

## Síntesis de polisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de aminoazúcares

G. Jorba y María Teresa Pérez-Ureña

Instituto de Inmunología y  
Biología Microbiana C.S.I.C.  
Velázquez, 144 - Madrid-6

(Recibido el 23 de julio de 1979)

G. JORBA and M. T. PEREZ-UREÑA. *Variations in the P. aeruginosa Polysaccharide Synthesis Conditioned by Aminosugars*. Rev. esp. Fisiol., 36, 155-162. 1980.

The production of capsular and extracellular polysaccharides by *P. aeruginosa* species was conditioned by the presence of hexosamines in the growth media. Glucosamine and most remarkably galactosamine, strongly reduced the production of extracellular polysaccharides. Studies on the dynamics of the polysaccharide production show that these products are used by the cells after the carbon source (glucose or glucosamine) of the growth medium has been exhausted. These results suggest the presence of adaptative hexosaminidases.

The concentration of total hexosamines in the polysaccharides changed according to the carbon source (glucose, glucosamine or galactosamine) and so did the molecular composition as demonstrated by IR spectrometry. IR spectra show variations in the intensity of some characteristic bands, as those located at 1,650-1,560  $\text{cm}^{-1}$  (N-acetylhexosamines), 1,420 and 1,320  $\text{cm}^{-1}$  (aminosugars) and at 1,380  $\text{cm}^{-1}$ . This last band disappears from polysaccharides after prolonged incubation. Bands between 1,300 and 700  $\text{cm}^{-1}$  varied and even disappeared according to the aminosugar employed and the length of the incubation period.

En las especies del género *Pseudomonas*, quizá sean los polisacáridos, endotoxinas y pigmentos los productos que mayor significación pueden tener en la fisiología, inmunogénesis y patogénesis de este género bacteriano. De ahí que, en nuestro laboratorio, se haya tenido interés en aportar datos, tanto en lo referente a cromogénesis (5, 7) y sus variaciones (6, 8, 9, 15), como sobre la producción de polisacáridos en cultivo continuo (3) o la síntesis de endotoxinas (1, 16); asimismo, en relación con estos tres tipos de

metabolitos, se ha estudiado previamente su significación para la respuesta inmunitaria del huésped (14).

Por otra parte, a la vista de algunos datos presentados por BOSMANN (2) en relación con aminoazúcares y síntesis de macromoléculas, y dado que también se ha comprobado experimentalmente la influencia de hexosaminas en el crecimiento de estirpes de *Pseudomonas* (11), hemos considerado interesante estudiar las posibles variaciones que, en la síntesis de polisacáridos capsulares y exocelulares de

*P. aeruginosa*, pueden originar la glucosamina y galactosamina, que son los aminoazúcares más abundantes en la naturaleza y con capacidad para intervenir en los procesos biológicos más variados (10).

### Material y métodos

**Bacterias.** Se han utilizado cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes de la clínica en las que previamente se había comprobado su capacidad para producir polisacáridos y pigmentos. Mediante el análisis de sus patrones de cromogénesis (7, 8) se seleccionaron tres cepas de *P. aeruginosa* (P-110; P-115; P-165) para disponer de una mayor cantidad de material de ensayo.

**Hexosaminas.** Todas las experiencias se han realizado frente a glucosamina y galactosamina (Merck), por ser los dos aminoazúcares más abundantes en condiciones naturales.

**Medios de cultivo.** Se han empleado distintos medios de cultivo, según el propósito experimental, distinguiéndose entre: *a*) pruebas de aislamiento y selección de cepas, efectuadas sobre diferentes medios sólidos con agar-común, y agar-sangre, para examen de colonias e indicio de su capacidad de producción de polisacáridos; *b*) los ensayos de cromogénesis se efectuaron sobre los medios P y F de Difco para *Pseudomonas*; *c*) para estudios de crecimiento y producción celular se emplearon medios líquidos de Penassay (Difco) y un medio mínimo salino (11) a los que se añadían concentraciones 0,05 M de glucosa (GC), glucosamina (GM) y galactosamina (GT); y *d*) para obtención de polisacáridos se utilizó un medio Penassay Difco a pH 7,2 con 0,5 % de glucosa o aminoazúcar como fuente de carbono.

