

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología

# Efecto de la temperatura en el subproteoma de membrana externa de *Escherichia coli*

Autor:

Christian Alejandro Muñoz Maggi

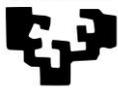
Directora:

Arana Basabe, María Inés

Codirectora:

Orruño Beltrán, Maite

eman ta zabal zazu

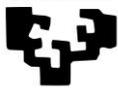


Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología





# ÍNDICE

	Página
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. OBJETIVOS .....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
3.1- Cepa de <i>Escherichia coli</i> y preparación del inóculo	
3.2- Determinación de los parámetros celulares	
3.3- Análisis proteómico	
4. RESULTADOS .....	8
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	11
6. BIBLIOGRAFÍA .....	14



## Resumen

En sus habitas naturales, los microorganismos están en un estado constante de adaptación a cambios tanto bióticos como abióticos. Ante situaciones de estrés, como por ejemplo cambios en nutrientes, temperatura o de osmolaridad, las estrategias de supervivencia o adaptación se pueden manifestar como cambios fenotípicos y genotípicos. En este estudio se analizaron algunos mecanismos de cambio asociados a la supervivencia y la composición proteica de membrana en *Escherichia coli* (bacteria mesófila), al ser expuesta a condiciones de ayuno y a temperaturas subóptimas (4 y 20°C). Al realizar un análisis comparativo del subproteoma de membrana entre estas dos temperaturas, se observó que ante la ausencia de nutrientes, *E. coli* respondía de forma diferente en la expresión de proteínas asociadas a estructura (lipoproteínas), conservación de la energía y transporte, con un aumento en el número de proteínas expresadas a 20°C. Se observó, además, una importante diferencia en la supervivencia a estas dos temperaturas, donde el número de células en el estado viable no cultivable (VNC) representaron un porcentaje importante a 20°C.

## Abstract

In their natural habitat, microorganisms are in a constant adaptation process to couple with the changes in the surrounding environment. During stress, occurring as a result of changes in temperature, nutrients, or salinity, microorganisms respond by either phenotypic or genotypic changes in order to survive and adapt to those conditions. In this study we analyzed some of the changes associated to cell survival and membrane proteins composition in *Escherichia coli* under starvation conditions and as a response to sub-optimal temperatures exposure (4 and 20 °C). By performing a comparative analysis of the membrane subproteome, we observed changes in the expression of transport, energy, and structural (lipoproteins) associated proteins, with an overall increased number of expressed proteins at 20°C. Differences in bacterial survival rate were also observed at both temperatures, with a significant increase in viable but not cultivable cells (VBNC) at 20°C when compared to 4°C.



## 1. Introducción

Se puede considerar que los microorganismos en sus ecosistemas naturales están en un estado de cambio continuo, adaptándose a modificaciones de las condiciones medioambientales (p.e. fluctuaciones de las temperaturas) o a cambios de ambiente (p.e. el paso desde el intestino de un animal hacia un medio acuático). Las bacterias responden a estos cambios a través de la regulación en la expresión de familias de proteínas que son requeridas para la supervivencia durante periodos de estrés (Young y Bernlohr, 1991). Según las estrategias empleadas para sobrevivir, las bacterias se clasifican en diferenciadas y no diferenciadas (Guerrero y Berlanga, 2001). Las primeras poseen la capacidad de formar estructuras de resistencia, siendo las esporas un ejemplo, mientras que las bacterias no diferenciadas no poseen la capacidad de formar esporas. Al no tener esta capacidad, experimentan cambios graduales en su fisiología celular y en su morfología. Ya en 1954, Heinmets *et al.* apoyaron la teoría de que, durante estos periodos de estrés en los que no se presentaba división en las bacterias, se seguían manteniendo procesos metabólicos de forma activa (p.e. síntesis de proteínas). Un ejemplo de respuesta ante estas condiciones es el desarrollo del estado viable no cultivable (VNC). En este estado, las células bacterianas poseen funciones metabólicas detectables, pero no son capaces de crecer en medios de cultivo convencionales (Roszak y Colwell, 1987). Algunos autores sugieren que perder la cultivabilidad podría representar una vía alternativa para generar formas durmientes de supervivencia similar a la formación de esporas que se produce en bacterias diferenciadas (McDougald *et al.*, 1999; Kell y Young, 2000). Durante la transición del estado cultivable al estado VNC, se han descrito cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar en las células, pero también cambios de ámbito molecular, entre los que destacan la síntesis de nuevas proteínas (Morton y Oliver, 1994; Srinivasan *et al.*, 1998), o la expresión diferencial de determinados genes (Lleó *et al.*, 2000; Wetherell, 2004; Smith y Oliver, 2006; Asakura *et al.*, 2007). El estado VNC podría resultar por tanto de vital importancia para conseguir sobrevivir ante condiciones desfavorables si las células en este estado tuvieran la capacidad de recuperar nuevamente la cultivabilidad. De ser así, este estado se podría considerar como parte del ciclo vital del microorganismo (McDougald *et al.*, 1999; Oliver, 2005; Keep *et al.*, 2006; Panutdaporn *et al.*, 2006; Coutard *et al.*, 2007).

