



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
**CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**



**Biotecnología  
Industrial**

Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología  
Mención Industrial

Método no enzimático de inducción de protoplastos microbianos

**Autor:** Lic. Bigan de La Caridad Hung Guzmán

**Tutor:** Ph D. Francisca Fernández del Campo  
MSc. Rosa Mireya García Garrido

***Santiago de Cuba***

**2012**

***“Año 54 de la Revolución”***

## Introducción

Los microorganismos son células de vida independiente, que sustentan la vida de las plantas y de los animales y fueron los primeros en la evolución, en particular las cianobacterias fueron los primeros autótrofos que produjeron el dióxígeno en la Tierra y los responsables de la aparición del oxígeno en la atmósfera (Svenning et al., 2005). Debido a sus tamaños, diversos hábitats y versatilidad han sido muy utilizados para la producción de compuestos químicos, ellos sintetizan una gran variedad de compuestos que incluyen desde los azúcares más simples, aminoácidos y ácidos grasos hasta los más complejos antibióticos y pigmentos, así como otros productos microbianos (Neidleman, 1989; Manteca et al., 2006).

Las paredes celulares son estructuras que están presentes en los diferentes grupos taxonómicos microbianos de las bacterias, los hongos filamentosos, las levaduras, y las microalgas, tienen composiciones específicas de cada grupo y aunque le confieren rigidez y protección a las células constituyen una limitante para la manipulación de los mismos con fines biotecnológicos y en la naturaleza la frecuencia de aparición de células desnudas es muy baja, sin embargo pueden lograrse en condiciones de laboratorios (Blackhall, et al., 1994).

Las células desnudas microbianas se conocen como protoplastos, este término fue asignado por primera vez por Hainstein en 1980 refiriéndose a la unidad de protoplasma que se encuentra dentro de una sola célula (Evans et al., 1981) aunque para los vegetales que son los otros organismos vivientes con células cubiertas por paredes, también se les definen como estructuras osmóticamente sensibles (Vallín, 1982).

Los protoplastos son células desprovistas totalmente de las paredes celulares y son esferoplastos cuando la pérdida es sólo parcial, se obtienen de los organismos que pertenecen a los reinos: Monera, Fungi, y Plantae, representantes a su vez de los dominios Eubacteria y Eucariota. Para cada organismo particular se establece un protocolo de inducción con ajustes del tiempo de exposición a las enzimas líticas, osmolitos empleados para garantizar la sobrevivencia de las células desnudas y técnicas de determinación de la viabilidad celular con colorantes vitales, lo cual aún se utiliza con bastante frecuencia aunque la tendencia actual es al uso de los fluorocromos y la microscopía de epifluorescencia, también la microscopía confocal. (Jones y Senft, 1985)

El aislamiento de los protoplastos microbianos y su utilización para la obtención de fusantes heterocariontes, para el mejoramiento de cepas con determinado interés industrial o su uso como herramientas para estudios fisiológicos,

biofísicos, bioquímicos y genéticos ha sido parte de las investigaciones de las últimas décadas. La importancia de la inducción y el aislamiento de los protoplastos ha precisado la necesidad del desarrollo de técnicas que combinen el uso de enzimas de la clase 3 (hidrolasas), cuya actividad catalítica sea específica de los enlaces químicos presentes en los polímeros de las paredes celulares, así como el establecimiento de las condiciones osmóticas, del pH óptimo y el tiempo de exposición a los agentes líticos. Debido a que es generalmente necesaria la liberación de las paredes celulares por medios enzimáticos existe un gran número de enzimas elaboradas comercialmente, las más utilizadas para la degradación de las paredes de hongos filamentosos y de levaduras son las procedentes de la bacteria *Cytophaga* y del coctel de enzimas que se obtiene del hepatopáncreas del caracol *Helix pomatia*, comercializadas por la firma Merck, también se han realizado ensayos en levaduras con enzimas de *Zachrysia guanensis* (Vallín,1982)I y nuevas celulasas Spezyme y la celobiasa Novozyme (Meijuan et al, 2006).

Algunos investigadores prefieren obtener cocteles líticos lo que requiere del cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio para garantizar la producción de las proteínas con actividad catalítica, además del proceso de aislamiento y de purificación, pero generalmente son mezclas de hidrolasas con nucleasas, proteasas, y lipasas en bajos contenidos que afectan la viabilidad de los protoplastos, las hidrolasas comerciales más utilizadas son las celulasas (EC 3.2.1.4) y las muramidases ( EC 3.2.1.17), también se utilizan crudos enzimáticos y preparaciones purificadas de las enzimas comerciales.

En el presente trabajo se caracterizan los efectos de los ácidos orgánicos en la morfología y viabilidad de microorganismos de diferente complejidad celular: procariotas como son las bacterias y las cianobacterias, y en eucariotas: levaduras, hongos filamentosos y microalgas., se establecen las metodologías para la inducción de los protoplastos y su regeneración.

## **PROBLEMA CIENTÍFICO**

En la obtención de protoplastos para el mejoramiento de cepas y cultivos en Biotecnología, el método enzimático es el más utilizado, sin embargo, su eficiencia para la obtención de protoplastos viables generalmente es baja y las enzimas hidrolíticas (celulasas, lisozimas y otros cocteles comerciales) utilizadas son mezclas, acompañadas por otras enzimas: nucleasas, proteasas y lipasas, que limitan el éxito en el proceso de obtención de protoplastos viables por los efectos deletéreos, así como por la recalcitrancia para su regeneración.

## HIPÓTESIS

Si los ácidos orgánicos actúan sobre las paredes celulares de forma similar a las enzimas, entonces inducen protoplastos viables y regenerables.

## Objetivo General

Establecer la metodología para la obtención de protoplastos viables en microorganismos de los dominios Eubacteria y Eukarya.

## Objetivos Específicos

- Establecer las metodologías para obtener protoplastos en las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, en las cianobacterias *Anabaena PCC7120 sp*, *Nodularia sp* y *Aphanizomenon ovalisporum*; en los hongos filamentosos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, y en la microalga *Scenedesmus sp*.
- Determinar la viabilidad de los protoplastos obtenidos de bacterias, levaduras y hongos filamentosos mediante técnicas de microscopía óptica.
- Determinar la viabilidad de los protoplastos obtenidos de cianobacterias mediante técnicas de epifluorescencia.
- Evaluar la regeneración de los protoplastos obtenidos con ácidos orgánicos.

## Importancia del trabajo

### Aporte teórico

- Permitirá el conocimiento de los efectos de los ácidos orgánicos sobre las paredes celulares de los microorganismos seleccionados. Se brindará información de las condiciones osmóticas, los tiempos de exposición y de las características de los protoplastos obtenidos en cuanto a dimensiones, viabilidad, recuentos en el tiempo, iniciación de la regeneración de las paredes celulares y ocurrencia de divisiones celulares.

### Aporte práctico

- Se desarrolla una metodología que permite obtener protoplastos viables aplicable en Biotecnología, en condiciones osmóticas convenientes por un método no enzimático.
- Constituye un nuevo método de obtener células sin paredes en organismos de diferente complejidad: células procariotas y eucariotas.
- La información ofrecida sienta las bases para elaborar metodologías de obtención de protoplastos en otros organismos similares a los estudiados tanto en microorganismos heterótrofos como autótrofos.

### Novedad

- Se obtienen protoplastos con ácidos orgánicos en organismos de diferente complejidad, representantes de dos dominios del mundo vivo: Eubacteria y Eucarya.
- Se obtienen esferoplastos y protoplastos en *Aphanizomenonovalisporun*, lo que ofrece la posibilidad de estudios de expresión de genes, no realizados aún en este organismo.

## **Capítulo 1. Revisión bibliográfica**

### **1.1. Los microorganismos. Características generales e importancia.**

- 1.1.1. Las bacterias y sus paredes celulares.
- 1.1.2. Las cianobacterias y sus paredes celulares.
- 1.1.3. Los hongos.
  - 1.1.3.1. Los hongos filamentosos Paredes celulares
  - 1.1.3.2. Las Levaduras. Paredes celulares
- 1.1.4. Las microalgas. Paredes celulares.

### **1.2. Los protoplastos. Características generales.**

- 1.2.1. Metodología para la obtención de protoplastos metabólicamente competentes.
- 1.2.2. Lisozima
- 1.2.3. Los ácidos orgánicos.
  - 1.2.4. Características de los ácidos orgánicos
    - 1.2.4.1. Ácido fórmico.
    - 1.2.4.2. Ácido Tánico.
    - 1.2.4.3. Ácido acético.

### **1.3. Regeneración de los protoplastos**

#### **1.1. Los microorganismos. Características generales e importancia.**

Los microorganismos realizan transformaciones bioquímicas que no pueden llevar a cabo ni las plantas ni los animales por lo que juegan un papel determinante de la vida en la biosfera, como es la utilización del nitrógeno atmosférico (Rai y Bergman, 2002), la biodegradación de sustancias complejas que llegan a los suelos y los productos de sus fermentaciones (Siqueia, 1994;

Silva et al., 2004), por medio de bioconversiones son capaces de producir metabolitos primarios y secundarios de interés para el hombre como son las enzimas, poliósidos capsulares, aminoácidos, antibióticos, vitaminas, nucleótidos púricos y pirimídicos, disolventes, e inclusive biomasa; los denominados ideolitos o metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento microbiano (Neidleman, 1989).

También son capaces producir sustancias que afectan la salud del hombre, las plantas y los animales y tales actividades perjudiciales para esos organismos son para ellos una garantía de supervivencia pues son medios nutritivos completos que de forma natural le ofrecen sus fuentes de carbono y nitrógeno, de manera que ha sido necesario estudiarlos para utilizarlos, mejorarlos o eliminarlos.

Es muy amplio el campo de estudio de los microorganismos y la mayoría presenta una cubierta protectora, rígida, muy bien ensamblada por diferentes biomoléculas, que es la pared celular, sin la cual son frágiles osmóticamente, por lo que se hace necesaria la disrupción de sus polímeros naturales para acceder al interior celular y transferir la información genética, para liberar los productos de interés, o para seguir las rutas metabólicas y conocer sus puntos de regulación, cruciales para obtener los productos o para impedir la replicación de su material genético, limitando así su crecimiento, pero es conocido que con sólo eliminar las paredes celulares parcial o totalmente quedan expuestas al choque osmótico, si lo que interesa es lissarlas, pero si es necesario utilizarlas mejoradas se debe impedir la lisis, se enfrenta entonces el investigador a una muy difícil tarea que es conservarlas viables hasta que regeneren sus paredes celulares.

### **1.1.1 Las bacterias y sus paredes celulares.**

Pertencen al Reino Monera del dominio Eubacteria, son células microcópicas, procarióticas, algunas fotosíntetizadoras clasificándose unas como heterótrofas y otras autótrofas, con dimensiones de 1-10 micras de longitud y hasta 5 micras de diámetro.

Las bacterias poseen paredes celulares para resistir la presión interna o presión de turgencia de hasta 2 atmósferas debido a la presencia de solutos disueltos en el interior celular, a la vez que les dan forma y rigidez.

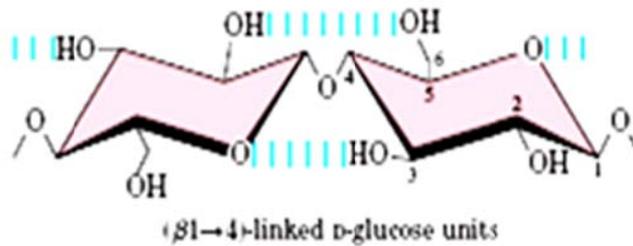
Se diferencian en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas según la respuesta a la tinción diferencial denominada tinción

de Gram, presentando diferencias en la morfología y composición, pero estructuralmente presentan el peptidoglicano o mureína, capa que da la rigidez y que está formada por finas láminas de derivados de azúcares: N-acetilglucosamina y ácido murámico y los aminoácidos L-Alanina, D-Alanina, D-Glutámico y Lisina o DAP (ácido diaminopimérico) que juntos forman el tetrapéptido de glicano, que puede presentar lisina o DAP, y no se presentan los aminoácidos ramificados, azufrados, aromáticos, arginina, prolina ni la histidina (Madigan, 2004).

La estructura básica es una lámina donde los aminoácidos forman enlaces peptídicos y los azúcares por enlaces glucosídicos y aunque fuertes se entrecruzan para conferir la rigidez característica variando el número de enlaces en dependencia de la especie, en las Gram negativas es entre el grupo amino del diaminopimérico y el grupo carboxilo terminal de la D-Alanina, en las Gram positivas se forman puentes interpeptídicos entre varios aminoácidos, en *Staphylococcus aureus* cada puente está formado por cinco moléculas de glicina. En las Gram positivas el 90 % de la pared es de peptidoglicano y presenta ácidos teicoicos, en las Gram negativas, solo un 10%, presentando membranas externas.

Las células bacterianas pueden perder sus paredes por la acción de diferentes agentes líticos, como la lisozima (EC 3.2.1.17) una enzima muramidasa que actúa sobre el peptidoglicano a nivel de los enlaces  $\beta$ -1,4glucosídicos (Figura 1), lo que debilita la pared y expone a la célula a lisis por entrada de agua, ello se evita pues aunque pierda la pared si las condiciones osmóticas son adecuadas, se logra que las células desnudas sobrevivan como protoplastos o como esferoplastos, estas últimas son las que conservan restos de paredes pero también pueden lisarse.

Otros procariontes como *Mycoplasma* y *Thermoplasma* son protoplastos naturales que sobreviven por sus fuertes membranas debido a la presencia de esteroides o porque su hábitat es el interior del cuerpo humano en el caso de los infecciosos. Algunas bacterias *Archea* tienen un pseudopeptidoglicano donde está presente el ácido N-acetilalosaminurónico y enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,3.



**Figura 1.** Representación del enlace  $\beta$ 1-4. Tomado de Principles of Biochemistry, Cox et al, 2005.

### 1.1.2. Las cianobacterias y sus paredes celulares.

Las cianobacterias son un grupo antiguo de microorganismos cuya existencia data aproximadamente de unos 3,500 millones de años según (Schopf, 1993; Golubic, 1999; Schopf, 2000; Svenning. Et al, 2005).

Las cianobacterias pertenecen al Reino Monera de la División Cyanophyta Clase Cyanophyceae, poseen las mismas características enunciadas para las células procarióticas pero a diferencia de las bacterias verdaderas pueden medir hasta 60 micras de longitud, presentan membranas internas llamadas laminillas fotosintetizadoras (lo que las hace autótrofas) dispuestas en un complejo multilaminar homologable a los tilacoides de los cloroplastos y son las responsables de realizar el metabolismo fotosintético ya que poseen toda la maquinaria necesaria para hacerlo, poseen clorofila, pigmentos fotosintéticos accesorios, factores ATP sintetasa y en general todo el complejo enzimático (Loreto y Morales,2003), poseen sólo una forma de clorofila, la clorofila a (lo que se considera que gran importancia en la clasificación filogenética) y todas poseen pigmentos biliprotéicos como las ficobilinas entre las que se encuentra la ficocianina, que participan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y son responsables del color azulado característico de la mayoría de las bacterias, una de las líneas filogenéticas principales del dominio bacteria y al parecer tienen un parentesco lejano con las bacterias Gram positivas (Madigan, 2004). Son un grupo grande y diverso de procariontes gramnegativos que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica y al igual que las plantas, las cianobacterias poseen dos fotosistemas, FSI y FSII (Castenholz, 2001).

El citoplasma con dos zonas: el centroplasma incolora, con material nuclear en forma de gránulos y el cromatoplasma: zona periférica pigmentada con pigmentos asimiladores (clorofila a, carotenoides, ficocianina (azul) y ficoeritrina

c (rojo) en laminillas submicroscópicas de actividad fotosintética. Como producto de reserva tienen un polisacárido semejante al glucógeno animal (almidón de cianofíceas) y proteínas. Pueden ser unicelulares o agrupados no filamentosos y filamentosos (simples, con falsa ramificación y con ramificación verdadera). La reproducciónes vegetativa por fisión binaria, fragmentación, hormogonios y hormocistes y por esporas: acinetos, endosporas y exosporas. En las agrupaciones filamentosas puede existir una célula particular, el heterociste, que es de mayor tamaño, sin pigmentos, con paredes gruesas con dos nódulos en los puntos por los cuales se unen a las otras células de la agrupación y basándose en características genéticas, según la segunda edición del Manual Sistemático de Bergey (Castenholz, 2001), también se dividen a las cianobacterias en cinco sub-secciones.

Los heterocistes se asocian a la fijación de nitrógeno, mediante el complejo de la enzima nitrogenasa, sólo presente en estos organismos y en bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Azotobacter* (Mazur por y Plinski, 2003), esta enzima es inactivada por la presencia del oxígeno, y el nitrógeno atmosférico lo reduce a iones amonio. Los heterocistes tienen discutida intervención en la reproducción por actuar como puntos de fragilidad lo que contribuye a la multiplicación de la agrupación y además tienen valor diagnóstico (posición, número), (Huang, Fan et al., 2004).

En cuanto al hábitat e importancia; son mayormente acuáticas en un amplio rango de salinidad y temperatura y están presentes en agua dulce, sobre suelo, rocas y partes vegetales húmedas en forma de manchas incrustadas o como almohadillas viscosas verde azulosas, oliváceas, pardas o casi negras. Algunas pueden formar, en épocas del año con temperatura favorable, una capa superficial de diversos colores conocida como flores de agua; como ejemplo está *Microcystisaeruginosa* que libera al medio sustancias tóxicas que pueden causar la muerte de los peces. Algunas viven en aguas termales (hasta 80°C), en desiertos y lugares helados. Otras especies forman asociaciones simbióticas con raíces de plantas vasculares (Bryophytas, *Cycas* y *Azolla* (helecho acuático) y hongos (líquenes), así como también contribuyen a la formación de arrecifes coralinos segregando carbonatos de calcio y de magnesio. Participan como fijadoras del nitrógeno libre lo que incrementa la producción en campos de arroz y otros cultivos (Willmott y Herdman, 2001).

