

CO-CULTIVO DE MICOBACTERIAS Y *CYANOBACTERIUM MINERVAE* (COP.) KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (CYANOPROKARIOTA)

María J. Squadrone*, María. T. Wenzel*, María del C. Ríos de Molina**

*Dpto. de Ciencias Biológicas.

**Dpto. de Química Biológica.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pabellón 2, 4° piso. Ciudad Universitaria, UBA (1428)
Buenos Aires, República Argentina.

Correos electrónicos: wenzel@bg.fcen.uba.ar / mcrios@qb.fcen.uba.ar

Resumen

Con el objetivo de comprobar la relación que existe entre *Cyanobacterium minervae* aislada de los ambientes termales de Domuyo (Neuquén, Argentina) y 5 cepas de micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. del complejo Mac* y *M. gordoneae*, se estudiaron las interacciones que se producen entre esos microorganismos. Las cepas de las micobacterias fueron cultivadas en un medio inorgánico, óptimo para el crecimiento de *C. minervae*, solas, o en presencia del alga.

Ninguna de las Mycobacterias estudiadas se desarrolló en forma aislada. *M. fortuitum* y *M. gordoneae* desarrollaron en co-cultivo con *C. minervae*. En consecuencia, se concluyó que las sustancias químicas secretadas por el alga serían los nutrientes utilizados por esas Mycobacterias para su desarrollo.

MYCOBACTERIA AND *CYANOBACTERIUM* *MINERVAE* (COP.) KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (CYANOPROKARYOTA) UNDER CO-CULTURE CONDITIONS

Summary

A study of interaction between *Cyanobacterium minervae* isolated from thermal environments (Domuyo, Neuquén, Argentina) and five strains of *Mycobacteria*: *M. tuberculosis*

Palabras clave: *Mycobacterium* - Micobacterias - *Cyanobacterium minervae* - Cyanoprokariota - Cyanophyceae - Cyanobacteria.

Key words: *Mycobacterium* - Micobacterias - *Cyanobacterium minervae* - Cyanoprokariota - Cyanophyceae - Cyanobacteria.

lois, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. Mac complex* and *M. gordoneae* was carried out. Each *Mycobacteria* strain was cultured in an inorganic optimum culture media for *C. minervae*, alone or with the latter.

None of *Mycobacteria* was able to develop when cultured alone. However, *M. fortuitum* and *M. gordoneae* were able to growth when they were co-cultured with *C. minervae*. From the study of chemicals excreted to the media, it was proved that the nutrients used by these micobacterias in their growth may be secreted by the algae.

Introducción

Entre los estudios de las interacciones de las algas con bacterias se citan la presencia de aquellas que desarrollan en los mucílagos de las cianobacterias: *Caulobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Bacillus subtilis* (Carr y Whitton, 1982).

Hasta el momento, no existen antecedentes que indiquen la interacción de micobacterias con algas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación que existe en el co-cultivo de micobacterias y *Cyanobacterium minervae*, un alga verde-azul, unicelular, aislada de matas algales termales del Domuyo, Neuquén, Argentina (Wenzel y Halperin, 1991; Negritto, 1992).

Materiales y métodos

Microorganismos

Cyanoprokariota: *C. minervae* (Cop.) Komárek y Anagnostidis aislada de matas algales termales del arroyo Aguas Calientes, Domuyo (Figura 1).

Micobacterias: *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. complejo Mac*, *M. kansasii* y *M. gordoneae* (Lawrence y Kubica, 1986; Holt y col., 1994).

Cultivos

Para el cultivo de *C. minervae* y el co-cultivo se utilizó el medio D de Castenholz (Castenholz, 1988) y, para las micobacterias, el medio de Lowestein-Jensen (L-J).

Los cultivos de *C. minervae* se desarrollaron en erlenmeyers que contenían 150 ml de medio y un inóculo de 153×10^3 cél./ml, con agitación, iluminados con 1.046 luxes y a temperatura ambiente. Para el co-cultivo se sembró, además, un inóculo de 2×10^6 bacterias/ml de la cepa en estudio.

Con respecto a los estudios en función del tiempo, se cultivó *C. minervae* en dos erlenmeyers durante 30 días. Uno fue filtrado con membrana Millipore

de 0,45 m (Fs) e inoculado con *M. fortuitum*; el otro erlenmeyer fue inoculado con *M. fortuitum*, para la obtención de un co-cultivo.

