



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
TRABAJO FIN DE GRADO
EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

**“Estudio del comportamiento de *C. Sakazakii* en
diversos medios de crecimiento y su relación
con el Quorum Sensing”**

AUTORA: NOEMÍ GANCEDO LORDA
TUTOR: IRMA CARO CANALES

FACULTAD DE MEDICINA
4º GRADO NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA
CURSO 2016-2017

RESUMEN

Cronobacter sakazakii es un microorganismo ubicuo, oportunista y patógeno emergente, asociado a brotes alimentarios en neonatos y lactantes causando graves infecciones con una alta tasa mortalidad. Este microorganismo se ha aislado a partir de leches maternizadas y de un gran número de alimentos especialmente de origen vegetal como cereales, hortalizas, verduras, hierbas, especies y extractos de plantas. Con este trabajo se pretende conocer la influencia de las condiciones de un medio de cultivo basado caldo de triptona soja (TSB) en el crecimiento de *C. sakazakii* y su posible relación con el Quorum Sensing (QS) determinando la presencia de autoinductores. Se estudió el crecimiento de *C. sakazakii* (CECT 858) en caldo TSB normal, caldo TSB normal centrifugado, caldo TSB concentrado a sequedad y reconstituido en TSB normal y TSB utilizado para un cultivo anterior, esterilizado por filtración, concentrado a sequedad y reconstituido en TSB normal. A partir de las cinéticas de crecimiento se calcularon los parámetros de la fase de latencia, velocidad de crecimiento, entre otros, utilizando el software de modelización ComBase. *C. sakazakii* mostró una mayor fase de latencia y una menor velocidad de crecimiento cuando creció en los medios concentrados en comparación con el medio TSB normal, siendo el medio concentrado reutilizado en el que peor creció la bacteria. El estudio de la producción de autoinductores en el crecimiento de *C. sakazakii* por cromatografía de gases determinó la posible presencia de sustancias relacionadas con el QS (dipéptidos cíclicos), que fueron distintas a los autoinductores comúnmente descritos en la bibliografía para este microorganismo: las n-acil-homoserina lactonas. Por lo tanto se requieren más estudios para conocer la relevancia de los compuestos encontrados en el mecanismo de QS y su relación con la variación en el crecimiento en los distintos medios.

PALABRAS CLAVE:

Cronobacter sakazakii, parámetros de crecimiento, *Enterobacter*, *Quorum Sensing*, N-acil-homoseril lactonas, CG/EM.

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is a ubiquitous, opportunistic and emerging pathogen related to foodborne diseases in neonates and young infants and responsible for severe infections with a high mortality. This microorganism has been isolated from milk replacers and a great variety of food, mainly plant-origin food such as cereals, vegetables, herbs, spices and plant extracts. This study aimed to investigate the effect of selected variations in a triptone soy broth (TSB)-based culture media on the growth of *C. sakazakii* and on the formation of microbial autoinducers related to the Quorum Sensing (QS). The growth of *C. sakazakii* (CECT 858) in standard TSB, centrifuged standard TSB, dry-concentrated TSB and reconstituted in standard TSB, and dry-concentrated TSB, previously used for *C. sakazakii* growth and then sterilized by filtration, and reconstituted in standard TSB. The growth parameters, lag phase, growth speed, etc. were modelled using the de ComBase software. *C. sakazakii* showed longer lag phase and lower growth speed in concentrated and then reconstituted TSB, with the reused concentrated and then reconstituted TSB showing the longest lag phase and lowest growth speed. The analysis of autoinducers in the TSB cultures of *C. sakazakii* using gas-chromatography coupled to mass spectrometry showed the presence of molecules related to the QS: cyclic dipeptides, which are different to the autoinducers usually formed by this microorganisms: n-acil-homoseril lactones. More studies are needed in order to know the relevance and role of the dipeptides detected in the QS mechanism and on the variation showed by this microorganism growth in the different TSB-based media tested.

PALABRAS CLAVE:

Cronobacter sakazakii, growth parameters, *Enterobacter*, Quorum Senging, N-acil-homoseril lactonas, CG/MS,

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Cronobacter sakazakii	6
1.1.1. Taxonomía.....	6
1.1.2. Epidemiología	8
1.1.3. Presencia en alimentos.....	8
1.1.4. Patogenia y factores de virulencia.....	10
1.2. Quorum Sensing.....	10
1.2.1. Estructura química de la N-acil-homoserina lactonas.....	12
1.2.2. Tipos de autoinductores y su expresión	13
1.2.3. Métodos de detección de autoinductores	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1 Efecto del medio de cultivo sometido a diversos tratamientos en el crecimiento de <i>C. sakazakii</i>	15
4.1.1 Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en caldo triptona de soja sin ninguna modificación.....	15
4.1.2 Crecimiento <i>C. sakazakii</i> en TSB centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos.	18
4.1.3. Crecimiento <i>C. sakazakii</i> en TSB concentrado	19
4.1.4 Crecimiento <i>C. sakazakii</i> en TSB concentrado a partir de un cultivo con una población de 10^9 ufc/mL	20
4.2. Detección de autoinductores por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CGM)	21
4.2.1. Extracción de acil-homoserina lactonas	21
4.2.2. Preparación de estándares.....	21
4.2.3 . Análisis cromatográfico e identificación.....	21
4.3 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1. Curvas de crecimiento	22
5.1.1. TSB sin modificación	23
5.1.2. TSB centrifugado	24
5.1.3. TSB concentrado	25
5.2. Parámetros de crecimiento en las distintas condiciones	27
5.3 Detección de n-acil homoserina lactonas	28
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33
8. ANEXO	37

FIGURAS

Figura 1. Árbol de máxima probabilidad de similitud de las especies del género Cronobacter y de las especie más cercanas a ese género, obtenidas de siete loci usando la técnica de tipificación de Secuenciación Multilocus.....	7
Figura 2. Análisis de GeoBURST de Cronobacter STs de acuerdo a su fuente de aislamiento	9
Figura 3. Estructura general de las acil-homoserina lactonas (AHLs).....	12
Figura 4. N-acil-homoserina lactonas identificadas en Cronobacter sakazakii	12
Figura 5. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> a 37°C durante 24 horas.....	15
Figura 6. Preparación y recuento de los inóculos de <i>C. sakazakii</i> . Método de realización de las diluciones para la siembra.....	16
Figura 7. Preparación de los inóculos para obtener una población de <i>C.sakazakii</i> 10 ³ ufc/mL.....	17
Figura 8. Método de siembra en placa por gota en superficie	18
Figura 9. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB con una población inicial de 10 ³ ufc/mL.....	23
Figura 10. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB con una población inicial de 10 ⁹ ufc/mL.....	24
Figura 11. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB con una población inicial de 10 ³ ufc/mL.....	24
Figura 12. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB centrifugado con una población inicial de 10 ⁹ ufc/mL.....	25
Figura 13. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB sin crecimiento concentrado.....	26
Figura 14. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en TSB con una población de 10 ⁹ ufc/mL concentrado.....	26
Figura 15. Cromatogramas obtenidos del análisis del estándar interno (1,5 mg/mL de metanol) y su espectro de masas.....	29
Figura 16. Cromatogramas obtenidos del análisis muestra de caldo de cultivo de TSB concentrado a partir de un cultivo con una población de 10 ⁹ ufc/mL después de 8 horas de incubación.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores ajustados de las poblaciones iniciales y finales, periodo de latencia, velocidad máxima, R2 y DS de las curvas obtenidos mediante el programa.....	28
Tabla 2: Relación de compuestos detectados en el cromatograma.....	31

ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

OMS: Organización Mundial de la Salud

SPP: subespecies

ST: secuencias tipo

QS: Quorum Sensing

AHLs: N-acil-homoserina lactonas

SAM: s-adenosil metionina

DPD: dihidroxipentanodiona

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

CGM: cromatografía de gases masas

TSB: caldo triptona de soja

TSA: agar triptona soja

UFC: unidades formadoras de colonia

RPM: revoluciones por minuto

C: concentrado

MC: medio de cultivo concentrado

TSBCS: medio de cultivo concentrado con sobrenadante

R²: coeficiente de determinación

X_t: población teórica

X_i: población inicial ajustada

λ: fase de latencia

μ: fase exponencial

X_f: población final ajustada

DS: desviación estándar

PPM: partes por millón

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii es un microorganismo ubicuo, oportunista y patógeno emergente de gran importancia en la salud pública [1]. Podemos definir a un microorganismo emergente como aquel agente infeccioso, recientemente identificado y anteriormente desconocido capaz de causar problemas de salud pública, a nivel local, regional o mundial, o aquel que aunque conocido recientemente ha adquirido carácter epidémico, convirtiéndose en amenaza [2].

C. sakazakii, ha estado asociado desde su aislamiento por Farmer et al., (1980) [3] a brotes alimentarios en neonatos o lactantes mayores, causando infecciones graves con un alto índice de mortalidad, aproximadamente 50% o más [1]. La fuente de estos brotes alimentarios en esa población son las fórmulas lácteas en polvo [4]. Sin embargo, otros alimentos podrían ser también vectores de este microorganismo como; los alimentos de origen vegetal, ingredientes utilizados en la industria alimentaria [5]. También se ha aislado este microorganismo en portadores sanos, ratones, ambientes clínicos, que pueden ser considerados como reservorios del mismo [6]. Los posibles factores que influyen sobre la presencia de este microorganismo en alimentos con condiciones desfavorables, como bajo contenido acuoso, como es el caso de las leches formuladas, o bajo pH, como los alimentos de origen vegetal... etc. puede deberse a una resistencia desarrollada a condiciones ácidas, osmóticas y altas temperaturas [5].

1.1.1. Taxonomía

Cronobacter sakazakii es caracterizado por ser un bacilo, gram negativo, no esporulado, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae [7]. Presenta un tamaño entre 1-3µm, es una bacteria flagelada, lo cual le confiere movilidad [3, 8, 9]. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 37-43°C, presentando un tiempo de generación de 37 a 44 minutos a una temperatura de 22°C [10]. La temperatura mínima de crecimiento se encuentra entorno a 5°C, aunque podría seguir creciendo durante periodos largos, si hay un abuso o incremento de la temperatura de almacenamiento [11].

Inicialmente este microorganismo se clasificó como *Enterobacter cloacae* ya que se podía distinguir de otros miembros de la misma especie por la producción de

un pigmento amarillo. Posteriormente, se puso en evidencia que los microorganismos que producían ese pigmento, mostraban una homología menor al 50% en el ensayo de hibridación DNA-DNA con respecto a las cepas no pigmentadas de *E. Cloaceae*. A partir de este hecho, se sugirió que esas cepas podían ser agrupadas en una nueva especie, la cual se denominó como *Enterobacter sakazakii*. El nombre *Enterobacter sakazakii* se acuñó en 1980 en homenaje al científico japonés Richii Sakazakii [3].

Esta especie se distinguía de *E. Cloaceae* a partir de los ensayos de hibridación DNA-DNA, la producción de pigmento, la resistencia a antibióticos y la asignación a biotipos dentro de la misma especie [3]. Recientes estudios taxonómicos, como el análisis de secuenciación del 16S RNAr y la secuencia del gen hsp 60, realizados a partir de 2004, han permitido mejorar la clasificación de este microorganismo [12, 13, 14] Estos estudios permitieron realizar una revisión taxonómica exhaustiva que llevó al establecimiento de un nuevo género: *Cronobacter* [7,13]. Actualmente, este género agrupa a siete especies como se puede observar en la Figura 1.

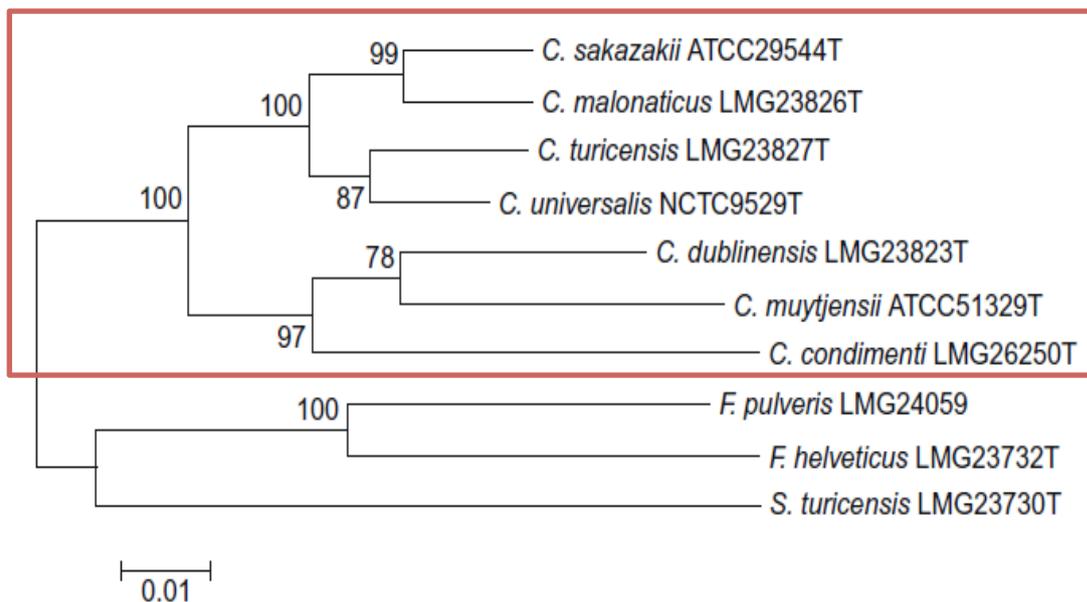


Figura 1. Árbol de máxima probabilidad de similitud de las especies del género *Cronobacter* y de las especies más cercanas a ese género, obtenidas de siete loci usando la técnica de tipificación de Secuenciación Multilocus [6]

1.1.2. Epidemiología

Si bien las toxiinfecciones causadas por *Cronobacter sakazakii* han sido observadas en poblaciones de diversas edades, se ha podido establecer la etapa lactante como la que presenta un mayor riesgo frente a la infección, destacando entre la población más sensible los neonatos (< de 28 días, según la OMS) y los lactantes que hayan presentado bajo peso al nacer (< 2,500, según la OMS) [15].

