

Caracterización electroforética de bacterias celulolíticas

H. RODRÍGUEZ MESA Y A. ENRÍQUEZ MOURIZ

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 19 de diciembre de 1977

ABSTRACT. The standarization of the polyacrylamide gel electrophoresis technique of soluble proteins of bacteria from the genus *Cellulomonas* was achieved. Reproducible electrophoretic patterns of the two strains under study were obtained. The protein patterns were not affected by the clarification of extracts, by its storage at -15°C for a month, nor by the cell disruption method employed. A characteristic pattern was found for each strain, suggesting the applicability of the technique in the differentiation and characterization of strains in this genus.

RESUMEN. Se logró la estandarización de la técnica de la electroforesis en gel poliacrilamida de las proteínas solubles de bacterias del género *Cellulomonas*. Se obtuvieron patrones electroforéticos reproducibles de las dos cepas estudiadas. Los métodos de ruptura celular probados, la clarificación de los extractos y el almacenamiento a -15°C durante un mes, no afectaron los patrones obtenidos. Se encontró un patrón característico para cada cepa, sugiriendo así la aplicabilidad de la técnica en la diferenciación y caracterización de cepas en este género.

INTRODUCCION

Dado que el conjunto de proteínas de una célula está determinado por su genoma, los patrones electroforéticos de sus proteínas solubles pueden tomarse como una representación indirecta de una buena parte del mismo, constituyendo por tanto una forma de caracterización genética de los microorganismos y un índice para el estudio de las relaciones genéticas entre los mismos. (*Garbey y Rippons, 1968 y Razin y cols., 1970*).

Los estudios realizados por Razin y Rottem, (1967) en *Micoplasmas*, así como por otros autores en distintos microorganismos (*Sacks y cols., 1969*;

Kulik y Brooks, 1970; Larsen y cols., 1971; Davies y Gottlieb, 1973 y Haas y cols., 1974), han probado la validez de la técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles, en la identificación y caracterización genética de micoorganismos hasta el nivel de especie o cepa, en los distintos géneros por ellos estudiados. Se ha planteado así mismo la posibilidad de extender su uso a muchos otros géneros y especies (*Razin y Rottem, 1967*).

La diferenciación y caracterización de cepas en el género *Cellulomonas* es importante debido a la significación económica de este género en la obtención de proteína unicelular por crecimiento directo sobre desechos celulósicos. La realización de trabajos pendientes a la búsqueda y selección de nuevas cepas, por aislamiento directo o mediante mutaciones genéticas, que logren mejoras técnicas y económicas del proceso, es un propósito permanente que lleva aparejado la necesidad de contar con técnicas rápidas y precisas, que además de diferenciar las nuevas cepas obtenidas de las existentes, posibiliten una interpretación más acertada de las variaciones genéticas experimentadas.

Este trabajo aborda la estandarización de la técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles de bacterias del género *Cellulomonas*, con vistas a su diferenciación y caracterización genética.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos. Se emplearon las siguientes cepas de bacterias celulólicas: la cepa IIbc, identificada con el género *Cellulomonas* de acuerdo con el Manual de Clasificación de Bergey (*Enríquez, 1975 y Buchman y Gibbons, 1974*), y la cepa XD, igualmente identificada como *Cellulomonas* y suministrada por el laboratorio de Microbiología del ICIDCA (*Duarte, 1977*). Es conveniente señalar que en el género *Cellulomonas* actualmente se reconoce una sola especie, bajo el nombre de *Cellulomonas flavígena* (*Buchaman y Gibbons, 1974*).

Preparación de los extractos de proteínas. Las cepas fueron mantenidas en cuñas de agar-CMC. Para el cultivo de las células se empleó medio sintético M9, de acuerdo al procedimiento descrito por *Enríquez y cols.*,

(1977), utilizándose como fuente de carbono y energía bagazo de caña pre-tratado según Dunlap, (1969). Los inóculos fueron preparados en erlenmeyers agitados en una zaranda rotatoria durante 48 horas. El crecimiento se efectuó en un fermentador agitado (Biolafitte) a pH-6.5 y temperatura de 35°C. El crecimiento fue seguido turbidimétricamente.

