

Papel del alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii* en cultivo sumergido

The role of alginate in *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture

Edith Coronado¹, Enrique Galindo¹, Carlos Peña²

Resumen

El cultivo de la cepa LA21, una cepa no-mucoide de *Azotobacter vinelandii*, derivada de la cepa parental ATCC9046, reveló que el alginato no es necesario para la formación de los agregados celulares. De hecho, la cepa mutante desarrolló agregados significativamente más grandes que los generados por la cepa parental mucoide (ATCC9046), lo cual sugiere que el alginato ejerce un efecto negativo sobre el tamaño de agregación debido a sus propiedades como agente tensoactivo. Al tratar los agregados con proteasas se produjo una disminución en el diámetro equivalente de las estructuras, sugiriendo la participación de proteínas extracelulares en el proceso de agregación de la bacteria.

Palabras clave: agregación, *Azotobacter vinelandii*, alginato, cepa mutante, mucoide.

Abstract

The culture of strain LA21, a non-mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* derivative of ATCC 9046, revealed that alginate is not necessary for aggregate formation. In fact, the non-mucoid strain LA21 developed aggregates significantly larger than those of the mucoid strain (ATCC 9046), which suggests that alginate has a detrimental effect on the aggregate size, due to its properties as a surface active agent. Treating the aggregates with a protease caused a decrease in the equivalent diameter of the structures, suggesting the participation of extracellular proteins in the aggregation.

Key words: Aggregation, *Azotobacter vinelandii*, alginate, mutant strain, mucoid.

Recibido: abril 4 de 2008

Aprobado: mayo 8 de 2008

1 Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México.

2 Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morenos, México. carlosf@ibt.unam.mx

Introducción

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa, la cual se desarrolla en forma planctónica o puede formar agregados multicelulares (Peña *et al.*, 1997). Cuando las células se desarrollan en cultivos sumergidos bajo condiciones de agitación moderadas, forman agregados (Peña *et al.*, 2000; 2002). Bajo esas condiciones, *A. vinelandii* produce alginato (un exopolímero lineal formado por el ácido β -D-manurónico y su epímero, el ácido α -L-gulurónico) de alto peso molecular y, por tanto, los caldos de fermentación exhiben una alta viscosidad.

La agregación de las células es un fenómeno extendido en el mundo microbiano, encontrándose en bacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas y protistas. La agregación puede ser definida como la agrupación de células para la formación de estructuras estables bajo condiciones fisiológicas específicas. En general, la agregación involucra la participación de polímeros naturales como polisacáridos complejos y poliaminoácidos que son excretados a las superficies celulares (Burdman *et al.*, 2000a; 2000b).

En el caso de *Azospirillum brasilense*, hay evidencias claras sobre el importante papel de los polisacáridos extracelulares (exopolisacáridos, EPS y polisacáridos capsulares, CPS) en la agregación de este microorganismo (Del Gallo y Haegi, 1990; Burdman *et al.*, 2000a). En contraste, estudios previos en biopelículas con células de *Pseudomonas aeruginosa* (Nievens *et al.*, 2001; Gómez-Suárez *et al.*, 2002; Wozniak *et al.*, 2003) han revelado que el polisacárido alginato no contribuye a la formación de las biopelículas y podría tener hasta un efecto negativo en la formación de estas estructuras (Wozniak *et al.*, 2003).

En el caso de *A. vinelandii*, se han realizado algunos intentos para tratar de relacionar la participación del alginato producido por esta bacteria, particularmente su peso molecular, en el proceso de agregación celular (Peña *et al.*, 2000; 2002). Sin embargo, la influencia del alginato en

la agregación de *A. vinelandii* no se ha determinado aún. Es importante señalar que la agregación de *A. vinelandii* es un factor que pudiera influir en la transferencia de oxígeno en los cultivos y, a su vez, en la producción de alginato por este organismo (Peña *et al.*, 2000; 2002).

Con el objetivo de establecer si el alginato juega un papel relevante en la agregación de *A. vinelandii*, en el presente estudio se caracterizó la agregación de una cepa mutante no mucóide de *A. vinelandii* (LA21), la cual es incapaz de producir y excretar alginato, y su desempeño se comparó con el comportamiento de una cepa mucóide productora de alginato (ATCC 9046).

