

## ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE PÉRDIDA DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pTG201 EN CÉLULAS DE *E. coli* LIBRES E INMOVILIZADAS

F. Marín-Iniesta\*

Recibido: noviembre 1987  
Aceptado: junio 1988  
Publicado: febrero 1989

### SUMMARY

Analysis of the kinetics of the loss of recombinant plasmid pTG201 in free and immobilized *E. coli* cells

Cells of *Escherichia coli*, strains K12 (rec+) and HB101 (recA-), carrying the recombinant plasmid pTG201 were immobilized in order to study the stability and expression of plasmid genes in several culture conditions. Continuous cultures (chemostats) with BL medium and different oxygen tension were tested. Parallel experiments were carried out with free cells. The statistical analysis of the kinetics of plasmid loss showed a better plasmid stability in immobilized cells cultured in the presence of pure oxygen. In the last case a maximal production of protein codified by plasmid also occur. Likewise the influence of culture conditions over the microbial growth in the gel and their relation to plasmid stability has also been studied.

**Key words:** Plasmid stability, immobilized cells.

### RESUMEN

Se han inmovilizado células de *Escherichia coli*, cepas K12 (rec+) y HB101 (recA-), portadoras del plásmido recombinante pTG201, con el fin de comparar la estabilidad y la expresión de los genes plasmídicos en diversas condiciones de cultivo. Para ello se han utilizado cultivos continuos (quimioestatos) con medio BL en presencia de diferentes tensiones de oxígeno. Paralelamente se han llevado a cabo experimentos con células libres. El análisis estadístico de las respectivas cinéticas de pérdida del plásmido revela una mayor estabilidad en células inmovilizadas en presencia de oxígeno puro, la cual se acompaña de una mayor producción de proteínas codificadas por el plásmido. Asimismo se ha estudiado la influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento microbiano en el gel y su relación con la estabilidad plasmídica.

Palabras clave: Estabilidad de plásmidos, células inmovilizadas.

### INTRODUCCIÓN

Entre los logros más importantes de las aplicaciones prácticas de la Ingeniería Genética, cabe destacar la producción a nivel industrial de proteínas humanas tales como insulina y hormona de crecimiento, por medio de microorganismo~el más utilizado de los cuales ha sido la bacteria *Escherichia coli* (HARRIS, 1983). Para ello fragmentos de DNA que contienen los genes para la proteína de interés se implantan habitualmente, por técnicas de recombinación adecuadas, en diversos plásmidos

derivados de ColE1 los cuales permiten la expresión en *E. coli* de los genes recombinados y posibilitan la obtención a bajo precio y en grandes cantidades de las proteínas codificadas por dichos genes (HARRIS, 1983).

Una condición indispensable para la utilización de plásmidos en aplicaciones industriales de la Ingeniería Genética es su mantenimiento estable en células huésped. El método más empleado para este fin ha sido hasta ahora el marcado de los plásmidos con genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos, de manera que mediante cultivo en presencia de dichos anti-

\* Dep. Genética y Microbiología. Fac. Biología. Universidad de Murcia. 30071 Murcia.

bióticos se seleccionan los clones celulares portadores del plásmido. Sin embargo en aplicaciones industriales, es importante lograr la estabilización sin presión selectiva (IMANAKA & AIBA, 1981) y numerosos autores se han interesado por este problema utilizando para ello sistemas experimentales en cultivos continuos (SEO & BAILEY, 1986; ENSLEY, 1986; WATSON *et al.*, 1986).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que mediante inmovilización de *E. coli* en geles de k-carragenina se puede lograr la estabilización de plásmidos recombinantes que portan dichas bacterias (DE TAXIS DU POET *et al.*, 1986 y 1987; MARÍN-INIESTA *et al.*, 1987; NASRI *et al.*, 1987). Sin embargo, para una mejor comprensión del principio en que se basa este fenómeno, se requiere más información sobre el modo en que los microorganismos crecen en el gel. En este sentido hemos encontrado algunos estudios de microscopía electrónica sobre crecimiento de células bacterianas en distintos soportes tales como fibras horadadas (INLOES *et al.*, 1983) o K-carragenina (BAUDET *et al.*, 1983; DHULSTER *et al.*, 1984) donde se describen densidades celulares en el soporte de inmovilización del orden de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/ml lo cual presenta un indudable interés a la hora de utilizar estos sistemas como biocatalizadores industriales. Por otra parte FUJIMURA *et al.* (1984) ha señalado el efecto de la limitación de difusión de oxígeno en los geles usados para inmovilizar microorganismos, como el principal factor que limita el crecimiento de las células inmovilizadas.

En el presente trabajo se ha ensayado la influencia de diversas condiciones de cultivo en la estabilidad plasmídica en células de *E. coli* inmovilizadas, estudiando para ello la expresión de dos genes presentes en el plásmido pTG201 que codifican, respectivamente, las proteínas p-lactamasa y catecol 2-3 dioxigenasa. Los datos obtenidos podrán generalizarse a la obtención de proteínas de interés industrial utilizando sistemas similares con DNA recombinado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### PLÁSMIDO Y CEPAS BACTERIANAS UTILIZADOS

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *E. coli* K12 (rec<sup>+</sup>) y *E. coli* HB101 (ésta última es una cepa recA-derivada de la cepa K12). El plásmido utilizado fue pTG201 (6.44 kilobases) el cual contiene el gen Xy1E, procedente de *Pseudomonas putida*, que codifica la actividad catecol 2-3 dioxigenasa (cat-02-asa). El gen Xy1E está controlado por el promotor PR del fago  $\lambda$  el cual es a su vez reprimido por CI857, pTG201 co-

difica asimismo la actividad p-lactamasa. Cat-02-asa y p-lactamasa son ambas usadas como marcadores plasmídicos, pTG201 no es conjugativo, y fue construido siguiendo la metodología descrita por ZUKOWSKI *et al.* (1983) y generosamente cedido por Transgene S.A. (Francia).

### PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN

Se prepararon células viables inmovilizadas siguiendo el método descrito por TAKATA *et al.* (1977) como sigue: 0.5 ml de cultivo bacteriano ( $5 \times 10^8$  células) se mezclaron con 9.5 ml de solución al 2% de k-carragenina (E-407, CECA, Francia) a 40° C. La mezcla se dejó gotear sobre una solución de CIK 0.3 M para obtener bolas de gel con células inmovilizadas.

### MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio de cultivo contenía, por litro de agua desionizada, 10 g de triptona (Difco), 5 g de extracto de levadura (Difco), 5 g CINa y el pH ajustado a 7.2 (medio BL). Este medio fue suplementado con 7.5 g de CIK por litro para asegurar la estabilidad mecánica de las bolas de gel. La temperatura de incubación fue en todos los casos de 37° C.

Los cultivos discontinuos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer en un incubador con sistema de agitación orbital (Lab Line, Melrose Park, Illinois-USA).

