

Variación de la composición de ácidos grasos de membrana celular de *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r en respuesta a la temperatura y salinidad

G.N. PUCCI y H. PUCCI*

CEIMA - Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Gerónimo Maliqueo 164, 9000, Comodoro Rivadavia, Pcia. de Chubut, Argentina

* Correspondencia: e-mail: ohpucci@yahoo.com

RESUMEN

Los integrantes del género *Rhodococcus* son habitantes frecuentes y abundantes de áreas contaminadas con hidrocarburos y resisten la creciente salinidad que se presenta en la Patagonia central. Este género tiene buena capacidad de eliminar contaminantes hidrocarburos que constituyen el mayor contaminante de la región. En el presente trabajo se estudió la respuesta en la composición de sus ácidos grasos de una cepa aislada de un sistema de landfarming, ante la acción combinada de diferentes temperaturas y concentraciones salinas. La estrategia de la cepa *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r frente al incremento de temperatura, es el aumento del porcentaje de los ácidos grasos saturados totales (n:0); ácidos grasos ramificados en el carbono terminal con grupos oxidrilo en posición 2 (n:0 iso 2 OH) y saturados con grupo metilo en carbono 10 (n:0 10 metil), a expensas de la disminución del porcentaje de los n:1 cis.

Palabras clave: ácidos grasos, temperatura, salinidad

SUMMARY

Variation in the composition of *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r cell membrane fatty acids in response to temperature and salinity. The members of the genus *Rhodococcus* are frequent and abundant inhabitants of polluted areas with hydrocarbons and they resist the salinity present in the central Patagonia. This genus has good capacity to eliminate pollution produced by hydrocarbons that constitutes the biggest pollutant agent in the region. The present work studies the answer in the composition of its fatty acids under the combined action of the temperature and saline concentration of an isolated stump of a landfarming system. The strategy of *Rhodococcus rodochrous* strain GNP-OHP-38r in front of the thermal-osmotic stress is the increase of the percentage of the total saturated fatty acids (n:0); fatty acids branched in the terminal carbon with hydroxyl group in position 2 (n:0 iso 2 OH) and saturated with group methyl in carbon 10 (n:0 10 metil) when the temperature is increased. These acids increase while the percentage of n:1 cis decrease.

Key words: fatty acids, temperature, salinity

INTRODUCCIÓN

El nombre del género *Rhodococcus* fue propuesto Goodfellow y Alderson (11) en un estudio de clasificación por taxonomía numérica. *R. rodochrous* fue propuesto como la especie tipo. El género lo integran además ocho especies: *R. bronchialis*, *R. coprophilus*, *R. corallinus*, *R. erythropolis*, *R. equi*, *R. rhodnii*, *R. ruber*, *R. rubropertinctus* y *R. terrae*. Estas bacterias exhiben un amplio rango de actividades metabólicas (33). Algunas de ellas tienen la habilidad de degradar una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo xenobióticos como bifenilos policlorinados, mientras otras son capaces de degradar numerosos hidrocarburos alifáticos, alifáticos ramificados y aromáticos (5, 10, 22, 34, 35). Están presentes en suelos patagónicos contaminados con hidrocarburos provenientes del petróleo, y están sometidos a condiciones de estrés térmico y osmótico. Se sabe que cumplen un rol importante en la biorremediación (22).

Las condiciones de crecimiento tales como la composición del medio de cultivo (3, 4, 18), la fase del crecimiento o edad de las células (17, 19), la temperatura de incubación, (3, 8, 9) y el pH (9, 19, 26) afectan en gran medida la composición de la membrana lipídica, específicamente su fluidez, posiblemente para mantener su integridad y funcionalidad ante las condiciones externas (30).

El principal mecanismo por el que las bacterias mantienen esta fluidez ideal de la membrana es cambiando la composición de los ácidos grasos (3, 24, 31).