Dentro de este grupo se pueden encontrar una gran diversidad de formas entre ellas: unicelulares como *Gleocapsa*, filamentosas ramificadas (*Stigonema*), no ramificadas (*Oscillatoria*), con heterocistes que son células vegetativas diferenciadas que se encuentran regularmente a lo largo de un filamento o en un extremo del mismo. Por ejemplo: el género *Anabaena* que posee

heterocistes presenta una relación simbiótica importante con el helecho acuático *Azolla*, facilitándole a este último la captación de nitrógeno (Kaplan et al., 1986) En cuanto a su membrana plasmática es importante anotar la presencia de ácidos grasos con dos o más enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada a diferencia de los demás procariontes que poseen ácidos grasos saturados. A su vez las cianobacterias, en especial las especies planctónicas, se caracterizan por poseer vesículas de gas en su citoplasma que son las encargadas de mantener el organismo en flotación para ubicarse en la zona de máxima iluminación (Rippka et al., 1988). Han desarrollado diferentes sistemas, así algunas poblaciones como *Gleothoece* separan ambos procesos llevando a cabo la fotosíntesis durante el día y la fijación denitrógeno durante la noche (Millineaux et al, 1981; Flores y Herrera, 1994 y Costa, 2004). *Trichodesmium* lleva a cabo la fijación de nitrógeno en un subconjunto de células en el filamento (Lin et al., 1998; Costa, 2004). Por último, para poder realizar ambos procesos simultáneamente, algunas cianobacterias aíslan el proceso de fijación del nitrógeno en una célula especializada conocida como heterociste (*Nostoc* y *Anabaena*). Esta célula modificada se diferencia estructural y fisiológicamente del resto de las células por ser una célula carente del fotosistema II y una pared celular adicional para impedir la entrada del oxígeno.

La importancia ecológica y evolutiva de estos organismos radica en la capacidad de generar oxígeno formado durante el proceso fotosintético, esto confirma que especies ancestrales similares a ellas fueron los primeros organismos fototróficos responsables de generar la atmósfera primitiva en el planeta. (Kaplan, Richmond, Dubinsky y Aronson, 1986) Además generan materia orgánica para otros organismos, son de utilidad económica en suelos donde se cultiva arroz, ya que al incorporar el nitrógeno atmosférico en compuestos utilizables por estas plantas, se evita la utilización de fertilizantes, se mejora la calidad del suelo y se incrementa el rendimiento agrícola, también entre ellas hay más de 46 especies son tóxicas, como *Anabaena*, *Aphanizomenon ovalisporum* y *Nodularia* (Sivonen y Jones, 1998).

En cuanto a su pared celular no contiene celulosa pero es muy resistente debido a la presencia de polisacáridos unidos a polipéptidos. Además secretan una sustancia mucilaginosa que les confiere la defensa contra predadores ya que puede ser tóxica. Por otra parte un grupo de células formando filamentos dando lugar a las cianobacterias filamentosas. La pared celular posee dos capas: la interna es la más cercana al protoplasto y la externa formada por compuestos pécticos y de aspecto mucilaginoso, puede existir una envoltura o vaina mucilaginosa segregada por la célula, de grosor variable, estratificada o

lisa y coloreada o no. Las cianobacterias pueden formar blooms, en el Mar Báltico es frecuente que ocurra en verano siendo la principal *Nodularia spumigena* (Horstman 1975 y Niemi 1979; Larsson et al., 1985; Kahru et al., 1994). Junto a *Nodularia* spp. Aparece *Aphanizomenon* spp. (Kononen & Niemi 1984).y es precisamente *N. Spumigena* la que produce la cianotoxina nodularina (Rinehart et al., 1988; Sivonen et al., 1989; Codd et al., 1999; Mazur y Plinski, 2003), que es una hepatotoxina (Fujiki, 1989).

La obtención de esferoplastos y protoplastos en las cianobacterias se ha realizado fundamentalmente en diferentes especies de *Anabaena*, resulta de interés para facilitar los estudios de las cianotoxinas, precisamente por las características de las cubiertas celulares de estas bacterias muy gruesas, la tarea se dificulta y se logra dañar las paredes celulares con la enzima hidrolítica lisozima (EC 3.2.1.17); algunas especies de los géneros *Nodularia* y *Anabaena* han sido tratadas con lisozima  $1,5\text{mg ml}^{-1}$  y los resultados son esferoplastos mayormente, aunque la eficiencia generalmente es menor de un 50%, de todas formas el éxito de los tratamientos enzimáticos depende de la metodología aplicada para lograr el proceso de inducción de las células con las paredes debilitadas o ausentes, se emplean con frecuencia métodos de disrupción que utilizan el ultrasonido, bolas de vidrio y otras, de esa forma se destruyen también las estructuras celulares liberándose entonces los compuestos que tienen diferentes actividades entre las que son más estudiadas las toxinas.

*Anabaena*: este género es uno de los más estudiados, su genoma está secuenciado y está reportado como un modelo para el estudio de la formación de heterocistes y de aquinetos, cuando hay poco nitrógeno en el medio, una de cada 10 células se diferencia en heterociste, este tipo de célula suministra a las vecinas con el nitrógeno fijado y reciben a cambio los productos de la fotosíntesis, son funciones separadas pues el oxígeno inhibe a la fijación al hacer a la enzima nitrogenasa inestable (Rippka, 1988).Las células carecen de núcleo y de otras estructuras celulares. Actualmente se puede fotografiar y rastrear el curso de la absorción de nutrientes a escala nanométrica con un espectrómetro de masas de alta resolución, nanosims, lo que permite ir esclareciendo como pueden "fijar" o absorber el nitrógeno atmosférico y el carbono.

*Nodularia*: aparece frecuentemente en el Mar Báltico formando "blooms", registrados desde finales del siglo XIX, (Horstman, 1975; Niemi,1979),crece en condiciones neutrales o ligeramente alcalinas, aguas cálidas con bajos contenidos de fósforo y nitrógeno, generalmente aparece junto a *Aphanizomenun ovalysporun*, produce la cianotoxina nodularina, hepatoxina

que puede causar cáncer de hígado (Ohta et al., 1994, Fujiki et al., 1996, Ouahid, 2008), requiere hierro para su crecimiento para la síntesis de ácido  $\delta$  amino levulínico, precursor de la clorofila, también el hierro es cofactor de las enzimas nitrogenasa y nitrato reductasa, así como en las peroxidasas y las catalasas que contienen hierro (III), (Stryer, 1997).

### **1.1.3. Los hongos**

Los hongos forman tres grandes grupos: hongos filamentosos (conocidos también como mohos), levaduras y setas, se clasifican en Ascomicetos, Basidiomicetos, Zigomicetos, Oomicetos y Deuteromicetos, siendo los géneros clave: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* y *Candida* (Brock, 2004) por su importancia para la sociedad tanto desde el punto de vista industrial como de la salud.

#### **1.1.3.1. Los hongos filamentosos. Paredes celulares.**

Los hongos pertenecen al Reino Fungi, constituyen un grupo amplio de organismos quimiorganótrofos, de pocos requerimientos nutricionales, con paredes celulares y esporas, crecen en diferentes ambientes, sobre la materia orgánica, mineralizan el carbono orgánico, parasitan a las plantas, y a los animales, incluido el hombre. Crecen en condiciones de pH bajos, para algunos extremadamente ácidos y temperaturas de 25-36° C hasta 62° C, (Pelczar, 1966; Reed, 1982; Litchfield, 1989; Brock, 2004).

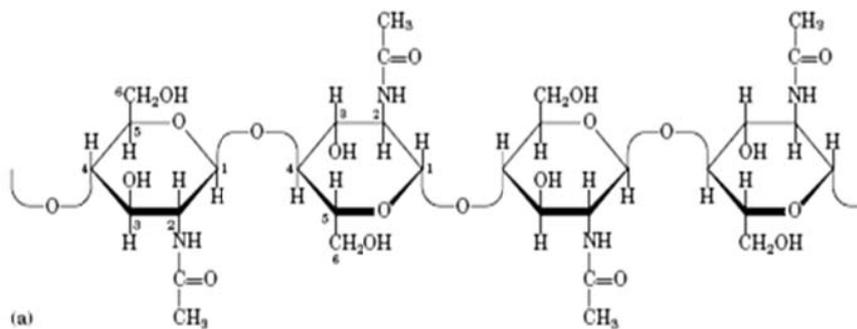
Los hongos crecen por extensión celular, sus filamentos se denominan hifas y constituyen el micelio a partir del cual se forman esporas o conidios (asexuales), también pueden presentar esporas sexuales resistentes a la desecación. Los hongos tienen enzimas que les permiten degradar sustratos naturales de composición celulósica como telas, maderas y papeles, por medio de enzimas celulasas (EC 3.2.1.4) y otros complejos con actividades hidrolasas (Walsh, 1979, Smith et al., 2000) que se utilizan en la producción de antibióticos, ácidos orgánicos, aminoácidos y diferentes procesos fermentativos de interés biotecnológico como la producción de ácidos orgánicos: ácido cítrico, láctico, glucónico, fumárico, málico, en particular el ácido cítrico es ampliamente usado en bebidas y alimentos, resaltante de sabores, promotor de acción detergente, quelante de metales y antioxidante, por procesos de fermentación con los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paelomyces*, *Mucor* y *Ustilina*, en los cuales de forma natural se produce en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (de Krebs) como un intermediario formado del acetyl-Coa y el oxalacetato por inhibición al extraer iones hierro para bloquear el paso a *cis*-aconitato (Reed, 1982; Randolph y Hardy, 1989).

Las paredes celulares están compuestas mayormente de quitina (polímero de

N-acetil-D-glucosamina), de cadenas no ramificadas de residuos  $\beta$ 1-4, (figura 2), muy parecida a la celulosa con iguales enlaces, pero con diferencias en el reemplazo del grupo hidroxilo en el carbono 2 por un grupo acetamido, es insoluble, forma microfibrillas (Wissenlingh, 1998), también pueden estar presentes mananos, galactanos o quitosán, los polisacáridos en un 80-90% y los lípidos, los polifosfatos e iones inorgánicos forman una matriz cementante, pocos presentan celulosa, la composición es útil para la clasificación y para las aplicaciones biotecnológicas.

En la familia *Aspergillaceae* también están presentes la glucosa, la manosa y la galactosa; desde 1965 se conocen las paredes celulares de *A. Niger*, que contiene un compuesto denominado nigerano (polímero de glucosa que alterna enlaces  $\alpha$  1-3 y 1-4 y otro polímero de glucosa ligado solo por enlaces 1-3).

Las esporas son de composición similar con más proteínas y menos hexosaminas, con espículas cristalinas de péptidos que son compuestos cíclicos de aminoácidos y de hidroxíácidos. (Durban et al., 2004).



**Figura 2.** Un corto segmento de quitina, un homopolímero de unidades de N-acetil-D-glucosamina con enlace  $\beta \rightarrow 1,4$ . Tomado de Principles of Biochemistry (Cox et al., 2005).

### 1.1.3.2. Las Levaduras. Paredes celulares

Son organismos eucariotas que pertenecen al Reino Fungi, en particular al grupo Deuteromicetos, las del género *Candida* (Margulis y Schwartz, 1988), sin embargo *Saccharomyces* es un Ascomiceto; ya desde 1839 Schwan y Cagniar-

Latour habían demostrado que las levaduras eran unicelulares y Meyer las denominó “hongos azucarados” del latín *Saccharomyces* (Surema y Morles,1998). Se reproducen por gemación que puede alternarse con la simple escisión, habitan sobre el suelo, materias orgánica de origen vegetal, se aíslan fácilmente de las superficie de las frutas, del suelo y de otras partes de las plantas, también pueden encontrarse en productos animales; son unicelulares, de formas esféricas, ovoides o elipsoides, más alargadas o más ensanchadas de 1-9 micras de ancho y de 2 a más de 20 micras de longitud, la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría es de 20-30 °C, tolerando un amplio rango de ph (2,2-8,00) dependiendo de las especies y razas; pueden crecer con una amplia variedad de sustratos carbonados y nitrogenados monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, polioles, etanoles y ácidos orgánicos, polisacáridos y raramente las pectinas, galactosa, xilosa; ácidos: acético, acetoacético, fumárico,málico, láctico, pirúvico y succínico. Aunque utilizan monosacáridos, disacáridos trisacáridos y polisacáridos mayormente degradan al almidón soluble y a la inulina, y raramente utilizan la celulosa. Presentan colonias de diversas formas texturas y bordes: lisas, arrugadas, planas, elevadas, de margen entero, irregular o velloso, consistencia pastosa, que se espesa y seca al envejecer y pueden pigmentarse (Hakala, 2004), los procesos metabólicos que presentan pueden ser aerobios y anaerobios (Lehninger, 1989; Magar, 2005).

Sus células son ricas en vitaminas hidrosolubles: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina, ácido *paraminobenzoico* e *inositol*, variando la proporción entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, caracterización que se debe a Pelczar en 1966.

*Saccharomyces cerevisiae* fue el primer organismo eucarionte del cual se reportó la secuencia nucleotídica de su genoma en 1996 (Bolívar,2004) y es utilizada en la fabricación de cervezas, ron, vinos y otras fermentaciones de zumos de frutas, para la industria del pan, la producción de enzimas invertasas, glucoamilasas, diferentes glucosioimerasas, quesos, salsa de soja, condimentos a base de aminoácidos (Litchfield,1989; Tahoun et al.,2002), tratamiento de cueros y producción de etanol, esta última es la más conocida de sus aplicaciones, pero también en estudios moleculares y celulares, fundamentalmente relacionados con procesos patológicos en humanos, como cáncer (Magar et al,2005), como hospedero para la síntesis de proteínas extrañas incluyendo la interleukina-2, y ha sido ensayado clínicamente en el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y en el cáncer (Neidleman,1989). Algunos estudios con *S.cerevisiae* y también con *S.boulardii* han reportado sus usos como agentes bioterapéuticos, (probióticos) para el

tratamiento de colitis y diarreas causadas por bacterias, para ello han utilizado células viables de levaduras que mejoran la resistencia del ecosistema intestinal a la infección bacteriana. De esa forma se pueden mejorar y hasta curar enfermedades gastrointestinales (Kopp-Hoolihan, 2001; Nivien et al., 2007). Ya en el 2003 Akyol et al. Estudiaron el efecto antibiótico de las levaduras en la pancreatitis necrotizante, también en ese año García et al., utilizaron cepas de *Lactobacillus* con *S.boulardii* para tratar las diarreas persistentes de los niños, y otros estudios se refieren a disminuir algunos efectos del envejecimiento en la microflora del intestino (Hebuterne, 2003), las levaduras se utilizan con esos fines fundamentalmente por sus altos contenidos de vitaminas del complejo B (Vargas y Maraz, 2002). Con el objetivo de obtener cepas mejores para los ensayos de actividades probióticas los métodos tradicionales genéticos utilizados han sido los de la mutagénesis, sin embargo los problemas de la aneuploidía, poliploidía y diploidía de las cepas de uso industrial no han permitido éxitos con las técnicas de recombinación y ha sido necesario acudir a la transformación genética y a la fusión de protoplastos (Nivien et.al., 2007).

*Candida utilis*: comúnmente conocida como levadura torula que a veces se ha denominado *Torulopsis utilis*, fue utilizada el siglo pasado para la producción de proteína celular de los azúcares procedentes de las maderas (Litchfield,1989), es el mejor ejemplo de capacidad amplia para asimilar sustratos carbonados diferentes como galactosa y la xilosa, también ácidos orgánicos, por lo que es muy apreciada para forraje, para suplemento de la alimentación animal y humana a partir de materiales de desechos vegetales, desechos del licor del sulfito de la industria del papel, hidrocarburos y quesos para producir grasas y enzimas (Dzuiba et al., 2002), También por su capacidad fermentativa es muy empleada en la formación de híbridos somáticos con *Saccharomyces*. Y con *Pichia* (Selebane, 1993, Dzuiba et.al., 2002).

Salkowski caracterizó las paredes celulares de las levaduras en 1894, denominando acrocelulosa, a un material insoluble, que químicamente es un carbohidrato. Durante 40 a 50 años de estudios, se utilizaron álcalis diluídos y métodos similares a los realizados con las bacterias (Norticote y Horne, 1963)

Por este medio se obtuvo el material homogéneo de las paredes celulares, los polisacáridos solubles como por ejemplo el glucógeno que procede de las partes internas de la célula y no de la pared (Northcote, 1963; Bishop, Blanck y Gardner, 1960).Luego se establecieron varios polímeros aislados primariamente por extracción alcalina, estando presentes glucanos, mananos y proteínas, y un por ciento muy bajo de quitina, lo cual es discutible, pero desde

la década de 1950 se considera que un 30 % es de glucanos, 30% de mananos, 2% de nitrógeno como proteínas, 8% de lípidos y un 3% de cenizas.

En *Saccharomyces* se ha encontrado glucosamina y en los productos de la hidrólisis ácida, amino azúcares (1-3 %) en base a peso seco y por Rayos X se obtuvieron patrones de quitina, pero es una quitina con un grado diferente de polimerización (Martin et al., 2004; Andalis et al., 2004).

El examen de los productos de la hidrólisis parcial ácida de los glucanos de las levaduras panaderas según Peat, Whelan y Edwards, en 1958 confirmó la presencia de enlaces 1-6 y de 1-3. Los polisacáridos remanentes son un residuo de la extracción alcalina de las células completas purificadas por el tratamiento con **ácido acético** cuando es esterilizado a 135° C por una hora con acetato 0,02 mol L<sup>-1</sup>, a pH 7,0 y son parcialmente hidrolizados con **ácido fórmico**.

En 1937-1941 se hicieron las primeras investigaciones sobre los mananos y su estructura por Heath y Peat, Haworth, Hirst, y Isherwood. En 1961 Peat et al. , esterilizaron células completas a 135 ° C y pH7,00, en solución acuosa bufferada , con la hidrólisis **ácida parcial** y el aislamiento de los oligosacáridos mostraron la relativa estabilidad ácida del enlace glucosídico en orden 1-6,1-2,1-3, por lo que los estudios anteriores permitieron arribar a la propuesta de la estructura, que sugiere que el manano en la pared de *Saccharomyces cerevisiae* no difiere muy fundamentalmente de otras levaduras; en *S. Rouxii* ha sido estudiada por (Charlson y Perlin, 1956; Gorin y Perlin, 1957), los que mostraron evidencias de la presencia de enlaces 1-3, parece que es una estructura del esqueleto de residuos de mananoiranosos enlazados 1-6 con cortas cadenas laterales de residuos 1-2 o 1-3. El estudio de *Candida albicans* por Bishop et al., en 1960 no muestra evidencias del enlace 1-3.

También se han determinado complejos proteína polisacáridos, donde el contenido de nitrógeno varía con la edad del cultivo y con la especie en particular (Eddy, 1958; Kuhle, 2005)). Cuando el cultivo es joven contienen un 0,4% y se eleva hasta 1,4 -1,5 % en los más viejos.

La composición de las paredes varía entre diferentes levaduras, pero es frecuente la presencia de glucanos, mananos y quitina en diferentes proporciones, mostradas por estudios químicos y por los patrones de difracción de rayos X, gracias a ellos se conoce la composición de las paredes de *Schizosaccharomyces* sp., *Nadsonia fulrescens*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus*, *Endomyces decipiens*, *Eremascus fertilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Candida utilis* y

otros.(Roger y Perkins, 1968; Lehman et al.,1998; Mathews et al., 2000; Andalis et al., 2004, Abd El-Khalek et al., 2006).