Para cultivos continuos se utilizó un pequeño quimiostato (MARÍN-INIESTA *et al.*, 1987) con 25 ó 45 ml de volumen y un flujo de suministro de oxígeno igual a tres veces el volumen del quimiostato por minuto. El oxígeno fue suministrado a una concentración del 21% (aire) y al 100% respectivamente. La tasa de dilución del quimiostato (D) de acuerdo con DE TAXIS *et al.*, (1986) fue ajustada a 0.7 veces el valor de la máxima tasa de crecimiento de las cepas bacterianas ( $\mu_{max}$ ) en el caso de las células libres y tres veces  $\mu_{max}$  para las células inmovilizadas. En este último caso las células eliminadas por las bolas de gel no pueden dividirse en el quimiostato ya que el tiempo de resistencia es mucho más corto que el tiempo de duplicación celular (DE TAXIS DU POET *et al.*, (1986). El número de generaciones celulares (n) fue determinado, para células libres e inmovilizadas, según la fórmula:

$$n = t \mu / \ln 2$$

Siendo t el tiempo desde el inicio del experimento.

### RECuento CELULAR Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PLÁSMIDO

El recuento celular de muestras del cultivo continuo se llevó a cabo mediante siembra en placas Petri con medio BL solidificado con 15 g/l de agar. Cuando se deseó detectar la presencia del marcador plasmídico p-lactamasa se utilizaron placas Petri con el medio anterior adicionado con 50 mg/l de ampicilina.

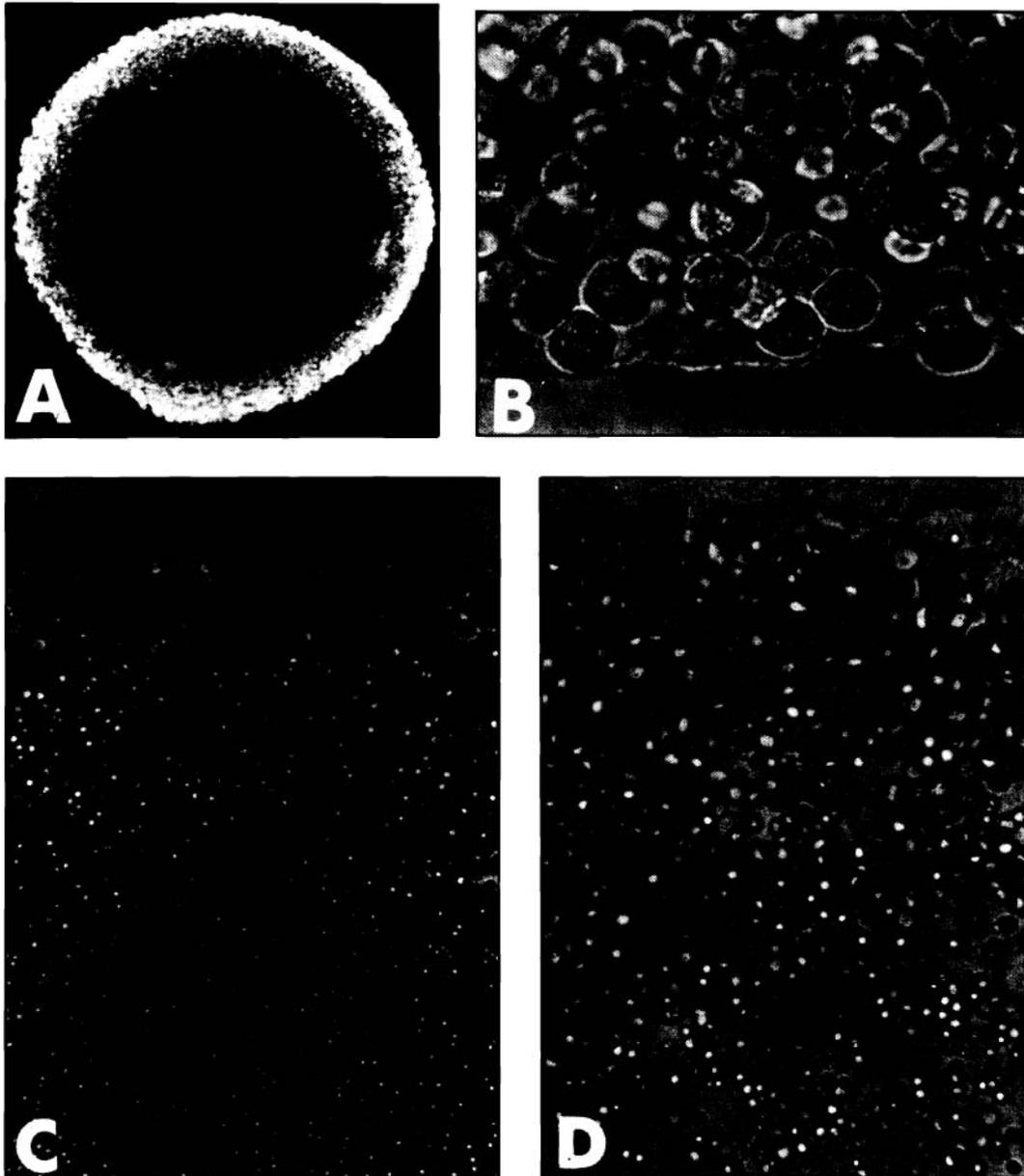


FIGURA 1. Micrografías ópticas de secciones, de unos 150  $\mu\text{m}$  de espesor, de bolas de k-carragenina con células inmovilizadas de *E. coli* K12/pTG201. (Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ .)

A. Visión global de una bola de gel con un diámetro medio de 2.5 mm. 24 horas de cultivo, 21% de oxígeno.  
 B. Detalle de colonias superficiales con 4 horas de cultivo 21% de oxígeno, puede notarse la forma esférica de las microcolonias.

C. Muestra de bolas con 24 horas de cultivo en presencia de 21% de oxígeno.  
 D. Muestra de bolas con 24 horas de cultivo en presencia de 100% de oxígeno.

Optical micrographs of 150  $\mu\text{m}$  thick slices of k-carrageenan heads containing *E. coli* K12/pTG201 cells. (Bars indicate 100  $\mu\text{m}$ .)

A. Low magnification of a gel head of 2.5 mm mean diameter. 24 hours of culture in the presence of 21% oxygen.  
 B. High magnification of the gel surface showing distinct spherical colonies inside the gel after 4 hours of culture in the presence of 21% oxygen.  
 C. Sample of beads after 24 hours of culture in the presence of 21% oxygen.  
 D. Sample of beads after 24 hours of culture in the presence of 100% oxygen.

