

Separación de células cultivables y no cultivables mediante gradiente de densidad

Orruño, M., Seco, C., Calera, A., Arana, I., Muela, A., Barcina, I.

Dpto. Inmunología, Microbiología e Inmunología. Fac. Ciencia y Tecnología.

Universidad del País Vasco. Apdo. 644. 48080 Bilbao. (isabel.barcina@ehu.es)

INTRODUCCIÓN

El significado biológico del estado viable no cultivable (VNC) está en entredicho desde su descripción (1). La aceptación del estado VNC como parte integrante de un ciclo de vida requiere la comprobación inequívoca de que las células VNC reversionen al crecimiento vegetativo. Esta exigencia plantea un problema metodológico complejo, dada la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas compuestas por mezclas de células cultivables y no cultivables.

Siegele *et al.* (2) han propuesto un método de separación de células cultivables y no cultivables por centrifugación en gradiente de densidad de Renografin-76+ (Radioselectan o Urografin). Se asume que la toxicidad de los medios de contraste iodados iónicos es nula o muy baja (3), si bien Fanning *et al.* (4) alertan del efecto tóxico del Urografin sobre células eucariotas. Recientemente, Desnues *et al.* (5) han utilizado este método de fraccionamiento para obtener poblaciones no cultivables para su posterior caracterización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensiones celulares. Suspensiones de *Escherichia coli* CECT 416: i) crecidas en M9 + 0,2% de glucosa, TSB o LB y recogidas en distintas fases de la curva de crecimiento (8-14 h; 1 d, 8-10 d; >100 d de incubación a 37°C), ii) tras exposición a situaciones de estrés (pH 2,5; ayuno) y iii) mezcla (50% fase estacionaria + 50% mantenidas 100 d en TSB). Densidad final de las suspensiones, 10⁹ células/ml.

Gradiente discontinuo de Urografin (Urografin 76%, Shering Alman) según Siegele *et al.* (2) con modificaciones (Tabla 1). Centrifugación a 28.000 r.p.m. (Centrikon T-2190, rotor TFT 28.38, Kontron Inst.), 4°C, 14 h. Tras la centrifugación, medir la ubicación de las bandas, recoger las células y resuspender en tampón PBS (4°C) y cuantificar las fracciones celulares en cada banda.

Toxicidad de las soluciones de Urografin. Periódicamente se enumeraron las células de fase exponencial mantenidas en PBS estéril o en soluciones A ó F de Urografin (Tabla 1). Incubación a 4 ó 25°C durante 24 horas.

Standard externo de densidad. *Density Marker Beads* (DMBs, Amersham Biosciences) en gradientes de Urografin, sacarosa (60-80%) y gradiente isosmótico preformado de Percoll (Amersham Biosciences).

Cuantificación de células. Número total de bacterias, TDC (6); número de bacterias con membrana citoplasmática intacta, MEMB+ (Live/Dead BacLight™ kit, Molecular Probes); número de bacterias cultivables sobre Agar TSA, UFC; porcentajes de fracciones celulares (Tabla 2).

Tabla 1

Solución	Concentración de Urografin (% v/v)	Volumen (ml)
A	24,45	2,0
B	30,66	2,0
C	34,87	2,0
D	39,08	2,0
E	43,29	2,0
F	47,50	2,5
G	53,20	2,5

Tabla 2

Fracción	Cálculo
Células cultivables (C)	$\frac{UFC \times 100}{TDC}$
Células no cultivables (NC)	$\frac{(TDC - UFC) \times 100}{TDC}$
Células viables no cultivables (VNC)	$\frac{(MEMB^+ - UFC) \times 100}{TDC}$
Células no viables (NV)	$\frac{(TDC - MEMB^+) \times 100}{TDC}$

OBJETIVO

Analizar la eficacia de la centrifugación en gradiente de Urografin para separar fracciones homogéneas de células cultivables y no cultivables a partir de poblaciones celulares heterogéneas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La centrifugación de poblaciones celulares en gradiente de densidad originó la aparición de diversas bandas (Figura 1 y Tabla 3).

