

Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 12 (2). 1996: 131-137

# Superóxido dismutasa y catalasa en bacterias bioluminiscentes marinas

Z. González-Lama y A. Díez del Pino

Microbiología. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apdo. 550. 35080 Las Palmas, España.

## RESUMEN

Han sido estudiadas la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) de bacterias bioluminiscentes marinas. Hemos encontrado varios isoenzimas de catalasa y un isoenzima de superóxido dismutasa y se ha observado que a menor luminiscencia los niveles de catalasa son mayores. Una variante de *Photobacterium phosphoreum* var. K (cepa mutante que carece de bioluminiscencia) mostró los máximos niveles de catalasa. Hay dos tipos de catalasas en esta estirpe, una de pI 7,2 que es inhibida por el 3-amino, 1,2,4-triazol y otros isoenzimas que son resistentes a la acción de este inhibidor. Todas las catalasas de estas bacterias bioluminiscentes marinas son hemoproteínas, ya que son inhibidas por la azida y el cianuro. El isoenzima de SOD es una Fe-SOD.

**Palabras clave:** Superóxido dismutasa, catalasa, bacterias bioluminiscentes, *Vibrio*, *Photobacterium*.

## ABSTRACT

Superoxide dismutase and catalase in marine bioluminescent bacteria.

Catalase and superoxide dismutase (SOD) were studied in strains of marine bioluminescent bacteria. We found several isozymes of catalase in these strains and only one isozyme of superoxide dismutase. We observed that catalase levels rose as bioluminescence emission fell. A dark strain of *Photobacterium phosphoreum* var. K showed the maximum levels of catalase. There are two types of catalases in this strain: an isozyme of pI 7.2 inhibited by 3-amino, 1, 2, 4-triazole and others isozymes resistant to this inhibitor. All isozymes of catalase from these bioluminescent marine bacteria are hemo-proteins, since they were inhibited by cyanide and azide. The single isozyme of SOD is a Fe-SOD.

**Key words:** Superoxide dismutase, catalase, bioluminescent bacteria, *Vibrio*, *Photobacterium*.

## INTRODUCCIÓN

La superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa son dos enzimas que protegen a las células de los derivados tóxicos, radical superóxido y agua oxigenada, que se originan en el metabolismo aerobio de las células (Fridovich, 1974; Ma y Eaton, 1992).

Las SOD son metaloenzimas compuestas de dos o más subunidades que, de acuerdo con el componente metálico que contengan, se dividen en tres clases (Fridovich, 1974): cupro-zinc superóxido dismutasa

(Cu/Zn-SOD), manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) y ferro-superóxido dismutasa (Fe-SOD). La Fe-SOD se encuentra, principalmente, en microorganismos procariontas, tanto anaerobios como facultativos y aerobios (Hopkin, Papazian y Steinman, 1992; Sadosky *et al.*, 1994; Pesci, Cottle y Pickett, 1994). Las catalasas descomponen el agua oxigenada en agua y oxígeno. En microorganismos tales como *Escherichia coli* han sido descritas dos catalasas denominadas HPI y HPII (Dawson *et al.*, 1991; Loeven *et al.*, 1993; Meir y Yagil, 1985; Von

Ossowski *et al.*, 1991) con características diferentes.

La emisión de luz en las bacterias bioluminiscentes está estrechamente relacionada con la cadena respiratoria (Kurfust, Ghisla y Hasting, 1983; Watanabe *et al.*, 1975), habiendo una competición entre la cadena respiratoria y el sistema luciferasa por el poder reductor. Existe, por tanto, una relación entre luciferasa, catalasa y superóxido dismutasa en estas bacterias.

Aquí se propone estudiar las características de la catalasa y la superóxido dismutasa en bacterias bioluminiscentes marinas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las bacterias luminosas marinas utilizadas en este trabajo han sido aisladas a partir de aguas costeras de la isla de Gran Canaria y de la piel y contenido intestinal de salemas *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758), pez muy común en las islas Canarias. Han sido identificadas siguiendo las directrices del manual Bergey (Holt *et al.*, 1994). Los extractos enzimáticos han sido obtenidos a partir de un cultivo en medio líquido siguiendo los métodos habituales de sonicación de la masa celular y centrifugación en frío; alícuotas de los sobrenadantes fueron congeladas para los posteriores ensayos enzimáticos.

