

Caracterización de bacterias celulolíticas por métodos bioquímicos y electroforéticos

H. RODRÍGUEZ, A. ENRÍQUEZ Y W. FERNÁNDEZ

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

Recibido: 15 de septiembre de 1979

Recibido: 22 de noviembre de 1980

ABSTRACT. The characterization and identification of a strain of cellulolytic bacteria was carried out by means of traditional methods as well as by the method of polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. A characteristic pattern was found for the strain, with some common bands to another *Cellulomonas* strain, thus supporting the classification into this genus given up by the biochemical tests. Two variants were assayed for the determination of the protein content of the strain, and its vitamin requirements were investigated by the growth in different culture media, for the more complete characterization of the strain.

RESUMEN. Se realizó la identificación y caracterización de una cepa de bacterias celulolíticas por métodos tradicionales, así como empleando el método de electroforesis de las proteínas solubles en gel de poliacrilamida. Se encontró un patrón electroforético característico para la cepa con algunas bandas comunes a otra cepa del género *Cellulomonas*, apoyando la clasificación dentro de este género dada por las pruebas bioquímicas tradicionales. Se ensayaron dos variantes para la determinación del contenido de proteínas de la cepa y se investigaron sus requerimientos vitamínicos por el crecimiento en distintos medios de cultivo, como elementos para su más completa caracterización.

INTRODUCCION

Las bacterias celulolíticas han sido objeto de estudio desde hace algún tiempo, con vistas a su aplicación en la obtención de proteína unicelular, mediante la fermentación de desechos celulósicos (*Dunlap, 1975; Herrera, 1975; Enríquez, 1978*).

Un aspecto importante al acometer este tipo de estudio es la adecuada identificación y caracterización de los microorganismos a utilizar.

Los métodos tradicionales de identificación enfrentan la necesidad cada vez más imperiosa de complementarse y apoyarse en técnicas más modernas que brinden una mayor confiabilidad y precisión en correspondencia con el moderno concepto biológico de especie.

En general, técnicas como la determinación de la composición de bases del DNA, cromatografía gaseosa, composición de la pared celular y otras, son ya empleadas en este sentido. Dentro de ellas la electroforesis de proteínas solubles en gel de poliacrilamida ha probado ser un método útil y prometedor a estos propósitos (*Razin y Rottem, 1967; Garbey y Rippon, 1968; Davies y Gottlieb, 1973; Haas y cols., 1974*).

En el género *Cellulomonas* ha sido propuesta la aplicación de esta técnica en la caracterización de cepas y como un apoyo importante en los criterios de clasificación de estas bacterias (*Rodríguez y Enríquez, 1980*).

Los objetivos de este trabajo son la identificación y caracterización de una cepa de bacterias celulolíticas, utilizando los métodos bioquímicos tradicionales, paralelamente a la aplicación de la electroforesis de sus proteínas solubles, así como la determinación del contenido de proteínas y los requerimientos vitamínicos de la cepa, como elementos importantes en su caracterización, con vistas a su aplicación como proteína unicelular.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se empleó la cepa Gi_{III}, obtenida tras un proceso de selección aplicado a una cepa aislada de pedazos de caña atacados (*Rodríguez y cols., 1981*).

Pruebas morfológicas

Se hicieron observaciones microscópicas para apreciar forma, tamaño, motilidad y agrupación de las células, así como la prueba de tinción de Gram. Se precisaron las características morfológicas que presentaban las colonias, así como el crecimiento en cuñas.

Pruebas bioquímicas

En general para la realización de estas pruebas se siguieron los procedimientos descritos por Harrigan y Mc Cance (1968) y Hugh y Leifson (1953), así como las pruebas indicadas en el Manual de Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974).

Caracterización electroforética

Con vistas a la aplicación de la técnica de la electroforesis de las proteínas solubles en gel de poliacrilamida en la caracterización de nuestra cepa, se procedió a la obtención de sus patrones electroforéticos, paralelamente a los de una cepa conocida de *Cellulomonas* (cepa IIbc) (Enríquez, 1978), para su comparación entre sí, siguiendo el procedimiento descrito por Rodríguez y Enríquez (1980), con las modificaciones siguientes:

La preparación de los extractos se realizó partiendo de cultivos en zarama a 30°C en medio M9 más tiamina (Rodríguez y cols., 1981), en fase log de crecimiento. La ruptura celular fue realizada en un desintegrador Braun, con perlas de vidrio de 60 y 100 mesh durante 50 segundos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo por un tiempo de 3 horas a 9°C, utilizándose una pre-electroforesis de 5 minutos y muestras conteniendo entre 300-400 µg de proteínas. Se hicieron varias corridas para probar la repetibilidad de los extractos, de ambas cepas, G_{III} y IIbc paralelamente. Los geles fueron registrados en un densitómetro.