Como se comentará más adelante *Cronobacter spp* especialmente *C. sakazakii*, se ha aislado de leches maternizadas en polvo cuya incidencia varía entre un 2 y un 14%. De acuerdo con [16] las concentraciones de este microorganismo en esos productos son muy bajas, entorno a una célula/g o incluso menor de 1 célula/100g, siendo este valor el más representativo. Estos autores también indican que es posible que esta cantidad microbiana se corresponda a la dosis infectiva para recién nacidos [17, 16]

1.1.3. Presencia en alimentos

Cronobacter spp. ha sido aislado a partir de un amplio número de alimentos especialmente de origen vegetal como los cereales, trigo arroz, maíz, ensaladas, hortalizas, verduras, hierbas, especies y extractos de plantas utilizados como ingredientes [5,18]. También, se han aislado en hierbas aromáticas tanto secas como frescas alcanzando una incidencia del 30% en estos alimentos [19]. Los autores antes mencionados señalan que *Cronobacter spp* podría tener un hábitat común que pueden ser las plantas. Esos autores fundamentan su hipótesis en ciertas características particulares que presenta este grupo microbiano como la producción de polisacáridos, la producción de pigmentos amarillos y a la resistencia a la desecación que presentan estos microorganismos. Estas características serían las responsables de que el microorganismo quedara unido a las hojas de las plantas protegiéndose de los radicales libres, producidos por la exposición a los rayos solares, así mismo, que puedan sobrevivir largos periodos secos. Teniendo en cuenta que estos microorganismos están asociados a las hortalizas y los vegetales, su incidencia en este tipo de alimentos que no han tenido un tratamiento térmico elevado es alta, por ejemplo hasta un 61% en brotes, hierbas frescas y especias. La incidencia en alimentos de origen animal que contiene algunos ingredientes de origen vegetal también es alta, por ejemplo la incidencia en los alimentos deshidratados, y también, como se ha dicho, en fórmulas lácteas en polvo para infantes es de un 21,6% [16],

En la figura 2, podemos observar la asociación entre las fuentes de aislamiento y las distintas especies del género *Cronobacter* y usando un análisis GeoBURST: Éste análisis relaciona la fuente de aislamiento con una parte del genoma de las especies bacterianas, denominadas secuencias tipo (ST), lo que permite reconocer rasgos genéticos comunes [16].

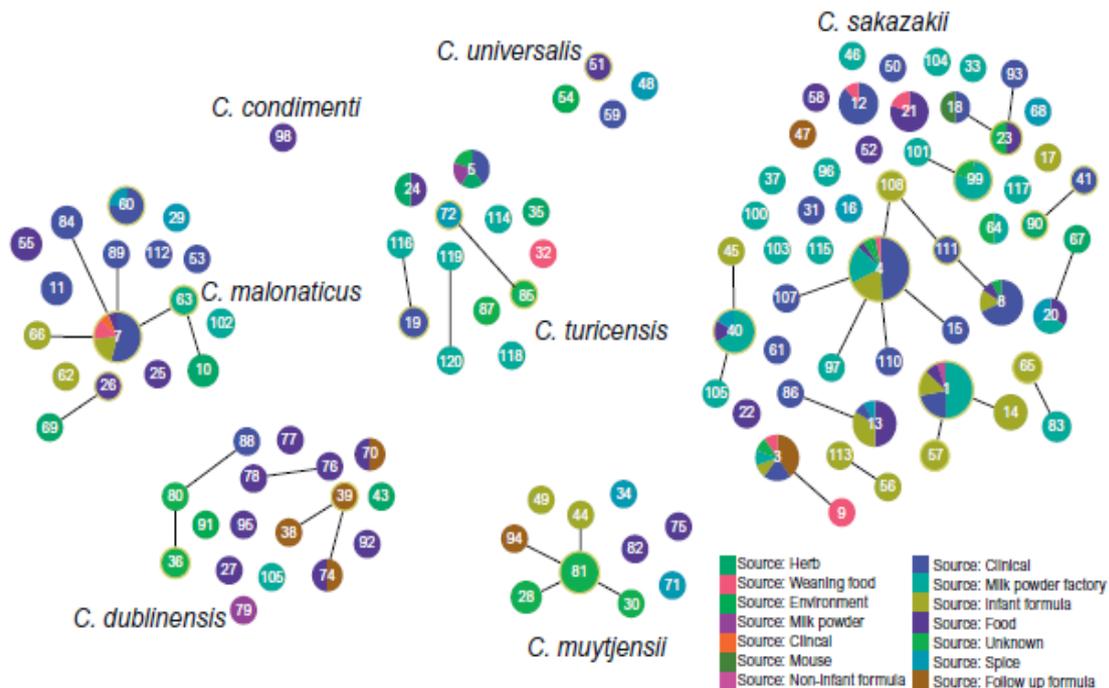


Figura 2. Análisis de GeoBURST de *Cronobacter* STs de acuerdo a su fuente de aislamiento [16]

El análisis de GeoBURST con Secuencias Tipo (ST) de los aislamientos de *Cronobacter spp* mostró una estrecha relación entre los grupos (clusters) de cepas y su hábitat de aislamiento. Forsythe et al 2014 [16], encontraron que el 45% de las cepas de origen clínico y el 24,5% de las cepas aisladas de leche maternizada producen meningitis un rasgo genético común para los *C. sakazakii* meningitis pathovariedad que le denominaron CC4. La razón de esta asociación no se conoce totalmente debido a los pocos estudios sobre los factores de virulencia de este microorganismo. Adicionalmente, esa pathovariedad de *C. sakazakii* también ha sido aislada en el ambiente de las fábricas de leche en polvo y de fórmulas lácteas infantiles en diversos países como Irlanda, Suecia, Australia y Alemania [16]

La contaminación por *Cronobacter sakazakii*, se produce en el transcurso de la producción de alimentos, por deficientes prácticas de higiene, envasado y manejo. Tanto personas como maquinaria de producción pueden ser portadoras de la

bacteria y contaminar los alimentos en cualquier fase de la producción, poniendo énfasis en la agregación de sustancias termolábiles, las cuales no se puede someter a la pasteurización [20], a los alimentos tratados por el calor, después de su tratamiento térmico.

Derivado de los brotes alimentarios ocasionados por *Cronobacter spp* especialmente *C. sakazakii*, se reconoce a este microorganismo como patógeno y se propone incluir a *C. sakazakii* como criterio microbiológico para los preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses (Reglamento CE 2073/2005) <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32005R2073>. El criterio microbiológico máximo permitido es: ausencia en 10 gramos.