#### **1.1.4. Las microalgas. Paredes celulares.**

Son organismos eucarióticos, aeróbicos, fotoautótrofos y unicelulares (Smith, 1987), con fotosistemas I y II organizadas en cloroplastos , sus procesos vitales requieren agua dióxido de carbono sustancias inorgánicas como N y P y luz, la fotosíntesis es su principal modo de obtención de la energía para el metabolismo (Biggins, 1981; Azevedo,1994; Moraes,1999) su origen se remonta a aproximadamente 3,5 billones de años, han sido descubiertas en fósiles de rocas sedimentarias al noroeste de Australia, son organismos pioneros de la Tierra, los primeros productores de materia orgánica y de la liberación del oxígeno (Shelef y Soeder, 1980; Becker, 1994; Rovaniemi, 2004).

Las paredes celulares de las algas varían considerablemente en estructura y composición, presentan fibras de celulosa con otros polisacáridos como xilanos, pectinas, mananos, ácido fuccínico y ácido algínico, se puede depositar el carbonato cálcico y también la quitina aumentando la rigidez, las euglenoides no tienen paredes celulares, en las diatomeas las paredes son de silicio más proteínas y polisacáridos, sus paredes presentan poros que permiten el paso de sustancias de baja masa molecular: agua, iones inorgánicos , gases y nutrientes, por lo que en ellas la fagocitosis no es posible (Sander, 1981; Brock, 2004).

El espesor de las paredes celulares varía según la edad y tipo de la célula, generalmente, las células jóvenes tienen paredes más delgadas que las completamente desarrolladas, pero en algunas células la membrana aumenta poco de espesor después que la misma ha dejado de crecer. Sean delgadas o gruesas, las paredes son de estructura compleja, pudiendo a menudo reconocerse la presencia de capas de distinta composición química y estructura. La presencia de una pared celulósica rígida en organismos unicelulares y flagelados es suficiente para clasificarlas entre las algas, lo cual es arbitrario pues muchos flagelados fotosintetizadores no poseen pared celulósica (Biosíntesis de la pared; sitio Web).

Los xilanos son polímeros donde los residuos  $\beta$ -D-xilósilos están unidos por enlaces  $\beta$  (1-3) y  $\beta$  (1-4), son parcialmente ramificados. En las especies con paredes de xilano existe una estructura en forma de capas con orientación de las microfibrillas y contienen mayormente polímeros lineales.

El grupo *Scenedesmus* es uno de los más importantes de la familia Scenedesmaceae formado por especies presentes en aguas dulces y cálidas, importantes pues ofrecen nutrientes para uso en la acuicultura por lo que es necesaria cultivarlas “in vitro”, que con protoplastos viables se logra un complemento de las técnicas convencionales, se pueden realizar experimentos de fusión, pueden ser una opción para la transferencia de características de las especies salvajes a las cultivadas haciendo posible el flujo genético entre especies lo que elimina las barreras de la hibridación sexual interespecífica (Neidleman, 1989; Aptk y Behrens, 1999). Algunas algas contienen minerales en sus paredes, ejemplo la silicona en conchas de las diatomeas, también en algunas algas pardas y verdes (*Chlorella*, *Scenedesmus*, etc.). Otro componente es el calcio que aparece en forma de incrustaciones en especies tropicales de aguas marinas, se deposita como carbonato de calcio en dos estados cristalinos: calcita (algas rojas y *Charophyceae*) y argonita (algas verdes como *Acetabularia*, etc.). En las algas las funciones de la pared celular se basan en: proteger a la célula, servir de comunicación con células del mismo u otro tipo; ser permeables a los metabolitos y reguladores y determinar el tamaño y la forma celular (Cell walls of algae; sitio Web; Shelef y Soeder, 1980; Abo-Shady, 1992).

## 1.2. Los protoplastos. Características generales.

En 1880 Hainstein denominó protoplasto a la unidad de protoplasma que se encuentra dentro de una sola célula (Evans, 1981). Weibull en 1953 los definió como la estructura osmóticamente sensible obtenida luego de aislar la pared celular (Vallín, 1982). Un protoplasto es una célula vegetal esférica, osmóticamente sensible, sin su pared celular pero reteniendo intacta la membrana celular, (Smith et al., 2000). La definiciones que reportan la literatura se refieren esencialmente a células vegetales y se utiliza el nombre de esferoplastos para los microorganismos cuando no se han eliminado totalmente la paredes celulares (Williamson, 1975; Frobisher, 1976; Pelczar, 1982; Biggins, 1981; Abo et al., 1992; Blackhall, Davey, Power, 1994; Rai, 1997; Durban, 2004); cuando quedan restos de paredes unidas a las membranas pero la célula está protegida osmóticamente son esferoplastos, es incorrecto usar el término protoplasto por esferoplasto (Madigan, 2004).

Los protoplastos y esferoplastos obtenidos de diferentes organismos, procariotas o eucariotas son células que mantienen sus funciones en un medio osmóticamente protector, y si las características de la semipermeabilidad y semiselectividad de sus membranas se conservan al no dejar pasar al interior colorantes como el Azul de Evans, se dice que son competentes, y deben regenerar sus paredes celulares cuando cese la acción de los agentes líticos,

así también durante el proceso de regeneración deben dar lugar a células como las originales de donde se obtuvieron.

La importancia de los esferoplastos y de los protoplastos que en las bacterias se pueden obtener cuando son tratadas con enzimas líticas específicas para los componentes de sus paredes celulares y en medios ricos en sacarosa en concentraciones de hasta 20% (p: v) es que se convierten en células fácilmente manipulables aunque son muy frágiles. Estos protoplastos son potencialmente activos biológicamente por lo que también juegan un papel central en los estudios sobre las respuestas celulares al medio circundante; a través de los protoplastos se pueden conocer detalles del crecimiento y de los procesos metabólicos, por lo que han sido caracterizados ampliamente en levaduras, hongos filamentosos, cianobacterias y microalgas (Magar, 2005; Mayer, 2005; Shiba, 2007).

Las aplicaciones de los protoplastos se pueden resumir de la siguiente forma:

- 1) Biología: procesos de transporte, morfogénesis, división celular, mutagénesis, selección, transformación genética, introducción-absorción de proteínas y DNA exógeno, procesos de programación de células para competencia metabólica, proteínas transmembrana, estudios biosintéticos de la membrana plasmática, de la propia pared, asilamiento de ribosomas, estudios de estrés a nivel celular y procesos de diferenciación.
- 2) Biotecnología: son una herramienta fundamental para la obtención y selección de cepas mejoradas, estudios de resistencia a antibióticos, análisis parasexual en hongos filamentosos, sistemas de regeneración, reconocimiento de la superficie celular, para estudios fisiológicos, para el mejoramiento de las cepas de interés industrial en la obtención de bioproductos.

En Fitopatología se utilizan para estudiar la etiología de los virus, procesos infectivos y replicación; la especificidad y modo de actuación de hongos y bacterias patógenas, la evaluación de toxinas, la obtención y selección de clones resistentes a diversos patógenos y productos fitosanitarios para la mejora genética, la producción de antibióticos semisintéticos, con los protoplastos de hongos filamentosos y de actinomicetos, hay evaluaciones de los protoplastos bacterianos como biosensores, y para el estudio de la biosíntesis de la pared en *Saccharomyces cerevisiae* (Pardo, 2006).

### 1.2.1. Metodología para la obtención de protoplastos metabólicamente competentes.

Se utilizan técnicas de ruptura celular suaves como en la lisis celular en los eritrocitos, por ósmosis, digestión enzimática, solubilidad química, autólisis, y solubilización parcial (Chávez, 2007). Preferiblemente se emplean las enzimas por la especificidad de acción para los diferentes enlaces químicos que forman los polisacáridos de las paredes celulares, son enzimas de la Clase 3, denominadas hidrolasas y particularmente son  $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1. ), donde solo varía el número inequívoco, coincidiendo la clase, la subclase y la sub-sub-clase (Walsh, 1989 ; Cox, 2005).

La obtención de protoplastos se hizo por primera vez en células vegetales por métodos mecánicos (Klercker, 1892), y en 1970 se comienzan a utilizar las enzimas exitosamente (Cocking, 1970), las más utilizadas son las celulasas (EC 3.2.1.4) Onozuka:S,2S,3S,4S,R-10,P-1, los cocteles de enzimas líticas, de  $\beta$ -glucosidasas, Driselasa de *Basidiomycetes* sp., y mezclas de diferentes enzimas que también son aplicadas a las microalgas por la presencia de la celulosa. Desde mediados del siglo pasado se reportan estudios con protoplastos microbianos: Eddy y Williamson (1957) fueron los primeros en estudiar la formación de protoplastos en *Saccharomyces cerevisiae* con enzimas del molusco *Helix pomatia*, también se han empleado otras enzimas denominadas helicasas (Maraz, 1977; Deak y Nork, 1970; Housset et al., 1975, Labealt et al., 1972; De Vries y Wessels, 1973; Yamamoto et al., 1975), con diferentes estabilizadores osmóticos y el uso de los compuestos mercaptos (Vallin, 1989). Se reportó el uso de la enzima lisozima en una especie marina de *Pseudomonas* utilizando sacarosa concentrada para garantizar una osmoticidad favorable y también se han obtenido protoplastos a partir del hongo filamentoso *Fusiarum culmorun* (Frobisher, 1969). En 1982 Vallín et al. investigaron la formación de protoplastos en dos cepas mutantes auxotróficas de la levadura *Candida tropicalis* con la enzima del caracol *Zachrysia guanensis casianeae* mercaptoetanol. Otros trabajos importantes son los de Kichachiro Ogawa, Anne Brown y Thomas Word (1986) con mutantes de color de *Trichoderma reesei* QM 9414 para la obtención de heterocariones mejores productores de celulasas mediante la hibridación intraespecífica de las cepas. Cotaro, Kimura, Takaski, Yaguchi y Shoji Usami en 1986 lograron cepas mejores productoras de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger* vía fusión de protoplastos (Sarduy, 1988).

En los diferentes protocolos de obtención de protoplastos en bacterias, cianobacterias y hongos filamentosos se emplea la lisozima (EC 3.2.1.17) en concentraciones desde 0,01-2% con diferentes osmóticos siendo más

frecuentemente usada la sacarosa, además: manitol, sorbitol, y en algunos casos cloruro de sodio o de potasio, acompañados de estabilizadores de la membrana celular, como el cloruro de calcio; en microalgas.

Además de la lisozima se hacen combinaciones con celulasas y otras hidrolasas, así por ejemplo Yamada y Sakaguchi en 1981 con *Chlorella* utilizaron celulasa Onozuka R-10, Macerozima R-10, Pectinasa y hemicelulasa de *A. niger*, quitinasa, driselasa y celulisina así como sorbitol/manitol (1:1). Reportes previos describen procedimientos diferentes para el aislamiento y cultivo de los protoplastos pero siempre partiendo de cultivos axénicos (Lederbeg, 1957; Watnabe, 1960; Millonig, 1963 Kessler et al., 1963; Nagata y Takebe, 1970; Atkinson, 1972; Bhattacharya, 1973; Berliner, 1977; Spiller, 1980; Yamada y Skaguhi, 1981; Redford, 1987; Seikimoto, 1992; Siqueira, 1994; Mayer, 2005; Hou-liang, 2005; Mountfour, 2006; Shiba, 2007).

En la década del 90 hubo tendencias a utilizar nuevas técnicas para la transferencia de la información genética para mejorar cepas productoras de diversos productos ya que en la práctica los tradicionales métodos de recombinación genética en microorganismos de interés industrial no dieron el éxito esperado (Buzanello et al., 1999; Nieven, 2007). La transformación y los procedimientos de fusión de protoplastos son más ventajosas, en particular la fusión de protoplastos permite la expresión de los caracteres recombinados sin los fenómenos de aneuploidía, poliploidía y diploidía, pero todavía se presentan dificultades con la eficiencia para el aislamiento y la purificación de los protoplastos y con las enzimas utilizadas, pues generalmente son extractos crudos de diferentes orígenes: fúngico como las celulasas de *Trichoderma reesei*, y de *Aspergillus niger*, bacteriano (*Cytophaga*), de caracoles *Helix pomatia*, *Zachrysia guanensis*; y las pectinasas ricas en actividades poligalactouronidasas o las celulasas con hemicelulasas,  $\beta$ -1,4 que generalmente están acompañadas de otras hidrolasas que pueden afectar a la viabilidad celular.

Los protoplastos son producidos a partir de suspensiones celulares, frecuentemente durante la fase de crecimiento logarítmica del ciclo celular (William y Eriksson, 1973, Dixon y González, 1985), en general siempre se tiene en consideración la pureza de la enzima, la relación entre la lisozima y la celulasa, la producción de protoplastos y su viabilidad. Los protoplastos se cultivan en un medio líquido nutriente, de composición similar al medio de cultivo requerido pero con la adición de un estabilizador osmótico para prevenir que estallen. Durante el cultivo hasta un 90% de los protoplastos aislados de diferentes células sufren un rápido e inmediato proceso de desdiferenciación e inician al mismo tiempo la síntesis de las nuevas paredes.

La obtención de esferoplastos y protoplastos en las cianobacterias se ha realizado fundamentalmente en diferentes especies de *Anabaena* (Abo-Shady et al., 1992; Rai y Bergmann, 2002), para facilitar entre otros los estudios de las cianotoxinas, y precisamente por las características de las cubiertas celulares de estas bacterias que son muy gruesas, la tarea se dificulta y solo se logra dañar las paredes celulares con la enzima hidrolítica lisozima (EC 3.2.1.17); algunas especies de los géneros *Nodularia* y *Anabaena* han sido tratadas con lisozima  $1,5\text{mg mL}^{-1}$  y los resultados son esferoplastos mayormente, aunque la eficiencia generalmente es menor de un 50%, de todas formas el éxito de los tratamientos enzimáticos depende de la metodología aplicada para lograr el proceso de inducción de las células con las paredes debilitadas o ausentes, se emplean con frecuencia métodos de disrupción que utilizan el ultrasonido, bolas de vidrio y otras, de esa forma se destruyen también las estructuras celulares liberándose entonces los compuestos que tienen diferentes actividades entre las que son más estudiadas las toxinas (Ouahid, 2008).

La obtención de los protoplastos microbianos se realiza en varios pasos que en general son:

- 1) El crecimiento hasta la fase logarítmica o hasta la fase lineal, en medio selectivo específico del microorganismo utilizado.
- 2) El acondicionamiento osmótico, de temperatura y de pH.
- 3) La inducción y el aislamiento en un medio de digestión.
- 4) La eliminación del agente lítico por lavados sucesivos.
- 5) Recuentos celulares en cámara de recuento (hemacitómetro).
- 6) La concentración y purificación.
- 7) Determinación de los índices de eficiencia y viabilidad.
- 8) La siembra para evaluar la regeneración.

### **1.2.2. Lisozima. Mecanismo de acción en la disrupción de paredes celulares.**

La lisozima es una enzima considerada un agente antibacterial natural que se encuentra en las lágrimas y en la clara del huevo de gallina, su masa molecular es 14 296, es un monómero que contiene 129 residuos aminoácidos (14,6 kd), fue la primera enzima a la cual se le determinó la estructura tridimensional por

D. Phillips y colegas en 1965, posee cuatro enlaces disulfuro. La molécula tiene una forma más o menos helicoidal 30x30x45Å. Hay hélices alfa y algunas regiones de la cadena tienen conformación de lámina beta extendida con una hendidura, en el sitio de fijación del sustrato que atraviesa la cara de la molécula, siendo su plegamiento más complejo. En la hendidura se unen 6 residuos del polisacárido por medio de puentes de H con diferentes grupos de los residuos aminoacídicos de la proteína. Como la lisozima hidroliza enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  del ácido N-acetilmurámico (NAM) a N-acetilglucosamina (NAG), implica que el enlace que se rompe es entre el anillo D $\rightarrow$ E, es decir entre el cuarto y quinto anillo.

El mecanismo es el de una catálisis ácido-base, en el que intervienen dos aminoácidos ácidos (Glu<sup>35</sup> y Asp<sup>52</sup>), que se encuentran a ambos lados del enlace glucosídico  $\beta(1\rightarrow4)$ , el entorno de cada uno de estos aminoácidos es diferente.

El Asp<sup>52</sup> se encuentra rodeado de grupos polares y tienen un pK normal, por lo que a pH fisiológico se encuentra ionizado, mientras que el Glu<sup>35</sup> está en una región apolar (lo que le permite estar protonado –no ionizado– a pH fisiológicos), el entorno de cada uno de los residuos determina su papel en el proceso catalítico.

No obstante las demostraciones de ese mecanismo de tipo disociativo de Phillips et al., se continuaron las investigaciones durante más de cuatro décadas, ha habido controversias por lo que existe otro mecanismo alternativo de Stephen Withers y colaboradores del 2001, es el del doble desplazamiento directo y consecutivo, que en un primer paso el Asp<sup>52</sup> ataca el C-O del ácido murámico para desplazar al N-acetil-glucosamina como en el mecanismo de Phillips, el Glu<sup>35</sup> actúa como un ácido general para protonar la N-acetil glucosamina y en el segundo paso el agua ataca al C-1 del Ácido murámico para desplazar el Asp<sup>52</sup> y dar el producto. En estos momentos es el más aceptado porque se ha podido observar el intermediario covalente formado, pero no se asegura que el otro mecanismo sea incorrecto, los dos son químicamente posibles ( Nelson, Cox., 2005).

### 1.2.3. Los ácidos orgánicos

### 1.2.4. Características de los ácidos orgánicos

Los ácidos carboxílicos constituyen un grupo de compuestos que se caracterizan porque poseen un grupo funcional -COOH llamado grupo carboxilo o grupo carboxi, se produce cuando se une un grupo hidroxilo (-OH) y carbonilo(C=O). Se puede representar como COOH o CO<sub>2</sub>H.

Las reacciones químicas típicas son:

- ❖ Reemplazamiento del hidrógeno ionizado.
- ❖ Reemplazamiento del grupo OH.
- ❖ Reacción del grupo carbonilo (CO).
- ❖ Eliminación del grupo carboxilo (COOH).
- ❖ Reacción de halógenos con el grupo alquilo

#### 1.2.4.1. Ácido fórmico.

El ácido metanoico, también llamado ácido fórmico (presente en las hormigas), es un ácido orgánico de un solo átomo de carbono, y por lo tanto el más simple de los ácidos orgánicos. Su fórmula es  $\text{H-COOH}(\text{CH}_2\text{O}_2)$ , el grupo carboxilo es el que le confiere las propiedades ácidas a la molécula. El  $\text{pK}_a$  del ácido fórmico es de 3,75. Teniendo en cuenta que el pH varía generalmente entre 0 y 14 (siendo 7 el pH neutro) podríamos decir que el fórmico, pese a ser un ácido de origen natural es relativamente fuerte.