Para bacterias como *Escherichia coli*, los medios acuáticos representan un entorno hostil, donde se presentan condiciones de escasez de nutrientes y de temperaturas no óptimas para el crecimiento del organismo, a lo cual responderá mediante el uso de estrategias que le permitan sobrevivir. *Escherichia coli* generalmente se encuentra en el intestino de los

animales (donde las condiciones son completamente diferentes e ideales para su crecimiento), formando parte de la microbiota intestinal, contribuyendo con la absorción de nutrientes.

*Escherichia coli*, al ser una bacteria Gram negativa, presenta dos membranas (una interna o citoplasmática y una externa) separadas por el espacio periplásmico, donde se localiza el peptidoglicano (Figura 1).

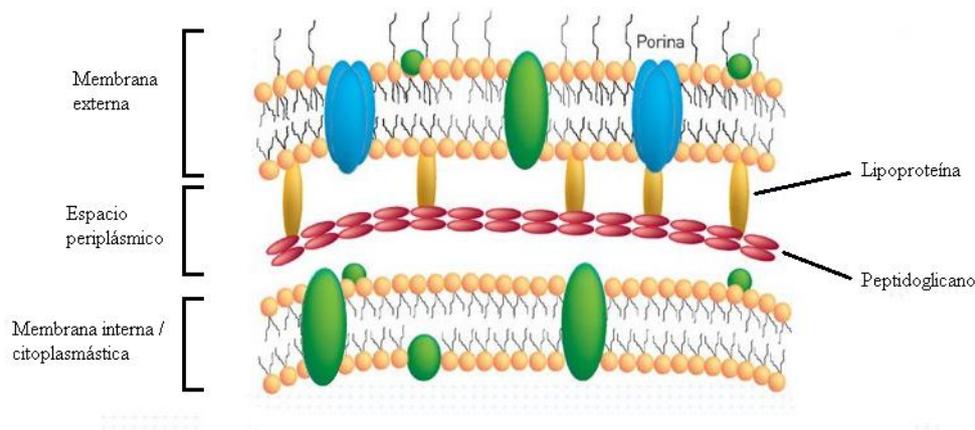


Figura 1. Representación de la envoltura celular característica en bacterias Gram negativas. (Ref.: [http://morfologiabacteriana.blogspot.com.es/2013/03/estructura-de-la-pared-celular-de-las\\_7765.html](http://morfologiabacteriana.blogspot.com.es/2013/03/estructura-de-la-pared-celular-de-las_7765.html)).

En estas estructuras se llevan a cabo actividades que determinan el funcionamiento de la bacteria, y se pueden catalogar en diferentes grupos funcionales. Las actividades relacionadas con la conservación de la energía se realizarán principalmente en la membrana interna. En el espacio periplásmico se encuentran las lipoproteínas, cuyo papel se relaciona con el mantenimiento estructural de las membranas. Las funciones vinculadas al transporte se realizan en ambas membranas, interna y externa.

Las proteínas son el componente que desempeña la mayoría de las funciones activas de las membranas, y son por ello una parte importante de las mismas. Aproximadamente el 20% del total de proteínas se localizan en la membranas bacterianas (Schulz, 2002). Constituyen, además, alrededor del 50% de la masa de la membrana externa, ya sea en forma de proteínas integrales de membrana o como lipoproteínas que están fijadas a la membrana (Koebnik *et al.*, 2000).

Hasta ahora, muchos han sido los estudios enfocados en la respuesta de *E. coli* ante diferentes tipos de estreses. Se ha observado que se producen regulaciones en el funcionamiento de la

bacteria que contribuyen a una mejor supervivencia ante los estreses a los que se enfrenta (Alba y Gross, 2004; Mandel y Silhavy, 2005; Santos *et al.*, 2005; Jones, 2012; Shimizu, 2014; White-Ziegler *et al.*, 2008).

La membrana externa es el componente estructural en contacto con el medio circundante y, por tanto, la primera barrera de respuesta de la célula frente a las condiciones medioambientales cambiantes. Por tanto, el estudio de las variaciones en el subproteoma de la membrana puede ser de gran utilidad al contribuir al conocimiento de la respuesta bacteriana al estrés.

## 2. Objetivos

Determinar estrategias de adaptación y supervivencia de *Escherichia coli* ante condiciones de estrés inducido por ayuno a dos temperaturas subóptimas (4 y 20°C). Los objetivos fueron observar cambios en el subproteoma de membrana externa y analizar la cultivabilidad celular a estas dos temperaturas. Estos cambios, podrían ayudarnos a entender las posibles estrategias de adaptación y supervivencia de *Escherichia coli* bajo condiciones subóptimas.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1- Cepa de *Escherichia coli* y preparación del inóculo

Previamente a realizar el inóculo, los matraces se lavaron con ácido clorhídrico (HCl, 10% [v/v]) para eliminar los restos de materia orgánica. Posteriormente se aclararon 10 veces con agua desionizada. Finalmente, se secaron a 250°C durante 24 horas.

