

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

---

PARTICIPACIÓN DEL ALGINATO EN LA AGREGACIÓN DE  
*Azotobacter vinelandii* EN CULTIVO SUMERGIDO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRA EN CIENCIAS PRESENTA:

I.B.Q. Edith Aimée Coronado Martínez

Tutor:

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Junio 2004

2004  
CORONADO MARTINEZ EDITH



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Edith A. Coronado Martínez

FECHA: 1 Junio 2004

FIRMA: E. Coronado

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Felipe Peña Malacara. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN-218201, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 39955-Z, así como la beca CONACYT (165492).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Felipe Peña Malacara por la dirección en la realización de este trabajo y aguantarme durísimo.

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes por aceptarme en su grupo de trabajo y por poner más dudas en mi cabeza.

Al comité tutorial por su dirección y dedicación a este trabajo.

Dr. Carlos F. Peña Malacara

Dr. Jorge Nieto Sotelo

Dr. Daniel Segura González

A los miembros del jurado por sus acertados comentarios y sugerencias.

Dr. Agustín López Munguía (Presidente)

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara (Secretario)

Dr. Francisco M. Goycoolea (Vocal)

Dr. Gabriel Corkidi Blanco (Suplente)

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara (Suplente)

A los Grupos OTR y EG, en especial a Soledad Córdova, Mauricio Trujillo y el Ing. Chiquis por escucharme.

Y porqué no, también a Ángeles, Elia, Andrés, Cuervo, Josué, Luis, Víctor, Jalisco, Nora, Gerardo-gusi, Alberto, Efraín, Gloria y Maribel por todos los jueves y viernes del amigo.

A mis papis, hermanitas y a Camilo....

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	vi
Resumen	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Biología de <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
2.2. Agregación de <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
2.2.1. Biopelículas bacterianas	5
2.2.2. Estructura de las biopelículas	8
2.2.3. Técnicas de medición de la formación de biopelículas	10
2.3. Características del alginato	12
2.3.1. Estructura y propiedades	12
2.3.2. Interacción del alginato y el calcio	13
2.3.3. Biosíntesis de alginato por <i>Azotobacter vinelandii</i>	15
2.3.4. Función biológica del alginato	18
2.3.5. Aplicaciones del alginato y fuentes de producción	19
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. Estrategia experimental	23
5. Materiales y métodos	24
5.1. Cepas bacterianas y condiciones de almacenamiento	24
5.2. Cultivo en matraces	24
5.3. Separación de fracciones	25
5.4. Cuantificación de alginato	26
5.5. Cuantificación de células	26
5.6. Determinación de la viscosidad	27

5.7. Determinación del peso molecular	27
5.8. Determinación de la relación G/M	27
5.9. Determinación de la concentración de proteína extracelular	28
5.10. Ensayo de adición de proteasa	29
5.11. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)	29
5.12. Medición de parámetros morfológicos de agregados	29
5.13. Medición del grado de agregación	30
5.14. Análisis estadístico	31
6. Resultados y Discusión	32
6.1. Metodología de análisis de imágenes	32
6.1.1. Selección de parámetros morfológicos	32
6.1.2. Representación de los datos morfológicos	35
6.1.3. Determinación del número de objetos a medir	37
6.2. Componentes involucrados en la agregación de <i>A. vinelandii</i>	40
6.3. Papel del alginato en la morfología de agregados	50
6.3.1. Características del alginato sintetizado	50
6.3.2. Influencia del alginato en la morfología de agregados	56
7. Conclusiones	63
8. Referencias bibliográficas	64
9. Anexo (Análisis estadístico)	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Células de <i>Azotobacter vinelandii</i> (cepa ATCC9046) de manera libre (a) y formando agregados (b y c). Objetivos utilizados 100x (a y c) y 40x (b).	3
Figura 2. Diagrama del desarrollo de biopelículas (Center for Biofilm Engineering, 2004).	6
Figura 3. Equipo de análisis de imágenes utilizado en el presente estudio.	11
Figura 4. Ácido manurónico (M), ácido gulurónico (G) y bloques de estos monómeros (MM y GG) de alginato (Gacesa, 1998).	12
Figura 5. Proceso de epimerización de residuos de manuronato (M) a guluronato (G) (Draget et al., 1998).	14
Figura 6. Estructura tipo ‘Caja de huevos’ de asociaciones mediadas por calcio de bloques G de moléculas adyacentes de alginato (Braccini y Pérez, 2001).	15
Figura 7. Vía biosintética del alginato y el PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i> . Entre paréntesis se muestra el gen que codifica para la correspondiente enzima.	17
Figura 8. Algas pardas de las especies <i>Ascophyllum</i> (a), <i>Laminaria</i> (b), <i>Macrocystis</i> (c) y <i>Lessonia</i> (d).	20
Figura 9. Estrategia experimental.	23
Figura 10. Diagrama de la separación de fracciones a partir del caldo de cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	26
Figura 11. Distribución muestral de los agregados de <i>Azotobacter vinelandii</i> con respecto al DE.	39
Figura 12. Distribución de agregados de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa ATCC9046, con distintos tamaños de muestra con respecto al diámetro equivalente (a) y el correspondiente valor de la mediana $\pm$ desviación estándar del DE de las muestras de distinto tamaño (b).	39
Figura 13. Células de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa ATCC9046 (a, c, e y g) y	41

cepa LA21 (b, d, f y h), de manera libre (a y b) y formando agregados (c-h). Objetivo utilizado 100x (a-d) 40x (e y f) y 20x (g y h).

- Figura 14. Comparación de distribuciones de agregados de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (●) y cepa LA21 (□). 42
- Figura 15. Cromatograma de compuestos asociados a células (a) y solubles (b) producidos por *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (línea continua) y cepa LA21 (línea punteada). 44
- Figura 16. Distribución de agregados de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (a) y cepa LA21 (b) sin tratamiento (línea continua) y al añadir una proteasa a la muestra (línea punteada). 47
- Figura 17. Imágenes de agregados de *Azotobacter vinelandii*, cepa LA21 sin tratamiento (a) y al añadir una proteasa a la muestra (b). 48
- Figura 18. Gel de acrilamida de proteínas presentes en el caldo de cultivo de las cepas ATCC9046 (primer carril) y LA21 (segundo carril) de *Azotobacter vinelandii*. M, representa estándares de peso molecular, expresado en kDa. 50
- Figura 19. Variación de la concentración celular y de alginato (a), viscosidad (b), PMP (c), IP (d) y relación G/M (e) del alginato y caldo de cultivo de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046, en respuesta a la variación del calcio en el medio de cultivo (las letras sobre los puntos representan diferencias estadísticas). 52
- Figura 20. Diagrama del comportamiento de las moléculas de alginato en respuesta a la presencia de calcio en el medio de cultivo. 55
- Figura 21. Frecuencia acumulada de agregados de *Azotobacter vinelandii* en respuesta a la variación de calcio del medio, con respecto al DE (a) y la circularidad (b). Se muestran ejemplos de barras de desviación estándar para cada una de las muestras. 57
- Figura 22. Frecuencia de agregación de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (a) y cepa LA21 (b), cultivadas con distintas concentraciones de CaSO<sub>4</sub> en el medio de cultivo. 59

Figura 23. Matraces con cultivos de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046, para la condición de cultivo de 3 (a) y 200 mg CaSO<sub>4</sub>/L (b). Las flechas indican los puntos en los cuales se observó adhesión de sólido en las paredes.

60

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Células libres (imagen 1) y agregados (imágenes 2 a 5) de <i>Azotobacter vinelandii</i> y los respectivos valores para los parámetros morfológicos evaluados. Las columnas sombreadas se refieren a los parámetros de tamaño.	33
Tabla 2. Descripción de los parámetros seleccionados para caracterizar agregados de <i>Azotobacter vinelandii</i> .	36
Tabla 3. ANOVA de las curvas de distribución de los parámetros morfológicos de los agregados de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepas ATCC9046 y cepa LA21. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO <sub>4</sub> . F <sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).	73
Tabla 4. ANOVA de las curvas de distribución de los parámetros morfológicos de los agregados de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa ATCC9046. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO <sub>4</sub> . F <sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).	75
Tabla 5. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del alginato y caldo de cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa ATCC9046. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO <sub>4</sub> . F <sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).	76
Tabla 6. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del caldo de cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa LA21. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO <sub>4</sub> . F <sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).	76
Tabla 7. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del caldo de cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> , cepa ATCC9046 y cepa LA21, en respuesta a la concentración de calcio del medio de cultivo. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: Cepa. F <sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).	77

- Tabla 8. ANOVA de la frecuencia de agregación de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 y cepa LA21, en respuesta a la concentración de calcio del medio de cultivo. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: Cepa.  $F_{\text{tab}}$  tomado de Merrington y Thompson (1943). 78
- Tabla 9. ANOVA de la variación de la concentración de ácidos urónicos en la fracción asociada a células de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 y cepa LA21, en respuesta a la concentración de calcio del medio de cultivo. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: Cepa.  $F_{\text{tab}}$  tomado de Merrington y Thompson (1943). 78

## Resumen

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria que sufre cambios en su morfología, dependiendo de las condiciones en las cuales es cultivada, variando desde células libres hasta agregados. Se ha observado que el cultivar a la bacteria en matraces, en condiciones de baja velocidad de agitación (200 rpm), favorece la presencia de agregados. En estas condiciones de cultivo se desarrollan caldos de alta viscosidad, como consecuencia de los altos pesos moleculares del alginato producido. El alginato sintetizado por la bacteria podría estar influenciando su morfología. En trabajos anteriores se ha postulado que el alginato producido (en particular su alto peso molecular) provoca la agregación de las células; sin embargo, se desconoce el grado de participación de éste y otros componentes en la formación de agregados de *Azotobacter vinelandii* y el mantenimiento de su estructura.

Mediante la utilización de una cepa de *A. vinelandii* no productora de alginato (LA21), se observó que el alginato no es requerido para la formación de agregados, ya que la cepa no mucoide forma agregados de manera similar a la cepa productora del polisacárido. Al parecer existen otros componentes, probablemente proteínas extracelulares y polisacáridos, involucrados en el proceso de agregación.

Se varió la concentración de calcio del medio de cultivo, con la finalidad de obtener un alginato con distinta composición ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  interviene en la biosíntesis del alginato (existen enzimas epimerasas dependientes del catión) y en su conformación molecular (el polisacárido forma asociaciones entre moléculas mediadas por el calcio). El objetivo fue evaluar la relación entre las características del alginato sintetizado y la morfología de los agregados. En el rango de 3 a 50 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  la proporción de restos guluronato (G) aumentó con el calcio del medio, mientras que a concentraciones superiores permaneció constante. Se obtuvo una alta viscosidad en los caldos a los cuales se añadió de 3 a 50 mg/L y una viscosidad baja al añadir concentraciones superiores del catión.

A pesar de haber obtenido diferencias en la viscosidad del caldo de cultivo, el peso molecular y composición del alginato, no se observaron variaciones en el diámetro equivalente (tamaño) ni en la circularidad (forma) de los agregados desarrollados por *A. vinelandii*. Sin embargo, la cepa ATCC9046 (productora de alginato) llegó a presentar frecuencias de agregación 5 veces mayores que las desarrolladas por la cepa LA21 aunque el diámetro equivalente de éstos agregados fue significativamente menor que el de los generados por la cepa LA21. Se propone que el alginato tiene un efecto negativo en la agregación, debido a sus propiedades surfactantes.

El alto peso molecular del alginato producido en los cultivos en los cuales se favorece la formación de agregados podría estar relacionado con la presencia de bajas velocidades de crecimiento en las células que forman parte de estas estructuras, condición que se ha observado promueve la síntesis de alginato de alto peso molecular.

## **1. Introducción**

En trabajos realizados por Peña et al. (1997; 2000; 2002a) y Reyes (2000) se ha observado que las condiciones bajo las cuales *Azotobacter vinelandii* es cultivada, influyen tanto su morfología como las características fisicoquímicas del alginato sintetizado. Esta bacteria puede crecer de manera libre o llegar a formar aglomerados celulares llamados agregados. La presencia de agregados se ve favorecida cuando *A. vinelandii* es cultivada en matraces, a baja velocidad de agitación, condiciones en las que hay poca aireación y mezclado (Peña, 1998; Peña et al., 2002a). En estos cultivos es común obtener alginatos de un alto peso molecular y como consecuencia, los caldos son altamente viscosos (Peña et al., 1997; 2002a). El alginato producido por la bacteria podría estar involucrado en la formación de los agregados.

Estudios realizados sobre la formación y estructura de biopelículas de distintas especies de *Pseudomonas* (productoras de alginato) han mostrado que el alginato tiene gran importancia en estos sistemas (Davies et al., 1993; Boyd y Chakrabarty, 1994; 1995; Hentzer et al., 2001), mientras que otros autores reportan que el alginato no contribuye significativamente a la adhesión celular en biopelículas (Christensen et al., 2001; Nivens et al., 2001; Gómez-Suárez et al., 2002; Wozniak et al., 2003).

El alginato es un copolímero constituido por residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidos por enlaces 1 $\rightarrow$ 4 (Rehm y Valla, 1997). El carbohidrato es producido inicialmente como ácido polimanurónico y posteriormente algunos residuos M

son epimerizados a G por enzimas epimerasas (AlgE1-AlgE7 y AlgG). Las enzimas AlgE son dependientes de calcio (Sabra et al., 2001; Valla et al., 2001). Adicionalmente, moléculas de alginato con un alto contenido de residuos G son capaces de formar geles en presencia de calcio. Así, la concentración de calcio influye tanto en la composición del alginato como en las asociaciones entre moléculas (Annison y Couperwhite, 1986).

Como parte de este trabajo se evaluó el grado de participación del alginato producido por *A. vinelandii* en el proceso de agregación de la bacteria, mediante el cultivo de una cepa mutante no productora de alginato.

Posteriormente se cultivó a una cepa productora de alginato y se indujo la síntesis de polisacárido con distinta composición, al variar la concentración de calcio del medio de cultivo. Esto se realizó con el objeto de determinar el efecto del peso molecular, la composición del alginato y la viscosidad de los caldos, sobre la morfología de los agregados. Se caracterizó morfológicamente a los agregados generados en las distintas condiciones de cultivo y se determinó la existencia de diferencias entre dichas muestras de agregados.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Biología de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una Eubacteria Gram-negativa, fijadora de nitrógeno. Su morfología puede variar desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les puede observar como células individuales o formando agregados irregulares (figura 1). Es una bacteria aerobia, pero puede crecer en concentraciones de oxígeno bajas. En condiciones ambientales adversas sufre un proceso de diferenciación que transforma la célula vegetativa en una forma en estado latente o quiste (Espín, 2002). En el estado latente, la célula está rodeada de una cápsula protectora que consiste de una capa delgada exterior (exina) y una capa interior más gruesa (intina), ambas ricas en proteínas, lípidos y carbohidratos (Espín, 2002). Cuando los requerimientos para el crecimiento están presentes, la célula se libera de la cápsula del quiste y entra en un estado vegetativo (Espín, 2002).

El tamaño de una célula vegetativa es aproximadamente de  $2 \times 5 \mu\text{m}$  de diámetro y éste se ha asociado con la poliploidía (posee varias copias de su cromosoma), calculándose que puede tener hasta 80 copias (Espín, 2002).

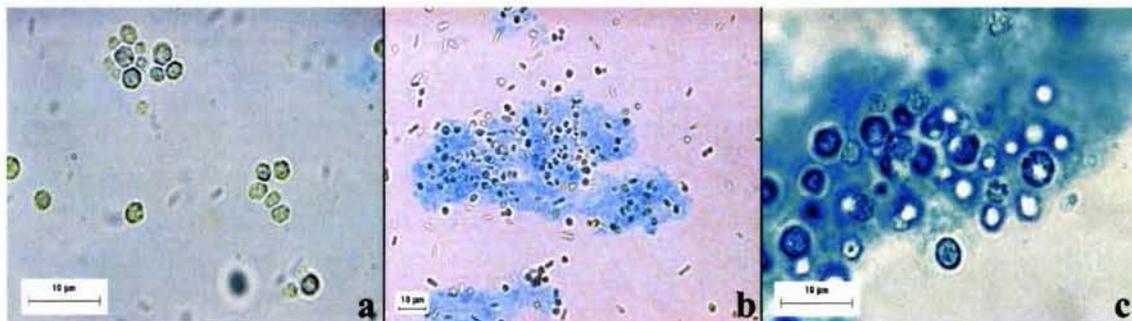


Figura 1. Células de *Azotobacter vinelandii* (cepa ATCC9046) de manera libre (a) y formando agregados (b y c). Objetivos utilizados 100x (a y c) y 40x (b).

*A. vinelandii* produce dos polímeros de interés industrial: el polisacárido extracelular alginato, y el poliéster intracelular, poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB). El PHB es un plástico biodegradable y es acumulado como un compuesto de reserva de carbono y energía. Para la exitosa formación de quistes, el PHB y alginato son esenciales (Sabra et al., 2001).

## **2.2. Agregación de *Azotobacter vinelandii***

Peña et al. (1997; 2000; 2002a) han observado que *Azotobacter vinelandii* puede crecer de manera libre o planctónica, o asociarse en pequeños grupos llamados agregados (figura 1). Peña et al. (2000) reportaron la presencia de agregados en cultivos de *A. vinelandii*, crecidos en matraces y en biorreactores. En este mismo trabajo, se observó que la formación de estas estructuras se ve favorecida en condiciones de baja aireación y baja velocidad de agitación (matraces convencionales, agitadas a 200 rpm). Monitoreando la presencia de agregados de *A. vinelandii* durante 72 h, para matraces convencionales y matraces bafleados, se encontró que en matraces convencionales el tamaño de agregados aumentó con el tiempo de cultivo, mientras que en matraces bafleados prácticamente se observaron células libres (Peña et al., 2002a).

Peña et al. (2002a) postularon que el alginato producido por *A. vinelandii* podría estar involucrado en la agregación de las células. Estos autores reportaron que el aumento en la viscosidad del medio de cultivo, debido principalmente al peso molecular del alginato producido, parece estar asociado al aumento en el diámetro equivalente de los agregados evaluados durante el cultivo (Peña et al., 2002b). Actualmente, se desconoce el grado de

participación del alginato y otros componentes en la formación de agregados y en el mantenimiento de su estructura. Autores como Davies et al. (1993), Boyd y Chakrabarty (1994; 1995) y Hentzer et al. (2001) han reportado que el alginato producido por algunas bacterias, tiene gran importancia en la formación y estructura de biopelículas celulares. Sin embargo, Christensen et al. (2001), Nivens et al. (2001) Gómez-Suárez et al. (2002) y Wozniak et al. (2003) encontraron que el alginato no contribuye a la adhesión celular ni al mantenimiento de la estructura de biopelículas.

### **2.2.1. Biopelículas bacterianas**

Las biopelículas son sistemas heterogéneos que consisten de células embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (como polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos), sales y hasta un 98 % de agua (Körstgens et al., 2001; Sutherland, 2001c; Gómez-Suárez et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2004). Esta definición incluye agregados microbianos y flóculos. En el presente trabajo, los grupos de células adheridas unas a otras pero en suspensión, serán nombrados agregados mientras que las asociaciones de células adheridas a una superficie, biopelículas. Los microorganismos que forman parte de biopelículas predominan en virtualmente todos los ecosistemas (Costerton et al., 1995; Sutherland, 2001b; Hall-Stoodley et al., 2004). Trabajos recientes han mostrado que las biopelículas no son simples ensamblados pasivos de células que se adhieren, sino sistemas biológicos dinámica y estructuralmente complejos (Hall-Stoodley et al., 2004). Aunque la función y apariencia de estas estructuras puede variar, todas se forman de la misma secuencia de eventos básica: a) unión reversible, b) unión irreversible, c) maduración-1, d) maduración-2 y e) dispersión (Gómez-Suárez et al., 2002; Sauer et al., 2002; Stoodley et al., 2002) (figura 2).