Fueron tomadas muestras en fase logarítmica de crecimiento en distintas corridas bajo las mismas condiciones de crecimiento. Estas fueron filtradas y la biomasa separada por centrifugación a 30 000 xg. El sobrenadante fue desechado y las células fueron lavadas tres veces en ClNa 0.9% y finalmente resuspendidas, a cuyo efecto se probaron tres solventes: Agua destilada, tampón tris-hidroximetilaminometano-ClH (pH-8.9) y tampón tris-hidroximetilaminometanoglicina (pH-8.3).

Se probaron dos métodos de ruptura celular: disrupción ultrasónica en un desintegrador ultrasónico MSE-150 W, a una amplitud de 5 μ durante 4 minutos; y disrupción mecánica en un desintegrador "Braun" utilizando perlas de vidrio de 0.11 mm de diámetro, durante 50 segundos.

El material insoluble fue separado por centrifugación a 26 000 xg durante 30 minutos a 0°C, y la concentración de proteínas en el sobrenadante determinada por el método de Biuret (Robinson y Hugden, 1940). Se probó el efecto de una clarificación de los extractos a 162 000 xg.

Para probar la reproducibilidad de los patrones, para cada cepa se prepararon varios extractos a partir de cultivos realizados en diferentes días, los cuales se almacenaron a -15°C para ser aplicados en una misma corrida.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta se llevó a cabo esencialmente de acuerdo al método de Davies, (1964) y Ornstein, (1964), en un equipo de electroforesis en placa de $12.6 \times 10 \times 0.5$ cm (Chapel y cols., 1974), utilizando tampón tris glicina (pH-8.3) para ambos compartimientos anódico y catódico. La concentración de acrilamida en el gel de separación fue de 8.5% y el pH de 8.9, usándose en gel de compactación de 5% y pH 6.7.

Antes de aplicar las muestras el sistema fue equilibrado a 50 mA durante 5 minutos. Una muestra de entre 40 y 50 μ l del extracto libre de

células conteniendo entre 300-400 μg de proteínas fue mezclada con 20 μl de una solución de sacarosa al 20% y aplicada en la parte superior del gel de compactación (polaridad de corrida del ánodo al cátodo). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura de 12°C en un refrigerador, usando una corriente de 50 mA, probándose distintos tiempos de corrida hasta lograr los mejores patrones, tomando como criterio la definición y el número de bandas. El frente de corrida fue marcado con azul de bromofenol al 0.1%. Se utilizó albúmina bobina (2 mg/ml) como un marcador de referencia.

A continuación en algunos casos, los geles fueron cortados longitudinalmente para probar distintos sistemas de tinción. Esta se realizó con azul de coomassie en concentraciones de 0.25 y 1% durante varios períodos de tiempo entre 1 y 24 horas. Los geles fueron almacenados en ácido acético al 7%. Fueron probados varios extractos paralelamente en el mismo gel y realizadas varias corridas para los diferentes extractos. Los geles fueron registrados en un densitómetro.

RESULTADOS Y DISCUSION

Electroforesis. Los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de corrida entre 3 y 3½ horas, al cabo de las cuales el frente migró entre 5.5 y 6 cm a través del gel de separación. Se observaron ligeras variaciones en la longitud migrada por el frente en diferentes corridas para un mismo tiempo —lo cual puede deberse a diferencias en el voltaje entre las distintas corridas— por lo que es recomendable, para comparaciones, correr las muestras simultáneamente en un mismo gel. Se obtuvieron buenos resultados de tinción con el azul de coomassie al 0.25% durante 4 horas. Cuando se equilibró el sistema por algunos minutos antes de aplicar las muestras se logró una mejoría en la calidad y definición de los patrones, procedimiento éste sugerido por Brewer, (1970). La reproducibilidad de los resultados fue buena en corridas de un mismo extracto repetido en un gel, distintos extractos en un gel, así como de un extracto en diferentes geles. La reproducibilidad de extractos diferentes en un mismo gel se muestra en la Fig. 1.