En *Pseudomonas putida* S12, un incremento de milimolar a molar en la concentración de cloruro de sodio tiene muy pequeño efecto sobre la temperatura de la fase de transición de la membrana celular de semifluida a líquido cristalina (25) y sólo a concentraciones tóxicas de cloruro de sodio hay un incremento significativo en la razón trans/cis. (14)

El análisis de ácidos grasos de membrana por cromatografía gaseosa para la identificación de bacterias desde su introducción por Abel et al (1) ha estado de acuerdo con datos obtenidos por métodos que utilizan hibridación DNA-DNA (16, 23, 35) y se usa ampliamente para la identificación de aislamientos clínicos y ambientales (7, 12, 15, 21, 28, 29). Esta técnica tiene ventajas prácticas, tales como la simplicidad del método analítico, rapidez del análisis, y el bajo costo de los materiales. Además el contenido de todos los ácidos grasos de membranas celulares es una expresión directa y estable del genoma. En efecto el patrón de ácidos grasos es un carácter fenotípico que difícilmente es afectado por mutaciones o adquisición o pérdida de plásmidos (6).

En este trabajo se estudió el efecto conjunto de la variación de temperatura y de la concentración de cloruro de sodio sobre cepa *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r aislada de un suelo de la Patagonia Central Argentina con una larga historia de contaminaciones con hidrocarburos. La misma tiene capacidad de utilizar como fuente de carbono a componentes del petróleo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa

La cepa se obtuvo a partir del suelo de un landfarming por enriquecimiento a 28 °C en medio líquido con una mezcla de hidrocarburos, y una posterior selección en medio sólido sin nutrientes con vapores de una mezcla de hidrocarburos (hexano, heptano e iso-octano).

Cultivo y aislamiento

Para el aislamiento se utilizó un medio con la siguiente composición: sulfato de magnesio 0,2 g, cloruro cálcico 0,02 g, fosfato monopotásico 1 g, fosfato dipotásico 1 g, nitrato amónico 1 g, cloruro férrico 0,05 g, agar-agar 15 g, y atmósfera de hexano:heptano:iso-octano (1:1:1) en bolsas de polipropileno herméticamente selladas. Con suficiente cantidad de oxígeno para desarrollo aeróbico (aproximadamente 200 ml).

Las bacterias fueron cultivadas en cada una de las condiciones de este ensayo (temperaturas de 14, 28 y 35 °C y concentraciones de NaCl de 0,5; 1,5; 2,5 y 3,5% para cada una de las temperaturas) en medio TSBA. Las incubaciones se realizaron en un período de 24 hs.

Identificación

Se efectuó en base a su perfil de sus ácidos grasos de membrana por cromatografía gaseosa, utilizando la base de datos de SherlockMidi en el laboratorio de microbiología ambiental de UFZ (Leipzig, Alemania).

Extracción de ácidos grasos

La extracción de ácidos grasos se realizó por tratamiento de 40 mg (peso húmedo) de células crecidas en la tercera estría a las 24 horas, efectuando una saponificación con alcohol metílico-hidróxido de sodio-agua (150 ml:45 g:150 ml) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6 N y alcohol metílico (325 ml:275 ml) y a continuación una extracción con n-hexano-metil terbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10.8 g-900 ml) de acuerdo con el procedimiento del sistema de identificación SHERLOCK (MIDI Newark, Del., USA).

Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa, usando una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud, 0,2 mm de diámetro, el análisis se llevó a cabo con una cromatografía HP 5890 series II GC (inyección «splitless»; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-260 °C a 5 °C/min, 260-310 °C a 40 °C/min, 1,5 min. de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por HP 3365 (Hewlett Packard), la integración de los picos se efectuó mediante HP 3365 Chem Station, los ácidos grasos fueron identificados con estándares Agilent «Calibration standards kit for the microbial identification system». La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico en relación con la sumatoria de áreas de todos los ácidos grasos de C9 a C20. La nomenclatura adoptada para los ácidos grasos es: el número anterior a los dos puntos indica el número total de carbonos de la molécula, el número posterior indica el número de dobles ligaduras, el número que sigue a w (en caso de existir) indica el carbono inicial de la doble ligadura seguido de la palabra cis o trans para la correspondiente configuración, el número antes de la palabra metil indica la posición de éste, La indicación iso o anteiso indica la posición del metilo terminal o subterminal.

Tratamiento de datos

El análisis de análisis de componentes principales mediante el programa NTSyS (Rolf F.J., Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00 (1997) Exeter Softwear, New York).

RESULTADOS

La composición en ácidos grasos de la cepa *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r se explicita en la Tabla 1.

