

Prototipo de simulación gravitacional: caracterización de porinas y consumo de glucosa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhimurium* en hipergravedad

Andrés Villalobos, Marcelo Serrano, Javier Salazar y José Miguel Morales*

Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala

*jmmorales@uvg.edu.gt

RESUMEN: La fisiología bacteriana en condiciones de gravedad extrema ha sido poco estudiada. Evaluamos el cambio en el consumo de glucosa y en la producción de porinas (proteínas de membrana externa) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhimurium* creciendo en hipergravedad generada utilizando un prototipo de simulación gravitacional previamente diseñado. Se creció un cultivo durante 6 horas a una gravedad relativa de 750g y se extrajeron las porinas por medio de la resuspensión en buffers con detergentes. Estas se separaron por medio de un SDS-PAGE y se identificaron tres: OmpC (42 kDa), OmpD (39 kDa) y OmpR (27 kDa); que son proteínas importantes en el transporte de sustancias y adhesión celular. También se determinó la tasa de consumo de glucosa en hipergravedad por medio del crecimiento en medio mínimo M9 realizando mediciones cada 2, 4 y 6 horas. Para esto se determinó la concentración de glucosa presente en el medio con el método DNS (ácido dinitrosalicílico) para la estimación de azúcares reductores y se midió la concentración del cultivo. A pesar de haberse reducido en un 90% el crecimiento de la bacteria en hipergravedad, se aumentó la tasa de consumo de glucosa en estas condiciones. Esta investigación demuestra que las demandas bioquímicas cambian en condiciones de hipergravedad generadas por el prototipo y demuestra que se podría utilizar estos modelos para estudiar cambios en la expresión génica y resistencia a antibióticos.

PALABRAS CLAVE: Hipergravedad, *Salmonella*, Porinas, Consumo de glucosa.

Gravitational simulation prototype: glucose consumption and porin production by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhimurium* in hypergravity

ABSTRACT: Bacterial physiology in extreme gravity conditions has been understudied. We evaluated the change in glucose consumption and porin (external membrane proteins) production in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar. *typhimurium* growing in hypergravity generated through a previously designed gravitational simulation prototype. A bacterial culture was grown for 6 hours in a relative gravity of 750g and porins were extracted through the resuspension in detergent buffers. Proteins were separated in an SDS-PAGE and three porins were identified: OmpC (42 kDa), OmpD (39 kDa) y OmpR (27 kDa); which are important in substance transport and cellular adhesion. We determined the glucose consumption rate in minimal media (M9) measuring cell growth every 2, 4 and 6 hours. Glucose concentration was assessed through a DNS (dinitrosalicylic acid) method for the estimation of reducing sugar and bacterial concentration was measured. Although bacterial growth was reduced in 90% under hypergravity conditions, glucose consumption rate increased. This study demonstrates that biochemical demands change in artificially-generated hypergravity, and that these models could be used in studies involving gene expression changes and antibiotic resistance.

KEY WORDS: Hypergravity, *Salmonella*, Porins, Glucose consumption.

Introducción

Salmonella enterica subsp. entérica serovar *Typhimurium* (*S. typhimurium*), es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es la principal responsable de la gastroenteritis humana, además es usada como modelo en ratones para estudios relacionados a la fiebre tifoidea (Ryan y Ray, 2004).

Al ser una bacteria Gram negativo, *S. typhimurium* posee dos membranas celulares, una membrana interna y otra externa. Esta última contiene porinas dentro de su estructura, las cuales son proteínas integrales que funcionan como canales acuosos que permiten la difusión pasiva de solutos al periplasma. Es a través de estas porinas que ingresan a la célula azúcares y otros nutrientes, así como algunas sustancias dañinas para la bacteria, como los antibióticos. La caracterización de las porinas de bacterias Gram negativo ha sido de gran utilidad para comprender varios aspectos de la fisiología bacteriana, al mismo tiempo que brinda una mejor comprensión de cómo las bacterias responden a variables de su entorno que influyen en su crecimiento y proliferación como la temperatura, pH, luz, salinidad (Calderón, 2008) y en el caso de la presente investigación, la gravedad. Calderón, (2008) también evidenció que la expresión de algunas porinas está correlacionada negativamente al estrés por factores externos. Así mismo, Saavedra (2008), demostró que algunas porinas como las OmpW, OmpD y OmpL contribuyen a homeostasis del periplasma y a la supervivencia de *S. typhi* en su hospedero.