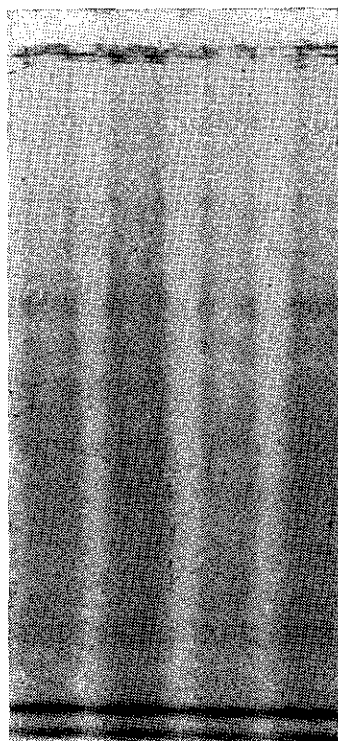


Fig. 1. Corrida en un mismo gel de 4 extractos preparados bajo idénticas condiciones, pero a partir de cultivos realizados en diferentes días.

Análisis de los patrones de cada cepa. Las condiciones de crecimiento y preparación de los extractos, así como las condiciones de corrida, fueron idénticas para ambas cepas. Ello nos brinda la posibilidad de comparar entre sí los patrones obtenidos para cada una de ellas, sobre bases idénticas.

En la Fig. 2, se muestran los patrones de bandas correspondientes a las cepas IIbc y XD, con los correspondientes registros del densitómetro y diagramas realizados en base al cálculo de la posición relativa de las bandas con respecto al frente (Ef). De ella y de la Fig. 3 se puede observar

que los patrones de proteínas de ambas cepas son diferentes, característicos para cada cepa, con algunas bandas comunes a ambas. En total se aprecian 23 bandas en el patrón de la cepa XD y 19 bandas en el de la cepa IIbc. Se puede observar que existen 13 bandas que pueden considerarse comunes para ambas cepas (7 cuyos E_f son idénticos y 6 donde la diferencia entre éstos es de sólo 0.01). En la cepa XD se aprecian 4 bandas que no se observan en la IIbc ($E_f = 0.09$, $E_f = 0.17$, $E_f = 0.36$ y $E_f = 0.49$), mientras que se observan otras 6 bandas que aparecen en ambas, pero con movilidades y/o intensidades diferentes. Esto nos sugiere que cada patrón puede constituir una representación característica de cada cepa, útil en la identificación y caracterización genética de las distintas cepas del género. La correlación que pudiera existir entre las diferencias observadas en los patrones y el fenotipo de cada cepa, constituye un interesante aspecto para estudios futuros.

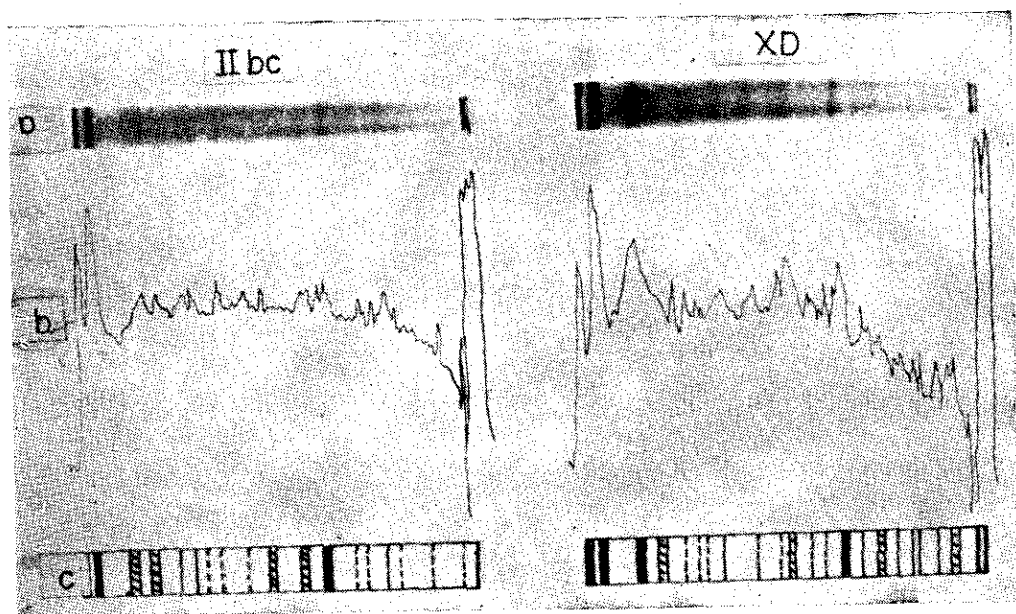


Fig. 2. Patrones de las cepas IIbc y XD. a) Patrón electroforético de las proteínas solubles, b) registros densitométricos y c) representación diagramática.