Entre otras propiedades el ácido metanoico es un ácido, líquido, incoloro, de olor irritante, el punto de ebullición del cual es de  $100,7^\circ\text{C}$  y el de congelación de  $8,4^\circ\text{C}$  y es completamente soluble en agua porque su cadena carbonada es muy corta y fácilmente ionizable.

#### 1.2.4.2. Ácido Tánico.

El ácido tánico ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9$ ) o ( $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ ) es un derivado del ácido gálico que gradualmente se oscurece al ponerse al aire, o a la luz. A  $210-215^\circ\text{C}$ , se descompone en pirogalol y CO. Forma precipitados insolubles con albúmina, almidón y gelatina. Con sales férricas forma precipitados negro – azulosos. Es incompatible con sales de metales pesados. Se presenta natural y extensamente; probablemente como glucósido en agallas, en corteza de árboles tales como: zumaque, encina y abeto. Es un polvo amorfo, brillante, débilmente amarillo formando escamas brillantes o una masa esponjosa. Soluble en agua, alcohol y acetona; casi insoluble en benceno, cloroformo, éter y bencina de petróleo. En la industria de licores se utiliza como agentes de clarificación; en la química en la obtención de tanatos, ácido gálico, ácido pirogálico, hidrosoles de metales nobles. En la medicina como astringente activo en las diarreas, así como astringente en dermatología y para el tratamiento de las quemaduras. Es un magnífico antídoto de los alcaloides y algunas sales metálicas. (Brewster, 1963; Solomon, 1987; Merck 1990).

#### 1.2.4.3. Ácido acético.

El ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), es el componente del vinagre, es un líquido incoloro, fuertemente ácido, cuando es puro puede cristalizar total o parcialmente si se enfría por debajo de su punto de fusión, de  $16,6^\circ \text{C}$  durante algún tiempo, su punto de ebullición es  $118,2^\circ \text{C}$ . Se puede obtener por oxidación del acetaldehído con aire y un catalizador de óxido metálico, por oxidación bacteriana del alcohol etílico diluido y por el método de recuperación del ácido piroleñoso por neutralización para formar acetato cálcico seguido de recalcificación y destilación. Es un ácido higroscópico y causa graves quemaduras, es **microbiostático** y **microbicida**, la eficiencia es por la acción tóxica del ácido no disociado en disolución. A alta salinidad y pH bajo es más efectivo como conservador de alimentos; en forma de acetil- coa es el precursor de los ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas, también de terpenos y acetogeninas (Brewster, 1963; Cox et al., 2005). Tiene gran importancia industrial, se utiliza en la industria química en la fabricación de los acetatos, de colorantes, productos intermedios, fungicidas, sales aromáticas, como disolvente, en la fabricación de plásticos, gomas, drogas y gran variedad de productos orgánicos (Bonner, 1986); en medicina se utiliza como diurético, para cauterizar heridas, mordeduras o picaduras de animales venenosos, para extirpar callosidades, verrugas y tumores córneos en general (Solomon, 1987).

#### 1.3. Regeneración de los protoplastos.

Los protoplastos son capaces de regenerar las paredes siempre que las condiciones de osmoticidad en que se obtienen garanticen su supervivencia en períodos de tiempo que pueden fluctuar desde horas hasta días, es usual utilizarlos entonces en estudios de los procesos celulares, o destinarlos a procesos de fusión, principalmente entre especies afines o distantes evolutivamente en dependencia de las cualidades seleccionadas para obtener mediante la recombinación los nuevos microorganismos que exhiban las características de interés de las cepas de origen.

De forma natural o espontánea se forman en los procesos de fermentación (Reed, 1982), aunque resulta difícil distinguirlos si las células de origen son morfológicamente esféricas, siendo precisamente la forma la que permite identificarlos porque al no poseer las rígidas paredes celulares debido a la presión interna, tales células forman siempre esferas de diferentes tamaños.

Los procesos de obtención de células sin paredes son muy drásticos para las mismas ya que la eliminación de un componente celular que de forma natural poseen y que tienen las funciones de dar rigidez y forma a la célula al perderse

ocasiona cambios morfológicos y respuestas al medio en una forma algo diferente de lo usual se dice que son células estresadas, pero totipotentes y que permiten estudios del paso de los nutrientes, medidas de los potenciales de membrana, por inserción de microelectrodos, estudios de la ciclosis, y realizar ensayos de fusión (Tsuchikane, Fujii, y Sekimoto, 2005).

La regeneración de los protoplastos es la prueba que confirma el éxito de los tratamientos, no es poco frecuente que se manifieste la recalcitrancia o fallos en el crecimiento del cultivo y si se logra, los por cientos de eficiencia son bajos (Evans, 1981; Ahiua, 1982; Cheney et al. 1986; Chang y Meng, 1990; Cocking, 1993; Rai y Bergman, 2005; Shiba, 2007).

## Capítulo 2. Materiales y Métodos

Se seleccionaron microorganismos representantes de diferentes reinos: Monera, Fungi, y Plantae, según el sistema de clasificación de Cavalier y Smith para los ensayos de obtención de protoplastos, mediante el método no enzimático con los **ácidos orgánicos**: tánico, fórmico y acético y el método enzimático con las enzimas **celulasa** y **lisozima**, para comparar los efectos. Los ensayos se realizaron en flujo laminar en condiciones asépticas en los laboratorios de Bioquímica de Biología de La Universidad de Oriente, del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado y en el laboratorio de Fisiología Vegetal de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

A continuación se relacionan.

### 2.1 Microorganismos utilizados

#### 2.1.1 Reino Monera

**Bacterias:** *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*.

**Cianobacterias:** *Anabaena* PCC7120, *Nodularia* sp y *Aphanizomenon ovalisporum*.

**Bacterias:** procedentes de los laboratorios de Biología de la Universidad de La Habana, conservadas en plano inclinado de caldo nutriente agarizado OXOID al 2 % (p: v), OXOID, pH7,00, esterilizados a 120 °C por 15 minutos en autoclave y fueron crecidas por 24 horas en medio líquido de la misma composición e incubadas a 37 ° C con temperatura controlada.

**Cianobacterias:** *Anabaena* PCC 7120, *Nodularia* sp. y *Aphanizomenon ovalisporum*, procedentes de la colección del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

#### 2.1.2. Reino Fungi

**Levaduras:** *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* Y-660

*Saccharomyces cerevisiae*-02 (UH) procedente de la Universidad de La Habana.

*Candida utilis* (del ICIDCA). Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar.

**Hongos filamentosos: *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.**

*Aspergillus niger* (CCEBI, UO) procedente de la colección de cepas de microorganismos del centro de estudios de Biotecnología Industrial, de la Universidad de Oriente.

*Aspergillus oryzae* (UH) procedente de la Universidad de la Habana.

**2.1.3. Reino Plantae: microalga *Scenedesmus* sp.**

Se utilizó el alga verde *Scenedesmus* sp. (Lag. Chod, 4001), aislada de ambiente natural y mantenida en el laboratorio de cultivo algal de la colección CCEBI, de la División: Clorophyta, Orden Chlorococcales, Familia *Scenedesmaceae*. Es una especie fitoplanctónica común de aguas dulces y cálidas, son células cilíndricas que forman cenobio con una distribución regular en grupos de dos a ocho células más frecuentemente, menos en grupos de 16, sin espinas.

**2.2. Inducción y aislamiento de protoplastos microbianos.**

**2.2.1. Esquema general para microorganismos**

1. Selección de cultivos en fase logarítmica de crecimiento.
2. Tratamiento enzimático con Lisozima y celulasa 1-2%,(p:v) (Cocking, 1960; Dixon,
3. Purificación por el método de filtración-centrifugación en gradiente de Percoll
4. Recuento celular en Cámara de Fuchs- Rosenthal o de Neubauer mejorada.
5. Determinación el Índice de Eficiencia
6. Determinación del Índice de Viabilidad mediante técnicas de tinción.
7. Medición del tamaño de los protoplastos.
8. Regeneración de la pared celular y división celular (visualización con el fluorocromo Calcofluor White).
9. Siembra de los protoplastos en los medios de cultivo específicos para bacterias, cianobacterias, levaduras, hongos filamentosos y microalgas: caldo nutriente, Allen & Arnon, BG11, Saboureaud, YPG, Czapek, Medio de Brown.

## 1. Selección de cultivos en fase logarítmica de crecimiento

Todas las cepas de eubacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, fueron crecidas en las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración de los nutrientes requeridos como fuentes de carbono y de nitrógeno durante 24 horas. Las cianobacterias: *Anabaena* PCC 7120, *Nodularia sp.* y *Aphanizomenon ovalisporum*, crecieron en cultivo discontinuo por período de 6-21 días. Las levaduras: *Saccharomyes cerevisaie* y *Candida utilis* Y-660, y los hongos filamentosos: *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, fueron incubados hasta 72 horas (crecimiento lineal), y las microalgas (*Scenedesmus sp*) hasta 7 días.

Los medios de cultivo y las soluciones de los osmolitos, fueron preparados con agua bidestilada estéril, y las manipulaciones se realizaron en flujo laminar.

Los cultivos axénicos de las cianobacterias *Anabaena* PCC 7120, *Nodularia sp.* y *Aphanizomenon ovalisporum*, fueron conservados en medio de cultivo BG11 (Stanier et al., 1971, modificado por Hubert, 1987) y Medio de Allen y Arnon, preparados con agua miliq, esterilizada a 121° C durante 30 minutos. Fueron crecidos en condiciones fotosintéticas con intensidad de luz de aproximadamente  $30 \pm 5 \mu\text{molar m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con fotoperíodos de 16 horas por día: 8 horas noche y aireación de  $2,1 \text{ L min}^{-1}$ . Antes de los experimentos los cultivos fueron ajustados a pH 7,5-8,0 con HCl y NaOH, ambos  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Las microalgas: conservadas y crecidas en medio de Brown, con una densidad inicial de  $2,2 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , a  $25 \pm ^\circ\text{c}$  con iluminación continua de 2500 lux ( $56.25 \mu\text{/Em}^2\text{s}$  equivalente (según el factor de conversión de Ginsburg), aireado con un flujo de  $2,2 \text{ Lmin}^{-1}$ . Los cultivos fueron muestreados en el estado medio del crecimiento exponencial y alícuotas de 10mL del cultivo fueron utilizadas para los tratamientos líticos.

Se determinó la fase de crecimiento logarítmico en cada cultivo para la toma adecuada de las muestras a tratar con los agentes líticos. La densidad fue  $1,2 \times 10^5$  hasta  $1,8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

## 2. Tratamiento enzimático o con ácidos orgánicos

Las variantes ensayadas fueron: Lisozima comercial (EC 3.2.1.17), celulasa Onozuka R-10 y ácidos orgánicos GR de alta pureza.

Acido Tánico G.R.Merck MM 1701,1

Acido Fórmico,G:R: China,d=1,058

MM 46, 02, pureza 99%

Ácido acético Glacial, G:R: Quimicen, MM 60, Pureza 99 %

Lisozima cristalina, Merck, 1500 E/mg pH 7 y 25 °C

El tratamiento enzimático se hizo según las metodologías establecidas para los microorganismos (Mayer, Hou-liang, 2005; Mountfour, 2006; Shiba, 2007) que emplean enzimas  $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.17) y (EC 3.2.1.4) y en el no enzimático se siguió la misma metodología pero con ácidos orgánicos como agentes líticos.

### 3. Purificación

Concluida la digestión se procedió al método de purificación filtración - centrifugación según Power y col. (1984) utilizando Percoll o soluciones de CPWA y CPWB sacarosa  $0,72 \text{ mol L}^{-1}$  y manitol  $0,7 \text{ mol L}^{-1}$  para los lavados con Tween 80 10% (v/v) (Grosser, 1996; Rai y Bergman, 2002).

### 4. Recuento celular

Se realizó examen por microscopía óptica, con objetivos secos: 10x, 20x, 40x y ocular de 10x. Las bacterias fueron observadas con lente de inmersión, 100x y los hongos con objetivos secos. Luego se realizó recuento celular en cámara de Fuchs-Rosenthal antes de tratar las células (10 campos microscópicos) y posterior al tratamiento (10 campos microscópicos), para determinar el número de protoplastos espontáneos, viables y no viables con 3 réplicas cada tratamiento y 3 tiempos diferentes para cada cepa, lo que permitió establecer un tiempo óptimo de 10 minutos en bacterias y de 1 hora en hongos.

Características de la cámara de Fuchs-Rosenthal

|   | Fuchs-Rosenthal |
|---|-----------------|
| Profundidad (en mm)                           | 0,200           |
| Superficie del cuadrado más pequeño (en mm)   | 0,0625          |
| Concentración celular mínima (en células /ml) | $10^3$          |

#### Procedimiento:

- Diluir, eventualmente, las muestras (utilizar formol al 4% para fijar las células de algas móviles)

- Presionar el cubreobjetos sobre el porta hasta la aparición de los anillos de Newton
- Llenar ambos lados de la cámara, usando una pipeta Pasteur por debajo de cubreobjetos con un flujo suave de la suspensión (evitar la formación de burbujas)
- Contar al microscopio (objetivo de 40 aumentos) las células en 80 pequeños cuadrados. Contar las células que tocan los bordes superior e izquierdo, pero no las que los hacen en los bordes inferior y derecho.
- La submuestra del otro lado de la cámara se cuenta de la misma forma.

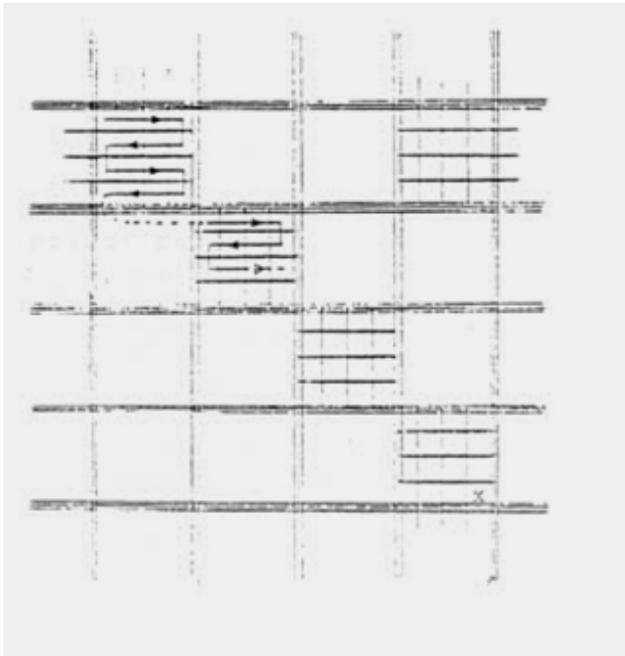


Figura1. Ilustración de la cámara de Fuchs- Rosenthal.

### Cálculos

$$\text{- Fuchs-Rosenthal} \\ \text{número de células/ml} = \frac{n_1 + n_2}{2 \times 80} \times 80 \times 10^3 \times d = \frac{n_1 + n_2}{2} \times 10^3 \times d$$

Donde: n1 = Número de células contadas en la parte superior

N2 = Número de células contadas en la parte inferior

D = Factor de dilución, para una mayor precisión hacer tres recuentos dobles (a diluciones diferentes)

### **5. Determinación del índice de Eficiencia.**

Índice de Eficiencia: Número total de protoplastos obtenidos x 100/número total de células normales.

### **6. Determinación del índice de Viabilidad.**

Índice de Viabilidad: Número total de protoplastos viables /número total de protoplastos obtenidos x 100.

Para conocer cuales protoplastos eran viables, se hicieron observaciones microscópicas siguiendo los cambios morfológicos el cual es un método muy tedioso que permite apreciar los cambios en el tiempo pero no precisa si están dañados por lo que se utilizó la tinción de los protoplastos de las bacterias, de las levaduras, de los hongos y de las microalgas con Azul de Metileno de Flink y Kühle, o con Azul de Evans (Dixon, 1994), siendo viables las no teñidas. (Glomelius, Kanai y Edwards, 1995; Kenneth, Jones y Senft, 1985). La tinción diferencial de los protoplastos de las cianobacterias se hizo con fluorocromos DFA-IP para revelar la integridad de la membrana y la tinción del ADN.

### **7. Medición del tamaño de los protoplastos**

Se realiza con micrómetro ocular graduado, y micrómetro objetivo, aumento de 70x, 100X y 400x, hallando el factor de calibración de 3,33-4,1 (De la Torre, 1975; Martínez, 1990).

## **8. Regeneración de la pared celular y división celular.**

Se hizo el ensayo de regeneración en los medios de cultivo líquidos y sólidos de uso común para los microorganismos, garantizando una densidad inicial de siembra de  $1 \times 10^6$  protoplastos  $\text{ml}^{-1}$ .

Ensayos de regeneración:

Según el tiempo de exposición óptimo al agente lítico teniendo en cuenta los índices de eficiencia y de viabilidad se procedió a la transferencia de los protoplastos utilizando 5 mililitros de solución de Tween 80 al 10 %, centrifugando a 2000 revoluciones por minuto durante tres minutos con resuspensión del sedimento en cloruro de potasio al 1%, de nuevo se centrifuga pero a 1000 revoluciones por minuto en dos minutos y del sobrenadante se siembra 0,1 mililitro en profundidad en medio de cultivo para hongos, levaduras y bacterias heterotróficas, en placas de Petri incubando a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  para levaduras y hongos respectivamente. Los microorganismos autótrofos fueron sembrados en medios líquidos.

Se detecta la presencia de las nuevas paredes tiñendo las muestras de 0,1 mL con Calcofluor White LRP al 5% (Pilet, 1990) manteniendo una relación de 1:1, el colorante abrillantador se prepara según las normas de Molecular Probes para los fluorocromos inmediatamente antes de su utilización.

## **10. Siembra de los protoplastos en los medios de cultivo.**

Los medios utilizados fueron: caldo nutriente OXOID para las bacterias, medio BG 11 y medio de Allen y Arnon para las cianobacterias, medio Saboureaud y medio Czapek para los hongos filamentosos y medio YPG para las levaduras, medio de Brown para las algas.

Se ajusta el protocolo general de inducción y aislamiento de protoplastos para cada especie.

### **2.2.2. Inducción y aislamiento de protoplastos en bacterias, levaduras y hongos filamentosos.**

Partiendo de cultivos bacterianos, crecidos en fase logarítmica y de hongos en crecimiento lineal, se vertieron 5 ml de buffer fosfato pH7 en un matraz de 50 ml, se adicionó 5 ml de solución de cloruro de potasio 1% (p: v), se añadió entonces la suspensión de células o de conidios de concentración (densidad celular) de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , 1 mL de solución de enzima 1% o 5 ml de ácido

orgánico 1% (p: v), se ajustó el pH a 7,0 y se incubó con agitación de 100-110 oscilaciones por minuto, durante 10 minutos las bacterias y por 1- 3 horas en los hongos, realizando el examen microscópico, observando las muestras teñidas con 0,05 mL de la solución del colorante Azul de Evans (0,5%); durante el tratamiento se hacen el recuento y la medición de los protoplastos obtenidos (Dixon y González, 1989). A continuación la purificación y determinación de los índices de eficiencia y viabilidad.