Conrad y colaboradores (2011) determinaron que la curva de crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* disminuye a 38 gravedades relativas y que ambas bacterias aumentaron su consumo de glucosa durante todo el crecimiento, lo cual atribuyeron a la presión hidrostática en el medio. Así mismo, estudios más recientes han demostrado que la tasa de reproducción de las bacterias responde negativamente al aumento en la gravedad (Villalobos et al, 2017). Por otra parte, Deguchi et al. (2011), también observaron el decrecimiento en la tasa de reproducción de seis bacterias diferentes. Algunas bacterias mostraron más susceptibilidad a la hipergravedad que otras, siendo *Paracoccus denitrificans* la más resistente a esta. Los autores determinaron que *E. coli* deja de reproducirse en 403,627g. Cabe mencionar que no hay datos acerca de cómo se comporta *S. typhimurium* bajo estas condiciones.

En un estudio previo se diseñó un prototipo de simulación gravitacional que permite comparar el crecimiento bacteriano en condiciones de hipergravedad. El objetivo de la presente investigación es evaluar la fisiología en estas condiciones por medio del cambio en la producción de proteínas y el consumo de glucosa de *S. typhimurium*.

Metodología

Prototipo de simulación gravitacional

Se utilizó el prototipo de simulación gravitacional desarrollado previamente por Villalobos et al. (2017). Este cuenta con un motor de 3200 rpm, cuyo eje está fijado a un disco de madera de 34 cm de diámetro con aberturas para tubos cónicos de 15ml, ubicadas a 10 y 13 cm con respecto al eje a un ángulo de 45°. Se utilizó un regulador de voltaje para disminuir las revoluciones del motor y controlar las gravedades relativas.

Manejo y almacenamiento bacterias

Se utilizó la cepa ATCC14028 de *Salmonella enterica* subsp. entérica serovar *typhimurium*. La bacteria fue almacenada en cepario y se resembró semanalmente para mantener la cepa activa. Se utilizó agar tripticasa de soya Merck #105458 para los cultivos utilizados para la extracción de proteínas, mientras que para la cuantificación de glucosa se utilizó medio mínimo.

Caracterización de porinas

- **Crecimiento en hipergravedad.** Se transfirieron 3mL de un cultivo crecido durante 16 horas en 8 tubos cónicos de plástico VWR de 15 ml. Se instalaron 4 tubos en el prototipo de simulación gravitacional y se crecieron a 750g durante 8 horas, mientras que los otros 4 se crecieron en gravedad estándar.

- **Extracción de porinas.** Se realizó el procedimiento de Arockiasamy y Krishnaswamy (2000) con algunas modificaciones. Las muestras se centrifugaron a 2,000g durante 15 minutos y el gránulo se resuspendió en 200µL de Buffer PBS pH 7.4 - Tween 20 2% (v/v) y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 10,000g durante 10 minutos a 8°C. El gránulo conteniendo membrana se resuspendió en 500µL de Buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 10 mM MgCl₂, y SDS 2% p/v) y se incubó durante 62 horas a 37°C. Luego se centrifugó a 11,000g durante 1 hora a 15°C. El gránulo se resuspendió en 500µL de Buffer II (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 1% SDS, y 0.05% β-ME v/v) y se incubó por 2 horas a 37°C. Después se centrifugó a 11,000g durante 1 hora a 15°C, se resuspendió en 200µL de Buffer III (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 0.4M NaCl y 0.05% β-ME) y se incubó por 2 horas a 37°C. Se centrifugó a 11,000g durante 40 minutos a 15°C y se recolectó el sobrenadante conteniendo porinas en un tubo. Se repitió el procedimiento con Buffer III utilizando 150µL, el sobrenadante se recolectó junto con el extracto de porinas y se almacenó en refrigeración. El contenido de proteína se cuantificó por medio del ensayo de Bradford.