Como controles se continuó el cultivo de *C. minervae* en medio D; además, se realizó un cultivo de *M. fortuitum* en L-J y otro, en medio D; en los dos últimos casos fueron inoculados con 2×10^6 bacterias/ml.

Para las observaciones microscópicas y microfotografías fue utilizado un microscopio Zeiss y para el co-cultivo se efectuaron coloraciones de Ziehl-Nilseen.

Curvas de crecimiento

Control en el crecimiento de los microorganismos

Para la curva de crecimiento de micobacterias se seleccionó una cepa de *M. fortuitum* porque es un *Mycobacterium* de rápido desarrollo y, además, un patógeno multirresistente a las drogas antibacilares.

Para obtener un número de colonias contables de *M. fortuitum* fue necesario efectuar previamente diluciones de la muestra. La cantidad de gérmenes existentes en el inóculo fue determinada por el control del momento de la visualización de las colonias y, de esta manera, se determinó la cantidad inicial de microorganismos. Posteriormente se realizaron diluciones de *M. fortuitum*: 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 , 10^{11} y 10^{13} que fueron sembradas en L-J. Debido al rápido desarrollo de *M. fortuitum* se efectuó una primera lectura de los cultivos a los 5 días, luego a los 15, y a los 30 días.

Con respecto al co-cultivo, una vez confirmado el desarrollo de ambos microorganismos, se efectuaron diluciones en la misma proporción que para *M. fortuitum*.

El cultivo de *C. minervae* y el co-cultivo fueron cuantificados por recuento de células en cámara de Neubauer a los 5, 15 y 30 días.

Determinaciones químicas

Para estudiar la naturaleza de las sustancias liberadas al medio, se filtraron los cultivos y co-cultivos con membrana Millipore 0,22 μ . Sobre el filtrado fueron aplicadas cromatografías y electroforesis en gel de poliacrilamida. Se detectaron cuali o cuantitativamente: hidratos de carbono (azúcar reductor) (Somogyi, 1952); glicosamino-glicanos; proteoglicanos (Rodríguez Montelongo y col., 1986); proteínas (Lowry y col., 1951) y lípidos (Kates, 1991).

Las determinaciones de *M. fortuitum* se realizaron por las valoraciones con el líquido de condensación del medio L-J, que se llevó a 2 ml con agua destilada estéril.

Resultados

Cyanobacterium minervae (Cop.) Komárek y Anagnostidis (Komárek y Anagnostidis, 1999) incluida dentro de la familia Synechococcaceae, Orden Chroococcales, es una cita nueva para la Argentina (Figura 1).

Crecimiento de los microorganismos

Las distintas cepas de micobacterias sin el agregado de *C. minervae* no desarrollaron en el medio D.

M. fortuitum no desarrolló en el filtrado del cultivo de *C. minervae*.

Tanto *M. fortuitum* como *M. gordonae* desarrollaron en óptimo estado junto a *C. minervae* y fueron detectadas las microalgas en división (Figuras 3 y 4).

En el co-cultivo de *M. tuberculosis* con *C. minervae* se registraron escasas células algales, detritus celulares y ninguna forma bacilar ácido-alcohol-resistente (AAR).

En el co-cultivo del *complejo Mac* con *C. minervae* desarrollaron las micobacterias como elementos granulares.

En el co-cultivo de *M. kansasii* y *C. minervae* se registraron escasas células algales, sin el desarrollo de las micobacterias.

Los controles en L-J de los co-cultivos resultaron positivos: con *M. fortuitum* a partir de los 4 días de incubación, y con *M. gordonae*, a los 17 días; estos resultados indican la viabilidad de los dos microorganismos. Las micobacterias restantes, *M. tuberculosis*, *complejo Mac* y *M. kansasii* no desarrollaron.

En la fase óptima del co-cultivo de *M. fortuitum* y *C. minervae* (Figura 2) se observaron gran cantidad de micobacterias adheridas al mucílago de *C. minervae*. En etapas posteriores, las células de *Mycobacterium* permanecieron adheridas al mucílago algal (Figuras 3 y 4) y comenzaron a desarrollarse formas bacilares largas, algunas con gránulos citoplasmáticos y formas cocoides aisladas, o en abundantes cadenas (Figura 4).

Para determinar el tiempo de supervivencia de ambos microorganismos se agregó progresivamente medio D. A los 5 meses, el co-cultivo era denso y de color verde azulado. Células de *C. minervae*, escasas formas bacilares AAR y formas cocoides o granulares no AAR (Figura 5) fueron registradas por observación con microscopio. Sin embargo, a los 6 meses se detectó un 50 % menos de células de *C. minervae*, algunas decoloradas, y muy escasos bacilos AAR (Figura 6).

