramas obtenidos para cada fracción se pueden observar en la figura 16 y 18.

Los datos obtenidos de la filtración molecular se procesaron de acuerdo a la fórmula descrita en el material y método en la página 49, se obtuvo el logaritmo del peso molecular contra el volúmen de elución (K_{av}) de cada una de las muestras, esta relación se graficó y dio como resultado una línea recta (fig 17).

Como se ve en la figura 19 solo se presentó una banda de actividad, correspondiente a Cat-1, en todas las fracciones que se analizaron.

Tabla 2. Características de elución de las proteínas usadas para la calibración de la columna ACA-34.

Proteína	Log PM	* Kav	Peso molecular
Citocromo C	4.09	0.83	12 384
Ovoalbúmina	4.65	0.62	45 000
Catalasa bovina	5.38	0.38	240 000
Ferritina	5.64	0.31	443 000
Cat-1	5.48	0.33	*307 000
Cat2-Cat1	5.48	0.34	*307 000

Kav es igual a la diferencia entre el volúmen de elución de la muestra y la de el azul de dextrano entre la diferencia del volúmen de elución del azul de dextrano y de la columna.

*Peso molecular estimado a partir de la gráfica que se presenta en la figura 17.

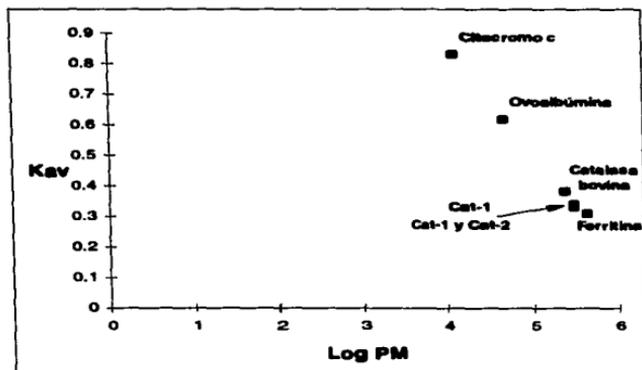


Figura 14. Calibración de la columna ACA-34 en la que se determinó el peso molecular aparente de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*. El peso de Cat-1 y Cat-2, se obtuvo a partir de los volúmenes de elución de la actividad de catalasa presente en extractos de células vegetativas y de esporas libres respectivamente.

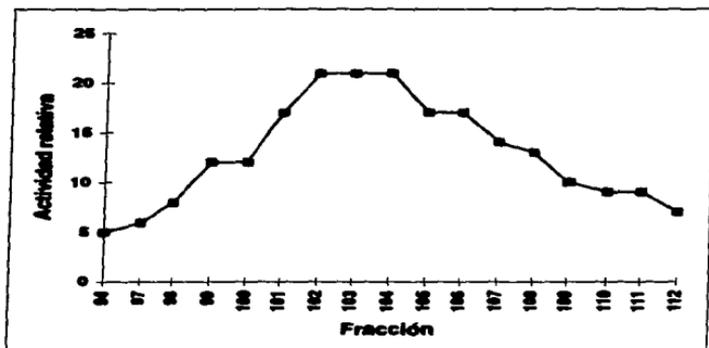


Figura 15. Perfil para la actividad relativa de catalasa de las fracciones obtenidas de la filtración molecular de extractos de células en fase de crecimiento logarítmico de *Bacillus cereus* en una columna ACA-34.



Figura 16. Zimograma las fracciones 210, 212, 214, 216, 218 y 220 obtenidas por filtración molecular de los extractos de células en crecimiento logarítmico de *Bacillus cereus*; en donde se identifica la única banda perteneciente a Cat-1. El número de la fracción representa el volumen de elución que corresponde a los mismos datos presentados en la figura 15.

El peso molecular aparente de la Cat-2 se determinó de la misma forma que para la Cat-1, 1.5 ml de extracto de esporas completas (diluído 1:2 con amortiguador), a las fracciones se les midió la actividad específica para catalasa por oximetría y se separaron por electroforesis. En las figuras 17 y 18 se muestran los resultados de ambas pruebas.

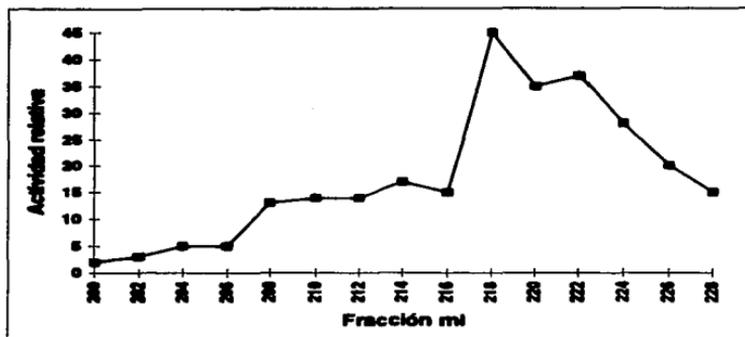


Figura 17. Perfil para la actividad relativa de la catalasa de las fracciones obtenidas por la filtración molecular del extracto de esporas completas de *Bacillus cereus* en una columna ACA.34.

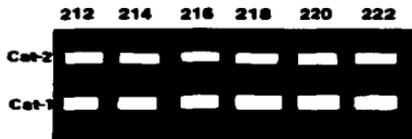


Figura 18. Zimograma de las fracciones 212, 214, 216, 218, 220 y 200 ml obtenidas de la filtración molecular del extracto de esporas completas de *Bacillus cereus*. Se puso en todos los carriles la misma cantidad de la muestra. los volúmenes de elución corresponden a los que se muestran en la figura 17.

Al observar la gráfica de elución del extracto de las esporas (fig 17), se distingue un pico asimétrico, lo que hace suponer que la Cat-1 y la Cat-2 se habrían separado; posiblemente una de las catalasas se encontraba entre las fracciones 208 ml y 216 ml y que la otra estaría entre los 212 ml y 228 ml aproximadamente, entonces se realizaron los zimogramas de las fracciones desde 212 ml hasta 222 ml para tratar de visualizar a las catalasas presentes.

En el zimograma de las fracciones analizadas (fig 18), se puede ver que no parece haber diferencia en el contenido de las bandas de actividad presentes para la Cat-2; se esperaba encontrar en las primeras fracciones solo una banda, posiblemente la Cat-2 por su menor migración y en las finales la Cat-1 como única banda. Sin embargo se presentaron 2 bandas en todas las fracciones con la misma intensidad. Este resultado sugiere que la Cat-1 y la Cat-2 tienen un peso molecular cercano y por lo tanto eluyen juntas.

De acuerdo a la filtración molecular para la Cat-1 del estado vegetativo, el volumen de elución fue de 216 ml y para las isoenzimas de la espora libre la Cat-1 y la Cat-2 de 218 ml, lo que correspondió a una K_{av} de 33 y 34 respectivamente (tabla 1).

Las K_{av} obtenidas de las isoenzimas de la catalasa de *Bacillus cereus* se extrapolaron en la curva de calibración de la columna, con base en lo anterior se obtuvo un peso molecular aparente de 307 kDa tanto para la Cat-1 como para la Cat-2 (fig 14).

EXTRACCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE Cat-2 DE LA ESPORA DE *Bacillus cereus*.

El estudio de la localización subcelular de las isoenzimas de catalasa en la espora latente, se llevo a cabo de la siguiente manera: como una primera acción, el exosporio se eliminó mediante un tratamiento con 1% de SDS para evitar la interferencia producida por las proteínas. Posteriormente se rompieron las esporas y se obtuvo el sobrenadante.

Se realizó el zimograma de estos extractos de esporas tratadas con SDS y se observó una banda, que coincidió con la de menor migración identificada como la Cat-2 (fig 19).