La presencia de clones celulares portadores del marcador cat-02-asa fue detectada pulverizando las colonias con una solución de catecol 0.5 M, las colonias portadoras del plásmido (p+) se tiñen de amarillo en tanto que las que no portan el plásmido (p-) permanecen sin teñir (DHULSTER *et al.*, 1984; ZUKOWSKI *et al.*, 1983). Las determinaciones anteriores se llevaron también a cabo en células inmovilizadas disolviendo previamente, las bolas de gel por agitación en una solución de citrato sódico a 42° C.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAT-02-ASA

La conversión del catecol en semialdehído 2-hidroximucónico fue medida espectrofotométricamente a 375 nm (DHULSTER *et al.*, 1984). La actividad cat-02-asa fue expresada como incremento de DO 375 nm producida por ml de muestra y por minuto.

#### TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Se obtuvieron secciones de bolas de gel de unos 150  $\mu\text{m}$  de espesor por una técnica ya descrita (MA-

RÍN-INIESTA *et al.*, 1988) y observadas por microscopía óptica. Para el procesado de las muestras de microscopía electrónica se siguió la técnica de DHULSTER *et al.* (1984).

#### RESULTADOS

##### EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR EN EL GEL

En la figura 1 (A, B, C y D) pueden verse micrografías ópticas de secciones de bolas de k-carragenina inoculadas con *E. coli* K12/pTG201 a diversos aumentos y tiempos de incubación. Resultados similares se obtuvieron con la cepa HB101/pTG201. Puede observarse cómo el crecimiento celular tiene lugar en forma de microcolonias las cuales tienen un mayor tamaño en la capa superficial. No obstante, el crecimiento es también importante en capas más profundas del gel hasta 150 a 300  $\mu\text{m}$  según el caso (ver fig. 1 C y D). La figura 2

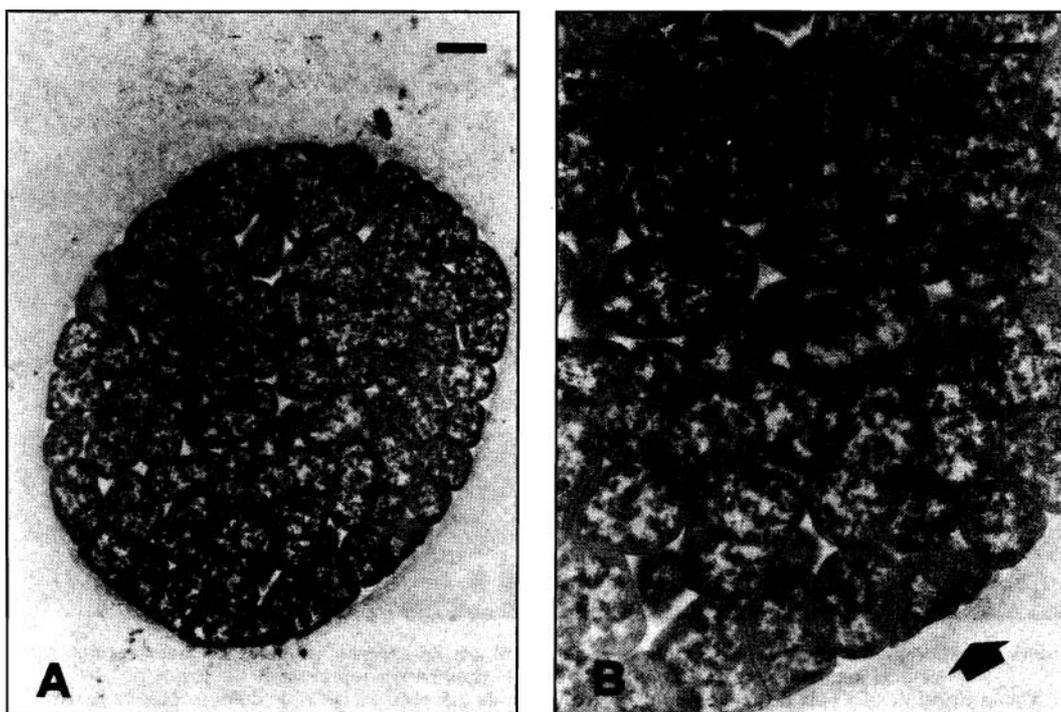


FIGURA 2. Micrografías electrónicas de transmisión de cortes ultrafinos de bolas de k-carragenina con células inmovilizadas de *E. coli* K12/pTG201. (Las barras representan 1  $\mu\text{m}$ .)

A. Obsérvese la elevada densidad de células en el interior de una microcolonia en el seno del gel.  
B. La flecha muestra una mayor densidad electrónica, en el gel que rodea a las colonias, debido a la tensión producida por el crecimiento celular.

Electron micrographs of ultrathin sections of beads of immobilized *E. coli* K12/pTG201 cells. (Bars indicate 1  $\mu\text{m}$ .)

A. Note the high density of cells in a microcolony inside the gel.  
B. Arrow shows the mechanical constraints due to cell growth.

corresponde a microfografías electrónicas de transmisión de la cepa K12/pTG201 donde puede verse la elevada densidad celular en el interior de las microcolonias para las que ha sido determinado un valor medio de  $2 \times 10^{11}$  células/ml por el método de INLOES *et al.* (1983).

En la figura 3 puede observarse la evolución de la población celular en bolas de gel inoculadas con *E. coli* K12/pTG201 cultivadas en presencia de 21% y 100% de oxígeno respectivamente. Inicialmente (ver fig. 3) se produjo un rápido incremento de la población celular entre 0 y 10 horas de cultivo y después se entró en una fase estacionaria con un incremento muy lento que no afectó a la población celular periférica de hasta 150  $\mu\text{m}$  de espesor. Esto último pudo comprobarse por observación microscópica de cortes de bolas tales como los mostrados en la figura 1, C y D, así como por el estudio morfométrico de dichos cortes MARÍN-INIESTA *et al.* (1988).

La figura 1 (C y D) muestra asimismo que las microcolonias externas son aproximadamente del mismo tamaño en bolas cultivadas en presencia de 21% y 100% de oxígeno, pero en capas más internas a partir de 100  $\mu\text{m}$  son claramente mayores en 100% de oxígeno lo cual

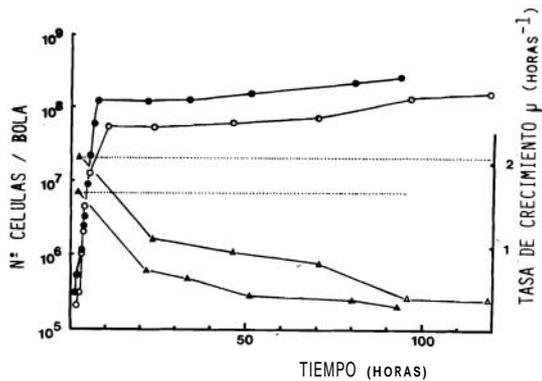


FIGURA 3. Evolución de la población celular y tasas de crecimiento ( $\mu$ ) en bolas de k-carragenina inoculadas con *E. coli* K12/pTG201.

