

INVESTIGACION DE LA SECRECION DE AMINOACIDOS  
POR ESPECIES DEL GENERO BACILLUS

P. ROMERO, A. RAMOS-CORMENZANA

INTRODUCCION

La producción y secreción extracelular de compuestos orgánicos nitrogenados por levaduras fue descubierta por Thenard, Pateur y Duclaux a principios del siglo XIX (1). Muy posteriormente con el desarrollo de técnicas analíticas de tipo cromatográfico, se indentificaron como péptidos o aminoácidos. Datos en este sentido obtuvo en *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, Dagley (2); en levaduras, Reindel y Hoppe (3); en hongos, Morton y Broadbent (4); en *Streptomyces*, Perlman y O'Brien (5). A estos compuestos orgánicos nitrogenados se les dio el nombre de ENC (extracellular nitrogen compounds).

A partir de este momento son numerosas las investigaciones realizadas. Así Guinea (6), Clotet, Guinea y Pares Farras (7), Hernández (8), estudian los problemas genético relacionados con la producción de aminoácidos; Kinoshita y col. (9), encuentran bacterias *Corynebacterium glutamicum* capaces de producir en cantidades apreciables ácido L-glutámico, propiedad que se utiliza con fines industriales; Vagnerova y Vancura (10), y Becker y Schmidt (11), estudian la producción de aminoácidos por microorganismos del suelo, encontrando estos últimos, que todas las bacterias aisladas son Gram positivas, siendo la mitad de ellas especies del género *Bacillus*. También Ruiz Berraquero (1) encuentra que especies de *Bacillus*, aisladas del suelo, producen diferentes aminoácidos.

## MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL

Se han empleado 38 estirpes del género *Bacillus* correspondientes 15 a la colección Española de cultivo —tipo (CECT)—, 18 a Poland Collection of Microorganisms (PCM) y 5 a Czechoslovak Collection of Microorganisms (CCM). Tabla I.

I.—*Determinación de la producción de aminoácidos.*

Se sigue la técnica de Udaka (12) basada en el método de revelado en placa, modificado por Ruiz-Berraquero (1).

Como cepas para el revelado se utilizan *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042, cepa auxotrófica para arginina, lisina, leucina, aspártico y glutámico y *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081 cepa auxotrófica para alanina (13).

Medio de conservación para las cepas auxotróficas MRS-agar (14).

Medio inóculo para revelado: Bacto lactobacillibroth AOAC deshidratado (13). Veinticuatro horas antes de cada determinación se realiza una siembra de las cepas auxotróficas del medio MRS en el medio de inóculo.

Medio de cultivo.—Se emplea un medio exento de aminoácidos y proteínas con el medio empobrecido de Ruiz Berraquero (1) en el que se sustituye el fosfato bicálcico por fosfato monopotásico.

## Composición:

Glucosa ... ..	20 g
Cloruro amónico ... ..	7 g
Fosfato monopotásico ... ..	1 g
Sulfato monopotásico ... ..	0,5 g
Agar purificado ... ..	18 g
Agua destilada ... ..	1.000 ml.
pH ... ..	7,5 g

se esteriliza a 120° C, durante 15 minutos.

Las placas se siembran en masa en cuatro puntos equidistantes. Se incuban a la temperatura óptima para cada estirpe durante 72 horas, realizándose a continuación el revelado (1).

