



Vol. 12 Núm. 1
Ene.-Abr. 2025
pp 19-24

Identificación por espectroscopia Raman de celulosa en biopelículas formadas por *Mycobacterium bovis Bacilo de Calmette y Guérin*

*Identification by Raman spectroscopy of cellulose in biofilms formed by *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin**

Jorge Gómez-Haro,* Alba Adriana Vallejo-Cardona,† Mario Alberto Flores-Valdez§

RESUMEN

Introducción: las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridos entre sí y que forman una matriz extracelular que les proporciona protección contra antibióticos y el sistema inmunológico del huésped, lo que contribuye a la cronicidad y resistencia al tratamiento de enfermedades, como ocurre durante la tuberculosis. Se han reportado estructuras semejantes a las biopelículas formadas *in vitro* en pulmones de modelos animales infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, lo que podría aumentar la dificultad de tratamiento y el riesgo de recaída. Comprender estas biopelículas es crucial para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. En este trabajo se explora la producción de celulosa por parte de *Mycobacterium bovis BCG*, incluyendo una cepa que sobreexpresa el gen de celulasa *celA1*, y se analiza por espectroscopia Raman. **Objetivo:** identificar la presencia de celulosa, mediante espectroscopia Raman. **Material y métodos:** se realizaron cultivos de la cepa *Mycobacterium bovis BCG Pasteur ATCC 35734*, así como en una recombinante que sobreexpresa el gen de celulasa *celA1*, en medio Sauton sin ningún detergente, para favorecer la autoagregación y formación de biopelículas; se les extrajo material con protocolo para celulosa bacteriana y se compararon espectros Raman contra celulosa comercial. **Resultados:** aunque se observan diferencias en la resolución y ubicación de algunos picos, aquellos característicos de celulosa confirman su presencia en las cepas en estudio. **Conclusión:** mediante análisis de espectros de Raman, encontramos que *Mycobacterium bovis BCG* produce celulosa en cultivos en medio Sauton sin detergente, ya que sus espectros muestran similitudes con los de celulosa microcristalina comercial.

* Estudiante de Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). ORCID: 0000-0002-0485-317X
† Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C. Jalisco, México. ORCID: 0000-0002-4568-3787
§ Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A.C. Jalisco, México. ORCID: 0000-0002-4125-1370

Recibido: 26/05/2024.
Aceptado: 15/01/2025.

Palabras clave: celulosa, biopelícula, micobacterias, espectroscopia Raman, *Mycobacterium bovis BCG*.

ABSTRACT

Introduction: biofilms are complex communities of microorganisms that adhere to each other and form an extracellular matrix that provides protection against antibiotics and the host's immune system, contributing to the chronicity and treatment resistance of diseases, such as tuberculosis. Similar structures to *in vitro* biofilms have been found in the lungs of animal models infected with *Mycobacterium tuberculosis*, which could increase the difficulty of treatment and the risk of relapse. This study explores the production of cellulose by *Mycobacterium bovis BCG*, including a recombinant strain that overexpresses the cellulase encoding gene *celA1*, and analyze them by Raman spectroscopy. The importance of understanding the interaction between cellulose and mycobacteria in developing therapeutic strategies and biotechnological applications is highlighted. **Objective:** to identify the presence of cellulose using Raman spectroscopy. **Material and methods:** cultures of *Mycobacterium bovis BCG Pasteur ATCC 35734* strain, as well as a recombinant strain that overexpresses the cellulase-encoding gene *celA1*, were carried out in Sauton medium without detergent, to promote autoaggregation and biofilm formation;

Citar como: Gómez-Haro J, Vallejo-Cardona AA, Flores-Valdez MA. Identificación por espectroscopia Raman de celulosa en biopelículas formadas por *Mycobacterium bovis Bacilo de Calmette y Guérin*. Salud Jalisco. 2025; 12(1): 19-24. <https://dx.doi.org/10.35366/121773>

material was extracted using a bacterial cellulose protocol and Raman spectra were compared to those of commercial cellulose. **Results:** although differences are observed in the resolution and location of some peaks, those characteristic of cellulose confirm its presence in the strains under study. **Conclusion:** through Raman spectra analysis, we found that *Mycobacterium bovis* BCG produces cellulose in cultures in Sauton medium without detergent, since its spectra show similarities to those of commercial microcrystalline cellulose.