1.1.4. Patogenia y factores de virulencia

Las cepas de *C. sakazakii* que han producido meningitis y/o mortalidad muestran una alta invasión a las células Caco 2, pueden invadir las células intestinales, se replican en macrófagos y pueden atravesar la barrera hematoencefálica [21, 22]. Además, *Cronobacter* produce proteínas de membrana OmpA y OmpX (proteína presente en la pared celular), similar a la que produce *E. coli K12* que contribuye a la adhesión a las células del huésped [23] y que podrían tener el rol de penetrar en la barrera hematoencefálica y también invadir las células microvasculares endoteliales del cerebro. Sin embargo el mecanismo de destrucción de las células del cerebro no son conocidos. Se piensa que en parte puede ser una respuesta del huésped [6]. *C. sakazakii* es la única especie que presenta genes que codifican para β -fimbriae, así mismo presenta un cluster de genes nanATKR, que codifican el uso de ácido salicílico endógeno [16]

1.2. Quorum Sensing

Los seres vivos presentan mecanismos mediante los cuales se comunican y les permiten mantener relaciones entre sí y con el medio que les rodea. La comunicación celular es un proceso que implica necesariamente que las células tengan unos mecanismos de generación de señales, transmisión y recepción de estímulos, así como de respuesta, que les sirvan para comunicarse e interrelacionarse entre ellas [1, 25]

Durante años se pensó que los organismos unicelulares procariotas no se relacionaban entre sí y que sólo respondían a estímulos procedentes de su medio ambiente. Recientemente se ha demostrado que las bacterias son capaces de comunicarse entre ellas a través de moléculas orgánicas, que colaboran en la función de comunicación. Esta colaboración hace posible que las bacterias funcionen de forma similar a un organismo multicelular a través de un sistema de comunicación individuo-individuo [26]. Este mecanismo de comunicación entre células es conocido como “*Quorum Sensing*” (QS). Este mecanismo, fue descubierto mientras se estudiaba la *Vibrio fischeri*, una bacteria marina [27] que tenía una relación de simbiosis con ciertas especies de calamar como la *Euprymna scolopes*[24]. Otro aspecto que permitió conocer el mecanismo de QS fue la luminiscencia que producía la mencionada bacteria (*Vibrio fischeri*) a altas concentraciones. Más adelante, se pudo demostrar que la luminiscencia que producía se debía a una molécula, la N-acil homoserina lactona 3-oxohexanoil, producida por los propios *Vibrio fischeri* [1].

El QS otorga a una bacteria, de forma individual, la capacidad de recabar información sobre la densidad celular de su entorno, mediante la síntesis moléculas químicas que actúan como señales, éstas señales reciben el nombre de autoinductores [28], debido a que estimulan o inhiben su propio metabolismo [2]. Así mismo se ha observado que la concentración extracelular de los autoinductores aumenta según la densidad celular [28]. Una de las funciones más importantes de la autoinducción o QS es la regulación de la densidad de población celular entre bacterias, lo cual tiene gran repercusión en el comportamiento de la población de bacterias durante la invasión y colonización de organismos [30]

Los autoinductores pueden ser producidos por diferentes bacterias y son de distintos tipos. Uno de los más relevantes son las N-acil-homoserina lactonas, diferenciándose entre ellas en la longitud de la cadena de N-acilo, que oscila entre 4 a 18 carbonos y en la sustitución en la posición C-3 de la cadena lateral (grupo oxo o hidroxilo) [31, 32, 33]. Es conocido que *C. sakazakii*, produce y secreta diversos tipos de autoinductores (ver figura 3) [34] los cuales se acumulan en el medio y actúan como comunicadores [3]

1.2.1. Estructura química de la N-acil-homoserina lactonas

Las moléculas N-acil-homoserina lactonas (AHLs) son moléculas de bajo peso molecular (unos 250 uma), las cuales se acumulan en el medio extracelular. Las AHLs son producidas principalmente por bacterias Gram negativas y son bacteria dependiente. La primera que ha sido identificada fue la 3-oxo-hexanoil-AHL sintetizada por *V. Ficheri* [35,36].

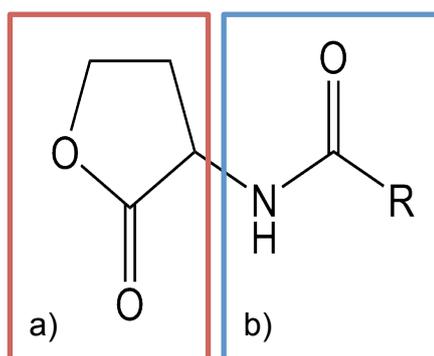


Figura 3. Estructura general de las acil-homoserina lactonas (AHLs).
a) anillo de acil-homoserina lactona. b) cadena acilada

Las AHLs presentan una estructura en la que se observan dos regiones. En la primera región se localiza un anillo de homoserina lactona el cual aparece en todas las AHLs. En la segunda región (Ver figura 3, recuadro azul) aparece la cadena acilada en la que difieren las estructuras AHLs según a) la longitud de la cadena unida a N (de 4 a 18 carbonos; Figura 4) [33], b) del grupo ubicado en la posición C-3 y c) de la posibilidad de presentar enlaces insaturados a lo largo de la cadena hidrocarbonada. Esta estructura les otorga una naturaleza anfipática, permitiéndoles traspasar la membrana a favor de gradiente de concentración y acumularse en el medio extracelular [37, 38, 39].

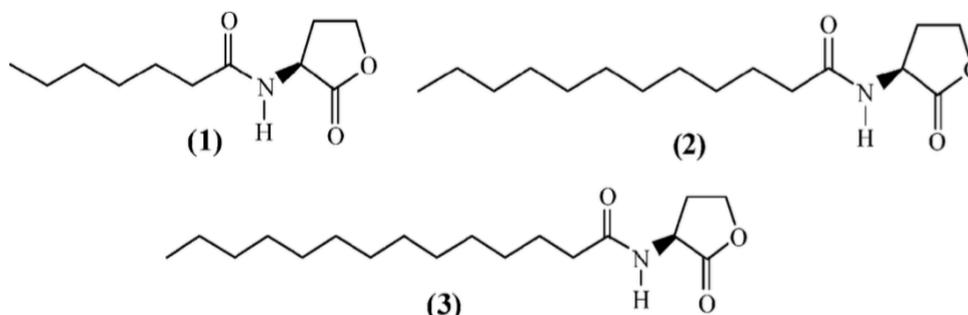


Figura 4. N-acil-homoserina lactonas identificadas en *Cronobacter sakazakii*.

1) N-heptanoil-HSL 2) N-dodecanoil-HSL 3) N-tetradecanoil-HSL.

