

# Estudio de algunas propiedades fisicoquímicas y biológicas del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K8

MARIA DEL CARMEN HERRERA-BAUTISTA, JORGE GONZALEZ-Y-MERCHAND\*; JUVENCIO RUIZ-PUENTE, ANA MARIA MESTA-HOWARD\* y JORGE ORTIGOZA-FERADO\*

Laboratorio de Microbiología General  
Departamento de Microbiología  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN  
Apartado Postal 4-870  
06400 México, D.F.

HERRERA-BAUTISTA, M. del C., J. GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J. RUIZ-PUENTE, A.M. MESTA-HOWARD y J. ORTIGOZA-FERADO, 1991. Estudio de algunas propiedades fisicoquímicas y biológicas del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K8. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* **34**: 57-64.

**RESUMEN:** Se determinó el efecto que producían diferentes valores de pH, solventes y temperaturas sobre la solubilización, la viscosidad y la inocuidad del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* (PCK) K8. Las concentraciones utilizadas fueron: 1%, 2% y 3%.

Los resultados nos indicaron que independientemente de las diferentes condiciones de temperatura, pH y solventes, el PCK se solubilizó después de 10 a 20 minutos de agitación constante. El PCK K8 fue inocuo al ratón únicamente en las siguientes condiciones: a) PCK al 1% a pH de 5 y de 9, y b) PCK al 1% disuelto en solución salina a una temperatura de 50°C.

Se sugiere la utilización del PCK disuelto en las condiciones anteriores para usarlo como sustancia que reduzca las defensas de un huésped no susceptible.

## INTRODUCCIÓN

Bajo ciertas condiciones de cultivo, algunas bacterias producen polisacáridos extracelulares.<sup>12</sup> El papel biológico o las funciones de estos polímeros son poco conocidos, pero su localización sobre la superficie bacteriana sugiere que pueden estar involucrados en las interacciones de la célula con su medio ambiente.<sup>2,12</sup>

A partir de 1976, en el Departamento de Microbiología de la ENCB se han estudiado algunas características inmunológicas del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* (PCK) K8, tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>3,7</sup> Dentro de estos estudios, se encontró que a 2,000 µg/ml el PCK reducía notablemente la resistencia del huésped hacia una infección

---

\* Becarios de la COFAA—IPN.

producida por *Salmonella typhi*. Este mismo efecto ha sido observado con otras sustancias como la mucina y el citrato férrico<sup>4,9</sup> pero con resultados menos sorprendentes, por lo que se podrían probar mayores concentraciones del PCK K8 y mejorar dicho efecto. También se observó que para preparar dicha concentración de PCK existían problemas de solubilización, los cuales impedían continuar con el estudio usando concentraciones más elevadas que son promisorias para su uso como sustancia que favorece la virulencia de cepas en un huésped no susceptible. Debido a lo anterior y a que se necesitaba trabajar con concentraciones muy elevadas del PCK, los objetivos del presente estudio fueron: estudiar algunas propiedades fisicoquímicas del PCK K8 para conocer las condiciones que permitan su rápida solubilización y determinar si las diferentes condiciones de solubilización influyen en la toxicidad de dicho PCK al ser inoculado en animales de laboratorio.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Microorganismo.** *Klebsiella pneumoniae* K8, se aisló a partir de un brote de septicemia.<sup>7</sup>

**Obtención y purificación del polisacárido capsular de *K. pneumoniae* (PCK).** El PCK se obtuvo y purificó como se ha mencionado anteriormente.<sup>3</sup>

**Determinación de la pureza del PCK.** Los criterios de pureza que se aplicaron al polisacárido fueron dos: la determinación de proteínas, utilizando el método de Lowry<sup>5</sup> y la determinación del contenido de ácidos nucleicos leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

**Condiciones para la solubilización del PCK.** Para la solubilización del PCK se probaron: dos disolventes diferentes, agua destilada y solución salina al 0.85%; tres valores de pH, 5, 7 y 9, y tres temperaturas, 22°C, 50°C y 70°C. En cada una de las condiciones anteriores se utilizó el PCK al 1%, 2% y 3%. Para probar dichas condiciones, se determinaron: el tiempo de solubilización total de la muestra, su viscosidad final y su inocuidad en ratón, de la siguiente forma:

- a) **Tiempo de solubilización total.** Se registró el tiempo total requerido para solubilizar el PCK en las diferentes condiciones.
- b) **Viscosidad.** Se utilizó el viscosímetro de Ostwald. También se determinaron los tiempos de flujo de los disolventes sin PCK con la finalidad de usarlos como testigos. La viscosidad relativa se calculó según la fórmula:

$$\text{Viscosidad relativa} = \frac{\text{tiempo en que fluye el problema}}{\text{tiempo en que fluye el testigo}} \times 100$$

- c) **Prueba de inocuidad.** Se formaron grupos de cinco ratones para cada una de las diferentes condiciones en las cuales fue solubilizado el PCK, y otros dos grupos de cinco ratones fueron usados como testigos de diluyente y cepa de ratón respectivamente. Se inocularon 0.5 ml de cada una de las muestras por vía intraperitoneal. Se registró diariamente el peso de cada grupo de ratones, observando si los animales presentaban algún signo anormal con respecto a los testigos.

### RESULTADOS

**Preparación del PCK.** El PCK K8 que se aisló y purificó como se mencionó anterior-

mente, contenía 5% de proteínas y de ácidos nucleicos.

*Condiciones para la solubilización del PCK.* En la tabla 1 se muestran los resultados del efecto del disolvente sobre la solubilización y toxicidad del PCK K8, en donde se observa que al aumentar la concentración del PCK se incrementa la viscosidad, siendo mayores estos valores en agua destilada que en solución salina; además, en esta última la solubilización es más rápida. Con respecto a la prueba de inocuidad se observa que el PCK, a concentraciones del 1% al 3% en solución salina y en agua destilada, es tóxico para el ratón.

En la tabla 2 se muestra que el polisacárido a pH de 9.0 se disolvió más rápidamente que a pH 5 y 7, observándose además, que al incrementarse la concentración del PCK se aumentó la viscosidad. En esta misma tabla también se observa que el PCK al 1% disuelto a pH de 5 y de 9 no es tóxico para el ratón. En cambio, cuando el PCK al 2% y 3% se disolvió en cualquiera de los valores de pH probados, se incrementaron los efectos tóxicos del polímero.

En la tabla 3 se muestra el efecto de la temperatura de solubilización sobre el PCK K8 al 1%, 2% y 3% respectivamente. Aquí se observa que al disolver al PCK en agua destilada y aumentar la temperatura de solubilización, se reduce la viscosidad; pero esta relación no se observa si se disuelve en solución salina. Por otro lado, se presenta la respuesta del ratón al PCK observándose que éste, al 1% en solución salina y disuelto a 50°C, es atóxico, mientras que en las otras condiciones no lo es.

## DISCUSIÓN

Actualmente se ha observado que los polisacáridos capsulares de las bacterias pueden emplearse en una gran variedad de áreas que van desde las industrias de los fármacos y las cremas, hasta la recuperación mejorada del petróleo. Para tales propósitos se han empleado, entre otros, los polisacáridos capsulares de *Xanthomonas campestris* y de *Bacillus* CFW.<sup>8,11</sup>

Otra actividad biológica de los polisacáridos fue estudiada en *Escherichia coli* K1, en la que se observó que el polisacárido aumentó la virulencia de la cepa en ratas recién nacidas.<sup>1</sup> Este mismo efecto fue informado por nuestro Laboratorio para *S. typhi* utilizando el PCK K8, en un intervalo de concentración entre 200 y 2,000 µg/ml.<sup>3</sup> Debido a que en dicho estudio se obtuvieron resultados muy prometedores para el uso del PCK K8 como incrementador de la virulencia de ciertas cepas bacterianas, se estudiaron algunas condiciones (disolventes, pH y temperatura) que permitieran solubilizar, en forma rápida, concentraciones más altas del PCK que pudieran aumentar aún más la virulencia de las cepas bacterianas sin volver tóxico al PCK K8, el cual a concentraciones bajas es inocuo.<sup>3</sup>

Con respecto a los resultados mostrados en la tabla 1, se considera que el PCK K8 a todas las concentraciones trabajadas y con los diluyentes empleados es tóxico para el ratón, aunque se observó que el tiempo total de solubilización con solución salina se disminuyó a la mitad. En esta misma tabla se muestra únicamente el peso promedio inicial por ratón, ya que no se pudo registrar su incremento de peso debido a la muerte de los animales.