Keywords: cellulose, biofilm, mycobacteria, spectroscopy Raman, *Mycobacterium bovis* BCG.

Abreviaturas:

BCG = bacilo de Calmette-Guérin
Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*
DTT = Ditiotreitol

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas micobacterianas son comunidades microbianas complejas formadas por bacterias del género *Mycobacterium*, que incluyen especies como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Estas biopelículas están formadas por microorganismos adheridos entre sí y que forman una matriz extracelular que les proporciona protección y les permite resistir condiciones adversas, como la acción de antibióticos y, posiblemente, el sistema inmunológico del huésped.¹ El impacto de las biopelículas micobacterianas en la salud es significativo, ya que estas estructuras contribuyen a la cronicidad y la resistencia a los tratamientos de enfermedades como la tuberculosis. Algunas de las formas más resistentes de estas bacterias se encuentran dentro de las biopelículas, lo que dificulta su erradicación y prolonga la duración del tratamiento.²

Actualmente se están explorando diferentes estrategias para prevenir, reducir o eliminar las biopelículas, así como para desarrollar terapias dirigidas específicamente a las bacterias que residen dentro de estas estructuras. Esto tiene como objetivo mejorar la eficiencia de los tratamientos existentes y reducir la persistencia y la recurrencia de estas enfermedades, lo que podría tener un impacto significativo en la salud pública a nivel mundial.

Ojha y colaboradores reportaron la presencia de ácidos micólicos libres en las biopelículas en medio Sauton sin detergente, estructura en la que hubo mayor tolerancia a antibióticos comparado con células "libres" (planctónicas), lo que tiene relevancia traslacional en términos de posiblemente contribuir al tratamiento prolongado *in vivo*, aunque esto se encuentra en el terreno de la hipótesis todavía.³

La celulosa es un polisacárido estructuralmente simple pero altamente resistente que forma la

pared celular de muchas plantas y algas. Es una de las sustancias más abundantes en la naturaleza y desempeña un papel crucial en la arquitectura de las células vegetales, proporcionándole rigidez y resistencia.⁴ Por estas características, la producción de celulosa por parte de las micobacterias puede servir como componente estructural clave en estas estructuras microbianas.⁴ Se ha demostrado que la celulosa contribuye a la resistencia y la estabilidad de las biopelículas micobacterianas al proporcionar una matriz extracelular que protege a las bacterias de factores externos, como la acción de los antibióticos y el sistema inmunológico del huésped.⁴ Recientemente, Trivedi y colaboradores en medio 7H9 con ditiotreitol (DTT) demostraron que induce estrés reductor de tiol en *M. tuberculosis*, afecta su capacidad para formar biopelículas y cómo estas biopelículas pueden estar ancladas a celulosa.⁵ La diferencia en los medios y condiciones de cultivo entre los dos estudios podría explicar las observaciones diferentes. La presencia de ácidos micólicos libres en biopelículas en Ojha y la formación de biopelículas ancladas a celulosa en respuesta al estrés reductor de tiol en Trivedi resaltan la plasticidad y la capacidad de adaptación de *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes condiciones ambientales y de estrés. Entonces ¿BCG produce celulosa en medio Sauton sin la adición de DTT?

