

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE FLUORÓFOROS QUE PERMITAN DETECTAR CELULAS VIABLES DE *Azotobacter vinelandii*

Edith Coronado¹, Gabriel Corkidi², Enrique Galindo¹ y Carlos Peña¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, 62250

²Laboratorio de Imágenes y Visión (Unidad Morelos), CCADT-UNAM, Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

coronado@ibt.unam.mx Fax: (777) 3 13 88 11

Palabras clave: *Azotobacter vinelandii*, viabilidad, análisis de imágenes

Introducción. Durante el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* hay cambios importantes en la fisiología de la bacteria, los cuales dependen de las condiciones del cultivo e impactan en la síntesis del alginato y de otros metabolitos (1). La capa de polisacárido que se forma alrededor de las células puede limitar la movilidad celular y el intercambio de nutrientes y gases con el medio y así reducir la síntesis de alginato (2). Por ello es de gran importancia determinar de manera rápida y precisa el estado fisiológico de las células que están siendo cultivadas.

Este trabajo tiene como objetivo la selección y evaluación de diferentes fluoróforos para la detección de células viables de *A. vinelandii*.

Metodología. Se cultivó *A. vinelandii* (ATCC9046) en matraces agitados, a 29°C, durante 72 h. Se tomaron muestras de 1 ml de caldo de cultivo a las cuales se le añadieron distintos fluoróforos a diferentes concentraciones y tiempos de incubación (Cuadro 1). Las imágenes se obtuvieron mediante una videocámara (CoolSnap-Pro, Media Cybernetics), acoplada a un microscopio óptico (Optiphot-2 Nikon) y fueron ecualizadas usando el programa Image-Pro® Plus (V.4.1 Media Cybernetics, U.S.A) (3).

Cuadro 1. Fluoróforos, concentración y tiempos de incubación evaluados en este trabajo.

Fluoróforo	Concentración evaluada	Tiempo de incubación (min)
Rodamina 123	0.25, 1, 2, 3, 4 y 5 μ g/mL	5, 15, 30
Yoduro de propidio	0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/mL	5, 15, 30
Kit LIVE/DEAD? BacLight?	SYTO9-0.08 a 1 mM PI-0.43 a 12 mM	5, 15, 30

Resultados y Discusión. El yoduro de propidio y el kit de determinación de viabilidad LIVE/DEAD? BacLight? , (el cual incluye el SYTO9 y yoduro de propidio , PI) no permitieron teñir adecuadamente las células de *A. vinelandii* ya que en ambos casos los fluoróforos quedaron retenidos en la cubierta de alginato. Cuando se usó la rodamina 123 se tiñe principalmente la célula, permitiendo discernirla del

polisacárido que la rodea y del resto de los componentes del medio de cultivo. La mayor intensidad de fluorescencia se alcanzó usando una concentración de rodamina de 4 μ g/mL con un tiempo de incubación de 15 minutos. En la figura 1 se observa como, en una muestra con células de *A. vinelandii* sonicadas (2 min, pulsos de 5 seg), el número de elementos fluorescentes es considerablemente menor, respecto a los que se observan en una muestra sin tratamiento (en ambos casos teñidas con rodamina 123). Estos resultados corresponden con una menor viabilidad de las células sonicadas, medida por la técnica de dilución seriada y siembra en placa.

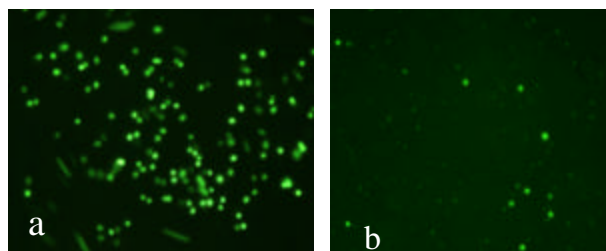


Fig. 1. Imagen de células de *Azotobacter vinelandii* teñidas con rodamina 123, sin tratamiento (a) y después de un tratamiento de sonicación drástico (b).

Conclusiones. El uso de la rodamina 123 permite teñir diferencialmente a las células vivas de *A. vinelandii*, lo cual lo hace un fluoróforo adecuado para la detección de células viables, que puede ser usado para el desarrollo de una técnica que permita cuantificar la viabilidad del cultivo.

Agradecimientos. Trabajo financiado por DGAPA (proyecto IN218201).

Bibliografía

- 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.
- Peña, C. Trujillo, M., Galindo, E. (2000) Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol.* 27:390-39.

3. Peña, C., Reyes, C., Larralde-Corona, P., Corkidi, G and Galindo, E. (2002) Characterization of *Azotobacter vinelandii*

aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiol Lett* 207:173-177.