La actividad de la catalasa en los extractos enzimáticos ha sido determinada siguiendo la técnica de Ortega, Costa y Montoya (1976). La actividad catalasa se expresa en mk/mg de proteína, siendo k la constante de velocidad de la pseudoreacción de descomposición del  $H_2O_2$  y mk el producto 1 000k. Los isoenzimas fueron separados y visualizados por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida-almidón con anfolitos (González-Lama, Cutillas y Lamas, 1983). La visualización de los enzimas de catalasa en gel de poliacrilamida-almidón se lleva a cabo cubriendo éste con una disolución de  $H_2O_2$  2,5 mM en tampón fosfato durante 15 minutos; posteriormente se sumerge en una disolución que contiene IK al 10 %, ácido sulfúrico 2N y molibdato

amónico al 1 %, hasta que el gel toma una coloración azul negruzca, debido a la tinción del almidón por el yodo libre, y los isoenzimas aparecen como manchas incoloras sobre el fondo azul negruzco del gel. Para estudiar la acción de los inhibidores, una vez realizado el isoelectroenfoque, se sumergen los geles en una solución de inhibidores 20 mM durante 30 minutos y posteriormente se realiza el proceso normal de revelado. Los inhibidores utilizados han sido: 3-amino, 1, 2, 4-triazol (AT), cianuro potásico y azida sódica.

Los isoenzimas de SOD han sido visualizados por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (Lonnerdal, Keen y Hurley, 1979) y su contenido metálico ha sido detectado siguiendo la técnica de McEuen *et al.* (1979).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias bioluminiscentes marinas en las que hemos estudiado los enzimas catalasa y superóxido dismutasa, son estirpes que pertenecen a las especies *Vibrio splendidus* I, *Vibrio logei*, *Vibrio fischeri* y *Photobacterium phosphoreum*; también hemos utilizado una estirpe mutante espontánea, no bioluminiscente, de *Photobacterium phosphoreum* que se denomina variante K. Todos los estudios se han realizado con extractos enzimáticos de estas estirpes.

La tabla I muestra la cuantificación de catalasa total en los extractos enzimáticos de las diferentes estirpes estudiadas. Considerando como 100 la cantidad de catalasa encontrada en la variante K (oscura) de *Photobacterium phosphoreum*, podemos calcular el porcentaje de catalasa encontrada en las otras estirpes con respecto a ella. Es de destacar que la variante K no luminiscente de *Photobacterium phosphoreum* presenta la más alta cantidad de catalasa y *Vibrio splendidus* I la más baja, mientras las otras estirpes presentan cantidades de catalasa intermedias. Esto está relacionado con el tipo de luciferasa y su actividad. El agua oxigenada es un producto metabólico que puede derivarse de la reacción luminosa de la lucifera-

Tabla I. Actividad de catalasa total en extractos enzimáticos de bacterias bioluminiscentes marinas, expresada en mk/mg de proteína (mk = 1 000k). (\*): mutante no luminosa.

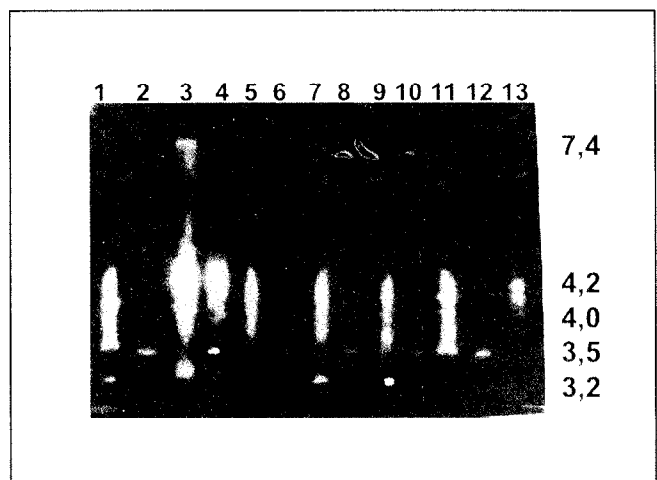
Microorganismos	Catalasa total (mk/mg proteína)	Porcentaje
<i>Photobacterium phosphoreum</i> var. K*	824,20 ± 10,3	100
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	401,20 ± 9,2	48,60
<i>Vibrio logei</i>	282,70 ± 8,3	34,20
<i>Vibrio fischeri</i>	189,00 ± 4,7	22,90
<i>Vibrio splendidus</i> I	48,21 ± 2,4	5,84