- población celular en 21% oxígeno.
- población celular en 100% de oxígeno.
- △  $\mu$  en 21% de oxígeno.
- ▲  $\mu$  en 100% de oxígeno.
- $\mu$  para la población total de la bola (N).
- .....  $\mu$  para la población externa de la bola (Ne).

Evolution of cell population and growth rate ( $\mu$ ) in beads of K-carrageenan inoculated with *E. coli* K12/pTG201.

- cell population in 21% oxygen.
- cell population in 100% oxygen.
- △  $\mu$  in 21% oxygen.
- ▲  $\mu$  in 100% oxygen.
- $\mu$  for the total cell population of the bead (N).
- .....  $\mu$  for the outer population of the bead (Ne).

tiene como consecuencia que la población celular en las bolas sea aproximadamente el doble en este último caso que en presencia de 21% de oxígeno (ver fig. 3).

En la figura 3 puede observarse también la evolución de  $\mu$  para la población celular total en bolas de gel. La determinación de  $\mu$  se efectuó entre 0 y 5 horas por medio de recuento celular después de la disolución de las bolas. Este valor de  $\mu$  igual a  $\mu_{\text{max}}$  (fig. 3) fue el mismo que se determinó para las respectivas células libres tanto en la cepa K12 como en la HB101 (ver tabla 1). Con posterioridad a 5 horas de cultivo

TABLA 1. Valores de  $\mu_{\text{max}}$ , para células libres, en las diversas cepas y condiciones de cultivo. Se obtuvieron los mismos valores de  $\mu_{\text{max}}$  para las células con y sin plásmido (p+ y p-, respectivamente), por lo que la relación  $\alpha = \mu_{\text{p-}}/\mu_{\text{p+}} = 1$  en todos los casos.

Values of  $\mu_{\text{max}}$  obtained for free cells. The same values were obtained for cells with and without plasmid and therefore  $\alpha = \mu_{\text{p-}}/\mu_{\text{p+}} = 1$  in all the cases.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO %	$\mu_{\text{max}}$ (horas <sup>-1</sup> )
HB101	21	1.39
K12	21	2.08
K12	100	1.63

la determinación de  $\mu$  por el método mencionado antes no es fiable ya que el crecimiento celular produce además de incremento de la población en las bolas una notable liberación de células al medio como puede apreciarse en microfografías electrónicas de barrido de muestras de bolas (fig. 4, A y B). Después de las 10 horas iniciales de cultivo (ver fig. 3) el incremento de la población en las bolas es despreciable, en pequeños intervalos de tiempo, por lo que el crecimiento se dirige fundamentalmente a la eliminación de células al medio. Debido a este fenómeno, para la determinación de  $\mu$  en la fase estacionaria se ha considerado a cada bola de gel individualmente como un pequeño quimiostato donde:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N ; \mu = \frac{\text{Ln} \frac{N + Z}{N}}{t} \quad (i)$$

Siendo N la población celular por bola cuya evolución se muestra en la figura 1; Z el número de células liberadas por bola y unidad de tiempo y t un pequeño incremento de tiempo considerado. El valor Z, determinado experimentalmente, mostró pequeñas variaciones



FIGURA 4. Micrografías electrónicas de barrido obtenidas en muestras de bolas de k-carragenina inoculadas con *E. coli* K12/pTG201 cultivadas en presencia de 21% de oxígeno después de 24 horas de cultivo. (Las barras representan 10  $\mu\text{m}$ .)

- A. Aspecto de la superficie de una bola de gel.  
 B. Detalle que muestra algunas microcolonias rotas que están liberando células al medio.

Scanning electron micrographs obtained from K-carrageenan beads inoculated with *E. coli* K12/pTG201 cultured in 21% oxygen after 24 hours of incubation. (Bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .)

- A. The bead surface.  
 B. Detail that shows some broken microcolonies that are leaking cells into the medium.

a lo largo de los experimentos con valores medios expresados en células/bola/minuto de  $9.95 \times 10^5$  a 21% de oxígeno, y  $1.41 \times 10^6$  a

100% de oxígeno. Como puede verse en la figura 3 los valores  $\mu$  para la población total de las bolas tienden a decrecer como consecuencia del lento incremento de N.

Los resultados anteriores nos permiten considerar que en las bolas de gel existen al menos dos poblaciones celulares, una interna (Ni) y otra externa (Ne). Las poblaciones Ni y Ne exhiben un crecimiento rápido ( $\mu_{\text{max}}$ ) entre 0 y 5 horas de cultivo, pero después de las 10 horas (fase estacionaria) Ni se encuentra sometida a restricciones difusionales de oxígeno y nutrientes lo cual reduce progresivamente el valor correspondiente de  $\mu$ . Por otro lado Ni no contribuye a la liberación de células al medio. Por el contrario la población Ne permanece sin cambio en la fase estacionaria como se ha indicado antes, lo cual puede explicarse porque el crecimiento de Ne en esta fase se encuentra equilibrado con la eliminación de células al medio. Por otra parte podemos considerar que  $\mu$  de la población Ne permanece también sin cambio —con un valor igual a  $\mu_{\text{max}}$  determinado entre 0 y 5 horas de cultivo— debido a la ausencia de restricciones difusionales sobre el crecimiento. De hecho el valor Z es prácticamente constante durante todo el experimento según hemos visto antes. Como consecuencia del lento incremento de Ni en la fase estacionaria la población total de la bola de gel ( $N = N_i + N_e$ ) también se incrementa y el valor de  $\mu$  total disminuye de acuerdo con los datos experimentales de la figura 3. Asumiendo el esquema anterior podemos aplicar la ecuación (i) para la población externa reemplazando N por Ne y despejando:

$$N_e = \frac{Z}{e^{\mu t} - 1} \quad (\text{ii})$$

Aplicando (ii) a los datos experimentales de la figura 3 se obtiene  $N_e = 2.83 \times 10^7$  células/bola a 21% de oxígeno y  $5.12 \times 10^7$  a 100% de oxígeno. Si estos valores se comparan con la población total de la bola de gel (N), la cual evoluciona de acuerdo con la figura 3, se aprecia como a consecuencia del incremento de la población interna, la relación  $N_e/N$  decrece a lo largo del tiempo oscilando entre 50% y 18% de la población total N (fig. 5).

Teniendo en cuenta los datos anteriores se puede considerar que sólo la población Ne tiene relevancia en las actividades de las bolas de gel y en consecuencia hemos usado el valor  $\mu$  determinado entre 0 y 5 horas para calcular el número de generaciones celulares de las células inmovilizadas (figs. 6 y 7).