La espectroscopia Raman es una técnica poderosa para analizar la estructura molecular de materiales, incluida la celulosa.⁶ La celulosa es polímero de glucosa y su estructura es altamente ordenada, lo que la hace ideal para el análisis mediante espectroscopia Raman.⁶

En la espectroscopia Raman, se ilumina una muestra con un láser y se analiza la luz dispersada. La luz dispersada experimenta cambios en su energía debido a las vibraciones moleculares dentro de la muestra. Estos cambios se traducen en un espectro Raman que proporciona información sobre las vibraciones moleculares presentes en la muestra. En el caso de la celulosa, la espectroscopia Raman puede proporcionar información sobre la conformación molecular, la cristalinidad, la presencia de grupos funcionales y las

interacciones con otros componentes de la muestra. Por ejemplo, los picos en el espectro Raman pueden asociarse con las vibraciones de los enlaces químicos presentes en la estructura de la celulosa, como los enlaces C-C, C-O y C-H. Esta técnica es especialmente útil en la caracterización de celulosas modificadas o en la monitorización de procesos de degradación o transformación de celulosa.⁶

La compresión de la interacción entre la celulosa y las micobacterias es importante tanto desde un punto de vista biológico como médico. Este conocimiento también podría tener aplicaciones en la ingeniería de las biopelículas y la biotecnología, aprovechando las propiedades únicas de la celulosa producida por las micobacterias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó la cepa BCG Pasteur (ATCC 35734) como silvestre, de la cual se derivan las cepas BCG:*celA1* (*celA1*) y BCG:pMV361 (pMV:361), clonando el gen *celA1* bajo el promotor *hsp60* en el primer caso, y el vector vacío pMV361, en el segundo; estas cepas fueron previamente reportadas.⁷

Condiciones de crecimiento biopelícula

Las cepas BCG cultivadas como células planctónicas en medio Sauton (L-asparagina 4 g, ácido cítrico 2 g, KH₂PO₄ 0.50 g, MgSO₄ 0.50 g, citrato de amonio férrico 0.05 g, glicerol 60 ml y ZnSO₄ 1 ml en un litro de agua inyectable)⁸ con 0.05% Tween 80 hasta una DO600nm a 0.8 se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 min a 21 °C y lavado una vez con medio Sauton sin detergente 1:2 (vol/vol) y resuspendidas en Sauton sin detergente, ajustado a un punto de partida DO600nm de 0.03, fueron cultivos en frascos de cultivo celular de 75 cm², tapa ventilada, incubados horizontalmente. Los frascos se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante dos semanas, en estático.⁴

Extracción de celulosa bacteriana

A la biomasa obtenida de la biopelícula, agregar 15 ml de NaOH 0.1 M por cada 2.5 g de biomasa e incubar por un periodo de 4 horas a baño María a 80 °C. Centrifugar, dejar reposar mínimo 12 horas. Separar biomasa y sobrenadante solidificado, por de-

cantación. Agregar a la biomasa 10 ml de NaOH 0.1 M e incubar a 80 °C durante 4 horas en baño María. Centrifugar y separar. Agregar a la pasta blanca 10 ml de NaOH 0.05 M e incubar a 37 °C durante 1 hora a baño María, centrifugar, reposar 1 hora y separar la parte sólida. Realizar procedimiento dos veces más, una cada 24 horas. Se forma un gel cristalino como producto final. Lavar el producto obtenido con 1 ml agua destilada a 60 °C (son tres lavados con agua con duración de 1 hora), durante tres días seguidos para regular el pH.⁹ El proceso de secado se realiza en el equipo SpeedVac 5 horas para eliminar la mayor cantidad de agua libre que pueda interferir en su posible análisis de identificación.

Determinación de celulosa bacteriana por espectroscopia Raman

La celulosa purificada se prepara para secado adicional hasta peso constante. Las películas de celulosa bacteriana se aplican sobre un cristal de microscopio, en donde se obtuvieron espectros Raman con un tiempo de integración de 10 s con un objetivo de 40× con una longitud de onda de 785 nm y una potencia de salida de 70 mW.