Figura 1

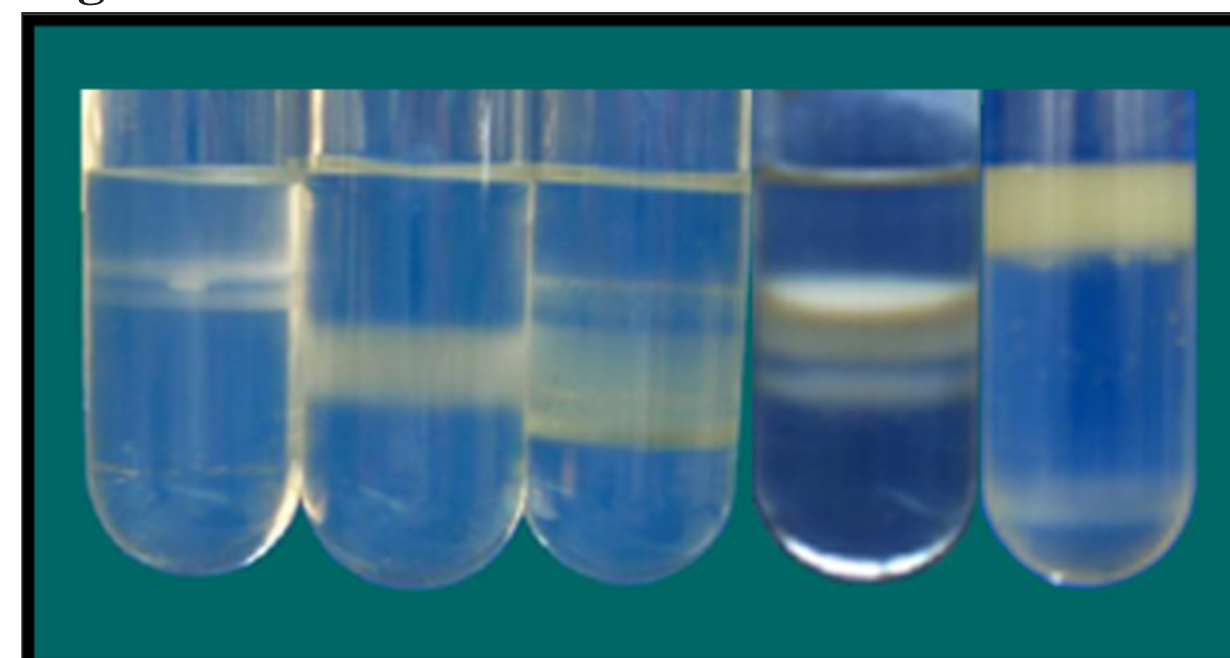


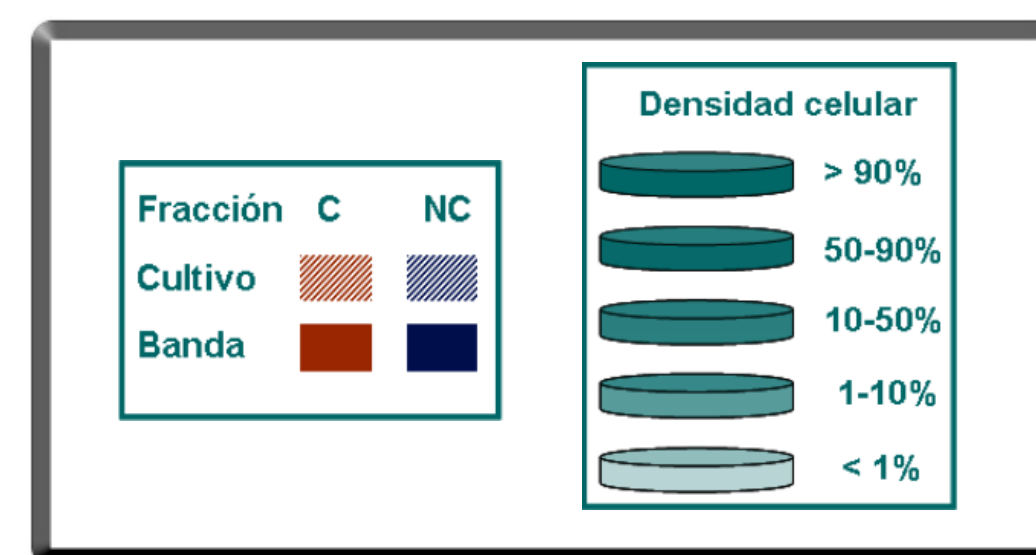
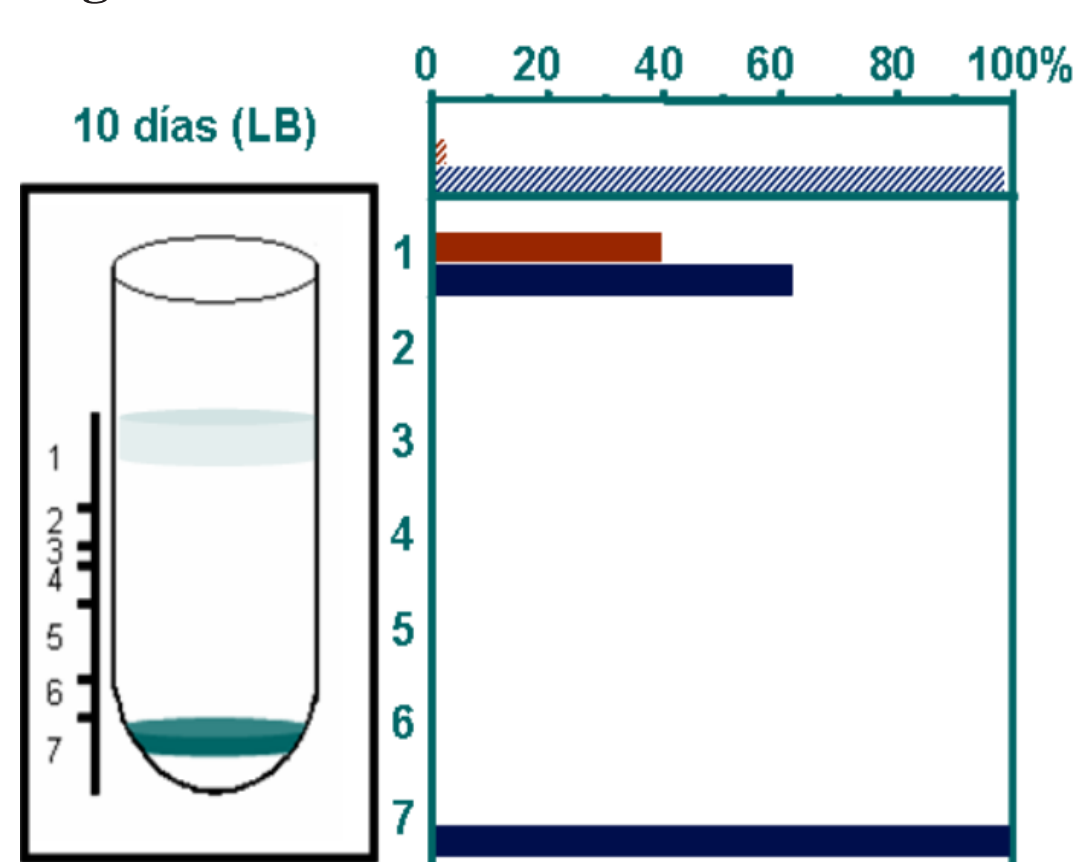
Tabla 3

Banda	Localización de las bandas (cm desde la parte superior)	Concentración de Urografin (%)
1	0-1,10	24,45-34,87
2	1,10-1,54	34,87
3	1,54-1,76	39,08
4	1,76-2,20	39,08-43,29
5	2,20-3,08	43,29-47,50
6	3,08-3,52	47,50
7	3,52-4,40	60,04

La separación de las fracciones celulares, en gradiente de Urografin, se atribuye a que en una población heterogénea, entre otras diferencias, las células presentan distintas densidades (7, 8). Recientemente, Siegele *et al.* (2) y Desnues *et al.* (5) sugieren que las células cultivables son más ligeras que las células no cultivables y, por tanto, ambos tipos de células se situarán en diferentes niveles en un gradiente de Urografin. En este trabajo, tras la centrifugación de cultivos de fase estacionaria crecidos en LB, obtuvimos 2 bandas (Figura 2). En la zona alta del gradiente se recogieron mayoritariamente las células cultivables mientras que la banda situada en la zona baja del gradiente estaba fundamentalmente constituida por células no cultivables.