TABLA I

## ACUMULACION DE AMINOACIDOS POR DISTINTAS ESPECIES DEL GENERO BACILLUS

Estirpe, colección, núm. catálogo	Tipo de aminoácido					
	Arg.	Li.	Leu.	As.	Glut.	Al.
<i>Bacillus alvei</i> CECT 2 ... ..	1	1	1	2	0	1
<i>B. badius</i> CECT 17 ... ..	OM	1	1	0	0	OM
<i>B. brevis</i> CECT 5 ... ..	OM	OM	OM	0	0	+m
<i>B. circulans</i> CECT 10 ... ..	1	1	0	0	0	OM
<i>B. circulans</i> CECT 375 ... ..	1	1	0	0	0	OM
<i>B. cereus</i> CECT 193 ... ..	0	1	1	OM	0	OM
<i>B. dextralactius</i> CECT 13 ... ..	1	0	0	0	0	0
<i>B. laterasporus</i> CECT 15 ... ..	OM	1	0	0	0	1
<i>B. licheniformis</i> CECT 20 ... ..	1	1	1	0	0	1
<i>B. megaterium</i> CECT 44 ... ..	1	2	1	1	0	OM
<i>B. pumilus</i> CECT 29 ... ..	0	0	0	0	0	OM
<i>B. pumilus</i> CECT 152 ... ..	OM	0	0	0	0	0
<i>B. polymyxa</i> CECT 155 ... ..	0	3h	0	0	0	OM
<i>B. sphaericus</i> CECT 33 ... ..	0	2h	0	0	0	1
<i>B. alvei</i> PCM 481 ... ..	1	1	1	3	0	2
<i>B. circulans</i> PCM 1398 ... ..	1	0	1	0	0	1
<i>B. cereus</i> PCM 1482 ... ..	OM	1	1	1	0	1
<i>B. coagulans</i> PCM 1843 ... ..	1	OM	1	1	0	1
<i>B. firmus</i> PCM 1844 ... ..	1	1	0	1	0	1
<i>B. globisporus</i> PCM 1845 ... ..	0	1	2	2	0	1
<i>B. laterosporus</i> PCM 1848 ... ..	1	OM	1	1	0	1
<i>B. lentus</i> PCM 450 ... ..	1	1	1	OM	0	0
<i>B. mycoides</i> PCM 1401 ... ..	1	1	1	2	0	3
<i>B. megaterium</i> PCM 1855 ... ..	2	1	2	1	0	1
<i>B. macerans</i> PCM 1399 ... ..	1	OM	2	2	0	OM
<i>B. pumilus</i> PCM 1852 ... ..	2	1	2	1	0	OM
<i>B. pantothenicus</i> PCM 454 ... ..	1	2	1	OM	0	OM
<i>B. polymyxa</i> PCM 451 ... ..	1h	1	1	OM	0	OM
<i>B. psychrophilus</i> PCM 1850 ... ..	2	1h	2	1	0	2
<i>B. sphaericus</i> PCM 485 ... ..	1	1	1	1	0	2
<i>B. staerothermophilus</i> PCM 453 ... ..	1	2	1	OM	0	2
<i>B. subtilis</i> PCM 1903 ... ..	2h	1h	2	1	0	2
<i>B. badius</i> CCM 2113 ... ..	1	OM	OM	1	0	0
<i>B. coagulans</i> CCM 2013 ... ..	1	0	1	1	0	0
<i>B. firmus</i> CCM 2213 ... ..	1	0	2	2	0	0
<i>B. macerans</i> CCM 2012 ... ..	0	0	0	1	0	0
<i>B. subtilis</i> CCM 2216 ... ..	OM	1	OM	1	0	1

TABLA II

RELACION DE ESTIRPES MAS PRODUCTORAS DE LOS AMINOACIDOS QUE SE INDICAN

Estirpe	Arg.	Li.	Leu.	As.	Al.
<i>B. polymyxa</i> (ATCC 842) ... ..		3h			
<i>B. sphaericus</i> (ATCC 14577) ... ..		2h			
<i>B. alvei</i> (PCM 481) ... ..				3	2
<i>B. globisporus</i> (PCM 1845) ... ..			2	2	
<i>B. mycoides</i> (PCM 1401) ... ..				2	3
<i>B. megaterium</i> (PCM 1855) ... ..	2		2		
<i>B. pumilus</i> (PCM 1852) ... ..	2		2		
<i>B. pantothenicus</i> (PCM 454) ... ..		2			
<i>B. psychrophilus</i> (PCM 1850) ... ..	2		2		2
<i>B. sphaericus</i> (PCM 485) ... ..					2
<i>B. subtilis</i> (PCM 1903) ... ..	2		2		2
<i>B. firmus</i> (CCM 2213) ... ..			2	2	

TABLA III

RESUMEN DE ESTIRPES DE BACILLUS PRODUCTORAS DE AMINOACIDOS

N.º de estirpes	N.º aminoácidos producidos
5	1
2	2
7	3
7	4
17	5
0	6
38	

TABLA IV

NUMERO DE ESTIRPES QUE HAN PRODUCIDO ESPECIFICAMENTE AMINOACIDOS

Arginina ... ..	31 estirpes (81 %)
Lisina ... ..	30 » (78 %)
Leucina ... ..	26 » (68 %)
Ac. aspártico ... ..	26 » (68 %)
Ac. glutámico ... ..	0 » (0 %)
Alanina ... ..	30 » (78 %)

Como medios de ensayo para revelado de aminoácidos se utilizan Bacto Assay Medium Deshidratado de Difco, para los aminoácidos arginina, lisina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina, cuya sensibilidad es de 1 a 5 microgramos de aminoácido (13).