Materiales y métodos

Microorganismos

Las cepas de *A. vinelandii* usadas en el presente estudio fueron la ATCC 9046 (Peña *et al.*, 1997) y una mutante en *algK* (LA21) (Mejía-Ruíz *et al.*, 1997). El gene *algK* codifica para una proteína periplásmica que es parte del complejo de polimerización del alginato; por tanto, la mutante en *algK* produce ácidos urónicos no polimerizados y se desarrolla con un fenotipo no mucóide (Mejía-Ruíz *et al.*, 1997).

Condiciones de cultivo

Ambas cepas se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml del medio de Burk modificado, cuya composición fue previamente descrita (Peña *et al.*, 1997). El pH del medio se ajustó a 7,2 con la adición de NaOH de 1,0 M. A los cultivos con la cepa LA21 se les añadió kanamicina (0,3 μ g/ml). Los cultivos se realizaron en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Co., Modelo G 25) a 200 revoluciones por minuto y 29°C, hasta alcanzar una densidad óptica (medida a 540 nm) de 0,15 (dilución 1:50). 10 ml de este inóculo se transfirieron a matraces de 500 ml, conteniendo 90 ml del medio de Burk y se desarrollaron bajo las mismas condiciones (200 rpm y 29°C) durante 72 h.

Análisis de agregación

El análisis de agregación se realizó mediante la tinción de las células provenientes de 1 ml de caldo de cultivo con 10 μ L de azul de metileno (al 1% p/v). Las observaciones microscópicas fueron realizadas con un microscopio óptico (Nikon, modelo 104). La captura de la imagen y el análisis se realizaron de acuerdo con el método previamente descrito por Peña *et al.* (2002). Con el propósito de caracterizar el tamaño de los agregados se usó el diámetro equivalente (DE) como parámetro. Este parámetro es definido como el diámetro de un círculo perfecto, teniendo la misma área del objeto que se midió [DE = $4 \times (\text{área}/\text{perímetro})$] (Peña *et al.*, 2002). Para cada muestra se midieron 300 objetos, este número fue determinado como el de muestra mínimo requerido para tener un valor representativo. La concentración de objetos en la muestra se midió mediante una cámara de Neubauer, a partir de una muestra teñida con azul de metileno. Se realizaron tres experimentos independientes, los cuales fueron estudiados mediante un análisis de varianza (Anova). Se consideró un nivel de confianza del 95% para todas las muestras.

Tratamiento con proteasas

El efecto del tratamiento de los agregados con una proteasa fue evaluado añadiendo 5 mg/mL de papaina (E.C. 3.4.22.2, Sigma Chemicals, Co.) a muestras de 1 mL de caldo. Las muestras fueron incubadas durante 4 h y la morfología de los agregados se evaluó con el sistema de análisis de imagen descrito previamente (Peña *et al.*, 2002).

Resultados y discusión

Para establecer el grado de participación del alginato en los agregados se evaluó el comportamiento de una cepa no productora de alginato (LA21). Ésta es una mutante isogénica de la cepa silvestre ATCC9046, la cual presenta una mutación polar en el gen *algK*, mediante la cointegración de un casete de kanamicina

(interposición), produciendo un fenotipo no mucoide (ya que no produce alginato, sino ácidos urónicos no polimerizados) (Mejía-Ruíz *et al.*, 1997). Se cree que la proteína AlgK (50,9 kDa), es una de las responsables de la polimerización de los ácidos urónicos para formar el polimuronato (Mejía-Ruíz *et al.*, 1997).

Como se observa en la figura 1, la cepa LA21 desarrolló agregados, indicando que no es necesaria la producción de alginato para la formación de estas estructuras. No se observaron diferencias morfológicas claras entre los agregados formados por la cepa mucoide y la cepa no mucoide. Es importante señalar que ésta es la primera vez que tal efecto es demostrado para *A. vinelandii* cultivado en fermentación sumergida. Se evaluaron las distribuciones del tamaño de los agregados producidos por las cepas ATCC 9046 y LA21 (figura 2). La cepa LA21 desarrolló agregados con un DE promedio de $27,8 \pm 4,1 \mu\text{m}$; mientras que los agregados de la cepa ATCC9046 mostraron un DE promedio de $16,1 \pm 4,5 \mu\text{m}$. El análisis mediante la prueba de Anova demostró una diferencia significativa ($P = 0,05$) en los DE promedio de ambas poblaciones.