En este trabajo se utilizó la cepa *Escherichia coli* CECT 416, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T, Valencia, España).

La cepa se incubó en medio de cultivo Luria Bertani (LB, Merck) en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria.

Al cabo de 24 horas las células se encontraban en fase estacionaria y se recogieron por centrifugación (5.000 r.p.m., 10 minutos), realizándose 3 lavados sucesivos con solución salina estéril (NaCl 0,9% [p/v]). Finalmente, las pastillas celulares se resuspendieron en

solución salina, y las suspensiones bacterianas resultantes se emplearon como inóculos en las distintas experiencias, hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente  $10^8$  células/ml.

Las condiciones medioambientales adversas se simularon en microcosmos. Para ello se utilizaron matraces que contenían solución salina y se mantuvieron bajo agitación continua, sometiendo a las células a situaciones de ayuno y exposición a temperaturas subóptimas para el crecimiento (4 y 20°C).

Periódicamente se tomaron alícuotas por triplicado, con el fin de poder determinar los siguientes parámetros: número total de células (TDC), número de células con membrana citoplasmática intacta (MEMB<sup>+</sup>) y número de células cultivables o formadoras de colonias (UFC).

Cada uno de los ensayos de supervivencia fue repetido 3 veces.

### **3.2- Determinación de los parámetros celulares**

#### **Cuantificación del número total de bacterias (Total Direct Count, TDC)**

La determinación del número total de bacterias se llevó a cabo por recuento directo mediante microscopía de epifluorescencia, siguiendo la técnica descrita por Hobbie *et al.* (1977).

Para ello, se recogieron volúmenes adecuados de las muestras y se conservaron con formalina (concentración final 2% [v/v]) para, posteriormente, teñirlos con una solución de naranja de acridina (concentración final 0,06 mg/ml) (Molecular Probes) durante 2 minutos. Una vez pasado este tiempo, las submuestras teñidas se filtraron a través de filtros de membrana de policarbonato de color negro con 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore Corp.). Los filtros se montaron sobre portaobjetos con aceite de inmersión de baja fluorescencia (Nikon tipo A). Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400, equipado con un bloque de filtros B-2A (filtro de excitación EX450-490, espejo dicróico DM505 y filtro barrera BA520).



## **Cuantificación del número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra (MEMB<sup>+</sup>)**

El número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra (MEMB<sup>+</sup>) se cuantificó mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando el kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes) tal y como describen Joux *et al.* (1997). El kit está compuesto por dos fluorocromos, SYTO 9 e yoduro de propidio. El fluorocromo SYTO 9 penetra en todas las bacterias, proporcionando a las células una fluorescencia verde. Por el contrario, el yoduro de propidio, sólo va a penetrar en aquellas bacterias con las membranas dañadas, proporcionando una fluorescencia de color rojo. Cuando ambos fluorocromos están presentes en una bacteria, la fluorescencia producida por el yoduro de propidio se impone sobre la del SYTO 9 de forma que las bacterias con las membranas citoplasmáticas dañadas fluorescerán en rojo, mientras que las bacterias con la membrana citoplasmática íntegra (MEMB<sup>+</sup>) fluorescerán en verde. Las muestras se procesaron empleando filtros de policarbonato negros (Millipore Corp.) de 0,22 µm de diámetro de poro. Para los objetivos de este trabajo, se consideraron viables a todas aquellas bacterias con membrana citoplasmática íntegra (MEMB<sup>+</sup>).

## **Cuantificación del número de bacterias cultivables (unidades formadoras de colonias, UFCs)**

La cultivabilidad, expresada como UFC, se estimó mediante la siembra en superficie empleando como medio de cultivo agar Luria Bertani (Merck). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

El límite de detección del método fue 3,3 UFC/ml.

### **3.3- Análisis proteómico**

#### **Obtención de las suspensiones celulares**

Las suspensiones celulares se obtuvieron para el tiempo 0, a los 6 y 21 días para la experiencia llevada a cabo a 4°C, mientras que a 20°C se recogieron para el tiempo 0, a los 6,

12 y 21 días. Las células fueron recogidas por centrifugación (8000 g, 40 min). La pastilla celular obtenida se resuspendió en 10 ml de TBS (Tris-buffered saline).

### **Obtención de las proteínas de membrana externa**

Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugaron nuevamente (8000 g, 20 min) y resuspendieron en 10 ml de TBS. Se añadieron 250  $\mu$ l de Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) por g o peso celular y 90  $\mu$ l de PSMF 2 mM (AppliChem). Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las células se rompieron por sonicación intermitente (SONICS VibraCell<sup>TM</sup> VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter, USA) usando una sonda de 6 mm de diámetro (ajuste al 65% de amplitud, ciclos de 30 segundos encendido/45 segundos apagado durante 3 minutos en total). Las células intactas y los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 6000 g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se almacenó en hielo mientras el precipitado se resuspendió nuevamente en 10 ml de TBS y se sonicó a las mismas condiciones descritas anteriormente. Este proceso se repitió al menos 3 veces.

