

## Caracterización de cepas nativas de *Clostridium* spp por secuenciación parcial del gen ribosomal 16s rARN

D. Montoya, L Perdomo, C. Arévalo\*, F. Aristizábal\*\*, W. Schwarz\*\*\*

### RESUMEN

Las cepas de *Clostridium*, productoras de solventes y ácidos, han sido caracterizados empleando una amplia gama de técnicas fisiológicas, bioquímicas y moleculares. Los trabajos más recientes han clasificado estos microorganismos en cuatro grupos y es de esperarse que muchos de los microorganismos anaerobios solventogénicos estén fuera de esta clasificación. El presente trabajo estuvo orientado a caracterizar molecularmente por 16S rARN trece cepas silvestres de *Clostridium* seleccionadas por su mayor capacidad para producir solventes con respecto a la cepa patrón de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Se hizo la secuenciación parcial del gen 16S rARN, sobre su segmento final (aproximadamente 700 pb). Para analizar las secuencias, se calculó *p* y se construyó el dendograma empleando neighbor-joining. Se pudo observar que las cepas silvestres no pertenecen a ninguno de los cuatro grupos de *Clostridium* solventogénicos sino que están cercanamente relacionadas con *Clostridium butyricum*.

**Palabras clave:** *Clostridium* spp, cepas nativas, cepas productoras de solventes, 16S rARN, caracterización molecular.

### SUMMARY

Solventogenic and acidogenic *Clostridium* has been characterized by biochemical, physiological and molecular techniques. These microorganisms have been classified into four groups but these may not necessarily be the only

four exclusive groups; in fact, many of these microorganisms might not belong to any of these selected groups. The main goal was to classify 13 higher solvent-producing Clostridia strains through molecular biology techniques; strains were isolated by our Group. Sequence analysis was calculated by *p* and the dendogram was constructed by neighbor-joining. The results obtained strongly suggest the idea of a high similarity between the 13 native strains in the study and the fact that they had no relationship to any of the 4 groups established by Keis *et al* (1995). It was found that *Clostridium butyricum* strain is the most related specie to the thirteen Colombian strains.

**Key words:** *Clostridium* spp., native strains, solvent production, 16S rRNA, molecular characterization.

### INTRODUCCIÓN

La producción biotecnología de butanol, etanol y acetona (ABE), fue desarrollada desde la primera guerra mundial, pero se vio disminuida después de 1945 debido a la baja disponibilidad de melaza de caña de azúcar o de azúcar de remolacha, empleadas como fuente de carbono. Actualmente el butanol se sintetiza químicamente a partir de derivados del petróleo como etileno, propileno o trietilaluminio, entre otros (Jones y Keis, 1995).

La producción del butanol por procesos fermentativos podría nuevamente sustituir a la vía química, siempre y cuando se disponga de una cepa con altos rendimientos en producción de solventes y con capacidad para degradar un amplio rango de fuentes de carbono de bajo costo (como residuos agroindustriales); esta característica la poseen algunos microorganismos, entre ellos, los *Clostridium* solventogénicos (Bronnenmeier Staudenbauer, 1993).

Durante muchos años se han intentado clasificar los *Clostridium* solventogénicos, mediante diferentes métodos que incluyen la caracterización de ácidos grasos de mem-

\* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

\*\*\* Instituto de Microbiología de la Universidad Técnica de Munich.

brana, la composición de carbohidratos, las pruebas bioquímicas y fisiológicas (Johnson y Chen, 1995). Hasta el momento se han empleado técnicas de caracterización por reasociación de ADN genómico, hibridización y secuenciación del gen 16S rARN, entre otras. Con estas metodologías los *Clostridium* solventogénicos han sido clasificados en cuatro grupos, claramente distinguibles (Keis *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997). En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular por 16S rARN de 13 cepas silvestres seleccionadas como las mayores productoras de solventes, provenientes de un cepario desarrollado previamente en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Montoya *et al.*, 2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Conservación y mantenimiento de microorganismos

Una alícuota de un cultivo de *Clostridium* spp crecido durante 12 horas se plaqueó en cajas con agarT6 (Kashket y Cao, 1993) y se incubó a 37°C durante dos semanas. Las esporas generadas se recogieron del centro oscuro de las colonias y se activaron a 70°C por 10 minutos en viales que contenían 3 ml de medio T6 estéril gaseado con CO<sub>2</sub>; los viales se incubaron durante 2 días. Cada cultivo se examinó microscópicamente para visualizar la uniformidad, tamaño de células y esporas (Hippe *et al.*, 1992). El cultivo se centrifugó a 4.000 g durante 5 minutos; las células se resuspendieron en 5 ml de solución salina isotónica (0,9% p/v) y se lavaron dos veces a 5.000 g durante 15 min. El *pellet* se resuspendió en 5ml de una mezcla de igual volumen de leche 5% v/v y glicerol al 10%; a 500 µl de esta mezcla se le añadió 1 gramo de sílica gel anhidra, esterilizada previamente a 180°C por 3 h y pre-enfriada a 0°C por 5 min. Se secaron los tubos en un cristizador con CaCO<sub>3</sub> y sílica gel por 10 días.