Determinación de proteínas

Para determinar el por ciento de proteínas de la cepa, se ensayaron dos variantes del método de Biuret (Robinson y Hogden, 1940). En la primera variante se empleó para la extracción de las proteínas el tratamiento descrito por Stickland (1951) para levaduras y cocos Gram positivos (cinco minutos a ebullición con NaOH). Simultáneamente se realizó para la misma biomasa el procedimiento descrito por Robinson y Hogden (1940), consistente en tratar las muestras con NaOH en frío, pero durante 24 horas. Se realizó un análisis estadístico (test de Student) para la comparación de ambas variantes y se calculó el intervalo de confianza con la variante finalmente escogida.

Requerimientos vitamínicos

La cepa fue cultivada en zaranda simultáneamente en medio M9 con y sin tiamina (único suplemento vitamínico utilizado en los cultivos en placas durante el aislamiento y la purificación de la cepa) (Rodríguez y cols., 1980), así como en medio de Srinivassan, que contiene extracto de levadura, para determinar en su conjunto si la cepa presentaba o no requerimientos vitamínicos para su crecimiento. El crecimiento en el medio sin vitaminas fue comparado con el de la cepa IIBC, auxotrófica a la tiamina, corrida paralelamente

RESULTADOS Y DISCUSION

Observaciones microscópicas y morfológicas

Bacilos cortos, pleomórficos, sin organización apreciable, algunas formas curvas. Gram variable. Móvil. En placas de agar-CMC, colonias lisas, cóncavas, de bordes regulares, pequeñas y de color blanco.

Pruebas bioquímicas

Un resumen de algunas características generales de nuestra cepa en comparación con las de distintos géneros de bacterias celulolíticas aparecen en la Tabla I. De ella podemos inferir que todos los géneros, excepto Cellulomonas, tienen características excluyentes con relación a nuestra cepa, por lo que nos inclinamos a pensar que la misma perteneciera a este género.

Los resultados del conjunto de pruebas bioquímicas y otras características se muestran en la Tabla II, en comparación con el género Cellulomonas. La mayoría de las características, tanto bioquímicas como morfológicas coinciden con las reportadas para este género en el Manual de Bergey.

La ausencia de requerimientos de biotina y tiamina puede explicarse dado que en el proceso de aislamiento se utilizaron medios en placas sin suplemento vitamínico alguno (Rodríguez y cols., 1980) lo cual pudo conducir al aislamiento de un mutante prototrófico de una Cellulomona del suelo.

Por ello en primera instancia, consideramos que la cepa G_{III} debe pertenecer al género Cellulomonas, familia Corinebacteriaceae.

Características generales de la cepa Gi_{III} en comparación con distintos géneros de bacterias celulolíticas

[illegible]

TABLA II

Resultados de las pruebas bioquímicas y otras para la cepa Gi_{III} en comparación con el género Cellulomonas

Habitad	Tempe- ratura	pH	Requeri- mientos Vitamíni- cos	Requeri- mientos de Oxígeno	N inorgá- nico co- mo úni- ca fuen- te de N	Creci- miento en agar nu- triente	Creci- miento en agua de peptona	Creci- miento en papel de filtro	Moti- lidad	Produc- ción de áci- do a par- tir de glucosa	Hidroli- sis del almidón	Hidró- lisis de la ge- latina	Reduc- ción de NO ₃ N ₂	Cata- losa
Gi III	Suelo	30°	Neutral	—	Anaerobic facultativo	+	+	+	+	+	+	?	— Reduce el NO ₃ más allá del esta- do de NO ₂	+
Cellulo- monas	Suelo	30°	Neutral	Biotina y Tiamina	Anaerobio facultativo	+	+	+	±	+	+	+ Lenta- mente	+ La Ma- yoría	+

Caracterización electroforética

En la Fig. 1 se presentan los patrones electroforéticos de las cepas Gi_{III} y IIbc con los correspondientes registros del densitómetro y diagramas realizados en base al cálculo de las movilidades relativas de cada banda con respecto al frente (Ef).

