

Aislamiento y caracterización de bacterias carboxidótrofas potencialmente útiles en el desarrollo de un sensor enzimático para monóxido de carbono*

Isolation and characterization of potentially useful carboxidotrophic bacteria in the development of an enzymatic sensor for carbon monoxide

Raúl A. Cuervo

Biólogo. Profesor Tiempo Completo de la USB

Diana M. Gómez

Química,
Universidad del Valle.

Neyla Benítez

Bióloga, magíster en Microbiología,
Universidad del Cauca.

Olaf Upegui

Ingeniero Agroindustrial
Director Programa de Ingeniería Agroindustrial, USB

Enrique Bravo

Bioquímico, magíster en Ciencias,
Universidad del Valle.

Walter Torres

Químico, doctorado en Química,
Universidad del Valle

Fernando Larmat

Químico, doctorado en Química,
Universidad del Valle.

Grupo de investigación: *Biotecnología vegetal*
Universidad de San Buenaventura Cali

Resumen

Este trabajo reporta el aislamiento y caracterización de cuatro cepas nativas provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales de la población de Ginebra, provincia del Valle del Cauca, Colombia, que fueron cultivadas en un medio mineral saturado con monóxido de carbono a 30 °C bajo agitación constante. Su comportamiento se comparó con el de la bacteria *Oligotropha carboxydovorans*, cepa OM 5, adquirida a través de la Type American Culture Collection (ATCC) y estudiada anteriormente en la construcción enzimático para CO.

Palabras clave: Bacterias carboxidótrofas, monóxido de carbono, sensor enzimático, *Oligotropha carboxydovorans*

Abstract

This paper reports the isolation and characterization of 4 native strains from a wastewater treatment plant in the town of Ginebra, Valle del Cauca, Colombia, that were grown in a mineral environment saturated with Carbon Monoxide at 30°C under constant agitation. Their behavior was compared to the *Oligotropha carboxydovorans* bacterium, OM 5 strain, acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) and previously studied in the enzymatic construction for CO.

Keywords: Carboxidotrophic bacteria, carbon monoxide, enzymatic sensor, *Oligotropha carboxydovorans*.

* Este informe hace parte de las investigaciones adelantadas en el grupo *Biotecnología vegetal*, registrado por Colciencias e inscrito en el Centro de Investigaciones Bonaventuriana de la Universidad de San Buenaventura Cali.

Fecha de recepción: Septiembre de 2005.

Aceptación para su publicación: Noviembre de 2005.

Introducción

El monóxido de carbono es oxidado en la naturaleza por bacterias que tienen la capacidad de producir la enzima monóxido de carbono oxidasa, inducida durante su crecimiento. En este grupo de bacterias carboxidótrofas se encuentran especies como las *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Hidrogenomonas* y *Oligotrophas*, entre las más estudiadas.

Las bacterias carboxidótrofas son organismos quimiolitótrofos capaces de utilizar el monóxido de carbono (CO) como única fuente de carbono y energía. La capacidad para metabolizar el CO depende de la producción de enzimas denominadas monóxido de carbono deshidrogenasas, las cuales catalizan la oxidación de CO a CO₂. Las carboxidótrofas usan los electrones derivados de esta reacción para la asimilación de parte del CO₂ producido y para impedir la inhibición del CO. Además, pueden crecer con H₂ + CO₂ y son litótrofas facultativas, capaces de usar una variedad de sustratos orgánicos para crecer de manera heterótrofa (MEYER & SCHLEGEL, 1983, 1995).

Su gran diversidad taxonómica, comprende más de 15 especies, descritas en por lo menos ocho géneros, entre los que se encuentran *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Azomonas*, *Hidrogenomonas*, *Azotobacter* y *Oligotrophas*. Entre las especies más estudiadas están *Oligotrophas carboxidovorans*, *Bacillus schlegelli* y *Alcaligenes carboxydus* (MEYER & SCHLEGEL, 1995; LORITE, et al, 2000).

La diversidad de las bacterias en estudio se sustenta en diferencias con respecto al con-

tenido de G+C del DNA, coloración de Gram, forma, presencia de flagelos, resistencia antibiótica y utilización de sustratos orgánicos. Sin embargo, ellas comparten algunas propiedades generales como la de ser aeróbicas obligadas y autotróficas facultativas, su estado flagelado es máximo al final de la fase de crecimiento exponencial (MEYER & SCHLEGEL, 1995).