1.2.2. Tipos de autoinductores y su expresión

Actualmente se han descrito varios sistemas de QS en los que la principal diferencia reside en la naturaleza del autoinductor, se conocen tres tipos de autoinductores [40]:

- **Auto inductores de tipo 1 o QS mediado por acil-homoserina lactona (AHL):** este sistema corresponde a la comunicación entre bacterias Gram negativas pertenecientes a la misma especie. Las N-acil homoserina lactonas (AHLs) provienen de las moléculas S-adenosil metionina (SAM) y acil-PTA, molécula que transporta los grupos acilo [32, 41]. Las AHLs son productos generados por sintetasa autoinductores de tipo LuxI [29]. Las AHLs atraviesan la membrana plasmática y se acumulan en el espacio extracelular y cuando alcanzan una concentración de 5 a 10 nM se reincorporan al medio celular y actúan como señalizadores regulando la expresión de genes [35, 29], siendo reconocidos por proteínas ubicadas en el citoplasma con afinidad LuxR. LuxR es un regulador transcripcional, al que se ensamblan los sustratos o autoinductores, activando la transcripción de genes del QS [42, 24].
- **Oligopéptidos:** es el método de comunicación que es empleado entre bacterias Gram positivas pertenecientes a la misma especie. Los oligopéptidos son identificados por receptores ubicados en la membrana bacteriana produciendo la activación de la expresión de los genes de QS [29].
- **Autoinductores tipo 2 o QS mediado por di-hidroxi-pentanodiona (DPD):** se refiere a un tipo de comunicación interespecie, que es empleado tanto por bacterias Gram negativas como Gram positivas [42]. Este tipo de autoinductores se generan como consecuencia del metabolismo bacteriano y su estructura se caracteriza por di-hidroxi-pentanodiona o DPD [1].

1.2.3. Métodos de detección de autoinductores

Los métodos de detección de los autoinductores de QS son diversos, debido a que estas moléculas tienen estructuras químicas distintas. Las moléculas de naturaleza aminoacídica como los oligopéptidos se pueden determinar por electroforesis de poli-acrilamida o por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los otros dos tipos de inductores (1 y 2) también se pueden cuantificar por diversos métodos entre ellos la Cromatografía de Gases, siendo este último método el más

utilizado, ya que los autoinductores como las AHLs son semivolátiles lo que permite su detección por éste método a partir de cultivos de bacterias [43, 44, 34], y que se lleva a cabo después de obtener los sobrenadantes por centrifugación y extracciones sucesivas con disolventes orgánicos.

2. JUSTIFICACIÓN

El estudio realizado en este trabajo, forma parte de un estudio más amplio que se está realizando en nuestro grupo de investigación, que se lleva a cabo en la Universidad de Valladolid y la Universidad de León. En concreto, este estudio se plantea para conocer si ciertas modificaciones realizadas en el medio de crecimiento Caldo Triptona Soja (TSB) influye en el crecimiento de *C. sakazakii*, específicamente en la presencia de autoinductores que regulan en sistema QS. Además, también pretendía comprobar la detección de autoinductores por CG/EM a lo largo del crecimiento de este microorganismo y para futuros estudios que serán realizados en este grupo de investigación.

Finalmente y no menos importante, la inquietud propia de desarrollar este estudio de investigación, que ha requerido muchas horas de laboratorio, fue adquirir competencias en el trabajo de laboratorio en el campo de la microbiología, el cual me resulta muy interesante.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo 1:

Conocer la influencia en el crecimiento de *C. sakazakii* de la cantidad de inóculo y del medio de cultivo, caldo triptona de soja (TSB), en distintas condiciones (reconstitución normal, centrifugado, concentrado).

3.2 Objetivo 2:

Comprobar si se detectan autoinductores con el método de detección de Cromatografía de Gases acoplado a un detector de Espectrometría de Masas (CG/EM) en los caldos de crecimiento de *C. sakazakii* en las distintas condiciones utilizadas (reconstitución normal, centrifugado, concentrado).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos de este trabajo se han estructurado en dos secciones. En la primera sección se estudió el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *C. sakazakii* y la segunda parte comprobar la presencia de autoinductores en esos medios con el método de detección por CG/EM.

4.1 Efecto del medio de cultivo sometido a diversos tratamientos en el crecimiento de *C. sakazakii*

En la primera sección se estudió el efecto del medio de cultivo, sobre el crecimiento de *C. sakazakii*. Para ello, se ha estudiado el crecimiento de ésta bacteria en caldo triptona de soja (TSB) sometido a diversos tratamientos según se describe a continuación.

4.1.1 Crecimiento de *C. sakazakii* en caldo triptona de soja sin ninguna modificación.

4.1.1.1 Crecimiento de *C. sakazakii*

Se inoculó 1 ml de cultivo de *C. sakazakii* CECT 858 mantenido a 4°C en 6 ml de TSB y se incubó durante 24 horas a 37°C, (ver figura 5). A partir de este cultivo se realizaron las diluciones en tubos *Eppendorf* con 900 µL de TSB y 100µl de dilución problema con el fin de conocer la concentración microbiana. Posteriormente, las diluciones pertinentes se sembraron en Agar Triptona Soja (TSA). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

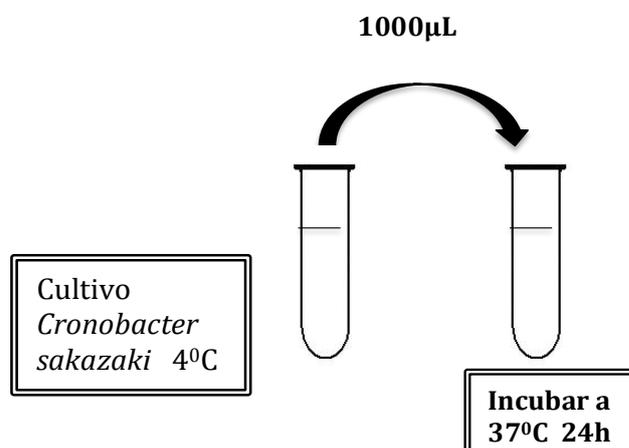


Figura 5. Crecimiento de *C. sakazakii* a 37°C durante 24h.

4.1.1.2 Preparación de los inóculos

El estudio del crecimiento de *C. sakazakii* se realizó en dos concentraciones diferentes (10^9 y 10^3 ufc/ml). A partir de un cultivo de *C. sakazakii* de 24 horas a 37°C se realizaron las diluciones necesarias para alcanzar concentraciones de 10^9 ufc/ml y 10^3 ufc/ml.

- Por un lado, a partir de un cultivo *C. sakazakii* a 37°C durante 24 horas, que tenía una población 10^9 ufc/ml, se inocularon con $100\ \mu\text{L}$ 9 tubos *Eppendorf* que contenían $900\ \mu\text{L}$ de TSB. Los 9 tubos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 y T_8), se incubaron a 37°C durante 8 horas (ver figura 6). Posteriormente, las diluciones pertinentes cada tiempo se sembraron en Agar Triptona Soja (TSA) según se recoge en la sección 4.1.1.3. (Ver anexo 1 Figura 3)