Figura 1.- *Cyanobacterium minervae*. a: célula vegetativa; b: célula en división.

Figura 2.- Co-cultivo de *C. minervae* y *M. fortuitum* a los 30 días.

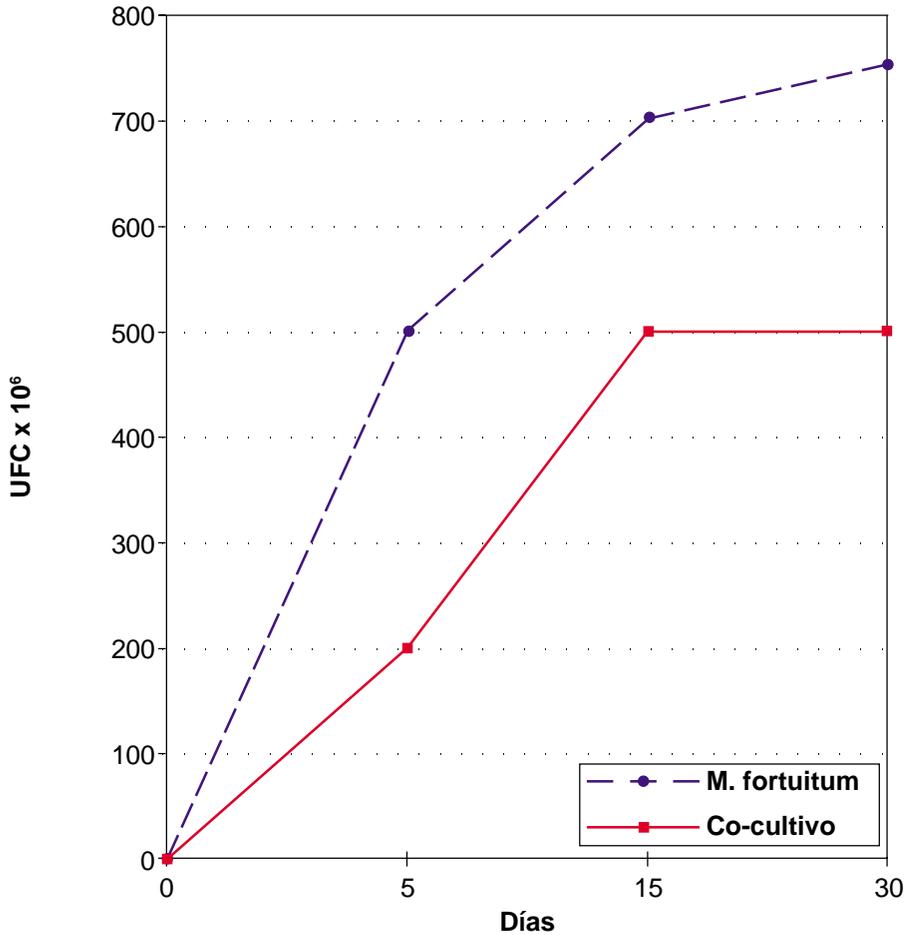
Figuras 3 y 4.- Co-cultivo a los 3 y 4 meses.

Figuras 5 y 6.- Co-cultivo a los 5 y 6 meses. Aumento 1000x.

Curva de crecimiento del cultivo de *Mycobacterium fortuitum*

En los cultivos, el óptimo desarrollo fue obtenido a los 30 días en la dilución 10^7 (Gráfico 1).

Gráfico 1.- Curva de crecimiento de *M. Fortuitum* y del co-cultivo con *C. minervae*