La mayor parte de estas bacterias, conocidas y caracterizadas, se han aislado a partir del suelo. Algunas se han obtenido de aguas residuales (DRAKE, 1982; ZAVARZIN & NOZHEVNIKOVA, 1974; MEYER, et al, 1978). Se considera que el consumo de CO en el suelo y en aguas residuales y su conversión en CO₂ por las carboxidótrofas es un proceso de gran significado ecológico, pues constituiría el principal sumidero de CO de la naturaleza (Conrad & Séller, 1980; Brock, 2000).

De otro lado, las propiedades de las enzimas que oxidan CO presentes en las bacterias carboxidótrofas, pueden aprovecharse tecnológicamente para la construcción de biosensores enzimáticos, de tipo amperométrico, para la detección de CO con selectividad y sensibilidad mejoradas con respecto a sensores no enzimáticos (TURNER, et al, 1984; CALVO & DANILOWICZ, 1997).

No se conocen estudios anteriores sobre carboxidótrofas nativas en Colombia. En este trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de cuatro bacterias carboxidótrofas nativas aisladas a partir de aguas residuales en una planta de tratamiento situada en la localidad de Ginebra, departamento del Valle del Cauca.

Materiales y métodos

Organismos: Para los estudios de caracterización de las bacterias carboxidótrofas nativas se utilizó como referencia la *Oligotropha carboxydovorans*, cepa OM 5, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC No. 49405). Además, se logró el aislamiento de cuatro de estas bacterias procedentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ginebra, Valle del Cauca (Colombia).

Medio de crecimiento: Para el crecimiento autotrófico se utilizó el medio mineral ATCC No. 1789, que contenía la siguiente composición (g/l de agua destilada) Na_2HPO_4 , 12 H_2O (9 g), KH_2PO_4 (1,5 g), NH_4Cl (1,5 g), MgSO_4 , 7 H_2O (0,2 g), CaCl_2 , 2 H_2O (20 mg), citrato férrico de amonio (1,2 mg), elementos trazas (1 ml). El pH final fue de 6,8.

Elementos trazas: ZnSO_4 , 7 H_2O (100 mg), MnCl_2 , 4 H_2O (30 mg), H_3BO_3 (300 mg), CoCl_2 , 6 H_2O (200 mg), CuCl_2 , 2 H_2O (10 mg), NiCl_2 , 6 H_2O (20 mg), Na_2MoO_4 , 2 H_2O (900 mg), Na_2SeO_3 (20 mg).

El crecimiento autotrófico fue realizado mediante la inoculación de las bacterias aisladas y de la *Oligotropha carboxydovorans*, OM 5, en un medio mineral líquido, en el que la única fuente de carbono disponible para la bacteria provenía del monóxido de carbono. Los cultivos se realizaron en 90 ml del medio mineral inoculado con 10 ml de la muestra de agua residual. El Erlenmeyer, con el medio de cultivo inoculado, fue colocado en un desecador saturado con monóxido de carbono y con agitación constante a 30 °C durante tres días, tiempo necesario para que las células alcanzaran su fase exponencial (Ver Figura 1).

Figura 1



Montaje para el crecimiento de las bacterias carboxidótrofas nativas

Una vez se observó el crecimiento bacteriano por ligera turbidez del medio y se verificó por recuento celular en la cámara de Neubauer, se hicieron siembras en medio sólidas para caracterizar las colonias. Este medio sólido era el mismo medio líquido al cual se le agregaba agar (15g/L). La pureza de los cultivos se aseguró mediante réplicas sucesivas y verificación por microscopía después de coloración de Gram.

El crecimiento heterotrófico se realizó con el medio mineral líquido, suplementado con un ácido orgánico, acetato, piruvato, lactato, crotonato, malato, succinato o formato, en un ambiente sin CO . Todas las demás condiciones fueron similares a las del cultivo autotrófico.