sa (Kurfust, Ghisla y Hasting, 1983; Watanabe *et al.*, 1975), de tal modo que, cuando no hay emisión de luz, se produce agua oxigenada. En el caso de *Photobacterium phosphoreum* variante K, al no ser activa la luciferasa y, por tanto, no poder emitirse luz, la reacción luminiscente elimina, como uno de sus productos finales, mayor cantidad de agua oxigenada de lo habitual, por lo que necesita mayor cantidad de catalasa para defenderse. También es de destacar que a mayor emisión de luz, se produce menor cantidad de catalasa. Así, *Vibrio splendidus* I, que emite más luminosidad debido a que posee una luciferasa de cinética lenta, es la estirpe que produce menos catalasa; el resto de las estirpes tienen una luciferasa de cinética rápida, emiten menos luz y, por tanto, producen más catalasa. Parece ser

que en estas bacterias el agua oxigenada actúa como inductor de la catalasa, al igual que ocurre en *E. coli* (Hassan y Fridovich, 1978), *Rhodospseudomonas spheroides* y *Salmonella typhimurium* (Finn y Condon, 1975), las cuales responden a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extra e intracelularmente. En cambio, en *Pseudomonas fluorescens* (Rodríguez y Pionetti, 1981) el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es el inductor de la catalasa.

Al separar los isoenzimas de catalasa por isoelectroenfoque en gel de poli(acrilamida-almidón), en un gradiente de pH 3-10 (figura 1) y pH 3,5-6,0 (figura 2), podemos observar que estas bacterias poseen diversos isoenzimas con distintos puntos isoelectrónicos (tabla II). Aquí debemos destacar que, actualmente, no existe ninguna técnica de visualización de isoenzimas de catalasa.

Figura 1. Isoenzimas de catalasa de bacterias bioluminiscentes marinas. Isoelectroenfoque en gel de poli(acrilamida-almidón), pH 3,5-9,5, de extractos enzimáticos procedentes de (1): *Photobacterium phosphoreum*; (2): *P. phosphoreum* diluido 1/10; (3): *P. phosphoreum* variante K; (4): *P. phosphoreum* variante K diluido 1/10; (5): *Vibrio logei* biotipo II; (6): *V. logei* biotipo II diluido 1/10; (7): *Vibrio fischeri* biotipo II; (8): *V. fischeri* biotipo II diluido 1/10; (9): *V. fischeri* biotipo I; (10): *V. fischeri* biotipo I diluido 1/10; (11): *V. logei* biotipo I; (12): *V. logei* biotipo I diluido 1/10; (13): *Vibrio splendidus*.



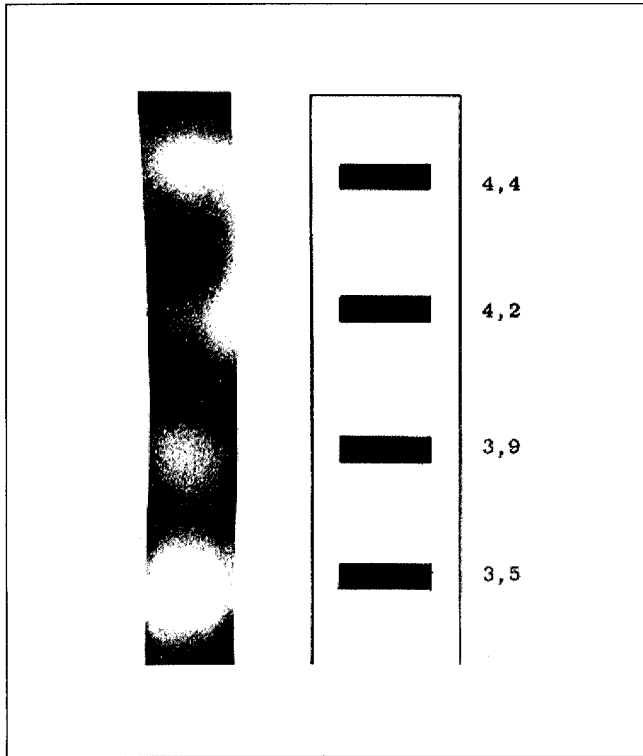


Figura 2. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida-almidón (pH 3,5-6,0) de catalasa de *Vibrio logei* biotipo I.