Cuando se estudiaron otras suspensiones celulares (ver Material y Métodos), el número y localización de las bandas varió según el origen de las células (Figura 3). Si bien, las bandas 5 e inferiores (Tabla 3), cuando aparecían, estaban mayoritariamente constituidas por células NC y la mayor parte de las células cultivables se recogieron en la banda 1.

Figura 2



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de estos resultados se destacan varios hechos:

1. Tanto los resultados presentados por Siegele *et al.* (2) y Desnues *et al.* (5) como los nuestros muestran que las bandas no están constituidas exclusivamente por un tipo de células, cultivables o NC, si no que presentan cierta heterogeneidad con predominancia de uno u otro tipo celular (Figuras 2 y 3).

2. El Urografin ejerce un efecto tóxico sobre las células que se refleja en un aumento del número total de células NC obtenido al finalizar el proceso (sumatorio de células NC de las diferentes bandas) respecto al número de células NC previo al protocolo de separación. La caracterización en base a la actividad (MEMB+) de las células recogidas en las bandas altas mostró un incremento de las fracciones NV y VNC con respecto a la suspensión celular inicial. La permanencia en soluciones de Urografin afectó negativamente la cultivabilidad (Figura 4) siendo este efecto directamente dependiente de la concentración de Urografin, del tiempo y de la temperatura de exposición (Figuras 4 y 5).