Entonces se pensó que posiblemente la Cat-1 se encontraba en el exosporio y por lo tanto, había sido eliminada por la acción del detergente y que la Cat-2 se localizaba en el citoplasma. Sería fácil caracterizar a la Cat-2 de la espora dado que el tratamiento con detergente permitió obtener una preparación de la Cat-2 libre de la interferencia de la actividad de Cat-1. Así que ya se contaba con una técnica adecuada para aislar la Cat-2 de la espora.

Sin embargo, el mayor problema resultó ser la actividad baja de Cat-2 de la espora. Los extractos obtenidos no contenían la suficiente actividad para su detección durante la cromatografía en la columna de filtración molecular. Así que no fue posible, después de varios intentos localizar la actividad de Cat-2 en las fracciones eluidas de la columna. Se decidió desistir y tomar como buenos los resultados obtenidos para las muestras de las esporas no tratadas con detergente que contenían Cat-1 y Cat-2 donde se determinó un peso de 307 kDa.

Para definir la localización de la Cat-1 en la espora, se realizaron una serie de ensayos que en seguida se describen:

EXTRACCIÓN DE Cat-1 DE LA ESPORA LIBRE DE *Bacillus cereus*.

El protocolo para la obtención de la Cat-1 de los tegumentos incluyó diversos agentes perturbadores de membrana como SDS, AOT, Tritón, CTAB, colato de sodio, peryodato de sodio, a una concentración del 1% en amortiguador TCM; a los que se agregaron las esporas completas. Cada muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Al sobrenadante se le determinó la actividad específica de la catalasa. La prueba resultó ser positiva para las muestras que habían sido sometidas a el tritón X-100, el colato de sodio y el peryodato de sodio.

Posteriormente para tratar de mejorar el rendimiento en la extracción de la enzima se sonicaron las esporas por 1 minuto en presencia de los mismos agentes perturbadores de membrana utilizados en el ensayo anterior y a los extractos resultantes se les midió la actividad específica, que en todos los casos dió positiva. Estas muestras se corrieron en una electroforesis, en el zimograma fueron evidentes en todos los casos el mismo patrón: varias bandas en cada carril, resultado de la ruptura de las esporas.

Para determinar si la sonicación provocaba la disociación de las proteínas y por lo tanto el bandedo múltiple en el zimograma, las esporas se sometieron a sonicación en amortiguador TCM, durante 30 segundos, 1, 1.5, 2, 2.5, y 3 minutos. Se les midió actividad específica y se corrieron en electroforesis, en las que aparecieron el mismo número de bandas colocadas en forma similar (fig 19).



Figura 19. Zimograma de algunos tratamientos para obtener la catalasa de tegumentos y Cat-2 de *Bacillus cereus*. carril 1- Cat-1 de tegumentos de la espora, se extrajo con Tritón X-100 y agitación por una hora; carril 2- esporas con amortiguador sonicadas por 30 segundos, se puede ver el bandedo múltiple de la proteína producida por sonicación; carril 3-esporas con amortiguador agitadas por 1 hora; carril 4-Cat-2, se extrajo de esporas rotas previamente tratadas con SDS; carril 5-la Cat-1 se obtuvo del extracto de células en crecimiento logarítmico.

La actividad específica de la catalasa aumento hasta los 3 minutos, a partir de los cuales se estabilizó (fig 20). Los zimogramas de los extractos de las esporas sonicadas presentaron también una gran cantidad de bandas (fig 19).

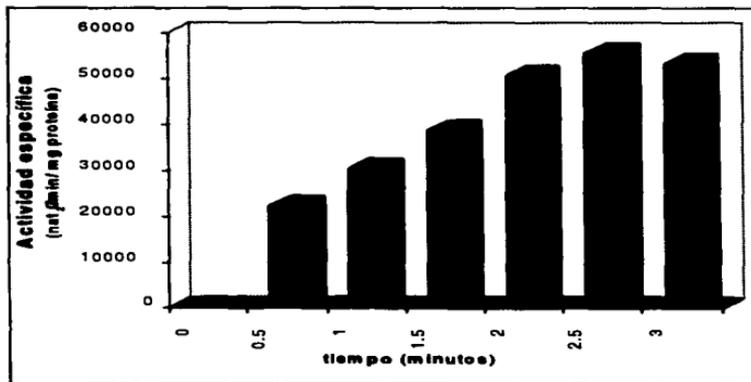


Figura 20. Actividad específica de los extractos obtenidos a partir de esporas libres sonicadas en amortiguador TCM a diversos tiempos.

Por lo tanto se concluyó que el bandedo múltiple en el zimograma fue resultado de la ruptura de las esporas y la liberación de la Cat-1 y la Cat-2 por la sonicación, sumado a la disociación causada por el mismo tratamiento.

Puesto que con los ensayos anteriores la Cat-teg no se obtenía aislada y completa, entonces se decidió tratar a las esporas completas con agitación en presencia de los mismos agentes perturbadores de membrana durante una hora, y se concentraron en la centrifuga clínica. A los sobrenadantes se les determinó actividad para catalasa por oximetría, las muestras en las que se obtuvo mayor actividad de catalasa se corrieron en electroforesis. Este protocolo se repitió dos veces. Los resultados se pueden ver en la figura 21.

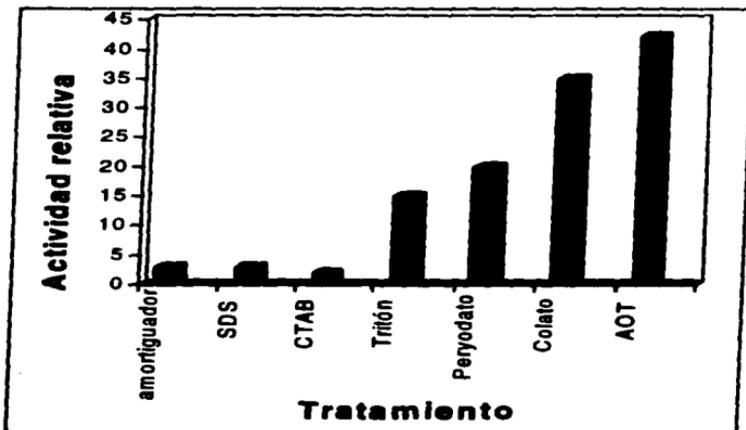


Figura 21. Actividad de catalasa registrada en el solubilizado de tegumentos. Los extractos se obtuvieron incubando esporas completas en una solución al 1% del agente perturbador de membrana en agitación por una hora a temperatura ambiente.

El resultado para cada tratamiento fue el siguiente. Con 1% de SDS no se obtuvo actividad para la catalasa, ni por oximetría ni en zimograma, así que posiblemente la enzima se desnaturaliza. Con 1% de AOT, 1% de colato de sodio y 1% de peryodato de sodio se recuperó la mayor actividad de la catalasa, pero en las electroforesis aparecieron varias bandas, artificio causado por el tratamiento con el detergente pues produjo una rápida desnaturalización de la proteína.

Las esporas sometidas a 1% de CTAB y el control con amortiguador TCM no presentaron actividad para catalasa (fig 20). Los extractos tratados con Tritón X-100 presentaron actividad con valores medios para la catalasa y en el zimograma se obtuvo una sola banda con migración semejante a Cat-1; este detergente no produjo modificaciones evidentes en el zimograma. Por lo tanto el Tritón X-100 fue el que produjo el rendimiento óptimo en la extracción decat-teg.

Los diferentes ensayos realizados demuestran que la acción del detergente es suficiente para provocar el desprendimiento de la catalasa contenida en los tegumentos de la espora, y como es evidente en el control, la agitación no produce la liberación de la catalasa de las esporas, pues incubadas en las mismas condiciones con amortiguador, no la liberaron al medio (fig 20).