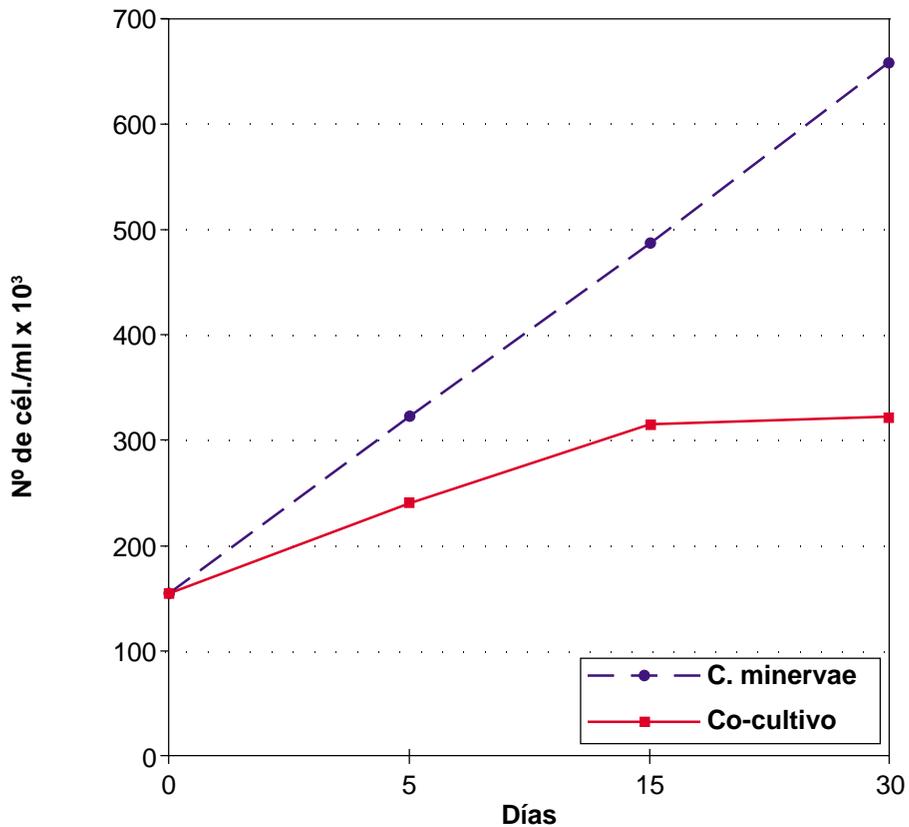
UFC: unidades formadoras de colonias.

A mayor tiempo de cultivo y de co-cultivo aparecieron limitaciones en el crecimiento por el agotamiento de los nutrientes o por la presencia de algún producto del metabolismo, o por ambas causas.

Curva de crecimiento del cultivo de *C. minervae*

A los 5 días se registraron 321×10^3 cél./ml que aumentaron progresivamente hasta los 15 días con 490×10^3 cél./ml, y a los 30 días alcanzaron el óptimo desarrollo con 664×10^3 cél./ml (Gráfico 2).

Gráfico 2.- Curva de crecimiento de *C. minervae* y del co-cultivo con *M. fortuitum*



Curva del crecimiento del co-cultivo de *C. minervae* con *M. fortuitum*

El desarrollo de *M. fortuitum* en co-cultivo con el alga fue semejante al que se obtuvo en el medio L-J; el crecimiento final fue cercano al 70 % (Gráfico 1).

A los 5 días se registraron 240×10^3 cél./ml de *C. minervae*; a los 15 días, 315×10^3 cél./ml y a los 30 días, 325×10^3 cél./ml. Hubo un retraso en el desa-

rollo en función del tiempo y se alcanzó la fase estacionaria a los 15 días. El desarrollo final fue muy inferior al alcanzado en el cultivo aislado, aproximadamente un 50 % menor (Gráfico 2).

Determinaciones químicas

En la tabla 1 se presentan los valores correspondientes a los hidratos de carbono reductores, glicoproteínas, glicosamino-glicanos, proteínas totales y lípidos totales. En los cultivos de *M. fortuitum* y *C. minervae* se detectaron, a los 30 días, considerables concentraciones de lípidos, proteínas y azúcares reductores. Por otra parte, en el co-cultivo de 30 días, la concentración de azúcares reductores bajó al 7 % remanente, mientras que la concentración lipídica fue del 50 %. A los 5 meses en el co-cultivo se restituyó la concentración de azúcares reductores en mayor proporción que en el cultivo de 30 días de *C. minervae*.

Tabla 1.- Estudios comparativos de la composición de los medios de cultivo en función del tiempo y de las condiciones de desarrollo

Muestras	Tiempo de cultivo	Azúcar reductor	Glico-proteínas	GAG	Proteínas	Lípidos
		($\mu\text{mol/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(mg/ml)
<i>Fs</i>	30 días	n.d.	n.d.	n.d.	6,0	2,40
<i>Mf</i>	30 días	0,36	0,82	0,93	8,5	2,38
<i>Cm</i>	30 días	1,06	0,49	0,13	2,0	3,33
<i>Cc</i>	30 días	0,07	n.d.	0,12	3,0	1,83
<i>Cc</i>	5 meses	1,62	0,09	0,08	1,5	1,48

Fs: filtrado del cultivo de *C. minervae*; *Mf*: cultivo de *Mycobacterium fortuitum*; *Cm*: cultivo de *Cyanobacterium minervae*; *Cc*: co-cultivo; n.d.: no detectable.