sa capaz de discernir claramente entre isoenzimas y puntos isoelectrónicos próximos (figura 1); de ahí el por qué hemos utilizado diluciones de los extractos enzimáticos y electroenfoques con rango de pH más estrecho (figura 2): para poder visualizar mejor estos isoenzimas. En *E. coli* se han identificado dos catalasas diferentes separa-

das por electroforesis (Hassan y Fridovich, 1978; Meir y Yagil, 1985). En *Comamonas compransoris* (Nies y Schlegel, 1982) y en *Bacteroides distasonis* (Gregory, Kowalski y Holdeman, 1977) ha sido descrita una sola catalasa. La movilidad electroforética de las catalasas ha sido utilizada como criterio taxonómico en las micobacterias (Danis,

Tabla II. Isoelectroenfoque de catalasa en poliacrilamida-almidón de bacterias bioluminiscentes. (\*): mutante no luminosa.

Microorganismos	Puntos isoelectrónicos (pIs)
<i>Vibrio splendidus</i> I	4,0 4,2
<i>Vibrio logei</i>	3,5 4,0 4,2 4,4
<i>Vibrio fischeri</i>	3,2 3,5 4,0 4,2 4,4
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	3,2 3,5 4,0 4,2 4,4
<i>Photobacterium phosphoreum</i> var. K*	3,2 3,5 4,0 4,2 4,4 7,4

1977; Stavni, 1975), así como en *Staphylococcus* (Zimmerman, 1976).

Como se indica en el apartado de material y métodos, se sometieron los isoenzimas de catalasa, una vez separados por isoelectroforesis, a la acción de distintos inhibidores de la catalasa. El AT a concentración de 20 mM inhibe el isoenzima de pI 7,4 de *Photobacterium phosphoreum* variante K y afecta poco al resto de los isoenzimas (figura 3). Este isoenzima que se inhibe por la acción del AT debe ser similar a la catalasa HPII descrita en *E. coli* (Dawson *et al.*, 1991; Loewen *et al.*, 1993; Meir y Yagil, 1985; Von Ossowski *et al.*, 1991) y a la catalasa termoestable descrita en micobacterias (Wayne y Díaz, 1976), mientras el resto de los isoenzimas deben corresponder a la catalasa HPI de *E. coli* (Meir y Yagil, 1985) y la catalasa termolabil de micobacterias (Wayne y Díaz, 1976). Al ensayar la acción del cianuro potásico y la azida sódica sobre los isoenzimas de catalasa de estas bacterias, observa-

mos que todos los isoenzimas eran inhibidos por ambas sustancias. Esto nos indica que los isoenzimas de catalasa de estas bacterias luminiscentes son verdaderas catalasas que contienen el grupo hemo, a diferencia de las pseudocatalasas de las bacterias ácido-lácticas que no son hemoproteínas y son insensibles al cianuro y la azida, así como a la inactivación por la exposición prolongada al agua oxigenada (Clarke y Knowles, 1980).

En todas las estirpes aquí estudiadas hemos encontrado un solo isoenzima de SOD de pI 4,26 (figura 4) que no es inhibido por el cianuro potásico y sí por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; esto indica que es una Fe-SOD. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Bang *et al.*, 1981; Bang, Woolkalis y Baumann, 1978; Baumann, Bang y Baumann, 1980; Puget y Michelson, 1974) en las especies de *Photobacterium* y *Vibrio* de vida libre y saprofitas, en que se describe para estas bacterias una Fe-SOD.