Como resultado de los ensayos descritos para la extracción de la Cat-1 se pudo confirmar la existencia de una catalasa en los tegumentos de la espora. Al considerar que el Tritón X-100 según Black y Gerhardt (1962), no afecta ni la corteza ni la cubierta de la espora se puede determinar que la Cat-teg se encuentra ubicada específicamente en el exosporio.

Por la localización de la Cat-1 en uno de los tegumentos de la espora, y por la variación en la migración electroforética que presenta, ya que es diferente a la Cat-1 de la célula

FALTA PAGINA

No. 67

vegetativa; hasta este momento no se contaba con los datos de caracterización cinética para definir si corresponde o no Cat-1. Para que no hubiera confusión entre la Cat-1 encontrada en la célula logarítmica y la de la espora, a esta última se denominó Cat-teg por su ubicación.

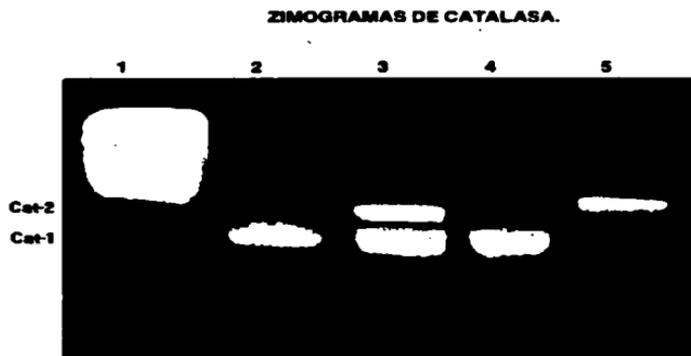


Figura 22. Zimograma de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus* realizado con tris-glicina pH 8.1. carril 1-catalasa bovina; carril 2-Cat-1, se obtuvo del extracto de células en crecimiento logarítmico; carril 3-Cat-2 y Cat-teg, son resultado de el extracto de esporas no tratadas; carril 4-Cat-teg, se ve a partir del exosporio de esporas extraído con tritón X-100 y carril 5-Cat-2 de extracto de esporas tratadas con SDS. Las cantidades de proteína fueron distintas en cada carril, pues se buscaba que fueran evidentes las bandas. Las cuatro muestras de catalasa que aparecen son las que se usaron en los ensayos enzimáticos.

Al observar los zimogramas realizados para la catalasa, llamó la atención que la movilidad de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*, fue mayor que la de la catalasa bovina (fig 22), siendo que el peso molecular aparente de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus* es mayor (307 kDa) que el de la catalasa bovina (240 kDa), por lo que debería

migrar más lento. Esto se explica debido a que la migración electroforética de las proteínas en un gel nativo se ve afectada también por factores como el pH y la carga total de las mismas y no únicamente por el peso molecular.

Este mismo efecto de la migración pero en *Bacillus subtilis* lo observaron Loewen y Switala(1987); propusieron que la causa podría ser el amortiguador de Tris-glicina en la que se corrieron las electroforesis, el cual causaba disociación de la enzima de la bacteria en dímeros. Para tratar de contrarrestar este efecto se hicieron variantes en el amortiguador, conservando el mismo pH para determinar si ésta realmente era la causa de la migración más rápida de las catalasas de *Bacillus cereus*.

Se utilizó amortiguador de fosfatos y borato 0.217 M pH 8.1. Se hicieron dos geles para cada amortiguador uno se precurrió a 10 miliamperios durante 12 horas, para ver si el efecto se debía al persulfato de amonio y el control no se precurrió. La movilidad en todos los casos siguió siendo la misma. La catalasa bovina migró más lento que las de *Bacillus cereus* (fig 23), sin embargo el tamaño de las bandas fue menor y no se separaron las isoenzimas en el caso en el que hubieran dos (figura 23. 3). Así que las electroforesis con Tris-glicina, las enzimas migraron mejor, las bandas fueron más claras y sí se separaban las isoenzimas (fig 22).

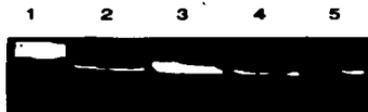


Figura 23. Zimograma realizado con amortiguador de borato pH 8.1, carril 1-catalasa Bovina, carril 2- Cat-1, carril 3-Cat1 y Cat-2, carril 4 Cat-1eg, 5-Cat-2. Se precurrió 12 horas a 10 miliamperios antes de agregar las enzimas. Se usaron las mismas cantidades de muestra, tiempo e intensidad que para Tris-glicina. Comparar con la figura 22.

CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE *Bacillus cereus*.

Como siguiente etapa en el proyecto de investigación, se diseñaron una serie de ensayos enzimáticos con el fin de conocer las diferencias entre Cat-1, Cat-teg y Cat-2.

Se obtuvieron las muestras de Cat-teg a partir de extractos de esporas incubadas con 1% de Tritón X-100 agitadas por una hora; Cat-1 se obtuvo del extracto de bacterias en crecimiento logarítmico rotas en la RIBI; y Cat-2 de esporas tratadas con SDS al 1% rotas en la licuadora con perlas de vidrio. A todas las muestras se les realizaron las siguientes pruebas:

La actividad medida por oximetría para las isoenzimas se presentan en la figura 24, las cifras encontradas para cada uno de los casos fueron expresadas en $\text{natg de O}_2/\text{mg proteína}/\text{minuto}$: para Cat-1 4,000; en Cat-2 1,575; para Cat-1 y Cat-2 juntas 36,654 y Cat-teg 6,171.

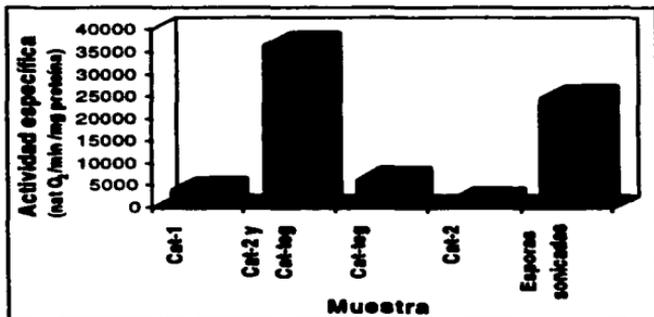


Figura 24. Actividad específica de las isoenzimas de catalasa en la célula vegetativa y la espora completa de *Bacillus cereus*. Cat-1 se obtuvo de células en etapa logarítmica, Cat-2 del citoplasma de esporas libres tratadas con 1% de SDS antes de romperlas; Cat-teg fue extraída del exosporio con Tritón X-100; Cat-teg y Cat-2 juntas a partir de esporas sin tratar rotas, y esporas sonicadas en amortiguador TCM.

TERMORRESISTENCIA DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE *Bacillus cereus*.

Para establecer los parámetros de la termorresistencia se utilizaron muestras de extractos de esporas completas que contenían Cat-1 y Cat-2, se sometieron a 25, 50, 60 y 70 °C por 5 minutos y se registró una inactivación de 0, 27, 36 y 96%, respectivamente.

De acuerdo con estos resultados en extractos que tenían Catteg y Cat-2, se decidió hacer todos los ensayos incubando las muestras a 60 °C durante 1.5, 3, 5 y 10 minutos. Se usaron en este caso, igual que para todos los ensayos enzimáticos, extractos que contenían Cat-1 obtenido de esporas en crecimiento logarítmico; Cat-2 de citoplasma de esporas tratadas con SDS para extraer el exosporio y Cat-teg obtenido de exosporio aislado con tritón X-100.

Como se muestra en la gráfica 25 la termorresistencia de la Cat-2 fue mayor que la de Cat-1 y Cat-teg. A 60 °C por 3 minutos la primera se inhibe 20% mientras que las otras se inactivan cerca del 80%.