**Producción de polisacáridos.** Para obtención y determinación de polisacáridos acudimos como procedimiento normal a

la técnica de DOGGET (4), por precipitación con alcohol frío, adaptándola a nuestras condiciones de trabajo (3). En ocasiones, los cultivos se mantuvieron durante 12 ó 28 días incubando a 37° C; en estos casos, cultivos con 100 ml de medio se incubaron con agitación (250 rpm) durante las primeras 48 h, ya que según se comprobó previamente, en estas condiciones se incrementa la producción de polisacáridos; también cada 4 días fue controlada la viabilidad bacteriana por recuento de células.

**Determinación de hexosaminas.** La determinación de hexosaminas totales se realizó según el método de JOHNSON (12), en el cual se modifican el método de BOAS y el de ELSON-MORGAN con el fin de evitar interferencias y errores. Previamente se preparó una curva de calibración para un intervalo de concentraciones desde 10 hasta 100 µg (11).

**Espectroscopia infrarroja.** La determinación de los espectros IR de los polisacáridos, previamente purificados por dos sucesivas precipitaciones (3), se efectuó sobre pastillas de BrK (300 mg de sal/1 mg de muestra), en un aparato Perkin-Elmer mod. 457 según es habitual en nuestro laboratorio (1, 3).

### Resultados

**Producción total de polisacáridos.** Después de unos ensayos previos para conocer el momento de productividad máxima de polisacáridos exocelulares, hemos determinado la producción total de estos compuestos después de 5 días de cultivo, a 37° C en medio líquido y utilizando distintas fuentes de carbono según se indica en la tabla I. Como puede verse, la presencia de hexosaminas disminuye la producción de polisacáridos, sobre todo en la fracción extracelular.

Por otra parte, en la figura 1 se comparan, en forma de histograma, las varia-

Tabla I. Producción de polisacáridos capsulares y extracelulares, en distintas cepas patógenas de *P. aeruginosa*, cultivadas sobre distintas fuentes de carbono.

Cepas bacterianas	Producción de polisacáridos (mg/ml)		Fuente de carbono
	Capsulares ( $\pm 2.2\%$ )	Extra-celulares ( $\pm 2.9\%$ )	
Ps. 110	0,381	0,117	Glucosa
Ps. 115	0,339	0,110	
Ps. 165	0,367	0,109	
Ps. 110	0,299	0,062	Glucosamina
Ps. 115	0,306	0,034	
Ps. 165	0,317	0,044	
Ps. 110	0,290	0,04	Galactosamina
Ps. 115	0,293	indicios	
Ps. 165	0,298	0,06	

ciones condicionadas por los aminoazúcares sobre la producción de polisacáridos capsulares y en el sobrenadante, de las cepas de *Pseudomonas* que resultaron más altamente productoras de estas sustancias y que, por otra parte, eran las más patógenas. En este examen comparativo se considera como 100 % de producción

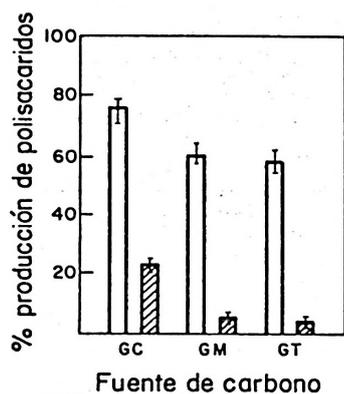


Fig. 1. Examen comparativo de la influencia de la fuente carbonada en la producción de polisacáridos capsulares (□) y extracelulares (▨) de *P. aeruginosa* (cepa P-110) frente a glucosa (GC), glucosamina (GM) y galactosamina (GT).

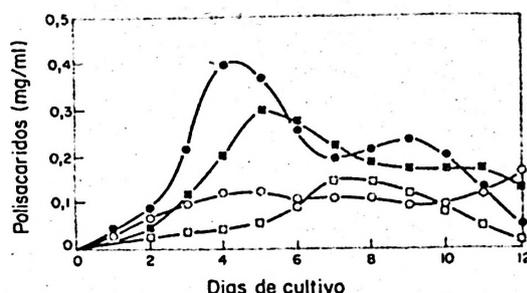


Fig. 2. Dinámica de la producción continua (durante dos semanas) de polisacáridos de *P. aeruginosa* (cepa 110) en presencia de glucosa (●; ○) y glucosamina (■; □) como substratos carbonados.

Los símbolos blancos se refieren a polisacáridos exocelulares y los negros a los capsulares.

normal, al total de polisacáridos capsulares más los del sobrenadante, producidos en presencia de glucosa.