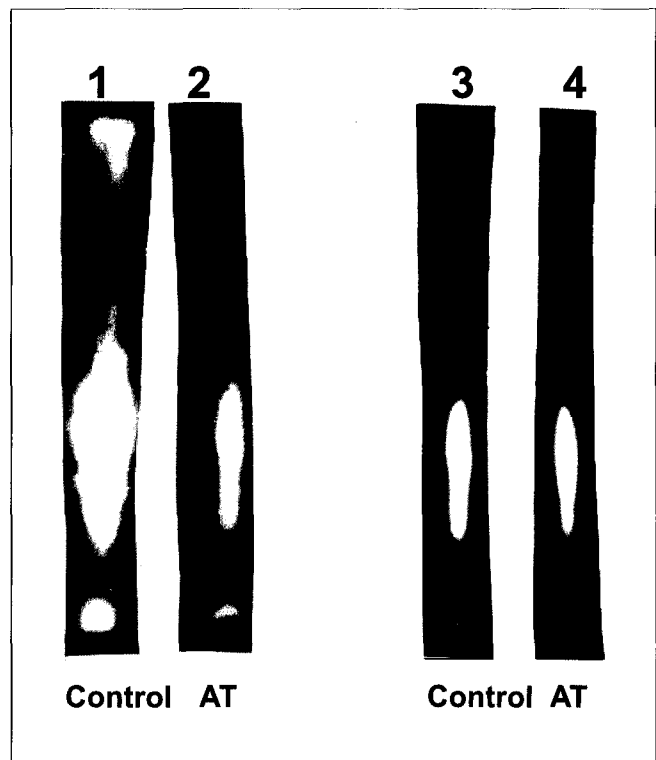


Figura 3. Efecto del AT sobre los isoenzimas de catalasa de *Photobacterium phosphoreum*. (1): *P. phosphoreum* variante K; (2): *P. phosphoreum* variante K incubado con AT; (3): *P. phosphoreum*; (4): *P. phosphoreum* incubado con AT.

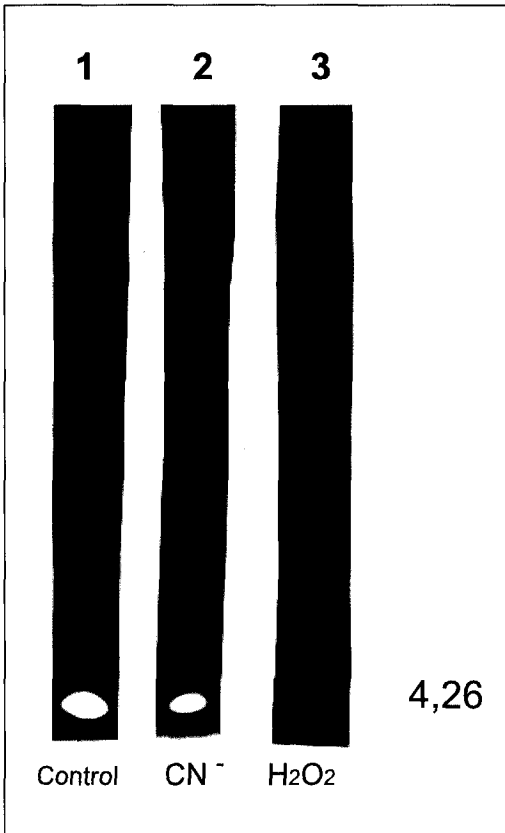


Figura 4. Isoenzima de superóxido dismutasa de bacterias bioluminiscentes marinas; isoelectrofoque en gel de poliacrilamida (pH 3,5-9,5). (1): control; (2): incubado con cianuro; (3): incubado con  $H_2O_2$ .