En la tabla 2 se muestra que el tiempo total de solubilización fue menor a pH 9. También se observa, que a una misma concentración de PCK y al aumentar el valor de pH, no hay una variación significativa en los valores de viscosidad relativa final. Asimismo, se observa que al realizar la prueba de inocuidad, el producto resultó ser tóxico a pH 7.0

en todas las concentraciones del PCK K8, mientras que sólo fue inocuo a una concentración del 1% y disuelto a pH de 5 y de 9. Debido a lo anterior se sugiere utilizar al PCK al 1% en regulador a pH 5, para su posible uso como sustancia inhibidora de los mecanismos de defensa del ratón y probar concentraciones entre el 1% y 2% para establecer el límite menor del 2% y mayor que el 1% que sea atóxico.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la solubilización del PCK K8 (tabla 3) se observó que el tiempo de solubilización disminuyó al aumentar la temperatura. Sin embargo, las muestras preparadas en dichas condiciones también fueron tóxicas para el ratón, a excepción del PCK K8 al 1% disuelto en solución salina a 50°C.

Al realizar la determinación del PCK al 1%, 2% y 3% en solución salina a 70°C, se observó un incremento en el valor de la viscosidad relativa. Posiblemente esto se deba a algún cambio conformacional de la molécula, pues fue un dato que no estaba de acuerdo con lo esperado.

Las condiciones de solubilización estudiadas permiten el uso del PCK a concentraciones mayores del 1% y menores del 2% para continuar el estudio del efecto del PCK sobre la inhibición de las defensas del huésped citado anteriormente.<sup>3,7</sup>

Además, el trabajo podría servir de base para continuar algunos estudios del efecto adyuvante y de agente crioprotector del PCK sobre vacunas, iniciados en nuestro laboratorio.<sup>6,10</sup>

#### SUMMARY

The effect of different solvents, temperature and pH upon the solubilization, viscosity and innocuity of the capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* (CPK) K8 were tested. The CPK was used at the following concentrations: 1%, 2% y 3%.

The results so far obtained showed that the CPK dissolved independently of the different temperatures, pH and solvents, it always dissolved after 10 to 20 minutes of constant agitation. The CPK showed to be innocuous in the mouse model under these conditions: a) 1% CPK/pH 5 and pH 9, and b) 1% CPK dissolved in saline at 50°C.

According with our results we suggest that the CPK can be used under the previously described conditions as a substance that decreases the immune response of the host.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BERK, S.L., P. NEUMANN, D.S. CHI and J.K. SMITH, 1983. Enhanced virulence effect of K1 polysaccharide in neonatal rats challenged with *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 8: 297-299.
2. FREDERIC, A.T., 1979. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 519-560.
3. GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J., J. RUIZ-PUENTE, A.M. MESTA-HOWARD y J. ORTIGOZA-FERADO, 1986. Efecto del polisacárido de *Klebsiella pneumoniae* K8 sobre la DL<sub>50</sub> de *S. typhi*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 28: 9-13.
4. JOÓ, I., 1975. Virulence-enhancing effect of ferric ammonium citrate on *Vibrio cholerae*. *Prog. Drug. Res.* 19: 546-553.
5. LOWRY, O.M., M.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
6. MARTÍNEZ-AGUILERA, J.J., M.A. CORPI y A.M. MESTA. 1984. Evaluación del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* tipo K-8 como soporte biológico en la conservación de bacte-

- rias por congelación a -20°C y liofilización. XV Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. México. p. 176.
7. MESTA, A.M.; C. AVALOS, J. BARBACHANO, M. CARMONA, A. GARZA, F. LARES; G. SALAZAR, O. VALLEJO y J. ORTIGOZA, 1985. *Klebsiella pneumoniae* como agente patógeno primario. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **27**: 1-6.
  8. MESTA-HOWARD, A. M. and J. E. ZAJIC, 1985. Properties of *Bacillus* from Conroe Oil Field (Texas) and other reservoir sources. En: Microbes and oil recovery. Vol. I. J. E. Zajic y E. C. Donaldson, Eds. Bioresource Publications. El Paso, Texas. p. 295-309.
  9. NUNGESTER, W. F., L. F. JOURDANIS and A. A. WOLF, 1936. The effect of mucin on infections by bacteria. *J. Infect. Dis.* **59**: 11-21.
  10. RUILOBA DE LEÓN, S., J. GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J. JIMÉNEZ-LAÑAREDES, J. RUIZ-PUENTE, A. M. MESTA-HOWARD y J. ORTIGOZA, 1984. Efecto adyuvante del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* sobre la antigenicidad del toxoide tetánico. XV Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. México.
  11. SOTTRELL, I. W. y K. S. KANG, 1978. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. *Dev. Ind. Microbiol.* **19**: 117-131.
  12. SUTHERLAND, W. I., 1972. Bacterial Exopolisaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **8**: 143-206.