Identificación bacteriana: A las cepas aisladas se les realizaron diferentes pruebas, como coloración de Gram, esporas, pruebas bioquímicas y de resistencia antibiótica. (Ampicilina, Penicilina, Novobiocina, Oxitetraciclina, Bacitracina, Kanamicina, Eritromicina, Tetraciclina, Carbamicina, Neomicina). Estas pruebas fueron repetidas cinco veces. Además, se hizo una primera identificación morfológica por medio de microscopía electrónica. Se utilizó el kit

de diagnóstico BBL Cristal para afinar las pruebas de identificación.

Resultados y discusión

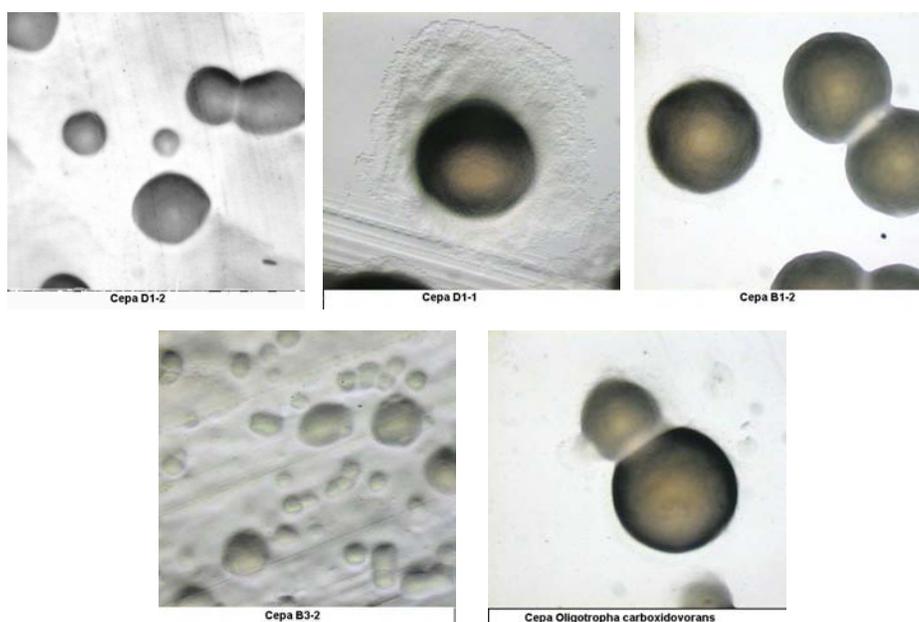
Aislamiento: Se aislaron y caracterizaron cuatro cepas de bacterias diferentes a la bacteria de referencia (*Oligotropha carboxydovorans*), a partir de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ginebra, Valle del Cauca. Las bacterias aisladas fueron denominadas B1-2, B3-2, D1-1 y D1-2.

Cultivos: Se realizaron en medio mineral líquido y en medio sólido, en un ambiente saturado con monóxido de carbono, a 30 °C y con agitación constante. En estas condiciones, las bacterias alcanzaron la fase de crecimiento exponencial en, aproximadamente tres días.

En medio sólido todas las cepas mostraron características muy similares, observándose colonias pequeñas y translúcidas, característica constante de las cepas carboxidótrofas estudiadas. Sin embargo, se presentaron algunas diferencias como puede notarse en la Figura 2, la cepa B3-2 muestra las colonias más pequeñas, D1-1 presenta un halo alrededor de cada colonia, D1-2 presenta colonias de bordes irregulares, mientras que B1-2 y *Oligotropha carboxydovorans* presentan colonias de apariencia muy similar, pero los bordes de la colonia B1-2 no son tan homogéneos (Ver Figura 2). Esta caracterización fue realizada en un medio de cultivo que contenía lactato.