## BIBLIOGRAFÍA

- Bang, S. S., L. Baumann, M. J. Woolkalis y P. Baumann. 1981. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium* as determined by immunological studies of superoxide dismutase. *Arch. Microbiol.* 130: 111-120.
- Bang, S. S., M. J. Woolkalis y P. Baumann. 1978. Electrophoretic mobilities of superoxide dismutases from species of *Photobacterium*, *Benckea*, *Vibrio*, and selected terrestrial enterobacteria. *Curr. Microbiol.* 1: 371-376.
- Baumann, L., S. S. Bang y P. Baumann. 1980. Study of relationship among species of *Vibrio*, *Photobacterium*, and terrestrial enterobacteria by an immunological comparison of glutamine synthetase and superoxide dismutase. *Curr. Microbiol.* 4: 133-138.
- Clarke, D. J. y C. I. Knowles. 1980. The effect of haematin and catalase on *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* growing on glycerol. *J. Gen. Microbiol.* 121: 339-347.
- Danis, W. B. 1977. Differentiation of catalases in *M. phlei* on the bases of the susceptibility to isoniazid; association with peroxidase and acquired resistance to isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 529-533.
- Dawson, J. H., A. M. Brante, A. M. Huff, S. Kadkhodayan, C. M. Zeitler, M. Sono, C. K. Chang y P. C. Loewen. 1991. The active site structure of *E. coli* HPII catalase. Evidence favoring coordination of a tyrosinate proximal ligand to the chlorin iron. *FEBS Lett.* 295: 123-126.
- Finn, G. F. y S. Condon. 1975. Regulation of catalase synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 123: 570-619.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 41: 35-97.
- González-Lama, Z., M. J. Cutillas y A. M. Lamas. 1983. Polyacrylamide-starch gel electrofocusing of catalase from *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Electrophoresis '82*. D. Stathakos (ed.): 481-484. Walter de Gruyter and Co. Berlín-Nueva York.
- Gregory, E., J. B. Kowalski y L. Holdeman. 1977. Production and some properties of catalase and superoxide dismutase from the anaerobe *Bacteroides distasonis*. *J. Bacteriol.* 129: 1298-1302.
- Hassan, M. H. e I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 253: 6445-6450.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ª ed.: 256-274. Williams and Wilkins. Baltimore, EE UU.
- Hopkin, K. A., M. A. Papazian y H. M. Steinman. 1992. Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 267: 24253-24258.
- Kurfust, M., S. Ghisla y J. W. Hasting. 1983. Bioluminescence emission from the reaction of luciferase-flavin mononucleotide radical with  $O_2^-$ . *Biochemistry* 22: 1521-1525.
- Loewen, P. C., J. Switala, I. von Ossowski, A. Hillar, A. Christie, B. Tattrie y P. Nicholls. 1993. Catalase HPIII of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to cis-heme d. *Biochemistry* 32: 10159-10164.
- Lonnerdal, B., C. Keen y L. Hurley. 1979. Isoelectric focusing of SOD isoenzymes. *FEBS Lett.* 108: 51-55.
- Ma, M. y J. W. Eaton. 1992. Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 7924-7928.

- McEuen, A. R., H. A. O. Hill, G. J. Dring y G. S. Imgran. 1979. Comparison of methods for determining the prosthetic metal ion of bacterial superoxide dismutases in crude extracts. En: *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*. J. Bannister y H. Hill (eds.) 11A: 272-283. Elsevier North Holland Inc. Nueva York; Ámsterdam.
- Meir, E. y E. Yagil. 1985. Further characterization of the two catalases in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 12: 315-320.
- Nies, D. y H. G. Schlegel. 1982. Catalase from *Comamonas compransoris*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28: 311-319.
- Ortega, J. M., V. Costa y E. Montoya. 1976. Distribución y liberación del enzima catalasa en células de *Saccharomyces cerevisiae*. *Cuadernos de Ciencias Biológicas* 5: 71-76.
- Ossowski, I. von, M. R. Mulvey, P. A. Leco, A. Borys y P. C. Locwen. 1991. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* kat E, which encodes catalase HPII. *J. Bacteriol.* 173: 514-520.
- Pesci, E. C., D. L. Cottle y C. L. Pickett. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase in *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 62: 2687-2694.
- Puget, K. y A. M. Michelson. 1974. Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* 56: 1255-1267.
- Rodríguez, S. y J. M. Pionetti. 1981. Inducible catalase in *Pseudomonas fluorescens*. *Biochimie* 63: 535-540.
- Sadosky, A. B., J. W. Wilson, H. M. Steinman y H. A. Shuman. 1994. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J. Bacteriol.* 176: 3790-3799.
- Stavni, H. 1975. Electrophoretic mobility of the catalase of some Mycobacteria. *Arch. Roum. Pathol Exp. Microbiol.* 34: 85-89.
- Watanabe, H., N. Mimura, A. Takimoto y T. Nakamura. 1975. Luminescence and respiratory activities of *Photobacterium phosphoreum*: competition for cellular reducing power. *J. Biochem.* 77: 1147-1155.
- Wayne, B. L. y G. A. Díaz. 1976. Immunoprecipitation studies of mycobacterial catalase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 38-44.
- Zimmerman, R. J. 1976. Comparative zone electrophoresis of catalase of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from mammalian skin. *Can. J. Microbiol.* 22: 1691-1698.

Recibido en septiembre de 1996. Aceptado en diciembre de 1996.