TABLA 1. Efecto del disolvente sobre la solubilización y toxicidad del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K8 (PCK)

Producto	Disolvente	Tiempo total de solubilización (min)	Viscosidad relativa	Prueba de inocuidad en ratón		
				Promedio de peso inicial (g)	Promedio de peso final (g)	Relación S/T *
PCK al 1%	Agua destilada	20	3,000	18.8	ND**	0/5
	Solución salina 0.85%	10	1,035	18.4	ND	0/5
PCK al 2%	Agua destilada	20	5,242	18.6	ND	0/5
	Solución salina 0.85%	10	1,171	18.6	ND	0/5
PCK al 3%	Agua destilada	20	12,000	18.6	ND	2/5
	Solución salina 0.85%	15	6,795	18.2	ND	1/5
Testigos de la prueba de inocuidad.	—	—	—	18.2	23.2	5/5

\* Relación sobrevivientes/total

\*\* Prueba no determinada debido a la toxicidad de las muestras (todos, o casi todos los animales murieron).

TABLA 2. Efecto de diferentes valores de pH sobre la solubilización y toxicidad del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* (PCK) K8

Producto	pH	Tiempo total de solubilización (min)	Viscosidad relativa	Prueba de inocuidad en ratón		
				Promedio de peso inicial (g)	Promedio de peso final (g)	Relación S/T *
PCK al 1%	5	16	1,132	18	21	5/5
	7	15	1,015	18.2	ND**	0/5
	9	10	1,042	18	19	5/5
PCK al 2%	5	15	3,129	18.6	ND	2/5
	7	15	2,631	18.4	ND	0/5
	9	10	3,018	18.4	18.8	4/5
PCK al 3%	5	15	6,926	18	ND	0/5
	7	15	6,444	18	ND	0/5
	9	10	5,096	18.4	16.8	4/5
Testigos de la prueba de inocuidad.	—	—	—	18.2	23.2	5/5

\* Relación sobrevivientes/total

\*\* Prueba no determinada debido a la toxicidad de las muestras (todos, o casi todos los animales murieron.)

TABLA 3. Efecto de la temperatura sobre la solubilización y toxicidad del polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* (PCK) K8

Producto	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo total de solubilización (min)	Viscosidad relativa	Prueba de inocuidad en ratón		
					Promedio de peso inicial (g)	Promedio de peso final (g)	Relación S/T *
PCK al 1%	Agua destilada	22	20	3,000	18.8	ND**	0/5
		50	15	1,934	18.6	ND	0/5
		70	10	1,087	18	ND	1/5
	Solución salina 0.85%	22	10	1,035	18.4	ND	0/5
		50	15	604	18	19	5/5
		70	10	963	18	ND	0/5
PCK al 2%	Agua destilada	22	20	5,242	18.6	ND	0/5
		50	15	3,041	18	ND	0/5
		70	15	2,490	18.4	ND	0/5
	Solución salina 0.85%	22	10	1,171	18.2	ND	0/5
		50	10	1,222	18.2	ND	0/5
		70	10	1,724	18.4	ND	0/5
PCK al 3%	Agua destilada	22	20	12,000	18.6	ND	0/5
		50	15	5,173	18	ND	0/5
		70	15	3,383	18.4	ND	0/5
	Solución salina 0.85%	22	15	6,795	18.2	ND	1/5
		50	10	1,764	18.4	ND	0/5
		70	10	1,832	18	ND	0/5
Testigos de la prueba de inocuidad.	—	—	—	—	18.2	23.2	5/5

\* Relación sobrevivientes/total.

\*\*Prueba no determinada debido a la toxicidad de las muestras (todos, o casi todos los animales murieron).