

CONFRONTACION DE DIVERSOS METODOS DE RUPTURA
SOBRE N-11, BACTERIA CAPAZ DE DESARROLLARSE EN
MEDIOS DEFICIENTES EN FOSFORO

por

RUIZ-BRAVO, A.; GARCIA-MARTOS, P.; KOUWATLI, K.;
RAMOS-CORMENZANA, A.

RESUMEN

Mediante el empleo de distintos métodos de ruptura de células bacterianas: ondas ultrasónicas, congelaciones y descongelaciones sucesivas y lisis enzimática, estudiamos su acción y rendimiento sobre la bacteria denominada N-11, caracterizada por su capacidad para desarrollarse en medios deficientes en fósforo.

El empleo de ondas ultrasónicas ha resultado ser la técnica más eficaz de todas las ensayadas. La liberación de proteínas citoplasmáticas se muestra mínima en medios deficientes en fósforo (medio P).

RÉSUMÉ

On a étudié des différents méthodes de désintégration de cellules bactériennes: ondes d'ultra-son, congélation et décongélation, et rupture enzymatique, sur la souche N-11, bactérie qui peut croître aux milieux déficients de phosphore.

L'emploi des ondes ultrasoniques se montre comme le plus efficient méthode de tous les essayés. La libération des protéines est minime aux milieux déficients de phosphore (milieu P).

SUMMARY

The desintegration of a special strain N-11 —which shows a peculiar ability to grow on phosphorus deficient media— with the use of different methods for desintegration matic, was studied.

Ultrasonic waves was more efficient technique that other methods used. It also was shown than in P medium (a phosphorus deficient media) the protein release was minimum.

INTRODUCCION

Entre los distintos métodos utilizables en la ruptura de células bacterianas, aplicables a diversos fines, podemos citar como más clásicos: lisis enzimática, empleo de abrasivos, acción de ondas sónicas y ultrasónicas, congelaciones y descongelaciones bruscas y sucesivas, presión, etc. (5). Otros procedimientos conllevan a desnaturalización de ciertas sustancias lábiles, como ocurre, por ejemplo, con los tratamientos térmicos (ebullición, autoclavado).

La lisis enzimática por medio de lisozima ha mostrado su eficacia sobre bacterias Gram positivas, determinando la formación de protoplastos que se lisan en medios hipotónicos (4) (1).

El efecto de las ondas ultrasónicas sobre las células bacterianas es bien conocido. Se ha discutido el efecto de la formación de microburbujas gaseosas en el seno de la suspensión (cavitación). En principio, la cavitación parece ser indicio de una pérdida de la energía que debiera incidir sobre las bacterias, pero según algunos autores las microburbujas pueden ejercer un efecto beneficioso facilitando la ruptura. WILLIAMS & CHASE han revisado algunos aspectos en este sentido (5).

Un salto térmico brusco de suficiente amplitud puede obtenerse alternando bajas temperaturas con calentamientos a temperaturas moderadas. Sucesivas repeticiones conducen a la ruptura celular, si bien algunas bacterias pueden presentar prolongada resistencia (5).

Pretendemos estudiar la eficacia de estos tres procedimientos sobre la cepa N-11, caracterizada por su capacidad para desarrollarse en medios deficientes en fósforo, utilizando medios con bajo contenido en fósforo y medios enriquecidos. La cepa N-11 se presenta como bacilos Gram positivos, y ha sido descrita por RAMOS-CORMENZANA y colaboradores (3), quienes han estudiado diversos aspectos de su comportamiento y variaciones morfológicas en relación al fósforo como nutriente.

MATERIAL Y METODOS

Medios de cultivo

El medio P descrito por RAMOS-CORMENZANA (2) está caracterizado por ser deficiente en fósforo.

El medio P+P se prepara a partir del medio P por adición de PO_4HNa_2 hasta concentración final de 1 g/ 1000 ml.

Como medio enriquecido, se ha utilizado agartripticasa-soja (TSA).