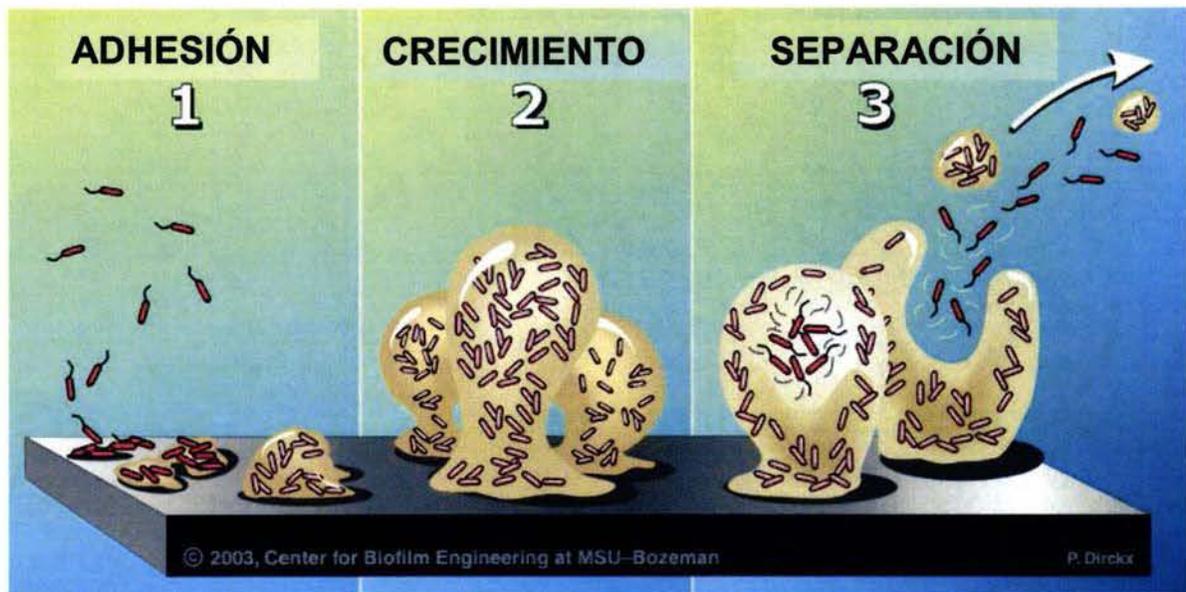


Figura 2. Diagrama del desarrollo de biopelículas (Center for Biofilm Engineering, 2004).

La formación de biopelículas puede ocurrir al menos por tres mecanismos: a) en el primero ocurre una redistribución de células adheridas por motilidad, b) el segundo consiste en división binaria de células adheridas, c) el tercer mecanismo de agregación es el reclutamiento de células del seno del líquido a la biopelícula en desarrollo (Stoodley et al., 2002).

Costerton et al. (1995) postularon que en ambientes donde hay pocos nutrientes, es una ventaja el crecer en biopelículas. Estas estructuras se caracterizan por una cooperatividad fisiológica, constituyendo una comunidad funcional coordinada que haría a la comunidad microbiana más eficiente que las células planctónicas (Costerton et al., 1995). Hall-Stoodley et al. (2004) reportaron que el crecimiento en biopelículas provee un grado de estabilidad a las bacterias que las conforman, permitiéndoles protegerse del medio ambiente (contra los rayos U.V., la toxicidad por metales, la exposición ácida, la deshidratación, la salinidad, la fagocitosis y a los agentes antimicrobianos). La producción

de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) por las bacterias que se encuentran dentro de las biopelículas participan en la unión inicial de la bacteria a superficies u otras células, en la formación y mantenimiento de la estructura de la biopelícula, en el aumento de la resistencia a estrés ambiental y en la nutrición (Körstgens et al., 2001; Sutherland, 2001c; Gómez-Suárez et al., 2002; Stoodley et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2004).

Existen tres mecanismos propuestos para explicar el aumento en la resistencia en bacterias dentro de biopelículas. El primero es la barrera difusional proporcionada por la matriz viscosa. Se ha postulado que biopelículas rodeadas de exopolisacáridos son más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos (Drenkard y Ausbel, 2002). El segundo involucra el estado fisiológico de las bacterias, es decir, la creación de fases estacionarias, limitadas en nutrientes o latentes dentro de las biopelículas. Microorganismos con velocidades de crecimiento menores parecen tener una susceptibilidad menor que las células libres (Huang et al., 1998). Un tercer mecanismo podría ser la existencia de subpoblaciones con fenotipos resistentes (a antibióticos por ejemplo) dentro de las estructuras (Huang et al., 1998; Hall-Stoodley et al., 2004).

La formación de agregados celulares podría disminuir la eficiencia de transferencia de nutrientes y oxígeno o deteriorar materiales de cultivo (de Boer et al., 1993; Huang et al., 1998; Peña et al., 2000; 2002a), por lo que éste estudio está encaminado a entender las implicaciones del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en el proceso de agregación celular.

### 2.2.2. Estructura de las biopelículas

La estructura de las biopelículas está influenciada por factores biológicos como la motilidad, la velocidad de crecimiento, la señalización celular, la producción de SPE y factores físicos del ambiente (Sutherland, 2001c). Como un ejemplo, Stoodley et al. (2002) observaron que las biopelículas de archea y bacterias comúnmente son filamentosas, en ambientes con flujos turbulentos, como los drenajes. En flujos laminares, las biopelículas tienden a formar estructuras con forma de champiñón (Hall-Stoodley et al., 2004). También se ha observado que los cambios en las condiciones nutricionales modifican la estructura de las biopelículas (Hall-Stoodley et al., 2004). De manera similar a lo observado por Peña et al. (1997; 2000; 2002a), Schalkwyk et al. (2003) reportaron que condiciones de baja intensidad de mezclado favorecen la agregación de *Propionibacterium jensenii*.

Stoodley et al. (2002) encontraron que las SPE determinan la fuerza de cohesión de las biopelículas. De la misma manera, Körstgens et al. (2001), Sutherland (2001c), Gómez-Suárez et al. (2002) y Sobeck y Higgins (2002) han observado que las SPE juegan un papel importante en la determinación de las propiedades físicas de las biopelículas.

Existen actualmente numerosos estudios donde se han evaluado los componentes involucrados en la formación de biopelículas de distintos organismos y la importancia de dichos componentes. Körstgens et al. (2001) determinaron que el alginato producido por *Pseudomonas aeruginosa* es el principal componente de las SPE en el agregado formado. Jahn et al. (2000) reportaron que en biopelículas de *Pseudomonas putida*, las proteínas llegan a ocupar hasta un 75 % del total de SPE. El levano, polisacárido que produce *Bacillus polymyxa*, es esencial para su adhesión a la rizósfera de la planta. Por su parte, el

galactoglucano producido por *Zoogloea ramigera* interviene en la formación de agregados (Sutherland, 2001c). El ácido colánico producido por *Escherichia coli* es esencial para el desarrollo de la estructura de biopelículas (Danese et al., 2000). Burdman et al. (1998; 1999; 2000; 2001) reportaron la importancia de los exopolisacáridos y las proteínas de membrana externa producidos por *Azospirillum brasilense* en el proceso de agregación. Las SPE ricas en glucosa y galactosa producidos por *Vibrio cholerae* O1E1 Tor son requeridas para el desarrollo de la estructura compleja de sus biopelículas (Yildiz et al., 2001). Schalkwyk et al. (2003) reportan la participación de carbohidratos complejos en la formación de agregados por la bacteria *Propionibacterium jensenii*. Así mismo, el DNA extracelular producido por *P. aeruginosa* parece ser esencial para la formación de biopelículas (Whitchurch et al., 2002).

Autores como Allison y Sutherland (1987), Boyd y Chakrabarty (1994; 1995), Burdman et al. (1998; 2000), Danese et al. (2000), Hentzer et al. (2001) y Schalkwyk et al. (2003) han enfatizado la participación de los exopolisacáridos en la formación de biopelículas; sin embargo, otros autores los consideran un factor que disminuye la adhesión (Pringle et al., 1983; Williams y Fletcher, 1996; Gómez-Suárez et al., 2002; Béchet y Blondeau, 2003; Wozniak et al., 2003). Los polisacáridos pueden interactuar con ellos mismos o con moléculas similares para producir geles. También interactúan con proteínas y glicoproteínas, ya sea en solución o estando unidas a la superficie de otras células (Sutherland, 2001b). De la misma manera existen estudios que reportan la participación de distintos tipos de proteínas producidos por bacterias en la formación de agregados y su adhesión (Burdman et al., 1999; 2001; Jahn et al., 2000; Sauer et al., 2002).

### **2.2.3. Técnicas de medición de la formación de biopelículas**

Millsap et al. (1998) realizaron una clasificación de distintos métodos empleados para estudiar la agregación. Estos métodos incluyen evaluaciones macroscópicas, microscópicas, turbidimétricas y radioactivas. Los métodos macroscópicos se basan en mezclar muestras microbianas en un tubo de ensayo, agitando para acelerar la congregación y evaluando visualmente en una escala relativa el grado de agregación. Estos métodos son considerados semicuantitativos. Los métodos microscópicos tienen la ventaja de que los microorganismos pueden ser vistos directamente. Los métodos espectrofotométricos miden la agregación como una reducción en la absorbancia de luz en un espectrofotómetro. Estos métodos son simples, pueden ser cuantitativos y han sido utilizados por numerosos autores (Burdman et al., 1998; Bos et al., 1999; Biggs et al., 2001; Wozniak et al., 2003). Las evaluaciones radioactivas permiten cuantificar la agregación; sin embargo, el uso de isótopos radiactivos requiere condiciones de manejo y procedimientos especiales, que conllevan riesgos para el usuario (Millsap et al., 1998)

Bos et al. (1999) reportaron la evaluación y cuantificación de la adhesión microbiana mediante un contador Coulter. Gómez-Suárez et al. (2002) utilizaron una cámara de flujo de placas paralelas acoplado a un sistema de análisis de imágenes. Por su parte, O'Toole y Kolter (1998) desarrollaron un método para la cuantificación de la formación de biopelículas bacterianas, conocido como el método O'Toole y Kolter, en el cual las células son cultivadas sin agitar, en placas multipozos de PVC. Posteriormente, las placas son lavadas abundantemente para remover células no adheridas y teñidas con cristal violeta. Este procedimiento de tinción permite la visualización de células unidas a las superficies.

Existen un gran número de trabajos enfocados al análisis de la morfología, principalmente de levaduras y hongos filamentosos y en menor grado de bacterias (Thomas, 1992; de Boer et al., 1993; Vicente et al., 1996; Azeredo et al., 1997; O'Shea y Walsh, 2000; Bloem et al., 1995; Pazouki y Panda, 2000; Christensen et al., 2001; Mas y Ghommidh, 2001; Li y Yuan, 2002). En éstos se han utilizado sistemas de análisis de imágenes acoplados a un microscopio, los cuales permiten obtener la información de una imagen mediante la utilización de una computadora. Wilkinson y Schut (1998) presentan una recopilación de los aspectos más importantes del análisis de imágenes, así como ejemplos prácticos de su utilización en morfometría de hongos, levaduras y bacterias.

En el presente trabajo se realizó la medición de la agregación de *Azotobacter vinelandii* mediante un sistema de análisis de imágenes (figura 3), previamente reportado por Peña et al. (2002a). Con este sistema fue posible obtener datos cuantitativos de imágenes, tales como tamaño y forma de los objetos.

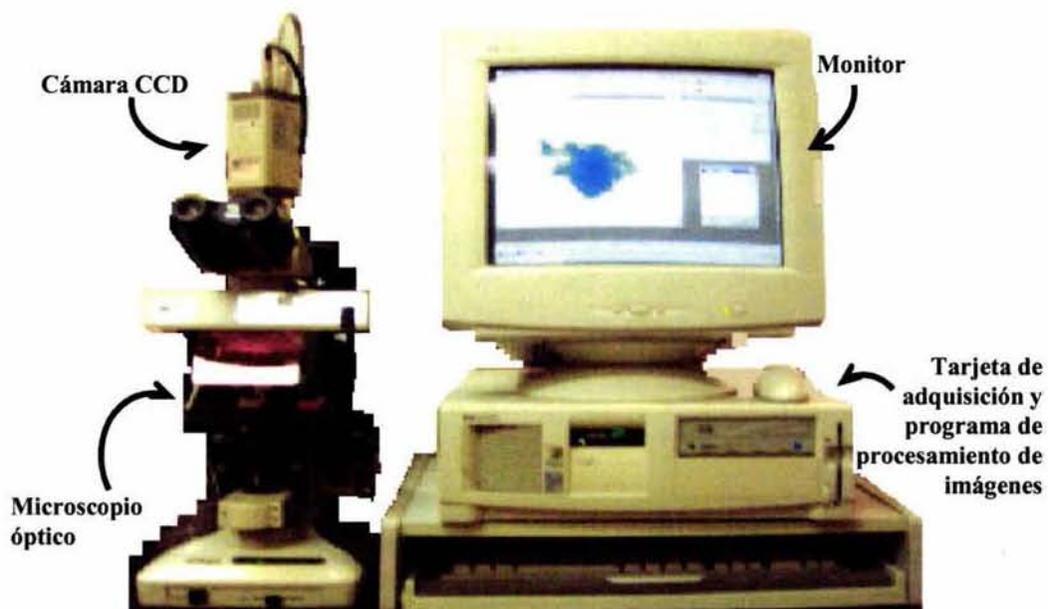


Figura 3. Equipo de análisis de imágenes utilizado en el presente estudio.

## 2.3. Características del alginato

### 2.3.1. Estructura y propiedades

El alginato es un polisacárido de cadena lineal, compuesto de los ácidos manurónico y su epímero C-5  $\alpha$ -L-gulurónico (figura 4). Estos monómeros pueden estar distribuidos en estructuras de bloques homopoliméricas o heteropoliméricas (Gacesa, 1998). Debido a que un bloque M está formado de grupos ecuatoriales en el carbono 1 y 4 ( $C_1$  y  $C_4$ ), en estado sólido, tiende a formar estructuras de tipo listón extendido. Por su parte, los bloques G están formados de grupos axiales en los  $C_1$  y  $C_4$ , resultando en una cadena con forma de cinta rizada (McHugh, 1987).

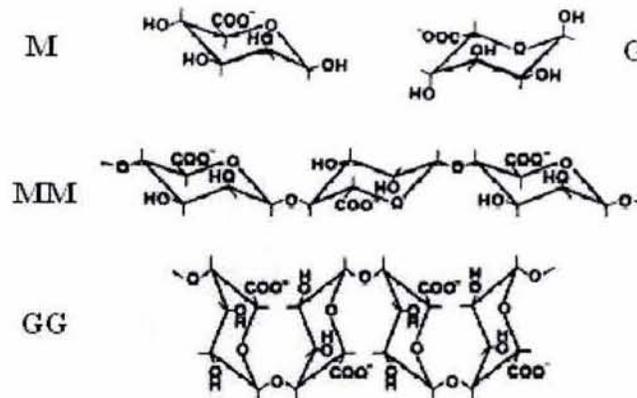


Figura 4. Ácido manurónico (M), ácido gulurónico (G) y bloques de estos monómeros (MM y GG) de alginato (Gacesa, 1998).

La gran versatilidad de los alginatos en distintos campos, se debe a sus propiedades gelificantes y viscosificantes (Gacesa, 1998). La capacidad gelificante depende del contenido relativo de los dos monómeros, mientras que la viscosidad de las soluciones de alginato, la cual determina su capacidad espesante, depende principalmente del peso molecular del polímero (Gacesa, 1998). Otros factores que influyen en la viscosidad son la concentración de alginato, la temperatura, el pH o la presencia de iones calcio (Sabra et al.,

2001). Las soluciones de alginato son pseudoplásticas, esto es, la viscosidad disminuye al incrementarse la velocidad de deformación (McHugh, 1987). McHugh (1987) reportó que la presencia de bajas concentraciones de iones calcio en una solución de alginato (hasta 70 mg CaSO<sub>4</sub>/L) incrementa su viscosidad, mientras que cantidades mayores (a partir de 100 mg CaSO<sub>4</sub>/L) propician la formación de un gel. La adición de calcio es una forma de incrementar la viscosidad de una solución sin aumentar la concentración de alginato disuelta o el peso molecular del mismo, debido a que favorece las interacciones entre moléculas del polisacárido (McHugh, 1987).

### **2.3.2. Interacción entre el alginato y el calcio**

La concentración de calcio es crítica para el crecimiento microbiano y producción de metabolitos (Martins et al., 1990). El proceso de síntesis de alginato no es la excepción. Originalmente sintetizado como ácido polimanurónico, el alginato sufre una epimerización de algunos restos de ácido manurónico no acetilados, a ácido gulurónico, por enzimas epimerasas (figura 5) (Annison y Couperwhite, 1984). Ésto tiene lugar en la superficie celular, después de la expulsión del polímero al ambiente extracelular (Valla et al., 2001).

El genoma de *A. vinelandii* codifica siete diferentes epimerasas (relacionadas evolutivamente), dependientes de calcio (AlgE1-E7). Los patrones de epimerización generados por cada una de estas enzimas son distintos (Valla et al., 2001). Pueden dividirse en dos grupos principales: aquellas que generan exclusivamente bloques MG (AlgE4), y aquellas que forman bloques G (Valla et al., 2001). Las enzimas dentro de los dos grupos no generan los mismos patrones de epimerización, ya que la longitud promedio de los bloques G puede variar (Sabra et al., 2001). La enzima AlgE6 puede introducir hasta un 78

% de residuos guluronato o aún más. El resto de las enzimas muestran propiedades diferentes. AlgE2 y AlgE5 generan bloques G más cortos que AlgE6, mientras que AlgE1 y AlgE3 generan bloques G y secuencias alternadas, respectivamente. La enzima AlgE7 muestra actividades de epimerasa y liasa (Valla et al., 2001).

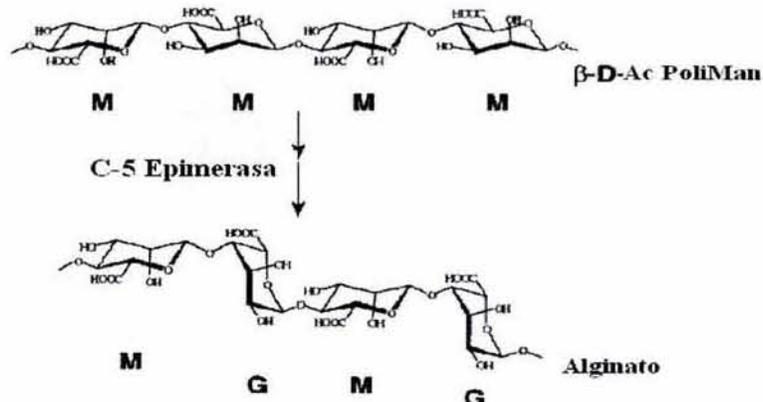


Figura 5. Proceso de epimerización de residuos de manuronato (M) a guluronato (G) (Draget et al., 1998).

Además de esta familia de proteínas, *A. vinelandii* codifica para otra enzima (AlgG) que cataliza la epimerización en ausencia de calcio. Se cree que la enzima AlgG se encuentra en el periplasma, mientras que las enzimas AlgE1-AlgE7 se encuentran unidas a la parte exterior de la membrana (Sabra et al., 2001). Annison y Couperwhite (1986) y Valla et al. (2001) reportaron que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene efecto no sólo en la cantidad de ácido gulurónico incorporado al polímero sino también a la distribución final de bloques.

Como se mencionó anteriormente, el alginato es capaz de formar geles. Este proceso es dependiente de la presencia de bloques G e involucra la interacción de cadenas

de polisacárido con la mediación de cationes divalentes como el calcio, de tal manera que un catión se coordina con cuatro residuos de guluronato (figura 6) (Annison y Couperwhite, 1984, 1986; Draget et al., 1998; Braccini y Pérez, 2001; Valla et al., 2001). En las regiones de bloques G, se presentan cavidades electronegativas formadas por residuos adyacentes de la cadena del polímero. El calcio permanece en estas zonas de unión entre moléculas de alginato (Annison y Couperwhite, 1984). Debido al arreglo de cationes a lo largo de esta zona, la estructura es descrita como una caja de huevos (Annison y Couperwhite, 1986; Draget et al., 1998; Braccini y Pérez, 2001).

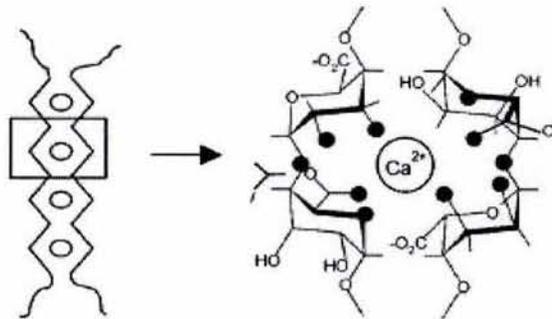


Figura 6. Estructura tipo 'Caja de huevos' de asociaciones mediadas por calcio entre bloques G de moléculas adyacentes de alginato (Braccini y Pérez, 2001).

### 2.3.3. Biosíntesis del alginato por *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* puede convertir la fuente de carbono a biomasa, alginato o polihidroxibutirato (PHB) (Sabra et al., 2001). Cuando se presenta una condición de baja concentración de oxígeno y una alta concentración de carbono en el medio de cultivo, se favorece la acumulación de NADH y NADPH en la célula (Espín, 2002). Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y el ciclo de Krebs y en estas condiciones se sintetiza el PHB (Espín, 2002). A altas concentraciones de oxígeno disuelto, la bacteria usa la fuente de carbono principalmente para producción de biomasa (Peña et al.,

1997). En condiciones estrictamente controladas de oxígeno, se logra una eficiente conversión de sacarosa a alginato (Peña et al., 1997).

