

## Prototipo de simulación gravitacional: efecto de la hipergravedad en el crecimiento de *Erwinia carotovora*

Andrés Villalobos, Marcelo Serrano, Javier Salazar, Juan Diego Oliva y José Miguel Morales

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala

jmmorales@uvg.edu.gt

**RESUMEN:** Determinamos el tiempo de duplicación de *Erwinia carotovora* creciendo a distintas hipergravedades con el fin de deducir un modelo matemático que describa el crecimiento de la bacteria en función de la gravedad. Diseñamos y construimos un prototipo de simulación gravitacional capaz de generar gravedades relativas hasta 1080 g. Seleccionamos cuatro puntos de hipergravedad para comparar el crecimiento de la bacteria en relación a la gravedad estándar de la tierra y tomamos mediciones de turbidez cada dos horas durante ocho horas para cada gravedad. Utilizamos el modelo de crecimiento poblacional bacteriano y la constante de crecimiento específico de cada curva generada como base para elaborar un modelo que relaciona una gravedad y un periodo de tiempo con la población de células de *E. carotovora*. El crecimiento poblacional se redujo en un 90% al crecer la bacteria durante ocho horas a 1080g en relación al crecimiento en gravedad estándar. Un aumento en la gravedad relativa de la tierra afecta el crecimiento de *E. carotovora* aumentando el tiempo de duplicación de la bacteria. Los microorganismos pueden sobrevivir en el espacio; sin embargo, la fisiología celular puede ser afectada. Esta investigación desarrolla un prototipo que permite generar hipergravedades y demuestra que se puede utilizar modelos bacterianos en este prototipo para estudiar los efectos en fisiología celular.

**PALABRAS CLAVE:** Curva de crecimiento, tiempo de duplicación, hipergravedad, *Erwinia carotovora*.

### Gravitational simulation prototype: effect of hypergravity in *Erwinia carotovora*'s growth

**ABSTRACT:** We determined *Erwinia carotovora*'s duplication time at different hypergravities in order to obtain a mathematical model describing bacterial growth in terms of gravity. We

designed and built a gravitational simulation prototype with the capacity to generate relative gravities of 1080 g. We selected four different hypergravities to compare the bacterial growth in relation to the growth at earth's gravity. We took turbidity measures every two hours in a total time of eight hours for each gravity. We used the bacterial population growth model and the specific growth constant of each growth curve generated to obtain a model that relates gravity and growth time with the cell population of *E. carotovora*. Population growth was reduced 90% when the bacteria was grown in 1080 g during a period of 8 hours. An increase in relative gravity affects *E. carotovora* growth increasing the bacteria duplication time. Microorganisms can survive in space; however, cell physiology may be affected. This research developed a prototype that generates hypergravities and allows to build bacterial models to study the effects on physiology.

**KEYWORDS:** Growth curve, duplication time, hypergravity, *Erwinia carotovora*.

### Introducción

Algunos microorganismos tienen la capacidad de vivir en condiciones ambientales extremas (Rampelotto 2013). Con la creciente exploración espacial se han estudiado los efectos fisiológicos en organismos expuestos a condiciones extremas de radiación, gravedad y vacío (Mastroleone *et al.* 2009; Horneck *et al.* 2010). La fisiología celular se ve afectada por gravedades superiores e inferiores a las que se están adaptados los seres vivos en la Tierra (Cogoli 1993, Vukanti *et al.* 2012, Kim *et al.* 2013a;b), lo que incluso puede provocar cambios genéticos y morfológicos en el organismo (Yanagisawa *et al.* 2012).

El aumento en el crecimiento bacteriano en microgravedad ha sido ampliamente estudiado en condiciones espaciales,

así como el aumento en la patogenicidad y mayor producción de biopelículas (Alexandrov *et al.* 2009; Mauclaire y Egli 2010; Wooseong *et al.* 2013). Esto le provee a los microorganismos una mayor resistencia a etanol, penicilina y cloramfenicol y cambios en la osmolaridad (Lynch *et al.* 2006). Bajo estas condiciones la expresión de genes cambia alterando la producción de proteínas (Arunasri *et al.* 2013, Crabbe *et al.* 2011). Incluso se han calculado las tasas de crecimiento para patógenos clásicos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Kacena *et al.* 1999) y se han desarrollado modelos matemáticos describiendo el efecto de la microgravedad en la sedimentación (Klaus *et al.* 1997).