Suspensiones bacterianas

Todas las suspensiones de N-11 destinadas a lisis se han preparado a partir de cultivos de 48 horas, obtenidos en frascos Roux. Los inóculos originados de estos cultivos procedían siempre del mismo medio que el de cultivo. Los microorganismos se recogen en solución salina estéril, lavándose por centrifugación a 5.000 rpm, tras lo cual se resuspenden en tampón. Las suspensiones obtenidas se valoran por turbidimetría, midiendo la transmitancia por medio de un espectrógrafo Beckman, a 680 nm. Para realizar cada serie de experiencias se iguala la transmitancia de todas las suspensiones utilizadas.

Lisis enzimática

Se han utilizado dos tipos de lisozima: Bacto-lysozyme (DIFCO) y Lisozima-Cl inyectable (WASSERMANN). Se prepararon soluciones extemporáneas, disolviendo 1 mg de lisozima en 10 ml de tampón fosfato pH 6,2 (DIFCO).

Se sigue la técnica descrita por WEIBULL (4) con algunas modificaciones. A 4,5 ml de suspensión de N-11 se adicionan 0,5 ml de la solución de lisozima, la cual queda por tanto a una dilución final de 1/100.000. Los tubos se incuban 20 minutos a 37°C, tras lo cual se procede a su lectura. Se preparan controles de lisozima (4,5 ml de tampón fosfato + 0,5 ml de solución de lisozima) y de las distintas suspensiones de N-11 (4,5 ml de suspensión + 0,5 ml de tampón fosfato).

Lisis por ultrasonidos

Se utiliza un aparato de ultrasonidos (MSE) con sonda de titanio. Las suspensiones de N-11 se someten durante una hora a una frecuencia de 20-22 kc/seg., registrándose amplitudes próximas a 2 micras.—Con el fin de obtener resultados comparables

con los de las otras técnicas, las suspensiones se llevan a la misma transmitancia, por adición de tampón de fosfato, utilizándose los mismos controles de N-11.

Congelaciones y descongelaciones sucesivas

Las suspensiones de N-11 se someten sucesivamente a temperaturas de 37°C y -20°C, lo que supone un salto térmico de 57°C. Se realizó un total de cinco congelaciones en cada caso. Con vistas a la comparación de resultados, se guardaron las precauciones anteriormente reseñadas en cuanto a la transmitancia de las suspensiones y la preparación de controles.

Lecturas

Los resultados de los distintos tratamientos se valoran según dos parámetros: Disminución de la turbidez y aumento de la absorción de UV correspondiente a las proteínas citoplasmáticas liberadas. Ambas medidas se efectúan en un espectrofotómetro Beckman.

La disminución de turbidez se aparecía midiendo la transmitancia en el visible, a 680 nm.

La absorción de las proteínas liberadas se mide a 260 y 280 nm, ya que las proteínas se absorben desigualmente a distintas longitudes de onda (4). Es preciso controlar la absorbancia propia de la lisozima, en el caso de la lisis enzimática. Las bacterias se eliminan por centrifugación a 5.000rpm, midiéndose la absorbancia de los sobrenadantes libres de células.

RESULTADOS

En la tabla I se expresan los resultados obtenidos en las mediciones de la transmitancia de las distintas suspensiones de N-11, sometidas a lisis, a 680 nm.

En la tabla II se recogen los resultados correspondientes a las mediciones de las proteínas liberadas en los sobrenadantes de N-11, por absorbancia a 260 y 280 nm.

Los controles de los dos tipos de lisozima empleados dieron un 100% de transmitancia a 680 nm, y menos de 0,01 de absorbancia a 260 y 280 nm.

TABLA I.—Efecto de los distintos métodos de ruptura sobre las suspensiones de N-11: Medida de la transmitancia a 680 nm.

Medio	Control	Lisozima- Difco	Lisozima- Wassermann	Ultrasonidos	Congelación y Descongelación
P	54	64	69	60	59
P+P	54	65	67	71	67
TSA	54	68	72	75	72

TABLA II.—Medida de las proteínas liberadas en los sobrenadantes de N-11 por absorbancia a 260 y 280 nm.