Al menos 24 genes han sido directamente implicados en la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa*. En el caso de *A. vinelandii* hay menos información acerca de esto (Sabra et al., 2001). La biosíntesis de alginato es un proceso que requiere de mucha energía. Los pasos iniciales de la vía son esencialmente aquellos del metabolismo general de carbohidratos; el azúcar sigue la vía Entner-Doudoroff (figura 7). La fructosa es metabolizada por la fosfomanosa isomerasa, al primer intermediario, la manosa-6-fosfato, la cual es posteriormente convertida a manosa-1-fosfato por la fosfomanosa mutasa (Sutherland, 2001c). La guanosino-difosfomanosa pirofosforilasa, con la ayuda de GTP, convierte la manosa-1-fosfato a GDP-manosa. Este compuesto es convertido a ácido GDP-manurónico por la enzima guanosin-difosfomanosa deshidrogenasa, siendo el producto de esta reacción el precursor inmediato de la polimerización (Gacesa, 1998). Los productos de los genes *alg8*, *alg44*, *algX* y *algK* son candidatos para ser subunidades del complejo alginato polimerasa (Mejía-Ruíz et al., 1997; Rehm y Valla, 1997), siendo el producto de esta reacción el alginato. El punto de control cinético en la vía de biosíntesis se encuentra a nivel de la enzima GDP manosa deshidrogenasa (Gacesa, 1988).

Una vez que el alginato se encuentra en el espacio periplásmico, es acetilado por acción conjunta de las enzimas AlgF, AlgI y AlgJ. El acetyl-CoA es el principal donador de los grupos O-acetil para la modificación del alginato; sin embargo, este metabolito se encuentra en el citoplasma, mientras que el proceso de O-acetilación se lleva a cabo en el periplasma. Al menos alguna de las proteínas AlgF, AlgI o AlgJ debe estar involucrada en

el transporte de los grupos O-acetil a través de la membrana celular hacia el periplasma (Gacesa, 1998). Otro proceso importante es la epimerización (Valla et al., 2001).

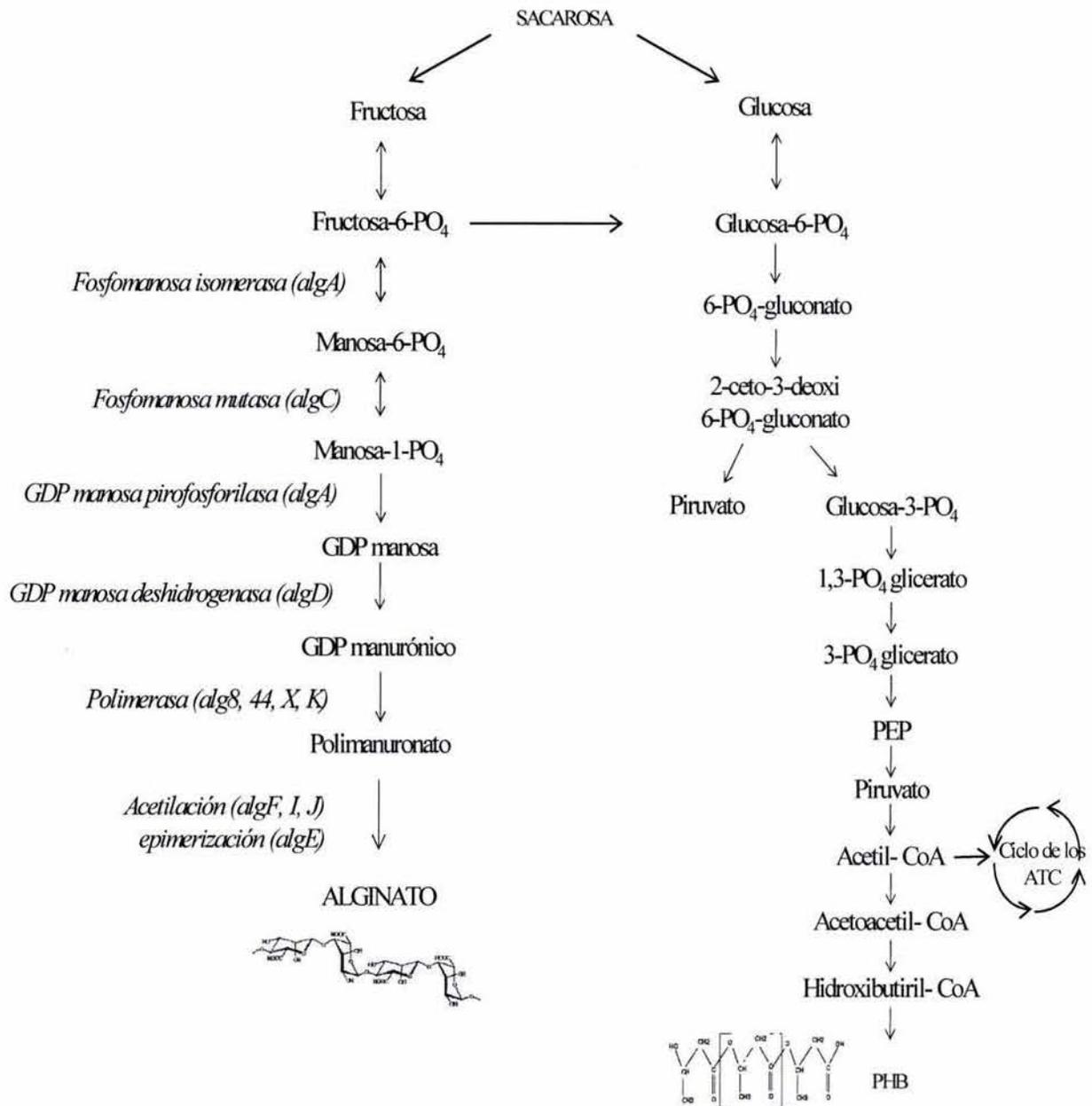


Figura 7. Vía biosintética del alginato y el PHB en *Azotobacter vinelandii*. Entre paréntesis se muestra el gen que codifica para la correspondiente enzima.

Ertesvåg et al. (1996) sugieren que controlando los niveles de expresión de cada enzima, las bacterias productoras de alginato son potencialmente capaces de producir

diferentes tipos de alginatos. Una ventaja de la explotación de estas bacterias como fuentes potenciales de alginato, es que eventualmente puede ser posible controlar el grado de polimerización, acetilación, composición y secuencia del polisacárido, lo cual no parece factible para alginatos obtenidos de la cosecha de algas en el océano (Rehm y Valla, 1997).

#### **2.3.4. Función biológica del alginato**

La función biológica de la producción de alginato por la bacteria no está completamente clara. La cubierta de polisacárido del quiste protege a la bacteria de la desecación y condiciones desfavorables (Sabra et al., 2001). Las capas de intina y exina del quiste contienen diferentes tipos de alginato. El alginato de la exina es un polisacárido con un alto contenido de bloques G, lo cual resulta en una rigidez mayor, comparado con el alginato que forma parte de la intina, que es más rico en residuos M (Sabra et al., 2001). Se postula que la compacta capa de alginato alrededor de la célula actúa como una barrera difusional para el oxígeno, lo cual limita su transferencia al complejo nitrogenasa, extremadamente sensible al oxígeno (Sabra et al., 2001). Se cree que el alginato producido por *A. vinelandii* actúa como una barrera protectora contra la toxicidad de metales pesados o como un sistema de intercambio iónico (Sabra et al., 2001). Probablemente, el alginato no tiene una sola función para la célula vegetativa misma, sino que le provee una multitud de propiedades protectoras en distintas condiciones ambientales (Sabra et al., 2001).

#### **2.3.5. Aplicaciones del alginato y fuentes de producción.**

Actualmente en el mundo se recolectan unas 85,000 ton (peso seco) de algas pardas, de las que se obtienen unas 40,000 ton de alginato por un valor de US\$ 230 millones. El precio puede variar de 5 a 15 US\$/kg, dependiendo de las características del producto

(McHugh, 2002; FAO, 2003). Del total del alginato producido actualmente, cerca del 50 % es utilizado en la industria textil, el 30 % en la industria de alimentos y aproximadamente el 20 % en la industria farmacéutica (World Association of Seaweed Processors, 2002).

Los productos comerciales de mayor interés son el alginato de sodio, alginato de propilenglicol y ácido algínico. También son utilizadas cantidades menores de sales de potasio, amonio, calcio y trietanolamina, así como sales mezcladas de sodio y calcio (McHugh, 1987).

En la industria de alimentos, el alginato se utiliza como producto estabilizante, espesante y agente gelificante. Es utilizado en helados, rellenos para pasteles, pan, pastas, jarabes, distintos tipos de bebidas, gelatinas, etc. (Rehm y Valla, 1997; Gacesa, 1998). En la industria textil, es utilizado en el teñido de telas, como espesante para la pasta que contiene la tinta, para mejorar la fijación, el brillo y el rendimiento de los colorantes. En la industria del papel, se emplean películas de alginato que mejoran la uniformidad superficial, aumentan la resistencia al aceite y brindan mayor brillo al aplicarle tintas al papel (Rehm y Valla, 1997; Sabra et al., 2001). En la industria farmacéutica, el alginato es utilizado para formar emulsiones estables, como agente desintegrante de tabletas o como cobertura de cápsulas. Es un medio muy exitoso para inmovilizar células y enzimas, especialmente en forma de perlas de gel. Alginatos formados sólo por residuos M pueden encontrar importantes aplicaciones como inmunoestimulantes (Rehm y Valla, 1997; Sabra et al., 2001). También son utilizados en procesos de tratamiento de agua, ya que ayudan a incrementar el tamaño de agregados en procesos de floculación (Rehm y Valla, 1997; Sabra et al., 2001).

La mayoría de las algas pardas son fuentes potenciales de producción de alginato (McHugh, 1987). Las principales fuentes comerciales son las especies de *Ascophyllum* y *Laminaria* (Europa), *Lessonia* (América del Sur), *Ecklonia* (Sudáfrica), *Durvillaea* (Australia y Chile) y *Macrocystis* (California y Baja California) (figura 8). Las especies *Sargassum* y *Turbinaria* se recolectan en aguas más cálidas, pero normalmente solo producen pequeñas cantidades de alginato de calidad inferior (McHugh, 2002).

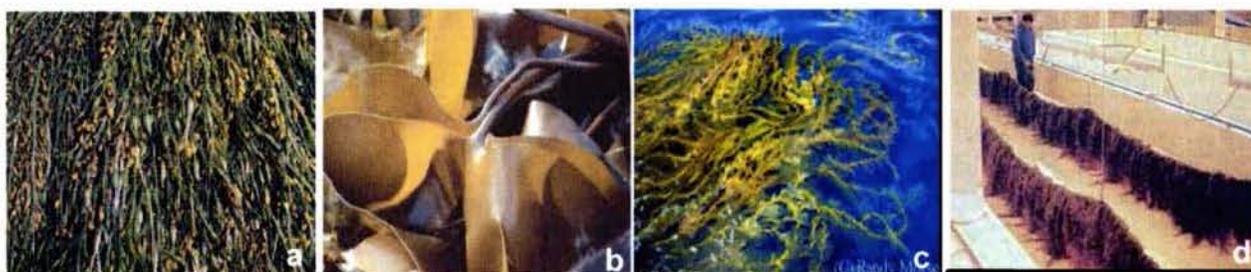


Figura 8. Algas pardas de las especies *Ascophyllum* (a), *Laminaria* (b), *Macrocystis* (c) y *Lessonia* (d).

Las propiedades del alginato varían con la especie y el tejido de la planta utilizado, por lo que la selección del alga que será cultivada está basada en la disponibilidad de una especie en particular y de las propiedades del alginato que contienen (McHugh, 1987). En estas plantas, el alginato actúa como componente estructural, proveyendo fuerza mecánica y flexibilidad. Esto explica la diferencia en composiciones en diferentes especies o tejidos de la misma planta (Draget, 2001; Sabra et al., 2001).

Existen distintas especies bacterianas que también sintetizan alginato, entre las que se encuentran *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter beijerinckii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*,

*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas corrugata* (Cote y Krull, 1988; Gacesa, 1988; 1998; Likhosherstov et al., 1991).

La diferencia principal a nivel molecular entre los alginatos de algas y bacterianos es la presencia de grupos *O*-acetilos en los carbonos 2 y/o 3 en los bacterianos (Draget, 2001). Como consecuencia, las bacterias producen un rango de alginatos con diferentes estructuras de bloques y grados de acetilación (Gacesa, 1998). Los grupos acetilo no contribuyen a la carga total de la macromolécula. La presencia de grupos acetilo en los residuos manuronato afecta importantemente la unión y selectividad del alginato por cationes divalentes, tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ . La capacidad de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  y la selectividad por este ión es reducida grandemente en moléculas acetiladas (Geddie y Sutherland, 1994; Lee y Day, 1995).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Estudiar la participación del alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii* y la influencia de las características del polisacárido en la formación y morfología de los agregados.

#### 3.2. Objetivos particulares

- 3.2.1. Estandarización de la técnica de análisis de imágenes para la caracterización rigurosa de los agregados de *Azotobacter vinelandii*.
  - 3.2.1.1. Selección de parámetros morfológicos para la caracterización de agregados.
  - 3.2.1.2. Selección del número mínimo de objetos a medir.
- 3.2.2. Determinar los componentes involucrados en la formación de agregados.
- 3.2.3. Evaluar la influencia del alginato producido y sus características en la morfología de los agregados de *Azotobacter vinelandii*.

#### 4. Estrategia experimental

La estrategia global consistió en evaluar la participación de alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii*, mediante la utilización de la cepa LA21 (no productora de alginato) y posteriormente provocar la síntesis de alginato con distinta composición (al variar la concentración de calcio presente en el medio de cultivo) para determinar el efecto de las características del alginato en la morfología de agregados celulares (figura 9).

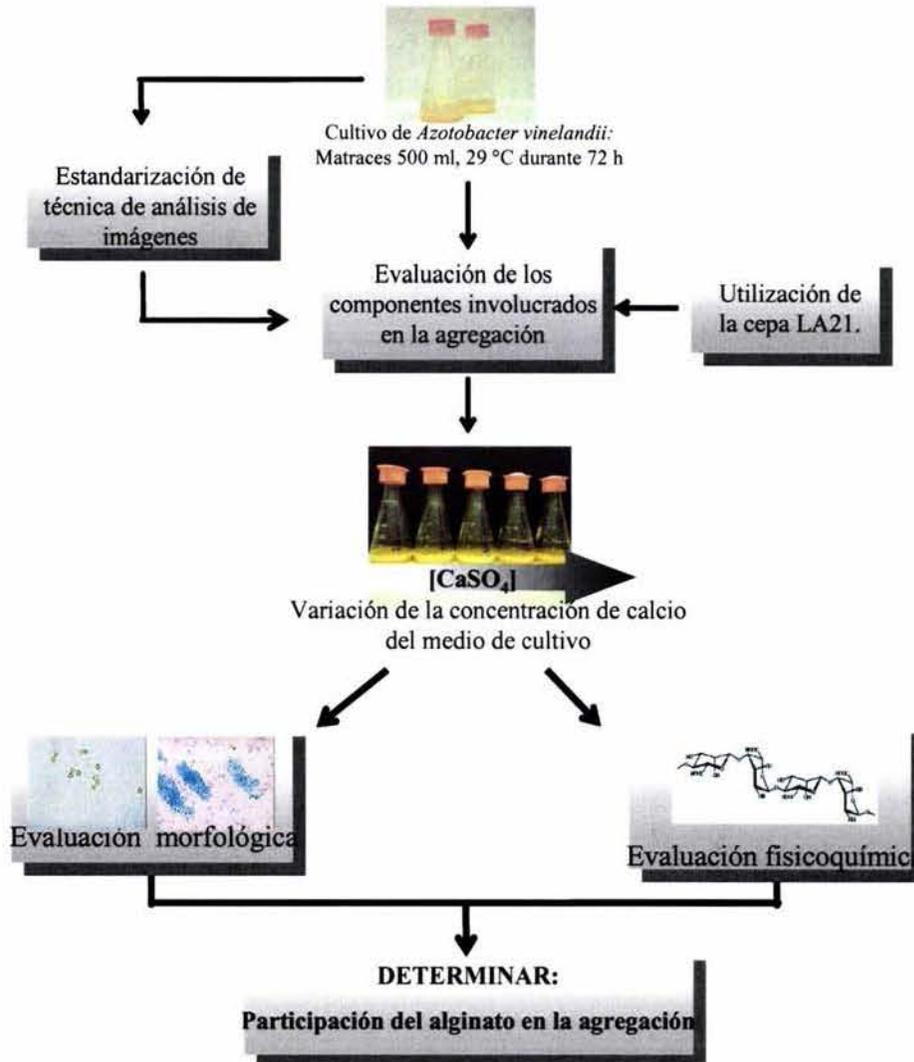


Figura 9. Estrategia experimental.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Cepas bacterianas y condiciones de almacenamiento

La cepa de *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 se preservó a 4°C en tubos inclinados con medio Burk modificado con la siguiente composición (g/L): sacarosa (20); agar (18); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.66); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.16); MOPS (ácido 3-[N-Morfolino]-propano sulfónico) (1.42); CaSO<sub>4</sub> (0.05); NaCl (0.2); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2); NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.0029); FeSO<sub>4</sub> (0.027) (Peña et al., 1997). La cepa LA21 (no mucoide, derivada de la cepa ATCC9046) se cultivó en el mismo medio, agregando el antibiótico kanamicina (0.3 µg/mL) (Mejía-Ruíz et al., 1997).

### 5.2. Cultivo en matraces

Para la obtención del inóculo se cultivaron las cepas ATCC9046 y LA21 de *A. vinelandii* a partir de tubos inclinados en cajas Petri a 29 °C durante 72 h. Se utilizaron tres asadas del inóculo de las cajas Petri para inocular matraces convencionales (de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL), con el medio Burk modificado sin agar, añadiéndoles extracto de levadura (3 g/L). Los matraces (por duplicado), se incubaron a 29°C, durante 24 h y a una velocidad de agitación de 200 rpm, adicionando kanamicina (0.3 µg/mL) a aquéllos de la cepa LA21. Cuando los matraces alcanzaron una densidad óptica de 0.15 (dilución 1:50), equivalente a 0.3 g/L de biomasa, se tomaron 10 mL del caldo de cultivo y se inocularon matraces con caldo de cultivo con concentraciones variables de CaSO<sub>4</sub>. Las concentraciones de CaSO<sub>4</sub> utilizadas fueron de 0, 10, 50, 100 y 200 mg/L. En el matraz al que no se le añada CaSO<sub>4</sub>, se considera una concentración de 3 mg CaSO<sub>4</sub>/L, debido al contenido residual de calcio en el inóculo. Este valor se determinó

mediante espectrofotometría de absorción atómica, técnica que se basa en la medida de la absorción de átomos o iones de un metal (calcio), en un medio gaseoso, al ser evaporada rápidamente una solución de la muestra a temperatura elevada (Ingle y Crouch, 1988).

### **5.3. Separación de fracciones**

Para realizar las distintas evaluaciones fisicoquímicas se separaron distintas fracciones a partir de los cultivos de la bacteria (figura 10). Con el caldo de cultivo completo se determinó la concentración de alginato, la concentración celular, la viscosidad y la frecuencia de agregación. Al caldo de cultivo se añadió EDTA y NaCl, se centrifugó (11,000 rpm x 25 min) y de esta manera se separó el sobrenadante y la biomasa.

El sobrenadante fue tratado de dos maneras distintas para separar diferentes fracciones del caldo. A un volumen del sobrenadante se agregó isopropanol (3 volúmenes) lo que provocó la precipitación y separación del alginato. Al alginato precipitado se le determinó el peso molecular, la relación G/M y concentración de ácidos urónicos. Al otro volumen del sobrenadante se le agregó CaCl<sub>2</sub> (10% p/v), se incubó en hielo, se centrifugó y posteriormente se separó y desechó el alginato gelificado de esta manera. Este extracto se dializó contra agua desionizada (para excluir cualquier exceso de iones) y fue denominado fracción soluble. La biomasa separada en el primer paso de fraccionamiento es lavada tres veces con agua desionizada. El sobrenadante que resultó de estos lavados se dializó y el extracto se denominó fracción asociada a células. Con la fracción soluble y la fracción asociada a células se determinó el peso molecular, la relación G/M, concentración de ácidos urónicos, proteína extracelular, y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas (SDS-PAGE).