RESULTADOS

Los espectros de Raman se pueden dividir en dos regiones. La región por debajo de 1,600 cm⁻¹, es más sensible a la conformación de columna vertebral de celulosa, mientras que la región por encima de 2,700 cm⁻¹ es más sensible a los enlaces de hidrógeno.¹⁰ La Figura 1 presenta los espectros Raman de celulosa para el rango espectral de 400 a 3,500 cm⁻¹. Los espectros son para celulosa microcristalina (celulosa en polvo, Sigma-Aldrich, catálogo 310697) y para celulosas de biopelícula micobacterianas (BCG, *celA1*, pMV361). Comparando estos espectros, se pudo observar un ensanchamiento y una pérdida de resolución de las celulosa micobacterianas. Otras diferencias en los espectros Raman entre las celulosas micobacterianas y microcristalina radica en la ubicación de las bandas y éstas se aprecian en la Tabla 1. También, en la región de 1,180 a 1,270 cm⁻¹ la curvatura de HCC, HCO, HCH y COH es predominante; en los picos 1,250 a 1,360 cm⁻¹ una curvatura de HCC, HCO; y en los picos 1,360 a 1,420 cm⁻¹ una flexión de COH. Existen pequeñas diferencias entre los espectros micobacterianos y de la celulosa microcristalina.

talina y se refieren principalmente a la resolución de los picos. Entre 1,500 y 2,500 cm⁻¹ no hay evidencia de bandas en los espectros Raman de celulosa. Por encima de 2,500 cm⁻¹ se producen dos bandas: una muy intensa alrededor de 2,900 cm⁻¹, que indica principalmente vibraciones de estiramiento CH. En esta región no existen diferencias claras en la celulosas micobacterianas y la celulosa microcristalina. La intensidad de los picos en el espectro Raman de *celA1* es mucho mayor que en BCG y la cepa control con el vector pMV361 (*Figura 1*), debido a un cambio en la polarizabilidad de la molécula durante la vibración.

DISCUSIÓN

Conforme a lo observado en los espectros de la *Figura 1*, así como en los picos característicos (*Tabla 1*), esto sugeriría que la celulosa microcristalina comercial contiene un mayor porcentaje de celulosa cristalina que las celulosas de micobacterianas.

Hay que señalar que la celulosa posee muchos más grados de libertad vibratoria que los observados en los espectros Raman.¹¹ En la región por debajo de 1,500 cm⁻¹ hay asignaciones particulares que resultan de movimientos internos de grupos metileno.

La región de 800 a 1,180 cm⁻¹ está denominada por movimientos de estiramiento de C-C y C-O y

algunas cantidades de flexiones de H-C-C y H-C-O.¹² Aparecen diferencias significativas en la intensidad del pico alrededor de 910 cm⁻¹, que probablemente estén relacionados con la cristalinidad de la celulosa y particularmente con el tamaño de los cristales más grandes y, por lo tanto, la celulosa más homogénea (los picos están mejor resueltos y son más estrechos) se asocian con una menor intensidad de este pico.¹¹ En la *Figura 1*, este pico para las celulosas micobacterianas es más estrecho y se desplaza a frecuencias más bajas de 896 cm⁻¹ que para la celulosa microcristalina (904 cm⁻¹). Esto indicaría una mayor cantidad de desorden en las celulosas micobacterianas.⁶

Aparecen diferencias significativas en el rango de 1,430 y 1,500 cm⁻¹, lo que indica diferencias en la flexión del HCH. La celulosa microcristalina contiene dos picos 1,455 y 1,476 cm⁻¹, mientras que las celulosas micobacterianas tienen sólo un pico ancho en 1,455 cm⁻¹. Un pico más alto a 1,481 cm⁻¹ corresponde a un mayor grado de cristalinidad.¹³ La falta de este pico para las celulosas micobacterianas podría confirmar las propiedades amorfas de este material.

En la *Tabla 1* se puede observar que algunas bandas en los espectros de las celulosas micobacterianas, por ejemplo 885, 1,256, 1,455 cm⁻¹, son similares a los obtenidos por Schenzel y colla-