Figura 3

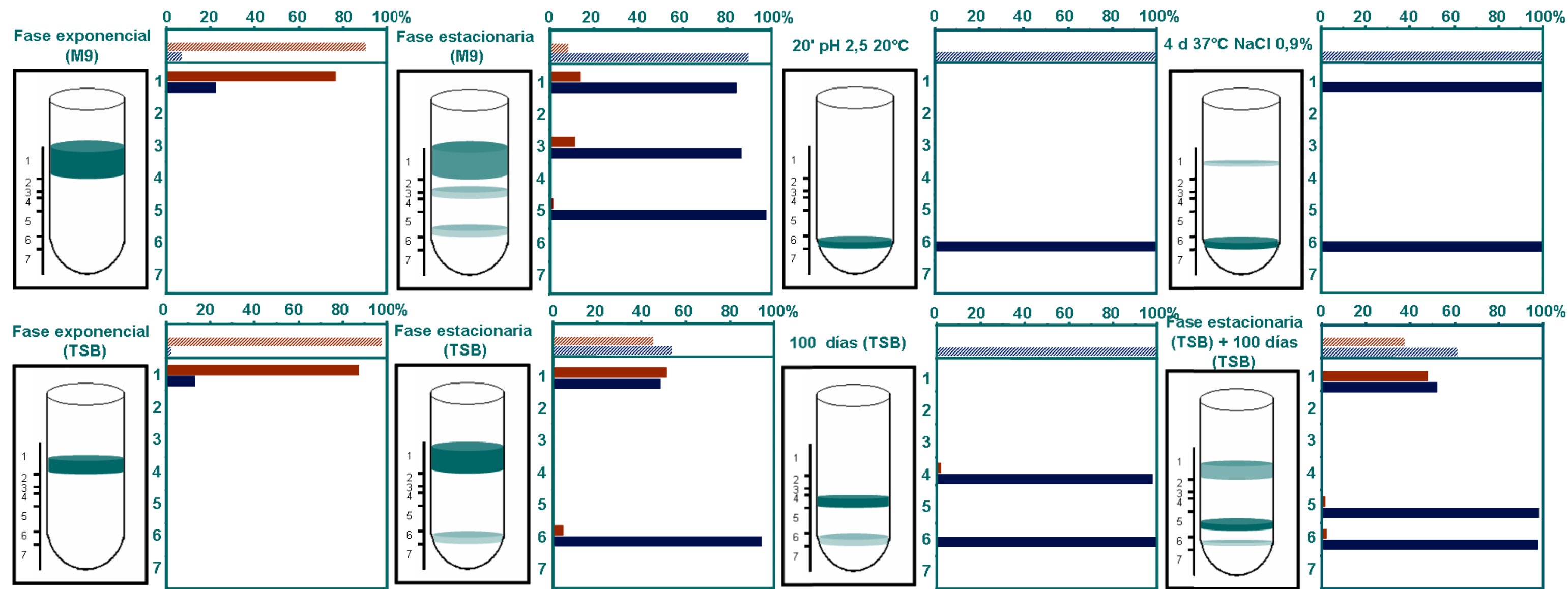


Figura 4