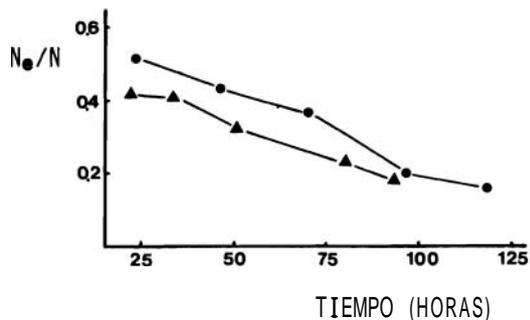


FIGURA 5. Evolución de la relación: población celular externa/población celular interna ( $N_e/N$ ) en bolas de K-carragenina inoculadas con *E. coli* K12/pTG201.

- - bolitas cultivadas en 21% de oxígeno.
- ▲ - bolitas cultivadas en 100% de oxígeno.

Evolution of the ratio: outer cell population/total cell population ( $N_e/N$ ) in K-carragenan beads inoculated with *E. coli* K12/pTG201.

- - beads cultured in 21% oxygen.
- ▲ - beads cultured in 100% oxygen.

ESTABILIDAD PLASMÍDICA

Se define la estabilidad plasmídica de acuerdo con IMANAKA & AIBA (1981) como el mantenimiento del plásmido inalterado, manifestando sus características fenotípicas durante el crecimiento de las células huésped.

Los datos de estabilidad del plásmido pTG201 en las diferentes cepas bacterianas y condiciones de cultivo se muestran en la figura 6 (A, B y C) donde podemos observar la variación de la fracción celular que porta el plásmido ( $F = p+/p-+p+$ ) en relación con el número de generaciones celulares. Estos datos han sido ajustados a la ecuación de IMANAKA & AIBA (1981):

$$F = \frac{1 - \alpha - h}{1 - \alpha - h2^{(\alpha+h-1)n}} \quad (iii)$$

h representa según IMANAKA & AIBA (1981), la probabilidad de que una célula sin expresión fenotípica del plásmido sea originada tras una división celular, lo cual puede ser debido a la segregación del plásmido o a una delección.

n es el número de generaciones celulares desde el inicio del experimento con  $F = 1$ .

a representa la relación entre tasas de crecimiento de células sin plásmido y con plásmido respectivamente ( $\mu p-/\mu p+$ ). Para  $a = 1$  (ver tabla 1) la expresión (iii) se simplifica:

$$F = 2^{-hn} \quad (iv)$$

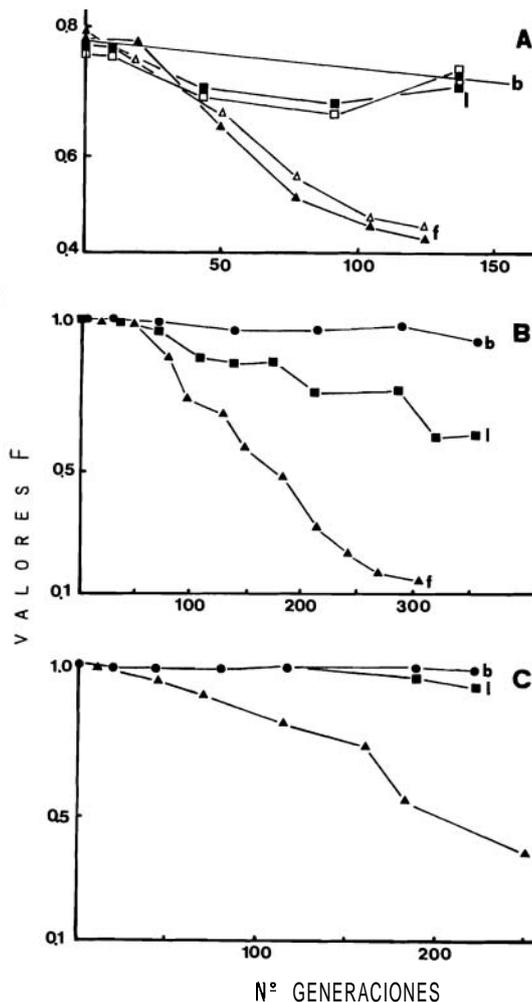


FIGURA 6. Evolución de la fracción de población bacteriana que porta el plásmido pTG201 (valor F) según los marcadores cat-02-asa (●, ■, ▲) y  $\beta$ -lactamasa (○, □, △).

- , ● - Células inmobilizadas en las bolas de gel (gráficas marcadas con la letra b).
- , ■ - Células liberadas por las bolas de gel (gráficas marcadas con la letra l).
- △, ▲ - Células libres (gráficas marcadas con la letra f).

- A. Cepa *E. coli* HB101, cultivos en presencia de 21% de oxígeno.
- B. Cepa *E. coli* K12, cultivos en presencia de 21% de oxígeno.
- C. Cepa *E. coli* K12, cultivos en presencia de 100% de oxígeno.

Evolution of the fraction of cells carrying plasmid pTG201 (F value) using cat-02-ase marker (●, ■, ▲) and  $\beta$ -lactamase marker (○, □, △).

- , ● - Immobilized cells (plots marked b).
- , ■ - Cells leaked from beads (plots marked l).
- △, ▲ - Free cells (plots marked f).
- A. *E. coli* HB101 strain, cultures in 21% oxygen
- B. *E. coli* K12 strain, cultures in 21% oxygen.
- C. *E. coli* K12 strain, cultures in 100% oxygen

El ajuste se llevó a cabo por el método de mínimos cuadrados y se determinó en cada caso el correspondiente valor *h*. Los valores *h* obtenidos así como su significación estadística se muestran en la tabla 2. Estos valores *h* han

**TABLA 2.** Valores *h* obtenidos ajustando los datos mostrados en la figura 6 A, B y C a la ecuación (iv). Los valores *h* fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.01$  a  $P < 0.001$ ) con la excepción de (\*) en que  $P = 0.05$ . Los símbolos de las muestras son los mismos que en la figura 6.

Values of *h* obtained by fitting to equation (iv) the data showed in figura 6 A, B y C. *h* values are significative ( $P < 0.01$  a  $P < 0.001$ ) with the only exception of (\*) that  $P = 0.05$ . The symbols of the samples are the same as in figure 6.

MUESTRAS VALORES <i>h</i>		
Cepa HB101 21% de oxígeno	A <sup>b</sup>	$4.16 \times 10^{-4}$
	A <sup>1</sup>	$7.88 \times 10^{-4*}$
	A <sup>f</sup>	$6.17 \times 10^{-3}$
Cepa K12 21% de oxígeno	B <sup>b</sup>	$1.60 \times 10^{-4}$
	B <sup>1</sup>	$1.94 \times 10^{-3}$
	B <sup>f</sup>	$9.74 \times 10^{-3}$
Cepa K12 100% de oxígeno	C <sup>b</sup>	$6.28 \times 10^{-5*}$
	C <sup>1</sup>	$3.92 \times 10^{-4}$
	C <sup>f</sup>	$5.38 \times 10^{-3}$

sido comparados entre sí para determinar si las diferencias observadas entre los mismos tienen significación estadística. La tabla 3 muestra el resultado de dicha comparación y los valores mostrados representan los límites superiores de *P*, probabilidad de que los valores *h* comparados entre sí no sean diferentes.