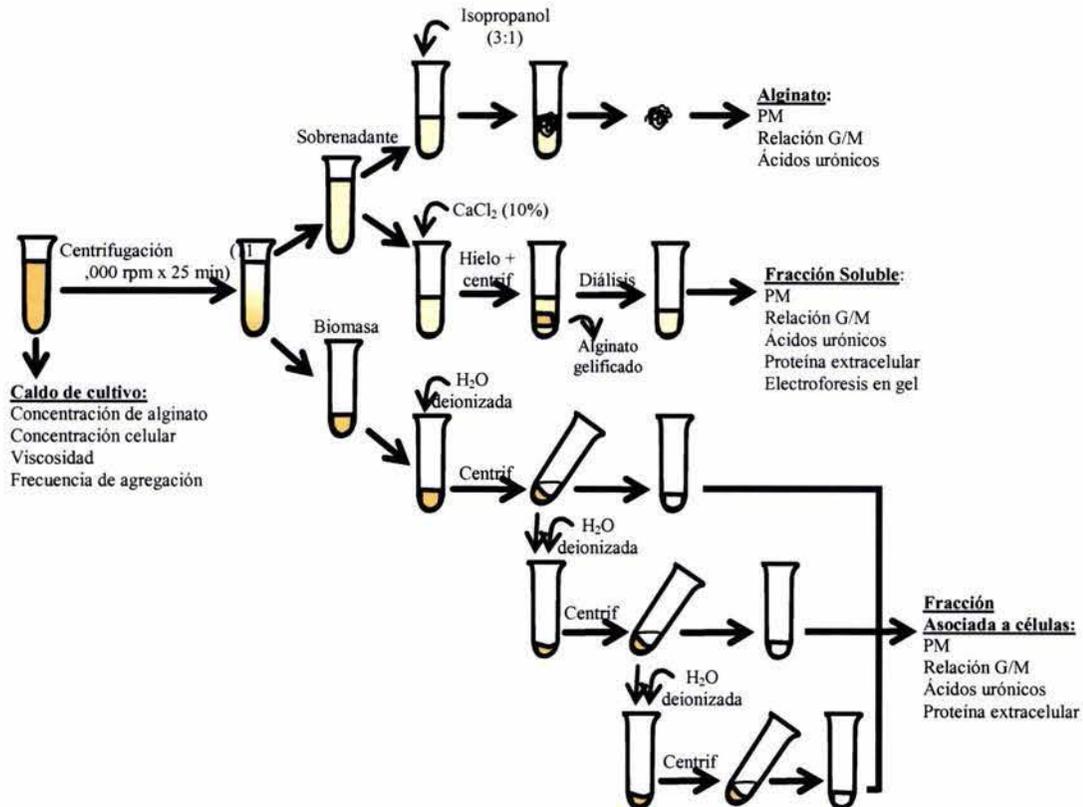


Figura 10. Diagrama de la separación de fracciones a partir del caldo de cultivo de *Azotobacter vinelandii*.

#### 5.4. Cuantificación de alginato

El alginato producido se determinó gravimétricamente. A 10 mL de caldo de cultivo se añadió 1 mL de NaCl 1M y 1 mL de EDTA 0.1M y se centrifugó (11,000 rpm x 25 min). Se separó el sobrenadante y se agregó isopropanol (3 volúmenes). Éste se filtró con membranas previamente pesadas (Millipore 0.45  $\mu\text{m}$ ) las cuales se secaron a 80°C hasta peso constante (Peña et al., 1997).

#### 5.5. Cuantificación de células

La concentración celular se determinó en un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics) con un tubo de apertura de 100  $\mu\text{m}$ . Las

muestras fueron previamente sonicadas para evitar interferencias por la presencia de agregados celulares. La condición de sonicación utilizada fue de 30 s con pulsos de 5 s de sonicación y 5 s de cese (amplitud 25 %).

#### **5.6. Determinación de la viscosidad**

La viscosidad aparente de los caldos de cultivo de *Azotobacter vinelandii*, se determinó mediante un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) a 6 rpm, con el cono CP-52, lo cual es equivalente a una velocidad de deformación de 12 s<sup>-1</sup> (Peña et al., 1997).

#### **5.7. Determinación de peso molecular**

El peso molecular promedio (PMP) se determinó mediante cromatografía de permeación en gel con columnas en serie (Ultrahydrogel, UG 500 y lineal, Waters) usando un sistema convencional de HPLC (Waters 625 LC Systems), con un detector refractómetro diferencial (Waters, 410). El eluyente utilizado fue NaNO<sub>3</sub> 0.1M a 35°C y un flujo de 0.9 mL/min. Como estándar se utilizaron pululanos de *Aureobasidium pullulans* de 5,800 a 1'600,000 Da (Waters). Esta técnica permite medir asimismo el índice de polidispersión (IP), el cual es una medida de la heterogeneidad de pesos moleculares en una muestra. Se representa como la relación del peso molecular promedio/ número molecular promedio.

#### **5.8. Determinación de la relación G/M**

La relación de los restos Guluronato/Manuronato se determinó por un método espectrofotométrico (Knutson y Jeanes, 1968; Vanegas y Vanegas, 2003). 15 mg de

alginato fueron hidrolizados con 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N a 121°C durante 30 min. Posteriormente, fue neutralizado con 2.5 mL de CaCO<sub>3</sub> 1N. Esta mezcla fue centrifugada a 3500 rpm durante 20 min. Del sobrenadante se separó 1 mL y se le añadió 6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La mezcla se dejó enfriar para posteriormente calentarla hasta 55°C durante 20 min. Finalmente se añadió 0.2 mL de carbazol (0.1 % p/v en etanol), se dejó en reposo durante 3 h y se leyó la absorbancia (530 nm) que corresponde al ácido manurónico (M) presente. La concentración de M se calculó con la fórmula reportada por Vanegas y Vanegas (2003) quienes realizaron una curva estándar:

$$\text{Ác. manurónico} = \frac{(abs + 0.043)}{0.00082}$$

donde *abs* es el valor de absorbancia obtenido en la medición espectrofotométrica. A la concentración de alginato se resta el valor obtenido de M con lo que se infiere la concentración del ácido gulurónico (G). El cociente de estos dos valores es la relación G/M.

### **5.9. Determinación de la concentración de proteína extracelular**

La concentración de proteína extracelular se determinó mediante el método de Bio-Rad®, el cual se basa en el método de Bradford. Esta técnica implica la adición de un colorante ácido a la solución de la proteína y la medición de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. A una muestra de 10 mL de caldo de cultivo se añadió 1 mL de NaCl 1M y 1 mL de EDTA 0.1M y se centrifugó (11,000 rpm x 25 min). El sobrenadante fue separado y se agregaron 1.5 mL de CaCl<sub>2</sub> (10 % p/v) por cada 10 mL de sobrenadante, incubando 3 h en hielo. Posteriormente, se centrifugó de nuevo (11,000 rpm x 25 min) y se separó el alginato gelificado. El extracto se dializó durante 12 h contra agua desionizada utilizando membranas de diálisis con un tamaño de corte de 12 kDa (Spectrapor™

membrane tubing, Fisher Scientific Co.). Con esta fracción se determina la concentración de proteína extracelular, usando seroalbúmina bovina como estándar.

#### **5.10. Ensayo de adición de proteasa**

Para determinar la estabilidad de los agregados al adicionar una proteasa inespecífica, se tomaron muestras de 1.0 mL de caldo de cultivo de ambas cepas de *A. vinelandii* y se agregó papaína (EC 3.4.22.2, Sigma Chemicals, Co.) en una concentración de 5 mg/mL. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas y al final de este periodo se evaluó la agregación de la bacteria. Estos resultados se compararon con las distribuciones de agregados sin tratamiento.

#### **5.11. Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)**

El extracto dializado de cada muestra se concentró 50x en una centrifuga al vacío (SpeedVac® Plus Savant, SC110A). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (gel de separación 15 %, gel de carga 4 % p/v acrilamida). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie brillante o con AgNO<sub>3</sub>. Los pesos moleculares fueron estimados usando estándares de peso molecular de 220 a 10 kDa (Invitrogen).

#### **5.12. Medición de parámetros morfológicos de agregados**

La morfología de agregados de *Azotobacter vinelandii* se evaluó mediante un sistema de análisis de imágenes previamente reportado por Peña et al. (2002a). Un mililitro del caldo de cultivo de la bacteria fue teñido con 10 µL de azul de metileno (1 % p/v). El

primer paso en el proceso de análisis consistió en la captura de la imagen mediante un microscopio óptico (Optiphot-2 Nikon, Japón). Las imágenes se obtuvieron con una video cámara Hitachi KP-D50 Color digital. La adquisición, almacenamiento y análisis de imágenes se realizó por medio del programa *ImagePro Plus* v4.0. La imagen fue convertida a una escala de grises y posteriormente procesada usando un algoritmo para agregados (Peña et al., 2002a). Se realizó una ecualización de la imagen para obtener un mejor contraste y atenuar el ruido del fondo; automáticamente los objetos oscuros (agregados) fueron separados del resto del fondo, mediante un contorno. Los objetos menores a un diámetro equivalente de 1  $\mu\text{m}$  son eliminados automáticamente (Peña et al., 2002a). Posteriormente se creó una máscara binaria de objetos separados (el área de agregados en negro, sobre el fondo blanco), mostrando los contornos de los objetos sobre la imagen original para verificar la exactitud del procedimiento de separación. Se capturaron las imágenes y se digitalizaron en formato TIF, en una pantalla con un arreglo de 640x480 píxeles. Mediante dos diferentes algoritmos fue posible discriminar agregados de las células y el resto de los objetos (Peña et al., 2002a). Los datos obtenidos fueron transferidos a una hoja de cálculo, donde se analizaron como distribuciones muestrales.

### **5.13. Medición del grado de agregación**

Se realizó por conteo directo en una cámara de Neubauer. 1 mL de la muestra sin diluir se tiñó con azul de metileno (1% p/v) para incrementar el contraste entre los agregados y el fondo. Se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  y se observó al microscopio con el objetivo 40x. Se contaron los agregados observados en cada uno de los 4 cuadrantes externos de la cámara, calculando un promedio general. La frecuencia de agregación se

expresa como agregados/mililitro, y se obtiene con la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Agregados/ mL} = \frac{(\text{numero de agregados observados})(f)}{(\text{profundidad})(\text{superficie de conteo})}$$

donde la profundidad de la cámara es 0.1 mm, la superficie de conteo es 0.0025 mm<sup>2</sup> y *f*, el factor de conversión a mL, es 10<sup>4</sup>.

#### **5.14. Análisis estadístico**

Los valores presentados en este trabajo son el resultado de tres experimentos independientes, evaluando cada condición por duplicado. Éstos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). El ANOVA evalúa el cociente de cuadrados medios entre grupos y dentro de grupos y provee un valor F (distribución Fisher) y su correspondiente valor P (probabilidad). Si la hipótesis nula es verdadera ( $\mu_1=\mu_2=\mu_3\dots=\mu_k$ ) el valor F debe ser aproximadamente 1. Si F es mucho mayor que 1, la hipótesis nula es falsa (Zar, 1999). Se utilizó un nivel de significancia de 5 %. Cuando se determinaron diferencias entre las medias, se realizó la prueba de múltiples comparaciones de Tukey (Zar, 1999). La diferencia entre las curvas de distribuciones de los parámetros morfológicos fue evaluada ajustando cada una de las curvas a un modelo matemático (sigmoideal) y comparando los coeficientes de la ecuación mediante un ANOVA.

## **6. Resultados y Discusión**

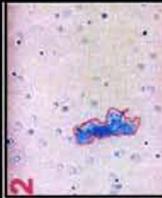
### **6.1. Metodología de análisis de imágenes**

#### **6.1.1. Selección de parámetros morfológicos**

Los agregados fueron evaluados mediante un sistema de análisis de imágenes. Para la caracterización de la morfología fue necesario establecer y estandarizar el procedimiento de medición. Como primer paso, se seleccionaron parámetros que permitiesen describir el estado morfológico de estas estructuras.

Diversos autores han utilizado descriptores morfológicos como el área, el diámetro promedio, el perímetro, el diámetro equivalente, la dimensión fractal, el grado de compactación, la rugosidad, la porosidad, el espesor del flóculo, la relación del diámetro mayor/diámetro menor, la relación del radio mayor/radio menor, la relación del eje mayor/eje menor, la circularidad, la caja x/y (relación del eje mayor/eje menor de un rectángulo imaginario alrededor del objeto), entre otros, para caracterizar la morfología de hongos filamentosos (Thomas, 1992; Tucker et al., 1992; Pazouki y Panda, 2000), levaduras formadoras de flóculos (Vicente et al., 1996; O'Shea y Walsh, 2000; Mas y Ghommidh, 2001) y la agregación o formación de biopelículas de bacterias (de Boer et al., 1993; Bloem et al., 1995; Azeredo et al., 1997; Christensen et al., 2001; Li y Yuan, 2002; Peña et al., 2002a). De estos parámetros, se realizó una preselección de aquéllos que, al menos por su definición y características, pudiesen ser más adecuados para la descripción del tamaño y la forma de los agregados. En la tabla 1 se enlistan los 10 parámetros elegidos para su evaluación, siendo el área, el diámetro equivalente, el perímetro, el diámetro

Tabla 1. Células libres (imagen 1) y agregados (imágenes 2 a 5) de *Azotobacter vinelandii* y los respectivos valores para los parámetros morfológicos evaluados. Las columnas sombreadas se refieren a los parámetros de tamaño.

IMAGEN	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	DE ( $\mu\text{m}$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Díametro promedio ( $\mu\text{m}$ )	Díametro mayor ( $\mu\text{m}$ )	Circularidad	Perim convexo / Perímetro	Eje mayor / Eje menor	Caja xly	Diám mayor / Diám menor	Radio mayor / Radio menor
	6.1	2.9	8.46	2.6	2.8	1	1	1.1	1	1.4	1.26
	582	18.2	128.3	32.0	47.3	0.44	0.87	2.7	0.56	2.8	5.87
	642	21.8	177.6	29.0	36.6	0.6	0.86	2.2	1.24	1.7	2.1
	1136	18.6	244.3	43.1	63.3	0.29	0.69	2.2	0.85	3.6	16.9
	1294	21.8	236.9	49.4	89.54	0.23	0.84	4.6	0.29	5.2	7.78

promedio y el diámetro mayor parámetros de tamaño y la circularidad, la caja x/y, las relaciones del perímetro convexo/perímetro, del eje mayor/eje menor, del diámetro mayor/diámetro menor y del radio mayor/radio menor, los parámetros de forma. Pueden observarse las imágenes de una célula individual (imagen 1) y agregados de diferente tamaño y forma (imágenes 2 a 5) con el correspondiente valor de cada parámetro.

Respecto al área (tamaño), al comparar las imágenes, se observa que el valor de este parámetro aumenta de manera proporcional con el tamaño del objeto observado, caracterizando adecuadamente al agregado. El diámetro equivalente (DE) representa el diámetro que tendría una esfera con la misma área y es calculado mediante la ecuación  $DE = [(4 \times \text{área}) / \text{perímetro}]$ . Este parámetro no está correlacionado con la forma del objeto, ya que su cálculo involucra únicamente al área y al perímetro. Al ser un descriptor que incluye a dos parámetros de tamaño, nos puede brindar más información sobre el objeto observado. Parámetros tales como el diámetro promedio (longitud promedio de diámetros que pasan por el centroide del objeto, medidos a intervalos de 2 grados) y el diámetro máximo (longitud mayor que pasa por el centroide y une a dos puntos del contorno de un objeto) son descriptores que están influenciados por la forma del objeto, por lo que podrían no representar la dimensión real del agregado. Debido a lo anterior, el área y el DE fueron considerados adecuados para la descripción del tamaño de los agregados.

En cuanto a los parámetros de forma, la circularidad es calculada mediante la fórmula  $C = [(\text{perímetro}^2) / (4\pi \times \text{área})]$  y puede tomar valores de 0 hasta 1, donde 1 es lo más cercano a la figura de un círculo perfecto. El parámetro perímetro convexo/perímetro (PC/P) describe la irregularidad del contorno de un objeto, tomando valores de 0 a 1, donde

1 corresponde a un objeto cuyo contorno no presenta invaginaciones. En la tabla 1 puede observarse, al comparar la imagen y los valores de circularidad y PC/P para una célula individual (imagen 1) con los valores correspondientes a los agregados (imágenes 2 a 5), una disminución de la circularidad y PC/P cuando la imagen correspondiente se aleja más de la figura de un círculo perfecto y un objeto sin invaginaciones. Para los parámetros de la caja x/y y las relaciones del eje mayor/eje menor, el diámetro mayor/diámetro menor, el radio mayor/radio menor, debido a que en concepto son semejantes, se esperarían valores similares entre ellos. Tomando como referencia la imagen 5 (tabla 1), el diámetro mayor parece ser casi tres veces mayor que el diámetro menor. Sin embargo los correspondientes valores de los parámetros antes mencionados son muy distintos entre ellos (al realizar una correlación entre las relaciones del radio mayor/radio menor y el diámetro mayor/diámetro menor de una población de agregados, se obtuvo un  $r^2=0.17$ ), diferencias que parecen incrementarse con la irregularidad de la imagen (como ejemplo la imagen 5). Los parámetros de caja x/y y las relaciones del eje mayor/eje menor, el diámetro mayor/diámetro menor, el radio mayor/radio menor fueron descartados, y se seleccionaron la circularidad y la relación del perímetro convexo/perímetro como los parámetros de forma para caracterizar los agregados. En la tabla 2 se describen brevemente los parámetros elegidos.

### **6.1.2. Representación de los datos morfológicos.**

El resultado del análisis de imágenes de los agregados son datos numéricos que pueden representarse mediante distribuciones de las muestras. Las curvas de distribución indican que las poblaciones son sesgadas y dispersas (encontrando agregados desde 5 hasta 100  $\mu\text{m}$  de diámetro equivalente) pero tienden a aproximarse a una distribución normal

(figura 11). Cuando se manejan poblaciones sesgadas, la mediana es preferida como medida de tendencia central, ya que se disminuye la posibilidad de que valores muy grandes o muy pequeños afecten el promedio (Zar, 1999). Debido a esto, en el presente estudio los datos morfológicos de tendencia central se representaron utilizando la mediana de la población, mientras que para analizar el total de la muestra los resultados se representaron mediante distribuciones acumuladas. Aunque en la evaluación de la morfología de los agregados se determinaron los cuatro parámetros elegidos, de aquí en adelante se menciona sólo el diámetro equivalente y la circularidad, ya que se observaron comportamientos similares entre los dos parámetros de tamaño y los dos parámetros de forma.

Tabla 2. Descripción de los parámetros seleccionados para caracterizar agregados de *Azotobacter vinelandii*.

Parámetro	Tipo	Definición	Fórmula
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Tamaño	Área del objeto proyectado	Suma de los pixeles que conforman el objeto.
Diámetro equivalente ( $\mu\text{m}$ )	Tamaño	Diámetro equivalente al diámetro de una esfera que presenta la misma área	$DE = \frac{(4 \times \text{área})}{\text{perímetro}}$
Circularidad (adimensional)	Forma	Desviación de un objeto de la figura de un círculo perfecto. Rango de valores de 0 a 1, donde 1 es un círculo perfecto.	$C = \frac{\text{perímetro}^2}{(4\pi \times \text{área})}$
$\frac{\text{Perímetro convexo}}{\text{perímetro}}$ (adimensional)	Forma	El perímetro convexo es el perímetro de la línea exterior convexa de un objeto, no toma en cuenta las invaginaciones o irregularidades del contorno del objeto. Describe la irregularidad del contorno de un objeto. El rango de valores va de 0 a 1, donde 1 describe a un objeto cuyo contorno no presenta invaginaciones.	$\frac{\text{Perímetro convexo}}{\text{perímetro}}$

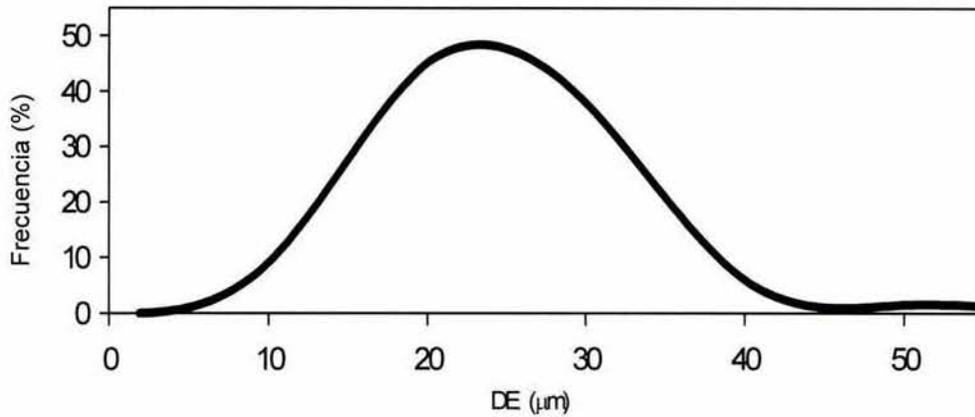


Figura 11. Distribución muestral de los agregados de *Azotobacter vinelandii* con respecto al DE.

Para determinar estadísticamente la diferencia morfológica entre muestras de agregados, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA). Las curvas de distribución acumulada generadas a partir de los datos de cada muestra fueron ajustadas a un modelo sigmoideal, representado por la siguiente fórmula:

$$y = \frac{a}{1 + (x/x_0)^b}$$

Los coeficientes obtenidos ( $a$ ,  $b$  y  $x_0$ ) caracterizan a la curva y con base en éstos se realizó la comparación entre curvas.