### Aislamiento del ADN

Esporas del microorganismo fueron activadas en las condiciones descritas arriba. Dos mililitros del cultivo activado fueron inoculados en 40 ml de RCM (Reinforced Clostridia Medium, Merck), previamente gaseado con CO<sub>2</sub> y esterilizado; los viales se incubaron a 37°C hasta el final de la fase exponencial de crecimiento y se colocaron en hielo durante 30 minutos. Las células se cosecharon por centrifugación durante 25 min a 4.000 g. El ADN fue extraído por lisis enzimática y química (Schwarz *et al.*, 1988).

### Amplificación

Las condiciones para la amplificación de los fragmentos fueron: un ciclo de 4 min a 94°C; 25 ciclos de 20 s a 94°C,

20 s a 65°C y 30 s a 72°C, y un ciclo de extensión de 20 s a 94°C, 20 s a 65°C y 7 min a 72°C. Cada 25 µl de reacción contenían: buffer 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 y KCl 50 mM); dNTP 0,18 mM y 0,3 µM de cada cebador A y J (Keis *et al.*, 1995); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 1,25 U de *Taq* Polimerasa (Promega) y 100 ng del ADN genómico. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Hybaid Thermocycler. El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa 1% en TBE 0,5X y se corrió a 3 V/cm durante 2 horas en TBE 0,5X. Los productos de PCR se purificaron empleando el kit Concert Rapid PCR (Gibco BRL). Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm.

### Secuenciación de los fragmentos de PCR

Para secuenciar los fragmentos de PCR se empleó un secuenciador automático Perkin-Elmer 373. Se utilizaron los cuatro cebadores para secuenciar, los dos de amplificación y los cebadores C y D, empleados por Keis *et al.* (1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño de cebadores y la amplificación parcial del gen

El objetivo fue seleccionar cebadores que pudieran ser empleados para amplificar un fragmento del gen ribosomal 16S en estas cepas (Rainey y Stackebrand, 1992). Se alinearon 9 secuencias (obtenidas del GenBank y el EMBL) del gen 16S rARN de los 4 grupos de *Clostridium* solventogénicos clasificados en trabajos anteriores (Keis *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997). Estas secuencias pertenecen a los siguientes microorganismos: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *C. Saccharo-butyl-acetonicum-liquefaciens* P262, *C.beijerinckii* NCIMB 8052, *C.beijerinckii* NCIMB 9362, *C.beijerinckii* DSM 791, *C. butyricum* NCIMB 8082, *C. butyricum* DSM 8478, *C. butyricum* ATCC 43755, y *C. saccharobutylacetonicum* N1-4. Para los alineamientos se empleó Dialign 2.0 (Morgenstern *et al.*, 1996). Las regiones conservadas se identificaron y en ellas se localizaron algunos de los cebadores descritos en las referencias (Kunhert *et al.*, 1996; Keis *et al.*, 1995; Lawson *et al.*, 1993), lo que permitió seleccionar los cebadores J y A para amplificar la región correspondiente en el gen 16S rARN de *E. coli* (desde 774 hasta 1.495). Para secuenciar se escogieron los cebadores C (1071-1087) y D (1075-1091). (Ver figura 1).

Cabe señalar que los cebadores seleccionados para este trabajo fueron los empleados por Keis *et al.* (1995), modificando el extremo 3'OH terminal del cebador J para disminuir la temperatura de alineamiento y poderlo emplear en lugar del cebador B, propuesto por los autores menciona-



**Figura 1.** Diseño de cebadores para amplificación y secuenciación.

dos, y de esta forma amplificar un segmento más grande del gen (ver figura 1).

Una vez que el ADN genómico se cuantificó, se realizó la amplificación con las condiciones mencionadas, empleando los cebadores A y J, y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb, el cual fue secuenciado con los cuatro cebadores, en todas las cepas silvestres y en dos cepas patrón, *Clostridium beijerinckii* DSM791 y *C. acetobutylicum* DSM 792. En la tabla 1 se muestra el tamaño de los fragmentos secuenciados.