Los efectos adversos se han comprobado en condiciones de hiperaceleración. El crecimiento y la acumulación de biomasa se reduce en hipergravedad (Kato *et al.* 2003), así como se aumenta el consumo de glucosa (Cabral *et al.* 2014) y cambia la morfología celular (Kato *et al.* 2003). Sin embargo, algunos microorganismos pueden mostrar una gran resistencia a estas condiciones. Se sabe que *Paracoccus denitrificans* y *Escherichia coli* aún proliferan a 400,000 g's (Deguchi *et al.* 2011). También se ha evaluado la disminución en la producción de OmpW en *E. coli* (Shimoshige *et al.* 2010), así como la inhibición en la traducción de proteínas (Shimoshige *et al.* 2011). Estos cambios podrían afectar la patogenicidad de los microorganismos, aunque esto no ha sido evaluado en hipergravedad. En la actualidad no se han llevado a cabo modelos matemáticos que describan cómo afecta la gravedad en el crecimiento bacteriano.

El desarrollo de un prototipo rudimentario de simulación gravitacional hace más accesible el estudio de los cambios en la fisiología celular en hipergravedad. Esto hace relativamente prescindible el uso de ultra centrifugas como las utilizadas por Deguchi *et al.* (2011).

Este estudio buscaba comprobar si al aumentar la fuerza de gravedad durante el tiempo de desarrollo de un cultivo disminuye su tasa de crecimiento. Con este fin se determinó la curva de crecimiento de *Erwinia carotovora* la bacteria en distintas gravedades, se calculó la tasa de crecimiento y se desarrolló un modelo matemático que describe el tiempo de duplicación en función de la gravedad.

## Materiales y métodos

### • Prototipo de simulación gravitacional:

Utilizamos un motor de 3200 revoluciones por minuto (rpm) fijado al eje un disco de madera de 34 cms. de diámetro. Realizamos aberturas en el disco para colocar los tubos a una distancia de 10 y 13 cm, a un ángulo de 45°. Utilizamos tubos cónicos de plástico (VWR) de 15 ml. Para enfriar el prototipo utilizamos paquetes de hielo que cambiamos cada hora. Usamos un regulador de voltaje para disminuir las revoluciones del motor y controlar las gravedades relativas.

### • Manejo y almacenamiento de bacteria:

Obtuvimos la cepa de *Erwinia carotovora* del Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Alimenticios del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. La bacteria fue almacenada en cepario y la resembramos semanalmente para mantener la cepa activa. Utilizamos caldo BHI (*brain heart infusion*) para todos los cultivos.

### • Curvas de crecimiento:

Inoculamos una colonia en 3 mL de caldo BHI y cultivamos por 16 horas a 30 °C. con agitación de 230 rpm. Diluimos en duplicado en 50 mL de caldo contenidos en un Erlenmeyer según estándar McFarland 0.5, homogeneizamos e incubamos la bacteria a 30 °C con agitación de 230 rpm en una incubadora con agitación (Barnstead Lab-Line Max 4000). Tomamos una muestra de 500 µL cada media hora durante 7 horas y medimos la absorbancia de la muestra a una densidad óptica de 600 nm (OD 600) en un espectrofotómetro UV visible (Thermo Biomate 3).

Para las muestras analizadas en hipergravedades inoculamos una colonia en 3 mL de caldo BHI y cultivamos por una noche a 30 °C. con agitación de 230 rpm. Estos los diluimos para igualar la turbidez de un estándar McFarland 0.5.

Distribuimos 100 µL a 8 tubos cónicos (VWR) de 15 mL con 3 mL de caldo BHI. Estos tubos luego fueron instalados en el prototipo a dos gravedades diferentes, 4 en un radio de 10 cm y los otros en un radio de 13 cm. Repetimos este procedimiento cuatro veces para cada velocidad angular, durante 2, 4, 6 y 8 horas. En cada corrida se suspendieron los pellets utilizando un vortex, tomamos una muestra de 500 µL para cada tubo y medimos el OD (600 nm) en el espectrofotómetro.

