

CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE *Azotobacter vinelandii* Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DE ALGINATO Y PHB

Carlos Peña y Enrique Galindo

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

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

Palabras clave: *Azotobacter vinelandii*, morfología, alginato, peso molecular

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria fijadora de nitrógeno, la cual produce dos polímeros de importancia comercial, el alginato, polisacárido extracelular y el polihidroxibutirato (PHB), poliéster intracelular. Típicamente, las células de *A. vinelandii* presentan formas bacilares y un tamaño promedio de aproximadamente 2 μ m. No obstante, la morfología de la bacteria depende de las condiciones de fermentación, situación que está estrechamente relacionada con la síntesis de alginato y su composición, así como la acumulación de PHB (1,2). En el presente trabajo se presenta un panorama de los diferentes estudios realizados en nuestro grupo de trabajo sobre la morfología de *A. vinelandii* y de que manera ésta se relaciona con la síntesis de polímeros como el alginato.

Resultados y Discusión. La morfología de *A. vinelandii* cambia en respuesta a las condiciones de aireación y mezclado del cultivo. Cuando las células se cultivan en condiciones de baja aireación, exhiben formas esféricas de gran tamaño (2-3 μ m) y presentan una película de polímero extracelular, la cual llega a representar hasta el 40 % del volumen total de la célula (1). A diferencia, en condiciones de mayor aireación, se observan células mucho más pequeñas (1.5 μ m), en las cuales la cubierta externa constituye menos del 20 % del volumen celular total. El tamaño de las células está asociado con la acumulación de PHB intracelular, la concentración y el peso molecular del alginato, encontrándose hasta el 50 % de PHB (con base en el peso seco celular) y un alginato de alto peso molecular en las células cultivadas a baja aireación (1). Por otra parte, se ha observado que en cultivos mal mezclados, tanto en matraces como en fermentadores, *A. vinelandii* forma agregados celulares, los cuales incrementan en tamaño conforme avanza el cultivo (2). Con el propósito de caracterizar la agregación de *A. vinealndii*, nuestro grupo desarrolló un método, basado en microscopía óptica y análisis de imágenes (3). Se encontró que las células cultivadas en condiciones de un pobre mezclado forman agregados de 9 μ m a las primeras 30 h (fase exponencial de cultivo) e incrementan su tamaño hasta 35 μ m durante la fase estacionaria de crecimiento (72 h). Contrariamente, en condiciones de mayor agitación y mezclado, prácticamente no se forman agregados durante el crecimiento de la bacteria.

Las características reológicas del medio y principalmente el

peso molecular del alginato, así como la concentración de calcio del medio de cultivo influyen en el grado de agregación de la bacteria (4). Bajas concentraciones de calcio (3-10 mg/L) asociados a altos pesos moleculares del alginato favorecen la formación de agregados de mayor tamaño (4). La presencia de agregados celulares en el cultivo pudiera ser un factor limitante en la transferencia de oxígeno, lo cual es crítico en la síntesis de alginato. En este sentido, nuestro grupo ha llevado a cabo estudios mecánicos del fenómeno con el propósito de evaluar posibles limitaciones de oxígeno al interior de los agregados de *A. vinelandii* (5). Los resultados del análisis cinético - difusional apuntan hacia el hecho de que en los agregados más grandes ($>100 \mu$ m), se pudieran presentar gradientes de oxígeno, los cuales repercutirían en el consumo de oxígeno, la concentración y composición del alginato y la síntesis de PHB.

Conclusiones. La morfología y la agregación de la *A. vinelandii* cambian en respuesta a las condiciones de aireación y de mezclado del bioreactor, así como a la concentración de calcio del medio. Estos cambios están estrechamente asociados a la síntesis de PHB y a la concentración y composición del alginato.

Agradecimientos. Trabajo financiado por DGAPA (proyecto IN218201).

Bibliografía

1. Peña, C., Campos, N., Galindo, E., (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flaks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 510-515.
2. 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.
4. Coronado, E., Galindo, E., Peña, C. (2002) Influencia del calcio sobre la morfología de *Azotobacter vinelandii* y las características del alginato producido. *Memorias del 3er Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos*, 3-4 Diciembre, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Mor. Mex., p. 26.

5. Peña, C., Galindo, E. and Díaz M. (2002). Effectiveness factor in biological external convection: Study in high viscosity systems.

J. Biotechnol, 95, 1-12.