



ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN LA ENVOLTURA CELULAR DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGENICA DESPUÉS DE SU EXPOSICIÓN A CONDICIONES DE ESTRÉS USANDO FTIR

Ariana Hernández^a, Raúl Delgado^a, Valentín López^a, Abdu Orduña^a, Marlon Rojas^a.

^aCentro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN, Carretera est. Sta. Ines tecuexcomac-Tepetitla Km. 1.5, Tepetitla de Lardizabal Tlaxcala 90700. anairahera@hotmail.com, rdelgadom@ipn.mx, vallozgayou@yahoo.com.mx, abdueve@hotmail.com, marlonrl@yahoo.com.mx.

RESUMEN

Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) patogénica son causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, que representan una amenaza de salud pública que debe ser enfrentada. Las células bacterianas reaccionan a diferentes condiciones de estrés, el cual les induce cambios fisiológicos y estructurales, causando la muerte de la célula. El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante la espectroscopia de infrarrojo las modificaciones en la envoltura celular de *E. coli* al ser expuesta a diferentes concentraciones de estrés. Las células de *E. coli* fueron centrifugadas y se lavaron dos veces con tampón PBS (pH 7,2), suspendiéndose en el mismo. Una alícuota de 500 μ L (2×10^9 UFC/mL) de suspensión fue incubada incorporando las diferentes condiciones de estrés a concentraciones variables: detergente libre de fosfatos, polimixina B (PMB), proteinasa K, metanol y un control. Las muestras fueron medidas en un espectrómetro FT-IR en modo ATR. Los resultados de infrarrojo muestran que es posible determinar el efecto de diferentes concentraciones de estrés mediante los cambios en la bandas de absorción. Para detergente, se observan cambios marcados en la banda asociada a PO_2^- en $1251-1319\text{ cm}^{-1}$. Las variaciones espectrales correspondientes a *E. coli* tratadas con diferentes concentraciones de metanol, se observan en 1300 y 900 cm^{-1} y están vinculados a los daños de la pared y membrana celular, para la cepa tratada con distintas concentraciones de PMB provoca cambios considerables en las bandas del azúcar $1070-1090$ y $1030-1060\text{ cm}^{-1}$. Por último se observa el efecto de diferentes concentraciones de proteinasa k sobre *E. coli* a 1800 y 1500 cm^{-1} , afectando la amida I y amida II asociada a proteínas y péptidos. Los resultados obtenidos indican la potencialidad de la espectroscopia FT-IR para discriminar entre células bacterianas intactas y dañadas, correlacionando los resultados con aspectos moleculares de respuesta al estrés bacteriano.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por su potencial patogénico, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole; *Escherichia coli* es un patógeno que ha llamado la atención de los investigadores debido a su impacto económico cuando se producen las llamadas enfermedades transmitidas por alimentos. Para reducir la presencia de éste patógeno¹,



es necesario investigar los diferentes enfoques que se han planteado para conocer la eficacia de antimicrobianos potenciales o de diferentes factores de estrés. Se conoce que la técnica de espectroscopia vibracional de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), permite el estudio de la composición de las células, puesto que todos los grupos funcionales absorben la luz infrarroja (IR), por lo tanto, se puede conseguir valiosa información sobre la composición química de las células². La espectroscopia FT-IR ha sido a menudo utilizada para estudios de taxonomía. Sin embargo, existen varios informes sobre la aplicación de ésta técnica para detectar cambios en el nivel celular tras la exposición de las células a diferentes factores de estrés³. La espectroscopia infrarroja es una técnica de análisis para obtener información acerca de los procesos de absorción y emisión sobre las moléculas que se encuentran en la materia. Esta técnica clasifica a los organismos en diferentes niveles taxonómicos y tiene en cuenta el estado fisiológico del microorganismo analizado, ya que el espectro refleja la composición bioquímica de las células en estudio⁴.

El objetivo del presente trabajo fue utilizar la espectroscopia FT-IR para dilucidar los cambios causados por diferentes factores de estrés sobre la composición celular de *Escherichia coli*.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Las células de *Escherichia coli* fueron centrifugadas y se lavaron dos veces con tampón PBS (pH 7,2), y se resuspendieron en el mismo tampón. Un alícuota de 500 μ L (2×10^9 CFU/mL) de suspensión fue incubada con 500 μ L de: detergente concentrado libre de fosfatos, proteinasa K, metanol, polimixina B y un control a diferentes diluciones. Las muestras fueron medidas en un espectrómetro FT-IR en el modo ATR, de acuerdo con Papadimitriou y cols. (2008)⁵. Los espectros fueron registrados cada 4 cm^{-1} .

3. RESULTADOS

Para determinar la influencia de varios factores de estrés sobre el espectro FT-IR en *E.coli*, las células fueron tratadas con (i) Detergente, (ii) metanol, (iii) Polimixina B and (iv), proteinasa K, en un intervalo de concentración de (1-1000 μ /ml). Diversas absorciones fueron detectadas en cinco regiones espectrales que son caracterizadas por los constituyentes celulares principales; en la figura 1A se observan cambios en el perfil de la banda PO_2^- entre 1251-1319 cm^{-1} asociados a células de *E.coli* tratadas con detergente. En la figura 1B, se muestran las variaciones en la forma e intensidad de los picos encontrados principalmente el de 1300 cm^{-1} , para los espectros de células tratadas con metanol. Por lo tanto una reducción en la intensidad del pico encontrado aproximadamente en 1300 cm^{-1} está presente, el cual parece estar compuesto de dos bandas, a concentraciones de metanol más altas un nuevo pico emerge a 1350 cm^{-1} . El espectro de células de *E.coli* no tratada (control) fue visualmente similar al espectro reportado en estudios previos para éste microorganismo y otras bacterias³.