**Tabla 1.** Longitud de los productos de PCR secuenciados en las cepas *Clostridium* productoras de solventes

Cepas	Número de nucleótidos secuenciados (pb)	Observaciones
DSM 791	717	Referencia
DSM 792	720	Referencia
IBUN 13 A	704	Cepa nativa
IBUN 18 A	708	Cepa nativa
IBUN 18 Q	709	Cepa nativa
IBUN 18 S	686	Cepa nativa
IBUN 22 A	711	Cepa nativa
IBUN 62 B	699	Cepa nativa
IBUN 62 F	713	Cepa nativa
IBUN 64 A	672	Cepa nativa
IBUN 95 B	717	Cepa nativa
IBUN 125 C	713	Cepa nativa
IBUN 137 K	705	Cepa nativa
IBUN 140 B	708	Cepa nativa
IBUN 158 B	715	Cepa nativa

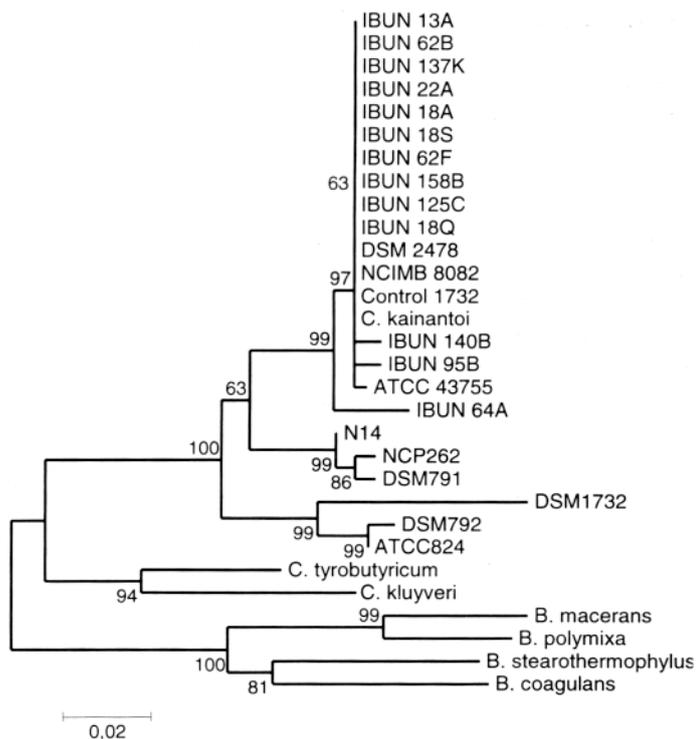
## ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias de cada cepa fueron corregidas con su electrofluorograma, y comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank para el gen 16S rARN de *Clostridium* spp.

Los alineamientos se hicieron en el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) organizando todas las secuencias desde una posición conservada en el extremo 3'OH (Secuencia CCCTGG) que forma parte del cebador A. Teniendo en cuenta que las cepas nativas deberían ser de la misma especie según las pruebas de caracterización que se realizaron con anterioridad (Montoya *et al.*, 2000), los parámetros de alineamiento para estas secuencias fueron estrictos. El segundo grupo alineado fue el de las secuencias de varias especies de *Clostridium* entre las que se encontraban: *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* DSM 791, *C. saccharoperbutylacetonicum* N 1-4, *C. Saccharobutyl-aceticum-liquefaciens* NCP 262; estas cuatro cepas pertenecen a cada uno de los grupos de *Clostridium* solventogénicos (Keis *et al.*, 1995; Johnson, 1997). También se incluyeron en este grupo las secuencias de tres cepas de *C. butyricum* (NCIMB 8082, DSM 2478 y ATCC 43755) porque al hacer una comparación empleando BLAST, entre las secuencias reportadas en el GenBank se observó que las secuencias de 16S rARN de las cepas nativas coincidían en un 99% con las de 16S rARN de *Clostridium butyricum*, almacenadas en esta base de datos. Teniendo en cuenta esta observación se incluyeron las secuencias de tres especies relacionadas con *C. butyricum*. la de *C. tyrobutyricum*, con el cual se encuentra asociado en contaminación de alimentos y suelos, la de *C. Kluyveri*, que fermenta etanol, produce hidrógeno y butirato a partir de acetato al igual que algunas de las cepas nativas, y la de *C. kainantoi* que ha sido clasificada en el mismo grupo de *C. butyricum* con algunos marcadores moleculares.

También se utilizó un grupo externo relacionado con *Clostridium* como parámetro para determinar si el método usado permite diferenciar los géneros. En este grupo se incluyeron las secuencias de cuatro especies de *Bacillus*: *B. macerans* (hidroliza almidón y produce gas); *B. coagulans* (anaerobio facultativo, esporoformador y productor de ácido láctico); *B. stearothermophilus* (se ha encontrado junto con *Clostridium* en muestras de suelo) y por último *B. polymixa* (anaerobio productor de gas y ácido en medios con glucosa) (Hippe *et al.*, 1992).