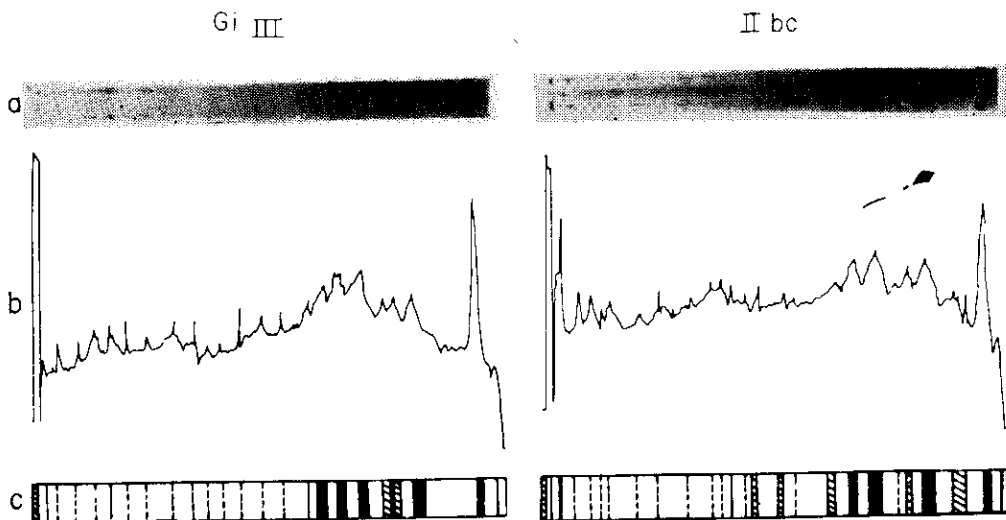


Fig. 1. a. Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de las cepas Gi_{III} y IIbc. b. Registros densitométricos. c. Representación diagramática.

Podemos observar que el patrón obtenido para la cepa Gi_{III} presenta 24 bandas, y el de la cepa IIbc, 26 bandas. Más detalladamente en la Fig. 2 podemos precisar que existen un total de 17 bandas comunes a ambos patrones en cuanto a sus movilidades relativas. Sin embargo, existen 9 bandas que están presentes en la IIbc y no en la Gi_{III} (Ef. 0.02, 0.07, 0.13, 0.32, 0.36, 0.40, 0.44, 0.51, 0.89), y 7 bandas en esta última que no aparecen en la IIbc (Ef. 0.06, 0.17, 0.30, 0.35, 0.41, 0.50, 0.60). Además, entre las 17 bandas comunes existen 7 cuyas intensidades difieren entre ambos patrones, teniendo el resto intensidades similares, como puede observarse a partir de los registros densitométricos de los geles y de la fotografía de los mismos (Fig 1).

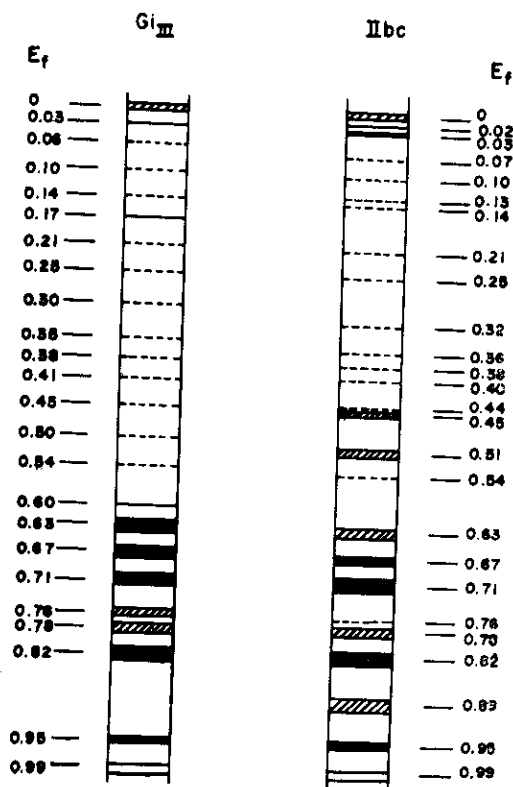


Fig. 2. Representación diagramática de los patrones electroforéticos de las cepas Gi_{III} y $IIbc$, con los E_f correspondientes a cada banda.