Lectura.—Los resultados positivos dan lugar a zonas de crecimiento de la cepa auxotrófica —observables macroscópicamente o microscópicamente mediante lupa de 40 aumentos— de diferente extensión y densidad. Es más precisa y exacta la lectura microscópica ya que aprecia la densidad y amplitud de la zona de crecimiento.

Los resultados (1) se expresan atendiendo a los siguientes criterios: (0): negativo; (OM): positivo microscópico; (1): 0,5 a 2 mm; (2): de 2 a mm; (3): más de 4 mm; (h): producción de halo de inhibición de crecimiento y secreción

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se indican en las tablas adjuntas. De las 38 estirpes investigadas, 31 han producido arginina, 30 lisina, 26 leucina, 26 ácido aspártico, 30 alanina y ninguna ha producido ácido glutámico (tabla IV).

El número de estirpes que ha segregado cinco aminoácidos de los seis investigados ha sido diecisiete; siete estirpes han producido cuatro aminoácidos; siete han producido tres; dos han producido dos y cinco han producido uno de los seis aminoácidos (tabla III).

Los aminoácidos segregados en mayor cantidad, dentro de una determinada estirpe productora, han sido alanina, leucina y lisina, y el mayor número de estirpes que ha sintetizado un determinado aminoácido ha sido para arginina —31 estirpes—.

Si se realiza un estudio comparativo de la producción de un determinado aminoácido por distintas estirpes de una misma especie de *Bacillus*, ya pertenezcan a idéntica o distinta colección y a pesar de que por el número de experiencias realizadas, para una determinada especie, los resultados no poseen valor estadístico, se encuentra (tabla I) que generalmente no hay concordancia entre los resultados para las distintas estirpes de una misma especie y cuando se presenta no posee valor taxonómico

ya que distintas especies se comportan de modo análogo. En algunos casos se observan diferencias entre especie (tabla I). Así *B. subtilis* y *B. licheniformis* se diferencian en la producción de ácido aspártico, que es positiva en *B. subtilis* y negativa en *B. licheniformis*. Este dato es interesante ya que ambas especies sólo se diferencian según el Bergey (15) —por su capacidad— de crecimiento en *agar anaerobio*, que es negativo para *B. subtilis* y positivo para *B. licheniformis*.

Si consideramos la no segregación de un determinado aminoácido —glutámico— se encuentra una concordancia absoluta entre todas las estirpes ensayadas, por lo que en principio dicho carácter puede utilizarse con fines taxonómicos e incluirse como carácter del género *Bacillus*.

Respecto a las estirpes más productoras, destacan *B. alvei* PCM 481 para ácido aspártico y *B. myxoides* PCM 1401 para alanina.

Todas las estirpes ensayadas han producido por lo menos un aminoácido y la mayoría más de uno —33 estirpes de las 38 estudiadas— hecho que puede indicar la importancia de estas bacterias en el suelo como creadoras de circunstancias favorables para el desarrollo de otros seres vivos.

#### RESUMEN

Se investiga la secreción de los aminoácidos arginina, lisina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina por especies del género *Bacillus* empleando una técnica de revelado en medio sólido con cepas auxotróficas.

De las 38 estirpes ensayadas, 31 producen arginina, 30 lisina, 26 leucina, 26 aspártico, 30 alanina y ninguna ácido glutámico. Es muy significativo este último resultado por lo que se sugiere puede ser un carácter de interés en la taxonomía del género *Bacillus*.

Se señala que la producción de ácido aspártico por *B. subtilis* y la no producción por *B. licheniformis* puede emplearse como prueba diferencial entre ambas especies.