El sobrenadante fue diluido (1:1) con carbonato sódico 0,2 M y se incubó en hielo durante una hora con agitación suave. Después de una hora de incubación las muestras se centrifugaron a 35000 r.p.m. durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y el precipitado de proteínas fue resuspendido en 1 ml de TBS.

### **Cuantificación de las proteínas**

Para la cuantificación de las proteínas presentes en las suspensiones obtenidas previamente se utilizó el kit BCA protein assay (BioRad) basado en el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951) y utilizando como estándar proteico albúmina de suero bovino.

### **Identificación de proteínas**

Las proteínas se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en el Servicio General de Proteómica de la UPV/EHU.

#### 4. Resultados

El efecto de la temperatura sobre la integridad, la viabilidad y la cultivabilidad de *E. coli* en condiciones de ayuno se muestran en la Figura 2.

En ambas experiencias, la integridad celular (TDC) permaneció constante al igual que su viabilidad (MEMB<sup>+</sup>). A 4°C se mantuvo constante el número de células cultivables (UFC), mientras que a 20°C se produjo un descenso rápido en la cultivabilidad a partir del día 6 (Figura 2.b). Esta disminución en la cultivabilidad fue de aproximadamente un orden de magnitud entre ambas temperaturas a 21 días.

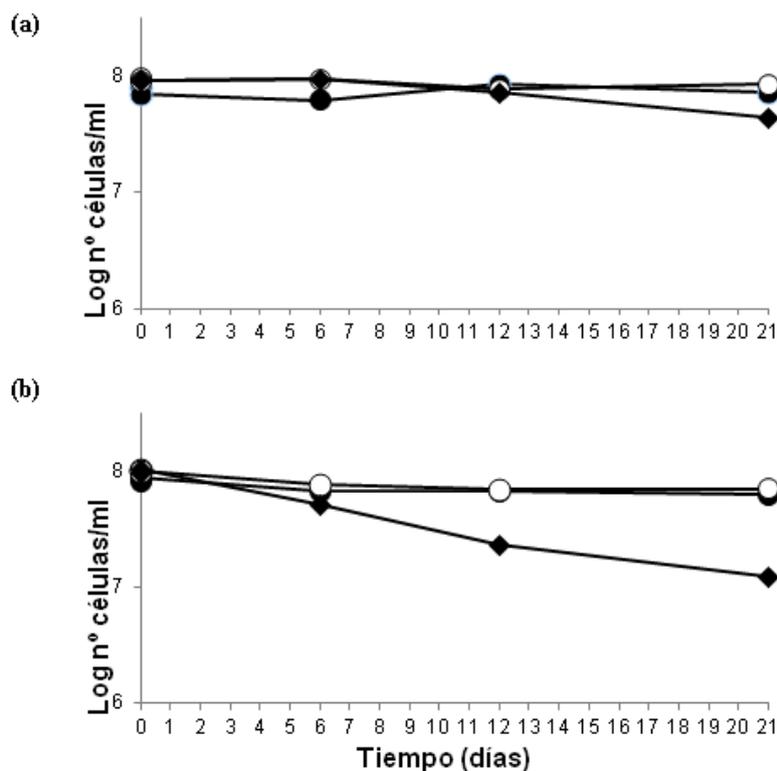


Figura 2. Evolución de la población de *E. coli* durante la permanencia en solución salina estéril mantenida a 4°C (a) y 20°C (b). Número total de células (○); número total de bacterias con membrana intacta (●), número de células cultivables (◆).

Para determinar el efecto del ayuno y de la temperatura sobre el subproteoma de membrana externa de *E. coli*, se estudió su composición proteica a diferentes tiempos a lo largo de las experiencias. Las proteínas detectadas e identificadas, fueron clasificadas en base a un criterio funcional en diferentes grupos: proteínas implicadas en la conservación de la energía, en procesos de transporte, en el mantenimiento de la estructura de la membrana, en la división

celular y en la síntesis de proteínas. Del total de proteínas detectadas, 33 proteínas de membrana fueron consideradas para el análisis. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas de membrana analizadas para el tiempo 0 y su clasificación en diferentes grupos funcionales.

Energía	
ATP sintasa	Fumarato reductasa
Citocromo d ubiquinol oxidasa	NADH deshidrogenasa
Formato deshidrogenasa - Sub. alpha	
Transporte	
ATPasa exportadora de cobre	Proteasa HflC moduladora de FtsH
Canal mecanosensitivo de gran conductancia	Proteasa HflK moduladora de FtsH
EIIAB-Man	Proteína de membrana externa N
EIICBA-Mtl	Proteína ElaB
EIICBA-Nag	Proteína putativa de membrana externa YedS
Manosa permeasa componente IID	Proteína TolC
Metaloproteasa de Zinc FtsH ATP-dependiente	Proteína tsx formadora de canales nucleósido-específicos
OmpA	Transportador DcuA
OmpC	Transportador glicerol-3-fosfato
Estructura	
DD-carboxipeptidasa (DacC)	Lipoproteína MetQ
Lipoproteína asociada a peptidoglicano	Lipoproteína Slyb
Lipoproteína E	Lipoproteína YbjP
Lipoproteína EcnB	Proteína de membrana externa Slp
Lipoproteína Lpp	
Síntesis de proteínas	
Factor de elongación Tu (EF-Tu)	