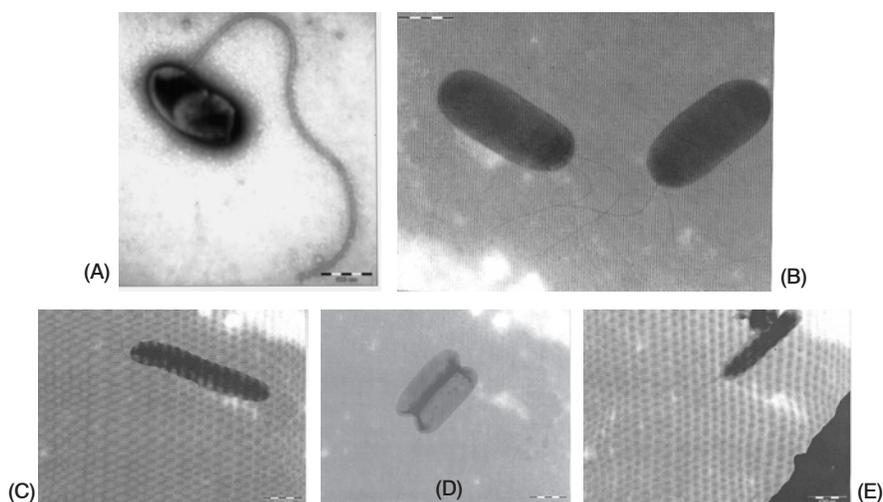
Morfología celular: Las células aisladas son bacilos Gram (-), móviles, con ausencia de esporas y cápsula. Por microscopía electróni-

Figura 2



Colonias de bacterias carboxidótrofas observadas a 60 aumentos en un microscopio Leica, provisto de analizador de imágenes: Arriba, de izquierda a derecha, cepa D1-2, cepa D1-1, Cepa B1-2; abajo, de izquierda a derecha, Cepa B3-2, Cepa *Oligotropha carboxydovorans*.

Figura 3



(A) *Oligotropha carboxydovorans* (OM 5): Bacteria Gram (-), con flagelo en posición subpolar, (B) B3-2 (C) D1-1. (D) D1-2 (E) B1-2.

ca se pudo observar que D1-1, D1-2 y B1-2 presentaban un flagelo en posición polar, mientras que B3-2 presentaba dos flagelos en posición polar, la bacteria *O. carboxydovorans*, en cambio, tiene un solo flagelo en posición subpolar (Ver figura 3).

Crecimiento autotrófico: El crecimiento autotrófico se realizó en un medio mineral saturado por monóxido de carbono a 30 °C y con agitación constante. El crecimiento óptimo en estas condiciones tardó en alcanzarse, aproximadamente, tres días.

La cantidad de gas (monóxido de carbono) suministrado afecta el crecimiento bacteriano. Cuando el medio está saturado del gas, el crecimiento tarda tres días, sin embargo, cuando el medio tenía 50% de monóxido y 50% de aire, el crecimiento demoraba aproximadamente 15 días.

Todas las bacterias aisladas de aguas residuales crecieron en un medio saturado con monóxido de carbono, esto indica que son

bacterias carboxidótrofas capaces de obtener energía a partir de este gas.

Crecimiento heterotrófico: Todas las bacterias tuvieron un crecimiento acelerado cuando el medio mineral fue suplementado con un ácido orgánico. En estas condiciones, la fase exponencial de crecimiento se alcanzó a las 24 horas. El mejor crecimiento se logró con acetato, donde se obtuvo una mayor cantidad de bacterias en un menor tiempo de crecimiento. En la Tabla 1 se observa el comportamiento de las bacterias en los medios suplementados por diferentes ácidos orgánicos: D1-1, B3-2, y *O. carboxydovorans* crecieron con todos los ácidos orgánicos ensayados, observándose diferencias únicamente en D1-2 que no creció con lactato y B3-1 que no lo hizo con formato.

Características metabólicas: La Tabla 2 muestra el comportamiento de las bacterias carboxidótrofas frente a algunas de las pruebas bioquímicas más usadas para la identifi-

Tabla 1

Crecimiento de *O. carboxydovorans* y de las cepas carboxidótrofas aisladas en ácidos orgánicos como fuente de carbono

MEDIO/CEPA	D1-1	D1-2	B3-1	B3-2	<i>O. carboxydovorans</i>
Acetato	+	+	+	+	+
Piruvato	+	+	+	+	+
Lactato	+	-	+	+	+
Crotonato	+	+	+	+	+
Malato	+	+	+	+	+
Succinato	+	+	+	+	+
Formato	+	+	-	+	+

cación bacteriana. En general, tal comportamiento es muy parecido entre las bacterias nativas y *O. carboxydovorans*. Sin embargo, además de las diferencias morfológicas observadas por microscopía electrónica, se encontraron diferencias metabólicas entre las cepas aisladas. Se observó que D1-2 no tiene capacidad de fermentar la glucosa-xilosa, ni arabinosa, mientras que las otras cepas pueden hacerlo.