Las biopelículas y la agregación celular en cultivos sumergidos comparten algunas características estructurales y, por tanto, es posible comparar su comportamiento en el laboratorio. Los resultados de este trabajo coinciden con los reportes previos para la formación de biopelículas conteniendo células de *Pseudomonas aeruginosa* (Nivens *et al.*, 2001; Gómez Suárez *et al.*, 2002; Wozniak *et al.*, 2003). Estos autores encontraron que cepas no mucoides de *P. aeruginosa* fueron capaces de establecer biopelículas en un patrón similar al observado con las cepas mucoides. Similarmente, se ha sugerido que el alginato tiene un papel poco relevante en la formación de agregados de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, ya que cuando se trata este tipo de estructuras con alginasas, no se efecta significativamente la arquitectura de la biopelícula (Christensen *et al.*, 2001). En el caso de *A. vinelandii* esta es la primera vez que se reporta el

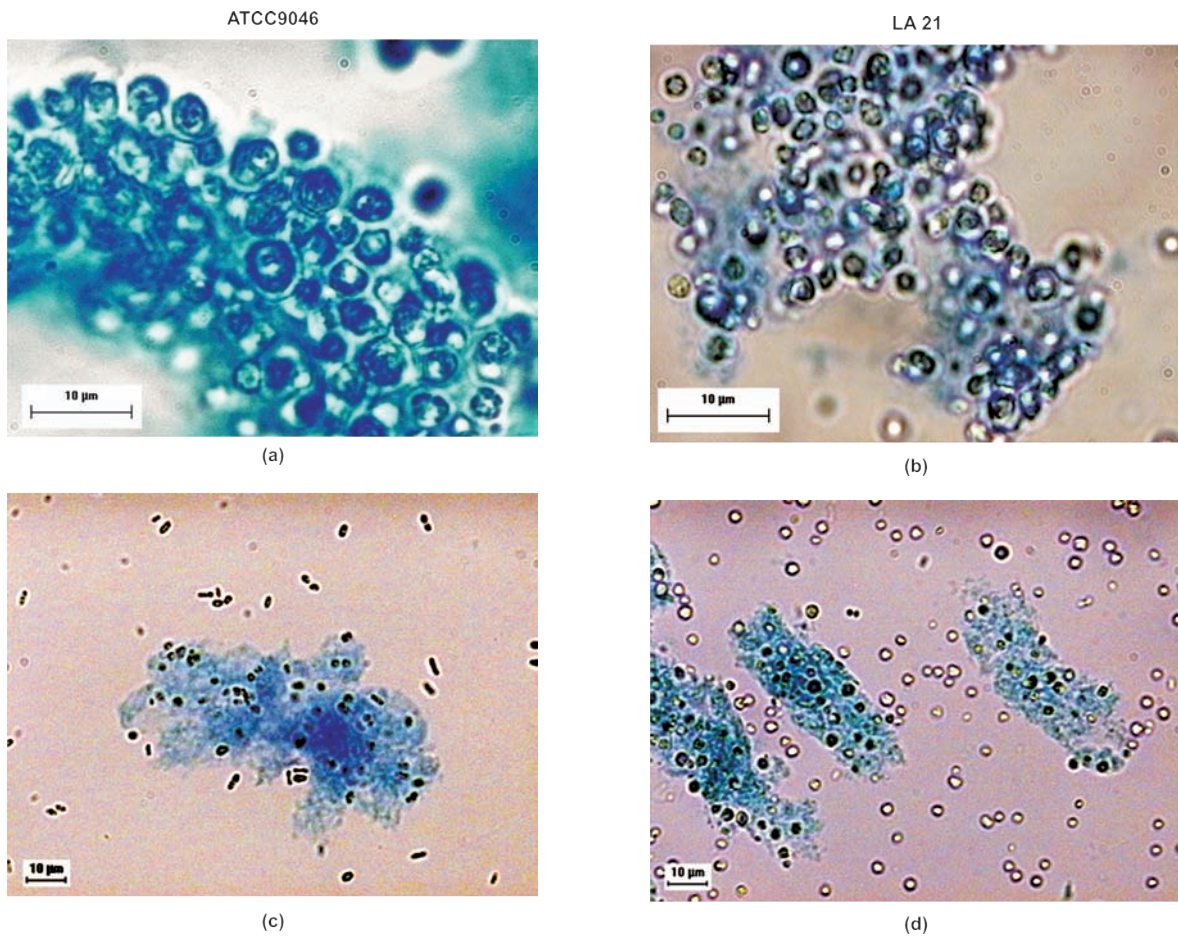


Figura 1. Microfotografías de los agregados de *A. vinelandii*. (A y C): cepa ATCC 9046; (B y D): cepa LA21.