- **SDS-PAGE y caracterización de proteínas.** Se analizaron las proteínas a través de la separación en un gel de poli(acrilamida) (PA), que estaba compuesto por un gel empaquetador (5% PA (p/v), pH

6.8) y un gel separador (12% PA, ph 8.8). Se prepararon las muestras con 15 μ L de buffer Laemmli y 15 μ L del extracto sin diluir. Se corrió el gel a 90V durante 2 horas, luego se tiñó durante 30 minutos con solución de Coomassie (ácido acético 10% (v/v), metanol 40% (v/v) y azul de Coomassie R-250 0.1%) y se destiñó durante una noche en una solución de ácido acético (10%) y metanol (40%). Se utilizó el programa Gel Analyzer para determinar el peso de las proteínas extraídas con base en un estándar de 15-250 kDa BIO-RAD #1610393. Se utilizó la base de datos de UniProt Knowledgebase (UniProtKB) <http://www.uniprot.org/uniprot/> para identificar las porinas según su peso.

Medición del consumo de glucosa

• **Cultivo de bacterias en medio mínimo.** Se transfirió un cultivo de *S. typhimurium* a caldo mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono. Para esto se centrifugó 5 ml de bacteria del cultivo inicial por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadió 5 ml de medio mínimo y se resuspendió la bacteria. Esta se incubó durante 16 horas a 30°C.

• **Crecimiento en hipergravedad.** Se estandarizaron los cultivos iniciales a una absorbancia (OD₆₀₀) de 0.057. Se transfirieron 3 ml a 8 tubos cónicos de plástico VWR de 15 ml. Se instalaron 4 tubos en el prototipo de simulación gravitacional y se crecieron a 750g. Los otros 4 tubos se crecieron a temperatura ambiente para realizar las mediciones en gravedad estándar. Se realizó este procedimiento 3 veces con períodos de crecimiento de 2, 4, y 6 horas.

• **Medición de la concentración de bacterias y glucosa en el medio.** Al finalizar el periodo de crecimiento de las bacterias se recolectó 600 μ L de cada tubo y se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Unisco SQ-2800. El resto del contenido se centrifugó para separar las bacterias del medio y se colectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de glucosa en el medio con el método DNS (ácido dinitrosalicílico) para la estimación de azúcares reductores según el protocolo de Miller (1959). Se midió la absorbancia a 540 nm.

• **Análisis del crecimiento bacteriano y consumo de glucosa.** Se construyeron gráficas semi-log de curvas de crecimiento usando el software Microsoft Excel y se calculó la constante de crecimiento y tiempo de duplicación en base a la fórmula de crecimiento específico de bacterias (Widdel, 2007). Para el consumo de glucosa, se calculó la cantidad de glucosa consumida al restar la cantidad de glucosa en el medio de la concentración inicial. En forma grafica se determinó que se ajustaba a una regresión exponencial y se obtuvo la tasa de cambio a partir de la pendiente de la recta al aplicarle una conversión semi-log.

Resultados

• **SDS-PAGE y caracterización de proteínas.** Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas. En la figura 1 cada banda vertical representa una proteína, las dos bandas de la izquierda corresponden a muestras crecidas en hipergravedad (HG) y las dos de la derecha (G) a las muestras crecidas en gravedad estándar.