De todo esto podemos concluir que la cepa Gi_{III} tiene un patrón electroforético característico, diferente al de la cepa $IIbc$, y a la vez con una serie de bandas comunes o semejantes, lo cual sugiere, por una parte un apoyo a su clasificación dentro del género *Cellulomonas* (bandas comunes), y a la vez concuerda con resultados anteriores que sugirieron la posibilidad de que en el género *Cellulomonas* cada cepa pudiera presentar un patrón electroforético característico y diferenciable, (apoyado en la gran variabilidad de cepas dentro del género, al reconocerse una sola especie actualmente) (*Buchanan y Gibbons, 1974*), con algunas bandas comunes entre las diferentes cepas del género. Los resultados presentes sugieren nuevamente un patrón con bandas comunes al género y otras características para cada cepa en cuestión.

Esto debe, no obstante, confirmarse más adelante continuando el estudio de un mayor número de cepas. No obstante, el patrón electroforético de las proteínas solubles de la cepa Gi_{III} puede de hecho constituir un marcador para su caracterización tanto desde el punto de vista práctico como genético, teniendo en cuenta que constituye de un modo indirecto una representación fenotípica de su genoma.

Determinación de Proteínas

El resultado de la comparación estadística de las dos variantes ensayadas del método de Biuret arrojó que la variante de ebullición por 5 minutos en NaOH da valores significativamente superiores con un 95% de confianza, extrayéndose con el tratamiento en frío aproximadamente un 83% de las proteínas extraídas con el método de ebullición. Esto está en concordancia con los resultados de Herber y cols., (1971), quienes encontraron que en general, la extracción con NaOH en frío en bacterias Gram negativas y bacilos no es completa, y en Gram positivas y levaduras apenas se realiza, lográndose con el calentamiento 5 minutos al parecer la extracción total, sin afectar el color dado por la proteína.

A similares resultados llegaron Iglesias y cols. (1978) con la cepa IIbc. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en nuestro sistema existen compuestos como la celulosa y la lignina que pudieran interferir en la determinación colorimétrica de las proteínas, por lo que es necesario para resultados más concluyentes, continuar el estudio de esta técnica para nuestras condiciones, tomando en cuenta estos factores y sus posibles interferencias.

Requerimientos vitamínicos

En la Fig. 3 se muestran las curvas de crecimiento representativas de las distintas corridas de la cepa Gi_{III} en medio de Srinivassan, M9 suplementado con B₁ y M9 sin vitaminas. En ella puede apreciarse que el crecimiento en el medio sin ningún suplemento vitamínico resulta superior en D.O. máxima alcanzada incluso al medio de Srinivassan, que contiene extracto de levadura, por lo que podemos inferir que ningún factor vitamínico externo resulta necesario a la cepa Gi_{III} para alcanzar un buen crecimiento, al menos en las condiciones hasta ahora ensayadas. (Tabla III).

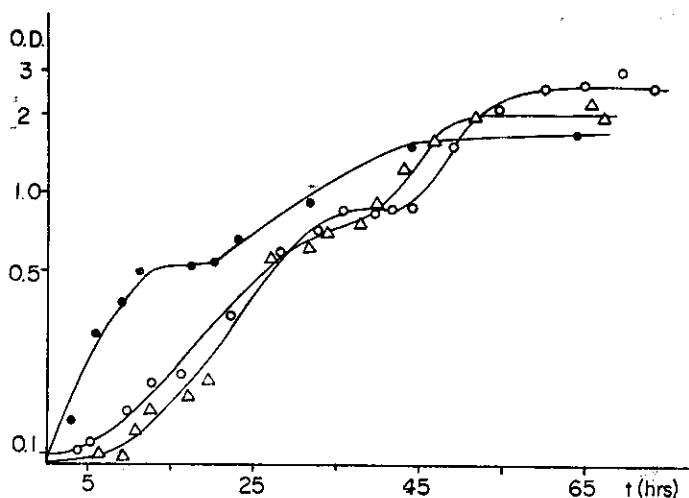


Fig. 3. Curvas de crecimiento de la cepa Gi_{III} en 3 medios diferentes. ● Srinivassan
○ M9 + tiamina △ M9 sin tiamina

TABLA III

Contenido de proteínas de la cepa Gi_{III} crecida en distintos medios

Medio	% Proteínas
Srinivassan	39 ± 2
M9 + B ₁	$38,5 \pm 0,8$
M9	40 ± 3

Resulta ilustrativo en este sentido la comparación del crecimiento de la cepa Gi_{III} con el de una *Cellulomonas auxotrófica* a la tiamina (IIbc), que se muestra en la Fig. 4. Puede apreciarse el escaso crecimiento de la IIbc en comparación con la Gi_{III} , lo cual apoya las conclusiones anteriores.