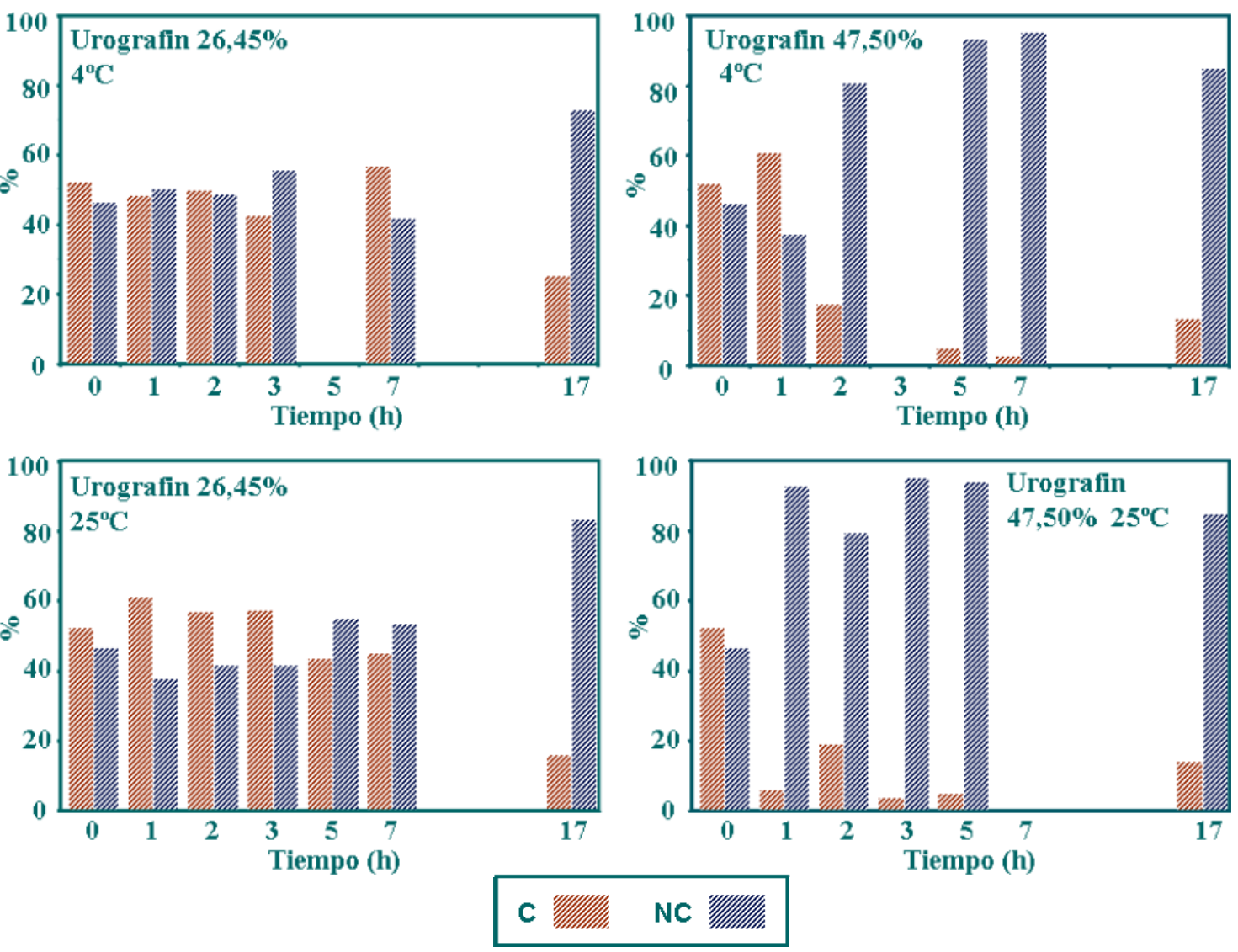
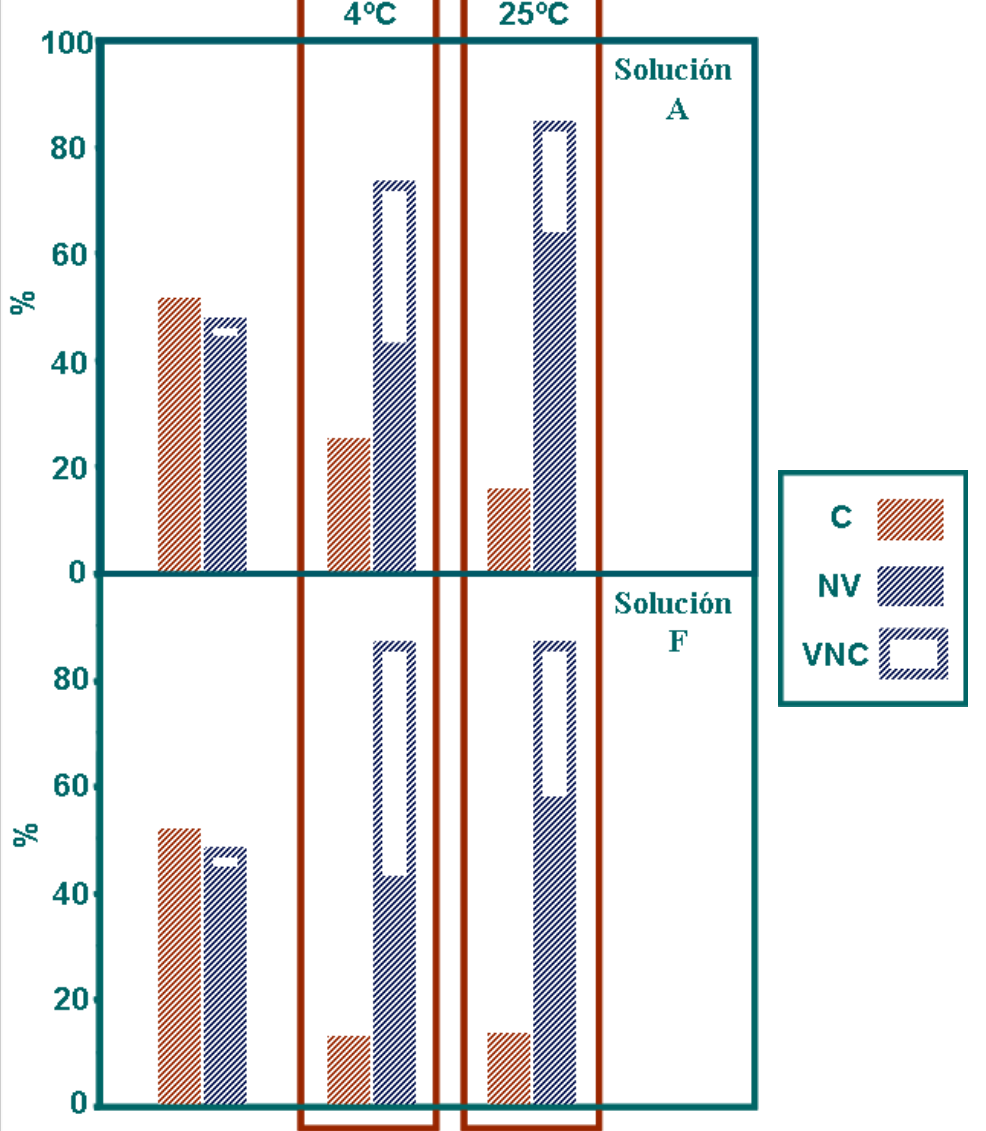