A lo largo de las experiencias, el número de proteínas de membrana detectadas aumentó para las dos temperaturas estudiadas con respecto al tiempo 0. El número de proteínas analizadas al cabo de 21 días resultó ser mayor a 20°C que a 4°C, donde se detectaron nuevas lipoproteínas no identificadas para el tiempo 0. Sin embargo, no se observó ninguna nueva lipoproteína en común para ambas temperaturas. A 20°C se mantuvo detectable la proteína TolC, mientras que a 4°C dejó de ser detectable al finalizar la experiencia. Estos resultados se reflejan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Proteínas analizadas en la experiencia llevada a cabo a 4°C. Proteínas que se mantienen detectables, proteínas que se detectaron posteriormente al tiempo 0 y proteínas que dejaron de detectarse.

Se mantienen		Aparecen		Desaparecen		
Energía	ATP sintasa	Energía	Nitrato reductasa	Transporte	EIIAB-Man	
	Citocromo d ubiquinol oxidasa		Succinato deshidrogenasa		EIICBA-Mtl	
	Formato deshidrogenasa - Sub. alpha				EIICBA-Nag	
	Fumarato reductasa				Manosa permeasa componente IID	
	NADH deshidrogenasa				Proteína putativa de membrana externa YedS	
Transporte	ATPasa exportadora de cobre	Transporte	DamX	Energía	Proteína TolC	
	Canal mecanosensitivo de gran conductancia		HemY		Estructura	Proteína tsx formadora de canales nucleósido-específicos
	Metaloproteasa de Zinc FtsH ATP-dependiente		Insertasa de proteínas de membrana YidC			
	OmpA		Porina de membrana externa NmpC			
	OmpC		Proteína Yhll			
	Proteasa HflC moduladora de FtsH	QmCA				
	Proteasa HflK moduladora de FtsH	Estructura	Lipoproteína LptE de ensamblaje al LPS			
	Proteína de membrana externa N					
	Proteína ElaB					
	Transportador DcuA					
Transportador glicerol-3-fosfato						
	Síntesis de proteínas	División	MinD			
			Factor de elongación Tu (EF-Tu)			
	Estructura					

Tabla 3. Proteínas analizadas en la experiencia llevada a cabo a 20°C. Proteínas que se mantienen detectables, proteínas que se detectaron posteriormente al tiempo 0 y proteínas que dejaron de detectarse.

Se mantienen		Aparecen		Desaparecen				
Energía	ATP sintasa	Energía	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona)	Transporte	EIIAB-Man			
	Citocromo d ubiquinol oxidasa		NAD(P) transhidrogenasa - Sub. Alpha		EIICBA-Mtl			
	Formato deshidrogenasa - Sub. alpha		Nitrato reductasa		Proteína de membrana externa N			
	Fumarato reductasa				Proteína putativa de membrana externa YedS			
	NADH deshidrogenasa				Proteína tsx formadora de canales nucleósido-específicos			
Transporte	ATPasa exportadora de cobre	Transporte	HemY	Energía	Transportador glicerol-3-fosfato			
	Canal mecanosensitivo de gran conductancia		Insertasa de proteínas de membrana YidC		Estructura	DD-carboxipeptidasa (DacC)		
	EIICBA-Nag		Manosa permeasa componente IIC			Estructura	Lipoproteína E	
	Proteína TolC		Porina de membrana externa NmpC				Estructura	Lipoproteína YbjP
	Manosa permeasa componente IID		Proteína de membrana SecG exportadora de proteínas					
	Metaloproteasa de Zinc FtsH ATP-dependiente	Proteína de membrana YajC						
	OmpA	Proteína transportadora de magnesio CorA						
	OmpC	Proteína Yhll						
	Proteína ElaB	QmCA						
	Proteasa HflC moduladora de FtsH	Translocasa de proteínas subunidad SecD						
Proteasa HflK moduladora de FtsH	Estructura	Factor de ensamblaje de proteínas de membrana externa BamD						
Transportador DcuA		Lipoproteína YbaY						
		Lipoproteína YceB						
		Lipoproteína Z8						
	Síntesis de proteínas	División	MinD					
			Factor de elongación Tu (EF-Tu)					

Se mantuvieron detectables a lo largo de ambas experiencias 21 proteínas de las 33 analizadas en el tiempo 0. Entre ellas destacan una importante proporción de lipoproteínas (p.e. lipoproteína EcnB y proteína de membrana externa Slp), el factor de elongación Tu (EF-Tu) y la proteína OmpA. Algunas proteínas no detectadas en el tiempo 0 fueron identificadas posteriormente a ambas temperaturas conforme las experiencias avanzaban. Así, se detectó la proteína MinD a partir del día 21 a 4°C y a partir del día 6 a 20°C (Tabla 4). El análisis comparativo en cada situación se muestra en la Figura 3.