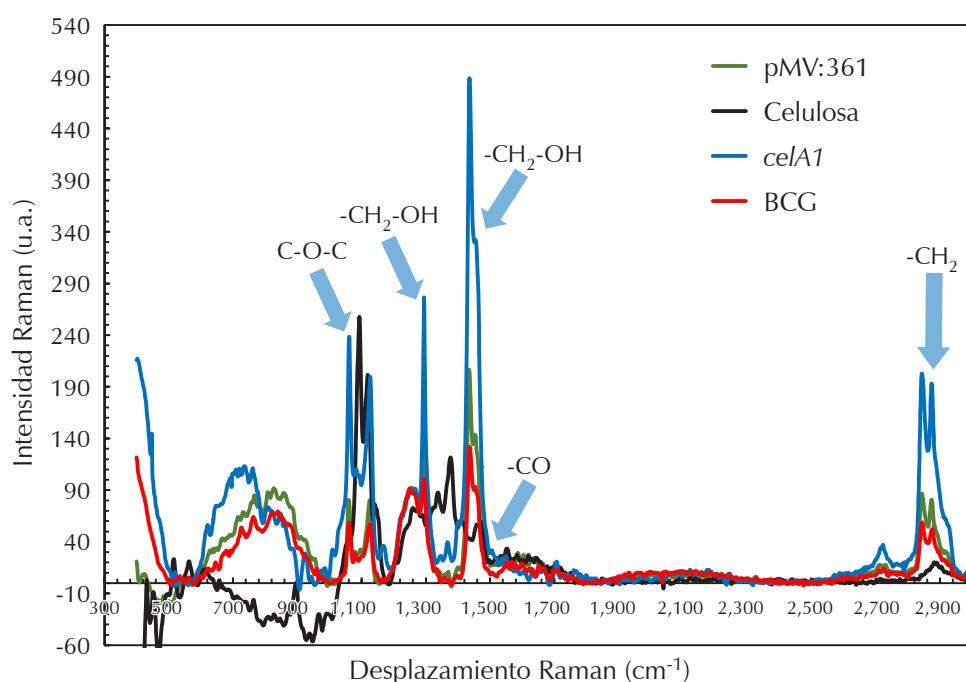


Figura 1:

Comparación de espectros Raman de extracción de celulosa en cepas de biopelícula micobacterianas BCG que sobreexpresa el gen de celulasa *celA1* o que contiene al vector vacío pMV361 en una regiónpectral de 400 a 3,000 cm⁻¹. Se utilizó como control celulosa microcristalina comercial, Sigma-Aldrich, catálogo 310697.

Tabla 1: Resumen de frecuencias Raman y asignación de bandas de celulosa cristalina (control polvo de celulosa microcristalina Sigma-Aldrich) y micobacterianas (de biopelícula BCG, celA1 y pMV:361).¹¹

Asignación de grupo funcional	Cristalina (cm ⁻¹)	Amorfa (cm ⁻¹)	Control (cm ⁻¹)	BCG (cm ⁻¹)	celA1 (cm ⁻¹)	pMV:361 (cm ⁻¹)
H-C-C, H-C-O doblamiento	904	896	896	885	890	885
C-O-C estiramiento simétrico	1,095, 1,120	1,095, 1,117	1,092, 1,117	1,098, 1,120	1,086, 1,128	1,061, 111
H-C-H (torsión), H-C-C, H-O-C, C-O-H (balanceo) doblamiento	–	1,262	1,258	1,256	1,268	1,256
H-C-H (movimiento), H-C-C, H-O-C, C-O-H (balanceo) flexión	1,293 1,337	– 1,337	1,293 1,337	1,293 1,337	1,293 1,342	1,293 1,342
H-C-H, H-C-C, H-O-C, C-O-H doblamiento	1,380	1,376	1,373	–	1,373	–
H-C-H doblamiento tijera	1,462 1,481	1,462 –	1,455 1,476	1,455 –	1,455 –	1,455 –
C-H vibración de estiramiento	2,900	2,900	2,875	2,875	2,875	2,875

boradores. Para el polimorfismo de celulosa II.^{6,14} Davis y Harris han notado que un procedimiento de extracción que utiliza NaOH 1 M da como resultado la conversión de celulosa I en celulosa II y también la producción de celulosa amorfica. En la naturaleza, sólo unas pocas cepas bacterianas podrían producir celulosa de la modificación II, por lo que las micobacterias podrían ser una de ellas o probablemente los cambios sean el resultado del proceso de preparación.¹⁵ De manera llamativa, al sobreexpresar el gen que codifica una celulasa, celA1, se modificó el espectro Raman, lo que podría indicar que el producto obtenido de esta cepa es más cristalino que el extraído de BCG y BCG con pMV361. Desde luego, la intensidad de los picos Raman puede variar por diversas razones experimentales y de la muestra, el número de desplazamiento Raman es una propiedad intrínseca de las vibraciones moleculares y permanece constante independientemente de la intensidad del pico, lo que indica que la sobreexpresión de celA1 no resulta en la pérdida de celulosa en biopelículas formadas por BCG en medio Sauton sin detergente.