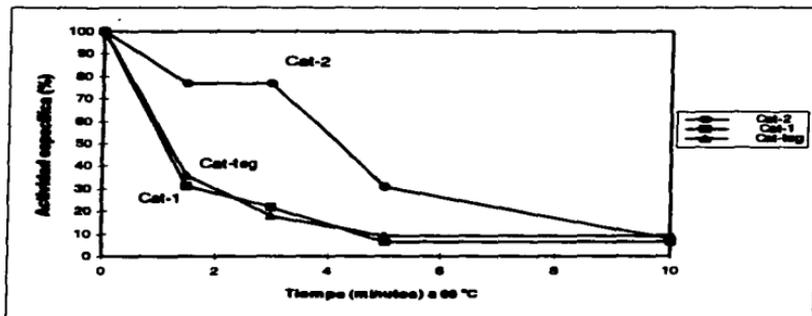


Figura 25. Termorresistencia de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*.

Km y Vmax APARENTES DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE *Bacillus cereus*.

La Vmax y la Km de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus* se obtuvieron de acuerdo con el método de saturación por el sustrato. La catalasa es una enzima, con una alta velocidad de recambio que le impide llegar a la saturación, por lo que no presenta una cinética Michaeliana, es decir saturable; por lo tanto la Vmax y la Km que se reportan son aparentes. Los datos obtenidos por oximetría se procesaron en el programa de computación Enzfiter y se obtuvieron los siguientes resultados (fig 26).

Enzima	Vmax aparente	Km aparente
Cat-1	1982 mM/minuto	61mM
Cat-2g	953 mM/minuto	67mM
Cat-2	1212mM/minuto	35mM

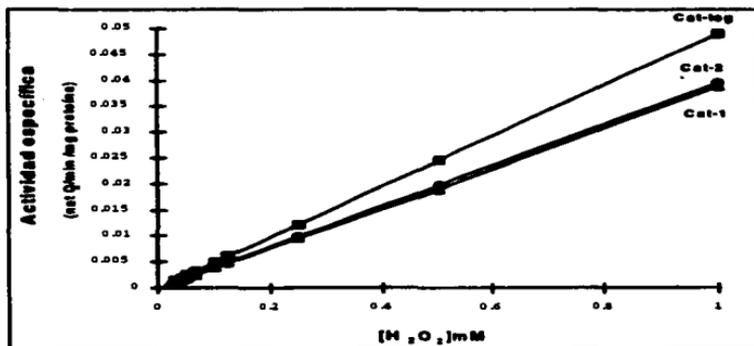


Figura 26. Actividad específica a partir de la cual se determinó de la Km relativa de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*, por oximetría. Los datos se procesaron y obtuvieron en el programa Enzfiter.

**INHIBICIÓN CON CIANURO DE POTASIO DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE
Bacillus cereus.**

La inhibición por cianuro de potasio se determinó por oximetría, este método consiste en medir la producción de O_2 como resultado del aumento de la concentración del veneno. Las curvas obtenidas se muestran en la figura 31. La inhibición con $10 \mu M$ de cianuro de potasio fue de 77% para Cat-1 y del 50% para Cat-2; por lo tanto Cat-2 es más resistente a la inhibición por cianuro. Se puede notar que en la curva resultante de tipo logarítmico, es evidente una inhibición de primer orden.

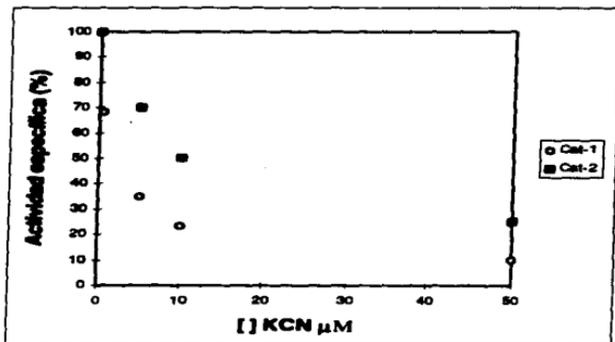


Figura 27. Inhibición con cianuro de potasio de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*, determinada por oximetría.

**INHIBICIÓN POR AZIDA DE SODIO DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE
Bacillus cereus.**

La inhibición por azida de sodio también se determinó por oximetría. La cinética registrada es de tipo logarítmico, de primer orden. A una concentración de 1 μM de azida de sodio la Cat-1 se inhibió un 85%, la Cat-teg 82% y la Cat-2 72% (fig 28).

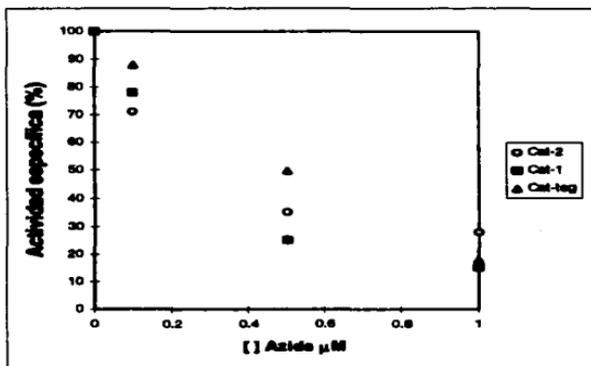


Figura 28. Inhibición por azida de sodio de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus*, determinada por oximetría.

Los resultados obtenidos de la caracterización de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus cereus* (tabla 3) permiten deducir que Cat-teg y Cat-1 pudieran ser posiblemente la misma enzima. La diferencia en la movilidad de ambas se puede explicar por efecto de las modificaciones de Cat-teg producidas como resultado de calor, proteólisis y pH extremo a los que frecuentemente se ven expuestas las esporas.

Así que en este trabajo se asumirá que la Cat-1 y la Cat-teg corresponden a la misma isoenzima, de tal manera que al hacer referencia a Cat-teg se denominará como la Cat-1 de la espora.

Tabla 3. Caracterización bioquímica de las isoenzimas de catalasa presentes en *Bacillus cereus*.

Característica	Cat-1	Cat-teg	Cat-2
Localización	Citoplasma de la célula en crecimiento	Exosporio de espora	Citoplasma de espora
Actividad nanómetros de O_2 /minuto /mg de proteína	4000	6161	1575
Vmax aparente mM/minuto	1982	953	1212
Peso molecular aparente kDa	307	307	307
Km aparente mM	61	67	35
Inhibición con cianuro de potasio 10 μM (%)	77	no determinada	50
Inhibición con azida de sodio 1.0 μM (%)	85	82	72
Termoestabilidad inactivación después de 3 minutos a 80°C (%)	78	82	23
Extracción	Ruptura con RIBI	Tritón	SDS y ruptura con perlas

DISCUSIÓN

En el ciclo de vida de *Bacillus cereus* se ha observado una expresión diferencial de dos isoenzimas de la catalasa durante el proceso de diferenciación celular, este fenómeno también se presenta en organismos como *Neurospora crassa* (Lledías y Hansberg, 1996), *Bacillus subtilis*, (Loewen y Switala, 1987), *Escherichia coli* (Hengge-Aronis, 1993), y *Aspergillus nidulans* (Navarro et al, 1986).

Los resultados hasta ahora descritos para *Bacillus cereus*, coinciden con lo reportado para *Bacillus subtilis* por Loewen y Switala (1987³). Se detectaron dos catalasas durante el ciclo de vida: una presente en la célula en crecimiento logarítmico la Cat-1 y otra en la espora la Cat-2 (fig 22).

EXPRESIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *Bacillus cereus*.

Durante la germinación de las esporas de *Bacillus cereus*, se detecta aumento en la actividad de la catalasa, a los 10 y 40 minutos del inicio de este proceso y en los zimogramas se identifican una serie de bandas (Michán,1996). En la siguiente etapa, la de crecimiento logarítmico, los extractos presentan actividad específica de catalasa constante, actividad que se puede atribuir a Cat-1, pues en los zimogramas ya no aparece la banda que corresponde a Cat-2 (fig 22).