Comportamiento de grupos ácidos grasos e índices de ácidos grasos como respuesta a variación de la temperatura y de la salinidad

En las figuras 1 a 4 se presentan las modificaciones de los principales grupos de ácidos grasos que se producen por efecto de la temperatura, cuanto la concentración salina permanece constante.

Con una concentración de 0,5% de NaCl (Figura 1) no hay modificaciones significativas en los grupos de ácidos grasos saturados con metilo en posición iso y un grupo oxidrilo (n:o iso OH), alcoholes totales (OH-tot) y largo total de ácidos grasos. Hay aumento en ácidos grasos saturados de cadena lineal (n:0), ácidos grasos saturados con grupo metilo en carbono 10 (n:0 10 metil), sumatoria de ácidos grasos ramificados totales (ram-tot) y sumatoria de ácidos grasos saturados totales (sat-tot) y disminución en los ácidos grasos monoinsaturados cis (n:1 cis).

Con una concentración de 1,5% de NaCl (Figura 2) no hay modificaciones significativas en el largo total de los ácidos grasos. Hay aumento en: n:o iso OH, n:0 10 metil, OH-tot, ram-tot, sat-tot; en cambio hay disminución en n:1 cis, y una disminución entre 14 y 28 °C con un posterior aumento entre 28 y 35 °C de n:0.

Para las concentraciones de 2,5% de NaCl (Figura 3), con diferencias cuantitativas se repite el comportamiento con la salinidad de la concentración de 1,5% de NaCl. Idéntico comportamiento se observa con 3,5% de NaCl (dato no mostrado).

El incremento de la concentración de cloruro de sodio tiene patrones diferentes en las tres temperaturas ensayadas. A 14 °C (Figura 4) n:o iso OH, OH-tot y largo total ácidos grasos. Hay aumento en n:0, sat-tot, un leve aumento en n:0 10 metil y ram-tot, disminución en los n:1 cis y no hay modificaciones significativas en los otros grupos. A 28 °C y 35 °C hay una diferenciación entre la concentración de 0,5% y el resto como puede observarse en las figuras 5 y 6.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales indica un agu-pamiento por temperaturas y una diferenciación dentro de las temperaturas por la concentración de cloruro de sodio. La concentración 0,5% NaCl es la que mayor diferenciación produce.

Los tres primeros componentes explican el 95% del comportamiento de este grupo de tratamientos (dato no mostrado), por lo que el análisis de las tres primeras dimensiones es suficiente. En la figura 7 se puede analizar el comportamiento de la cepa frente a los tratamientos con temperatura y salinidad.

DISCUSIÓN

Las bacterias pueden alterar la composición de sus ácidos grasos de membrana para estabilizar su fluidez.

La cepa *Rhodococcus rodochrous* GNP-OHP-38r tiene una estrategia de adaptación a la temperatura basada principalmente en el incremento de los ácidos grasos saturados totales. El incremento se produce en dos etapas una entre 14 y 28 °C en la que el aumento del porcentaje de n:0 es de poca magnitud, 52 a 55% (0,47%/°C) y la otra de 28° a 35 °C. Donde se produce un incremento mayor de 14% (2%/°C). Esta diferencia estaría en concordancia con la temperatura de 30 °C recomendada para su aislamiento, a pesar de ello la mayor biomasa en el menor tiempo se obtuvo a 28 °C (datos no mostrados). Los ácidos grasos saturados que se incrementan son 16:0, 15:0 iso 2OH y en menor porcentaje 18:0 10 metil, 16:0 10 metil, 17:0 10 metil. El número de carbonos de los ácidos grasos n:0, se mantiene constante.

El largo total de la cadena se mantiene constante en todas las salinidades y temperatura.

Si bien no existen comunicaciones sobre el comportamiento de *Rhodococcus rodochrous*, en respuesta a la variación de temperatura, el incremento de los ácidos grasos n:0, se presenta en otras especies de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (9), *Bacillus subtilis* (2), *Anabaena variabilis* (27) y *Synechocystis* sp. (32)

El incremento de los n:0 se acompaña con una disminución de los ácidos grasos (16:1 w7c y 18:1 w9c), con las mismas características (más atenuada entre 14 y 28°C y mucho mayor entre 28 y 35°C (Figura 2).