### 6.1.3. Determinación del número de objetos a medir

El siguiente paso en el establecimiento de la técnica de análisis de imágenes consistió en la determinación del número de objetos que era necesario analizar para tener una muestra estadísticamente representativa de la población. Existen fórmulas estadísticas que permiten calcular el tamaño de la muestra requerido. La fórmula reportada por Zar (1999), fue utilizada como un primer acercamiento para estimar el tamaño de muestra ( $n$ )

$$n = \frac{s^2 t_{\alpha(2),(n-1)}^2}{d^2}$$

donde  $s^2$  es la varianza de la muestra,  $t$  el valor tabulado del estadístico  $t$ ,  $\alpha$  es el intervalo de confianza,  $(n-1)$  son los grados de libertad y  $d$  es la mitad del intervalo de confianza.

El tamaño de muestra a medir depende en gran medida del intervalo de confianza o la diferencia mínima que se desea detectar entre dos muestras. Tomando como base el valor más pequeño de diámetro equivalente (DE) encontrado para un agregado ( $5 \mu\text{m}$ ), se estableció un intervalo de confianza del  $5 \mu\text{m}$  ( $d = 2.5$ ). Considerando un nivel de confianza de 95 % y con base en una muestra con una media de  $21.08 \mu\text{m}$ , una desviación estándar ( $s$ ) de 12.92, un valor  $t_{0.05(2),(699)}$  de 1.963, el tamaño de muestra calculado fue de 102 agregados. Al realizar varias pruebas con los valores de desviación estándar obtenidos de distintas muestras, el mayor tamaño de muestra calculado fue de 135 agregados.

En la figura 12a se muestran las distribuciones de agregados de la cepa ATCC9046, respecto al DE, con tamaños de muestra desde 100 a 700 agregados. Al parecer las distribuciones muestrales para los tamaños de muestra de 100 y 200 agregados se separan de la tendencia general del resto de las curvas, mientras que a partir del tamaño de muestra de 300 agregados parecen ser muy similares independientemente del número de objetos.

La figura 12b muestra los valores de la mediana  $\pm$  desviación estándar del DE de las muestras de agregados con distinto tamaño. Los valores de mediana de las muestras de 50 a 200 agregados muestran grandes variaciones y los valores de desviación estándar son grandes (de  $17.8 \pm 1.62 \mu\text{m}$  para 50 agregados a  $16.9 \pm 0.92 \mu\text{m}$  para 200 agregados). A

partir de la muestra de 300 agregados, los valores de la mediana se vuelven más constantes y los valores de la desviación estándar disminuyen (desde  $17.7 \pm 0.72 \mu\text{m}$  para 300 agregados hasta  $17.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$  para 700 agregados).

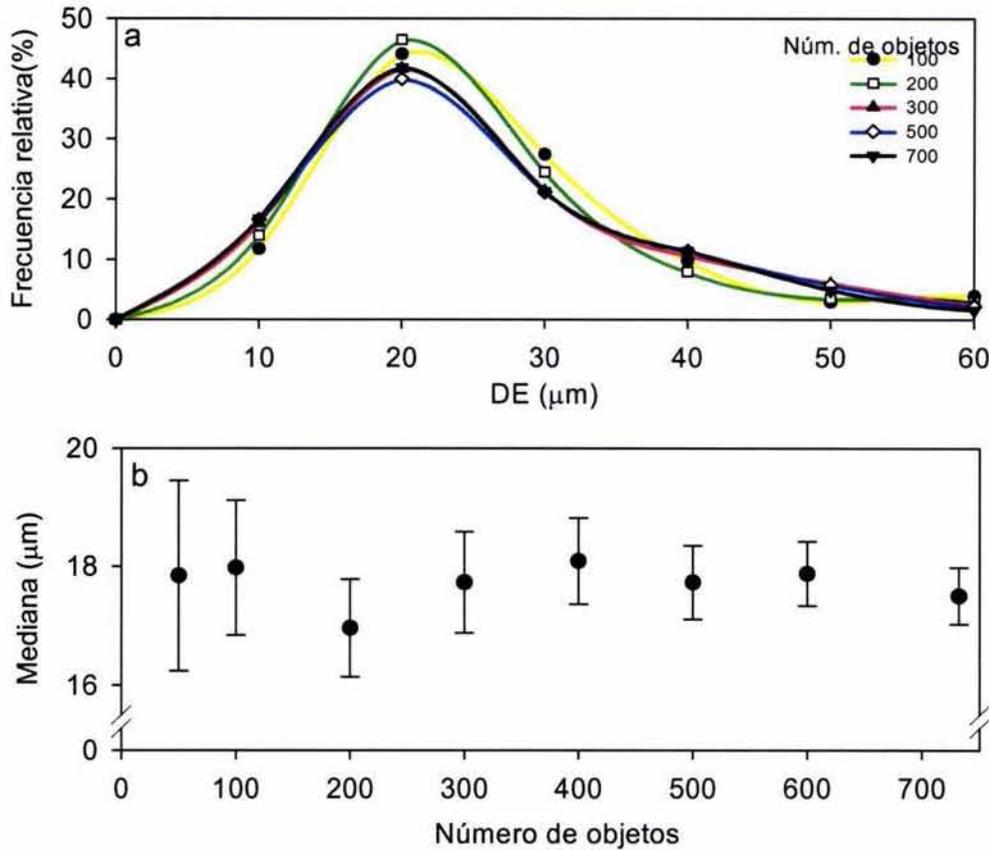


Figura 12. Distribución de agregados de *Azotobacter vinelandii* (cepa ATCC9046) con distintos tamaños de muestra con respecto al diámetro equivalente (a) y el correspondiente valor de la mediana  $\pm$  desviación estándar del DE de las muestras de distinto tamaño (b).

De acuerdo con la fórmula estadística antes mencionada, el número máximo de agregados que es necesario medir son 135; sin embargo, para tener más certidumbre de que la muestra es representativa de la población se decidió establecer el número mínimo de objetos a medir como 300 agregados ya que a partir de este punto el valor de la mediana es

más constante y la desviación estándar es menor. Con la medición de un número menor de objetos obtendríamos desviaciones más grandes y medir un número mayor sería poco práctico para el operador e innecesario.

## **6.2. Componentes involucrados en la agregación de *Azotobacter vinelandii***

Peña et al. (1997; 2000; 2002a) y Reyes (2000) postularon que el alginato producido por *A. vinelandii* podría estar involucrado en el proceso de agregación y que condiciones ambientales tales como la velocidad de aireación y el mezclado determinan en gran medida la formación de estas estructuras. Sin embargo, no existen trabajos que reporten la contribución de las condiciones ambientales, fisiológicas o genéticas en la formación y desarrollo de agregados de *A. vinelandii*. 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 cassette de kanamicina (interposón), 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 polimanuronato (Mejía-Ruíz et al., 1997). La cepa LA21 fue cultivada bajo las mismas condiciones que la cepa ATCC9046 (matraces convencionales de 500 mL, 200 rpm, a 29°C durante 72 h).

Esta cepa desarrolló agregados, indicando que no es necesaria la producción de alginato para la formación de éstas estructuras. No se encontraron diferencias estructurales entre los agregados formados por la cepa mucoide y la cepa no mucoide (figura 13).

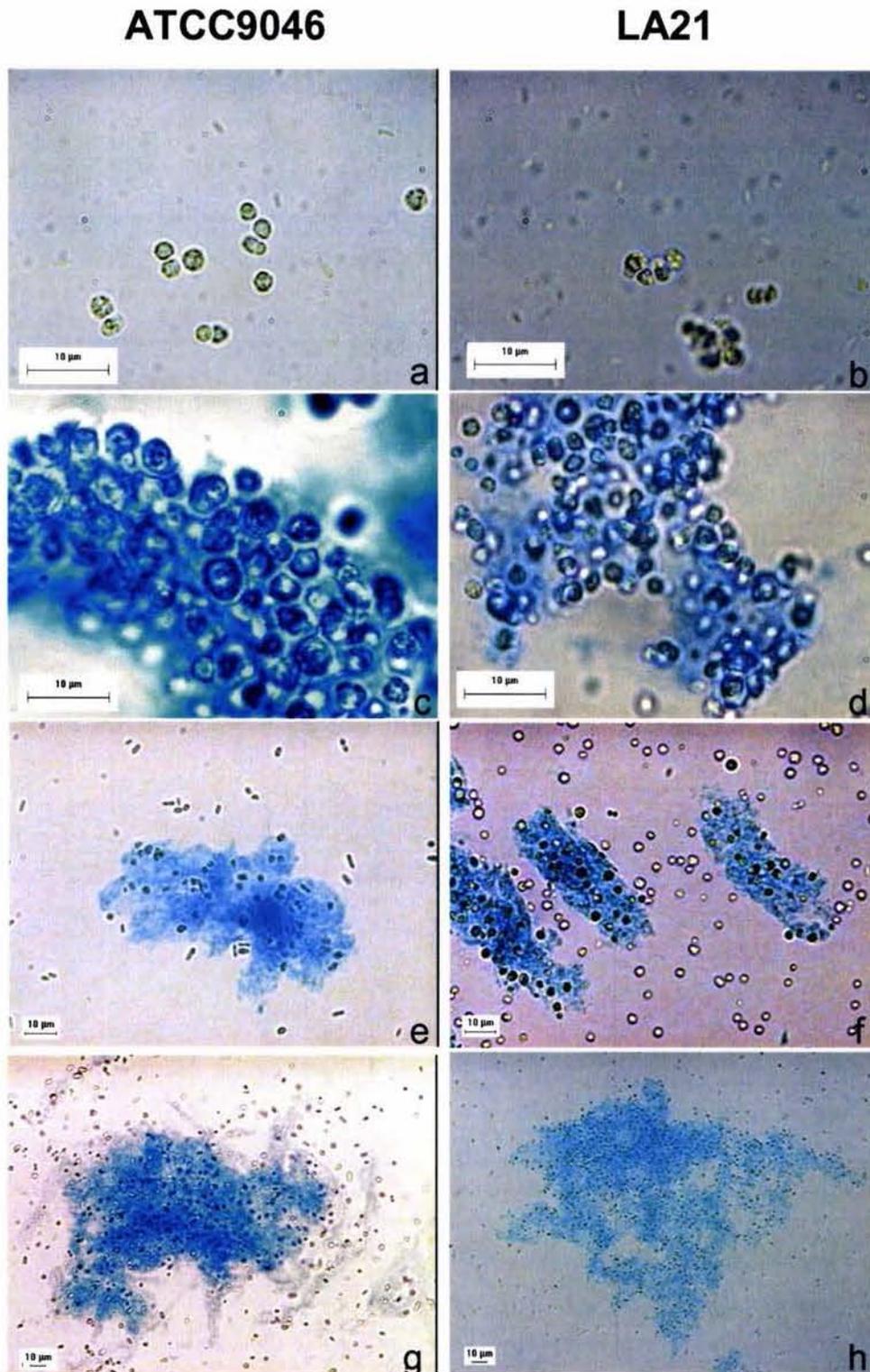


Figura 13. Células de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (a, c, e y g) y LA21 (b, d, f y h) de manera libre (a y b) y formando agregados (c-h). Objetivo utilizado 100x (a-d) 40x (e y f) y 20x (g y h).

De manera similar a lo observado en este trabajo, Wozniak et al. (2003) y Nivens et al. (2001) encontraron que cepas no mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* producen biopelículas. Christensen et al. (2001) al tratar biopelículas de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* con una enzima que degrada alginato (AlgL), no observaron cambios en la morfología de las biopelículas, por lo que sugieren que el alginato juega un papel menor y que probablemente otra sustancia polimérica extracelular (SPE) desconocida, esté involucrada en este proceso. De manera contraria, Boyd y Chakrabarty (1994) reportaron que la sobreexpresión de la proteína AlgL por *P. aeruginosa*, se relaciona con una disminución de la capacidad de adhesión celular. Sin embargo, la proteína debió sobreexpresarse hasta 100 veces más para observar este efecto. De la misma forma, Hentzer et al. (2001) reportaron que el alginato producido por *P. aeruginosa* es esencial para la formación de biopelículas. Davies et al. (1993) encontraron que células que forman parte de biopelículas de *P. aeruginosa* expresan hasta 3 veces más AlgC (enzima esencial en la síntesis de alginato), que células planctónicas, relacionando este fenómeno con la capacidad de adhesión de la bacteria.

En el presente trabajo, la cepa LA21 desarrolló agregados de un DE de  $27.8 \pm 4.1$   $\mu\text{m}$  (mediana), mientras que los agregados de la cepa ATCC9046 mostraron un DE de  $16.1 \pm 4.5$   $\mu\text{m}$ . La figura 14 muestra las distribuciones de agregados de ambas cepas, observando que los agregados de la cepa no productora de alginato tienen un mayor DE que la cepa productora del polisacárido (ANOVA tabla 3).

El mayor tamaño de los agregados de la cepa no productora de alginato, puede deberse a que esta cepa no tiene alginato en su matriz extracelular. Bos et al. (1999)

reportan 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 que la tensión superficial disminuya. 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. Por su parte, Pringle et al. (1983) reportaron que el alginato producido por *P. fluorescens*, debido a sus propiedades surfactantes, previene la adhesión de la bacteria.

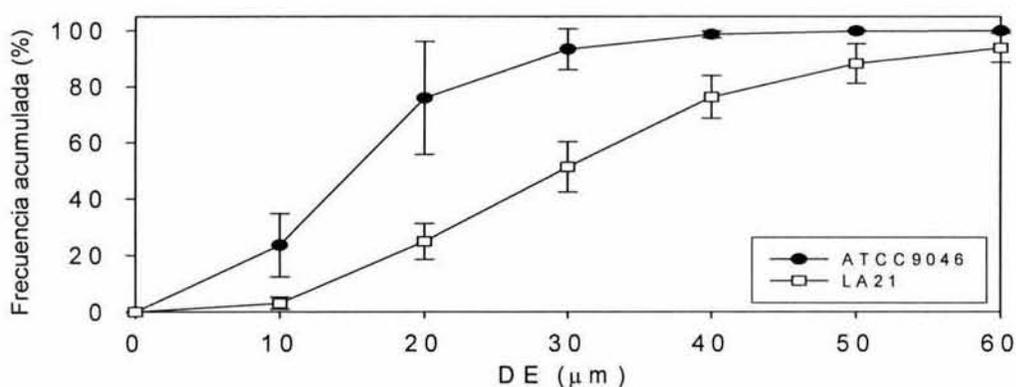


Figura 14. Comparación de distribuciones de agregados de las cepas ATCC9046 (●) y LA21 (□).

Con el propósito de identificar el peso molecular de los componentes potencialmente involucrados en la agregación, se evaluó cromatográficamente a los compuestos más asociados a las células, ya sea libres o formando parte de agregados. Para realizarlo, la fracción asociada a células y la fracción soluble (la separación se describe en la sección de Materiales y Métodos) fueron analizadas mediante un equipo de cromatografía líquida (HPLC), usando un detector refractómetro diferencial.

En la figura 15 se muestra un cromatograma de los componentes asociados a las células (a) y solubles (b), para las cepas ATCC9046 y LA21 (línea continua y punteada, respectivamente). La figura 15a muestra que en ambas cepas, un gran porcentaje de los compuestos asociados a las células se encuentran dentro del rango de PM de  $10^2$  a  $10^3$  Da (bajo peso molecular). En menor grado, se encontró otra fracción de compuestos en el rango de  $10^5$  a  $10^6$  Da (alto peso molecular). En la figura 15b, que corresponde a la fracción soluble, se observa una tercera familia de compuestos de PM en el rango de 30 a 300 Da aproximadamente, que no están presentes en la fracción asociada a células y la cual podría contener a la sacarosa residual, otros mono o disacáridos e incluso compuestos de menor PM. Los compuestos encontrados en la fracción asociada a células podrían estar involucrados en la formación de los agregados.

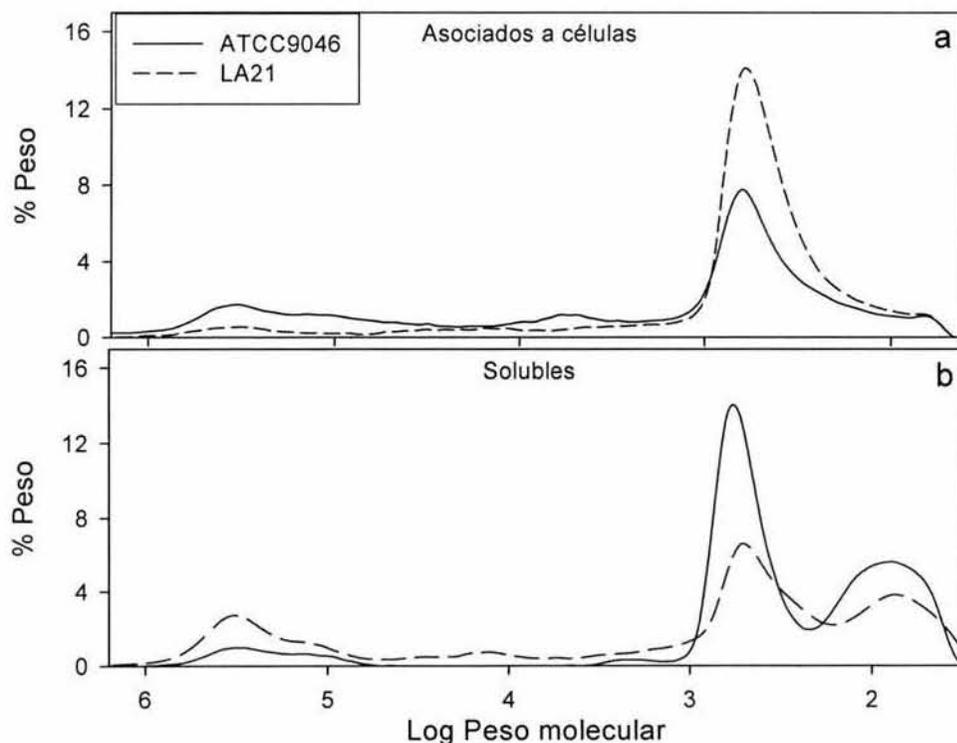


Figura 15. Cromatograma de compuestos asociados a células (a) y solubles (b) producidos por las cepas ATCC9046 (línea continua) y LA21 (línea punteada).

Con la evaluación cromatográfica solamente es posible determinar el rango de peso molecular de los compuestos presentes, sin poder establecer que tipo de compuestos se trata. Para determinarlo sería necesario emplear técnicas especializadas para compuestos específicos.

*A. vinelandii* produce otros oligosacáridos además del alginato, los cuales pueden estar involucrados en la formación de agregados. Vermani et al. (1995) reportaron que *A. vinelandii* produce un polisacárido que contiene residuos de glucosa, galactosa, fucosa, ramnosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, entre otros. Deinema y Zevenhuizen (1971) reportaron que la gran capacidad de *A. vinelandii* de formar flóculos parece relacionarse con la presencia de fibrillas de celulosa en la matriz extracelular. *Azotobacter chroococcum* produce alginato y un polisacárido formado de ramnosa, manosa y galactosa (Cote y Krull, 1988). Estos autores observaron que cepas de *A. chroococcum* que producen grandes cantidades de exopolisacáridos, forman biopelículas y se adhieren a superficies donde son cultivados. Likhosherstov et al. (1991) encontraron que *Azotobacter beijerinckii* produce alginato y un polisacárido compuesto de ramnosa, galactosa y ácido pirúvico.

En otros modelos bacterianos, diversos autores han resaltado la importancia de los exopolisacáridos producidos por los microorganismos en la formación de biopelículas (Allison y Sutherland, 1987; Boyd y Chakrabarty, 1994; 1995; Burdman et al., 1998; 2000; Danese et al., 2000; Hentzer et al., 2001; Schalkwyk et al., 2003). Burdman et al. (2000) encontraron una relación directa entre la cantidad de exopolisacáridos producidos por *Azospirillum brasilense* y el grado de agregación de la bacteria. Allison y Sutherland (1987), en un estudio de la agregación de bacterias gram negativas del mar, encontraron

que una cepa no productora de exopolisacáridos, no produce microcolonias. Por otra parte, Béchet y Blondeau (2003) reportaron que una cepa de *Aeromonas caviae* no productora de polisacáridos de cápsula se agrega más que una que sí los produce. Existe una gran discrepancia entre los trabajos realizados sobre la participación de ciertos compuestos de las SPE en la formación de biopelículas.

Con el propósito de evaluar el grado de participación de proteínas extracelulares en la formación y desarrollo de los agregados, se realizó un ensayo adicionando una proteasa inespecífica a una muestra de caldo de cultivo de las cepas ATCC9046 y LA21. Esto se realizó con el objetivo de degradar, al menos parcialmente, algunas de las proteínas extracelulares asociadas a las células y determinar si se presentan cambios en el tamaño de agregados, expresado como diámetro equivalente.

En la figura 16a se muestra el resultado del ensayo para la cepa ATCC9046, mientras que en la figura 16b el caso de la cepa LA21. Para la cepa ATCC9046 el DE de los agregados disminuyó de una mediana de  $18.8 \pm 2.1$  a  $14.9 \mu\text{m}$  (figura 16a) al tratar la muestra con la proteasa. La cepa LA21 (figura 16b) sufrió una disminución de la mediana del DE de  $26.3 \pm 6$  a  $13.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$  después del tratamiento. Estos resultados indicarían la participación de proteínas extracelulares en la agregación de *A. vinelandii*.