La tercera etapa en la vida de la bacteria, es la estacionaria, que se genera por la privación de los nutrientes que produce la disminución del poder reductor y el aumento en la concentración intracelular de las ERO, se detiene el crecimiento y la reproducción celular. Las

bacterias en esta fase contrarrestan los efectos del estado hiperoxidante, mediante la regulación de los mecanismos antioxidantes, uno de los cuales es la inducción de la actividad de enzimas como la catalasa (Hansberg y Aguirre, 1990); éste es el segundo incremento en la actividad de la catalasa durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus* (Michán, 1996). Esta respuesta se ha encontrado también en otros organismos como: *Bacillus subtilis* (Loewen y Switala, 1987) y *Escherichia coli* (Lowen et al, 1986).

Además Loewen y Switala (1987)³, reportaron que la concentración elevada del H₂O₂ generada durante el crecimiento estacionario promueve, *in vivo*, el incremento de la actividad de la catalasa como producto de la síntesis de más enzima.

El tercer aumento en la actividad de la catalasa durante el ciclo de vida del bacilo, tiene lugar durante la esporulación específicamente en los estados t2 y t3 del proceso. Por lo tanto se podría suponer que dicho aumento está relacionado con el incremento en la actividad respiratoria que genera las ERO (Escamilla y Benito, 1980) y con la compartimentalización del esporangio.

Durante la esporulación de *Bacillus cereus*, sólo está presente la Cat-1 y los niveles de la actividad específica de catalasa de los extractos se mantiene constante en todo el proceso (Michán, 1996).

En cuanto a las esporas la última etapa del ciclo de vida de *Bacillus cereus*, presentan 2 isoenzimas Cat-1 y Cat-2 (fig 22). La Cat-2 es funcional y está localizada en el citoplasma y la Cat-1 se localiza en los tegumentos de la espora a la que no se le conoce función alguna todavía.

CARACTERÍSTICAS DE LAS ISOENZIMAS DE CATALASA DE LA CELULA VEGETATIVA Y LA ESPORA LIBRE DE *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus presenta en su etapa de crecimiento logarítmico una sola isoenzima de la catalasa: Cat-1. Esta proteína se sobreexpresa 3 veces más en la etapa de crecimiento estacionario y persiste durante el proceso de esporulación desde las etapas t1, t2, t3, t4 hasta las fases terminales del proceso, incluyendo a la espora libre. En los zimogramas realizados con los extractos de estas etapas es evidente una sola banda de actividad (Michán, 1996).

En las esporas libres de *Bacillus cereus* se detectaron 2 isoenzimas de la catalasa. Una de mayor movilidad que en un principio se denominó Cat-teg y que coincide por su posición, con la banda de Cat-1 de la célula en crecimiento logarítmico. La otra isoenzima que presenta movilidad electroforética menor y se llamó Cat-2 (fig 22).

Cat-1 de *Bacillus cereus* parece tener un peso total de 307 kDa (fig 22). Por las características bioquímicas que se pueden ver en la tabla 3 de la sección de resultados, esta enzima es menos resistente a las condiciones extremas que la Cat-2.

La Cat-1 pudiera ser la responsable del incremento de la actividad de la catalasa tanto en la fase estacionaria como en t2 y t3. Esta podría ser una respuesta que se ha desarrollado en el esporangio y que asegura que el proceso de la esporulación llegue a su fin; también protege al esporangio de la elevada cantidad de oxidantes. Esta enzima posiblemente se sintetiza durante los primeros minutos de la germinación, cuando Cat-2 deja de estar presente (Michán, 1996).

La Cat-2 almacenada en la espora durante la esporulación, podría ser necesaria para la etapa inicial de la germinación. Posiblemente ésta es sustituida por Cat-1, la cual persiste en la

etapa vegetativa y en las fases finales de la esporulación, presentandose incluso en la espora libre (fig 13 y 22).

La Cat-1 está localizada en los tegumentos, específicamente en el exosporio. Al comparar las características de Cat-1 de la espora y Cat-1 de la célula en crecimiento logarítmico se encontró que el peso molecular es de 307 kDa en ambos casos. La Km aparente fue de 61mM y 67mM respectivamente (tabla 3).

La termorresistencia de Cat-1 de espora a 60 °C por 5 minutos fue de 94% de inhibición de la actividad específica. Bajo las mismas condiciones la de Cat-1 de la célula en crecimiento logarítmico fue del 91% (fig 25).

Al tratar ambas catalasas con 1.0 μ M de azida de sodio se obtuvo una inhibición del 85% en Cat-1 y 82%, en Cat-teg (fig 28). Las características bioquímicas de ambas isoenzimas fueron parecidas. Sin embargo una diferencia se presenta cuando se ve la migración que muestran las dos proteínas en los zimogramas. En este caso Cat-1 de la espora tiene una migración ligeramente más rápida que Cat-1 de la célula en crecimiento logarítmico (fig 22).

La Cat-1 de la espora, parece no ser funcional, puesto que se localiza en el exosporio y éste tiende a perderse por almacenamiento prolongado o incluso por simple fricción (Hengge-Aronis 1993). Además de que esta isoenzima no presenta resistencia a las condiciones de estrés a las que normalmente se ve sometida la espora, a diferencia de Cat-2 que sí presenta este tipo de resistencia (tabla 3).

Si se considera que Cat-1 es una enzima extracelular (vestigio del citoplasma del esporangio) y no funcional; esto representa un caso singular con tal localización en bacterias de acuerdo a los reportes.

En la espora de *Bacillus cereus* se detectó una isoenzima adicional: la Cat-1 presente en el exosporio. A pesar de la similitud en el proceso de esporulación de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*; en *Bacillus cereus* es característico el gran desarrollo que presenta ese tegumento, a diferencia de otras especies, como *Bacillus subtilis* en el que esta disminuido y no se ha encontrado en él la presencia de alguna catalasa. Con lo anterior se puede entender el porque de la localización de la Cat-1 en la espora de *Bacillus cereus*, aunque sería importante conocer en detalle el proceso de formación del exosporio, en ambas especies, para establecer una explicación convincente de esta diferencia.

En los gels de electroforesis nativos la migración de la Cat-2 es más lenta que la de Cat-1, aunque el peso molecular relativo es igual. Esto podría deberse a cambios en la estructura cuaternaria de la proteína, por efecto de glucosilación, proteólisis o por la acción del oxígeno singuleto (Lledías y Hansberg, 1996). Todos estos procesos pudieran de alguna forma provocar un cambio en la carga eléctrica de la proteína y repercutir en la migración (fig 22).

La Cat-2 se inhibe un 50% con 10 μM de KCN y 72% con 1.0 μM de azida de sodio, por lo tanto es cerca de 15 veces más resistente a la acción del cianuro de potasio que a la azida de sodio (fig 8 y tabla 3).

En *Bacillus subtilis* como en *Bacillus cereus* la Cat-2 está presente en el citoplasma, es de menor movilidad electroforética y mayor resistencia al calor y efecto de los inhibidores como el cianuro de potasio y la azida de sodio (tabla 3).

Al comparar las características bioquímicas de la Cat-1 y la Cat-2 de la espora se observó que la termoresistencia fue mayor en Cat-2 y los efectos de inhibición por la azida de sodio y el cianuro de potasio fueron mayores en Cat-1. Esto era de esperarse, puesto que la Cat-2 se encuentra localizada en una estructura de resistencia, expuesta a cambios

ambientales bruscos, que debe ser capaz de tolerar, en cambio la Cat-1 se presenta en la célula en crecimiento logarítmico que soporta condiciones de estrés menos drásticas (tabla 3).