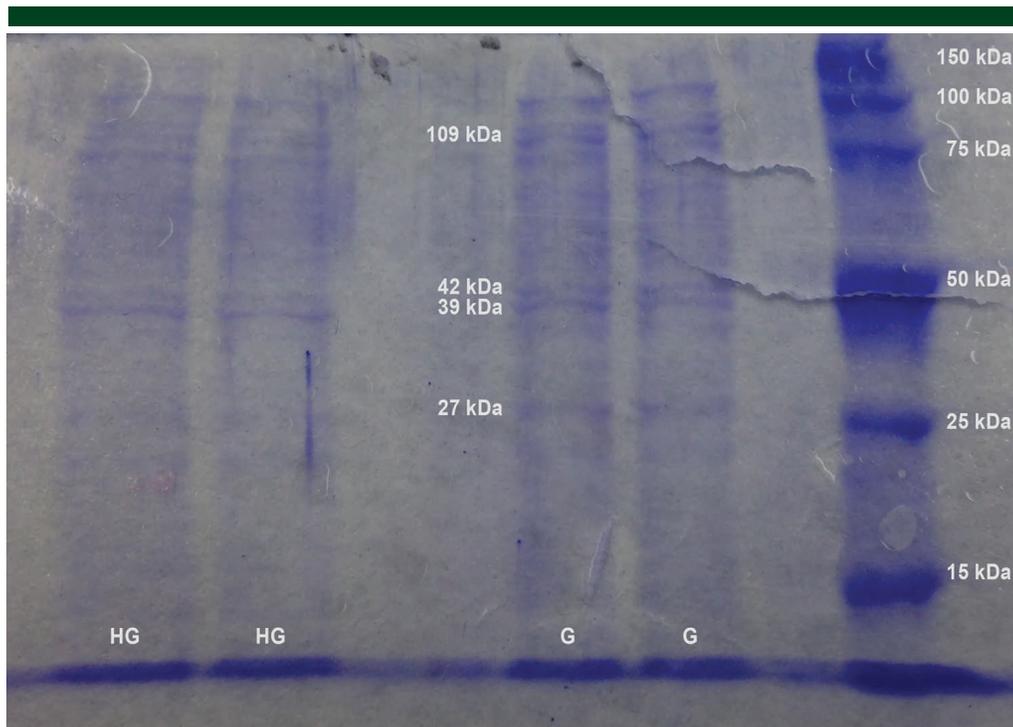


Figura 1. Electroforesis de proteínas de cultivos crecidos en gravedad estándar (G) e hipergravedad (HG).

Cuadro 1. Resultados del consumo de glucosa y el crecimiento de *S. typhimurium* en gravedad normal e hipergravedad en medio mínimo M9.

Gravedad	Tasa de cambio del consumo de glucosa (h-1)	Constante de crecimiento K (h-1)	Tiempo de duplicación g (h)
Normal	0.1570	0.0781	12.8096
Hipergravedad	0.2253	0.0157	63.5780

• **Análisis del crecimiento bacteriano y consumo de glucosa.** La tasa de cambio del consumo de glucosa indica la velocidad del aumento en el consumo de glucosa a medida que la cantidad de bacterias aumentaba. Se encontró que la tasa en hipergravedad era mayor aunque el crecimiento de la bacteria se redujo en un 90.48%.

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento de *S. typhimurium* en gravedad estándar y en hipergravedad (750g). A las 6 horas llegó al inicio de la fase exponencial y no alcanzó el punto de inflexión, mientras que la bacteria crecida en hipergravedad únicamente salió de la fase de adaptación al medio.

En la figura 3 se observa cómo varió la cantidad de glucosa en el medio de cultivo con respecto al tiempo. El consumo de glucosa aumentó en un 20.7% en los cultivos que crecieron en hipergravedad después de 6 horas.

Con un coeficiente de correlación de 0.9115 se puede afirmar que los datos mostrados en la figura 4 corresponden a un modelo exponencial cuadrático. Esto se explica ya que el consumo de glucosa debería ser directamente proporcional al crecimiento exponencial de la bacteria.

Con un coeficiente de correlación de 0.8722 se puede decir que los datos mostrados en la figura 5 corresponden a un modelo exponencial cuadrático, aunque en este caso en menor medida que los datos obtenidos en hipergravedad.