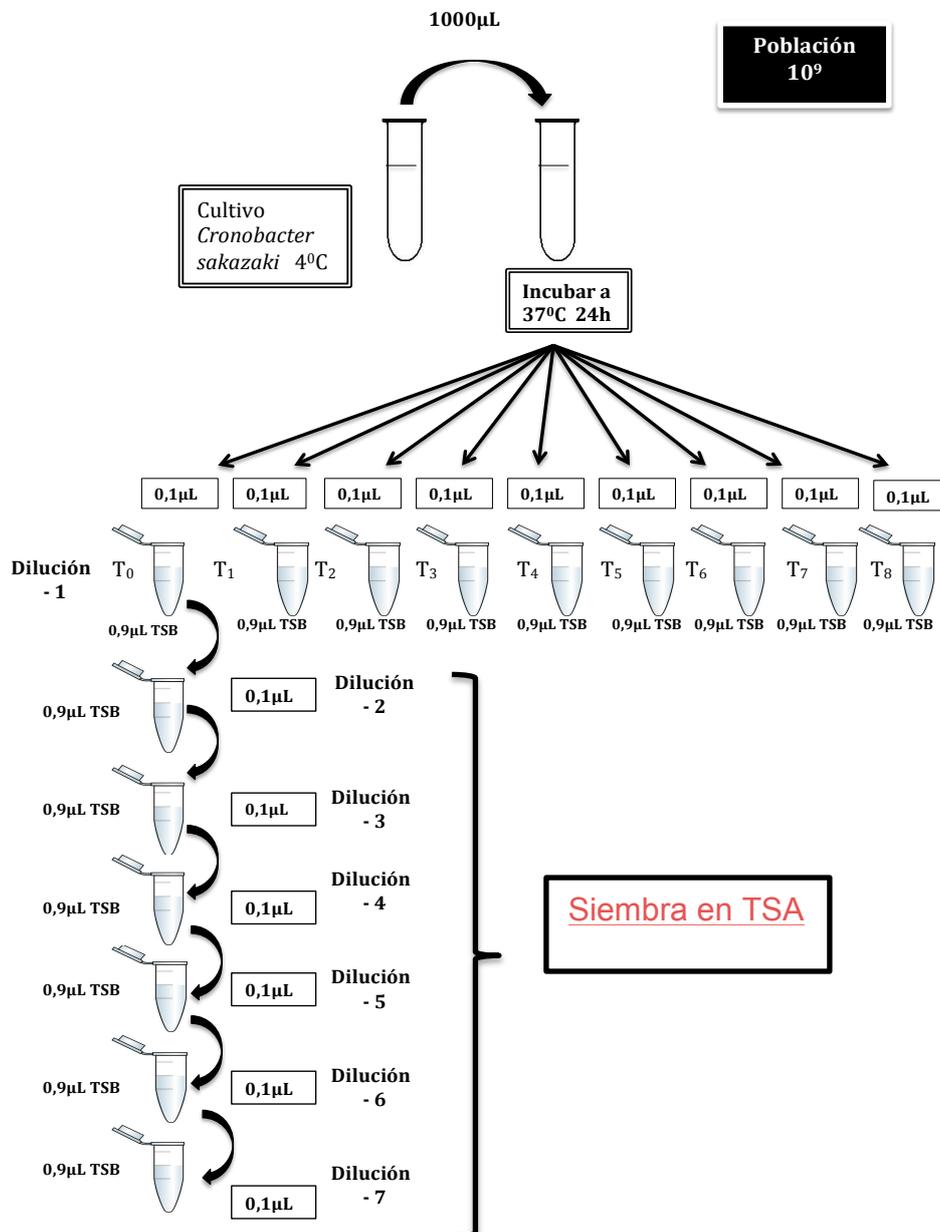


Figura 6. Preparación y recuento de los inóculos de *C. sakazakii*. Método de realización de las diluciones para la siembra.

- Por otro lado, del cultivo de *C. sakazakii* que presentaba una población de 10^9 , se realizaron las diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de 10^3 ufc/ml (ver figura 7). A partir de la dilución que tenía la concentración antes mencionada, se inocularon 9 tubos *Eppendorf* con $100 \mu\text{l}$ de esa dilución y $900 \mu\text{l}$ de TSB. Los tubos *Eppendorf* ($T_0, T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7$ y T_8) se incubaron a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, las diluciones pertinentes cada tiempo se sembraron en Agar Triptona Soja (TSA) según se recoge en la sección 4.1.1.3. (Ver anexo 1 Figura 4)

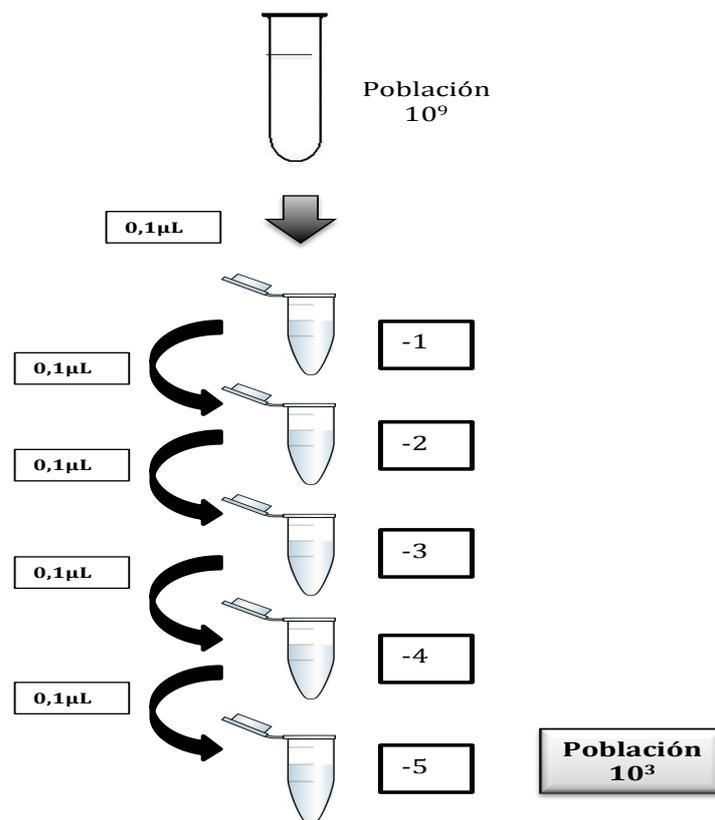


Figura 7. Preparación de los inóculos para obtener una población de *C. sakazakii*

4.1.1.3 Incubación y recuento microbiano

En ambos casos (concentración 10^9 y 10^3 ufc/ml), los tubos *Eppendorf* inoculados se corresponderán con los diferentes tiempos de incubación ($T_0, T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7, T_8$). En cada tiempo de incubación se realizaron las diluciones hasta alcanzar 10^{-7} y $10 \mu\text{L}$ de cada una de las diluciones fueron sembradas en TSA por triplicado e incubadas a 37°C durante 24 horas (ver figura 8), siguiendo la técnica de recuento por gotas en superficie en placas de agar de [45] Cada recuento se realizó por triplicado. (Ver anexo 1 figuras 6 y 7)