Tabla 4. Proteínas analizadas en ambas temperaturas. Proteínas que se mantuvieron detectables durante las experiencias, proteínas que se detectaron posteriormente al tiempo 0 y proteínas que dejaron de detectarse.

Se mantienen		Aparecen		Desaparecen	
<p><b>Energía</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ATP sintasa</li> <li>Citocromo d ubiquinol oxidasa</li> <li>Formato deshidrogenasa - Sub. alpha</li> <li>Fumarato reductasa</li> <li>NADH deshidrogenasa</li> </ul>	<p><b>Estructura</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Lipoproteína asociada a peptidoglicano</li> <li>Lipoproteína EcnB</li> <li>Lipoproteína Lpp</li> <li>Lipoproteína MetQ</li> <li>Lipoproteína Slyb</li> <li>Proteína de membrana externa Slp</li> </ul>	<p><b>Energía</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nitrato reductasa</li> </ul> <p><b>Transporte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>HemY</li> <li>Insertasa de proteínas de membrana YidC</li> <li>Porina de membrana externa NmpC</li> <li>Proteína Yhil</li> <li>QmcA</li> </ul> <p><b>División</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>MinD</li> </ul>	<p><b>Transporte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>EliAB-Man</li> <li>EiICBA-Mtl</li> <li>Proteína putativa de membrana externa YedS</li> <li>Proteína tsx formadora de canales nucleósido-específicos</li> </ul>		
<p><b>Transporte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ATPasa exportadora de cobre</li> <li>Canal mecanosensitivo de gran conductancia</li> <li>Metaloproteasa de Zinc FtsH ATP-dependiente</li> <li>OmpA</li> <li>OmpC</li> <li>Proteasa HflC moduladora de FtsH</li> <li>Proteasa HflK moduladora de FtsH</li> <li>Proteína ElaB</li> <li>Transportador DcuA</li> </ul>	<p><b>Síntesis de proteínas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Factor de elongación Tu (EF-Tu)</li> </ul>				

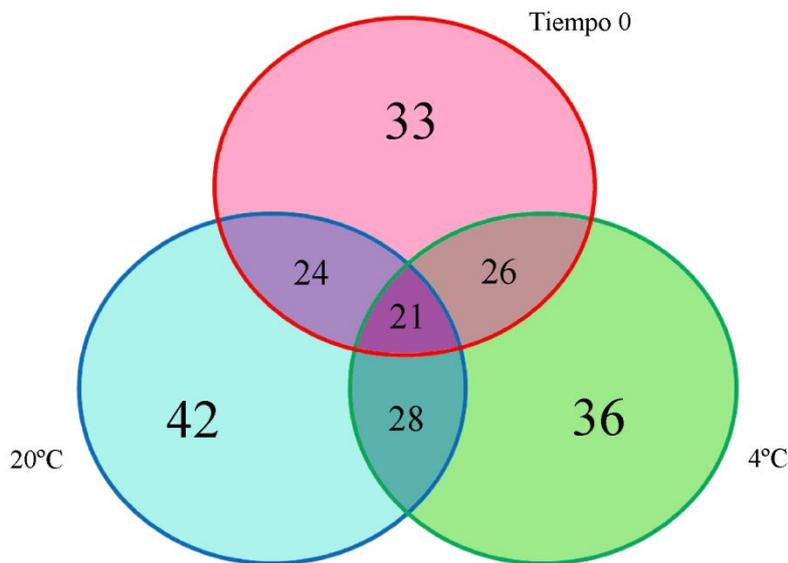


Figura 3. Diagrama de Venn indicando el número de proteínas consideradas para el análisis al tiempo 0 (rojo) y a 21 días en medio sin nutrientes a 4°C (verde) y 20°C (azúl).

### 5. Discusión y conclusiones

La fluctuación de la temperatura junto a la ausencia de nutrientes son probablemente los factores de estrés más frecuentes en los sistemas acuáticos que afectan la supervivencia de las bacterias alóctonas como *Escherichia coli*. Una relación inversa entre el mantenimiento de la cultivabilidad y la temperatura fue ya observada para *Campylobacter jejuni* (Lázaro *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999) y *Legionella pneumophila* (Ohno *et al.*, 2003). Arana *et al.* (2010) han demostrado que la supervivencia de *E. coli* sigue una relación inversa con la temperatura,

siendo las bajas temperaturas responsables de una ralentización del metabolismo destinada a retrasar la aparición de daños celulares. Se ha indicado además, que para evitar este daño a bajas temperaturas adquieren importancia moléculas como la trehalosa, que presumiblemente contribuiría a estabilizar ciertas proteínas y/o las membranas celulares (Kandror *et al.*, 2002), proteínas como la chaperona “factor desencadenante” o “trigger factor”, que aumenta la viabilidad del microorganismo en estas condiciones (Kandror y Goldberg, 1997) y proteínas que protegen el material genético como por ejemplo el ARN (Jones *et al.*, 1996). Esto se correspondería con nuestros resultados, donde se observó una mejor supervivencia a 4°C. A esta temperatura se seguían manteniendo tanto la integridad de las bacterias como su cultivabilidad. Por el contrario, a 20°C se observó un descenso importante en la cultivabilidad junto a un mantenimiento de la viabilidad en las bacterias (Figura 2). La reducción en el número de células cultivables a 20°C se asocia con una entrada en el estado viable no cultivable (VNC), que representaría una respuesta empleada por *E. coli* para hacer frente al estrés. Sin embargo, estudios anteriores (Arana *et al.*, 2007) han postulado que la entrada a este estado no representaría un fenotipo exitoso, debido a la incapacidad de regresar a un estado cultivable al desaparecer el estrés.