**COMPARACIÓN ENTRE LA Cat-1 y LA Cat-2 de
Bacillus cereus Y CON LA Cat-1 Y LA Cat-2 de *Bacillus subtilis*.**

Si se comparan las características bioquímicas de la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus*, se encuentra que el peso molecular aparente es de 307 kDa para las dos enzimas. Entre el peso molecular de las catalasas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* hay una notable diferencia, la Cat-1 de *Bacillus subtilis* pesa 393 kDa, en total y 65 kDa cada subunidad (Loewen y Switala, 1987 y 1988), mientras que en *Bacillus cereus* pesa 307 kDa aproximadamente (tabla 1 y 3).

Si se integran los datos es posible comprobar que existe mayor similitud entre la Cat-1 de *Bacillus cereus* y la de *Bacillus subtilis* que entre la Cat-2 de ambas especies.

En el caso de *Bacillus subtilis* hay una diferencia significativa entre el peso molecular de ambas catalasas, mientras que en *Bacillus cereus* las dos son muy parecidas (tabla 1 y 3).

Según Lowen y Switala (1988), el valor de la Km aparente de la Cat-1 de *Bacillus subtilis*, es de 40.1mM y de 78 mM para la Cat-2, este resultado coincide con el que se obtuvo en este trabajo para *Bacillus cereus*, en donde la Km de la Cat-1 fue 35 mM y la de Cat-2 61mM (fig 26).

Los valores de la Km y Vmax de las catalasas de *Bacillus cereus* que se reportan, no son un argumento válido para definir si Cat-1 y Cat-2, son o no la misma enzima; debido a que

es una cifra aparente puesto que la catalasa no se satura con sustrato porque presenta un número de recambio muy alto.

La inactivación de la Cat-1 a 60°C por 5 minutos en *Bacillus cereus* fue de 94% y para la Cat -2 de 70%; es decir la Cat-2 es 15% más termorresistente que la Cat-1 (fig 25). Si se compara con la termorresistencia de las isoenzimas de catalasa de *Bacillus subtilis*, parece ser más resistente la Cat-1 de *Bacillus subtilis* ya que se inhibe 100% a 65°C a los 20 minutos (tabla 1 y 3). La inhibición de las catalasas de *Bacillus cereus* con 10 µM de cianuro de potasio fue de 50% en Cat-1 y 77% en Cat-2. Así en *Bacillus cereus* la Cat-2 fue 50% más resistente a cianuro que Cat-1 (fig 27).

En *Bacillus subtilis* con 100 µM de cianuro de potasio la Cat-1 se inhibió 50%. Cat-2 con 10 µM de cianuro de potasio tuvo un 50% de inhibición (Lowen y Switala, 1988).

Al comparar la inhibición por cianuro de potasio de las catalasas de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, los resultados para Cat-2 son similares. Sin embargo la Cat-1 de *Bacillus cereus* es aproximadamente 7 veces más resistente al cianuro de potasio que la de *Bacillus subtilis* (tabla 1 y 3).

Con el mismo tipo de análisis, pero con 1.0 µM de azida de sodio en *Bacillus cereus* resultó una inhibición del 72% de la actividad de la Cat-1 y 85% de la Cat-2. De tal forma que Cat-2 es 12% más resistente a azida de sodio que Cat-1, diferencia que no es significativa (fig 28).

En *Bacillus subtilis* la inhibición con 2 µM de azida de sodio para la Cat-1 y con 60µM para la Cat-2, fue también del 50%. Esto permite concluir que las isoenzimas de catalasa de *Bacillus subtilis* son más resistentes a la azida de sodio que las de *Bacillus cereus*. Tanto

que la diferencia entre las Cat-1 es cerca del doble y para las Cat-2 es de más de 50 veces (tabla 1 y 3).

De este análisis comparativo de las isoenzimas de catalasa se puede concluir que las diferencias entre la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus*, en cuanto al peso molecular, la termoresistencia, la inhibición por azida de sodio y cianuro de potasio no son significativas, en relación con las existentes entre las mismas isoenzimas de *Bacillus subtilis*.

Por otra parte Cat-2 se presenta en el citoplasma de la espora libre. Su función parece contrarrestar los efectos de las posibles ERO en el inicio de la germinación (Hansberg y Rangel, 1996), producidos durante los primeros minutos de la transición de la latencia a la activación del metabolismo germinal. Posiblemente Cat-2 sólo está presente mientras que se empieza a sintetizar Cat-1.

En lo que respecta a la Cat-1 de *Bacillus cereus*, ésta se presenta inicialmente en la germinación, permanece durante el crecimiento logarítmico, se sobreexpresa en la fase estacionaria, actúa durante la esporulación y se encuentra en la espora, hasta que se pierde junto con el exosporio por fenómenos físicos o químicos; esto sugiere que la función de Cat-1 es "estratégica" pues solo dura algunos minutos.

Las diferencias entre la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus*; puede tener dos explicaciones. La primera es que se trate de la misma proteína (codificada por el mismo gen), y que la otra forma sea producto de una modificación postraducciona resultado de la oxidación (Liedes y Hansberg, 1996), la proteólisis o la glucosilación. Si este fuera el caso, se puede suponer que la Cat-2 es una modificación de la Cat-1, porque sólo es evidente en la espora, en donde no se lleva a cabo la síntesis de proteínas, además su actividad es muy breve durante el ciclo de vida de la bacteria.

La segunda explicación sobre el origen de la Cat-1 y la Cat-2 sería que las dos isoenzimas sean sintetizadas por genes distintos como es el caso de la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus subtilis* (Loewen y Switala, 1987), *Neurospora crassa* (Chary y Nativig, 1889), y *Aspergillus nidulans* (Navarro *et al.* 1996).

La primera suposición permitiría explicar satisfactoriamente la presencia de Cat-1 en la espora, pues podría tratarse de la misma enzima que no alcanzó a modificarse en Cat-2, debido a que no entró a la espora: lugar en donde se produciría la modificación sugerida. Esta propuesta, se apoya en los siguientes hechos: ambas enzimas en *Bacillus cereus* tienen un peso molecular similar y no se ha identificado el momento preciso en el que Cat-2 se hace presente durante la esporulación, ni siquiera se detecta la enzima durante éste proceso, solo es evidente Cat-2 en la espora (Michán, 1996). Así como las diferencias tan notables que existen entre las enzimas de catalasa de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, en la segunda especie existen al menos dos genes para catalasa. Junto con las diferencias significativas que hay entre Cat-1 y Cat-2 de *Bacillus subtilis*, sobre todo en peso molecular (Loewen y Sweitala, 1987 y 1988).

Algunas evidencias en favor de esta hipótesis sobre modificación postraducciona de la catalasa son los reportes sobre la heterogeneidad de la migración de la catalasa, los cuales han sido numerosos según Bonaventura (1972). Con respecto a estas diferencias se han propuesto algunas explicaciones: Chandlee y Scandalios (1984) suponen que las diferencias en la catalasa del maíz son de origen genético, mientras que Holmes (1979) piensa que no hay relación genética en la heterogeneidad que presenta la catalasa del hígado del ratón. Por su parte Lledias y Hansberg han observado que en *Neurospora crassa* las diferencias en la Cat-1 son resultado de la oxidación por oxígeno singuleto (Lledias y Hansberg, 1996).

Por lo tanto, la hipótesis que se ajusta mejor a las evidencias obtenidas es la primera: la Cat-1 y la Cat-2 podrían ser codificadas por el mismo gen. Sin embargo es prudente realizar

los experimentos necesarios para confirmar esta propuesta, por lo cual se podrían aplicar técnicas de Biología Molecular para determinar si la Cat-1 y la Cat-2g son la misma isoenzima, por estar codificadas por el mismo gen.

DIFERENCIAS EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN LOS ZIMOGRAMAS DE *Bacillus cereus* REVELADOS PARA CATALASA

Al hacer los zimogramas de las isoenzimas de catalasa, la banda de actividad que corresponde a la catalasa bovina migró más lento, (a pesar de que es mas ligera, 240 kDa) que la Cat-1 y Cat-2 de *Bacillus cereus* (307 kDa) (fig 22).