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados presentados en los espectros de Raman, se puede concluir de manera sólida que las biopelículas de *M. bovis* BCG obtenidas en medio Sauton sin detergente sí contienen

celulosa y que no se requiere añadir DTT para producir este polímero. La comparación de los espectros de celulosa microcristalina con los de las celulosas de biopelícula micobacterianas revela similitudes en las bandas características de la celulosa en ambas muestras, aunque se observan diferencias en la resolución de los picos y en la ubicación de algunas bandas. La sobreexpresión del gen celA1 no modificó la presencia de bandas Raman características de celulosa, posiblemente las vibraciones causaron un cambio significativo en la polarizabilidad resultando en picos más altos en la cepa que sobreexpresa el gen codificante de celulasa, celA1.

REFERENCIAS

1. Esteban J, García-Coca M. *Mycobacterium* biofilms. *Front Microbiol*. 2018;8:2651. doi: 10.3389/fmicb.2017.02651.
2. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2018;75(2):79-88. doi: 10.24875/BMHIM.M18000012.
3. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol*. 2008;69(1):164-174. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x.
4. Avcioglu NH. Bacterial cellulose: recent progress in production and industrial applications. *World J Microbiol Biotechnol*. 2022;38(5):86. doi: 10.1007/s11274-022-03271-y.
5. Trivedi A, Mavi PS, Bhatt D, Kumar A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*. 2016;7:11392. doi: 10.1038/ncomms11392.

6. Agarwal UP. Analysis of cellulose and lignocellulose materials by Raman spectroscopy: a review of the current status. *Molecules*. 2019;24(9):1659. doi: 10.3390/molecules24091659.
7. Vaca-González A, Flores-Valdez MA, Aceves-Sánchez MJ, Camacho-Villegas TA, Pérez-Padilla NA, Burciaga-Flores M, et al. Overexpression of the celA1 gene in BCG modifies surface pellicle, glucosamine content in biofilms, and affects *in vivo* replication. *Tuberculosis (Edinb)*. 2020;125:102005. doi: 10.1016/j.tube.2020.102005.
8. Larsen MH, Biermann K, Jacobs WR Jr. Laboratory maintenance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Protoc Microbiol*. 2007;Chapter 10:Unit 10A.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc10a01s6.
9. Chopra L. Extraction of cellulosic fibers from the natural resources: A short review. *Mater Today Proc*. 2022;48:1265-1270. doi: 10.1016/j.matpr.2021.08.267.
10. Atalla RH, Wiley JH. Raman spectra of celluloses. *IPC Technical Paper Series No. 226*. Appleton (WI): The Institute of Paper Chemistry; 1987.
11. Szymańska-Chargot M, Cybulski J, Zdunek A. Sensing the structural differences in cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2011;11(6):5543-5560. doi: 10.3390/s110605543.
12. Wiley JH. Raman spectra of celluloses [Thesis]. Appleton (WI): The Institute of Paper Chemistry; 1986.
13. Schenzel K, Fischer S. Application of FT Raman spectroscopy for the characterization of cellulose. *Lenzinger Berichte*. 2004;83:64-70.
14. Schenzel K, Fischer S. NIR FT Raman spectroscopy-a rapid analytical tool for detecting the transformation of cellulose polymorphs. *Cellulose*. 2001;8(1):49-57.
15. Davies LM, Harris PJ. Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls. *Planta*. 2003;217(2):283-289.

Correspondencia:

Mario Alberto Flores-Valdez

E-mail: floresv@ciatej.mx