Matin *et al.* (1989) observaron que en las células bacterianas se produce una degradación de proteínas que presumiblemente proporciona los precursores necesarios para sintetizar proteínas que actúan en respuesta a la inanición. *Escherichia coli* induce la expresión de más de 50 proteínas en respuesta a este tipo de estrés y muchas de ellas pertenecen a la membrana externa (Alexander y St John, 1994).

Para entender el comportamiento a nivel molecular de *E. coli* en estas situaciones de estrés, se explicarán posibles funciones de algunas proteínas detectadas durante las experiencias. El factor de elongación Tu (EF-Tu), es una proteína citoplasmática cuya función está relacionada con la síntesis de proteínas. Sin embargo, se asocia con la membrana cuando se presenta un déficit de glucosa, galactosa, amoníaco, glutamato o fosfato (Young y Bernlohr, 1991). Además, se ha propuesto que EF-Tu está involucrado en la capacidad bacteriana de percibir y responder a la privación de nutrientes (Yu *et al.*, 1986). Nuestros resultados podrían corresponderse a este fenómeno, donde EF-Tu podría intervenir como posible respuesta al estrés causado por la falta de nutrientes.

Con respecto a la proteína OmpA, cabe destacar que pertenece a la membrana externa y posiblemente su función principal es intervenir en el mantenimiento de la integridad

estructural de la membrana externa, proporcionando una conexión entre ésta y el peptidoglicano (Sonntag *et al.*, 1978; Koebnik *et al.*, 2000). Contribuye, además, a la formación de biopelículas (Orme *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007) que podría favorecer el proceso de supervivencia en ambientes acuáticos mediante la agregación bacteriana. La proteína TolC está relacionada con la proteína OmpA, dado que ambas intervienen en el transporte de colicinas (Bernadac *et al.*, 1998), que son toxinas que matan selectivamente microorganismos competidores cuando las condiciones nutricionales no son óptimas. Además, TolC está involucrada en la exportación de una amplia variedad de moléculas, incluyendo algunas tóxicas para la bacteria con el fin de evitar su acumulación, como por ejemplo hemolisinas o antibióticos (Sharff *et al.*, 2001).

También se identificó la proteína MinD a ambas temperaturas. Esta proteína es una ATPasa que interviene en el proceso de división celular, en la localización del centro de la célula para el posicionamiento correcto del sitio de división (septum) (de Boer *et al.*, 1991). Debido a que en nuestras experiencias no estaban ocurriendo procesos de división, dicha proteína podría estar participando en la generación de energía durante la permanencia bajo condiciones de estrés.

Santos *et al.* (2005) observaron que en condiciones de ayuno, aumenta el grosor del peptidoglicano en la pared celular, mientras que aumenta la cantidad de lipoproteínas en la membrana externa, incrementando así las conexiones entre la membrana externa y el peptidoglicano con el fin de obtener una mayor estabilidad. En nuestro caso, aumenta la diversidad de lipoproteínas en ambas temperaturas, entre ellas la EcnB. Se trata de una lipoproteína asociada a la bacteriólisis. Bishop *et al.* (1998) propusieron que bajo ciertas condiciones de estrés como es el ayuno, su expresión podría jugar un papel en la muerte celular programada. Mediante la lisis celular, se liberaría al medio circundante su contenido celular para proporcionar nutrientes a demás integrantes de la población y facilitar el proceso de supervivencia. Otra lipoproteína detectada en nuestras experiencias fue la proteína de membrana externa Slp (también conocida como “starvation lipoprotein”). Esta lipoproteína es inducida en ausencia de carbono y también durante la fase estacionaria y su función podría contribuir a la estabilización de la membrana externa durante la ausencia de nutrientes (Alexander y St John, 1994).

Se concluye que *Escherichia coli*, ante situaciones de estrés como la falta de nutrientes y la exposición a temperaturas no óptimas, presenta una serie de respuestas posiblemente



encaminadas a favorecer su supervivencia. Ante la falta de nutrientes, una serie de proteínas intervendrían para facilitar el proceso de supervivencia. En cuanto al efecto de la temperatura, se puede concluir que tiene un fuerte impacto en la supervivencia de *E. coli*, viéndose más favorecida en nuestro caso a 4°C que a 20°C. Si *E.coli* pudiera volver exitosamente a un estado cultivable tras desaparecer el estrés, el estado VNC representaría una estrategia eficiente para sobrevivir en medios acuáticos.

## 6. Bibliografía

**Alba BM y Gross CA** (2004) Regulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$ -dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* 52: 613–619.