Se observó que B1-2, B3-2 y *Oligotropha carboxydovorans* tienen capacidad de fermentar todos los carbohidratos analizados y además producen gas.

B3-2 y *Oligotropha carboxydovorans* presentan la capacidad de decarboxilar la lisina, mientras las demás cepas aisladas no; así mismo, la *O. carboxydovorans* fue la única capaz de fermentar la lactosa con producción de ácido, a diferencia de todas las otras cepas evaluadas.

De otro lado, las cepas aisladas presentan similitudes importantes que nos permiten afirmar que pueden pertenecer al género *Pseudomonas*, tal como el hecho de que todas producen el pigmento piocianina, son oxidativas positivas, con un metabolismo oxidativo y

no fermentativo, indol negativo, rojo de metilo negativo y voges proscaver negativo.

Pruebas de identificación: Las pruebas realizadas con el kit BBL Cristal no dieron resultados concluyentes para la identificación de la mayoría de las bacterias aisladas. El sistema identificó a B3-2 como *Burkholderia cepacia*, antiguamente conocida como *Pseudomonas cepacia*, una bacteria del medio ambiente que puede atacar plantas monocotiledóneas y a miembros de la familia *amarillidaceae*, provista de 1 a 3 flagelos en posición polar, no productora de indol, positiva para la prueba de citrato, positiva para la prueba de oxidasa (típico de las *Pseudomonas*), además de tener un buen crecimiento en medios específicos para este género, tales como Agar cetrimide, Agar XLD y Agar OF. Sin embargo, la bacteria B3-2 no dio positiva para la prueba con nitrato, descartando la posibilidad de pertenecer al grupo de las enterobacterias.

El sistema BBL Cristal no fue capaz de identificar a B1-2, D1-1, D1-2 ni tampoco a *O. carboxydovorans*. Es probable que la incapacidad de la prueba para identificar las bacterias se deba al hecho de que las que fueron analizadas se encuentran en el ambiente,

Tabla 2Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas y a la bacteria *O. carboxydovorans*.

PRUEBA	Cepa D1-1	Cepa D1-2	Cepa B1-2	Cepa B3-2	O. carboxydovorans
TSI	K/A	K/K	A/A	A/A	A/A
GAS	-	-	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-
LISINA	K/K	K/K	K/K	K/A	K/A
CITRATO	+	+	+	+	+
UREA	-	-	-	-	-
INDOL	-	-	-	-	-
MOTILIDAD	+	+	+	+	+
ROJO METILO	-	-	-	-	-
VOGES PROSCAVER	-	-	-	-	-
OXIDASA	+	+	+	+	+
HIDROLISIS ALMIDON	-	-	-	-	-
AGAR GELATINA	-	-	-	-	-
HIDRÓLISIS LECHE	-	-	-	-	-
CALDO XILOSA					
CALDO ARABINOSA					
CALDO GLUCOSA	+++	---	+++	+++	+++
CALDO NITRATO	-	-	-	-	-
LACTOSA	-	-	-	-	+
A. CETRIMIDE (pigmento piocianina)	+	+	+	+	+
A. XLD (Degradación de xilosa)	+	+	+	+	+
A. MACKONKEY (Degradación Lactosa)	-	-	-	-	-
AGAR OF Maltosa aeróbica Maltosa anaeróbica Glucosa Anaeróbica Glucosa aeróbica	+—+	+—+	+—+	+—+	+—+

NOTA: K/A: fermenta glucosa con producción de ácido. A/A: Fermenta glucosa y lactosa o sacarosa con producción de ácido. K/K: no se fermenta ningún carbohidrato.