Medio	Control		Lisozima- Difco		Lisozima- Wassermann		Ultrasonidos		Congelación y Descongelación	
	260nm	280nm	260nm	280nm	260nm	280nm	260nm	280nm	260nm	280nm
P	0,06	0,04	0,09	0,07	0,11	0,08	0,11	0,08	0,10	0,07
P+P	0,06	0,03	0,12	0,10	0,14	0,10	0,26	0,14	0,19	0,11
TSA	0,06	0,04	0,10	0,08	0,12	0,09	0,39	0,20	0,30	0,16

DISCUSION

En los tres métodos ensayados para la ruptura de la pared celular de N-11 se observa una variación de la cantidad de proteínas liberadas, según el medio de cultivo utilizado para el desarrollo de dicha bacteria. Se denota una mayor resistencia de N-11 en medio P, donde la proteína liberada es mínima. Ello puede explicarse por la pobreza de protoplasma que presentan las bacterias en dicho medio, fácilmente comprobable al microscopio (protoplasma fuertemente vacuolizado). Es suficiente la adición de fósforo al medio (medio P + P) para que aumente considerablemente la liberación de proteínas. En medio enriquecido (TSA) la cantidad de proteínas liberadas es máxima.

La lisis enzimática se muestra más efectiva utilizando diluciones de lisozima a bajas concentraciones (1/100.000); trabajando on concentraciones mayores (1/2.000) se obtienen resultados más bajos. De los dos tipos de lisozima ensayados, la lisozima-Cl inyectable (WASSERMANN) es superior que Bacto-Lysozume (DIFCO) en todos los medios de cultivo usados.

Las proteínas liberadas por lisis enzimáticas arrojan valores bajos, incluso las procedentes de N-11 en medio P+P y TSA. Por el contrario, la lisis bacteriana muestra un aumento para N-11 desarrollada en medio P lo cual no se da en los otros métodos de ruptura utilizados, posiblemente sea debido a una mayor acción de la lisozima en paredes celulares formadas en deficiencia de fósforo.

El empleo de ondas ultrasónicas parece en general ser el método más eficaz para la lisis de N-11, aunque en medio P la lisozima actúa más intensamente.

La máxima liberación de proteínas se obtiene empleando ultrasonidos, en todos los medios ensayados.

La ruptura de N-11 por congelaciones y descongelaciones sucesivas ha demostrado una situación intermedia en relación con los otros métodos probados, tanto en la lisis bacteriana como en la liberación de proteínas. Su acción ha sido satisfactoria, observándose una actuación más enérgica en medio enriquecido (TSA) que en medio deficiente en fósforo (medio P).

La circunstancia de que determinemos la absorbancia a dos diferentes longitudes de onda, evidencia que la absorción es mayor a 260 nm.

Confrontando los tres métodos de ruptura ensayados para N-11, consideramos como método más idóneo para realizar la lisis bacteriana cuando se trabaja en medio deficiente en fósforo (medio P) al procedimiento enzimático mediante lisozima. Sin embargo, si lo que se pretende analizar es la liberación de proteínas, el empleo de ondas ultrasónicas resulta ser mejor.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HUNTER, M. I. S.; MUIR, D. O. M. & THIRKELL, D. (1973).—“Effect of Lysizyme treatment on cell wall ultraestructure in *Sarcina flava*”. J. Bacteriol. 116, 483.
- (2) RAMOS-CORMENZANA, A. (1975).—“Aislamiento de bacterias en medios deficientes en fósforo”. Ars Pharm. 16, 203.
- (3) RAMOS-CORMENZANA, A.; MARTINEZ-BROCAL, A. & GONZALEZ, J. (1976).—“Morphological and physiological modifications produced in bacteria on a phosphorus deficient medium”. Proceedings of the Soc. Gen. Microbiol. 4, 45.
- (4) WEIBULL, C. (1953).—“The isolation of protoplast from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with Lysozyme”. J. Bacteriol, 66, 688.
- (5) WILLIAMS, C. A. & CHASE, M. W. (1967).—“Methods in Immunology and Immunochemistry”. Vol. I. Academic Press. New York and London.