También se indican las estirpes que se han mostrado con mayor capacidad productoras de los aminoácidos investigados.

#### SUMMARY

The secretion of the arginine, lysine, leucine, aspartic acid, glutamic acid and alanine aminoacids, for species of the *Bacillus* was studied using a detected technic in solid medium with auxotrophic strains.

From the 38 essayed *Bacillus* strains, 31 produce arginine, 30 lysine, 26 leucine, 26 aspartic, 30 alanine and no glutamic acid was produced. It is very important this result because it can mean an interest character in the taxonomy of the genus *Bacillus*.

It is pointed out that the aspartic acid production by *B. subtilis* and the no production by *B. licheniformis* can also be used as differential purpose between both species.

The strains that have shown the best production ability are also indicated.

### RESUME

On recherche la sécrétion des aminoacides, arginine, lysine, leucine, acide aspartique, acide glutamique et alanine par espèces du genre *Bacillus* en employant une technique de révélation au milieu solide avec des souches auxotrophiques.

Des 38 souches essayées, 31 produisent d'arginine, 30 de lysine, 26 de leucine, 26 d'aspartique, 30 d'alanine; mais aucune ne produit d'acide glutamique. C'est très significatif ce dernier résultat; c'est pour ça qu'on suggère qu'il peut être intéressant à la taxonomie du genre *Bacillus*.

On remarque que la production d'acide aspartique par *B. subtilis* et la non-production par *B. licheniformis* peut s'employer comme preuve différentielle entre toutes les deux espèces.

On indique aussi les souches qui ont montré la majeure capacité productrice des aminoacides recherchés.

### BIBLIOGRAFIA

- (1) RUIZ BERRQUERO, F. (1974): «Tesis Doctoral». Arch. F. Farmacia. Granada.
- (2) DAGLEY, S.; DAVIS, E. A., and MORRISON, G. A. (1950): «Production of aminoacids in synthetic media by *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*». Nature, 165, 437. London.
- (3) REINDEL, E., and HOPPE, W. (1952): «Über die stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukte der hefe». Chem. Bev., 85, 716.
- (4) MORTON, A. G., and BROADBENT, D. (1955): «The formation of extracellular nitrogen compound by fungi». J. Gen. Microbiol., 12, 248.
- (5) PERLMAN, D., and O'BRIEN, E. (1958): «Production of glutamic acid by *Streptomyces*». J. Bact., 75, 611.
- (6) GUINEA, J. (1966): «Estudio sobre segregación de aminoácidos por *Escherichia intermedia* C<sub>3</sub> y su condicionamiento genético». Tesis doctoral. F. Ciencias. Barcelona.
- (7) CLOFFT, R.; GUINEA, J., y PARES-FARRAS, R. (1968): «Segregación de aminoácidos por una cepa de *Citrobacter intermedium*». Microbio. Españ., 21, 155.

- (8) HERNÁNDEZ, S. (1968): «Segregación de glutamato en *Citrobacter intermedium* C<sub>3</sub> como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico». Tesis doctoral. F. Ciencias. Barcelona.
- (9) KINOSHITA, S.; UDAKA, S., and SHIMONO, M. (1957): «Studies on the aminoacid fermenttion. Part. I. Production of l-glutamic acid by various microorganisms». *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 13, núm. 3.
- (10) VAGNEROVA, K., and VANCURA, V. (1963): «Production and utilization of aminoacids by various species of rhizosphere bacteria». *Fol. Microbiol.*, 7, 55.
- (11) BECKER, G. E., and SCHMIDT, E. L. (1960): «Excretion of aminoacids by soil and rhizosphere isolated». *Bacteriol. Proc.*, 3, 29 (A<sub>5</sub>).
- (12) UDAKA, S. (1960): «Screening method for microorganism accumulating metabolites and its use in isolation of *Micrococcus glutamicus*». *J. Bact.*, 75, 754-755.
- (13) DIFCO (1966): «Supplementary literature Difco laboratoires». Detroit. Michigan.
- (14) MAN, J. C. DE; ROGOSA, M., and SHARPE, M. E. (1960): «A medium for the cultivation of lactobacilli». *J. App. Bact.*, 23, 130.
- (15) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Eighth edition. Williams & Wilkins Company.