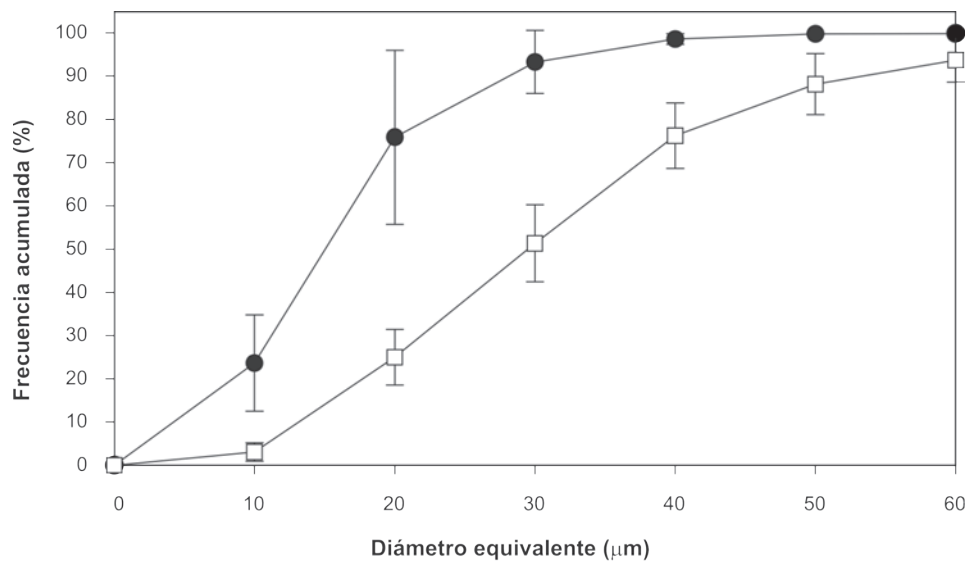


Figura 2. Distribuciones de los tamaños de los agregados de *A. vinelandii*. Cepa ATCC9046 (●) y cepa LA21 (□).

papel que tiene el alginato en la agregación de la bacteria en cultivos sumergidos.

En cuanto al mayor tamaño de los agregados de la cepa no productora de alginato, éste puede deberse a que la cepa LA21 no tiene alginato en su matriz extracelular. Bos *et al.* (1999) reportaron que la formación de agregados celulares puede estar controlada por la tensión superficial del fluido en el que son cultivados. El alginato es un tensoactivo, lo que provocaría la disminución de la tensión superficial. Esto favorecería que los agregados de la cepa productora del polisacárido se dispersen en el medio, y muestren tamaños menores. En este sentido, Gómez-Suárez *et al.* (2002) encontraron que la producción bacteriana de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), de las cuales el 80% son ácidos urónicos, disminuye la adhesión de *P. aeruginosa* a superficies. En contraste, hay casos como en *A. brasilense*, en donde hay evidencias claras sobre la correlación positiva entre la agregación de ese microorganismo y la cantidad de polisacáridos extracelulares (principalmente polisacáridos ricos en arabinosa) producidos en los cultivos sumergidos en matraces agitados (Del Gallo y Haegi, 1990; Burdman *et al.*, 2000a).

No obstante que la cepa mutante LA21 formó agregados celulares con tamaños más grandes que los que desarrolló la cepa parental (ATCC 9046), la concentración de agregados fue considerablemente más alta ($P = 0,05$) en los cultivos con la cepa ATCC 9046 ($7,3 \pm 0,4 \times 10^5$ agregados/mL) que lo observado en los cultivos con la cepa mutante LA21 ($1,5 \pm 0,6 \times 10^5$ agregados/mL).

La mutación *algK* en la cepa mutante LA21 afecta la excreción de alginato; sin embargo, esta cepa conserva aún el potencial de canalizar la fuente de carbono para la síntesis de GDP-manosa, un precursor de la síntesis lipo-oligosacáridos (LPS) (Martínez *et al.*, 1997). Estudios previos con *A. brasilense* han demostrado que una cepa mutante afectada en la producción LPS (dGDP-4-ramnosa) no formó agregados en los cultivos, no obstante que produjo exopo-

lisacáridos ricos en glucosa (Samet *et al.*, 2004). Por tanto, en el caso de *A. vinelandii*, es probable que los LPS, y no el alginato, participen en la formación de los agregados celulares.