### **2.2.3. Inducción y aislamiento de protoplastos en cianobacterias**

Los protoplastos libres fueron preparados de cultivos en fase logarítmica de crecimiento en medio BG11 (Stanier, 1971, Huber, 1984), por una digestión no enzimática en períodos de 2-16 horas en buffer A (Berliner, 1987), conteniendo sacarosa  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , EDTA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico)  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  el pH ajustado a 7,00; el ácido tánico en concentraciones de 1,5 % (p: v), en iguales condiciones se añadió la lisozima, concentraciones de 1,5% (p: v) para comparar en experimentos individuales para cada cianobacteria y siguiendo el comportamiento en relación al patrón. El medio de cultivo utilizado para los cultivos batch fue preparado con agua miliq, esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y crecidos en condiciones de luz  $30 \pm 5 \mu\text{molar m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de 16 horas día: 8 horas noche aireados con un flujo de  $2,2 \text{ L min}^{-1}$ ; antes de los experimentos los medios de cultivos fueron ajustados a pH 7,5-8,0.

Las suspensiones de los protoplastos obtenidos fueron purificadas empleando el método de centrifugación en Percoll, utilizando una Centrifuga Genesys Instrumentation, S.L. Hillich Zentrifugen CFC Free EBA 12 R y una Centrifuga Refrigerada SORVALL RC 5C Plus (800 rpm = 76 g; 1000 rpm = 120 g o 117-120).

La prueba de viabilidad se realizó utilizando la tinción diferencial con los fluorocromos IP (Ioduro de Propidio) y FDA (Diacetato de Fluoresceína) obtenidos de Molecular Probes, (Fluorescent Probes and Research Chemicals, USA), que fueron preparados en stocks de 100 mM en DMSO (Dimetilsulfóxido), las alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  fueron descongeladas previo a ser utilizadas, siempre conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se hicieron recuentos celulares en hemacitómetro de Fuchs-Rosenthal. Los protoplastos obtenidos retienen la actividad esterasa y fluorescen cuando son expuestos al FDA tolerando las condiciones ácidas y se tiñe de rojo el DNA con el IP (de concentración final 25  $\mu\text{molar}$ ) indicando pérdida de la viabilidad; se aplicó la microscopía de epifluorescencia, empleando las técnicas Nomarsky y DIC para lograr mejores

imágenes que fueron procesadas con un programa y el estimado correspondiente la frecuencia revelan la viabilidad de los mismos.

#### **2.2.4. Inducción y aislamiento de protoplastos de la microalga fitoplanctónica *Scenedesmus* sp.**

El cultivo en medio de Brown con una densidad inicial de  $2,2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>, incubado a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con iluminación continua de 2500 lux (56.25  $\mu\text{m}^2$ seuivalent según el factor de conversión de Ginsburg, aireado con un flujo de 2,2 Lmin<sup>-1</sup>. Los cultivos fueron muestreados en el estado medio del crecimiento exponencial y alícuotas de 10 mL de cultivo fueron utilizadas para los tratamientos líticos.

Aislamiento de los protoplastos: La adición de ml(0,28 molL<sup>-1</sup>) más Cloruro de Potasio(30 mmol L<sup>-1</sup>), después de mezclar se adiciona 1 ml de solución de enzima Celulasa (Onozuka R-10 EC 3.2.1.4), Lisozima (EC 3.2.1.17) ambos a pH 7 o ácido Tánico (1% w:v) a pH5, entonces se incuba la mezcla de digestión a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con agitación suave (100-130 oscilaciones min<sup>-1</sup>) y 3 réplicas por tratamiento más el control para tiempos de exposición de 2 a 24 horas; después que la digestión fue completada, se remueven las enzimas y el ácido tánico, se filtra por gasa mesh y entonces se centrifuga para eliminar los restos no digeridos a 200 G. Las observaciones microscópicas fueron realizadas durante los ensayos utilizando objetivo seco de 40x y recuento celular en hemacitómetro de Fuchs-Rosenthal para estimar los protoplastos espontáneos inducidos viables y no viables y determinación del tamaño según De la Torre (1975) con 4,166 como factor de conversión.

La eficiencia fue determinada por la estimación del número total de protoplastos aislados y el rango con el número inicial de células por 100 (Uchimiya & Murasighe (1974) cit. Por De la Cruz & Sarduy ,1988; Becker,D., Jimenz,1983; Becker,D.,1994); el índice de viabilidad fue determinado utilizando el colorante Azul de Evans para membranas intactas por el principio de exclusión del colorante, método of Glomelius *et al.* (1974); Kanai & Edwards (1975), donde el mismo volumen de suspensión de protoplastos es mezclado con el colorante al 2% (p: v) preparado cinco minutos antes de las observaciones.

#### **2.3. Análisis estadístico**

Los experimentos de inducción y aislamiento se repitieron 3 veces, los de recuentos celulares hasta 10 veces para cada agente lítico por microorganismo. El análisis de los resultados obtenidos incluyó la descripción

de los cambios morfológicos observados conducentes a la formación de protoplastos en cada experimento.

Los datos son las medias  $\pm$  DS de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre medias fueron comparadas utilizando el Test de Rangos múltiples de Duncan con SPSS para Windows (Release 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA)

## Resultados y discusión

Los ensayos permitieron la obtención de protoplastos viables en microorganismos pertenecientes a los reinos: Monera, Fungi, y Plantae, de los dominios Eubacteria y Eukarya por un método no enzimático empleando ácidos orgánicos y establecer las metodologías para obtener protoplastos en las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, en las cianobacterias *Anabaena* PCC7120 sp, *Nodularia* sp y *Aphanizomenon ovalisporum*, en los hongos filamentosos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, y en la microalga *Schenedesmus* sp.

### Resultados en bacterias

En las bacterias heterótrofas *E.coli*, *B.subtillis* y *B. megaterium* los ácidos orgánicos: tánico, acético y fórmico causaron efectos sobre la morfología, posiblemente debido a la acción sobre las paredes celulares, que al debilitarse provocaron el cambio a protoplastos, para un tiempo óptimo de 10 minutos, lo cual fue determinado en experimentos previos con diferentes tiempos de exposición a los ácidos. También se determinaron las concentraciones de los agentes líticos, la osmoticidad y los rangos de pH para cada cepa microbiana que por lo que para estandarizar el procedimiento no enzimático y establecer las metodologías de inducción de protoplastos ya estos parámetros habían sido probados y ajustados.

En las tablas 1, 2 y 3 aparece los efectos de los ácidos y de la enzima muramidasa (lisozima) mostrando que el ácido tánico tuvo una eficiencia similar para las tres bacterias y también la lisozima sin embargo la viabilidad y la regeneración fueron mayores con el ácido tánico respondiendo mejor *Bacillus subtilis*, el índice de regeneración más bajo se obtuvo con la lisozima en las tres cepas; el comportamiento de las cepas con el ácido fórmico fue muy parecido en la eficiencia pero mejores para la viabilidad y la regeneración en el proceso de inducción y aislamiento de los protoplastos y siempre mostró la menor regeneración. Con el ácido acético no hubo grandes diferencias.

El hecho de que se logren niveles de regeneración superiores al 50% en todos los ensayos indica una baja recalcitrancia que es el fenómeno que se presenta más frecuentemente al trabajar con los protoplastos ya que los procesos de obtención de células sin paredes son muy drásticos y fundamentalmente porque se dañan no sólo las paredes sino también las membranas celulares (Tsuchikane, Fujii, y Sekimoto, 2005). Los reportes de una alta producción de

protoplastos por vía enzimática en ocasiones no superan el 30% (Shiba, 2007) y se consideran protocolos exitosos.

**Tabla 1.** Efectos del ácido tánico 1% (p: v) y la lisozima 1% (p: v), en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos            | Eficiencia (%)  |                | Viabilidad (%) |                 | Regeneración (%) |                 |
|----------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                            | Ácido tánico    | Lisozima       | Ácido tánico   | Lisozima        | Ácido tánico     | Lisozima        |
| <i>Escherichia coli</i>    | 18,25 $\pm$ 0,4 | 19,4 $\pm$ 0,2 | 56,2 $\pm$ 6   | 32,4 $\pm$ 0,4  | 73 $\pm$ 5       | 8,17 $\pm$ 0,3  |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 17,56 $\pm$ 0,3 | 22,1 $\pm$ 0,5 | 73,2 $\pm$ 8   | 26,5 $\pm$ 0,66 | 79,3 $\pm$ 6     | 10,23 $\pm$ 0,4 |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 14,19 $\pm$ 0,5 | 18,3 $\pm$ 0,4 | 65,2 $\pm$ 7   | 22,1 $\pm$ 0,5  | 80 $\pm$ 7       | 8,10 $\pm$ 0,3  |

**Tabla 2.** Efectos del ácido fórmico 1% (p: v) y la lisozima 1% (p: v), en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos            | Eficiencia (%)  |               | Viabilidad (%) |              | Regeneración (%) |             |
|----------------------------|-----------------|---------------|----------------|--------------|------------------|-------------|
|                            | Ácido Fórmico   | Lisozima      | Ácido Fórmico  | Lisozima     | Ácido Fórmico    | Lisozima    |
| <i>Escherichia coli</i>    | 15,2 $\pm$ 0,2  | 10 $\pm$ 0,01 | 60 $\pm$ 1,2   | 30 $\pm$ 0,5 | 85 $\pm$ 5       | 25 $\pm$ 04 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 11,15 $\pm$ 0,2 | 5 $\pm$ 0,9   | 80 $\pm$ 3,4   | 25 $\pm$ 1,0 | 79 $\pm$ 4       | 16 $\pm$ 07 |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 30,04 $\pm$ 0,5 | 10 $\pm$ 0,4  | 81 $\pm$ 3,4   | 17 $\pm$ 4,3 | 67 $\pm$ 2       | 5 $\pm$ 0,2 |

**Tabla 3.** Efectos del ácido acético 1% (p: v) y la lisozima 1% (p: v), en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos            | Eficiencia (%) |             | Viabilidad (%) |            | Regeneración (%) |               |
|----------------------------|----------------|-------------|----------------|------------|------------------|---------------|
|                            | Ácido Fórmico  | Lisozima    | Ácido Fórmico  | Lisozima   | Ácido Fórmico    | Lisozima      |
| <i>Escherichia coli</i>    | 28,3 $\pm$ 2   | 27 $\pm$ 2  | 56 $\pm$ 4     | 25 $\pm$ 1 | 79 $\pm$ 5       | 12 $\pm$ 0,5  |
| <i>Bacillus megaterium</i> | 52,7 $\pm$ 4   | 9 $\pm$ 0,1 | 31 $\pm$ 3     | 15 $\pm$ 1 | 74 $\pm$ 4       | 15 $\pm$ 0,7  |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 57,4 $\pm$ 3   | 10 $\pm$ 1  | 20,3 $\pm$ 2   | 40 $\pm$ 2 | 57 $\pm$ 3       | 20 $\pm$ 5,07 |

### Resultados en cianobacterias

En las tablas 4, 5, y 6, y figuras 1, 2, y 3 se observa el crecimiento de las cepas sin tratamiento líticos, en el quinto día tienen la mayor densidad celular apropiada por ser la fase logarítmica, coincide con los datos de crecimiento en días en medio BG11 reportada por otros autores para las especies estudiadas (Paczuska y Kosakowa, 2003, Baudin et al., 2006) y la frecuencia de esferoplastos y protoplastos es baja en la población (tabla 6), pero se hace el recuento para estimar la efectividad lograda por los métodos aplicados con lisozima y con ácido tánico.

La aplicación de la nueva metodología a los cultivos de las cianobacterias *Anabaena* sp, *Nodularia* sp y *Aphanizomenon* utilizando el ácido tánico indujo la formación de esferoplastos y protoplastos, en la tabla 8 se observa que la eficiencia y la viabilidad son similares, ligeramente superior para *Anabaena*, teniendo en cuenta que la composición de las paredes no es igual aunque si es susceptible al ataque de la lisozima cuya acción específica es sobre el enlace glucosídico.

La lisozima es una enzima que rompe las paredes celulares de las bacterias, lo hace hidrolizando enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  de ácido N-acetilmuránico (NAM) a N-acetilglucosamina (NAG) en un polisacárido alternante de NAM-NAG.

La lisozima ataca las paredes de las células vegetativas y produce protoplastos sin afectar a las paredes de los heterocystes los cuales se alargan linealmente (Bhattacharya y Talpasayi, 1972). Recientes observaciones de las asociaciones entre plantas con las cianobacterias *Nostoc* y *Anabaena* indican que en esas asociaciones artificiales se pierde la capa de peptidoglicano y ocasionalmente la membrana externa (Baulina *et al.*, 2000; Gorelova *et al.*, 2000) lo que sugiere que las plantas producen agentes activos que difunden a través del medio e influyen en la formación de hormogonios y la diferenciación en heterocistes con actividad nitrogenasa, en las enzimas del metabolismo para la síntesis del peptidoglicano y el balance del crecimiento de la cianobacteria (Rai y Bergman, 2002) pero el de la planta también pues su crecimiento ocurre según la teoría del crecimiento ácido (Rayle y Cleland, 1992) lo que varía el pH del microambiente en el lugar de la asociación o sea que las condiciones ácidas facilitan la extensión de las paredes y se exponen los enlaces intersillares estructurales a los agentes líticos lisozima y ácido tánico, que tienen en común los grupos carboxílicos.

**Tabla 4.** Valores promedios de la densidad celular ( $\times 10^4$  células.ml<sup>-1</sup>) de *Anabaena* PCC7120 durante el estudio de la cinética de crecimiento.

|  |      |      |      |      |      |       |      |       |
|--|------|------|------|------|------|-------|------|-------|
| Densidad celular x 10 <sup>3</sup><br>(células/ml)(3 réplicas) | 2.00 | 5.79 | 12.2 | 15.2 | 17.8 | 20.64 | 40.0 | 56.46 |
|  |      |      | 0    | 1    | 1    |       | 1    |       |
| Tiempo<br>(días)   | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5     | 6    | 7     |

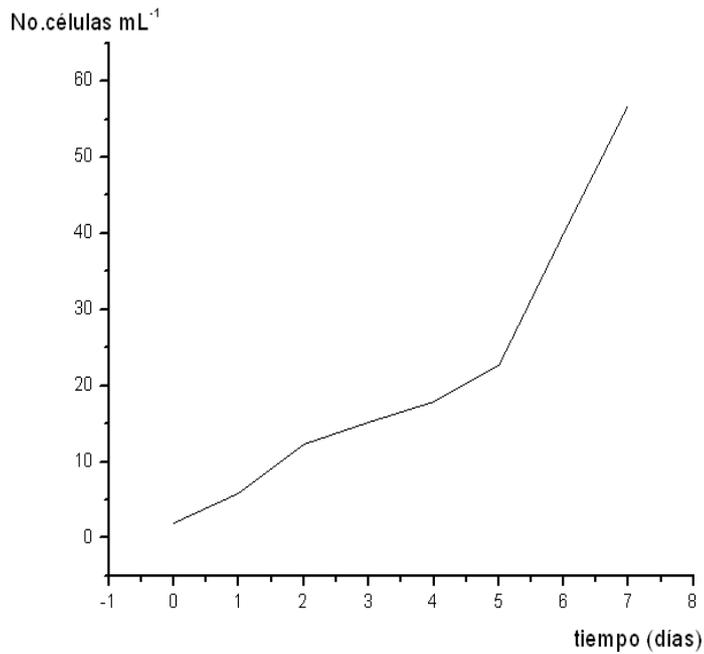


Figura 1. Curva de *Anabaena* PCC7120 durante el estudio de la cinética de crecimiento.

**Tabla 5.** Valores promedios de la densidad celular ( $\times 10^4$  células.m $l^{-1}$ ) de *Aphanizmoenon ovalysporum* durante el estudio de la cinética de crecimiento.

|  |      |      |       |       |       |       |       |       |
|--|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Densidad celular x 10 <sup>3</sup><br>(células/ml)(3 réplicas) | 2.21 | 6.54 | 13.02 | 17.20 | 20.19 | 25.16 | 39.15 | 57.82 |
| Tiempo<br>(días)   | 0    | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |

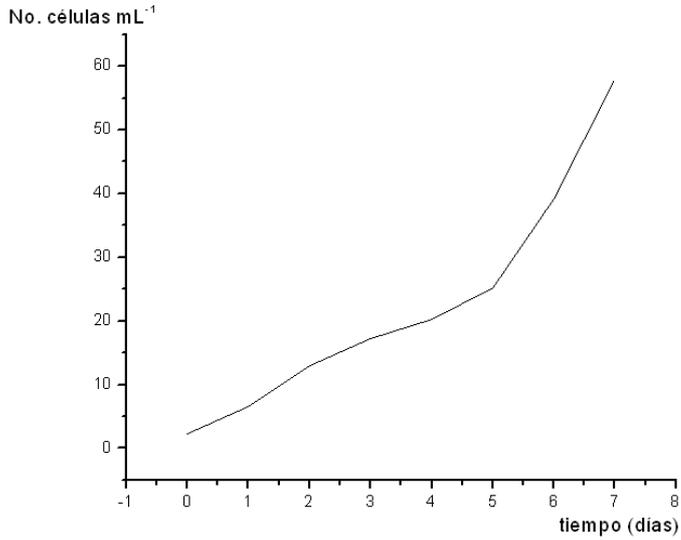
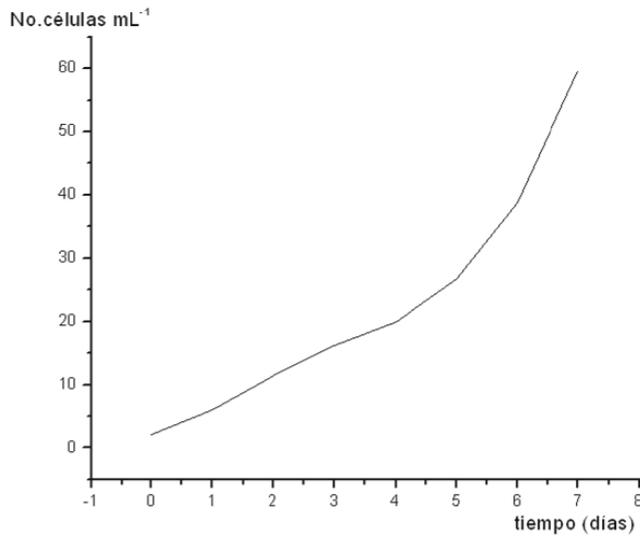


Figura 2. Curva de *Aphanizmoenon ovalysporum* durante el estudio de la cinética de crecimiento.

