

TRABAJOS DE COLABORACION

DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGIA
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (GRANADA) C.S.I.C.
y
FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE GRANADA
Prof. Dr. V. CALLAO FABREGAT

“TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA MINERALIZACION DEL —P—,
CONTENIDO EN EL —ADN—, POR BACTERIAS DEL SUELO” (1)

por

J. M. BAREA, R. AZCON y V. CALLAO FABREGAT

Ars. Pharm. VI, 303 (1970)

Entre los esteresfosfato integrantes de la Materia Orgánica del suelo, destaca, por su trascendental funcionalismo bioquímico, la presencia de los Acidos Nucleicos (ANDERSON, 1967).

Los ácidos Nucleicos, existentes en toda célula viva, llegan al suelo procedentes de descomposiciones vegetal animal y microbiana. En los suelos, constituyen al descomponerse un “pool” de nucleótidos, así como una reserva de P. Orgánico, mineralizable, y por consiguiente de gran importancia en Nutrición Vegetal.

La primera evidencia de la presencia de Acidos Nucléicos en la Materia Orgánica del suelo se tuvo, cuando a principios de siglo, SCHREINER & SHOREY (1910), aislaron de extractos de suelo adenina, guanina y citosina.

Estudios espectrofotométricos y cromatográficos (ADAMS et al, 1954) y ANDERSON (1957) y (1961) han permitido establecer los valores cuantitativos de ADN y ARN en los suelos.

Ciertos microbios, ejercen actividades enzimáticas de despolimerización sobre los Acidos Nucléicos, tales actividades han sido objeto de numerosas investigaciones.

FUSILLO et al. (1959), estudian la producción de DNA-asa en estirpes de estafilococo.

JEFFREIS et al. (1957), utilizan un método en placa, que posteriormente modifica en parte STREITFELD (1962) para aplicarlo al estudio de las características nucleásicas del género *Pseudomonas*. Este método emplea reactivos reveladores para detectar la actividad DNA-ásica.

(1) Extracto de la Tesina presentada por la Srta. Rosario Azcón González de Aguilar para obtener el Título de Licenciado - Graduado en Farmacia.

GREAVES et al (1970), investigan la degradación de Acidos Nucleicos por *Cytophaga*...

Pero, más que una investigación sobre una acción biológica de despolimerización en general, nuestro objetivo principal, es considerar el estudio de la actividad nucleásica microbiana como fenómeno de mineralización de un Fosfato Orgánico en los suelos, con posible liberación de ión fosfato (nutriente vegetal).

STOKLASA (1908), fue el primero que estudió la mineralización de los Acidos Nucléicos por microbios del suelo. A partir de entonces, en diversos trabajos se describe tal acción (PICCI, 1952; KOBUS et al. 1961 y GREAVES & WEBLEY, 1965), estudiándose el comportamiento microbiano frente a los ácidos nucleicos como tales Fosfatos Orgánicos.

Frecuentemente son citadas las especies del género *Bacillus* entre las razas más activas en la liberación de P (SAIMANOVA 1953; KOTELEV et al., 1963 y MAZILKIN et al., 1964), por lo que se destaca aún más el importante papel que dichas especies desempeñan en el ciclo general del P en los suelos.

Revisadas las técnicas seguidas por los autores anteriormente citados, así como las descritas por BAREA et al. (1970), aplicable al estudio de la liberación microbiana de P a partir de los Acidos Nucléicos, considerados como Fosfatos Orgánicos de los suelos, iniciamos el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- 1.—Elección de una técnica en medio sólido idónea, rápida y satisfactoria para el aislamiento de gérmenes mineralizadores de P de los Acidos Nucléicos.
- 2.—Elección de una técnica en medio líquido para confirmar la liberación enzimática de P por las bacterias, y contrastar con la anterior técnica en medio sólido.
- 3.—Aplicar esas técnicas para realizar aislamientos en muestras tomadas por nosotros en suelos agrícolas de la provincia de Granada.

MATERIAL Y METODOS

Material.—Iniciamos nuestro estudio con 30 razas aisladas del suelo mineralizadoras de los Fosfatos, Lecitina, Glicerofosfato y/o Fitato, pertenecientes a la colección bacteriológica de la Estación Experimental del Zaidín (Granada). Las 30 estirpes fueron identificadas por BAREA et al. (1969).