mientras que el sistema está diseñado para la identificación de bacterias patógenas para el hombre. Teniendo en cuenta los resultados, podemos notar que las bacterias más parecidas en su comportamiento bioquímico son B3-2 y *O. carboxydovorans* OM 5; sin embargo, la prueba de lactosa es negativa para la primera pero positiva para la segunda. Ade-

más, existen diferencias entre las bacterias D1-1, D1-2 y B3-1 con las otras dos anteriormente mencionadas, en las pruebas realizadas para lisina. Las bacterias D1-1 y D1-2 también presentan diferencias con B3-1 en algunas pruebas, tales como TSI y producción de gas. Podemos demostrar mediante la prueba de Agar OF, que todas las bacterias es-

Tabla 3

Crecimientos de las bacterias nativas aisladas y la bacteria *Oligotropha carboxydovorans* en medio saturado con monóxido de carbono y bajo los distintos antibióticos:

	Car 100	Amp 10	Pen 10	Nv 30	OT 30	B 10	K 30	E 15	TE 30	N 15
<i>Oligotropha carboxydovorans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D1-1	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
B1-2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B3-2	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D1-2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-

NOTA: (-) Inhibición del crecimiento. (+) No hay inhibición del crecimiento

tudiadas presentaron un metabolismo oxidativo (no fermentativo), otro rasgo característico de las *Pseudomonas*.

Pruebas con antibióticos: Adicionalmente, se realizaron pruebas de resistencia con diez antibióticos diferentes. Ampicilina (Amp), Penicilina (Pen), Novobiocina (Nv), Oxitetraciclina (OT), Bacitracina (B), Kanamicina (K), Eritromicina (E), Tetraciclina (TE), Neomicina (N) y Carbamicina (CAR).

En las pruebas con antibióticos, se observan también diferencias entre las cepas estudiadas; es así como *Oligotropha carboxydovorans* y D1-1 no fueron inhibidas por ampicilina, la novobiocina sólo inhibió a D1-2. La prueba con oxitetraciclina fue negativa sólo para D1-2 y B3-2, mientras que la Kanamicina y la Neomicina inhibió el crecimiento de D1-1 y D1-2, mientras que la Tetraciclina y la Carbamicina inhibieron el crecimiento de todas las cepas evaluadas, la Penicilina y la Eritromicina no inhibieron el crecimiento de ningunas de las cepas estudiadas.

Conclusiones

- Se ha logrado el aislamiento de cuatro bacterias carboxidótrofas nativas de Colombia, a partir de aguas residuales de una planta de tratamiento en la localidad de Ginebra, Valle del Cauca.
- Las bacterias carboxidótrofas nativas son bacilos Gram negativos, flagelados y no formadores de esporas. Las pruebas bioquímicas y de medios selectivos, ubicarían a las bacterias encontradas muy cercanas al género *Pseudomonas*, pero se requieren de más pruebas para lograr su identificación definitiva.
- El comportamiento de las bacterias carboxidótrofas en las pruebas bioquímicas y en los medios selectivos, así como en presencia de diversos antibióticos y las diferencias morfológicas, permite considerar que las cepas nativas son diferentes entre sí y con respecto a *Oligotropha carboxydovorans*, cepa OM 5, tomada como referencia.

- El trabajo expuesto aquí constituye un primer aporte al conocimiento de la diversidad de las bacterias carboxidótrofas en Colombia y abre la posibilidad de usar estos microorganismos nativos en el desarrollo de biosensores enzimáticos para la detección de monóxido de carbono.

Bibliografía

- CONRAD, R., SEILER, W. *Role of microorganisms in the consumption and production of atmospheric carbon monoxide by soil. Applied and environmental microbiology.* 1980. **40**:437-445.
- DRAKE, H. L., HU, S. I., WOOD, H. G. *J. Biol. Chem.* 1980. **255**: 7174-7180.
- Drake, H. L. *J. Bacteriol.* 1982. **149**: 561-566.
- HOLT, J., et. al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9 edición. Baltimore, Maryland. 1994.
- MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; J. PARKER. *Brock, Microbiología de los Microorganismos.* 8 edición. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1999.
- MEYER, O., SCHLEGEL, H. G. *Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium Pseudomonas carboxidovorans (Kistner) comb. nov. Arch. Microbiol.* 1978. **118**: 35-43.
- NOZHEVNIKOVA, A. N., ZAVARZIN, G. A. *Symbiotic oxidation of carbon oxide by bacteria. Isv. Acad. Nauk. SSSR. Ser. Biol.* 1974. **3**: 436-440.