Por otra parte Lowen y Switala (1988) han observado en los geles de catalasa de *Bacillus subtilis* que la movilidad electroforética es menor a la esperada, según el peso determinado para la proteína por filtración molecular; este resultado lo atribuyen a una posible disociación, producida por el amortiguador tris-glicina. Si se asume la misma explicación que utilizan Lowen y Switala para este fenómeno, entonces se podría pensar que las bandas de los zimogramas de la catalasa de *Bacillus cereus*, son el resultado de la actividad de los dímeros. Esto en base a la migración de estas últimas comparada con la catalasa bovina, además de que es la forma mínima en la que la enzima puede presentar actividad. Pero esta explicación no resulta convincente si se considera que se hicieron ensayos con dos amortiguadores diferentes, y que la migración siguió produciendose de la misma manera (fig 22 y 23). De tal forma que sería factible pensar que la migración de la proteína en el gel fue por la carga eléctrica y que posiblemente su estructura cuaternaria es conservada durante la corrida en el gel. Para corroborar cuál es la causa en las diferencias de movilidad de las catalasas de *Bacillus cereus* con respecto a la bovina sería convincente correr las electroforesis a distintos pH.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA PROBABLE DE LA EXISTENCIA DE ISOENZIMAS DE CATALASA EN *Bacillus cereus*.

La presencia de una catalasa específica en el estado diferenciado de *Bacillus cereus* indica la plasticidad, resultado de la adaptación, que tienen los procariotes, para responder a las condiciones extremas del medio. Un ejemplo de esto es cuando se presenta algún tipo de estrés, se desencadena la producción de isoenzimas resistentes para contrarrestar los efectos nocivos. Tal es el caso de un estrés oxidativo, para evitar los efectos dañinos de las ERO producidos por el metabolismo y/o el ambiente se inducen enzimas antioxidantes (Hansberg y Aguirre, 1990)

Desde el punto de vista evolutivo, este resultado es importante debido a que la atmósfera en la que se originaron los ancestros de los procariotes fue reductora y en el momento en que el oxígeno se incrementó como producto de la fotosíntesis oxigénica, se ocurrió un cambio drástico en el ambiente, al que tuvieron que adaptarse estos organismos.

Para evitar los efectos dañinos que producía el oxígeno en estos organismos debieron haberse dado una gran cantidad de modificaciones, que siguen siendo eficaces hasta nuestros días. Puesto que la diversidad actual comparte a un mismo ancestro (parecido a los procariotes), es lógico que algunos de estos mecanismos sean compartidos, por ejemplo: la existencia de enzimas como la catalasa, que por ser indispensable para el mantenimiento de la vida están conservadas, por lo que son una buena herramienta para establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos vivos.

La diferenciación celular es un fenómeno muy importante en la Biología, pues su estudio resulta indispensable para la comprensión del funcionamiento de los organismos vivos. sin embargo por ser tan complejo, es uno de los ámbitos más desconocidos en cuanto a causas y

mecanismos, debido a que la relación genes-célula-ambiente debe ser el objeto de estudio, pero abordar el problema desde este punto de vista resulta difícil en la práctica, porque las técnicas con las que hasta ahora se cuenta para poder estudiar los fenómenos que se dan en la naturaleza son aún limitadas.

CONCLUSIONES

- En el ciclo de vida de *Bacillus cereus* se identificaron dos isoenzimas de catalasa asociadas a diferenciación celular: una en la bacteria en etapa logarítmica y otra en la espora.
- La Cat-1 de *Bacillus cereus* está presente en la célula en crecimiento logarítmico y en la espora. En la célula en crecimiento logarítmico se localiza en el citoplasma. Se inhibe 77% con 10 μM de cianuro de potasio y 85% con 1 μM de azida de sodio. Se inactiva un 80% a 60°C por 3 minutos. En la espora se localiza en los tegumentos específicamente en el exosporio y es sólo un vestigio de la célula madre como resultado del engullimiento durante la esporulación.
- La Cat-2, se encuentra en el citoplasma de la espora. Se inhibe 50% con 10 μM de cianuro de potasio y 72% con 1 μM de azida de sodio. Se inactiva 23% 60 °C por 3 minutos. Por lo tanto es más resistente al calor, al cianuro de potasio y a la azida de sodio que la Cat-1.
- El peso molecular aparente de ambas isoenzimas de la catalasa en *Bacillus cereus* es de 307 kDa.

PERSPECTIVAS

- Determinar si los cambios en la movilidad electroforética de las catalasas son el resultado de la modificación postraducciona1 de la enzima.
- Obtener la estructura oligomérica de la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus* en solución.
- Purificar la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus*.
- Clonar y secuenciar el gen de la Cat-1 y la Cat-2 de *Bacillus cereus* para aclarar su origen.
- Obtener bacterias mutantes que carezcan del gen de la Cat-1 y la Cat-2, para determinar si existe algún cambio durante la diferenciación.

BIBLIOGRAFIA

- AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. Meth in enz. (ed). Lester Packer. **105** :120-127.
- ANDREOLI, A. J., SHUEHIRO, D., SAKIYAMA, TAKEMOTO, J., VIVANCO, E., LARA, J.C. y KLUTE, M. C. (1973). Release and recovery of forespores from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **115**:1159-1166.
- ARCHIBALD, R.A. (1989). The *Bacillus* cell envelope. In Hardwood (ed) the Bacillus. **9**: 217-246.
- BANNISTER, W.A. BANISTER J.V., BARRA, D., BOND, J., BOSSA, F. (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper-zinc enzyme. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 349-361.
- BLACK, S. H. y GERHARD, P. (1962). Permiability of bacterial spores. *J. Bacteriol.* **83**: 960-1967.
- BONAVENTURA, J., SCHROEDER, A. Y FANG, S (1972). Human erythrocyte catalase: an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties. *Arch. of Biochem.* **150**: 606-617.
- BOWLER, C., MONTAGU, V. M., INZÉ D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* **43**: 83-116.

- CABRERA, B. T., STUART, H.S, GERHARDT, P. (1971). Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **107**: 320-324.
- CHARY, P. y NATIVIG, D. O. (1989). Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development. *J. Bacteriol.* **171**: 2646-2665.
- CHANDLEE J.M., SCANDALIOS, J. G. (1984). Regulation of Cat1 gene expression in the scutellum of maize during early sporophytic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 4903-4907.
- COLLIER, R. E. (1957). An approach to synchronous growth for spore formation in *Glossosporium roseum*. In H.O. Halvorson (ed.), *Spores*. American Institute of Biological Sciences. Washington D. C. 10-17.
- DAWER, I. W. Y SUTHERLAND I.W. (1992). Microbial Physiology. (ed) Blackwell Scientific Publication. U.S.A. p 246.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II Methods and application to human serum protein. *Ann N. Y. Acad Sci* **121**: 404-407.
- DEISSEROTH, A. y DOUNCE, A. (1970). Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. *Physiol. Rev.* **50**: 391-373.

- DEMPSEY, B., AMÁBILE-CUEVAS, C. F. (1991). Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* **67**: 837-839.
- DENIS, M. ARNAUD, S. y MALATESTA, F. (1989). Hydrogen peroxide is the end product of oxygen reduction by the terminal oxidase in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* 617. *FEBS Let* **247** : 475-479.
- DOI, R. H. (1989). Sporulation and germination. *In* Harwood C. (ed) *Bacillus* **8**: 169-215.
- DOUNCE, A. L. (1983). A proposed mechanism of the catalytic action of catalase. *J. Theor. Biol.* **108**: 553-567.
- DOWDS, B. C. A. , MURPHY, P. Mc. CONELL, D. J. , Y DEVINE K. M. (1987). Relationship among oxidative stress, growth cycle, and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **160**: 5771-5775.
- DWORKIN, M. (1985). Developmental biology of the bacteria. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. U.S A.
- ESCAMILLA, J. E., y BENITO, M. (1984). Respiratory system of vegetative and sporulating *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **160**: 473-477.