En la figura 1C se muestran las variaciones espectrales correspondientes a *E.coli* tratada con varias concentraciones de PMB, se presentan cambios significativos en dos bandas dentro de la región de los azúcares entre 1000 a 1050 cm^{-1} y 1050 a 1100 cm^{-1} , con una disminución en el número de onda para la primera banda y la desaparición y/o cambio a altos números de onda para la segunda banda, indicando que PMB tiene una alta afinidad de enlace a *E.coli*. Finalmente en la figura 1D es posible observar el efecto de diferentes concentraciones de proteinasa K sobre *E.coli*



por las variaciones espectrales mostradas en la región entre los 1600 y 1500 cm^{-1} , región que muestra las afectaciones a los grupos amida I y amida II pertenecientes a las proteínas y péptidos ³⁻⁵. Estos resultados indican que algunos o todos los componentes celulares, como polisacáridos de la pared celular, ácidos grasos de la membrana celular, proteínas, ácidos nucleicos, u otros componentes del cuerpo celular, muestran alteraciones durante estos tratamientos.

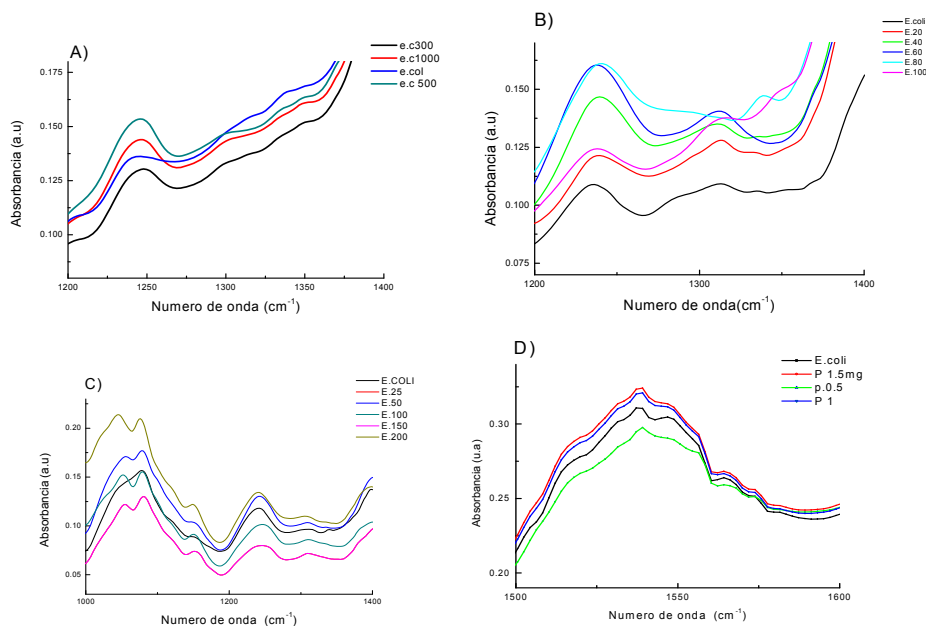


Figura 1: Efecto de diferentes concentraciones de agentes estresantes sobre *E.coli*
 A) Detergente, B) Metanol, C) Polimixina y D) Proteínasa K.

4. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos no solo indican el potencial de la espectroscopia FT-IR para discriminar entre células bacterianas intactas o dañadas sino también muestra la capacidad de esta técnica para estudiar los aspectos moleculares del estrés bacteriano como respuesta a los agentes estresantes. La espectroscopia FT-IR es un método fisicoquímico que puede determinar las características químicas globales de las células, y por lo tanto representa una técnica adecuada para estudiar los cambios moleculares después de la exposición a estrés. Los resultados obtenidos nos ayudaran a mejorar nuestro conocimiento de células de *E.coli* patógena dañadas y las estrategias de respuesta a estas condiciones adversas.

Agradecimientos

A la SIP-IPN por el apoyo mediante el proyecto 20150157



BIBLIOGRAFÍA

1. H.M. Al-Qadiri, M. Lin, A. G. Cavinato, and B. A. Rasco, Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichiacoli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *Int. J. Food Microbiol*, 2006,111:73–80.
2. H.M.Al-Qadiri, M. Lin, M. A. Al-Holy, A. G. Cavinato, and B. A. Rasco. Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotypeTyphimurium and *Listeria monocytogenes* using Fourier transform infrared(FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm⁻¹). *J. Food Sci.*,2008,73:54–61.
3. .A.T.Oust, K. Moretro,G.D. Naterstad, I. Sockalingum, I. Adt, M. Manfait, and A. Kohler, Fourier transform infrared and Raman spectroscopyfor characterization of *Listeria monocytogenes* strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 2006,72:228–232.
4. .A.A´ lvarez-Ordo´ n˜ez, A. Fern´andez, A. Bernardo, and M. Lo´pez, Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Sci.*, 2009, 81:65–70.
5. .A.Alvarez-Ordo´ n˜ez, J. Halisch, and M. Prieto, Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *Int. J. Food Microbiol*, 2010,142:97–105.