Ya que las proteínas son componentes importantes de la estructura de los agregados de varias especies bacterianas (Kolter y O'Toole, 1998; Burdman *et al.*, 1999; 2001; Jahn *et al.*, 2000) se evaluó la participación de proteínas extracelulares en el tamaño del agregado, tratando las muestras del caldo de cultivo de cada cepa con una proteasa (papaina). Como se observa en la figura 3, se presenta una caída en el tamaño de los agregados de ambas cepas. El diámetro equivalente promedio disminuyó significativamente ($P = 0,05$), de $18,8 \pm 2,1$ a $14,9 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$ y de $26,3 \pm 6 \mu\text{m}$ a $13,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$ para la cepa ATCC9046 y LA21, respectivamente. La disminución en el tamaño del agregado cuando las células se incubaron con la papaina sugiere que proteínas extracelulares están implicadas, al menos parcialmente, en la agregación de *A. vinelandii*.

Estudios previos en células de *A. brasilense* han demostrado la participación de proteínas de superficie de la membrana en el proceso de agregación de la bacteria (Burdman *et al.*, 1999; 2001), observándose que cuando las células de *A. brasilense* se incuban con tripsina o proteínaasa K sufren una disminución en su capacidad para formar agregados (Burdman *et al.*, 1999). En el caso de *A. vinelandii* es probable que las proteínas de la membrana externa pudieran participar en la agregación.

En condiciones naturales, la formación de agregados de *A. vinelandii*—igual a lo observado para otros modelos microbianos— (Hall-Stoodley *et al.*, 2004), podría conferir a las células una protección contra elementos adversos del medio como: radiaciones de alta energía, toxicidad por metales, la exposición ácida, la deshidratación, la salinidad, la fagocitosis y a los agentes antimicrobianos. En el caso de cepas de *P. aeruginosa*, se ha postulado que la formación de biopelículas en el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística confiere a las