**Alexander DM y St John AC** (1994) Characterization of the carbon starvation-inducible and stationary phase-inducible gene *slp* encoding an outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 11: 1059-1071.

**Arana I, Orruño M, Pérez-Pascual D, Seco C, Muela A y Barcina I** (2007) Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 1-11.

**Arana I, Muela A, Orruño M, Seco C, Garaizabal I y Barcina I** (2010) Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol* 74: 500-509.

**Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S y Makino S** (2007) Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but non-culturable state. *Microbiol Immunol* 51: 875-881.

**Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S y Lloubes R** (1998) *Escherichia coli* Tol-Pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol* 180: 4872–4878.

**Bishop R, Leskiw B, Hodges R, Kay C y Weiner J** (1998) The entericidin<sup>®</sup> locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J Mol Biol* 280: 583-596.

**Coutard F, Crassouss P, Droguet M, Gobin E, Colwell RR, Pommepuy M y Hervio-Heath D** (2007) Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* regrowth or resuscitation? *ISME J* 1: 111-120.

**De Boer PA, Crossley RE, Hand AR y Rothfield LI** (1991) The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO Journal* 10: 4371-4380.

**Guerrero R y Berlanga M** (2001) La “inmortalidad” procariótica y la tenacidad de la vida. *Actualidad SEM* 32: 16-23.

**Heinmets F, Taylor W y Lehman J** (1954). The use of metabolites in the restoration of the viability of heat and chemically inactivated *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 67: 5-14.

**Hobbie JE, Daley RJ y Jasper S** (1977) Use of Nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 33: 1225-1228.

**Jones PG, Mitta M, Kim Y, Jiang W y Inouye M** (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 76-80.

**Jones TH** (2012) “Response of *Escherichia coli* to environmental stress”. En: *Stress Response of Foodborne Microorganisms*. Nova Science Publishers. Editor: Hin-chung Wong (Universidad de Soochow, Taiwán) 293-330.

**Joux F, Lebaron P y Troussellier M** (1997) Succession of cellular states in *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 65-76.

**Kandror O y Goldberg AL** (1997) Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4978–4981.

**Kandror O, DeLeon A y Goldberg AL** (2002) Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9727-9732.

**Keep NH, Ward JM, Robertson G, Cohen-Gonsaud M y Henderson B** (2006) Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. *Cell Mol Life Sci* 63: 2555-2559.

**Kell DB y Young M** (2000) Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Op Microbiol* 3: 238-243.

**Koebnik R, Locher KP y Van Gelder P** (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37: 239-253.

**Lázaro B, Cárcamo J, Audicana A, Perales I y Fernández-Astorga A** (1999) Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 65: 4677-4681.

**Lleó MM, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C y Canepari P** (2000) mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol* 66: 4564-4567.

**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

**Mandel M y Silhavy T** (2005) Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *J Bacteriol* 187: 434–442.

**Matin A, Auger EA, Blum PH y Schultz JE** (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol* 43: 293-316.

**McDougald D, Rice SA y Kjelleberg S** (1999) New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia Bratislava* 54: 617-623.

**Morton DS y Oliver JD** (1994) Induction of carbon starvation-induced proteins in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* 60: 3653-3659.

**Ohno A, Kato N, Yamada K, y Yamaguchi K** (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* 69: 2540-2547.

**Oliver JD** (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43: 93-100.

**Orme R, Douglas CW, Rimmer S y Webb M** (2006) Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics* 6: 4269-4277.

**Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H y Makino S** (2006) Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella typhimurium* strain LT2. *Int J Food Microbiol* 106: 241-247.

**Rozsak DB y Colwell RR** (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51: 365-379.

**Santos JR, Ferrat GC y Eichelmann MC** (2005) La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev Latinoam Microbiol* 47: 92-101.

**Schulz GE** (2002) The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1565: 308-317.

**Sharff A, Fanutti C, Shi J, Calladine C y Luisi B** (2001) The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur J Biochem* 268: 5011–5026.

**Shimizu K** (2014) Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites* 4: 1-35.

**Smith B y Oliver JD** (2006) In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol* 72: 1445-1451.

**Smith SG, Mahon V, Lambert MA y Fagan RP** (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* 273: 1-11.

**Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y y Henning U** (1978) Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* 136: 280–285.

**Srinivasan S, Ostling J, Charlton T, de Nys R, Takayama K y Kjelleberg S** (1998) Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14. *J Bacteriol* 180: 201-209.

**Thomas C, Hill DJ y Mabey M** (1999) Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *J Appl Microbiol* 86: 1024-1032.

**Wetherell C** (2004) Differential gene expression by two strains of *Escherichia coli* (K12 and an environmental isolate) in response to temperature and nutrient stress using microarrays. Tesis de master. Universidad de Okanagan, Canadá.

**White-Ziegler CA, Um S, Perez NM, Berns AL, Malhowski AJ y Young S** (2008) Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, coldshock- and RpoS- dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol* 154: 148-166.



**Young CC y Bernlohr RW** (1991) Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 3096–3100.

**Yu F, Inouye S e Inouye M** (1986) Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene. *J Biol Chem* 261: 2284–2288.