Discusión

• **Consumo de glucosa.** Uno de los objetivos de este estudio era determinar el consumo de glucosa de *S. typhimurium* en condiciones de hipergravedad. Se encontró que la concentración de glucosa era menor en el medio de las bacterias crecidas en hipergravedad que en las que crecieron en gravedad normal, indicando que la tasa de consumo de la glucosa en esas condiciones era mayor. También se encontró que el crecimiento se redujo en un 90.48 %, obteniendo menos de la mitad de bacterias después de 6 horas. Esto se puede deber a que, al encontrarse bajo estrés por factores como el aumento de la presión hidrostática, estas requieren una mayor demanda energética para poder sobrevivir y reproducirse. Esta diferencia podría ser una de las causas de la reducción del crecimiento de

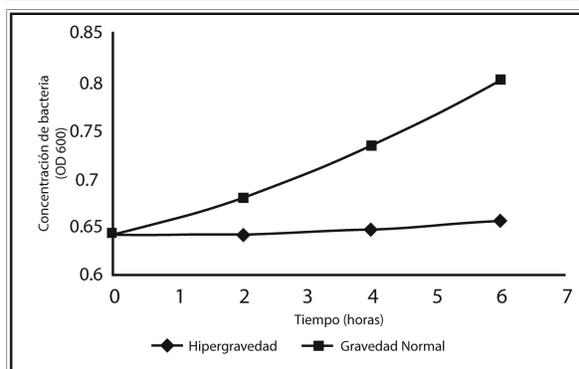


Figura 2. Curvas de crecimiento de *S. typhimurium* en condiciones de gravedad normal e hipergravedad en medio mínimo M9.

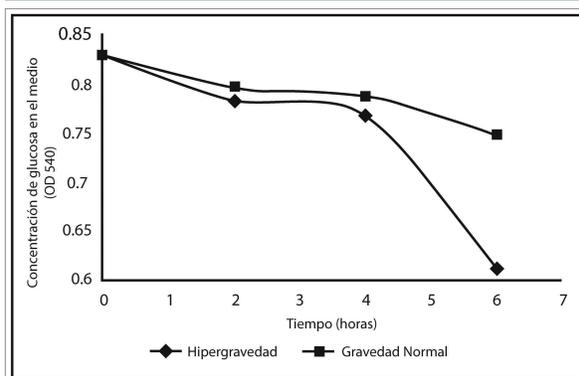


Figura 3. Concentración de glucosa presente en el medio con respecto al tiempo en condiciones de gravedad normal e hipergravedad.

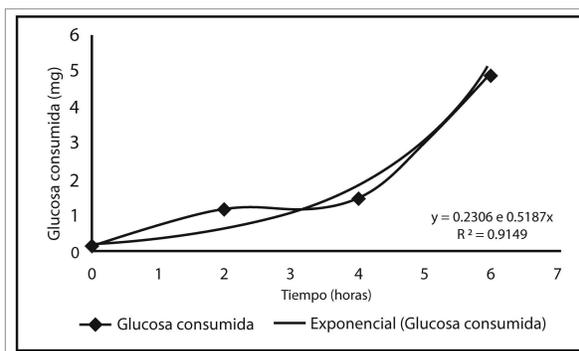


Figura 4. Regresión exponencial de la glucosa consumida por *S. typhimurium* en condiciones de hipergravedad con respecto al tiempo.

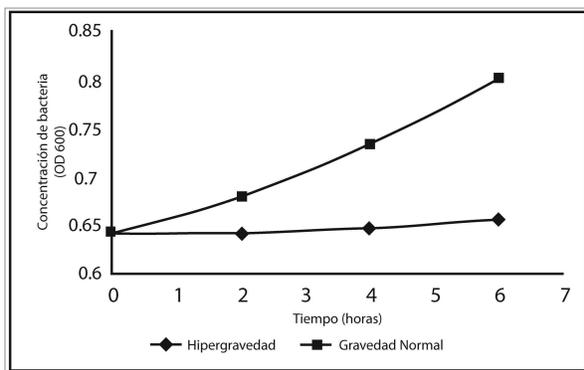


Figura 5. Regresión exponencial de la glucosa consumida por *S. typhimurium* en gravedad normal con respecto al tiempo.

las bacterias en hipergravedad. Al aumentar el consumo de glucosa por bacteria, se disminuye la cantidad de bacterias necesarias para que el cultivo llegue a la fase estacionaria.