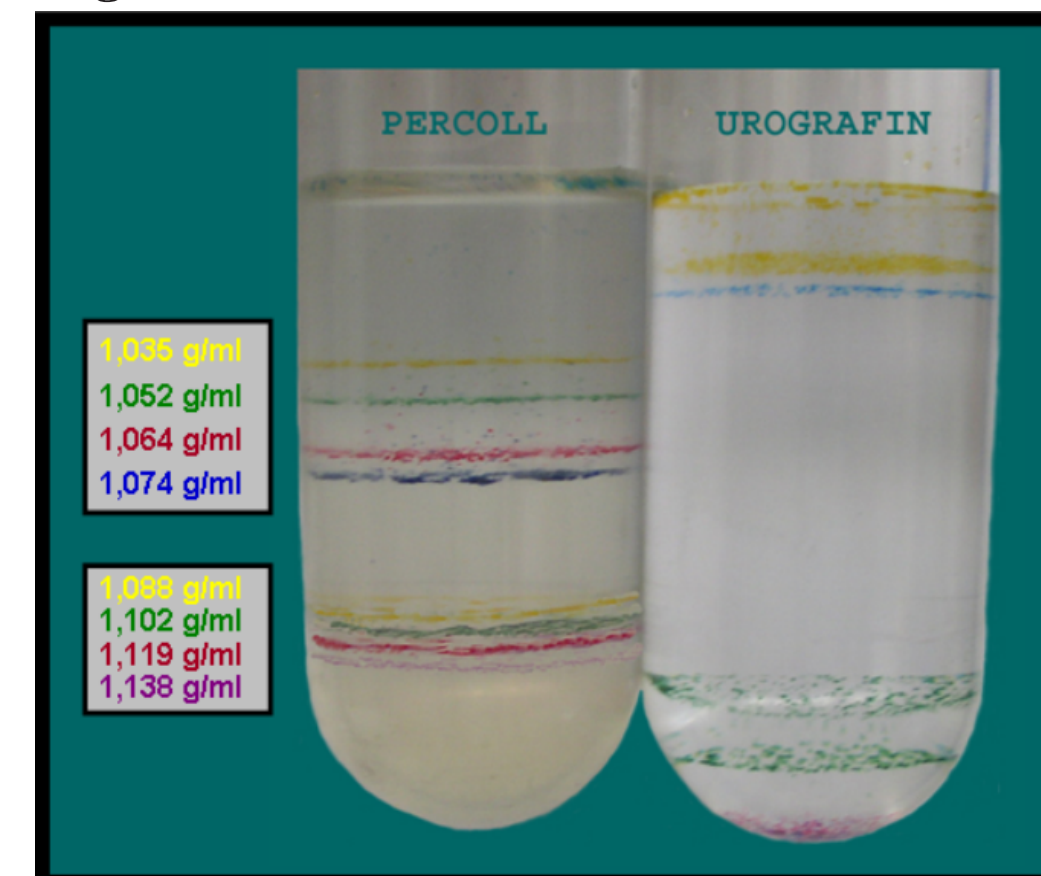