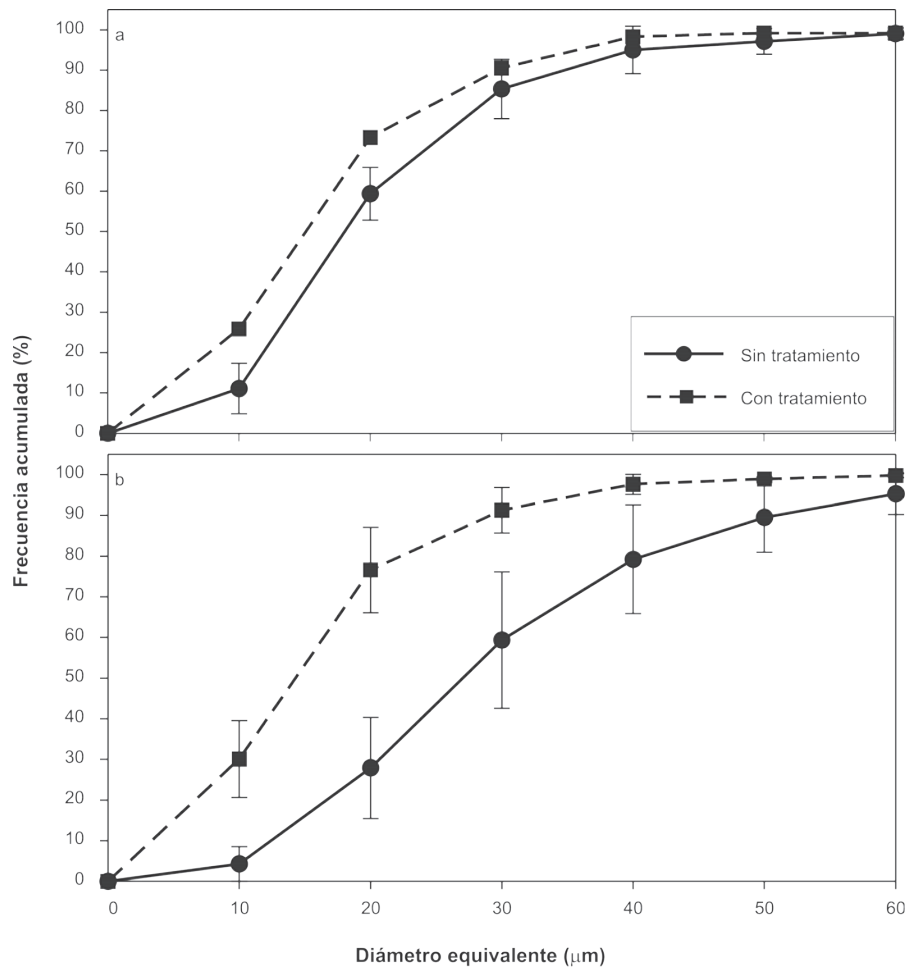


Figura 3. Distribuciones de los tamaños de los agregados de *A. vinelandii*. A. cepa ATCC9046 y B. cepa LA21, sin tratamiento (línea continua) y después de incubación con proteasa (línea discontinua).

células protección contra la acción de antibióticos usados en el tratamiento de los pacientes (Drenkard y Ausbel, 2002). Sin embargo, en cultivos sumergidos, y a nivel de laboratorio, la importancia que tiene para *A. vinelandii* la formación de agregados no está dilucidada.

Conclusiones

El alginato no es necesario para la agregación de *A. vinelandii* y, por el contrario, tiene un efecto negativo en el tamaño del agregado celular. Otros componentes, ya sea de naturaleza

proteica o LPS, pudieran estar determinando la agregación de la bacteria.

Agradecimientos

Agradecemos a la doctora Guadalupe Espín (Departamento de Microbiología Molecular del IBT-UNAM) por habernos proporcionado la cepa LA21 y por sus valiosos comentarios al manuscrito. El presente trabajo fue parcialmente financiado por el CONACyT (Proyecto 57220) y PADEP/UNAM (Proyecto IN-230407).

Referencias bibliográficas

- Bos, R.; Van der Mei, H.; Busscher, H. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions- its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 179-230.
- Burdman, S.; Jurkevitch, E.; Schwartsburd, B.; Okon, Y. 1999. Involvement of outer- membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 145: 1145-1152.
- Burdman, S.; Jurkevitch, E.; Díaz, M.; Gil-Serrano, A.; Okon, Y. 2000a. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 259-264.
- Burdman, S.; Okon, Y.; Jurkevitch, E. 2000b. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* 26 (2): 91-110.
- Burdman, S.; Dulguerova, G.; Okon, Y.; Jurkevitch, E. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 555-561.
- Christensen, B.; Ertesvåg, H.; Beyenal, H.; Lewandowski, Z. 2001. Resistance of biofilms containing alginate-producing bacteria to disintegration by an alginate degrading enzyme (AlgL). *Biofouling* 17: 203-210.
- Del Gallo, M.; Haegi, A. 1990. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 9: 155-159.
- Drenkard, E.; Ausbel, F. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743.
- Gómez-Suárez, C.; Pasma, J.; Van der Borden, A.; Wingen-der, J.; Flemming H.; Busscher, H.; Van der Mei, H. 2002. Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 148: 1161-1169.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.; Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 95-108.
- Jahn, A.; Griebe, T.; Nielsen, P. 2000. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* 14: 49-57.
- Kolter, R.; O'Toole, G. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.
- Martínez, P.; Guzmán, J.; Espín, G. 1997. A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Lett.* 19 (9): 909-912.
- Mejía-Ruiz, H.; Moreno, S.; Guzmán, J.; Nájera, R.; León, R.; Soberón-Chavez, G.; Espín, G. 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 101-106.
- Nivens, D.; Ohman, D.; Williams, J.; Franklin, M. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.* 183: 1047-1057.
- Peña, C.; Campos, N.; Galindo, E. 1997. Changes in the molecular mass distributions: broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shaken flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 510-515.
- Peña, C.; Trujillo, M.; Galindo, E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 390-398.
- Peña, C.; Reyes, C.; Larralde-Corona, P.; Corkidi, G.; Galindo, E. 2002. Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 173-177.
- Samet, E.; Castro-Sowinski, S.; Okon, Y. 2004. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 195-203.
- Wozniak, D.; Wyckoff, T.; Starkey, M.; Keyser, R.; Azadi, P.; O'Toole, A.; Parsek, M. 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PA01 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PNAS* 100: 7907-7912.