La cantidad de bacterias en el medio es variable durante el periodo de crecimiento. Por esto fue necesario calcular una tasa de cambio del consumo de glucosa para poder obtener un dato cuantitativo que fuera representativo. Por medios gráficos de la glucosa consumida se determinó que los datos se ajustaban a una regresión exponencial (ver figuras 3 y 4). Esto tiene sentido ya que el consumo de glucosa es proporcional con la cantidad de bacterias que se encuentran en el medio. La variación en los datos que no es atribuida al azar pudo haber sido causada porque las diferencias en la cantidad de glucosa entre el tiempo inicial y las 6 horas eran muy pequeñas, especialmente para el tratamiento en la gravedad normal.

• **Producción de proteínas.** Se extrajo una mayor cantidad de proteína de las muestras de los cultivos crecidos en gravedad estándar ($106.72 \pm 2.08 \mu\text{g/mL}$) que en los de hipergravedad ($78.94 \pm 6.85 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, esta diferencia en la concentración se debió a la menor cantidad de bacterias por la reducción en la tasa de crecimiento en hipergravedad. Esto se observó como una menor intensidad en el patrón de bandas al observar las proteínas en una electroforesis (figura 1).

Debido a que se utilizó la misma cantidad de proteína a diferente concentración en la electroforesis no es posible determinar cambios en la expresión de proteínas en condiciones de hipergravedad por la intensidad de las bandas del gel. Se recomienda diluir las muestras en gravedad estándar a la misma concentración que las de hipergravedad para atribuir las diferencias en el patrón de las bandas a cambios en la expresión de la proteína. Sin embargo, esto no fue posible debido a la baja cantidad de proteína extraída del cultivo crecido en hipergravedad.

Se extrajeron proteínas en el rango entre 25 y 150 kDa, sin embargo solo fue posible identificar tres: OmpC (42 kDa),

OmpD (39 kDa) y OmpR (27 kDa). Cuya extracción para *S. typhimurium* ha sido reportada previamente por Choonea et al. (2010), Verdugo-Rodríguez et al. (1993) y Arockiasamy y Krishnaswamy (2000). La proteína OmpC está involucrada en el transporte de iones adentro y afuera de la célula, mientras que la OmpR es requerida para la expresión de las porinas OmpD y OmpF (UniProt, 2014).

En el primer paso de la extracción se sedimentó la fracción de membrana después de la primera centrifugación. Sin embargo, debido a que no se llevó a cabo la separación de las membranas interna y externa es posible haber extraído proteínas citosólicas asociadas a la membrana interna. Esto pudo haber afectado en la cantidad de proteína extraída ya que se ha reportado que al realizar una separación de las proteínas citosólicas también se mejora el rendimiento de la extracción de proteínas de membrana externa (Choonea et al. 2010)

Debido a que no se realizaron pasos adicionales para la purificación del extracto, algunos componentes de la membrana pudieron haber quedado asociados a las porinas. La contaminación con lipopolisacáridos afecta el desplazamiento de las proteínas durante una electroforesis (Arockiasamy y Krishnaswamy, 2000). También es posible la contaminación por fragmentos de peptidoglucano asociados a las porinas, lo que puede dificultar su identificación debido a que muchas porinas tienen pesos similares que varían por 1 kDa (Nurminen, 1978).

Las proteínas extraídas de los cultivos crecidos en hipergravedad muestran un desplazamiento mayor en el gel en relación a las proteínas de los de gravedad estándar. Debido a que todas las proteínas muestran un corrimiento inusual es posible que en las muestras de hipergravedad se haya llevado a cabo una menor extracción de impurezas, por lo que se recomienda llevar a cabo procedimientos adicionales de purificación para asegurar la integridad del extracto de proteínas.