**Tabla 6.** Valores promedios de la densidad celular ( $\times 10^4$  células.ml<sup>-1</sup>) de *Nodularia sp* durante el estudio de la cinética de crecimiento.

|  |     |      |       |       |       |       |       |       |
|--|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Densidad celular x 10 <sup>3</sup><br>(células/ml)(3 réplicas) | 2.2 | 6.89 | 12.54 | 14.21 | 17.75 | 22.65 | 38.29 | 55.64 |
| Tiempo<br>(días)   | 0   | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |



.Figura 3. Curva de *Nodularia* sp durante el estudio de la cinética de crecimiento.

**Tabla 7.** Recuento de esferoplastos espontáneos en cianobacterias antes de la exposición a los agentes líticos para un número inicial de  $1,0 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> crecidas en fase logarítmica en medio BG11. Los datos son la media  $\pm$  DS error (n=3).

| Cianobacterias                   | Espontáneos     |
|----------------------------------|-----------------|
| <i>Anabaena</i> PCC7120          | 0,01 $\pm$ 3,0  |
| <i>Aphanizomenon ovalysporum</i> | 0,03 $\pm$ 3,0  |
| <u>Nodularia</u> sp              | 0,01 $\pm$ 0,05 |

La ocurrencia de esferoplastos espontáneos es un evento al azar en el cultivo donde algunos tricomas pueden colapsarse por causas mecánicas como choques o haberse dañado parcialmente por las manipulaciones con el instrumental empleado en las siembras, también por paredes sintetizadas deficientemente por errores genéticos en la biosíntesis de las enzimas involucradas en el crecimiento de las paredes celulares o de sus

constituyentes, teniendo en cuenta además que las poblaciones microbianas son heterogéneas y pueden expresarse mutantes (Brock,2004).

La inducción de protoplastos y esferoplastos en las cianobacterias es un método para aumentar la frecuencia del fenómeno y se realiza con la lisozima (EC 3.2.1.17) aunque las condiciones osmóticas pueden variar (Sato y Murata, 1982 Richmond,1996;Wolf,1988,Rippkar,1988;Loreto y Morales,2003).

Una vez inducidos los protoplastos y esferoplastos son purificados para la eliminación de las enzimas y son estimados en número mediante el recuento en hemacitómetros, ya sea en cámaras de Neubauer, Neubauer mejorada o cámaras de Fuchs –Rosenthal(Dixon y González,1994), los resultados se expresan en número obtenido por cada 100 calculándose los índices de eficiencia que resultaron similares para las tres cepas de cianobacterias(Tabla 5), figuras 4,5, y 6.mayor de 50% y hasta 80% en *Nodularia* sp que resultó ser más sensible a los dos agentes líticos.

**Tabla 8.** Resultados de la inducción de esferoplastos y protoplastos con lisozima 1, 5% (p: v) y ácido tánico 1, 5% (p: v). Los datos son la media  $\pm$ DS(n=3).

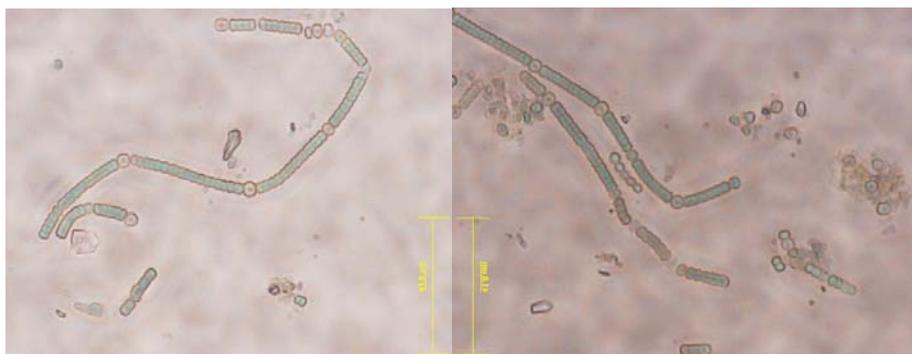
| Cianobacterias            | Eficiencia (%) |                               | Viabilidad (%) |                               |
|---------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|
|                           | Lisozima       | Ácido tánico                  | Lisozima       | Ácido tánico                  |
| Anabaena PCC 7120         | 60 $\pm$ 2,56  | <b>65<math>\pm</math>4,56</b> | 73 $\pm$ 4,25  | <b>79<math>\pm</math>4,58</b> |
| Aphanizomenon ovalysporum | 58 $\pm$ 2,13  | <b>59<math>\pm</math>2,21</b> | 68 $\pm$ 3,95  | <b>67<math>\pm</math>4,73</b> |
| Nodularia sp.             | 63 $\pm$ 4,78  | <b>60<math>\pm</math>2,48</b> | 75 $\pm$ 4,32  | <b>80<math>\pm</math>9,48</b> |

Los resultados obtenidos con la aplicación del ácido tánico y la lisozima fueron seguidos por microscopía óptica pudiendo apreciarse las transformaciones de los filamentos que a partir de las dos horas se fragmentan y luego se van separando, en esferoplastos y células libres a las 14-16 horas, en *Anabaena* PCC7120 fue posible ver los heterocistes intactos ligeramente alargados como reportan con lisozima (Bhattacharya y Talpasayi, 1972; Baulina *et al.*, 2000; Gorelova *et al.*,2000) pues estos tipos de células no son sensibles a la

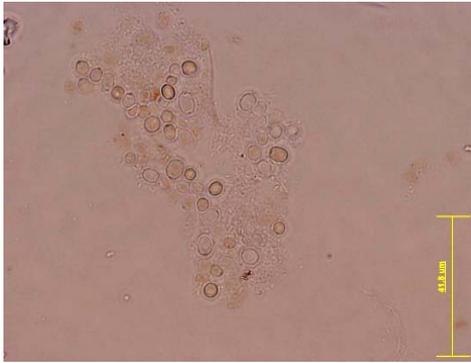
lisozima y en el estudio presente tampoco lo fueron al ácido tánico (figuras 3 a),b),c).

La composición de las paredes de los heterocistes se plantea es diferente a del resto de las células del filamento pues tienen una capa con lipopolisacáridos y azúcares poco frecuentes como ramnosa, que explicaría cómo es posible en *Anabaena* PCC7120 fijar el dinitrógeno en un ambiente con oxígeno (Huang,2005).

En la figura 4 se observan los esferoplastos fluorescentes a las 20 horas de tratados con la tinción doble con Ioduro de Propidio y Diacetato de Fluoresceína, donde están viables los que manifiestan actividad esterasa, con brillantez verde(a) y no se tiñeron con el ioduro de propidio, que es específico para ADN cuando se han dañado las membranas(Molecular Probes). En la figura 4b) se observan numerosos esferoplastos donde la mayoría no son totalmente esféricos y la coloración azul sobre ellos manifiesta restos de paredes en una muestra del mismo cultivo pero a las 48 horas coincidiendo con lo que reportan para *Anabaena* de formar la nueva pared y tender a agruparse (Wolk, C. P. 2000.; Zhou, Wolf, 2003).

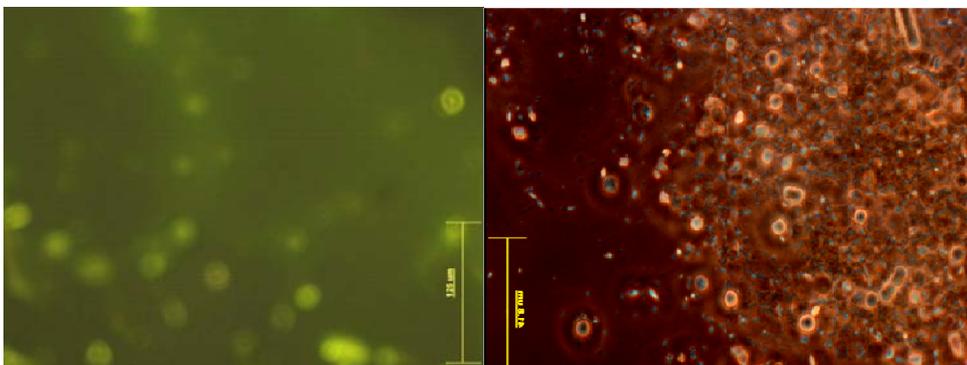


a) b)



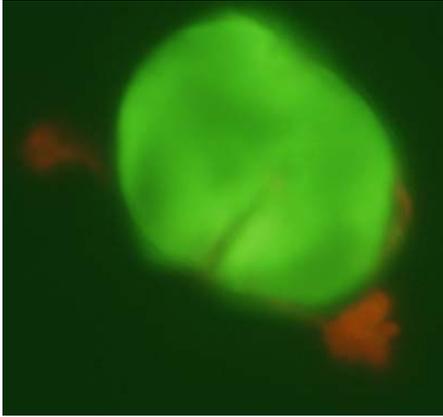
c)

Figura 3. Imágenes de *Anabaena* PCC7120 a) filamentos intactos, b) fragmentación a las 16 horas de tratados con ácido tánico, c) esferoplastos y heterocistes separados a las 9 horas. Aumento 400x, microscopía DIC Nomarsky en microscopio óptico Olympus BX 61 con cámara digital DP70.



a)

b)



c)

Figura 4. a) Esferoplastos de *Anabaena* PCC7120 mostrando actividad esterasa con FDA, por lo que son viables, no teñidos con IP. b) Numerosos esferoplastos mostrando restos de pared (color azul) con calcofluor White c) un protoplasto obtenido con la lisozima, aunque en división no es viable. Aumento 400x.

La cianobacteria *Aphanizomenon ovalisporum* también fue sensible a ácido tánico como se observa en la figura 5 a) y b), donde se obtuvieron además de esferoplastos viables, en más de un 50% la regeneración al dar positivas a las 35 horas según la tinción con Calcofluor White (Figura 6), esta especie también es tóxica y se estudia junto a *Nodularia* fundamentalmente para identificar las cianotoxinas (Ouahid, Barón, 2007).

En la figura 7 se observan en b) numerosos protoplastos autofluorescentes antes de las 20 horas, división celular a las 36 horas y actividad esterasa de los esferoplastos en c), que a los 21 días forman colonias o se agrupan para formar filamentos d).

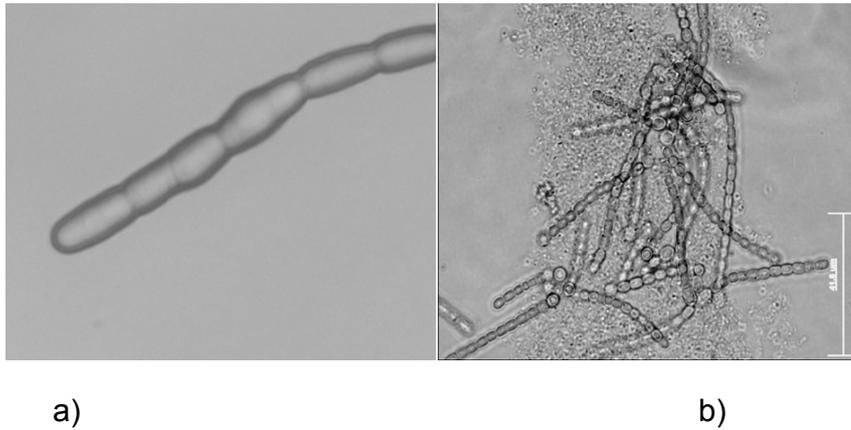


Figura 5. Imágenes de *Aphanizomenon ovalysporum*

a) Filamentos intactos, b) fragmentación de los tricomas y presencia de esferoplastos a las 16 horas de tratados con ácido tánico. Aumento 400x, microscopía DIC Nomarsky en microscopio óptico Olympus BX 61 con cámara digital DP70.



Figura 6. Regeneración de *Aphanizomenon ovalysporum*. Tinción con el fluorocromo Calcofluor White. Aumento 400x.

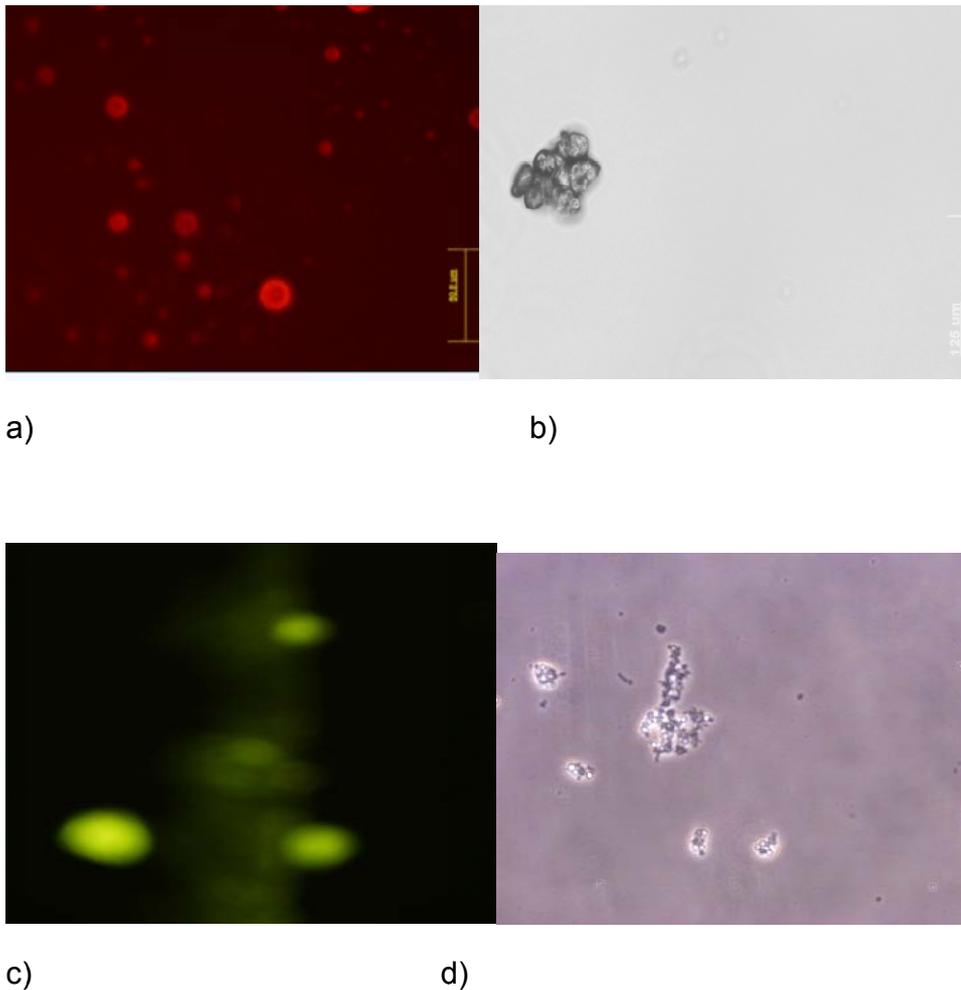


Figura 7. *Nodularia* sp. Protoplastos autofluorescentes obtenidos a las 14 horas, b) división celular a las 36 horas de tratados con ácido tánico, 2%, (p: v), microscopía de epifluorescencia y de campo claro respectivamente. Aumento 400x. En c) los esferoplastos autofluorescentes y en d) tienden ya a formar filamentos a los 21 días.

Los resultados obtenidos muestran la viabilidad de los esferoplastos y protoplastos inducidos con ácido tánico que pudieron regenerar sus paredes al crecer en los medios de cultivo post tratamiento lo cual sólo se ha realizado anteriormente en las cianobacterias *Anabaena* PCC7120, *Nodularia* sp y *Aphanizomenon ovalisporum* con la enzima lisozima.

Un procedimiento de tinción doble utilizando diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio fue empleado para la determinación de la viabilidad de los protoplastos, para ello preparaciones frescas de suspensiones de protoplastos obtenidas con métodos enzimáticos y con el no enzimático para remover las paredes fueron dispuestas en portaobjetos muy limpios y teñidas con los

fluorocromos, los esferoplastos viables son verde brillante y las protoplastos no viables se tiñen de rojo. Las observaciones fueron hechas con microscopía de campo claro, Nomarsky y epifluorescencia en microscopio Olympus BX-61 Motorizado, equipada con cubo U-M51004V2 y cámara digital DP-70 acoplada, las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Fotoshop Data Análisis, y visualizadas con monitor Hitachi según aparece en [www.olympusamerica.com](http://www.olympusamerica.com) (P. Wolk. 1990.; Cardemil, L., and C. P. Wolk. 1981; Fay, P. 1992; Herrero y Flores, 2008), la nueva metodología ofrece una alternativa para facilitar el trabajo con células sin paredes, con similar eficiencia y viabilidad.

### **Resultados y discusión en hongos filamentosos y levaduras**

Los resultados de los efectos de los ácidos orgánicos: tánico, acético y fórmico en forma comparativa con la enzima patrón lisozima están en las tablas 9, 10 y 11, referidos a los índices de eficiencia, viabilidad y regeneración en porcentaje donde se observa que la eficiencia del ácido tánico supera a la de la enzima de uso convencional con mayor eficiencia en *Aspergillus niger*, la viabilidad es similar para los cuatro microorganismos y la regeneración no se logra con la lisozima. Resultados similares se obtienen con el ácido fórmico, y con el ácido acético se obtuvieron los menores valores de los índices en general; en todos los casos los índices fueron más del doble de los obtenidos con la enzima lisozima. La regeneración de los protoplastos inducidos por los ácidos orgánicos ensayados en las células microbianas fue apreciable lográndose la regeneración de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, con índices superiores al 80%.

Los resultados obtenidos con el nuevo método dan la posibilidad de una alternativa: utilizar los ácidos tánico, fórmico y acético teniendo en cuenta que son grado reactivo, de pureza 96%-99% a diferencia de las enzimas glucosil-hidrolasas que son mezclas, por lo que se requiere de la purificación. La hidrólisis enzimática del enlace glucosídico tiene lugar mediante la acción de dos residuos presentes en el centro catalítico, uno opera como donante de protones y otro como base (Polaína, 2004). La hidrólisis química de los glicósidos procede vía rompimiento del enlace (C-1)-OR facilitada por la protonación ácida (Walsh, 1989) y se conoce que el efecto isotópico secundario es de magnitud 1,11 para la Lisozima y para los ácidos orgánicos es 1,13 (Walsh, 1989), además de que se disminuye el riesgo de inhibición por la celobiosa producto de la actividad Cx para desdoblarse en glucosa por acción de C1 (Buchanam, 1997).