La disminución en el tamaño de agregados después del tratamiento con la proteasa fue más evidente en la muestra de la cepa no mucoide, posiblemente debido a que el alginato dentro de los agregados de la cepa ATCC9046 está actuando como barrera

difusional a la acción de las enzimas. En el caso de la cepa que no produce alginato, las proteínas estarían más expuestas a la proteasa, siendo más drástica la disminución en el DE de sus agregados (figura 16).

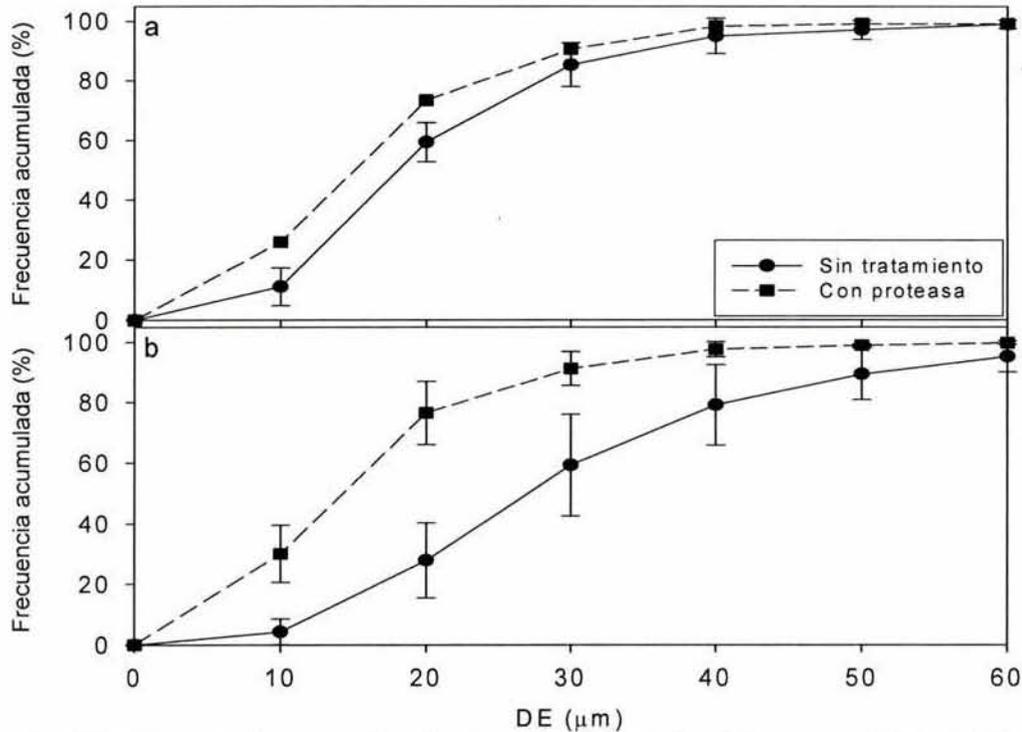


Figura 16. Distribución de agregados de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (a) y cepa LA21 (b) sin tratamiento (línea continua) y al añadir una proteasa a la muestra (línea punteada).

El hecho de que, incluso después de la incubación de la muestra de la cepa LA21 con la proteasa (4 h), se continuaron observando numerosos agregados, nos puede indicar que el tiempo de incubación no fue suficiente para eliminar los agregados o que existe otro componente, además de proteínas, involucrado en la formación de estas estructuras. En la figura 17a se observa una microfotografía de un agregado de la cepa LA21 sin tratamiento, mientras que en la figura 17b se presenta un agregado después del tratamiento con la

proteasa. La muestra a la cual se le agregó la proteasa aún presenta una matriz alrededor de las células, de componentes no identificados hasta el momento.

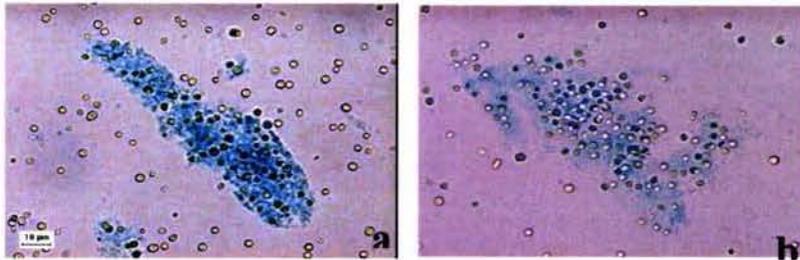


Figura 17. Imágenes de agregados de *Azotobacter vinelandii*, cepa LA21, sin tratamiento (a) y al añadir una proteasa a la muestra (b).

Dufrêne et al. (1996) encontraron que el aumento en la producción de proteínas por *Azospirillum brasilense* favorece la formación de agregados. Por su parte, Burdman et al. (1999) trataron con una proteasa (proteínasa K) a cultivos de *A. brasilense*, encontrando que el índice de agregación disminuye considerablemente. Jahn et al. (2000) reportaron que las proteínas de biopelículas de *Pseudomonas putida*, llegan a ocupar hasta un 75 % del total de las SPE. Sauer et al. (2002) observaron que los flagelos son necesarios para la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos en el ensayo de adición de proteasa podrían indicar que proteínas de la membrana externa están participando en el proceso de agregación de *A. vinelandii*.

Como se mencionó anteriormente, la cepa LA21 (no mucoide) desarrolló agregados de mayor tamaño que la cepa ATCC9046 (productora de alginato). Para evaluar la relación de la concentración de proteína extracelular con la agregación, se determinó la concentración de proteína extracelular presente en la fracción asociada a las células de ambas cepas. La concentración específica de proteína extracelular presente en los extractos

de ambas cepas fue similar, encontrándose  $6.24 \pm 1.2 \mu\text{g}/10^8$  células para la cepa ATCC9046 y  $4.47 \pm 2.2 \mu\text{g}/10^8$  células para la cepa LA21.

Aunque no existen diferencias significativas entre la concentración de proteína asociada a las células de ambas cepas, podría ocurrir que el patrón de proteínas expresadas en uno y otro caso sea distinto. Para tratar de determinar alguna posible diferencia en este sentido, se realizó una cromatografía en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas extracelulares de ambas cepas.

En la figura 18 se muestra el patrón de proteínas extracelulares de la cepa ATCC9046 (primer carril) y de la cepa LA21 (segundo carril). Los patrones de proteínas extracelulares de ambas cepas son diferentes. Las bandas que corresponden a 61 y 53 kDa (aproximadamente) son más intensas para la ATCC9046, mientras que la banda que corresponde a 47 kDa y el conjunto de bandas entre los 28 y 32 kDa aparece más intensa para el caso de la cepa LA21. La diferencia en intensidades no se debe a la concentración de proteína ya que fue cargada la misma concentración para cada muestra (10  $\mu\text{g}$ ). Hasta el momento se desconoce a que tipo de proteínas corresponden estas bandas.

Burdman et al. (1999) evaluaron los perfiles de proteína extracelular de distintas cepas de *Azospirillum brasilense* con diferentes capacidades de agregación, mas no encontraron diferencias significativas que permitieran explicar la variación en los comportamientos de agregación. Burdman et al. (2001) postularon que una proteína de la membrana externa (aproximadamente 40 kDa) parece participar en el proceso de

agregación de la bacteria. De la misma manera, Pringle et al. (1983) no encontraron diferencias al analizar los perfiles de proteína de membrana externa de cepas de *P. fluorescens* con distintas capacidades de adhesión.

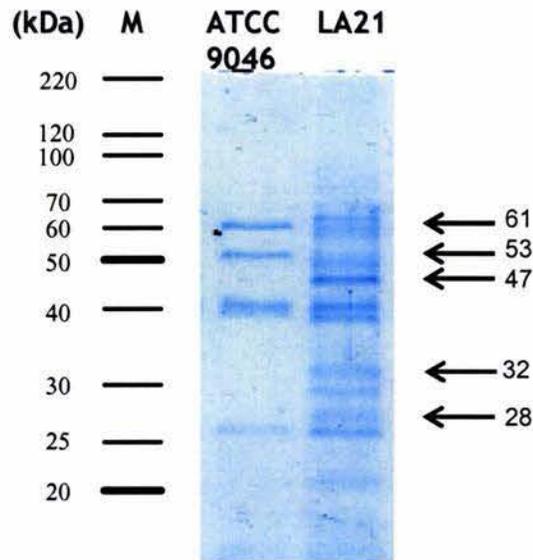


Figura 18. Gel de poliácridamida de proteínas presentes en el caldo de cultivo de las cepas ATCC9046 (primer carril) y LA21 (segundo carril) de *A. vinelandii*. M, representa los estándares de peso molecular, expresado en kDa.

### 6.3. Papel del alginato en la morfología de agregados

#### 6.3.1. Características del alginato sintetizado

Como se mencionó anteriormente, al evaluar la morfología de *A. vinelandii*, se encontró que la cepa productora de alginato desarrolló agregados con un DE menor al de los agregados de la cepa LA21. El alginato producido por la bacteria parece tener un efecto negativo en la formación del agregado, como se ha reportado para otros microorganismos.

Para determinar en que grado las características del alginato, como su peso molecular, la viscosidad de sus soluciones o su composición, pueden estar involucrados en

la formación y estructura de los agregados, se buscó inducir la síntesis de alginato con distintas características, variando la concentración de calcio del medio de cultivo. Siete de las enzimas epimerasas codificadas en el genoma de *Azotobacter vinelandii* son dependientes de calcio, por lo que se espera que al variar la concentración de calcio del medio de cultivo, se presenten variaciones en la composición del alginato (proporción de G y M) y como consecuencia, posiblemente en la viscosidad (Clementi et al., 1999).

En la figura 19 se muestra el comportamiento de la concentración de alginato producido, la concentración celular desarrollada, la viscosidad de los caldos, el peso molecular promedio (PMP), el índice de polidispersión (IP) y la relación G/M del alginato en respuesta a la variación de la concentración de calcio del medio de cultivo. El análisis estadístico de cada uno de estos parámetros se muestra en la tabla 5 (anexo).

La concentración de alginato producido y la concentración celular (figura 19a) permanecen constantes, independientemente de la concentración de  $\text{CaSO}_4$  añadida ( $2.74 \pm 0.82$  g/L y  $4.73 \times 10^8 \pm 0.9 \times 10^8$  cel/mL respectivamente). Este comportamiento es similar al obtenido por otros autores (Annison y Couperwhite, 1986; Martins et al., 1990; Obika et al., 1992; Körstgens et al., 2001) quienes al variar la concentración de calcio del medio de cultivo (en el mismo rango evaluado en el presente trabajo) de *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*, no encontraron variación significativa en la concentración de alginato y biomasa.

En cuanto a la viscosidad de los caldos de cultivo (figura 19b) se observó que a concentraciones menores a 50 mg  $\text{CaSO}_4$ /L se presenta una región de alta viscosidad ( $314 \pm$

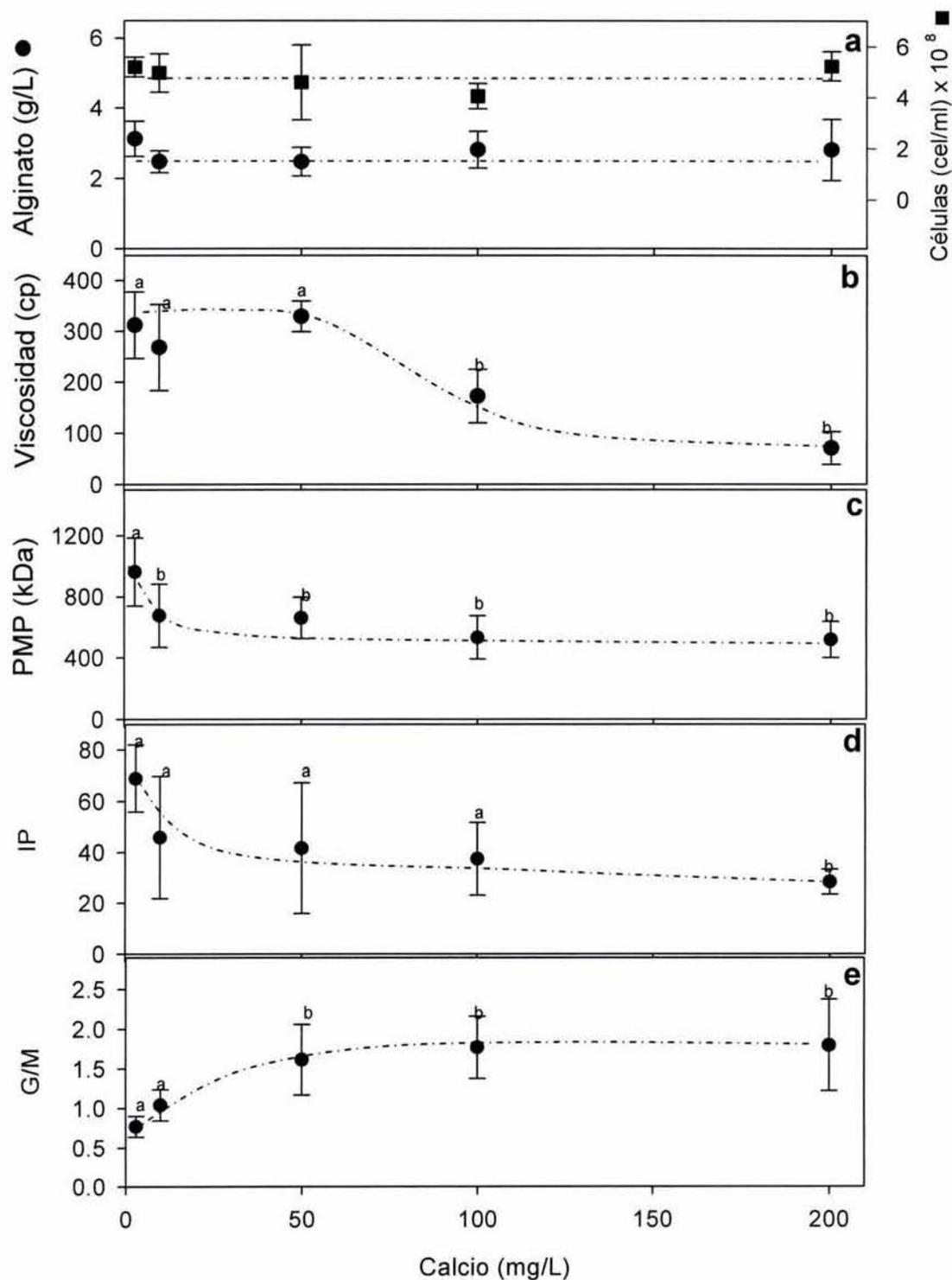


Figura 19. Concentración celular y de alginato (a), viscosidad del caldo de cultivo (b), PMP (c), IP (d) y relación G/M (e) de alginato sintetizado por *A. vinelandii* (cepa ATCC9046) en respuesta a la variación de la concentración de calcio (las letras sobre los puntos representan diferencias estadísticas).

44 cps), mientras que a concentraciones superiores se desarrollaron caldos con viscosidades bajas ( $78 \pm 32$  cps). McHugh (1987) reportó que hasta una concentración de 70 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ , el ión puede aumentar la viscosidad de soluciones de alginato, mientras que a concentraciones mayores a 100 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ , favorece la formación de geles de alginato y la viscosidad disminuye. Sin embargo, estos datos corresponden a soluciones de alginato de composición constante, mientras que en nuestro caso, se tienen distintas proporciones de M y G en el rango de 3 a 50 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  (figura 19e). A 100 y 200 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  se observaron partículas precipitadas en el fondo de los matraces, lo que indicaría que en estos puntos disminuye la viscosidad debido a que algunas partículas de alginato se encuentran asociadas y ya no están en suspensión.

El PMP (figura 19c) fue máximo a 3 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ , alcanzando un valor de  $963.3 \pm 220$  kDa. A niveles superiores de  $\text{CaSO}_4$  (10, 50, 100 y 200 mg/L), se obtuvo un PMP menor (hasta  $520 \pm 120$  kDa), sin mostrar diferencias estadísticas después de los 10 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ . En la figura 19d se observa que el IP del alginato producido es alto en la región comprendida entre 3 y 100 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  ( $68.9 \pm 13$ ), mientras que a 200 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  este parámetro disminuye ( $28.3 \pm 5$ ).

En la figura 19e se muestran los valores de la relación G/M, encontrando que en el rango de 3 a 50 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  éste parámetro aumentó de  $0.7 \pm 0.15$  a  $1.5 \pm 0.5$  (respectivamente). A concentraciones superiores de  $\text{CaSO}_4$ , la relación G/M permaneció constante. De manera similar, Annison y Couperwhite (1986) observaron un aumento de la relación G/M de 0.7 a 1.2, al aumentar la concentración de calcio del medio de cultivo de *A. vinelandii*, de 10 a 100 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ , mientras que a concentraciones superiores de

CaSO<sub>4</sub>, la relación G/M permaneció constante. Obika et al. (1992), al cultivar *A. vinelandii*, obtuvieron un aumento de la relación G/M de 0.12 a 3, al aumentar la concentración de calcio de 12 a 125 mg CaSO<sub>4</sub>/L. Se ha reportado que la concentración de residuos G aumenta de manera directa con la concentración de calcio dentro de ciertos rangos, mientras que a altas concentraciones ( $\geq 340$  mg CaSO<sub>4</sub>/L) la enzima se inactiva, produciendo alginatos exclusivamente con residuos M (Annison y Couperwhite, 1986).

Así, el calcio influye tanto en la biosíntesis como en la conformación molecular del alginato (Svanem et al., 2001; Valla et al., 2001). En el presente estudio no es posible discriminar un efecto del otro, debido a que están íntimamente relacionados y tanto la viscosidad como la conformación molecular, pueden ser el resultado de ambos efectos.

A bajas concentraciones ( $< 50$  mg CaSO<sub>4</sub>/L), el calcio puede estar interviniendo principalmente en el proceso de biosíntesis de la molécula, aumentando la concentración de residuos G al aumentar la concentración del catión (figura 19e y figura 20, paso 1 a 3). En estas condiciones se desarrollaron caldos de alta viscosidad. Como ya fue mencionado, la viscosidad es función de varios factores, entre ellos la concentración de alginato, el peso molecular, la composición del alginato y la presencia de iones (Sabra et al., 2001). Para el experimento en el que se agregó 3 mg CaSO<sub>4</sub>/L, la alta viscosidad se relaciona con un alto valor de peso molecular del alginato. Sin embargo, para 10 y 50 mg CaSO<sub>4</sub>, el PM del alginato disminuye casi 400 kDa sin repercutir en la viscosidad. La presencia del catión podría estar provocando que se mantenga una alta viscosidad en estos caldos aunque el PMP haya disminuido ya que, según lo reportado por McHugh (1987), a bajas concentraciones ( $\leq 70$  mg CaSO<sub>4</sub>/L), el calcio aumenta la viscosidad de las soluciones de

alginato, sin necesidad de aumentar la concentración del polisacárido debido a que favorece las interacciones entre moléculas.

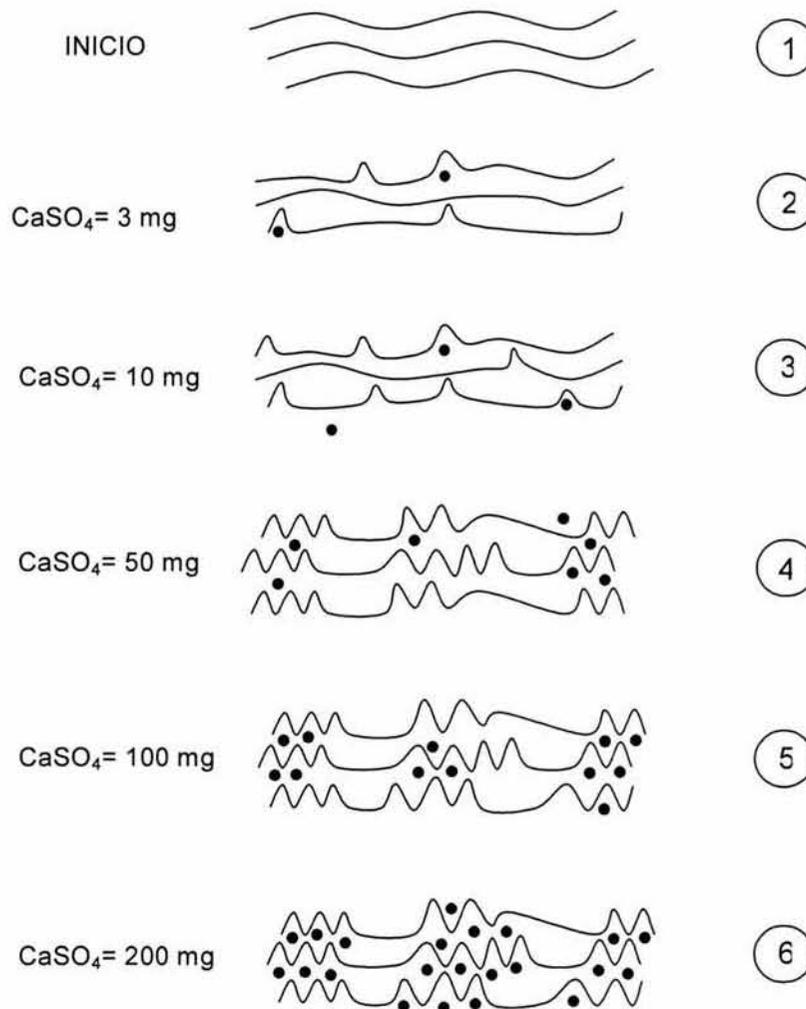


Figura 20. Diagrama del comportamiento de las moléculas de alginato en respuesta a la presencia de calcio en el medio de cultivo

A 50 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  y concentraciones superiores, el calcio puede estar influyendo principalmente en la conformación de la molécula de alginato ya que la concentración de residuos G permaneció constante tanto a 100 como 200 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ . Los caldos desarrollaron bajas viscosidades. Annison y Couperwhite (1986) observaron que una concentración de 50 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  es óptima para la síntesis de alginatos con un alto

contenido en residuos G, característica que favorece la formación de geles mediados por calcio. Estos autores reportaron que a concentraciones  $\geq 70$  mg CaSO<sub>4</sub>/L, los bloques G del alginato y el catión se asocian, generando estructuras del tipo ‘caja de huevos’ (figura 20 paso 4 a 6). La presencia de partículas en el fondo de los matraces a 100 y 200 mg CaSO<sub>4</sub>/L apoyaría la suposición de que en estos puntos se incrementan las asociaciones intramoleculares hasta el punto de provocar la disminución de la viscosidad (figura 19b).