Como sustrato modelo, elegimos el ADN, producto comercial, estimando el mayor interés de su estudio, por encontrarse en los suelos en cantidades superiores que el ARN (ADAMS et al., 1954 y ANDERSON, 1961).

Técnicas empleadas.

- 1.—Elección de técnica para el aislamiento en medio sólido. Fueron estudiados 3 medios de cultivo:

Medio de RAMOS y CALLAO (1967), *sin glucosa*

Medio de JEFFRIES et al. (1957).

Medio de LONCHHEAD & CHASE (1943), modificado por nosotros al ser adicionado con agar al 2 por ciento para convertirlo en medio sólido.

A estos medios se les adicionó posteriormente el ADN que previamente fue preparado en solución acuosa, 0,02 g/ml.

El pH de esta solución de ADN era aproximadamente de 2, por lo que decidimos neutralizar tal como hacen BAREA et al. (1970) al preparar un Fosfato Orgánico.

Al dejar estar la solución a pH=7—7,1, se produce un precipitado coloidal. En este estado, puede ser esterilizado por filtración al Millipore (0,45 μ de poro), ya que el precipitado atraviesa dicho filtro.

1 ml. de esta solución de ADN, se adiciona a 9 ml. de medio de cultivo fundido y enfriado a unos 45°, obteniéndose una concentración final de 0,002 g/ml. (GREAVES & WEBLEY, 1965), esta mezcla se vierte en placa de Petri quedando el medio con una tenue opacidad y apto para proceder a la siembra bacteriana.

La siembra se efectúa en forma masiva en sectores. (Fotografía). Las placas fueron incubadas a 25° y efectuadas lecturas diariamente, para detectar la formación de halos solubilizadores del sustrato fosforado.

2.—Técnica en medio líquido para confirmar la liberación de P a partir de ADN.

Fue empleado el medio B de LONCHHEAD & CHASE (1943), prescindiendo del Fosfato Inorgánico y utilizando como única fuente de P el ADN.

El ADN se preparó previamente por disolución en agua destilada al 1 por ciento. El pH de esa solución se ajustó entre 6,7-6,8 (pH del medio de LONCHHEAD & CHASE de esta forma no ocurre la precipitación que se produce a pH = 7-7,1.

Esta solución era adicionada al medio de LONCHHEAD & CHASE en proporción 1/10, quedando el ADN a concentración final de 0,1 por ciento P/V. Este medio transparente se esterilizó por filtración al Millipore (0,45 μ de poro) y se reparó en tubos estériles.

Los microorganismos sembrados fueron incubados 5 días a 25°. La turbidez (o su ausencia) producida por el crecimiento bacteriano fue estimada capacidad positiva (o negativa) para utilizar el ADN como única fuente de P.

La medida nefelométrica da idea cuantitativa de la capacidad enzimática.

3.—Aplicación de las técnicas anteriores para efectuar aislamientos de gérmenes mineralizadores en muestras tomadas por nosotros en suelos agrícolas.

Con muestras de suelo fueron realizadas diluciones suspensiones seriadas al 1/10 y de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se sembró en medio sólido adicionado con ADN (medio de RAMOS y CALLAO).

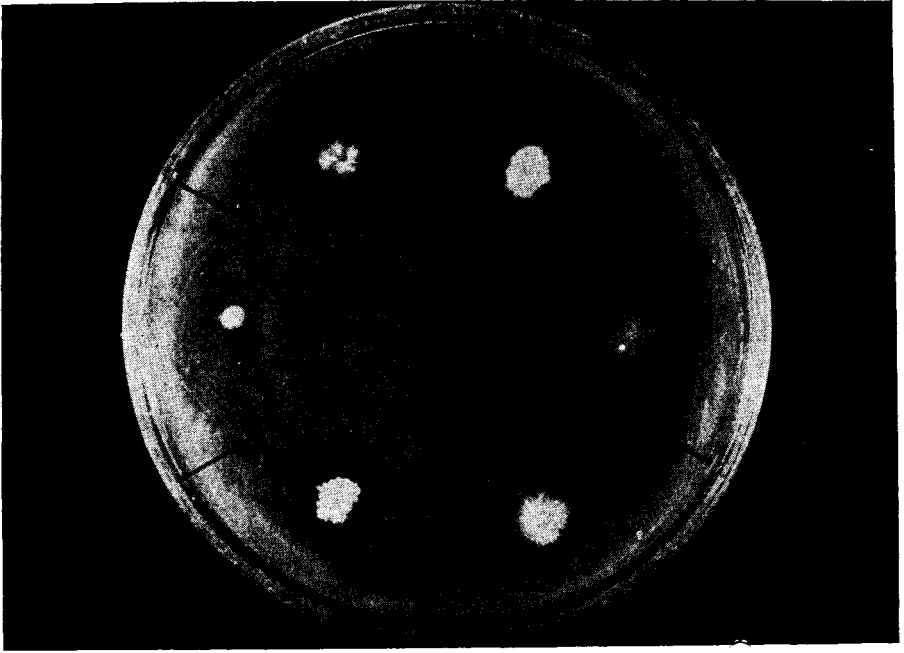
Incubadas las placas durante 5 días a 25°, se tomaron los gérmenes solubilizadores y confirmó su acción DNA-ásica en medio líquido (B de LONCHHEAD & CHASE, modificado).