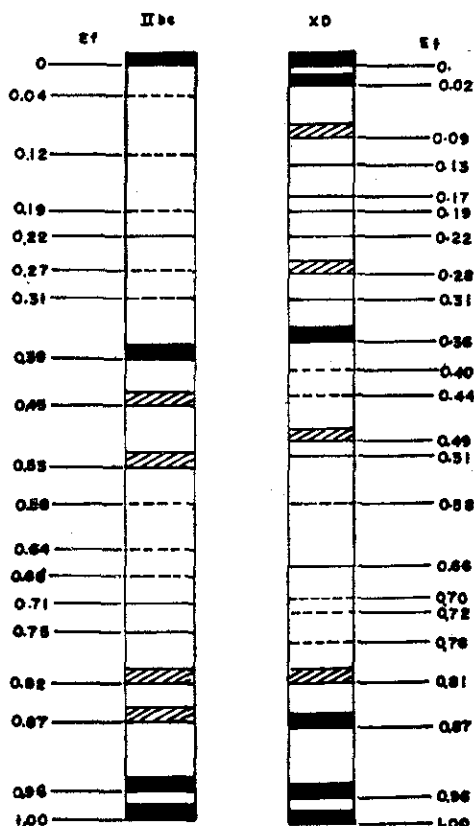


Fig. 3. Representación diagramática de los patrones electroforéticos de las cepas IIbc y XD, con los Ef correspondientes a cada banda.

Aunque debe tenerse en cuenta que dos cepas diferentes podrían dar patrones semejantes o casi idénticos, esto parece ser precisamente característico de cada género o especie (*Davies y Gottlieb, 1973*), dado por la variabilidad existente entre las cepas. Varios autores han encontrado también especificidad en la diferenciación con esta técnica hasta el nivel de cepa —es decir, su validez para diferenciar cepas entre sí— (*Larsen y cols., 1971 y Davies y Gottlieb, 1973*). En nuestro caso, nuestro resultado está en concordancia con el hecho de que en el género *Cellulomonas*, las 10 especies anteriormente reconocidas fueron reducidas a una

sola (*Buchanan y Gibbons, 1974*), por lo que puede existir una variación apreciable entre las distintas cepas del género. Asimismo, este resultado está en concordancia con los estudios de Braden y Thayer, (1976), que encuentran considerable diversificación en estudios serológicos de varias cepas de *Cellulomonas*. Estimamos conveniente, en el futuro, el estudio de un mayor número de cepas del género para reafirmar estos resultados.

Preparación de los extractos. Se encontraron ligeras diferencias entre los tres solventes probados para la resuspensión de los extractos en cuanto a los patrones obtenidos, consistentes en la presencia o ausencia de algunas bandas ténues. En los extractos subsiguientes usamos el tris-glicina, por ser el mismo tampón utilizado para los electrodos (*Brewer, 1969*).

No se observaron diferencias en los patrones de extractos preparados utilizando métodos diferentes de ruptura celular (ultrasonido y desintegración mecánica). De igual forma, no se observaron cambios en los patrones al ser sometidos los extractos a una clarificación por ultracentrifugación a 162 000 xg, eliminándose este paso, que nos había sido sugerido en algunos trabajos (*Davies y Gottlieb, 1973 y Gottlieb y Hepdem, 1966*).

Los patrones de proteínas no se afectaron con el almacenamiento de los extractos a -15°C durante un mes, lo que permite la posibilidad de comparar en un mismo día extractos de cultivos realizados en diferentes tiempos.

CONCLUSIONES

Se logró el ajuste de los parámetros para la estandarización de la técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas solubles de bacterias del género *Cellulomonas*.