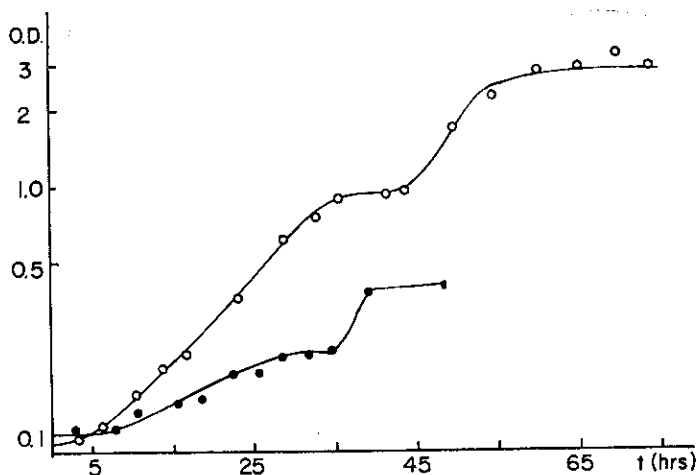


Fig. 4. Curvas de crecimiento de las cepas Gi_m y IIbc, en medio M9 sin vitaminas.
● Gi_m ○ IIbc

CONCLUSIONES

Se identificó la cepa en estudio como perteneciente al género *Cellulomonas*.

La aplicación de la técnica de electroforesis de proteínas solubles en gel de poliacrilamida reafirmó las posibilidades de su aplicación en la caracterización de este tipo de bacterias, al obtenerse un patrón característico para la cepa, con una serie de bandas comunes a otra cepa del género *Cellulomonas*, que apoya su ubicación dentro del género y provee a la vez un marcador de caracterización de la cepa.

La variante de ebullición por 5 minutos en NaOH para la extracción de las proteínas resultó la más apropiada en la aplicación del método de Biuret de determinación de proteínas. Esta arrojó un contenido de proteínas para la cepa entre 38-40%.

La cepa no mostró poseer requerimiento vitamínico alguno, al menos en las condiciones ensayadas, lo cual representa una ventaja económica en relación con la cepa hasta el momento utilizada (auxotrófica a la tiamina).

RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer su colaboración a las técnicas Isolina Argüelles y Digna Real, así como al resto de los compañeros del Dpto. de Fermentaciones del CENIC, y al Lic. Alberto Herrera, de la Fac. de Biología de la Universidad de La Habana por sus orientaciones en el aspecto de la caracterización bioquímica.

REFERENCIAS

- BUCHAMAN R. E. AND GIBBONS N. E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore The Williams, 629, 1974.
- 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.
- DUNLAP C. E. Production of SCP from insoluble agricultural wastes by mesophiles. In: *Single Cell Protein II*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 244, 1975.
- ENRÍQUEZ A. Obtención de proteína unicelular a partir de desechos celulósicos mediante procesos fermentativos. Tesis de Candidatura, Inst. Microbiología, Acad. Ciencias Checa, Praga, 1978.
- GARBEY E. D. AND RIPPONS Y. W. Proteins and enzymes as taxonomic tools. *Adv. Appl. Microbiol.*, 10, 137, 1968.
- HAAS H., MICHEL J. AND SACKS T. Identification of *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium hortelense* by Polyacrylamide gel electrophoresis of their cell proteins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 366, 1974.
- HARRIGAN W. F. Y MC CANCE M. E. *Métodos de laboratorio en microbiología*. Editorial Academia, España, 1968.
- HERBERT D., PHIPPS P. J. AND STRANGE R. E. *Methods in Microbiology*, 5B, Ed. Norris J. R. and Ribbons D. W. Acad. Press, New York, 244, 1971.
- HERRERA A. La Fermentación de los materiales celulósicos de la caña de azúcar. *Rev. Ciencias Serie 5, Bioquímica Farmacéutica* 13, marzo 1975.
- HUGH R. AND LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24, 1953.
- IGLESIAS G. Y LÓPEZ R. Comunicación personal, 1978.
- RAZIN S. AND ROTTEM S. Identification of Mycoplasmas and other microorganisms by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 94, 1807, 1967.

RODRÍGUEZ H. Y ENRÍQUEZ A. Caracterización electroforética de bacterias celulolíticas. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 11, 197, 1980.

RODRÍGUEZ H., ENRÍQUEZ A. Y FERNÁNDEZ W. *Revista de: Ciencias Biológicas*, 13, 15, 1982.

ROBINSON H. W. AND HOGDEN C. C. *J. Biol. Chem.*, 136, 707, 1940.

STICKLAND H. L. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 698, 1951.