El cambio en las funciones fisiológicas en función de la gravedad ha sido poco estudiado. Esta investigación puede servir como base para estudios que aborden otros aspectos del metabolismo celular en hipergravedad, con aplicaciones como la producción de antibióticos en microorganismos y el cambio en la expresión génica.

Conclusiones

El crecimiento de *S. typhimurium* en medio mínimo M9 se redujo en un 90.48% al crecer en hipergravedad, aumentando el tiempo de duplicación.

En base a la tasa de cambio en el consumo de glucosa y la concentración de bacteria se determinó que las bacterias consumen una mayor cantidad de glucosa en condiciones de hipergravedad.

Se identificaron las proteínas OmpC, OmpD y OmpR en cultivos de *S. typhimurium* crecidos en gravedad estándar e hipergravedad; no fue posible determinar cambios en la expresión de las mismas.

Agradecimientos

Agradecemos a Santiago Rodas y Edwin Castañón por su apoyo en el laboratorio. A los departamentos de Bioquímica y Biología de la Universidad del Valle de Guatemala por brindar las instalaciones, materiales y el equipo necesario y a cada una de las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

Bibliografía

- Arockiasamy, A., Krishnaswamy, S. (2000) *Purification of Integral Outer-Membrane Protein OmpC, a Surface Antigen from Salmonella typhimurium Structure - Function Studies: A Method Applicable to Enterobacterial Major Outer-Membrane Protein* Analytical Biochemistry 283: 64-70.
- Calderón, I. (2008) *Regulación de la expresión de porinas de Salmonella enterica serovar Typhimurium en un medio ambiente oxidativo* Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Concurso Nacional Regular 2008. Santiago, Chile.
- Chooeeaa, D, Karlsson, R., Encheva, V. Arnold, C., Appleton, H., Shah, H. (2010) *Elucidation of the outer membrane proteome of Salmonella enterica serovar Typhimurium utilizing a lipid-based protein immobilization technique* BMC Microbiology 10: 44
- Conrad, C, Pai, C, Prasade, K., Deoghare, S., Kazi, U., Fernandes, S. (2014) *Variation in Microbial Growth under Hypergravity* Quantitative biology, Cornell University. <<<http://arxiv.org/abs/1407.5586>>> [Consultado el 26 de octubre de 2017].
- Deguchi, S, Shimoshige, H., Tsudome, M., Mukai, S., Corkery, R., Ito, S., Horikoshi, K. (2011) *Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627g* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (108) 19: 7997-8002.
- Miller, G.L. (1959) *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar* Analytical Chemistry 31 (3): 426-428.
- Nurminen, M. (1978) *A mild procedure to isolate the 34K, 35K and 36K porins of the outer membrane of Salmonella typhimurium* FEMS Microbiology Letters 3: 331-334.
- Ryan, K., Roy, C. (2004) *Sherris Medical Microbiology* 4ta edición, Ed. McGraw Hill. EEUU.
- Saavedra, C. (2012) *Contribución de las porinas OmpW, OmpD y OmpL de Salmonella enterica al homeostasis del periplasma y a la supervivencia de Salmonella enterica en el hospedero* Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Concurso Nacional Regular 2008. Santiago, Chile.
- UniProt Knowledgebase (UniProtKB) (2014) UniProtKB - P0A263 (OMPC_SALTY) <http://www.uniprot.org/uniprot/>
- Verdugo-Rodríguez, A, Gam, L., Devi, S., Koh, C., Puthuchery, S. (1993) *Detection of antibodies against Salmonella typhi Outer Membrane Protein (OMP) preparation in typhoid fever patients* Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 11:45-52.
- Villalobos, A., Serrano, M., Salazar, J, Oliva, J., Morales, J. (2017) *Prototipo de simulación gravitacional: Efecto de la hipergravedad en el crecimiento de Erwinia carotovora* Revista de la Universidad del Valle de Guatemala. 35: 100-103.
- Widdel, F. (2010) *Theory and Measurement of Bacterial Growth* Grundpraktikum Mikrobiologie Universität Bremen.