**TABLA 3.** Comparación estadística entre los valores *h* mostrados en la tabla 2. Los números representan los límites superiores de *P* (probabilidad de que los valores *h* comparados no sean diferentes).

X = Comparación sin sentido.

NS = Diferencias no significativas entre los valores *h* comparados ( $P > 0.05$ ).

Statistical comparison among the *h* values, showed in table 2. The numbers represent the higher limits of *P* (probability that compared *h* values are not different). X = Nonsense comparison. NS = Non significative difference between compared *h* values ( $P > 0.05$ ).

	A <sup>b</sup>	A <sup>1</sup>	A <sup>f</sup>	B <sup>b</sup>	B <sup>1</sup>	B <sup>f</sup>	C <sup>b</sup>	C <sup>1</sup>
A <sup>1</sup>	NS	X						
A <sup>f</sup>	0.05	0.001	X					
B <sup>b</sup>	NS	X	X	X				
B <sup>1</sup>	X	0.05	X	0.001	X			
B <sup>f</sup>	X	X	0.02	0.001	0.001	X		
C <sup>b</sup>	NS	X	X	NS	X	X	X	
C <sup>1</sup>	X	NS	X	X	0.001	X	0.01	X
C <sup>f</sup>	X	X	NS	X	X	0.01	0.001	0.01

## INFLUENCIA DE LA INMOVILIZACIÓN

Como puede verse en las tablas 2 y 3 en todos los casos la estabilidad plasmídica es muy alta para células inmovilizadas en las bolas de gel (muestras b) y en las liberadas (muestras 1) en relación a los cultivos de células libres en las mismas condiciones (muestras f). Las células inmovilizadas mantienen en valor inicial de *F* con pequeñas variaciones y los correspondientes valores *h* son, por lo tanto, muy reducidos en los tres casos, sin embargo esta tendencia a mantener *F* constante disminuye los coeficientes de correlación y en consecuencia la significación estadística de los valores *h*. Por esta razón no se determinaron diferencias significativas entre los valores *h* de las células inmovilizadas (tabla 3).

Las células liberadas por las bolas de gel (muestras 1) presentan valores *F* que decrecen más rápidamente que en el caso de las células inmovilizadas en el gel (muestras b) tal como muestran sus mayores valores *h*, pero en todos los casos la estabilidad plasmídica es mucho mayor en células liberadas del sistema inmovilizado que en células libres (muestras f) que presentan valores *h* significativamente menores (véase tablas 2 y 3).

## INFLUENCIA DEL SISTEMA REC

En la figura 6 (A y B) y tablas 2 y 3 podemos ver que la cepa HB101 (recA-) presenta, en todos los casos, una mayor estabilidad plasmídica respecto a la cepa K12 (rec+) en las mismas condiciones de cultivo (21% de oxígeno). Sólo hay una aparente discrepancia en células inmo-

vilizadas (muestras b) pero en este caso, como se ha indicado anteriormente, no se han observado diferencias significativas entre los valores h debido a la elevada estabilidad plasmídica de estas muestras.

### INFLUENCIA DEL 100% DE OXÍGENO

Como puede verse en la figura 6 (B y C) en las tablas 2 y 3, las células libres de la cepa K12 presentan un efecto de estabilización plasmídica cuando son cultivadas en presencia de 100% de oxígeno con valores h significativamente menores que los valores h obtenidos a 21% de oxígeno (muestras Bf y Cf respectivamente).

En relación a las células inmovilizadas el efecto del 100% de oxígeno es aún más evidente (ver fig. 6 C y tablas 2 y 3) ya que en la estabilidad plasmídica está muy incrementada tanto en células inmovilizadas en el gel como en las liberadas por el mismo. En efecto los valores h para la cepa K12 a 100% de oxígeno son significativamente menores que a 21% de oxígeno (muestras Cl y Bl respectivamente).

Es de notar que en todos los casos, para células libres e inmovilizadas, los valores h de la cepa K12 en presencia de 100% de oxígeno no presentan diferencias significativas con los valores h obtenidos para la cepa HB101 a 21% de oxígeno.

### PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

Los resultados de la producción de actividad cat-02-asa para las diversas cepas y condiciones de cultivo se muestran en la figura 7 A, B y C.

En lo que respecta a células libres podemos apreciar que en presencia de 21% de oxígeno la cepa K12 muestra aproximadamente el doble de producción de actividad enzimática que HB101 (fig. 7 A, B). Estos resultados contrastan con los obtenidos para la cepa K12 en presencia de 100% de oxígeno la cual presentó el mínimo de producción de actividad enzimática observado (fig. 7 C).

En células inmovilizadas puede verse que la producción enzimática es siempre más elevada en células liberadas que en cultivos de células libres en las mismas condiciones (fig. 7 A, B y C). El máximo fue obtenido con células inmovilizadas de la cepa K12 en presencia de 100% de oxígeno, resultado que contrasta con la baja productividad obtenida por el sistema homólogo de células libres (fig. 7 C).

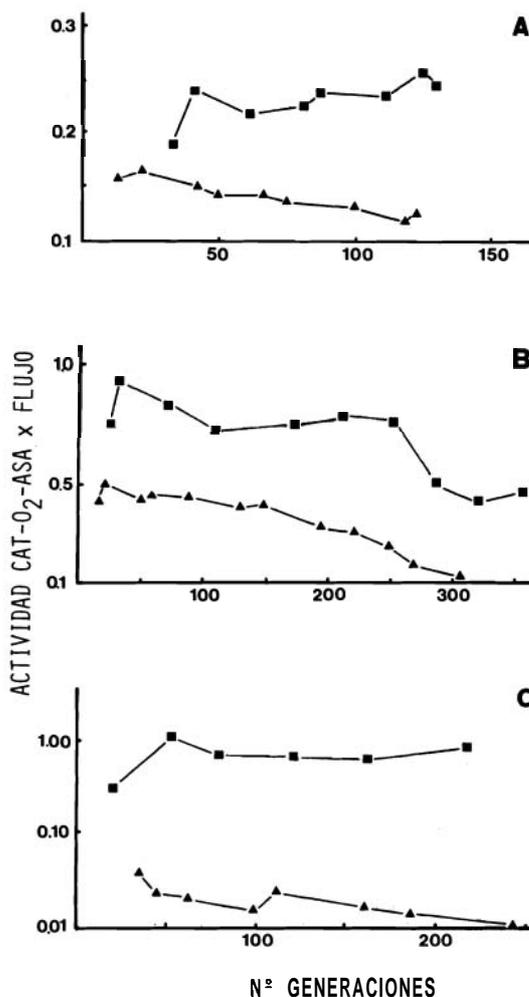


FIGURA 7. Producción de actividad cat-02-asa cada minuto por el quimiostato en cultivos de células libres (A) y de células inmovilizadas (■).