### **6.3.2. Influencia del alginato en la morfología de agregados**

El siguiente objetivo consistió en evaluar el efecto de la composición, el peso molecular del alginato sintetizado por *A. vinelandii* y la viscosidad de sus caldos en la formación y morfología de los agregados desarrollados.

En la figura 21 se consignan las curvas de distribución del DE de agregados generados bajo distintas concentraciones de CaSO<sub>4</sub> con respecto al DE como parámetro de tamaño (figura 21a) y la circularidad como parámetro de forma (figura 21b). El ANOVA (tabla 4) de dichas curvas de distribución mostró que todas las muestras son iguales estadísticamente, es decir, las características del alginato producido no tienen un efecto sobre el tamaño o forma de los agregados.

Peña et al. (2002a) midieron el cambio del DE de agregados como función del tiempo de cultivo, observando que el DE aumenta de un promedio de 9  $\mu$ m a las 30 h del cultivo, hasta 35  $\mu$ m a las 72 h. Estos autores proponen que las diferencias en el tamaño de agregados están relacionadas con la producción de alginato y el alto peso molecular del polisacárido. Sin embargo, estos autores incluyeron en sus distribuciones a células y

agregados de manera conjunta. La desventaja de este método es que la evaluación de una población que contiene un mayor porcentaje de células libres, dará como resultado una distribución que muestra menor tamaño, mientras una población que incluye una menor proporción de células libres, mostrará una distribución de mayor tamaño. Es decir, se podría estar midiendo indirectamente la frecuencia de agregación (porcentaje de las células totales que se encuentran formando parte de agregados), en lugar del tamaño de agregados.

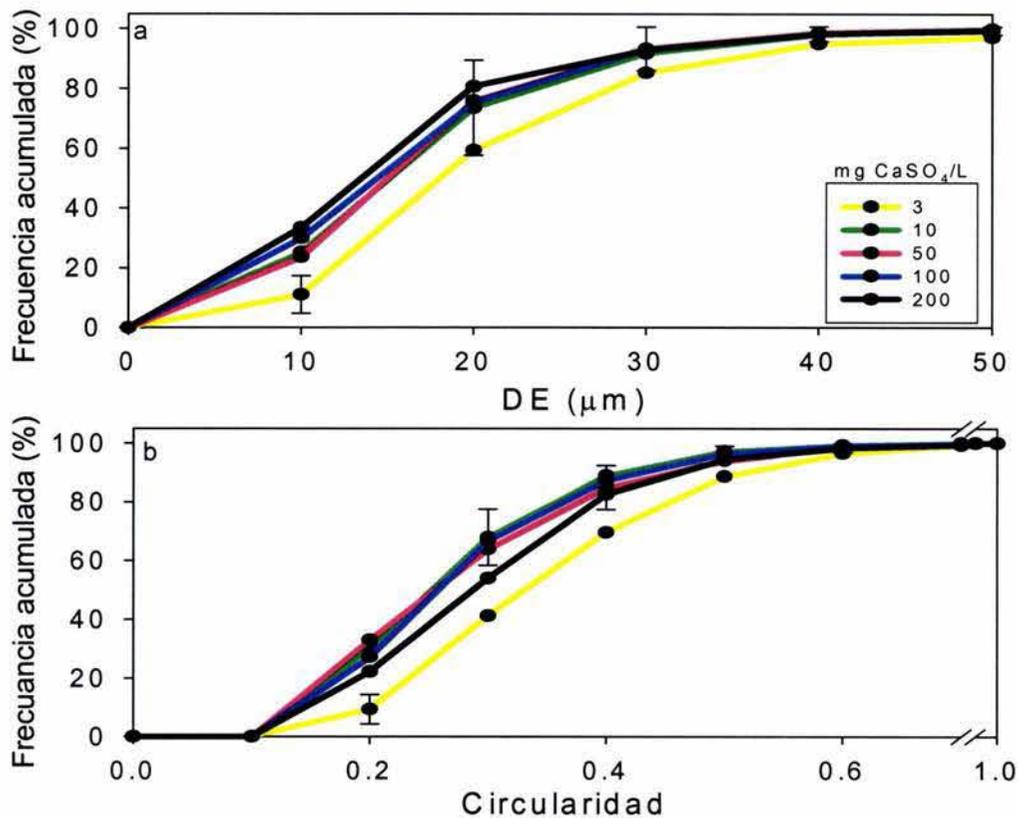


Figura 21. Frecuencia acumulada de agregados de *A. vinelandii* en respuesta a la variación de calcio del medio, con respecto al DE (a) y la circularidad (b). Se muestran ejemplos de barras de desviación estándar para cada una de las muestras.

Yang et al. (2000) reportaron que el tamaño de los agregados celulares o espacios intersticiales, pueden estar asociados a variaciones en la población y el estado nutricional.

Gjaltema et al. (1994), Stoodley et al. (1999), Yang et al. (2000), Beyenal y Lewandowski (2002) y Purevdorj et al. (2002) observaron que la forma de la biopelícula se asocia principalmente con la hidrodinámica del cultivo. En las diferentes condiciones evaluadas en el presente trabajo, no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración celular, razón por la cual probablemente no se encuentren diferencias en el tamaño de agregados. Aunque la viscosidad es distinta en algunos puntos evaluados y éste parámetro puede influir en las condiciones hidrodinámicas del cultivo, esta variación no fue suficiente para reflejarse en diferencias en la forma de los agregados.

Se determinó la frecuencia de agregación, es decir, la cantidad de agregados por unidad de volumen de las cepas ATCC9046 y LA21 cultivadas con distintas concentraciones de calcio en el medio. Este análisis se realizó utilizando la cámara de Neubauer y los resultados se reportan como agregados/ mililitro.

En la figura 22 se presenta la frecuencia de agregación de la cepa ATCC9046 (círculos y línea continua) y de la cepa LA21 (cuadros y línea punteada). Para la cepa ATCC9046 se observa una región de alta frecuencia de agregación ( $7.3 \pm 0.4 \times 10^5$  agr/mL) en los experimentos en los cuales se agregó de 3 a 100 mg CaSO<sub>4</sub>/L. En el cultivo con 200 mg/L, la frecuencia de agregación disminuyó drásticamente hasta  $2.1 \pm 1 \times 10^5$  agr/mL. Para el caso de la cepa LA21, la frecuencia de agregación es similar en las distintas concentraciones de calcio en el medio de cultivo ( $1.5 \pm 0.6 \times 10^5$  agr/mL), excepto para el experimento donde se agregó 100 mg/L, en el cual se encontró una menor frecuencia ( $0.58 \pm 0.12 \times 10^5$  agr/mL). Todos los valores de agregación de la cepa LA21 fueron menores estadísticamente que los observados para la cepa ATCC9046 (ANOVA tabla 8).

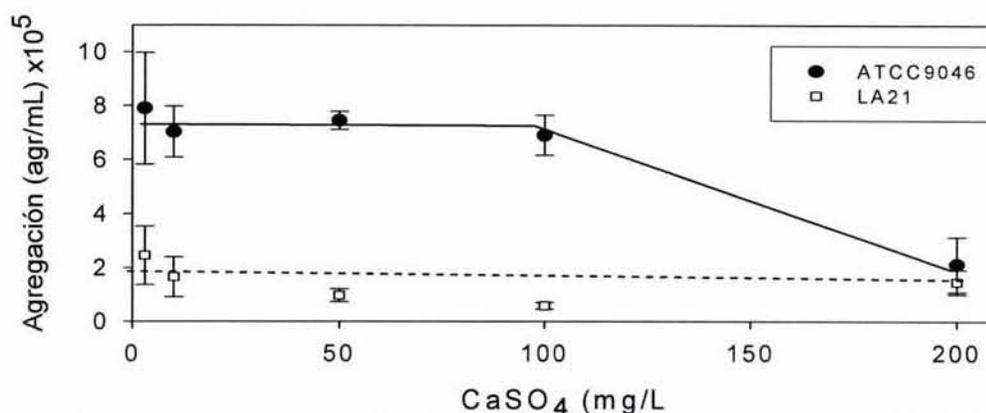


Figura 22. Frecuencias de agregación de *Azotobacter vinelandii*, cepa ATCC9046 (●) y cepa LA21 (□) cultivadas con distintas concentraciones de CaSO<sub>4</sub> en el medio.

Para la cepa ATCC9046, en el cultivo al cual se agregó 200 mg CaSO<sub>4</sub>/L se obtuvo una frecuencia de agregación hasta 70 % menor que los cultivos con concentraciones menores de calcio. En todas las condiciones evaluadas se observó una capa de sólidos adheridos en las paredes del matraz, pero en el cultivo al cual se agregó 200 mg CaSO<sub>4</sub>/L al medio de cultivo se observó mayor adhesión de sólidos (figura 23) con respecto al resto de los matraces. Como ya se mencionó, en esta condición se observaron sólidos en el fondo de los matraces, observables a simple vista. Los sólidos adheridos a las paredes y en el fondo de los matraces podrían incluir células, lo que disminuiría su proporción en suspensión, explicando el bajo valor de frecuencia de agregación observado en este punto.

Probablemente la alta concentración de calcio favorece que las células se adhieran a las paredes del matraz. Bos et al. (1999) menciona que el calcio puede ser absorbido por los componentes de la superficie de las células microbianas lo que incrementa su hidrofobicidad y muestran mayor capacidad de adherirse unas a otras. Zita y Hermansson (1994) describieron el papel de los cationes divalentes en la formación de flóculos en

términos de la teoría Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO). Según esta teoría, la presencia de cationes reduce la separación entre bacterias cargadas negativamente, promoviendo la agregación o floculación. Higgins y Novak (1997) proponen que los cationes están involucrados en la floculación participando como puentes iónicos.

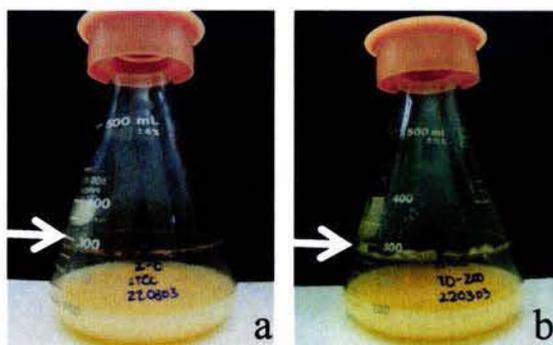


Figura 23. Matraces con cultivos de la cepa ATCC9046 para la condición de cultivo de 3 (a) y 200 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$  (b). Las flechas indican los puntos en los cuales se observó adhesión de sólido en las paredes.

Por otra parte, la cepa ATCC9046 (excepto en la condición donde se agregan 200 mg  $\text{CaSO}_4/\text{L}$ ) desarrolló una frecuencia de agregación casi 5 veces mayor que la cepa LA21. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los agregados de la cepa no productora de alginato fueron significativamente mayores que los generados por la cepa productora del polisacárido. Probablemente las propiedades surfactantes del alginato impiden que los agregados alcancen grandes tamaños (como en el caso de la cepa mutante), generando una mayor concentración de agregados pequeños. Sutherland (2001a) y Hall-Stoodley et al. (2004) mencionan a la producción de SPE con propiedades surfactantes, como una estrategia de dispersión de las biopelículas, para la colonización de nuevos nichos.

Sería necesario identificar a los compuestos involucrados en la formación de los agregados y determinar posibles diferencias que se estén presentando, ya sea respecto a la concentración o en sus características, en las distintas condiciones de cultivo. Esto permitiría determinar una posible relación de las características y concentraciones relativas de estos componentes con el patrón de agregación de la bacteria. Sutherland (2001a) postuló que cuando se genera una biopelícula, las señales ambientales pueden estimular que las bacterias sinteticen polímeros de composición distinta a la contraparte planctónica, o que se presenten diferencias en el grado de acetilación o el peso molecular de estos compuestos. Nivens et al. (2001) encontraron que una mayor adhesión celular de *P. aeruginosa* se relaciona con un alginato con un mayor grado de acetilación.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un esquema del proceso de formación de agregados por *A. vinelandii*:

Las condiciones hidrodinámicas bajo las cuales es cultivada la bacteria van a determinar la formación y el desarrollo de agregados celulares. Bajas velocidades de agitación y poca oxigenación favorecen la formación de estas estructuras (Peña et al., 1997; 2000; 2002a).

Compuestos producidos por *A. vinelandii*, como proteínas o polisacáridos, pueden intervenir en el proceso de agregación. Una vez que un conjunto de células se adhieren, inicia el desarrollo de la biopelícula y como parte de este proceso se sobreproducen sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Hall-Stoodley et al., 2004). El alginato forma parte de estas SPE y al parecer tiene un efecto negativo en el crecimiento de estas

estructuras, debido a sus propiedades surfactantes. Factores como el peso molecular, la composición del alginato y la viscosidad de los caldos de cultivo, parecen no tener influencia en la formación de estas estructuras.

En las condiciones de cultivo que favorecen la agregación, es común encontrar una gran proporción de alginatos de alto peso molecular. En numerosos trabajos enfocados al estudio de biopelículas bacterianas, han reportado la existencia de gradientes nutricionales y de oxígeno (de Beer et al., 1994; Møller et al., 1996; Xu et al., 1998; 2001; Sauer et al., 2002; Stewart, 2003). Incluso, algunos autores han encontrado velocidades reducidas de crecimiento o estados estacionarios en las células que se encuentran dentro de biopelículas (Boyd y Chakrabarty, 1995; Møller et al., 1996; Xu et al., 1998; Stoodley et al., 2002). Saude y Junter (2002) observaron que células de *A. vinelandii* inmovilizadas en películas de agar, producen alginatos de mayor peso molecular que las células en estado libre. Las biopelículas podrían compararse con células inmovilizadas. Priego y Galindo (2003) observaron que la velocidad de crecimiento de *A. vinelandii*, tiene influencia en el peso molecular del alginato sintetizado. Estos autores encontraron que, de manera general, al disminuir la velocidad de crecimiento de la bacteria, se sintetiza un alginato de mayor peso molecular. La baja velocidad de crecimiento que pudiera presentarse en las células dentro de los agregados podría ser la causa de la síntesis de alginatos de alto peso molecular, en las condiciones de cultivo que favorecen la presencia de agregados.

## 7. Conclusiones

- La técnica de análisis de imágenes desarrollada permite caracterizar adecuadamente la población de agregados presentes en el caldo de cultivo.
- El alginato parece tener un efecto negativo en la formación de agregados celulares por *Azotobacter vinelandii*.
- Polisacáridos y proteínas extracelulares producidos por *A. vinelandii*, pueden tener un papel importante en el proceso de agregación.
- Las diferencias en viscosidad de los caldos, el peso molecular y la composición del alginato sintetizado, no afecta el diámetro equivalente ni la circularidad (como parámetros del tamaño y la forma) de los agregados.
- Las células que forman parte de los agregados podrían tener una menor velocidad de crecimiento con respecto a las células libres, lo que causaría que en las condiciones de cultivo que favorecen la formación de agregados se sinteticen alginatos con un alto peso molecular.

## 8. Referencias bibliográficas

- Allison, D., Sutherland, I., 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1319-1327.
- Annison, G., Couperwhite, I., 1984. Consequences of the association of calcium with alginate during batch culture of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 321-325.
- Annison, G., Couperwhite, I., 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 55-61.
- Azeredo, J., Meinders, J., Feijó, J., Oliveira, R., 1997. Determination of cell number and size of a population of *Pseudomonas fluorescens* by image analysis. *Biotechnol. Techniques* 11, 355-358.
- Béchet, M., Blondeau, R., 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1072-1078.
- Beyenal, H., Lewandowski, Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnol. Prog.* 18, 55-61.
- Biggs, C., Ford, A., Lant, P., 2001. Active sludge flocculation: direct determination of the effect of calcium ions. *Wat. Sci. Tech.* 43, 75-80.
- Bloem, J., Veninga, M., Sheperd, J., 1995. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volume, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 926-936.
- 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.
- Boyd, A., Chakrabarty, A., 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *App. Environ. Microbiol.* 60, 2355-2359.
- Boyd, A., Chakrabarty, A., 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.* 15, 162-168.

- Braccini, I., Pérez, S., 2001. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup> induced gelation in alginates and pectins: the Egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2, 1089-1096.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Hampel, M., Okon, Y., 1998. Aggregation of *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiol.* 144, 1089-1999.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Okon, Y., 1999. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 145, 1145-1152.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M., Gil Serrano, A., Okon, Y., 2000. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 259-264.
- 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.
- Center for Biofilm Engineering, 2004. [www.erc.montana.edu](http://www.erc.montana.edu).
- 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.
- Clementi, F., Crudele, M., Parente, E., Mancini, M., Moresi, M., 1999. Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J. Sci. Food Agric.* 79, 602-610.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H., 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Cote, G., Krull, L., 1988. Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*. *Carbohydr. Res.* 181, 143-152.
- Danese, P., Pratt, L., Kolter, R., 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182, 3593-3596.
- Davies, D., Chakrabarty, A., Geesey, G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1181-1186.

- de Beer, D., Stoodley, P., Foe F., Lewandowski, Z., 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131-1138.
- de Boer, J., Cronenberg, C., de Beer, D., van den Heuvel, J., Teixeira de Mattos, M., Neijssel, O., 1993. pH and glucose profiles in aggregates of *Bacillus laevolacticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2474-2478.
- Deinema, M., Zevenhuizen, L., 1971. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Arch. Mikrobiol.* 78, 42-57.
- Draget, K., Steinsvåg, K., Onsøyen, E., Smidsrød, O., 1998. Na- and K-alginate; effect on Ca<sup>2+</sup> gelation. *Carbohydr. Polym.* 35, 1-6.
- Draget, K., 2001. Alginates from Algae. In: *Biopolymers*. Volume 6. Ed. Wiley-VCH, Alemania, pp. 215-224.
- Drenkard, E., Ausbel, F., 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740-743.
- Dufrêne, Y., Boonaer, J., Rhouxhet, P., 1996. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of the surface composition of *Azospirillum brasilense* in relation with growth conditions. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 7, 113-128.
- Ertesvåg, H., Valla, S., Skjåk- Bræk, G., 1996. Genetics and biosynthesis of alginates. *Carbohydr. Europe* 14, 14-18.
- Espín, G., 2002. *Biología de Azotobacter vinelandii*. En: *Microbios en línea*. [www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html](http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html).
- FAO, 2003. [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Gacesa, P., 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8, 161-182.
- Gacesa, P., 1998. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiol.* 144, 1133-1143.
- Geddie, J., Sutherland, I., 1994. The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20, 117-129.
- Gjaltema, A., Arts, P., van Loosdrecht, M., Kuenen, J., Heijnen, J., 1994. Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors: occurrence, structure, and consequences. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 194-204.
- Gómez-Suárez, C., Pasma, J., van der Borden, A., Wingender, J., Flemming H., Busscher, H., van der Mei, H., 2002. Influence of extracellular polymeric substances on

- deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiol.* 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.
- Hentzer, M., Teitzel, G., Balzer, G., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M., 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J. Bacteriol.* 183, 5395-5401.
- Higgins, M., Novak, J., 1997. The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: laboratory results. *Water Environ. Res.* 69, 215-225.
- Huang, C., Philip, S., McFeters, G., 1998. The study of microbial biofilms by classical fluorescence microscopy. In: *Digital image analysis of microbes*. Wiley and Sons Ltd. England, pp. 411-429.
- Ingle, J., Crouch, S., 1988. Atomic absorption spectrophotometry. In: *Spectrochemical analysis*. Prentice-Hall. U.S.A., pp. 273-305.
- Jahn, A., Griebe, T., Nielsen, P., 2000. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* 14, 49-57.
- Knutson, C., Jeanes, A., 1968. A new modification of the carbazol analysis: Application to heteropolysaccharides. *Anal. Biochem.* 24, 470-481.
- Körstgens, V., Flemming, H., Wingender, J., Borchard, W., 2001. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Wat. Sci. Tech.* 43, 49-57.
- Lee, W., Day, D., 1995. Bioacetylation of seaweed alginate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 650-655.
- Likhoshesterov, L., Senchenkova, S., Shashkov, A., Derevitskaya, V., Danilova, I., Botvinko, I., 1991. Structure of the major exopolysaccharide produced by *Azotobacter beijerinckii* B-1615. *Carbohydr. Res.* 222, 233-238.
- Li, X., Yuan, Y., 2002. Collision frequencies of microbial aggregates with small particles by differential sedimentation. *Environ. Sci. Technol.* 36, 387-393.
- Martins, L., Brito, L., Sá-Correia, I., 1990. Roles of Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12, 794-799.