RESULTADOS

La solubilización en placa queda patente en la fotografía.

Exponemos una Tabla comparativa de la actuación bacteriana en medio sólido R-C (RAMOS y CALLAO, 1967) y en medio de LONCHHEAD & CHASE, 1943).

En medio sólido anotamos solubilización positiva o negativa. En caso positivo, damos el diámetro del halo en mm. a los 5 días de incubación. Incluimos lectura nefelométrica del crecimiento bacteriano en medio líquido.



Modelo de solubilización en placa

Medio R-C (RAMOS y CALLAO, 1967) adicionado con ADN.

Gérmenes:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Marcado con flecha: | 36 = <i>Agrobacterium</i> sp. |
| Siguiendo el sentido de la flecha | 35 = <i>Xanthomonas</i> sp. |
| | B-1 = <i>Bacillus</i> sp. |
| | 41 = <i>Kurthia</i> sp. |
| | 26 = <i>Cellulomonas</i> sp. |
| | 9 = <i>Pseudomonas</i> sp. |

Solubilización en placa y utilización en medio líquido de ADN

Germen	Género	Medio de:			
		RAMOS y CALLAO	LONCHHEAD & CHASE		
		Solubili- zación	Diámetro halo (mm)	Crecimiento	Lectura ne- felométrica
B-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	20	+	45
4	<i>Acinetobacter</i> sp.	—	—	—	—
32	<i>Bacillus</i> sp.	+	18	+	40
13	<i>Bacillus</i> sp.	+	8	+	11
11	<i>Flavobacterium</i> sp.	—	—	—	—
PB	<i>Bacillus</i> sp.	+	10	+	30
H	<i>Micrococcus</i> sp.	—	—	—	—
42	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	15	+	39
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	—	—	—	—
45	<i>Sarcina</i> sp.	+	15	+	41
46	<i>Corynebacterium</i> sp.	+	12	+	40
2	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	12	+	36
2a	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	6	+	11
A	<i>Aerobacter</i> sp.	+	8	+	14
29	<i>Pseudomonas</i> sp.	—	—	—	—
44	<i>Aeromonas</i> sp.	—	—	—	—
3a	<i>Acinetobacter</i> sp.	+	15	+	40
VI	<i>Corynebacterium</i> sp.	+	12	+	30
33	<i>Bacillus</i> sp.	+	15	+	35
27	<i>Bacillus</i> sp.	+	12	+	30
26	<i>Cellulomonas</i> sp.	—	—	—	—
41	<i>Kurthia</i> sp.	+	14	+	16
B-1	<i>Bacillus</i> sp.	+	7	+	16
35	<i>Xanthomonas</i> sp.	+	18	+	45
36	<i>Agrobacterium</i> sp.	—	—	—	—
9	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	18	+	40
6	<i>Bacillus</i> sp.	+	18	+	37
3	<i>Bacillus</i> sp.	—	—	—	—
1	<i>Pseudomonas</i> sp.	—	—	—	—
5	<i>Bacillus</i> sp.	+	15	+	30

DISCUSION Y COMENTARIOS

Con respecto a la elección de medio de cultivo sólido, los resultados obtenidos en los tres medios estudiados son similares: 2 excepciones: Germen 13 y germen B-1, ambos *Bacillus* sp., solubilizan en placa solamente con medio de Ramos y Callao y no en los restantes medios.