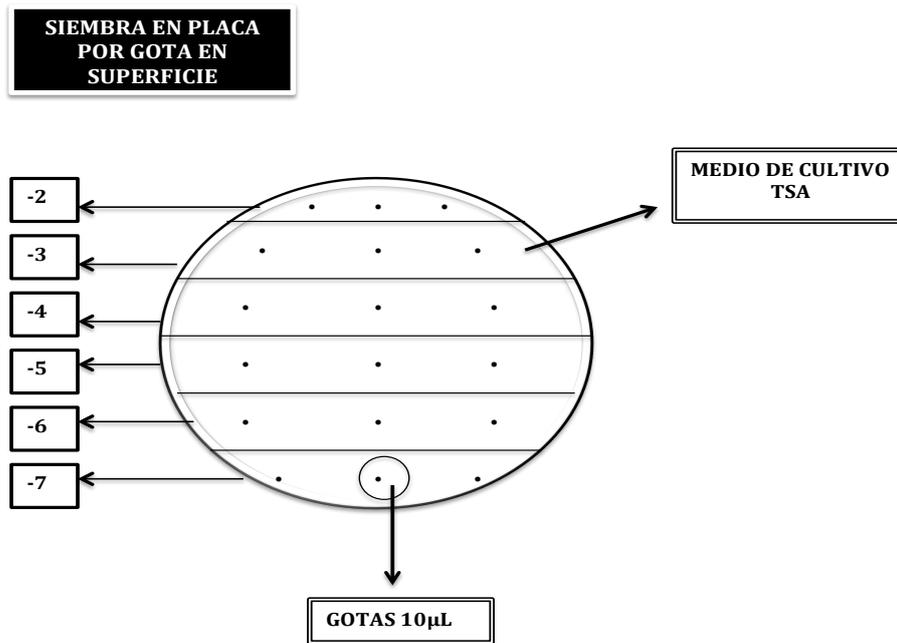


Figura 8. Método de siembra en placa por gota en superficie.

4.1.2 Crecimiento *C. sakazakii* en TSB centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos.

4.1.2.1. Preparación del medio de cultivo concentrado.

El medio TSB (laboratorios CONDA) reconstituido y esterilizado (121°C durante 15 min), se centrifugó en una centrifugadora (*Eppendorf* centrifuge modelo: 5415 R) a 12.000 r.p.m durante 5 minutos. (ver anexo 1, figura 8)

4.1.2.2 Crecimiento de *C. sakazakii*

La obtención del cultivo de *C. sakazakii* fue igual a la sección 4.1.1.1.

4.1.2.3 preparación de los inóculos

El estudio del crecimiento de *C. sakazakii* se realizó en dos concentraciones diferentes (10^9 y 10^3 ufc/ml). El procedimiento de dilución empleado para alcanzar ambas poblaciones fue el mismo que se menciona en la sección 3.1.1.2, (ver figuras 6 y 7).

- Por un lado, se inocularon 9 tubos *Eppendorf* que contenían 900 µl de TSB centrifugado a 12000 r.p.m durante 5 minutos con alícuotas de 100 µL procedentes de un cultivo de *C. sakazakii* que tenía una población 10^9 ufc/ml

(ver figura 5). Los 9 tubos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 y T_8), se incubaron a 37°C durante 8 horas. El recuento microbiano se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.1.1.3.

- Por otro lado, una vez alcanzada una concentración de 10^3 ufc/ml, se inocularon 9 tubos *Eppendorf* con $100\ \mu\text{l}$ cuya concentración era 10^3 ufc/ml y $900\ \mu\text{l}$ de TSB centrifugado a 12000 r.p.m durante 5 minutos. Los 9 tubos *Eppendorf* (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 y T_8) se incubaron a 37°C durante 8 horas.

4.1.2.4 Incubación y recuento microbiano

El recuento microbiano se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.1.1.3.

4.1.3. Crecimiento *C. sakazakii* en TSB concentrado

4.1.3.1. Preparación del medio de cultivo concentrado.

El medio TSB (laboratorios CONDA) reconstituido y esterilizado (121°C durante 15 min), se concentró hasta sequedad en un rotavapor (Heidolph; Modelo Laborota 4000), a 50°C y a 90 rpm. Finalmente, el medio concentrado se reconstituyó con un caldo TSB esterilizado en una relación 2:8 (medio concentrado: caldo TSB esterilizado). Una vez reconstituido fue filtrado a través de una membrana de filtración de $0,2\ \mu\text{m}$.

4.1.3.2. Crecimiento de *C. sakazakii*

El procedimiento llevado a cabo para el crecimiento de *C. sakazakii* fue similar al descrito en la sección 4.1.1.2.

4.1.3.3. Preparación de los inóculos

A partir de un cultivo de *C. sakazakii* de 24 horas a 37°C se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una población de 10^2 (ver figura 6 y 7). Una vez alcanzada esta concentración se incubó a 37°C durante 1 hora para obtener la tercera generación. Seguidamente, se procedió a la inoculación de 10 tubos *Eppendorf* que contenían $900\ \mu\text{l}$ de TSB (concentrado relación 8:2) y alícuotas de $100\ \mu\text{L}$ procedentes del cultivo de *C. sakazakii* con una población de 10^2 ufc/ml incubado durante 1 hora a 37°C . Los tubos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 y T_9), se incubaron a 37°C a distintos tiempos desde la hora 0 hasta las 9 horas. Los

recuentos microbianos se realizaron según lo indicado en la sección 4.1.1.3. (ver figura 7).

4.1.3.3 Incubación y recuento microbiano

El recuento microbiano se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.1.1.3.

4.1.4 Crecimiento *C. sakazakii* en TSB concentrado a partir de un cultivo con una población de 10^9 ufc/mL

4.1.4.1 Preparación del medio de cultivo concentrado (TSBCS).

Un medio de cultivo de 24 horas *C. sakazakii* con una 10^9 ufc/mL, se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min , posteriormente, el medio de cultivo se concentrado concentró hasta sequedad en un rotavapor (Heidolph; Modelo Laborota 4000), a 50°C y a 90 rpm (ver anexo 1 figura 9). Finalmente, el medio concentrado se reconstituyo con un caldo TSB esterilizado en una relación 2:8 (medio concentrado: caldo TSB esterilizado). Una vez reconstituido fue filtrado a través de una membrana de filtración de 0,2µm.

4.1.4.2. Crecimiento de *C. sakazakii*

El procedimiento llevado a cabo para el crecimiento de *C. sakazakii* fue similar al descrito en la sección (4.1.1.1)

4.1.4.3 Preparación de los inóculos

A partir de un cultivo de *C. sakazakii* de 24 horas a 37°C se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una población de 10^2 (ver figura 5 y 6). Una vez alcanzada esta concentración se incubó a 37°C durante 1 hora para obtener la tercera generación. Seguidamente, se procedió a la inoculación de diez tubos *ependorf* que contenían 900 µl de TSBCS con alícuotas de 100 µL procedentes del cultivo de *C. sakazakii* con una población de 10^2 ufc/ml incubado durante 1 hora a 37°C. Los tubos, se incubaron a 37°C a distintos tiempos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 y T_9) desde la hora 0 hasta las 9 horas.

4.1.4.4 Incubación y recuento microbiano

El recuento microbiano se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.1.1.3.