La matriz de distancias se generó calculando la proporción de nucleótidos diferentes ( $p$ ) entre pares de secuencias, y el dendograma se construyó empleando como estrategia de agrupamiento el algoritmo de Neighbor joining (Nei, 1987). Se utilizó este algoritmo para comparar los re-



**Figura 2.** Dendrograma de cepas nativas de *Clostridium* construido con Neighborjoining utilizando la distancia  $p$ .

sultados con los de la literatura (Keis, *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997). El dendrograma obtenido fue sometido a la prueba de Felsenstein's Bootstrap donde los valores de los nodos estaban entre el 60 y el 100% (ver figura 2).

En este dendrograma se observa que las cepas nativas están en el mismo grupo de las cepas de *C. butyricum* NCIMB 8082, DSM 2478 y cerca de la cepa ATCC 43755. Las cepas de *C. acetobutylicum* DSM 792 y ATCC 824 se encuentran en un grupo aparte y más alejado. También se

observa que las cepas de *C. saccharoperbutylacetonicum* NI-4, *C. Saccharo-butyl-acetonicum-liquefaciens* NCP 262 y *C. beijerinckii* DSM 791, forman un grupo aparte. La agrupación de las cepas patrón coincide con los resultados que reportó Keis (1995). Las cepas de *C. tyrobutyricum* y *C. kluyveri* forman un grupo alejado que se desprende del mismo nodo del que se desprenden todos los grupos de las especies anteriores. El *C. kainantoi* se encuentra en el mismo grupo de las cepas de *C. butyricum*, esto indica que con la secuencia parcial de 16S rARN no es posible diferenciar entre estas dos especies y es necesario buscar otro marcador molecular.

Es importante señalar que la cepa 64 A es la primera en separarse del grupo principal de cepas nativas, comportamiento que se ha evidenciado con otros marcadores fisiológicos como la producción de solventes (Montoya *et al.*, 2000).

## CONCLUSIONES

La secuencia parcial del gen 16S rARN permitió diferenciar las cepas nativas de otros *Clostridium* solventogénicos y acidogénicos. Las cepas nativas están relacionadas cercanamente con cepas de *Clostridium butyricum* y *C. kainantoi*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Colombiano para la Educación Superior (ICFES), a la Universidad Nacional de Colombia y a la Fundación Volkswagen de Alemania por el soporte económico brindado al proyecto. Al doctor Luis Ángel Murillo del Instituto de Inmunología por su apoyo para llevar a cabo las secuencias y al biólogo Diego Mauricio Riaño por su asesoría en el análisis de las mismas.

## REFERENCIAS

Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L. 1993. Molecular biology and genetics of substrate utilisation in clostridia. In: *The Clostridia and Biotechnology* (Woods, D. R. EdJ, Butterworth-Heinemann, Boston, MA. 261-309.

Hippe, H., Andreesen, J., Gottschalk, G. 1992. The genus *Clostridium*-Nonmedical. en: *The prokaryotes*, Vol. II (Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K., Eds.) 1800-1866. Springer-Verlag, New York, NY.

Johnson, J. L., and Chen, J. S. 1995. Taxonomic relationships among strains of *Clostridium acetobutylicum*

and other phenotypically similar organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 17:233-240.

Johnson, J. L, Toth, J., Santiwatanakul, S. and Chen, J. S. 1997. Cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:420-424.

Jones, D.T., and Keis, S. 1995. Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridia strains. *FEMS Microbiology Reviews*. 17:223-232.

Kashket, E. R., and Cao, Z. Y 1993. Isolation of

degeneration-resistant mutant of *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 8052. *Appl. Env. Microbiol.* 59:4198-4202.

Keis, S., Bennett, C., Ward, V., Jones, D. 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing Clostridia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:693-705.

Kunhert, R., Capaul, S., Nicolet, J., Frey, J. 1996. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rARN gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:1174-1176.

Lawson, R., Llop-Pérez, R., Hutson, R., Hippe, H., Collins, M. 1993. Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rARN sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:87-92.

Montoya, D., Espitia, S., Silva, E., Schwarz, W. 2000. Isolation of mesophilic solvent-producing *Clostridium* strains from Colombian sources: Physiological characterization and solvent production potential. *Journal of Biotechnology* (in press).

Morgenstern, B., Werner, T., Dress, A. 1996. Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-

segment comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12098-12103.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.

Rainey, F., Stackebrandt, E. 1993. 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:124-128.

Schwarz, W. H., Schimming, S., Rücknagel, K.P., Burgschwaiger, S., Krell, G., Staudenbauer, W. L. 1988. Nucleotide sequence of the CelC gene encoding endoglucanase C of *Clostridium thermocellum*. *Gene* 63:23-30.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. LUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.