Figura 5



3. Aparentemente, la separación de las células en Urografin no se produce exclusivamente en base a la densidad, dado que cuando se compara la ubicación de las bandas de controles externos de densidad (DMBs) los resultados presentan disimilitudes. Tanto en el gradiente de Percoll, como en el de sacarosa, las DMBs se colocaron, a lo largo del gradiente, ordenadas de acuerdo con su densidad (ver Figura 6). En el caso de gradientes de Urografin, las DMBs se organizaron de acuerdo con su densidad pero las bandas generadas siguieron un orden distinto al observado con los otros gradientes estudiados (ver Figura 6).

Figura 6



REFERENCIAS

- Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes & R.R. Colwell. 1982. *Microb. Ecol.* 8: 313-323.
- Siegele, D.A., M. Almirón & R. Kolter. 1993. En, *Starvation in bacteria*. Kjelleberg, S. (ed.), pp. 151-169. Plenum Press. NY.
- Pertoft, H. 2000. *J. Biochem. Biophys. Methods* 44: 1-30.
- Fanning, N.F., B.J. Manning, J. Buckley & H.P. Redmond. 2002. *British J. Radiol.* 75: 861-873.
- Desnues, B., C. Cuny, G. Grégori, S. Dukan, H. Aguilaniu & T. Nyström. 2003. *EMBO Reports* 4: 400-404.
- Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper. 1977. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228
- Tamir, H. & C. Gilvarg. 1966. *J. Biol. Chem.* 241: 1085-1090.
- Cahn, F.H. & M.S. Fox. 1968. *J. Bacteriol.* 95: 867-875.

AGRADECIMIENTOS

Subvención General a Grupos de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Ref. 9/UPV00093.310-14510/2002.
Beca Colaborador. Ref. 9/UPV00093.310-14510/2002.
Suministro de Urografin 76%, Shering Alman.