Esta circunstancia nos hace pensar en un elemento nutritivo apartado por el Extracto de Levadura, constituyente del medio R-C y ausente en los otros dos medios.

Por esta razón y por su facilidad de preparación, dada la sencillez de su composición, nos inclinamos por la elección del medio R-C.

En cuanto a la elección del medio de cultivo líquido: El medio B de LONCHHEAD & CHASE (1943) es considerado medio básico para el aislamiento de gérmenes del suelo. GREAVES & WEBLEY (1965), utilizan este medio sin P inorgánico, suministrando glicerofosfato como la única posibilidad de utilización de P. Sólo los gérmenes enzimáticamente capacitados podrán tomar el nutriente del sustrato orgánico, crecer y ofrecer turbidez en los cultivos líquidos.

Nosotros aplicamos este razonamiento en el presente estudio sobre el ADN, suministrando este sustrato como única fuente de P; hemos comprobado que unos gérmenes son capaces de crecer (estimamos que por estar dotados enzimáticamente para utilizar el P del ADN) mientras que otros son incapaces.

Por la rapidez de esta técnica (a las 24 horas se aprecia en la mayoría de los casos el crecimiento) y por la posibilidad de realizar medidas nefelométricas que nos den idea de la positividad, así como por la reproducibilidad de los resultados, hemos decidido adoptarla como técnica normalizada para el estudio de la actividad DNA-ásica de las bacterias del suelo en medio líquido.

Aspecto fundamental es la discusión de la preparación del ADN para ser adicionado a los medios de cultivo básicos:

JEFFREIS et al. (1957) y STRITFELD et al. (1962), estudiando la producción de nucleasa en medio sólido, emplean una técnica en la cual preparar el ADN en solución acuosa trasparente (que no llevan a su punto isoeléctrico). Estos autores consiguen un medio sin opacidad, pero detectan la actividad nucleásica con reactivos reveladores que se comportan de forma diferente en las zonas de la placa (halos) con el ADN atacado por la bacteria, que en las zonas no atacadas.

La precipitación coloidal del ADN que conseguimos al llevar su solución a $\text{pH}=7-7,1$, confería opacidad al medio de cultivo. De esta forma, la formación de halos de aclaramiento en torno a ciertas colonias, pone de manifiesto a simple vista el ataque bacteriano al ADN. (Fotografía).

La relación entre formación de halo y liberación de P es concordante, como se aprecia en la Tabla de Resultados y discutimos después.

El motivo de no llevar la solución de ADN hasta $\text{pH} = 7-7,1$, cuando ha de ser empleada en medio líquido, es precisamente evitar la precipitación, para poder apreciar el crecimiento bacteriano en caso de que el ADN sea utilizado.

Como se aprecia en la Tabla, existe una perfecta correspondencia en positividad y negatividad al comparar las técnicas en medio sólido y líquido. La diferencia de pH (7-7,1 en medio sólido y 6,7-6,8 en medio líquido) no fue suficiente para influenciar diferencias en la actuación bacteriana, pero es totalmente decisiva para la mecánica de la técnica.

Esta circunstancia de correspondencia ha sido confirmada al realizar unas experiencias de aislamiento bacteriano en muestras de suelo sobre medio sólido (R-C más ADN). Todas las bacterias formadoras de halo mostraron capacidad para utilizar ADN como única fuente de P en medio líquido, siendo incapaces de utilizarlo las bacterias negativas en placa.

Nuestra opinión y conclusión es que formación de halo de solubilización en placa, puede ser estimada como sinónimo de despolimerización de ADN con liberación de P.

Es de destacar la actividad positiva de los gérmenes del género *Bacillus*. Tal observación concuerda con las opiniones de KOTELEV et al. (1962), SAIMANOVA (1953) y MAZILKIN et al. (1964) que citan diversas estirpes del género *Bacillus* poseedoras de actividad nucleásica.

RESUMEN

Se estudia una técnica en placa para investigar la liberación de P del ADN por bacterias del suelo.

El ADN, en suspensión coloidal, (pH = 7-7,1), es adicionado a un medio básico al que le confiere opacidad.

Las bacterias con actividad deoxirribonucleásica forman al crecer en dicho medio halos de solubilización del ADN (Fotografía).

La formación de halo, puede ser estimada sinónimo de liberación de P, como se comprueba al estudiar las mismas bacterias por otra técnica (también descrita en este trabajo), en la cual se emplea un medio líquido con ADN como única fuente de P.