### • Modelaje y análisis matemático:

Mediante el software Microsoft Excel realizamos gráficas semi-log de las curvas de crecimiento. En base a la fórmula de constante de crecimiento específico (Widdel 2007) y a la ecuación de cada una de las gráficas determinamos las tasas de crecimiento en las distintas gravedades. Luego calculamos el tiempo de duplicación de cada bacteria con la fórmula de Widdel 2007. Esta ecuación la aplicamos en el modelo de crecimiento poblacional con recursos ilimitados y determinamos una ecuación donde se predice una población en relación a la gravedad y el tiempo de crecimiento.

## Resultados y discusión

Determinamos la constante de crecimiento y el tiempo de duplicación de *Erwinia carotovora* creciendo a distintas hipergravedades (Ver Cuadro 1) con el fin de determinar el efecto del aumento de gravedad en el crecimiento poblacional de la bacteria y deducir un modelo matemático que describa este en función de la gravedad.

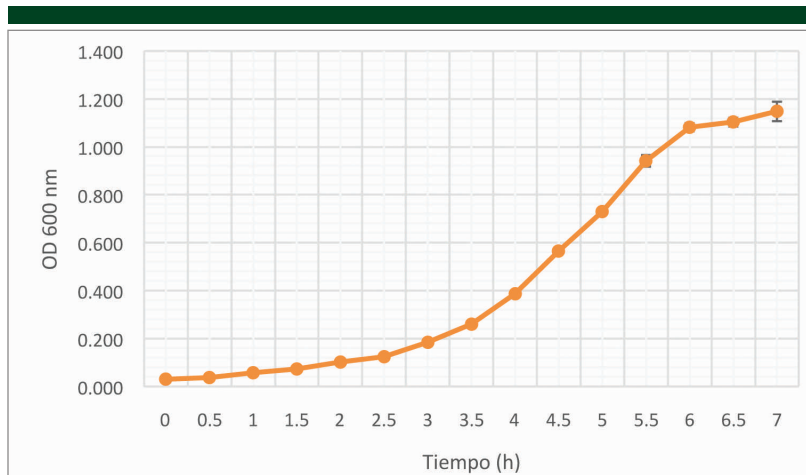
**Cuadro 1.** Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación a diferentes gravedades relativas.

Gravedad Relativa	Constante de crecimiento $k$ ( $h^{-1}$ )	Tiempo de duplicación $g$ (h)
1	$0.673 \pm 0.006$	1.030
592	$0.383 \pm 0.004$	1.808
769	$0.359 \pm 0.003$	1.928
830	$0.344 \pm 0.004$	2.016
1080	$0.341 \pm 0.001$	2.030

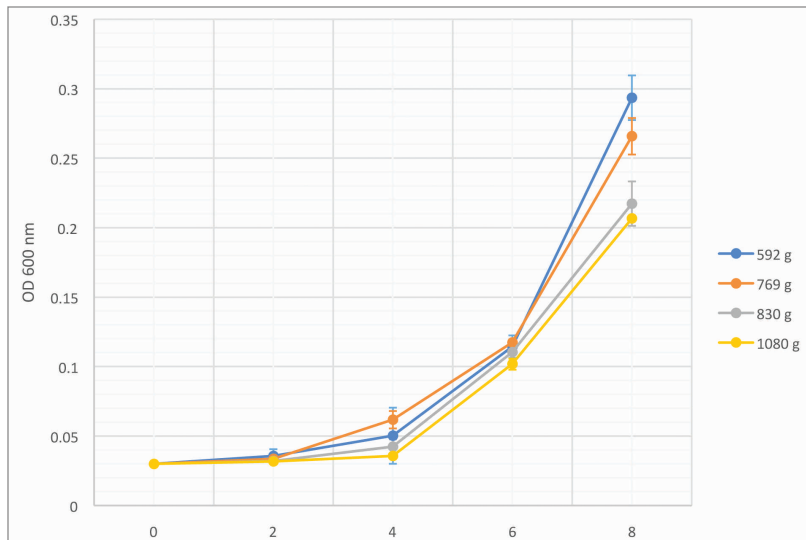
Estimamos que el crecimiento se redujo en un 90% al exponer la bacteria durante ocho horas a 1080 g en relación al crecimiento en gravedad estándar (ver Figuras 1 y 2). Las variaciones en crecimiento pueden ser causadas por distintos factores como la

sedimentación de las bacterias en el medio, los procesos de fermentación y las alteraciones en las membranas de las células. Al aumentar la gravedad, la densidad de las bacterias también aumenta provocando que la distancia entre las células sea menor. Esto disminuye la velocidad de difusión de las partículas en el medio, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes (Deguchi, 2011). Otro factor que puede afectar el crecimiento de las bacterias son las deformaciones mecano-sensitivas de las membranas de las bacterias. Un estudio realizado por Nickerson *et al* (2004) mostró que las deformaciones son significativas en microgravedades, y sugieren que puede tener efectos aún mayores en hipergravedades.