- Mas, S., Ghommidh, C., 2001. On-line size measurement of yeast aggregates using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 91-98.
- McHugh, D., 1987. Production, properties and uses of alginates. In: Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288, 189-236.
- McHugh, D., 2002. La industria de las algas marinas. En: Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. FAO Circular de Pesca. No.968. Roma.
- Mejía-Ruíz, 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.
- Merrington, M., Thompson, C., 1943. Tables of percentage points of the inverted beta (F) distribution. *Biometrika*, 33, 73.
- Millsap, K., der Mei, H., Bos, R., Busscher, H., 1998. Adhesive interactions between medically important yeasts and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 321-336.
- Møller, S., Pedersen, A., Poulsen, L., Arvin, E., Molin, S., 1996. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4632-4640.
- 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.
- Obika H., Sakakibara, J., Kobayashi, Y., 1992. Direct control of the constituent's ratio in a wide range in alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 332-333.
- O'Shea, D., Walsh, P., 2000. The effect of culture conditions on the morphology of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415: a study incorporating image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 316-322.
- O'Toole, G., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304.
- Pazouki, M., Panda, T., 2000. Understanding the morphology of fungi. *Bioproc. Eng.* 22, 127-143.

- Peña, C., Campos, M., 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., 1998. Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de doctorado, Instituto de Biotecnología-UNAM, México.
- 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 Microbiol. Technol.* 27, 390-398.
- Peña, C., Reyes, C., Larralde-Corona, P., Corkidi, G., Galindo, E., 2002a. Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 207, 173-177.
- Peña, C., Reyes, C., Larralde-Corona, P., Corkidi, G., Galindo, E., 2002b. Influencia del calcio y el peso molecular del alginato en la agregación de *Azotobacter vinelandii* en cultivo sumergido. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Microbiología.* Monterrey, México.
- Priego, R., Galindo, E., 2003. Producción de alginatos microbianos a bajas velocidades de crecimiento de *Azotobacter vinelandii*. *Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Puerto Vallarta, México.
- Pringle, H., Fletcher, M., Ellwood, D., 1983. Selection of attachment mutants during the continuous culture of *Pseudomonas fluorescens* and relationship between attachment ability and surface composition. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2557-2569.
- Purevdorj, B., Costerton, J., Stoodley, P., 2002. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4457-4464.
- Rehm, B., Valla, S., 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 281-288.
- Reyes, C., 2000. Cuantificación de la agregación de *Azotobacter vinelandii* por medio de análisis de imágenes y su impacto en la producción de alginato. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, México.

- Sabra, W., Zeng, A., Deckwer, W., 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 315-325.
- Saude N., Junter, A., 2002. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Biochem.* 37, 895-900.
- Sauer, K., Camper, A., Ehrlich, G., Costerton, J., Davies, D., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154.
- Schalkwyk, C., Joubert, H., Britz, T., 2003. Extracellular polymer production and potential for aggregate formation by classical propionibacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 285-289.
- Sobeck, D., Higgins, M., 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Res.* 36, 527-538.
- Stewart, P., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485-1491.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J., Lappin-Scott, H., 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* 85, 19s-28s.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., Costerton, J., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
- Sutherland, I., 1994. Structure-Function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12, 393-448.
- Sutherland, I., 2001a. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Wat. Sci. Tech.* 43, 77-86.
- Sutherland, I., 2001b. The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222-227.
- Sutherland, I., 2001c. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 663-674.
- Svanem, B., Strand, W., Ertesvåg, H., Skjåk- Bræk, G., Hartmann, M., Barbeyron, T., Valla, S., 2001. The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J. Biol Chem.* 276, 31542-31550.

- Thomas, C., 1992 Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. Trends Biotechnol. 10, 343-348.
- Tucker, K., Kelly, T., Delgrazia, P., Thomas, C., 1992. Automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. Biotechnol. Prog. 8, 353-359.
- Valla, S. Li, J., Ertesvåg, H., Barbeyron, T., Lindahl, U., 2001. Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. Biochimie 83, 819-830.
- Vanegas, A., Vanegas, J., 2003. Estandarización de métodos para la determinación de la concentración de ácidos urónicos y la separación de alginato bacteriano producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura, Universidad EAFIT. Colombia.
- Vermani, M., Kelkar, S., Kamat, M., 1995. Novel polysaccharide produced by *Azotobacter vinelandii* isolated from plant rhizosphere. Biotechnol. Lett. 17, 917-920.
- Vicente, A., Meinders, J., Teixeira, J., 1996. Sizing and counting of *Saccharomyces cerevisiae* floc populations by image analysis, using an automatically calculated threshold. Biotechnol. Bioeng. 51:673-678.
- Whitchurch, C., Tolker-Nielsen, T., Ragas P., Mattick, J., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295, 1487.
- Wilkinson, M., Schut, F., 1998. An introduction to digital image processing. In: Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications. Wiley & Sons Ltd. England. pp. 3-20.
- Williams, V., Fletcher, M., 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 100-1004.
- World Association of Seaweed Processors, 2002. [www.marinalg.org](http://www.marinalg.org)
- 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.
- Xu, K., Stewart, P., Xia, F., Huang, C., McFeters, G., 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4035-4039.

- Xu, K., Franklin, M., Park, C., McFeters, G., Stewart, P., 2001. Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 199, 67-71.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z., 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. J. Microbiol. Meth. 39, 109-119.
- Yildiz, F., Dolganov, N., Schoolnik, F., 2001. VpsF, a member of the response regulators on the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS<sup>ETr</sup>- associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O12 El Tor. J. Bacteriol. 183, 1716-1726.
- Zar, J., 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. U.S.A., pp. 122-160.
- Zita, A., Hermansson, M., 1994. Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3041-3048.

## ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 3. ANOVA de las curvas de distribución de los parámetros morfológicos de los agregados de las cepas ATCC9046 y LA21. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO<sub>4</sub>. F<sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).

Parámetro	CaSO <sub>4</sub> (mg/L)	VARIABLE DEPENDIENTE		CUADRADOS MEDIOS	F	SIG	F <sub>tab</sub>
Área	3	a	Entre Grupos	9.36	1.13	0.31	5.12
			Dentro grupos	8.2			
		b	Entre Grupos	0.08	0.75	0.41	5.12
			Dentro grupos	0.1			
		x	Entre Grupos	512	8.17	0.02	5.12
			Dentro grupos	62			
	10	a	Entre Grupos	1.9	0.32	0.58	5.12
			Dentro grupos	5.9			
		b	Entre Grupos	0.02	0.23	0.64	5.12
			Dentro grupos	0.09			
		x	Entre Grupos	145	7.7	0.24	5.12
			Dentro grupos	18.6			
	50	a	Entre Grupos	15.4	10.18	0.01	5.99
			Dentro grupos	1.51			
		b	Entre Grupos	0.096	2.07	0.2	5.99
			Dentro grupos	0.04			
		x	Entre Grupos	400	23.06	0.003	5.99
			Dentro grupos	17.3			
	100	a	Entre Grupos	0.56	0.742	0.41	5.12
			Dentro grupos	0.75			
		b	Entre Grupos	0.016	1.26	0.29	5.12
			Dentro grupos	0.013			
		x	Entre Grupos	19.7	1.52	0.25	5.12
			Dentro grupos	12.9			
200	a	Entre Grupos	0.02	0.01	0.92	6.61	
		Dentro grupos	1.79				
	b	Entre Grupos	0.32	0.86	0.39	6.61	
		Dentro grupos	0.38				
	x	Entre Grupos	63.7	5.4	0.06	6.61	
		Dentro grupos	11.7				
DE	3	a	Entre Grupos	3.22	2.3	0.16	5.12
			Dentro grupos	1.39			
		b	Entre Grupos	0.28	0.81	0.34	5.12
			Dentro grupos	0.34			
		x	Entre Grupos	1.93	8.41	0.02	5.12
			Dentro grupos	0.22			
	10	a	Entre Grupos	1.568	4.94	0.57	5.12
			Dentro grupos	0.31			
		b	Entre Grupos	0.09	0.28	0.61	5.12
			Dentro grupos	0.35			
		x	Entre Grupos	2.05	10.23	0.01	5.12
			Dentro grupos	0.2			

Circularidad	50	a	Entre Grupos	25.2	8.1	0.02	5.99
			Dentro grupos	3.08			
		b	Entre Grupos	5.73	4.05	0.09	5.99
			Dentro grupos	1.41			
		x	Entre Grupos	4.41	23.1	0.003	5.99
			Dentro grupos	0.19			
	100	a	Entre Grupos	0.17	1.43	0.26	5.12
			Dentro grupos	0.11			
		b	Entre Grupos	0.0008	0.002	0.96	5.12
			Dentro grupos	0.42			
		x	Entre Grupos	0.79	4.5	0.06	5.12
			Dentro grupos	0.17			
	200	a	Entre Grupos	0.47	3.89	0.1	6.61
			Dentro grupos	0.12			
		b	Entre Grupos	0.54	0.77	0.41	6.61
			Dentro grupos	0.7			
		x	Entre Grupos	1.43	8.41	0.03	6.61
			Dentro grupos	0.17			
	3	a	Entre Grupos	0.16	0.34	0.57	5.12
			Dentro grupos	0.48			
		b	Entre Grupos	4.78	12.9	0.007	5.12
			Dentro grupos	0.37			
		x	Entre Grupos	65	0.68	0.43	5.12
			Dentro grupos	94.34			
10	a	Entre Grupos	2.06	0.71	0.42	5.12	
		Dentro grupos	2.88				
	b	Entre Grupos	0.001	0.004	0.95	5.12	
		Dentro grupos	0.41				
	x	Entre Grupos	0.36	1.74	0.22	5.12	
		Dentro grupos	0.2				
50	a	Entre Grupos	0.95	4.13	0.08	5.99	
		Dentro grupos	0.23				
	b	Entre Grupos	0.0001	0	0.98	5.99	
		Dentro grupos	0.44				
	x	Entre Grupos	1.4	10.1	0.01	5.99	
		Dentro grupos	0.13				
100	a	Entre Grupos	0.09	0.77	0.4	5.12	
		Dentro grupos	0.11				
	b	Entre Grupos	0.13	0.11	0.74	5.12	
		Dentro grupos	1.19				
	x	Entre Grupos	0.17	0.73	0.41	5.12	
		Dentro grupos	0.23				
200	a	Entre Grupos	0.018	0.05	0.82	6.61	
		Dentro grupos	0.34				
	b	Entre Grupos	1.7	0.93	0.37	6.61	
		Dentro grupos	1.82				
	x	Entre Grupos	0.4	2.2	0.19	6.61	
		Dentro grupos	0.18				
PC/P	3	a	Entre Grupos	11.8	18.13	0.003	5.12
			Dentro grupos	0.65			
	b	Entre Grupos	2.72	5.03	0.5	5.12	
		Dentro grupos	0.54				
	x	Entre Grupos	0.45	13.9	0.006	5.12	
		Dentro grupos	0.03				
10	a	Entre Grupos	2.54	1.29	0.28	5.12	
		Dentro grupos	1.96				

	50	b	Entre Grupos	0.45	2.25	0.17	5.12
			Dentro grupos	0.2			
	100	x	Entre Grupos	0.21	1.6	0.24	5.12
			Dentro grupos	0.13			
	200	a	Entre Grupos	0.72	0.64	0.45	5.99
			Dentro grupos	1.12			
	50	b	Entre Grupos	5.56	46.02	0.001	5.99
			Dentro grupos	0.12			
	100	x	Entre Grupos	0.46	6	0.05	5.99
			Dentro grupos	0.07			
	200	a	Entre Grupos	0.01	0.004	0.95	5.12
			Dentro grupos	4.07			
	50	b	Entre Grupos	0.95	0.97	0.35	5.12
			Dentro grupos	0.97			
	100	x	Entre Grupos	0.35	2.9	0.12	5.12
			Dentro grupos	0.12			
	200	a	Entre Grupos	2.3	2.5	0.17	6.61
			Dentro grupos	0.94			
	50	b	Entre Grupos	0.16	0.55	0.49	6.61
			Dentro grupos	0.3			
	100	x	Entre Grupos	0.04	0.38	0.56	6.61
			Dentro grupos	0.12			

Tabla 4. ANOVA de las curvas de distribución de los parámetros morfológicos de los agregados de la cepa ATCC9046. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO<sub>4</sub>. F<sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).

PARÁMETRO	COEF.	CUADRADOS MEDIOS	F	SIG	F <sub>tab</sub>	
Área	a	Entre Grupos	2.97	0.64	0.63	2.84
		Dentro grupos	4.61			
	b	Entre Grupos	0.29	1.84	0.15	2.84
		Dentro grupos	0.16			
Circularidad	x	Entre Grupos	5.78	0.38	0.81	2.84
		Dentro grupos	15.08			
	a	Entre Grupos	0.61	0.49	0.74	2.84
		Dentro grupos	1.36			
DE	b	Entre Grupos	1.69	1.64	0.20	2.84
		Dentro grupos	1.03			
	x	Entre Grupos	35.11	0.97	0.44	2.84
		Dentro grupos	36.11			
Perim convexo perímetro	a	Entre Grupos	0.64	1.67	0.19	2.84
		Dentro grupos	0.38			
	b	Entre Grupos	1.75	2.15	0.10	2.84
		Dentro grupos	0.81			
Perim convexo perímetro	x	Entre Grupos	0.21	1.10	0.38	2.84
		Dentro grupos	0.19			
	a	Entre Grupos	4.11	1.72	0.18	2.84
		Dentro grupos	2.38			
b	Entre Grupos	0.85	1.19	0.34	2.84	
	Dentro grupos	0.7				
x	Entre Grupos	0.313	3.16	0.03	2.84	
	Dentro grupos	0.09				

Tabla 5. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del alginato y caldo de cultivo de la cepa ATCC9046. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO<sub>4</sub>.

F<sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).

PARÁMETRO		CUADRADOS MEDIOS	F	SIG	F <sub>tab</sub>
Concentración de alginato	Entre Grupos	0.41	0.57	0.68	2.76
	Dentro grupos	0.72			
Viscosidad	Entre Grupos	62150	17.99	0	2.76
	Dentro grupo	3453			
Peso Molecular Promedio	Entre Grupos	2.2e11	5.68	0	2.8
	Dentro grupos	3.4e10			
Indice de Polidispersión	Entre Grupos	14.21	3.6	0.02	2.78
	Dentro grupos	1.63			
Relación G/M	Entre Grupos	0.94	5.96	0	2.84
	Dentro grupos	0.15			
Concentración celular	Entre Grupos	1.28e16	1.65	0.19	2.84
	Dentro grupos	7.8e15			
Concentración proteína extracelular	Entre Grupos	1.35	0.97	0.44	2.8
	Dentro grupos	1.38			
pH	Entre Grupos	0.95	17.1	0	2.76
	Dentro grupos	0.05			

Tabla 6. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del caldo de cultivo de la cepa LA21.

Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: CaSO<sub>4</sub>. F<sub>tab</sub> tomado de Merrington y Thompson (1943).

PARÁMETRO		CUADRADOS MEDIOS	F	SIG	F <sub>tab</sub>
Viscosidad	Entre Grupos	5.53	0.45	0.77	5.19
	Dentro grupos	12.27			
Concentración celular	Entre Grupos	3.4e16	0.42	0.78	3.26
	Dentro grupos	8e16			
Proteína extracelular	Entre Grupos	1.69	0.90	0.49	3.18
	Dentro grupos	1.81			
pH	Entre Grupos	5.1e-2	2.3	0.10	3.06
	Dentro grupos	2.2e-2			

Tabla 7. ANOVA de los parámetros fisicoquímicos del caldo de las cepas ATCC9046 y LA21 en respuesta a la concentración de calcio del medio de cultivo. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: Cepa.  $F_{tab}$  tomado de Merrington y Thompson (1943).

$CaSO_4$ (mg/L)	VARIABLE DEPENDIENTE		CUADRADOS MEDIOS	F	SIG	$F_{tab}$
3	Viscosidad	Entre Grupos	142513	39.8	0.01	5.99
		Dentro grupos	3573			
	Conc. Celular	Entre Grupos	5.89e16	1.49	0.26	5.99
		Dentro grupos	3.95e16			
	Conc. Proteína	Entre Grupos	13.89	5.03	0.06	5.59
		Dentro grupos	2.76			
	pH	Entre Grupos	2.87	393.5	0	5.12
		Dentro grupos	0.007			
10	Viscosidad	Entre Grupos	107639	18	0.005	5.99
		Dentro grupos	5965			
	Conc. Celular	Entre Grupos	2.55e17	51.9	0	5.99
		Dentro grupos	4.9e15			
	Conc. Proteína	Entre Grupos	3.13	10.5	0.01	5.99
		Dentro grupos	0.29			
	pH	Entre Grupos	3.59	1409	0	5.12
		Dentro grupos	0.002			
50	Viscosidad	Entre Grupos	144738	85.7	0	5.99
		Dentro grupos	1688			
	Conc. celular	Entre Grupos	3.84e16	0.76	0.4	5.12
		Dentro grupos	5.05e16			
	Conc. Proteína	Entre Grupos	0.38	0.12	0.73	5.12
		Dentro grupos	3.22			
	pH	Entre Grupos	3.06	121	0	5.12
		Dentro grupos	0.02			
100	Viscosidad	Entre Grupos	43453	18.8	0	6.61
		Dentro grupos	2302			
	Conc. celular	Entre Grupos	1.68e16	0.51	0.49	5.12
		Dentro grupos	3.28e16			
	Conc. Proteína	Entre Grupos	1.16	2.09	0.18	5.12
		Dentro grupos	0.55			
	pH	Entre Grupos	2.59	85	0	5.12
		Dentro grupos	0.003			
200	Viscosidad	Entre Grupos	8458	9.7	0.2	5.99
		Dentro grupos	871			
	Conc. celular	Entre Grupos	2.41e16	0.6	0.5	6.61
		Dentro grupos	4.01e16			
	Conc. Proteína	Entre Grupos	1.579	2.17	0.18	5.59
		Dentro grupos	0.72			
	pH	Entre Grupos	0.02	0.14	0.71	5.12
		Dentro grupos	0.15			

Tabla 8. ANOVA de la frecuencia de agregación de las cepas ATCC9046 y LA21. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: cepa.  $F_{tab}$  tomado de Merrington y Thompson (1943).

<i>CALCIO (mg/L)</i>		<i>CUADRADOS MEDIOS</i>	<i>F</i>	<i>SIG</i>	<i>F<sub>tab</sub></i>
3	Entre Grupos	23762	86.4	0.0	4.17
	Dentro grupos	274			
10	Entre Grupos	23112	318.1	0.0	4.17
	Dentro grupos	72			
50	Entre Grupos	33540	3885	0.0	4.17
	Dentro grupos	8.6			
100	Entre Grupos	21336	559.7	0.0	4.17
	Dentro grupos	38.1			
200	Entre Grupos	338	5.3	0.03	4.17
	Dentro grupos	63.3			

Tabla 9. ANOVA de la variación de la concentración de ácidos urónicos en la fracción asociada a células entre la cepa ATCC9046 y LA21 en respuesta a la concentración de calcio del medio. Nivel de significación: 0.05. Variable independiente: Cepa.  $F_{tab}$  tomado de de Merrington y Thompson (1943).

<i>CaSO<sub>4</sub> (mg/L)</i>		<i>CUADRADOS MEDIOS</i>	<i>F</i>	<i>SIG</i>	<i>F<sub>tab</sub></i>
3	Entre Grupos	0.22	8.64	0.026	5.99
	Dentro grupos	0.002			
10	Entre Grupos	0.139	56.73	0	5.99
	Dentro grupos	0.002			
50	Entre Grupos	0.351	8.704	0.026	5.99
	Dentro grupos	0.04			
100	Entre Grupos	0.223	26.964	0.002	5.99
	Dentro grupos	0.008			
200	Entre Grupos	1.189	5.757	0.053	5.99
	Dentro grupos	0.20			