Sobre la dinámica de síntesis de polisacáridos. Con el fin de perfilar mejor el momento en que podía afectarse la síntesis de estas sustancias sobre estas mismas cepas, estudiamos la dinámica de producción de los polisacáridos en función del tiempo. El estudio se realizó mediante experimentos de 12 y 28 días de observación (fig. 2 y 3) al objeto de comprobar si se producía reutilización de los propios

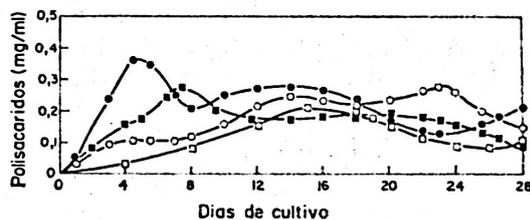


Fig. 3. Dinámica de la producción continua (durante cuatro semanas) de polisacáridos de *P. aeruginosa* (cepa 165) en presencia de glucosa (●; ○) y glucosamina (■; □) como substratos carbonados.

Los símbolos blancos equivalen a polisacáridos exocelulares y los negros a los capsulares.

polisacáridos; fenómeno ya observado previamente en nuestro laboratorio con otros géneros bacterianos (13).

Como un indicio de las variaciones de población celular, en el segundo experimento se determinaron bacterias viables a los 4, 8, 12, 16 y 20 días. Se pudo comprobar que de una concentración máxima de  $8,7 \times 10^9$  cel/ml de cultivo (al cuarto día) el número de bacterias viables presenta variaciones ondulatorias sucesivas con tendencia a la disminución según se ve por los valores obtenidos desde los 8 a los 20 días que fueron, respectivamente, 0,5, 6,5, 0,3 y  $2 \times 10^7$  cel/ml de cultivo.

Según parece deducirse por estas variaciones ondulatorias de la concentración celular y de los polisacáridos, también en estos casos, pudieran existir enzimas capaces de volver a utilizar los polisacáridos producidos en presencia de glucosa o glucosamina, después de 6 a 8 días de cultivo.

*Posibles modificaciones moleculares.* Finalmente, se quiso completar este estudio, analizando si también estas variaciones en la producción podían ir acompañadas de otras modificaciones en la composición de los polisacáridos. Para ello acudimos a la determinación del contenido de hexosaminas totales y al análisis —por espectroscopia molecular para la zona del IR— de los distintos polisacáridos obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo. En la tabla II se pueden ver las variaciones en la proporción de aminoazúcares según la fuente de carbono.

Tabla II. Variaciones en el contenido de hexosaminas totales del polisacárido de *P. aeruginosa* 110 según la fuente carbonada del medio de cultivo.

Fuente de carbono	Hexosaminas totales		
	%	$\mu\text{g}$	n mol
Glucosa	0,85	79,6	445
Glucosamina	1,2	113,1	632
Galactosamina	0,98	92,5	517

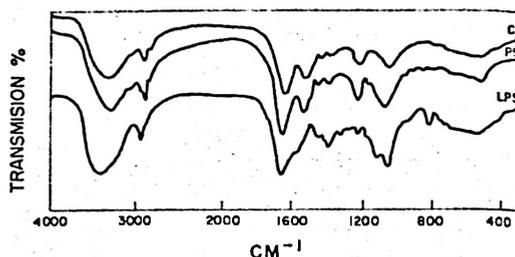


Fig. 4. Espectros IR de células desecadas de *P. aeruginosa* 110 (C) de su polisacárido (PS) y endotoxina (LPS).

En cuanto al examen comparativo de los espectros IR, pudimos ver en primer lugar (fig. 4), que la imagen obtenida con las células completas es prácticamente idéntica a la que se obtiene con el polisacárido capsular aislado de la misma estirpe, a diferencia de lo que se ve con el LPS completamente purificado; ello puede ser debido a la gran proporción que existe del polisacárido, en la bacteria estudiada y a su localización periférica, que produce un total enmascaramiento de los otros componentes.

Por otra parte, también hemos comprobado que existen diferencias, dentro de los polisacáridos normales obtenidos en presencia de glucosa, según el día de su extracción (fig. 5); ello es un indicio más a la hora de considerar el fenómeno de

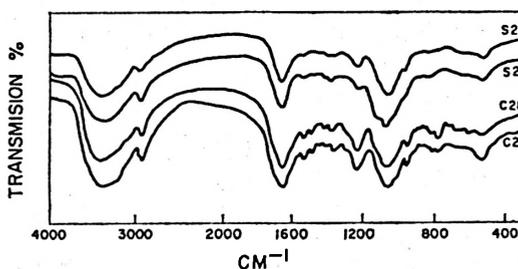


Fig. 5. Espectros IR de polisacáridos de *P. aeruginosa*, capsulares (C) y exocelulares (S) obtenidos del sobrenadante (S) a los 21 y 28 días de cultivo, respectivamente.