Discusión

Si bien *Mycobacterium fortuitum* es incapaz de desarrollar en medios inorgánicos, la presencia de *C. minervae* posibilita su desarrollo en esos medios.

M. fortuitum no desarrolla con el filtrado del cultivo de *C. minervae*, por lo que se presume que sería necesaria la presencia de las células algales para el desarrollo de las micobacterias.

La observación por microscopía permitió comprobar una tendencia a la acumulación de células de *M. fortuitum* muy cercanas al mucílago de *C. minervae*. En la última etapa del co-cultivo la aparición de formas bacilares largas, granulares o cocoides, incluso algunas no AAR, indicarían una carencia de elementos en el medio nutritivo.

La concentración de proteínas totales liberadas al medio en todos los cultivos y co-cultivos fue baja; es probable que cumplan una función clave en el desarrollo de estos microorganismos. Esta función podría deberse a su participación en reacciones enzimáticas o en los mecanismos de defensa anti-estrés, o en ambos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es probable que la principal fuente de energía utilizada por *M. fortuitum* en el co-cultivo, sean los lípidos y los azúcares secretados por el alga. Esta acción se manifiesta en el descenso de los metabolitos en el co-cultivo de 30 días.

A los 5 meses, los azúcares vuelven a aumentar debido a la disminución bacteriana; en los valores lipídicos se registró un leve descenso en comparación con los registrados a los 30 días. De esta manera, se demuestra la importancia que tiene *C. minervae* en la liberación de sustancias lipídicas, necesarias para el desarrollo y la estructura de las micobacterias.

La fase óptima para el desarrollo de *M. fortuitum* y de *C. minervae* en el co-cultivo es a los 30 días. Recién en este tiempo, el cultivo algal alcanza altas concentraciones de lípidos y azúcares necesarios para el desarrollo bacteriano.

Estos resultados sugieren la posibilidad de elaborar medios de cultivo para el crecimiento de micobacterias enriquecidos a partir de las sustancias orgánicas liberadas por esta clase de algas.

Se propone, el comienzo de una nueva línea de estudio que relaciona la interacción entre microorganismos patógenos y microalgas en cultivo.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Accorinti, ex Profesor Titular de la Cátedra de Fisiología Vegetal, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, donde fue realizado este trabajo. A la Dra. Martha Di Lonardo, Jefa del Laboratorio "Dr. Abel Cetrángolo"; Cátedra de Tiseoneumología, UBA, y Hospital F.J. Muñiz, quien proporcionó las cepas. A la Lic. Mercedes Rivero por la traducción del resumen al inglés.

Referencias bibliográficas

- Carr, M.G. y Whitton, B.A. (1982). *The Biology of Cyanobacteria. Botanical Monography*. Carr, M.G. & Whitton, B.A.: 688.
- Castenholz, R.W. (1988). "Cultiving methods for Cyanobacteria". *Meth. Enzimol.* 167: 79-88.
- Holt, J.G. y col. (1994). *Berger's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª ed. Williams & Wilkins. Baltimore: 787.
- Kates, M. (1991). Techniques of Lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. En: R.H. Burdon & P.H. van Knippenberg (eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Oxford.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. (1999). "Cyanoprokaryota". 1. Teil: *Chroococcales*. 19/1. G. Fisher, Jenna, Stuttgart, Lübeck, Ulm: 1-548.
- Lawrence, G.W. y Kubica, G.P. (1986). *Berger's Manual of Systematic Bacteriology*. Tomos I y II: 1436-1458.
- Lowry, O.M. y col. (1951). "Protein measurement-with phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Rodríguez Montelongo, L. y col. (1986). "Un nuevo método químico específico para la determinación de heparina y glicosamino glicanos naturales". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 22 (3): 433-447.
- Negritto, M.C. (1992). *Extracción y Caracterización de los Principios Activos de Microalgas Termales (Cyanophyceae) del Domuyo (Neuquén, Argentina)*. Trabajo de Tesis de Licenciatura 000244, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Somogyi, M. (1952). "Notes on Suggar Determinations". *J. Biol. Chem.* 159: 19-23.
- Wenzel, M.T. y Halperín, D.R. (1991). "Sistemática de las Cianofíceas Termales del Domuyo (Neuquén, Argentina)". *Dominguezia* 9 (1): 24-39.