- FARR, S. B. y KOGOMA, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* Dec: 561-585.
- FEUERS, R. J., PATILLO F. M., OSBORN, C. K., ADAMS, K. L. DELUCA, D. Y SMITH G. W. 1993. Application of integrated rate equation to the inactivation of catalase. *Free Rads Biol y Med.* 15: 223-226.
- FREESE, E. (1981). Initiation of bacterial sporulation. In Levinson, H., Sonenshein, a. L., y Tipper, D.J. (ed.) Sporulation and germination. American Society of Microbiology Washington, D. C. p 1-12.
- FREESE, E., y HEINZE, J. (1983). Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. In Levinson, H., Sonenshein, A. L. y Tipper, D. J. (ed.) Sporulation and Germination. American. Society of microbiology Washington, D. C. 101-172.
- FOWLER, T., REY, M.W., VAHA-VEHE, P., POWER, S. D. y BERKA, R.M. (1993). The cat R gene encoding a catalase from *Aspergillus niger* primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol Microbiol.* 9: 989-998.
- GERHARDT, P. y RIBI, E. (1964). Ultraestructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 88:1969-1174.

- GERSCHMAN R., GILBERT D. L. NYE S. W., DWYER P. y FENN W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 119: 623-626.
- GOULD, G.W. (1963) Mechanisms of resistance and dormancy. In HURST, H. and GOULD, G.W.. (Ed.) *The bacterial spore.* Academic Press, London. 2:173-209.
- HASHIMOTO, T. y CONTI, F. S. (1971). Ultrastructural changes associated with activation and germination of *Bacillus cereus* T spores. *J. Bacteriol.* 105: 361-369.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- HANSBERG, W y AGUIRRE, J. (1990). Hyperoxidant States Cause Microbial Cell Differentiation by Cell Isolation from Dioxygen. *J Theor Biol.* 142: 201-221
- HANSON, S. R. SRINISAVAN, V. R. and HALVORSON, O. (1963). Biochemistry of sporulation Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. *J. Bacteriol.* 85: 451-460.
- HANSON, C. R. (1979). The physiology and diversity of bacterial endospores. In Parish, H. (ed.) *Developmental biology of prokaryotes.* Univ. of California press. 3: 37-56.

- HARRIS, H. y HOPKINSON, D. A. (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing. p 1-2.
- HARWOOD, C.R. (1989). Introduction to the biotechnology. In. Harwood, C. (ed) *Bacillus*. Plenum Press, Nueva York. 2: 1-15.
- HEDRICK, J. L. y SMITH, A. J. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch Biochem Biophys*. **126**: 155-164.
- HENGGE-ARONIS, R. (1993). Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase regulation in *Escherichia coli*. *Cell*. **72**: 165-168.
- HOLMES, R. S., (1979). *Biochem. Genet.* **17**: 461-472.
- KEYNAN, A., EVENCHIK, Z., HALVORSON, H. O., and HASTINGS, J. W. (1964). Activation of bacterial endospore. *J Bacteriol.* **88**: 313-318.
- KONO, Y. Y FRIDOVICH, I. (1983). Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6015-6019.
- LEVINSON, S. y ARONSON, A. Y. (1967). Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* **93**: 1023-1030.

- LLEDIAS Y HANSBERG comunicación personal.
- LOEWEN, P. C. y SWITALA, J. (1986). Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell.* 258: 6015-6019.
- LOEWEN, P.C. y SWITALA, J. (1987)¹. Genetic mapping of *Kat A* locus that effects catalase 1 levels in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 169: 5948-5851.
- LOEWEN, P.C. y SWITALA, J. (1987)². Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169: 3001-3607.
- LOEWEN, P.C. y SWITALA, J. (1987)³. Purification and characterization of spore specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys.* 243: 144-149.
- LOEWEN, P.C. y SWITALA, J. (1988). Purification and characterization of spore specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cel. Biol.* 66: 707-714.
- LOWRY, O.H., ROSENBOROUGH, N. J., FARR, A.L., y RANDADLL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUTKENHAUS, J. (1994). Asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. In Piggot, P., Moran C. P. y Youngman, P. (ed.) Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology Washington, D.C. p 95-11.

- MARGULIS, L. Y SCHWARTZ, K. (1988). Five Kingdoms. 2 Edición. W. H. Freeman and Co. New York. p 66-67
- MARKWELL, M. A. K., HASS, S.M. TOLBERT, N.E. y BIEBER, L. L. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Meth in Enz.* Lowenstein, S. M. (de.) N.Y. Ac. Press. **72**: 296-303
- MATZ, L. L., CABRERA, B. y GERAHRDT, T. (1970). Chemical composition of Exosporium from Spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **101**: 196-201.
- MC CORD, J.M y FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Jour. Biol. Chem.* **244**: 6049, 6055.
- MEIER, B. HABERMEHL, G. (1991). Evidence for superoxide and catalase in mollicuotes and release of reactive oxygen species. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 451-454.
- MICHÁN, AGUIRRE, SHADAY. (1996). Expresión de isoenzimas de catalasa durante el ciclo de vida de *Bacillus cereus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Departamento de biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- NAVARRO, G.R., STRINGER, M. A., HANSBERG, W., TIMBERLAKEM, W. E Y AGUIRRE, J. (1993). cat A, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29 (4)**: 352-359.

- OSSOWSKI, H., HAUSNER, H., LOEWEN., P.(1993). Molecular Evolutionary Analaysis Based on the Amino Acid Secuence of Catalase. *J Mol Evol* **37**: 71-76.
- PARISH,H. (1979). Developmental Biology of Prokaryotes. Ed. J.H. Parish. University of California Press. 3: -36
- PEARCE, S. M. FITZ-JAMES, P. C. (1971). Sporulation of a cortexless mutant of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* **105**: 339-348.
- PRIEST, F. G. (1989). Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria. In Harwood C. (ed.) *the Bacillus* **3**: 27-23
- REDINBAUGH, M. G. SABRE, M. Y SCANDALIOS, J. G. (1990). Expresion of the maiza catalase gene under the influence of a circadian rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6853-6857.
- RANGEL Y HANSBER, comunicación personal.
- ROBERTS, A.R., FISHER, C.L. REDFORD, S. M., MCCREE, D. E. PARGE, A. E. GETZOFF, D.E. TAINER J.A. (1991). Mechanism and atomic structure of superoxide dismutase. *Free Rad Res Comms.* **12-13**: 269-278.
- RORTH, M. y JENSEN, P. K. (1967). Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochem Biophys Acta* **130**: 171-173.

- SCOTT, Y. R. y ELLAR J. D. (1976). Study of Calcium dipicolinate release during bacterial spore germination by using a new, sensitive assay for dipicolinate. *J Bacteriol* **135**: 133-137.
- SETLOW, P (1961). Biochemistry of bacterial forespore, development and spore germination. In Levinson, H., Sonenshein, A. L., y Tappert, D.J. (ed). Sporulation and germination. American. Soc. of Microbiol. Washington, D. C. p 13-28.
- SETLOW, P (1963). Germination and outgrowth. En Hurst, A. y Gould, G. W. (ed). The Bacterial spore, *Acad. Press.* **2**: 211-254.
- SHARMA, K. D., ANDERSSON, L., LOEHR M. T., TERNER, J., GOFF, H. M. (1989). Comparative spectral analysis of mammalian, fungal, and bacterial catalases. *Biol. Chem.* **264**: 12772- 12779.
- SRIVASTAVA P. y FITZ-JAMES P. (1981). Isolation and characterization of a unique serine protease from *Bacillus cereus* spore coats. *Gen Microbiol.* **128**: 463-475.