- A. Cepa *E. coli* HB101/pTG201, cultivos en presencia de 21% de oxígeno.  
 B. Cepa *E. coli* K12/pTG201, cultivos en presencia de 21% de oxígeno.  
 C. Cepa *E. coli* K12/pTG201, cultivos en presencia de 100% de oxígeno.

Production of cat-02-ase per minute by the chemostat in free cell cultures (▲) and immobilized cell cultures (■).

- A. *E. coli* HB101/pTG201 strain, cultures in 21% oxygen.  
 B. *E. coli* K12/pTG201 strain, cultures in 21% oxygen.  
 C. *E. coli* K12/pTG201 strain, cultures in 100% oxygen.

### DISCUSIÓN

El resultado obtenido en todos los casos para  $a = \mu p + / \mu p - = 1$  (tabla 1) muestra que el

medio BL utilizado es suficientemente rico y no impone por lo tanto restricciones nutricionales a las células portadoras de plásmido. Algunos autores, revisados por IMANAKA & AIBA (1981), encuentran también valores de  $\mu$  iguales o muy próximos a 1 en el mismo medio para cepas de *E. coli* portadoras de plásmidos tales como ColE1 o derivados del mismo.

La disminución de  $\mu$  observada en presencia de 100% de oxígeno, puede ser interpretada como consecuencia del efecto tóxico del exceso de oxígeno (FRIDOVICH, 1978), lo cual también se manifiesta por una menor producción de biomasa en el quimiostato con células libres en presencia de 100% de oxígeno en relación a las mismas en presencia de 21% de oxígeno. Sin embargo en el sistema de células inmovilizadas la situación es a la inversa y la mayor producción de biomasa se produce en presencia de 100% de oxígeno (MARÍN-INIESTA, resultados no publicados). Por otra parte las micrografías ópticas de cortes de bolas de gel (fig. 1C y D) muestran que las colonias superficiales de bolas cultivadas en presencia de 21% de oxígeno presentaron tamaños similares a las cultivadas al 100% de oxígeno. Sin embargo en capas más profundas de 100  $\mu\text{m}$  el tamaño medio de las colonias en el gel es claramente mayor en bolas cultivadas en presencia de 100% de oxígeno, lo cual explica la mayor población celular por bola en este último caso (ver fig. 3). Este fenómeno es un ejemplo de la observación realizada por FUJIMURA *et al.* (1984) en el sentido de que las células inmovilizadas en geles tales como k-carragenina pueden crecer en forma de microcolonias las cuales eligen un ambiente adecuado para su desarrollo protegidas de condiciones externas adversas por la capa de gel. De esta forma las células eluden el exceso de oxígeno del medio externo y crecen allí donde la limitación difusional de oxígeno y nutrientes así como la actividad de agua reducida crean condiciones óptimas para el crecimiento celular (MATTIASSON & HAHN-HAGERDAL, 1982).

SHINMYO *et al.* (1982) han descrito para *Bacillus amyloliquefaciens* una limitación del crecimiento en K-carragenina a una capa superficial de 50  $\mu\text{m}$ , por efecto de la limitación difusional de oxígeno. Este resultado contrasta con el obtenido por nosotros (ver fig. 1), pero hemos de considerar que *B. amyloliquefaciens* es un aerobio estricto, por lo que la limitación de oxígeno impide el crecimiento, en tanto *E. coli* puede crecer con metabolismo fermentativo, en ausencia de oxígeno, en capas profundas del gel.

IMANAKA & AIBA (1981) han establecido la regla, válida para células libres, de que existe una relación inversa entre la elevada produc-

ción de proteína codificada por un plásmido y la estabilidad de dicho plásmido. Nuestros resultados con células inmovilizadas contradicen esta regla ya que encontramos al mismo tiempo el máximo de estabilidad plasmídica y de productividad enzimática en relación a células libres. Sin embargo la regla se cumple cuando comparamos las cepas HB101 (*recA*<sup>-</sup>) y K12 (*recA*<sup>+</sup>), esta última presenta una elevada actividad cat-02-asa pero una menor estabilidad plasmídica tanto en células libres como inmovilizadas (figs. 6, 7 y tabla 2).

La mayor actividad cat-02-asa de la cepa K12 (*recA*<sup>+</sup>) en relación a la cepa HB101 (*recA*<sup>-</sup>) puede justificarse debido a que el sistema de expresión del gen *Xyle* en el plásmido pTG201 está controlado por el represor CI857 (Dairena, comunicación personal) el cual puede ser inactivado por la actividad de la proteína *recA* (JOHNSON *et al.*, 1981; PABO *et al.*, 1982; OHLENDORF *et al.*, 1982). Sin embargo en presencia de 100% de oxígeno, las células libres de la cepa K12 muestran una importante disminución de la actividad cat-02-asa lo cual puede relacionarse con dos efectos del exceso de oxígeno: un efecto tóxico, manifestado en la disminución de  $\mu$  y un hipotético efecto sobre el sistema *rec*. Este último efecto se manifiesta asimismo sobre la estabilidad plasmídica ya que los valores *h* para todas las muestras de la cepa K12 a 100% de oxígeno son significativamente menores que a 21% de oxígeno y sin embargo no presentan diferencias significativas con los valores *h* obtenidos para HB101 a 21% de oxígeno (ver tablas 2 y 3). Esto refuerza la idea de un efecto del oxígeno puro en el cultivo eliminando la inestabilidad plasmídica originada por el sistema *rec* en *E. coli*.

Diversos autores (DE TAXIS DU POET *et al.*, 1986 y 1987; MARÍN-INIESTA *et al.*, 1987; NASRI *et al.*, 1987) han utilizado  $\mu$  determinada en células inmovilizadas, durante las primeras horas de cultivo, para calcular el número total de generaciones celulares en cultivos en quimiostato sin tener en cuenta que las limitaciones difusionales de oxígeno y nutrientes, debido al efecto de pantalla que producen las microcolonias superficiales, limitan paulatinamente el crecimiento de la población interna (Ni) y disminuyen drásticamente  $\mu$  en la totalidad de las bolas al cabo de 5 a 10 horas de cultivo (ver fig. 3). Sin embargo si consideramos que sólo la población externa de las células inmovilizadas (Ne) contribuye a la liberación de células al medio y que ésta no se encuentra sometida a limitaciones difusionales, la objeción queda obviada.

La población en las bolas de gel se distribuye formando microcolonias lo cual implica un

efecto de compartimiento del gel; DE TAXIS *et al.* (1986) investigaron su relación con la estabilidad plasmídica, concluyendo que la compartimentación no es relevante a la hora de justificar la estabilidad de las células inmovilizadas y por lo tanto es posible que otras características de la distribución celular en el gel tengan una mayor influencia en la estabilidad plasmídica.