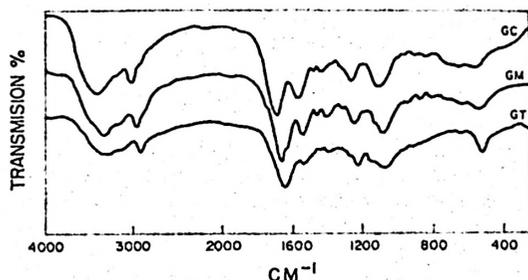


Fig. 6. Examen comparativo de los espectros IR de polisacárido capsular de la cepa *P. aeruginosa* 110 crecida sobre medio mínimo con glucosa (GC), glucosamina (GM) y galactosamina (GT) como substratos carbonados.

reutilización de este material biológico por la propia bacteria.

Finalmente, en la figura 6 se comparan los espectros de polisacáridos capsulares de la cepa P-110 de *P. aeruginosa* según que, estas sustancias, se produzcan en medios con glucosa, glucosamina o galactosamina.

### Discusión

En relación con la producción de polisacáridos de *Pseudomonas*, en presencia de hexosaminas, nos encontramos con que en todos los casos estudiados (tabla I), ésta era inferior cuando en el medio de cultivo existían aminoazúcares y sobre todo en presencia de galactosamina (fig. 1); lo que resulta paralelo a lo observado previamente en relación con la producción celular. Esta disminución afecta tanto al contenido de polisacáridos capsulares como a los excretados al medio de cultivo.

Al estudiar la dinámica de síntesis de estos polisacáridos en función del tiempo, nos parece observar — en experiencias de larga duración (12 y 28 días) — que se produce un fenómeno de reutilización del substrato. Este hecho, que ha sido observado en otras ocasiones en nuestro labo-

ratorio (3, 13), lo consideramos de alta significación ecológica. En esta ocasión, además, el fenómeno puede estar relacionado con la patogénesis pirocánica y representaría la existencia, en estas bacterias de hexosaminidasas capaces de hidrolizar estos polisacáridos; enzimas de este tipo se han encontrado en bacterias del suelo que viven en substratos con alto contenido de aminoazúcares. Al estudiar el contenido de hexosaminas totales en estas moléculas se encuentran las variaciones que cabía esperar (tabla II) de acuerdo con lo ya observado en la producción de polisacáridos celulares; lo que revela una posible modificación o adaptación de la ruta metabólica al nuevo substrato.

Las modificaciones en el contenido de aminoazúcares de estos polisacáridos van acompañadas de otras variaciones en la composición global de estas moléculas. Al comparar los espectros de las células enteras con los del polisacárido y endotoxinas de la misma bacteria (fig. 4), se ve que el del LPS resulta más característico y diferenciable que los otros dos; las principales diferencias aparecen para la zona comprendida entre 950 y 750  $\text{cm}^{-1}$  donde existen las bandas características de uniones glicosídicas y puede aparecer alguna de materiales de ácidos nucleicos contaminantes. Asimismo se observan diferencias de intensidad en la banda situada a 1.380  $\text{cm}^{-1}$  que es característica de aminoazúcares y en la correspondiente a 1.220  $\text{cm}^{-1}$ , típica de ésteres fosfato.

La zona comprendida entre los 700 y 1.300  $\text{cm}^{-1}$  es la más interesante para caracterización de polisacáridos, y es donde más diferencias se observan entre los polisacáridos capsulares y los del sobrenadante (fig. 5), al cabo de los 12 y 28 días de cultivo, respectivamente. En estos espectros se observan claras modificaciones de las bandas a 1.650-1.560  $\text{cm}^{-1}$  (tipo amidas I y II) que pueden estar producidos por residuos de N-acetil-hexosaminas. También, en los polisacáridos sobrena-

dantes, se aprecia desaparición de bandas entre 700 y 1.300  $\text{cm}^{-1}$ , que es la región más apropiada para estudiar características diferenciales de polisacáridos. Es curioso el hecho de que la banda a 1.380  $\text{cm}^{-1}$ , característica de aminoazúcares sea mucho menos intensa en los polisacáridos sobrenadanes que en los capsulares y que en ambos casos desaparezca en función del tiempo de cultivo, ya que su intensidad es más pequeña a los 28 días de cultivo. Ello nos podría llevar a considerar, una vez más, la posible reutilización de los polisacáridos por las propias células y que en ella existe movilización y transformación de los aminoazúcares.