Gaitis y Marakis en 1994 estudiaron el efecto del ácido tánico en el tiempo de germinación de las esporas y en la morfología micelial de *Aspergillus carbonarius* disminuyendo el mismo y modificándose las estructuras externas celulares con una considerable disminución de las quitinas y refieren haber observado la formación de protoplastos, no obstante la bibliografía sobre la inducción, el aislamiento y la regeneración de los protoplastos en levaduras y hongos filamentosos sólo cita el uso de las enzimas que en el caso de las que actúan sobre las paredes celulares de levaduras y de hongos filamentosos lo hacen por mecanismos ácido-base, tanto la lisozima como las quitinasas aunque la composición de las paredes es distinta y las enzimas son específicas, así también en las cianobacterias se utiliza sólo la lisozima, teniendo sólo en común la presencia de enlace glucosídico que al romperse desestabiliza la estructura de pared.

**Tabla 9.** Efectos del ácido tánico en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos                 | Eficiencia (%) |                                  | Viabilidad (%) |            | Regeneración (%) |          |
|---------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|------------|------------------|----------|
|                                 | Ácido          | Lisozima                         | Ácido          | Lisozima   | Ácido            | Lisozima |
|                                 | Tánico         |                                  | Tánico         |            | Tánico           |          |
| <i>Aspergillus oryzae</i>       | 93,8 $\pm$ 5   | <b>30,8 <math>\pm</math> 0,2</b> | 95,7 $\pm$ 6,7 | <b>2,1</b> | 93,1 $\pm$ 5,3   | -        |
| <i>Aspergillus niger</i>        | 95,2 $\pm$ 4   | <b>25,8 <math>\pm</math> 0,4</b> | 94,3 $\pm$ 5,4 | <b>0,6</b> | 90,3 $\pm$ 3,6   | -        |
| <i>Candida utilis</i>           | 86,4 $\pm$ 4   | <b>20,2 <math>\pm</math> 0,1</b> | 96,2 $\pm$ 5,3 | <b>1,4</b> | 90,6 $\pm$ 4,7   | -        |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 89,3 $\pm$ 3   | <b>35,0 <math>\pm</math> 0,2</b> | 95,1 $\pm$ 5,6 | <b>3,7</b> | 96,5 $\pm$ 4,5   | -        |

**Números en negrita:** resultados de la aplicación de la Lisozima.

**Tabla 10.** Efectos del ácido fórmico en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos                 | Eficiencia (%) |                                 | Viabilidad (%) |            | Regeneración (%) |          |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|------------|------------------|----------|
|                                 | Ácido          | Lisozima                        | Ácido          | Lisozima   | Ácido            | Lisozima |
|                                 | Fórmico        |                                 | Fórmico        |            | Fórmico          |          |
| <i>Aspergillus oryzae</i>       | 83,8 $\pm$ 5   | <b>30,8 <math>\pm</math>0,2</b> | 85,7 $\pm$ 6,2 | <b>2,1</b> | 83,1 $\pm$ 5,0   | -        |
| <i>Aspergillus niger</i>        | 95,2 $\pm$ 4   | <b>25,8 <math>\pm</math>0,4</b> | 94,3 $\pm$ 5,4 | <b>0,6</b> | 96,3 $\pm$ 4,6   | -        |
| <i>Candida utilis</i>           | 76,4 $\pm$ 4   | <b>20,2 <math>\pm</math>0,1</b> | 86,2 $\pm$ 5,3 | <b>1,4</b> | 87,6 $\pm$ 4,0   | -        |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 89,3 $\pm$ 3   | <b>35,1 <math>\pm</math>0,2</b> | 85,1 $\pm$ 5,6 | <b>3,7</b> | 86,5 $\pm$ 2,5   | -        |

**Números en negrita:** resultados de la aplicación de la Lisozima.

- : no se realizó por la baja viabilidad.

**Tabla 11.** Efectos del ácido acético en la liberación de protoplastos. Los datos son la media  $\pm$  DS (n=3).

| Microorganismos                 | Eficiencia (%) |                                | Viabilidad (%) |            | Regeneración (%) |          |
|---------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|------------|------------------|----------|
|                                 | Ácido          | Lisozima                       | Ácido          | Lisozima   | Ácido            | Lisozima |
|                                 | Acético        |                                | Acético        |            | Acético          |          |
| <i>Aspergillus oryzae</i>       | 73,8 $\pm$ 5,0 | <b>30,8<math>\pm</math>0,2</b> | 85,7 $\pm$ 6,7 | <b>2,1</b> | 93,1 $\pm$ 5,3   | -        |
| <i>Aspergillus niger</i>        | 75,2 $\pm$ 4,2 | <b>25,8<math>\pm</math>0,4</b> | 84,3 $\pm$ 5,4 | <b>0,6</b> | 96,3 $\pm$ 3,6   | -        |
| <i>Candida utilis</i>           | 76,4 $\pm$ 4,5 | <b>20,7<math>\pm</math>0,1</b> | 86,2 $\pm$ 5,3 | <b>1,4</b> | 97,6 $\pm$ 4,7   | -        |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 79,3 $\pm$ 3,2 | <b>35,1<math>\pm</math>0,2</b> | 85,1 $\pm$ 5,6 | <b>3,7</b> | 96,5 $\pm$ 4,5   | -        |

**Números en negrita:** resultados de la aplicación de la Lisozima.

- : no se realizó por la baja viabilidad.

\* : se trata como microorganismo

**Resultados en Microalga Scenedesmus sp.**

La Tabla 12 muestra los resultados de los tratamientos de inducción de protoplastos a las 2 y 24 horas, expresados como densidad de protoplastos viables o número de protoplastos viables mL<sup>-1</sup>. El t-Test de comparación de medias no mostró diferencias significativas entre los tratamientos a las 24 horas para un nivel de confianza del 95 % (0.05), no siendo así para los tratamientos con lisozima y ácido tánico a las 2 horas de exposición donde existen diferencias significativas para igual nivel de confianza.

**Tabla 12.** Índice de Eficiencia y Viabilidad.

| Tratamiento     | IE % V %<br>Tiempo (horas) |      |      |      |
|-----------------|----------------------------|------|------|------|
|                 | 2                          | 24   | 2    | 24   |
| Celulasa %      | 22,1                       | 35,0 | 60,0 | 70,0 |
| Ácido Tánico 2% | 22,2                       | 70,0 | 85,0 | 96,5 |
| Lisozima 1%     | 15                         | 78,0 | 90,1 | 90,0 |
| Control         | 9,3                        | 24   | -    | -    |

**Tabla 13.** Determinación de la densidad celular.

| Tratamiento     | Concentración celular (cel. MI <sup>-1</sup> x10 <sup>6</sup> ) $\bar{y} \pm DS$<br>(n=6)<br>Tiempo (horas) |             |
|-----------------|---|-------------|
|                 | 2   | 24          |
| Lisozima 1%     | *2.4±3.2  | 6.0±4.5 n/s |
| Celulasa 2%     | 0.5±0.05 n/s  | 1.1±0.5 n/s |
| Ácido Tánico 2% | *0.2±3.0 n/s  | 1.4±0.1 n/s |

\* Significativo, n/s no significativo

En cuanto a la eficiencia de inducción (IE) no existen diferencias significativas entre los tratamientos, para un nivel de confianza del 95 %, en los tiempos de exposición a los agentes disruptores de la pared ensayados, los resultados se muestran en la Tabla 12. La viabilidad (V) de los protoplastos (tabla 12) fue superior con el ácido tánico, con un 96,55a las 24 horas, seguido por la Lisozima, con la cual se logró un 90% de protoplastos viables.

Tamaño de los protoplastos.

Los resultados obtenidos de las mediciones del tamaño de los protoplastos para los tres tratamientos (media de 10 réplicas) son similares sugiriendo que la solución osmótica empleada es adecuada porque logra estabilizar los protoplastos evitando la lisis de los mismos, estos resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Tamaño celular

| Tratamiento     | Valor de pH<br>Tamaño de los protoplastos ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{Y} \pm \text{DS}$ (n=10) |                    |
|-----------------|--|--------------------|
|                 | 5  | 7                  |
| Lisozima 1%     | -  | 26.31 $\pm$ 1.1086 |
| Celulasa 2%     | -  | 26.71 $\pm$ 1.5082 |
| Ácido Tánico 2% | 25.53 $\pm$ 1.6023   | -                  |

**Tabla 15.** Resultados de la regeneración, con diferentes tratamientos en *Sclerotium sp.* En 24, 48 y 72 horas del cultivo celular simple.

| Tratamiento     | Tiempo (horas) Cel. $\text{mL}^{-1} \times 10^5$<br>$\bar{Y} \pm \text{DS}$ (n=6) |               |               |
|-----------------|---|---------------|---------------|
|                 | 24  | 48            | 72            |
| Lisozima 1%     | 86.5 $\pm$ 0.71   | 285 $\pm$ 2.0 | 307 $\pm$ 0.5 |
| Celulasa 2%     | 71 $\pm$ 1.4  | 283 $\pm$ 2.3 | 323 $\pm$ 2.1 |
| Ácido Tánico 2% | 73 $\pm$ 1.5  | 285 $\pm$ 3.3 | 323 $\pm$ 1.8 |

### Regeneración de los protoplastos

El ensayo de regeneración a partir de los protoplastos inducidos para los tres tratamientos no mostró diferencias significativas y la densidad celular (Tabla 13) tuvo valores similares para los tres experimentos y Fig. 9 se refiere a los valores medios de seis réplicas para cada ensayo durante tres días de cultivo bajo condiciones de cultivo similares a las utilizadas para el ensayo de inducción de protoplastos. En la figura 10 aparece la regeneración del cultivo en forma comparativa sin diferencias singficativas para un nivel del 95% hasta las 72 horas.

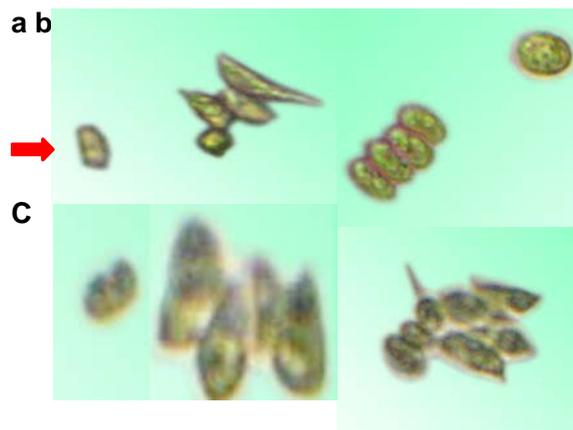


Figura9. Protoplastos de *Scenedesmus sp.* Aislados con ácido Tánico 2% (p: v). Cambios morfológicos de un cenobio, luego de 2 horas de inducción (a & b). Regeneración de la pared celular después de 16 horas (c). Nuevo cenobio formado a las 24 horas en medio de Brown (d). Aumento (400 x), imagen obtenida por microscopía óptica.

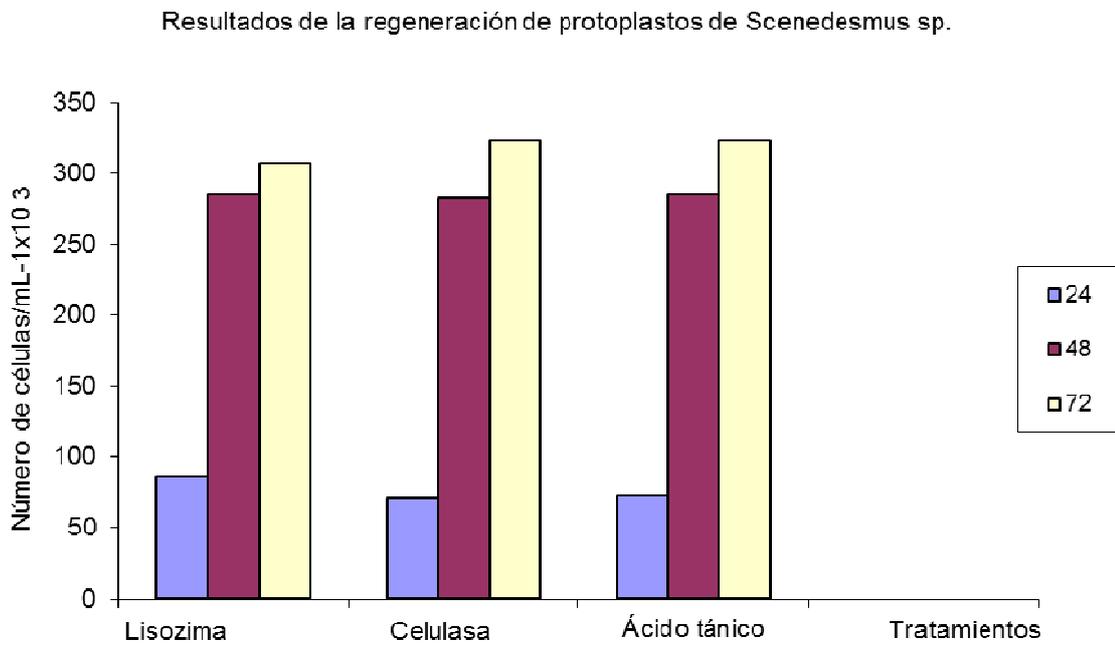


Figura 10. Comparación entre tratamientos en *Scenedesmus* sp. Para 24,48 y 72 horas.

#### Resultados del tamaño de los protoplastos

El tamaño de los protoplastos con ácido acético expresados en micras en: *E.coli* fue de 2, en *B.subtilis* de 8, 17 y en *B. megatarium* de 7,38; en *C.utilis* llegó a 34,37 y *S.cerevisiae* hasta 34, 78; para los hongos filamentosos *A.niger* 33.3 y 32,28 para *A. oryzae*. Con el ácido tánico *C.utilis* alcanzó 42,9 micras, todas las bacterias dieron valores menores de 10 y los hongos filamentosos no se diferenciaron del tratamiento con ácido acético e igual con el ácido fórmico. Aunque se hicieron al menos diez mediciones por campo para 10 campos por tratamiento, se analizó que en los estudios similares revisados y que aparecen en la bibliografía de inducción y aislamiento de protoplastos con enzimas hidrolasas no se prioriza este parámetro, muchos investigadores no miden los protoplastos microbianos, sí los vegetales, y ciertamente resultan bastante difícil las mediciones; por otro lado el simple hecho de que sean esféricos es una ventaja para el metabolismo, para el intercambio de los nutrientes, pero deben ser viables, que es lo más importante

por lo que es inadmisibles es un protocolo sin determinación de la viabilidad y de la eficiencia para hacer los ajustes y continuar los estudios de tipo celular o molecular según la aplicación en que se trabaje, entonces los parámetros fundamentales son el ajuste de las condiciones osmóticas, que se logró en presente estudio con la aplicación de sales neutras (cloruro de sodio, y de potasio) así como la adición de cloruro de calcio, las concentraciones no deben exceder el 2% (p: v) y en lo posible se pueden añadir estabilizadores del pH comerciales (HEPES, MES) muy recomendados.

Resultados de la regeneración de los protoplastos inducidos por un método no enzimático.

Los protoplastos son activos biológicamente y conservan los caracteres de las células de las que derivan (Hoon et al., 2001); muchos de los estudios sobre la idoneidad de los mismos como modelos para estudios celulares refieren que son células capaces de regenerar las paredes celulares y por tanto a las células como sus antecesoras en el caso de unicelulares, y para los pluricelulares se logran colonias, tejidos completos, organizados hasta el nivel de organismo, como ocurre en las plantas, debido a ello ocupan un lugar importante en cuanto a las respuestas celulares a los cambios en el medio circundante.

Se han hecho esfuerzos significativos para mejorar los métodos de obtención siendo la metodología específica para cada organismo, debiendo ensayarse repetidamente las soluciones seleccionadas y sus concentraciones como estabilizadores osmóticos, azúcares alcoholes como sorbitol, manitol, disacáridos como la sacarosa y sales neutras, cloruro de potasio, cloruro de sodio, así como las enzimas hidrolíticas de los polisacáridos de las paredes celulares, lisozima, EC 3.2.1.17, beta glucanasas, quitinasas, solas o en mezclas de proporciones de hasta 1 y 2% cada una de ellas, conjuntamente con las soluciones osmóticas favorables, necesitando procesos de purificación de proteínas antes de su aplicación lo que no siempre excluye la presencia de otras enzimas como proteasas que afectan la viabilidad.

Los ácidos orgánicos: tánico, fórmico y acético contribuyen a la separación de componentes de las paredes celulares, ellos son utilizados en los procesos de extracción de las paredes celulares de levaduras, bacterias y hongos filamentosos, pero no han sido utilizados anteriormente para la obtención de protoplastos viables. Algunas experiencias realizadas con ácidos orgánicos en las bacterias :*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniforme*, y en *Escherichia coli*, en algas del género *Scenedesmus*, en levaduras y hongos filamentosos (Hung, 2007; Beovides, Fernández, M, Fernández, A., Alvarez, I., Ramos, V, 1997. ) y en

plantas, en *Coffea arabica*, y otras experiencias realizadas en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma de Madrid, España, en 2005--2007 con plantas que son modelos genéticos: *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota* y también en *Solanum lycopersicum* y en cianobacterias los resultados son satisfactorios referentes a la viabilidad y regeneración.

La regeneración de los protoplastos es la prueba que confirma el éxito de los tratamientos aplicados pues aun cuando hayan sido viables, según los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de tinción para la microscopía, pueden ser por períodos de tiempos cortos debido a que son células muy estresadas privadas de un componente natural protector y se realiza como un primer paso para continuar según el objetivo de estudio, pueden disminuir en número en la población hasta por simples choques entre ellos, por lo que en todos los protocolos de regeneración se siembran en los medios de cultivos y condiciones establecidos para el buen crecimiento de los microorganismos, no es poco frecuente que se manifieste la recalcitrancia o fallos en el crecimiento del cultivo y si se logra, los porcentajes de eficiencia son bajos (Evans, 1981; Ahiua, 1982; Cheney et al., 1986; Chang y Meng, 1990; Cocking, 1993; Rai y Bergman, 2005; Tsuchikane, Fujii, y Sekimoto, 2005).

## Conclusiones

- Se brinda la posibilidad de una alternativa para la obtención de protoplastos no dependiente de enzimas hidrolíticas en microorganismos autotróficos y heterotróficos, y se establecen las metodologías en las bacterias y cianobacterias, hongos filamentosos, levaduras y microalgas estudiadas.
- El método hidrolítico con los ácidos tánico, fórmico y acético produce protoplastos viables en bacterias, levaduras, hongos filamentosos y microalgas, detectados mediante técnicas de microscopía óptica.
- Los esferoplastos inducidos con el ácido tánico a partir de las cianobacterias fueron viables, demostrado mediante técnicas de epifluorescencia.
- La regeneración de los protoplastos inducidos con ácidos orgánicos fue satisfactoria, manteniéndose la integridad celular de los microorganismos tratados.