La salinidad presenta variaciones en los perfiles de ácidos grasos pero no tiene tendencias que puedan ser ajustadas a ecuaciones más o menos simples. En la mayoría de los casos hay variaciones entre dos grupos,

uno corresponde a 0,5% NaCl y el otro a las otras tres salinidades.

Los ácidos grasos ramificados con OH tienen un aumento de aproximadamente 9 al 23% cuando la temperatura aumenta de 14 a 35°C. El ácido graso determinante de este aumento es el 15:0 iso 2 OH, y no hay variaciones de la longitud de la cadena de carbonos. Este incremento no está relacionado con la disminución de ningún grupo de ácidos grasos en particular, por lo que su incremento se debería a síntesis de novo a partir de leucina (24).

Las variaciones de los n:0 10 metil tienen el mismo patrón de variación que los n:0. Estos ácidos grasos, si bien no son los más abundantes, son característicos de este género y aumentan desde menos del 1% hasta valores cercanos al 10%. Varios autores (2, 18, 20) han comunicado variaciones de ácidos grasos ramificados, iso y anteiso como respuesta al estrés ambiental, pero en ningún caso las bacterias que estudiaron contenían n:0 iso OH, ni n:0 10 metil.

Los ácidos grasos característicos de este grupo de bacterias n:0 10 metil están ausentes a 14 °C y toman valores importantes a 35 °C.

En general la influencia del aumento de la temperatura con concentraciones NaCl al 0,5%, difiere de la observada a concentraciones mayores. Por otra parte, el incremento de la concentración salina sólo presenta un patrón más o menos definido a 14 °C, a mayores temperaturas la influencia de la salinidad no puede predecirse aunque afecta la composición de ácidos grasos.

El análisis de componentes principales muestra un comportamiento similar al análisis de agrupamiento (no mostrado) pero con mayor explicación para los dos tratamientos con aparentes discrepancias (28 °C con 0,5% de NaCl, y 35 °C con 0,5% de NaCl). En la figura 7 se observa como forman grupos por temperaturas cuando la salinidad es igual o superior a 1,5% de NaCl y la diferencia de comportamiento con la menor salinidad. Este comportamiento similar, con dos tratamientos diferentes (análisis de agrupamiento y análisis de coordenadas principales), indica que los datos de los valores promedios de los ácidos grasos son robustos.

En forma similar a lo comunicado por otros autores (26) la temperatura produce un estrés que implica un mayor cambio en la modificación de la composición de los ácidos grasos de membrana para mantener la homoviscosidad, y la salinidad tiene una influencia secundaria, salvo en el caso de concentración de cloruro de sodio de 0,5%.

Otros autores han encontrado cambios significativos en los ácidos grasos de las membranas celulares, Guillot et al (13) encontraron que en *Lactococcus lactis* se incrementa la proporción de ácidos grasos ciclopropano y que no se producen cambios en la relación insaturados/saturados, López et al (20), trabajando con *Bacillus subtilis* encontraron un aumento significativo de los ácidos grasos saturados de cadena lineal con una disminución de los ácidos grasos saturados, en particular los iso ramificados. Valderrama et al (31), estudiaron la acción de la concentración salina sobre *Halomonas salina* y comunicaron que la concentración salina tiene una gran influencia en la composición de ácidos grasos y que activaría la ciclopropano sintetasa con disminución de los ácidos grasos monoinsaturados. Esta variedad de respuestas de la parte no polar de la membrana celular a un mismo estímulo, el aumento de la concentración salina, indica que la biodiversidad de respuestas llega a funciones tan esenciales para la vida como es mantener la homo-viscosidad de las membranas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abel K, De Schmertzling H, Peterson JI (1963) Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. J. Bacteriol. 85: 1039-1044.
2. Aguilar PS, Cronan Jr JE, De Mendoza D (1998) A *Bacillus subtilis* Gene Induced by Cold Shock Encodes a Membrane Phospholipid Desaturase. J. Bacteriol. 180: 2194-2200.
3. Annous LA, Becker LA, Bayles DO, Labeda DP (1997) Critical Role of Anteiso-C15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. Applied and Environmental Microbiology. 63: 3887-3894.
4. Annous BA, Kozempel MF (1998) Influence of growth medium on thermal resistance of *Pediococcus* sp. NRRL B-2354 (formerly, *Micrococcus freudenreichii*) in liquid foods. J. Food Prot. 61: 578-581.
5. Bell KS, Philip JC, Aw DWJ, Christofi N (1998) The genus *Rhodococcus*. J. Appl. Microbiol. 85: 195-210.
6. Bertone S, Giacomini M, Ruggiero C, Piccarolo C and Calegari L. (1996) Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. Applied and Environmental Microbiology. 62: 2122-2132.
7. Bousfield IJ, Smith GL, Dando TR, Hobbs G (1983) Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. J. Gen. Microbiol. 129: 375-394.