SUMMARY

A plate technique to investigate the ability for P liberation from DNA, by soil bacteria, has been studied.

DNA, in colloidal suspension, (pH = 7-7,1), is added to a basal medium making it opaque.

Detection of deoxirribonuclease producing organisms was achieved by halos obtained (Photography).

Halo formation must be estimated as a proof of P liberation from DNA, since it was confirmed, by checking of the same bacteria in another technique, (also described in this paper), using a basal liquid medium with DNA as sole phosphorus source.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ADAMS, A. P., BARTOLOMEW, W. V. & CLARK, F. E.—Measurement of nucleic acid components in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 18, 40 (1954).
- 2.—ANDERSON, G.—Nucleic acid derivatives in soils. *Nature*, 180, 287 (1957).
- 3.—ANDERSON, G.—Estimation of purines and pyrimidines in soil humic acid. *Soil Sci.* 91, 156 (1961).
- 4.—ANDERSON, G. (1967).—Cap. 3 de *Soil Biochemistry* Edt. DEKKER, New York
- 5.—BAREA, J. M., RAMOS, A. y CALLAO, V.—Identificación de microorganismos del suelo mineralizadores de fosfatos. *Ars. Pharm.* X, 407 (1969).
- 6.—BAREA, J. M., RAMOS, A. y CALLAO, V.—Contribución al estudio "in vitro" de la mineralización bacteriana de fosfatos. En prensa en *Microbiol. Españ.* (Comunicación personal).
- 7.—FUSILLO & WEIS.—Qualitative estimation of staphylococcal desoxyribonuclease. *J. Bacteriol.* 78, 520 (1959).
- 8.—GREAVES, M. P. & WEBLEY, D. M.—A study of the breakdown of organic phosphates by microorganisms from root region of certain pastures grasses. *J. appl. Bacteriol.* 28 (3), 454-465 (1965).

- 9.—GREAVES, M. P., VAUGHAN, D. & WEBLEY, D. M.—Degradation of nucleic acid by *Cytophaga johnsonii*. *J. appl. Bacteriol.* 33, 380-389 (1970).
- 10.—JEFFREYS, J. D., HOLTMAN, D. F. & GUSE, G. D.—Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. *J. Bact.* 73, 590, (1957).
- 11.—KOBUS, J.—Role of microorganisms in transformation of phosphorus compounds in the soil. *Roelniki Nauk. Rolniezych D.* 91,5 (1961). Cita tomada de C-A, 57, 6.417 (1962).
- 12.—KOTELEV, V. V., MEKHNEVA, E. A. & SMIRNOV, V. I.—Mineralization of organic compounds of phosphorus by some soil microorganisms. *Izv. Akad. Nauk. Moldavsk.* 7, 34 (1962). Cita tomada de C-A, 59, 5.527 (1963).
- 13.—LONCHHEAD, A. G., & CHASE, F. E.—Qualitatives studies of soil microorganisms. V.—Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Sci.* 55, 185, (1943).
- 14.—MAZLKIN, I. A. & KUZNETSOVA, M. G.—Nuclease and phosphatase activity of soil bacteria. *Izv. Akad. Nauk. Sci. Biol.* 29 (4). 587 (1964). Cita tomada de C-A, 61, 16.466 (1964).
- 15.—PICCI.—Citado por O. VERONA, en *Microbiofología Agraria*, U.T.E.T. (1952).
- 16.—RAMOS, A. y CALLAO, V.—El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana.—*Microbiol. Españ.* 20 (1967) 1.
- 17.—SALMANOVA, R. A. & JUSAPOVA, D. V.—A study of bacteria possessing desoxyribonuclease activity. *Mikrobiologiya*, 32, 27-32 (1963).
- 18.—SHREIER, O. & SHOREY, E. C. (1910).—Citado por G. ANDERSON en el Cap. 3 de "Soil Biochemistry". Edit. DEKKER. New York (1967).
- 19.—STOKLASA (1908).—Citado por O. Verona en "Microbiología Agraria" U.T.E.T.
- 20.—STREITFELD, M. M., HOFFMANN, E. M. & JANKLOW, H. M.—Evaluation of extracellular desoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 84, 77 (1962).

Agradecemos al Prof. Ramos, de la Facultad de Farmacia de Barcelona, su colaboración.