

CARACTERIZACION DE LA AGREGACION DE *Azotobacter vinelandii* EN CULTIVO SUMERGIDO

Carlos Peña¹, César Reyes¹, Patricia Larralde¹, Gabriel Corkidi² y Enrique Galindo¹

¹ Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, ² Laboratorio de Análisis de Imágenes, Centro de Instrumentos, Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO
Fax: (52) (7) 17 23 88, e-mail: carlosf@ibt.unam.mx

Palabras clave: *algínato*, *Azotobacter vinelandii*, *agregación*, *análisis de imágenes*

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria fijadora de nitrógeno que bajo condiciones aeróbicas produce algínato. Estudios previos en nuestro grupo (1) han mostrado, mediante exámenes de microscopía óptica, la presencia de una cubierta extracelular y de agregados bacterianos en cultivos sometidos a una baja intensidad de mezclado. En estos estudios preliminares, el tamaño y la forma de los agregados fueron seguidos cualitativamente. El objetivo del presente trabajo fue estudiar cuantitativamente la evolución de la agregación de *A. vinelandii* bajo condiciones extremas de agitación y aireación, usando una técnica de análisis de imágenes.

Metodología. 1 mL de caldo de cultivo con células de *A. vinelandii* provenientes de cultivos desarrollados en matraces bafleados y convencionales fueron teñidas con 10 µL de azul de metileno y observadas con el objetivo de 40 x en un microscopio óptico. Las imágenes se obtuvieron mediante una videocámara acoplada al microscopio y fueron analizadas usando el programa Image-Pro® Plus (V.4.1 Media Cybernetics, U.S.A.). Las imágenes fueron procesadas usando dos diferentes algoritmos, uno para agregados y otro para células individuales. Para cada muestra se analizaron 50 imágenes, equivalente a 700 - 1000 objetos (2).

Resultados y Discusión. Con el propósito de generar un mejor contraste entre los agregados y el fondo de la preparación, se usó azul de metileno. El uso de este colorante no modifica la distribución del tamaño y la forma de la población y facilita la determinación del número y tamaño de los mismos. Por otra parte, la dilución de la muestra afectó la distribución de la población, observándose una disminución en la proporción de agregados de mayor tamaño en muestras diluidas 1:6. En matraces convencionales (baja aireación y mezclado) hay un aumento del diámetro promedio (DP) de los agregados conforme transcurre la fermentación (Fig. 1). Estos se incrementan de 7 µm a las 30 h (fase exponencial del cultivo) a 27 µm durante la fase estacionaria del cultivo (72 h). A diferencia, bajo condiciones de mayor aireación y mezclado (matraces bafleados), prácticamente no se forman agregados durante el cultivo.

Conclusiones. Se desarrolló una técnica que permite caracterizar la agregación de *A. vinelandii* en forma cuantitativa y rigurosa. Bajo condiciones de menor aireación y mezclado, la bacteria tiende a formar agregados de mayor tamaño.

Fig.1. Efecto de las condiciones de aireación y agitación sobre la distribución del tamaño de células individuales y agregados de *A. vinelandii*.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo financiero del CONACyT (proyectos I 30010-B y 31540-B). *P. Larralde colabora actualmente en el Centro de Biotecnología Genómica del IPN en Reynosa, Tamps.

Bibliografía

- Peña, C., Campos, N. Galindo, E. (1997) Changes in alginate molecular distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 510-515.
- Reyes, C. (2000) Cuantificación de la agregación de *Azotobacter vinelandii* por medio de análisis de imágenes y su impacto en la producción de algínato. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma del Estado de México.