8. Dubois-Brissonnet F, Malgrange C, Guerin-Mechin L, Heyd B, Leveau JY (2000) Effect of temperature and physiological state on the fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Food Microbiol* 55: 79-81.
9. Dennis WH, Yatvin KB (1981) Correlation of hyperthermic sensitivity and membrane microviscosity in *E. coli* K1060. *Int. J. Radiat. Biol.* 39: 265-271.
10. Finnerty WR (1992) The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 193-218.
11. Goodfellow M, Alderson G (1977) The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. *J. Gen. Microbiol.* 100: 99-122.
12. Guckert JB, Ringelberg DB, White DC, Hansonn RS, Bratina BJ (1991) Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2631-2641.
13. Guillot A, Obis D, Mistou M (2000) Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 47-51.
14. Heipieper HJ, Meulenbeld G, van Oirschot Q, De Bont JAM (1996) Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2773-2777.
15. Henningson PJ, Gudmestad NC (1991) Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137: 427-440.
16. Huys G, Vancanneyt M, Coopman R, Janssen P, Falsen E, Altwegg M, Kersters K (1994) Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 651-658.
17. Kadner RJ (1996) Cytoplasmic membrane. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, Jr., B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C. 58-87.
18. Klein W, Weber MHW, Marahiel MA (1999) Cold Shock Response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-Dependent Switch in the Fatty Acid Branching Pattern for Membrane Adaptation to Low Temperatures. *J. Bacteriol.* 181: 5341-5349.
19. Lechevalier MP, Moss CW (1977) Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 6: 109-210.
20. Lopez CS, Heras H, Garda H, Ruzal S, Sanchez-Rivas C, Rivas E (2000) Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *International J. Food. Microbiol.* 55: 137-142.
21. Osterhout GJ, Shull VH, Dick JD (1991) Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1822-1830.
22. Pucci OH, Bak MA, Peressutti SR, Klein L, Härtig L, Alvarez HM, Wünsche L (2000) Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semiarid soils of Patagonia (Argentina). *Acta Biotechnol.* 20-2: 129-146.
23. Rainey PB, Thompson IP, Palleroni NJ (1994) Genome and fatty acid analysis of *Pseudomonas stutzeri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 54-61.
24. Russell NJ (1984) Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci.* 9: 108-112.
25. Russell NJ (1989) Adaptive modifications of halotolerant and halophilic microorganisms. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 93-113.
26. Russell NJ, Evans RI, ter Steeg RF, Hellemons J, Verheul A, Abee T (1995) Membranes as a target stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 255-261.
27. Sato N, Murata N (1981) Studies on the temperature shift-induced desaturation of fatty acids in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-green alga (cyanobacterium), *Anabaena variabilis*. *Plant Cell Physiol.* 22, 1043-1050.
28. Stead DE (1992) Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 281-295.
29. Stead DE, Sellwood JE, Wilson J, Vieny I (1992) Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 72: 315-321.
30. Suutari M, Laakso S (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 285-328.
31. Valderrama ML, Monteoliva-Sanchez M, Quesada E, Ramos-Cormenzana E (1998) Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Res. Microbiol.* 149: 675-679.
32. Wada H, Murata N (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* 92, 1062-1069.
33. Warhurst AM, Fewson CA (1994) Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14: 29-73.
34. Whyte LG, Hawari J, Zhou E, Bourbonniere L, Inniss WE, Greer CW (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2578-2584.
35. Yang P, Vauterin L, Vancanneyt M, Swings J, Kersters K (1993) Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 47-71.