El modelo matemático que realizamos describe el crecimiento de una población en diferentes gravedades (Ecuación 1). En el cual  $P$  es la población final en UFC (unidades formadoras de colonias),  $P_0$  la población inicial en UFC,  $t$  es el tiempo en horas y  $G$  representa la gravedad relativa ( $xg$ 's). Ya que utilizamos la ecuación de recursos ilimitados, este modelo solamente representa la fase exponencial de la curva de crecimiento de las bacterias.



**Figura 1.** Curva de crecimiento de *E. carotovora* en gravedad estándar. Barras representan intervalo de confianza con un NS de 0.05



**Figura 2.** Curvas de crecimiento de *E. carotovora* en hipergravedades. Las barras indican intervalos de confianza con un NS de 0.05.

El modelo cuenta con varias constantes que son específicas para la bacteria *E. carotovora*. Para aplicarlo a otras bacterias se tendría que experimentar y determinar las constantes específicas de esas bacterias. Este modelo implica que el aumento del tiempo de duplicación de la bacteria tiende a moderarse al aumentar las gravedades. El modelo solo puede ser utilizado con valores de hipergravedades entre 1g y 1080 g. Para aumentar la robustez del modelo es necesario realizar pruebas en distintas gravedades y aumentar el número de réplicas.

**Ecuación 1.** Modelo del crecimiento poblacional de *E. carotovora* en relación a la gravedad relativa.

$$P = P_0 10^{\frac{0.693 \Delta t}{1.03258 + 0.0371866 (\log G)^3}}$$

El prototipo construido para simular las hipergravedades puede tener distintas funciones. El proyecto comprobó que este es capaz de someter a células a gravedades mayores que la de la tierra por periodos de hasta ocho horas.

Existen diversas líneas de investigación con las cuales se puede continuar este estudio. Una puede ser la resistencia a antibióticos de distintas bacterias en condiciones de hipergravedad. También se podría analizar las deformaciones mecánicas o el cambio en la expresión de distintos genes al comparar bacterias que crecieron en condiciones normales y en gravedades aumentadas.

## Conclusión

El crecimiento poblacional se redujo en un 90% al crecer la bacteria durante ocho horas a 1080 g en relación al crecimiento en gravedad estándar.

Un aumento en la gravedad relativa de la tierra afecta el crecimiento de *E. carotovora* aumentando el tiempo de duplicación de la bacteria.

El prototipo de simulación gravitacional diseñado es efectivo para estudiar el crecimiento de microorganismos en hipergravedades y sus efectos fisiológicos.

## Agradecimientos

Agradecemos a los departamentos de Biología, Bioquímica y Microbiología, Física, Matemática e Ingeniería Mecánica. Especial agradecimiento por su asesoría y apoyo a Victor Hugo Ayerdi, Luis Mijangos, Irene Aguilar, Michael Morales, Lucía Nitsch, Gabriela Palomo, Brooke Ramay y al equipo del taller de mecánica de la Universidad del Valle de Guatemala.

## Bibliografía

Alexandrov, L.B., Alexandrova, S., Usheva, A. (2009) *Computer Modeling Describes Gravity-Related Adaptation in Cell Cultures* Plos One 4 (12).