Comparando los polisacáridos capsulares de una misma cepa crecida sobre las distintas fuentes de carbono aquí consideradas (fig. 6) se observa que, en general, en el polisacárido procedente de galactosamina las bandas son algo menos intensas, excepto una situada a los 520  $\text{cm}^{-1}$  de difícil interpretación. Se considera de interés resaltar las diferencias en la intensidad de las bandas situadas en 1.420 y 1.320  $\text{cm}^{-1}$ , que son características de aminoazúcares. En cualquier caso es muy difícil hacer asignaciones fijas para las distintas bandas por no disponer de patrones adecuados, sirviéndonos únicamente como un indicio cierto de que también se producen modificaciones en la composición, aunque para una más exacta definición de estos cambios habrá de recurrirse a técnicas de cromatografía de gas.

### Resumen

La producción de polisacáridos capsulares y extracelulares de las distintas estirpes de *Pseudomonas* aquí examinadas disminuye cuando se empleó glucosamina o galactosamina como fuente de carbono, sobre todo en este último caso, que es cuando se obtuvo menor cantidad de polisacáridos, especialmente los extracelulares, que, ocasionalmente, llegaron a ser tan sólo indicios no estimables. Al estudiar la dinámica de producción de estos polisacáridos

obtenidos con glucosa y glucosamina, en función del tiempo y durante largos periodos de cultivo, se tiene evidencia del fenómeno de reutilización de los propios polisacáridos al agotarse el substrato, y ello hace suponer la existencia de hexosaminidasas de adaptación.

La concentración de hexosaminas totales, en estos polisacáridos, varió según la fuente de carbono utilizada (glucosa, glucosamina o galactosamina) y lo mismo sucede con su composición molecular según fue comprobado por espectrofotometría IR.

Aunque los espectros IR fueron muy semejantes, aparecieron variaciones en la intensidad de algunas bandas características, como en aquellas situadas a 1.650-1.560  $\text{cm}^{-1}$ , por posibles residuos de N-acetilhexosaminas, en otras situadas entre 1.420 y 1.320  $\text{cm}^{-1}$ , que son características para aminoazúcares, y la de 1.380  $\text{cm}^{-1}$ , que desaparece en tiempos prolongados de cultivo. Lo mismo sucede con algunas bandas situadas en la región más apropiada para estudiar características diferenciales de polisacáridos (entre 1.300 y 700  $\text{cm}^{-1}$ ), que varían según el aminoazúcar o desaparecen en los cultivos prolongados.

### Bibliografía

1. BARASOAIN, I.: Tesis Doctoral Facultad de Ciencias. Universidad Complutense. Madrid. 1976.
2. BOSMANN, H. B.: *Microbios*, 4, 57, 1971.
3. CORRIPIO, R.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 1975.
4. DOGGETT, R. G.: *Appl. Microbiol.*, 18, 936, 1969.
5. ESPINOSA, M.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense. Madrid. 1969.
6. ESPINOSA, M.: *An. Real Acad. Farmacia*, 36, 183-241, 1970.
7. ESPINOSA, M.: *Laboratorio*, 52, 13-17, 1971.
8. ESPINOSA, M., HIDALGO, A. y PORTOLES, A.: *Rev. Clin. Españ.*, 116, 123-130, 1970.
9. ESPINOSA, M., HIDALGO, A. y PORTOLES, A.: *Can. J. Microbiol.*, 18, 99-103, 1972.
10. GUNTHER, R. y GREILING, H.: *Z. Physiol.* 318, 234, 1960.

11. JORBA, G.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. 1977.
12. JOHNSON, A. R.: *Anal. Biochem.*, **44**, 628, 1971.
13. LÓPEZ, R.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid. 1966.
14. PÉREZ UREÑA, M. T., ESPINOSA, M., LÓPEZ, R. y PORTOLÉS, A.: *Zentralb. Bakteriolog. Parasitenk.*, **127**, 134-139, 1972.
15. PORTOLÉS, A., ESPINOSA, M. e HIDALGO, A.: *J. Antibiotics*, **24**, 266-269, 1971.
16. RUBIO, N.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid. 1971.