A su vez, se encontró un patrón característico para cada cepa estudiada, con algunas bandas comunes, lo cual sugiere que cada cepa tiene un complemento de proteínas reconocible y diferenciable por este procedimiento, el cual nos brindaría por tanto la posibilidad de diferenciar y caracterizar cada una de ellas.

La poca cantidad de células requeridas, la relativa simplicidad del método, disponibilidad de equipos, etc., junto a los resultados obtenidos, sugieren a la electroforesis de las proteínas solubles en gel de poliacrilamida, como una técnica útil y económica en la diferenciación de cepas y mutantes que se obtengan en este género de importancia económica.

RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer la asistencia brindada por los compañeros Lic. Clara González y M. Sc. Hiraldo Lima, del Dpto. de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. También la colaboración de los compañeros Lic. Víctor Cabrera y Julio C. García, del Dpto. de Bioquímica Microbiológica del CENIC, en la técnica de ruptura mecánica; del Lic. Augusto Pérez Reyes, del Dpto. de Metalografía de este centro en los registros densitométricos; a la compañera técnica Isolina Argüelles y finalmente al Dr. Carlos Pascual, por la crítica revisión de este manuscrito.

REFERENCIAS

- BRADEN A. R. AND THAYER D. W. Serological Study of Cellulomones, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 126, 1976.
- BREWER J. M. AND ASWORTH R. B. Disc. Electrophoresis, *J. of Chemical Education*, 46, 1, 1969.
- BREWER G. J. An Introduction to Isoenzyme Techniques 186, Academic Press, New York and London, 1970.
- BUCHAMAN R. E. AND GIBBONS N. E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 629, Baltimore, The Williams, 1974.
- CHAPEL T., IGLESIAS L., BARRETO A., BAISRE F. AND SIMON J. P. Simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gels. *Lab. Practice*, 23, 311, 1974.
- DAVIES B. J. Disc. Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404, 1964.
- DAVIES F. L. AND GOTTLIEB D. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins from several genera of the family Actinoplanaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 43, 1973.

DUARTE E. Comunicación personal, 1977.

DUNLAP C. E. Protein from waste cellulose by chemical-microbial processing. Thesis of Ph. D. Louisiana State University, 1969.

ENRÍQUEZ A. Obtención de proteína unicelular a partir de desechos celulósicos agroindustriales. Tesis de especialidad. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1975.

ENRÍQUEZ A., HERNÁNDEZ D., MONTALVO R. Y CANALES N. Variación de la estructura compleja del bagazo durante el crecimiento bacteriano. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas*, 9, 13, 1978.

GARBAY E. D. AND RIPPON J. W. Proteins and enzymes as taxonomic tools. *Adv. Appl. Microbiol.*, 10, 137, 1968.

GOTTLIEB D. AND HEPDEM P. M. The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* sps. as a taxonomic criterium. *J. Gen. Microbiol.*, 44, 95, 1966.

HAAS H., MICHEL J. AND SACKS T. Identification of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium hortelence* by polyacrylamide gel electrophoresis of their cell protein. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 366, 1974.

KULIK M. M. AND BROOKS A. G. Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* Spp. *Mycologia*, 62, 365, 1970.

LARSEN S. A., BICKHAM S. T., BUCHAMAN T. M. AND JONES W. L. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Corynebacterium diphtheriae*: A possible epidemiological aid. *Appl. Microbiol.*, 22, 885, 1971.

ORNSTEIN L. Disc Electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321, 1964.

RAZIN S. AND ROTTEM S. Identificación de Mycoplasmas and other microorganism by polyacrylamide gel electrophoresis of their cell proteins. *J. of Bacteriol.*, 94, 1807, 1967.

RAZIN S., VALDESUSO J., PUSCHELL R. H. AND CHANOCK R. M. Electrophoretic analysis of cell proteins of T-strain Mycoplasmas isolated from man. *J. of Bacteriol.*, 103 702, 1970.

ROBINSON H. W. AND HUGDEM C. B. *J. Biol. Chem.*, 135, 707, 1940.

SACKS T. G., HAAS H. AND RAZIN S. Polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins of Enterobacteriaceae. A possible taxonomic aid. *Israel J. Med. Sci.*, 5, 49, 1969.