La liberación de células de las bolas ocurre por eclosión de las colonias externas (fig. 4) lo cual da lugar a huecos en la superficie del gel que facilitan la difusión de oxígeno y nutrientes favoreciendo de esta forma el desarrollo de nuevas colonias de tal manera que  $N_e$  permanece constante (MARÍN-INIESTA *et al.*, 1987 y 1988). Es necesario determinar si estas nuevas colonias, que reemplazan a las que se rompen, son originadas por reinoculación externa procedente de algunas de las células liberadas o por el contrario existe un reemplazamiento continuo de las colonias externas por las colonias internas adyacentes.

En el primer caso (reinoculación externa) es posible que no exista una perfecta evacuación celular de las colonias que eclosionan y posteriormente los huecos formados en el gel se cierran al menos parcialmente con lo que las células remanentes podrían crecer formando nuevas colonias. Este ha sido el criterio mantenido por diversos autores (DE TAXIS DU POET *et al.*, 1986 y 1987; MARÍN-INIESTA *et al.*, 1987; NASRI *et al.* 1987). Por otra parte en un reciente artículo (MARÍN-INIESTA *et al.*, 1988) se demuestra la existencia de un gradiente de  $F$  en las células inmovilizadas en relación a la distancia a la superficie. Este gradiente puede estimarse entre el 8 y 10% de la población total de las bolas de gel, para la cepa K12/pTG201 en presencia de 21% de oxígeno, y en torno al 16% para la misma cepa cultivada en presencia de 100% de oxígeno, lo cual concuerda con los resultados de evolución del cociente  $N_e/N_i$  que se muestran en la figura 5 ya que en ambos casos la población celular sometida a gradiente de  $F$  se encuentra incluida en  $N_e$ . El hecho de que este gradiente se haga más aparente a lo largo del tiempo sugiere una evolución independiente de las poblaciones celulares  $N_e$  y  $N_i$ , lo que sustenta la hipótesis de reinoculación externa. No obstante la reinoculación interna es también una atractiva posibilidad puesto que explicaría, al menos parcialmente, el mantenimiento de los valores  $F$  ya que la población celular interna permanecería en estado latente («resting cells») con un número de generaciones reducido y por lo tanto según la ecuación (iii) de IMANAKA & AIBA (1981) con poca incidencia sobre los valores iniciales de  $F$ . Es también posible la exis-

tencia de una mezcla de ambos tipos de inoculación.

En el momento actual el autor se encuentra trabajando sobre aspectos morfológicos de células inmovilizadas por medio de microscopía óptica y electrónica con objeto de poder discernir entre arribas hipótesis.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi agradecimiento al profesor M. Canteras-Jordana, catedrático del Departamento de Bioestadística de la Universidad de Murcia por su ayuda técnica y sus constructivas discusiones.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BAUDET, C.; BARBOTIN, J. N. & GUESPIN-MICHEL, J. 1983. Growth and sporulation of entrapped *Bacillus subtilis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 297-301.
- DE TAXIS DU POET, P.; DHULSTER, P.; BARBOTIN, J. N. & THOMAS, D. 1986. Plasmid inheritability and biomass production: comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18 (pTG201) without selection pressure. *J. Bacteriol.* 165: 871-877.
- DE TAXIS DU POET, P.; ARCAND, Y.; BERNIER, R. J.; BARBOTIN, J. N. & THOMAS, D. 1987. Plasmid stability in immobilized and free recombinant *Escherichia coli* JM105 (pKK223-200): importance of oxygen diffusion, growth rate, and plasmid copy number. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1548-1555.
- DHULSTER, P.; BARBOTIN, J. N. & THOMAS, D. 1984. Culture and bioconversion use of plasmid-harboring strain of immobilized *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 87-93.
- ENSLEY, B. D. 1986. Stability of recombinant plasmids in industrial microorganisms. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 4: 263-277.
- FRIDOVICH, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- FUJIMURA, M.; KATO, J.; TOSA, T. & CHIBATA, I. 1984. Continuous production of L-arginine using immobilized growing *Serratia marcescens* cells: effectiveness of supply of oxygen gas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 79-84.
- HARRIS, T. J. R. 1983. Expression of eukariotic genes in *E. coli*. In: R. WILLIAMSON *Genetic engineering*, vol. 4: 128-155. Academic Press, New York.
- IMANAKA, T. & AIBA, S. 1981. A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmids. *Annals New York Acad. Sci.* 369: 1-14.
- INLOES, D. S.; SMITH, W. J.; TAYLOR, D. P.; COHEN, S. N.; MICHAELS, A. S. & ROBERTSON, C. R. 1983. Hollow fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2.653-2.681.
- JOHNSON, A. D.; POTEETE, A. R.; LAUER, G.; SAUER, R. T.; ACKER, G. K. & PRASHNE, M. 1981. **Repre-**

- sor and Cro-components of an efficient molecular switch. *Nature* **294**: 217-223.
- MARÍN-INIESTA, F.; DE TAXIS DU POET, P.; DHULSTER, P.; THOMAS, D. & BARBOTIN, J. N. 1987. Immobilized bacteria and plasmid stability. *Annals New York Acad. Sci.* **501**: 317-329.
- MARÍN-INIESTA, F.; NASRI, M.; DHULSTER, P.; BARBOTIN, J. N. & THOMAS, D. (1988). Influence of oxygen supply on the stability of recombinant plasmid pTG201 in immobilized *E. coli* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 455-462.
- MATTIASSON, B. & HAHN-HAGERDAL, B. 1982. Microenvironmental effects on metabolic behaviour of immobilized cells, a hypothesis. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 52-55.
- NASRI, M.; SAYADI, S.; BARBOTIN, J. N.; DHULSTER, P. & THOMAS, D. 1987. Influence of immobilization on the stability of pTG201 recombinant plasmid in some strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 740-744.
- OHLENDORF, D. H.; ANDERSON, W. F.; FISHER, R. G.; TAKEDA, Y. & MATTHEWS, B. W. 1982. The molecular basis of DNA-Protein recognition inferred from the structure of Cro repressor. *Nature* **298**: 718-723.
- PABO, C. O. & LEWIS, M. 1982. The operator-binding domain of repressor: structure and DNA recognition. *Nature*. **298**: 443-447.
- SEO, J. H. & BAILEY, J. E. 1986. Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1.590-1.594.
- SHINMYO, A.; KIMURA, H. & OKADA, H. 1982. Physiology of amylase production by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**:7-12.
- TAKATA, I.; TOSA, T. & CHIBATA, I. 1977. Screening of matrix suitable for immobilization of microbial cells. *J. Solid. Phase Biochem.* **2**: 225-236.
- WATSON, T. G.; PINCHES, A. & LOUW, M. E. 1986. Effect of growth rate on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 687-690.
- ZUKOWSKI, M. N.; GAFFNEY, D. F.; SPECK, D.; KAUFFMAN, M.; FINDELLI, A.; WISECUP, A. & LECOCQ, J. P. 1983. Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1.101-1.105.