- Arunasri, K., Adil, M., Charan, K.V., Suvro, C., Reddy, S.H., Shivaji, S. (2013) *Effect of Simulated Microgravity on E. coli K12 MG1655 Growth and Gene Expression* Plos One 8 (3).
- Cogoli, A. (1993) *The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system* Journal of Leukocyte Biology 54 (3): 259-268.
- Cabral, C., Pai, C., Prasade, K., Deoghare, S., Kazi, U., Fernandes, S. (2014) *Variation in Microbial Growth under Hypergravity* St. Xavier's College.
- Crabbé, A., Schurr, M.J., Monsieurs, P., Morici, L., Schurr, J., Wilson, J.W., Ott, C.M., Tsapralis, G., Pierson, D.L., Stefanyshyn-Piper, H., Nickerson, C.A. (2011) *Transcriptional and Proteomic Responses of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to Spaceflight Conditions Involve Hfq Regulation and Reveal a Role for Oxygen Applied and Environmental Microbiology* 77 (4):1221-1230.
- Deguchi, S., Shimoshige, H., Tsudome, M., Mukai, S., Corkery, R.W., Ito, S., Horikoshi, K. (2011) *Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627 x g* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (19): 7997-8002.
- Horneck, G., Klaus, D.M., Mancinelli, R.L. (2010) *Space Microbiology* 74 (1): 121-156.
- Kacena, M.A., Merrell, G.A., Manfredi, B., Smith, E.E., Klaus, D.M., Todd, P. (1999) *Bacterial Growth in Space Flight: Logistic Growth Curve Parameters for Escherichia coli and Bacillus subtilis* Applied Microbiology and Biotechnology 51: 229-234.
- Kato, Y., Mogami, Y., Baba, S.A. (2003) *Responses to Hypergravity in Proliferation of Paramecium tetraurelia* 20 (11): 1373-1380.
- Kim, W., Tengra, F.K., Shong, J., Marchand, N., Chan, H.K., Young, Z., Pangule, R.C., Parra, M., Dordick, J.S., Plawsky, J.L., Collins, C.H. (2013a) *Effect of spaceflight on Pseudomonas aeruginosa final cell density is modulated by nutrient and oxygen availability* BMC Microbiology 13: 241.
- Kim W, Tengra FK, Shong J, Marchand N, Chan HK, Young Z, Pangule RC, Parra M, Dordick JS, Plawsky JL, Collins CH (2013b) *Spaceflight Promotes Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa* Plos One 8(4)
- Lynch, S.V., Mukundakrishnan, K., Benoit, M.R., Ayyaswamy, P.S., Matin, A. (2006) *Escherichia coli Biofilms Formed under Low-Shear Modeled Microgravity in a Ground-Based System* Applied and Environmental Microbiology 72 (12): 7701-7710.
- Mastroleo, F., Van Houdt, R., Leroy, B., Abderrafi, M., Janssen, A., Mergeay, M., Vanhavere, F., Hendrickx, L., Wattiez, R., Leys, N. (2009) *Experimental design and environmental parameters affect Rhodospirillum rubrum SH response to space flight* The International Society for Microbial Ecology Journal 3: 1402-1419
- Mauclair, L., Egli, M. (2010) *Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolymeric substances of Micrococcus luteus space and earth isolates* FEMS Immunology and Medical Microbiology 59: 350-356.
- Nickerson, C.A., Ott, C.M., Wilson, J.W., Ramamurthy, R., Pierson, D.L. (2004) *Microbial Responses to Microgravity and Other Low-Shear Environments* Microbiology and Molecular Biology Reviews 68 (2): 345-361.
- Rampelotto, P.H. (2013) *Extremophiles and extreme environments* Life (Basel) 3 (3): 482-485.
- Rosenzweig, J.A., Abogunde, O., Thomas, K., Lawal, A., Nguyen, Y.U., Sodipe, A, Jejelowo, O. (2010) *Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence* Applied Microbiology and Biotechnology 85: 885-891.
- Shimoshige, H., Kobayashi, H., Shimamura, S., Usami, R. (2010) *Gravity Sensing by Escherichia coli* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 74 (12): 2511-2514.
- Shimoshige, H., Kobayashi, H., Usami, R. (2011) *Inhibition of Gene Expression in Escherichia coli under Hypergravity* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 75 (1), 175-177.
- Vukanti, R., Model, M.A., Leff, L.G. (2012) *Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology* BMC Microbiology 12: 4
- Widdel, F. (2010) *Theory and Measurement of Bacterial Growth* Grundpraktikum Mikrobiologie Universität Bremen.
- Yanagisawa, M., Kashiwagi, K., Hanada, H., Shinkai, T., Yoshitome, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M., Kashiwagi, A., Furuno, N., Watanabe, M. (2012) *Analysis of Head-Defects Caused by Hypergravity in Early Xenopus Embryos* Biological Sciences in Space 26:1-6.