## **Recomendaciones**

La información brindada sienta las bases para elaborar metodologías de obtención de protoplastos en otros organismos similares a los estudiados, por lo cual se recomienda realizar estudios sobre su aplicación, pues la obtención de protoplastos por métodos no enzimáticos, ofrece ventajas para los procesos de regeneración.

## Bibliografía

- Abe, S., J. Takeda, & M. Senda. 1980. Resting membrane potential and action potential of *Nitelia expansa* protoplasts. *Plant Cell Physiology* 21: 537-546.
- Abd El-Khalet, A.B., N.A. Abosereh, E.A.M. Solinam. 2006. Genetic improvement of some probiotic yeast important properties. *Research J. of Agric. Biology Science*. 2: 478-482.
- Abo-Shady S. M. Abou-El-Souod<sup>1</sup>, Abd El-Raheem, R. El-Shanshoury and Y. A. G. Mahmoud. 1992. Protoplasts from the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. [World Journal of Microbiology and Biotechnology](#) Springer Netherlands. Vol 8, No.4, 385-386.
- Ahuia, M. R., 1982. Isolation, culture, and fusion of protoplasts: Problems and Prospects. *Silvae Genetica* 31, 2-3: 66-77.
- Akyol, S., M.R., Mas, B., Comet, U., Ataskan, M.I.H. Kocar, 2003. The effect of antibiotic and probiotic infections and oxidative stress paramental acute necrotizing pancreatitis, pancreas. 26: 363-367.
- Amar, N. Rai and Birgitta Bergman (2002). *Biology and Enviroment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. 102B, No. 1, 65-68. © Royal.
- Andalis, A.A, Z. Storchova, C. Styles, T. Galiski, D. Pellman and G.R. Fink. 2004. Deffects arising from whole genome duplications in *S.cerevisiae*. *Genetics* 167: 1109-1121.
- APT, K. y P. Behrens, 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.* 35: 215-226.
- Beovides, Y. Hung, B., C. Cabrera. 1996. Ensayos de producción de celulasas en dos cepas de *Aspergillus spp.* *Revista Enlace*. ISSN 1025-0271. Vol. II, No. 9.
- Beovides, Y., B. Hung. 2000. Nueva metodología para la producción de celulasas en Cuba. *Revista CNIC, Ciencias Biológicas*, Vol. 31. No. 1.
- Bethke PC, Jones RL. 2001. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal* 25, 19-29.
- Berliner, M. 1981. Protoplasts of eukaryotic algae. *Inter. Rev. Cytol.* 73: 1- 19.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: Microbiology and Biotechnology*. Baddiley, J., Carey, N. H., Higgings, I. J. Y Potter, W. G. (eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. 293 pp.
- Bengochea, T., D., John. 1986. *Plant protoplasts* © National Centre for Biotechnology Education, 1995 Chapman and Hall. ISBN: 0412266407.

Berliner, M. 1987. Spheroplast induction in *Anabaena variabilis* Kütz and *A. azollae*. *Protoplasma*. Vol 139. No. 36-40.

Bioteconología. Disponible en: [www.labioteconología.estilo\\_co.scinax/chloro.htm](http://www.labioteconología.estilo_co.scinax/chloro.htm)

Biggins, J., (1981). Protoplast of algal cells. *Methods in Enzymology*. Vol. XXXIII, Photosynthesis. AP (Academic Press).

Blackhall, N.W., M.R. DAVEY, J.B. POWER. 1994. Isolation, Culture and Regeneration of Protoplasts. En: Dixon R.A. and González R.A. (Eds.), *Plant*

Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L.J. 1988. *Dunaliella*. En: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.), pp: 27-58. Cambridge University Press. Cambridge.

Brewster, R. Q & Mcwen, W. E. 1963. *Organic Chemistry*. Prentice Hall, Inc. Englewoodcliffs. New York. pp. 211-223.

Brown, T. E., Richardson, F. L. & Vaughn, M. L. 1967. Development of red pigmentation in *C. winneri* (Chlorophyta, Chlorococcales). *Phycologia* 6(4): 12.

Brown, T. A. 2002. *Genomes*. BIOS Scientific Publishers, New York.

Buzanello, C.V., Horii, J. 1999. Characterization of fusion products from protoplasts of yeasts and their segregants by electrophoretic karyotyping and RADP. *Revista de Microbiología* 30:71-76. ISSN0001-3714.

Buchanan, B.; W., Gruissem. R.L., Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA ISBN 0-943088-39-9.

Castenholz, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria: Oxygenic photosynthetic bacteria. *Cyanobacteria*. En: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig y J.G Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 473-583. Williams & Wilkins CO., Baltimore, U.S.A

Castenholz R.W. 1988. Culturing Methods for Cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 68-93.

Cell Walls of Algae. Disponible en: [o](#).

Chávez, M. *et al.* 1990. *Temas de Enzimología*. Universidad de La Habana. pp. 7-13.

Cox, B.S., E.A. Bevan. 1962. Aneuploidy in Yeasts. *New Phytol.*, 61:342-355.

Coking, E.C., 1989: *Plant cell and tissue cultures. A Revolution in Biotechnology*. International. By Jean L. Marx. Council of Scientific Unions. Scotpring Ltd., Musselburgh.

Chen, Y. C. and C. S. Chen. 1993. Use of fluorescent staining to monitoring the temporal pattern of cell walls resynthesis in *Ulva fasciata* (Chlorophyta: Ulvales, Ulvaceae) protoplasts. *Jpn. J. Phycol.* 41: 237-242.

De la Torre, S. 1975. Manual Básico de Microtecnia biológica. Editorial Revolucionaria. La Habana. Pp. 55-57.

Dictionary of organic compounds. 1982. 5 Edición. Vol. 1. Chapman and Hall. Pp.1045.

Dixon, R.A. and R.A., González. 1994. Plant cell culture. Oxford University. Press. P Durban, J. 2004. Production of protoplasts and characterization of chemically mutated homokaryons of *Physisporinus rivulosus* strain T241i. The 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (9ICBPPI), 10.-14.10.p. 27-39, USA.

Dzuiba, E., J. Chmeilewska. 2002. Fermentative activity of somatic hibrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehata* or *Pachysolen tannophilus*. *EJPU*, 5:1-15.

Durban, J. 2004. Production of protoplasts and characterization of chemically mutated homokaryons of *Physisporinus rivulosus* strain T241i. The 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (9ICBPPI), 10.-14.10.

Eddy, A. & Williamson, D, H. 1975. Method of insulating protoplast from yeast. *Nature* No. 183. Pp. 1101-1104.

Evans, D. *et al.* 1981. Handbook of plant cell culture. Academic Press, Inc, Vol. 1, New York. pp. 134-1.

Flores y Herrera. 2007. The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution (eds) Caister Press.

Fernández, M. Y B. Hung 2001: Regeneración de protoplastos obtenidos con ácidos orgánicos. Tesis.

Frobisher, M. 1969. Microbiología. Salvart Editores S.A. Barcelona. Pp. 68-80, 189, 252, 496.

Gaitis, F. y S. Marakis. 1994. Tannic acid effects on spore gemination time and mycelial morphology of *Aspergillus carbonarius*. *Micología Neotropical Aplicada*. Vol. 7. pp. 5-16.

Gaff, D. F.; O. Okongo. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J. Exp. Bot.* 22: 756-758.

Galbraith, D. W. 1981. Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiol. Plant.* 53: 111-116.

- Galun, E. 1981. Plant protoplasts as physiological tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 237-266.
- Gallon, J. R. 1992. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. *New Phytol.* 122:571-609.
- Haglund, K *et al.* 1992. Osmotic-adjustment in the cyanobacterium-PACF.148.PDF. Disponible en: [www.eureka.ya.com/jaleo/resisvir/](http://www.eureka.ya.com/jaleo/resisvir/)
- Hart, S. 1980. Photophosphorylation. Capacity of Stable Spheroplasts Preparations of *Anabaena*. *Plant Physiol.* 66,446-450.
- Hatakka, A. 2004. Production of protoplasts and characterization of chemically mutated homokaryons of *Physisporinus rivulosus* strain T241i. The 9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry.
- Hebuterne, X. 2003. Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr. Mrtab. Cares* 6:49-54.
- Huan, F. 2004. Parametrization of temperature- and salinity-dependent growth rates for two harmful Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia spumigena* and *Aphanizomenon flos-aquae*.", WKFDPI/ ICES Workshop on Future Directions in Modelling Physical-Biological Interactions, 7.-9.03.
- Jones, L., T. Senft. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 33(1) 77-79.
- Kaplan, A. Richmond A.E., Dubinsky Z. y Aaronson S. 1986. Algal Nutrition. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. A. Richmond (Ed). pp: 147-198.
- Kongshuang Z., Wei B., M. Hualing Mi. 2005. Dielectric spectroscopy of *Anabaena* 7120 protoplast suspensions. *Bioelectrochemistry*. [Volume 69, Issue 1](#), 49-57.
- Kopp-Hoolilanh, L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review *J. Am. Diet. Assoc.*, 101:299-341.
- Lamb C., Dixon R.A. 1997. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 251-275.
- Loreto, C., Morales, E. 2003. Productividad de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontinuos *Bol. Centro Invest. Biol.* v.37 n.1 Maracaibo. ISSN 0375-538X.
- Lehninger, A. 1988. *Bioquímica*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. pp. 117, 216, 239, 266-269, 270-277 y 662.
- López, I.M., Sohllenkamp, Ch., O. Geiger. 2003. Membrane-Lipids in Plant-Associated Bacteria. Their Biosynthesis and Possible Functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 567-579.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., J. Parker. 2004. *Biología de los microorganismos* 10 (ed). Pearson. Prentice Hall

Martins, C. V. B., J. Horii, A. P. Kleiner, 2004: Characterization of fusion products from protoplasts of yeasts and their segregates by electrophoretic karyotyping and RADP. *Rev. Microbiol.*, 30: 1-4.

Mountfort, D., Olivier Laczka, Claire Debarnot, Audrey Bonnin, Neil Pasco, Gareth Lloyd-Jones. 2006. Use of protoplasts from paired heterogenic bacterial species to detect tin contaminants: Prospects for biosensor development. *Biosens Bioelectron.* 30; 16815699.

Martínez, J. Colectivos de autores. 1986. *Microbiología general*. Universidad de la Habana. Editorial Pueblo y Educación.

Morales E., M. Rodríguez, D. García, C. Loreto y E. Marco. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencia* 27: 373-378.

Muñiz, I; Naranjo, L. 1996. Obtención de protoplastos en dos cepas de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Tesis para optar por el título de Licenciatura en Biología. Universidad de Oriente.

Mielenz J.R. 2006. Ethanol production from biomass. *Technology and commercialization status*. *Curr Opin Microbiology* 4:324-329

Neidleman. S.L. 1989. *The microbial product of biochemical*. Edit. Jean L. Marx. pp. 56.

Ohmori, M. Ikeuchi, N. Sato, P. Wolk, T. Kaneko, T. Ogawa, M. Kanehisa, S. Goto, S. Kawashima, S. Okamoto, H. Yoshimura, H. Katoh, T. Fujisawa, S. Ehira, A. Kamei, S. Yoshihara, R. Narikawa and S. Tabata. 2001 Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research* 8, 271-284.

Ohta, N. Sato, S. Kawano and T. Kuroiwa. 1994. The *trpA* gene on the plastid genome of *Cyanidium caldarium* strain RK-1. *Curr. Genet.* 25: 357-361

Ortega, C. 2006. Caracterización de respuestas de estrés oxidativo inducidas por cadmio y mercurio en plantas. Una metodología de estudio a tiempos cortos. Tesis Doctoral. UAM España, Madrid.

Pager, W. Winderick, J. 2005. Yeasts as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Scie* 26(5):265-273.

Pardo, M.M. 2004. Análisis e identificación de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular de "*Saccharomyces cerevisiae*": caracterización del gen "PST1". Disponible en <http://biblioteca.universia.net>

- Pelczar, M. 1966. Microbiología. 2<sup>th</sup> edición. Ediciones del Castillo, S.A. Madrid. pp. 121-133 y 193-211.
- Rogers, H.J & H.R. Perkins. 1968. Cell walls & membranes. Edit EPSON.
- Richmond, A. 1986 Cell Response to Environmental Factors. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. A. Richmond (Ed). pp.: 69-99.
- Rippka R (1988) Isolation and Purification of Cyanobacteria. Methods in Enzymology **167**: 3-27.
- Salton, M. 1960. Microbial cell wall. John Wiley & Sons Inc. New York. London. pp. 74-76.
- Sasson, A. 1985. Las biotecnologías: desafíos y promesas. Centro de Investigaciones biológicas. UNESCO. La Habana. pp. 191-198.
- Shelef. G y Soeder C. J. 1980. Algal biomass. Elsevier/ North Holland Biomedical press: 600 pp.
- Sato, N. and A. Wada. 1996. Disruption analysis of the gene for a cold-regulated RNA-binding protein, *rbpA1*, in *Anabaena*: Cold-induced initiation of the heterocyst differentiation pathway. *Plant Cell Physiol.* 37: 1150-1160.
- Sato, N., Ohmori, M., Ikeuchi, M., Tashiro, K., Wolk, C. P., Kaneko, T., Okada, K., Tsuzuki, M., Ehira, S., Katoh, H., Okamoto, S., Yoshimura, H., Fujisawa, T., Kamei, A., Yoshihara, S., Narikawa, R., Hamano, T., Tabata, S. and Kuhara, S. 2004 Use of segment-based microarray in the analysis of global gene expression in response to various environmental stresses in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120J. *Gen. Appl. Microbiol.* 50: 1-8.
- Seto, H., A. Tomasz. 1975. Protoplast Formation and Leakage of Intramembrane Cell Components: Induction by the Competence Activator Substance of Pneumococci. *Journal of Bacteriology.* 1975, p. 344-353 Vol. 121, No. 1. Copyright © 1975 American Society for Microbiology Printed in U.S. A.
- Saga, N., Y. Sakanishi, and T. Ogishima. 1989. Method for quick evaluation of cell viability in marine macroalgae. *Jpn. J. Phycol.* 37: 129-136.
- Sander, M., R.M. Leech. 1981. Chloroplast Protoplast of algal cells. Methods in Enzymology. Vol. XXXIII, Photosynthesis. AP Academic Press.
- Salton, M. 1960. Microbial cell wall. John Wiley & Sons Inc. New York. London. pp. 1-18.
- Sasson, A. 1985. Las biotecnologías: desafíos y promesas. Centro de Investigaciones biológicas. UNESCO. La Habana. pp. 191-198.
- Shelef. G y Soeder C. J. 1980. Algal biomass. Elsevier/ North Holland Biomedical press: 600 pp.

Spectrum, Merck. 1990. No. 1. pp. 32-33.

Schulz L., Seger B., Burchard, W. 2000. Structure of cellulose in solution. *Macromol Chem Phys* 201:2008-2002.

Soberón X & G. Montero 2004. En: Fundamentos y éxitos de la Biotecnología Moderna Capítulo VII: X. Soberón & G. Montero: Biocatálisis y Biotecnología Moderna. F. Bolívar (ed.). EL colegio Nacional. México.

Stryer, L., J. M. Berg & J. L. Tymoczko. 2003. *Bioquímica*, 5ª ed. Reverté.

Wolk, C. P., A. Ernst, and J. Elhai. 1994. Heterocyst metabolism and development, p. 769-823. *In* D. A. Bryant (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

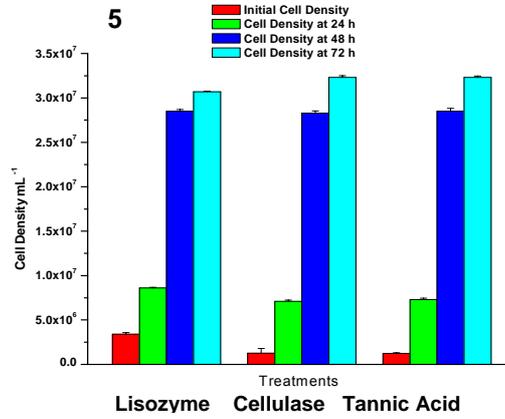
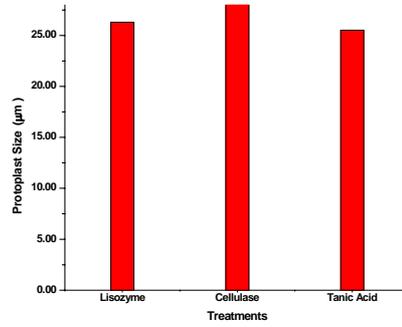
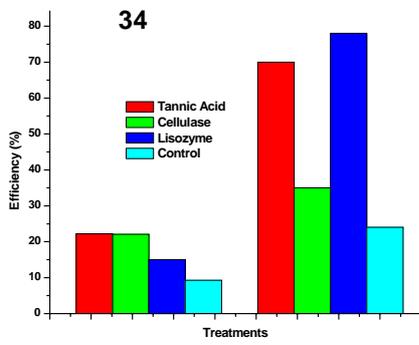
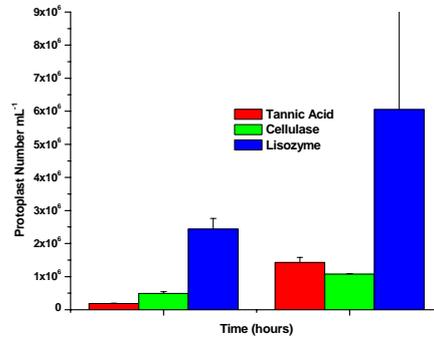
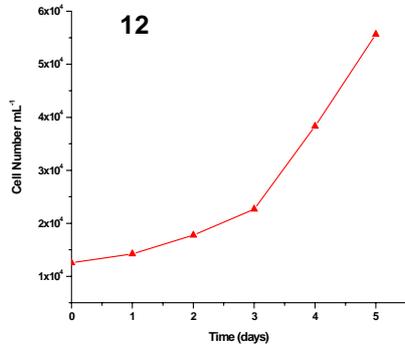
Wolk, C. P. 2000. Heterocyst formation in *Anabaena*. *In* Y. V. Brun and L. J. Shimkets (ed.), *Prokaryotic development*. ASM Press, Washington, D.C, p. 83-104.

Zeng, M., Dossier, N., Huang, Ch., Sherman, D.M., Ladish, M. 2007. Microscopic examination of changes in plant cells structure in corn storver due to hot water pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 97, No. 2, June 1.

Método no enzimático de inducción de protoplastos microbianos

Método no enzimático de inducción de protoplastos microbianos

Método no enzimático de inducción de protoplastos microbianos



Método no enzimático de inducción de protoplastos microbianos