4.2. Detección de autoinductores por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CGM)

4.2.1. Extracción de acil-homoserina lactonas

Se obtuvieron muestras (3 ml de caldo) a las 8 horas de las curvas de crecimiento de *C. sakazakii*. Estas muestras filtradas a través de una membrana de filtración de 0,45 μm para eliminar la carga microbiana y se les agregó 10 μl de estándar interno a una concentración 1 mg/mL. El estándar interno fue n-heptanoil-homoserina lactona, que es una acil-homoserina lactona que no forman las bacterias. La adición de estándar interno sirve para evaluar el grado de recuperación de homoserina lactonas en el método de extracción. A partir de estos sobrenadante se realizaron 3 extracciones con la misma cantidad de cloroformo, finalmente, se llevó a sequedad en una centrífuga a vacío y el residuo se fue redisolto con 2 ml metanol.

4.2.2. Preparación de estándares

Como estándares utilizados en el método para conseguir una identificación más fiable se inyectaron N-heptanoil-, N-dodecanoil y N tetradecanoil-homoserina lactona a una concentración 1.5 mg/mL de metanol.

4.2.3 . Análisis cromatográfico e identificación

El análisis de autoinductores por cromatografía gaseosa fue llevado a cabo de acuerdo a Cataldi et al. (2004) [43] con algunas modificaciones, usando un cromatógrafo modelo HP 7890 A (Hewlett-Packard, Palo Alto, E.E.U.U), acoplado a un detector de masas (HP modelo 5975C). Las modificaciones fueron una relación de split más pequeña para aumentar la concentración (relación 10:1, en vez de 150:1); el uso de una columna capilar más larga (60 m en vez de 30 m); un mayor flujo del helio como gas portador para aumentar la velocidad de paso (1,2 ml/min en vez de 0,8 ml/min); un menor rango de escaneo de masas en la primera monitorización (modo SCAN; relación masa/carga m/z 40-350), manteniendo la m/z 143 como ión seleccionado para la segunda monitorización (modo SIM). La identificación de las acil-homoserina lactonas se llevó a cabo en dos o, en su caso, tres pasos. Primero se consideraron como presuntas acil-homoserina lactonas los picos de los cromatogramas obtenidos con el modo SIM (ión m/z 143). Después se confirmó si eran homoseril-lactoras a partir de los espectros correspondientes de dichos picos en los cromatogramas del modo SCAN. Como paso final, se

comprobaron los tiempos de retención de las acil-homoserina lactonas con los de los estándares utilizados.

4.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos tras el recuento en placa de las colonias de *C. sakazakii* fueron introducidas de forma manual en el programa Excel. Se calcularon las desviaciones estándar y la media de los datos obtenidos en cada recuento por triplicado. Una vez calculados estos valores, se realizó el modelado de las curvas utilizando el programa ComBase (<http://browser.combase.cc/DMFit.aspx>).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Curvas de crecimiento

En este apartado, se muestran los resultados del crecimiento de *C. sakazakii* en medio TSB a diferentes condiciones medio reconstituido según las indicaciones del proveedor, un medio centrifugado y finalmente, el medio TSB concentrado (TSB C; ver materiales y métodos). En estudios anteriores realizado por este grupo de investigación, se observó que el crecimiento de *C. sakazakii* en un sobrenadante concentrado, proveniente de un cultivo de la misma bacteria de 24 h incubación y concentrado hasta sequedad, mostró un comportamiento de crecimiento diferente comparado con un sobrenadante obtenido en las mismas condiciones pero sin concentrar (TSB CS) [46]. Las preguntas que surgieron en ese momento fueron ¿el comportamiento observado en el crecimiento de este microorganismo era debido a la formación de autoinductores? o ¿era debido a las condiciones del medio de cultivo utilizado?. En las figuras (figuras 9-14), se muestran las curvas de crecimiento obtenidas a partir de TSB según las condiciones anteriormente mencionadas e inoculadas a dos concentraciones distintas 10^3 ufc/mL y 10^9 ufc/mL. Así mismo, en cada figura se recoge la desviación estándar y la curva de crecimiento ajustada al modelo de “Baranyi and Roberts, [47]”.

5.1.1. TSB sin modificación

En las figuras 9 y 10 se exponen los resultados del crecimiento de *C. sakazakii* en medio TSB sin ninguna modificación.

La Figura 9 muestra la curva de crecimiento obtenida con una población microbiana inicial de 10^3 ufc/mL. Como podemos observar el crecimiento se inició con una concentración de *C. sakazakii* de $3,8 \text{ Log ufc/mL} \pm 0,078$, alcanzando la máxima concentración de $8,7 \pm 0,078 \text{ Log ufc/mL}$ a las 8 horas y el inicio de la fase exponencial fue aproximadamente a las dos horas.

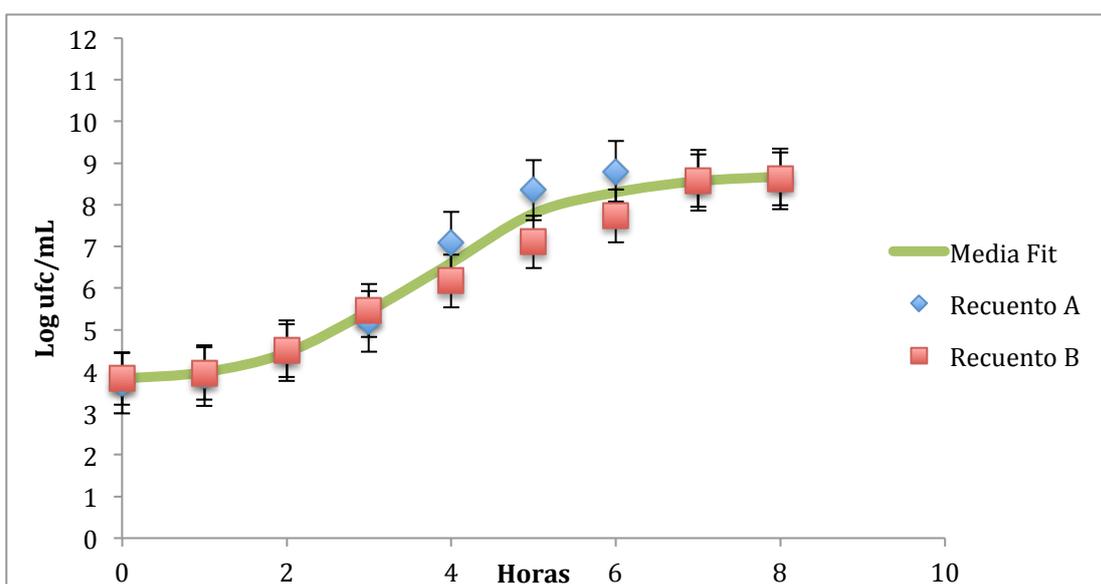


Figura 9. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB con una población inicial de 10^3 ufc/mL.

La Figura 10 muestra la curva de crecimiento obtenida a partir de una población inicial de 10^9 ufc/mL e incubada durante 8 horas. En esta figura podemos apreciar sólo un pequeño incremento de la población microbiana ($1,8 \text{ Log ufc/mL}$), ya que el nivel inóculo inicial fue de $8,8 \text{ Log ufc/mL}$, alcanzándose una población máxima de $10,6 \text{ Log ufc/mL}$. Además, como se puede apreciar la fase exponencial es prácticamente inexistente.

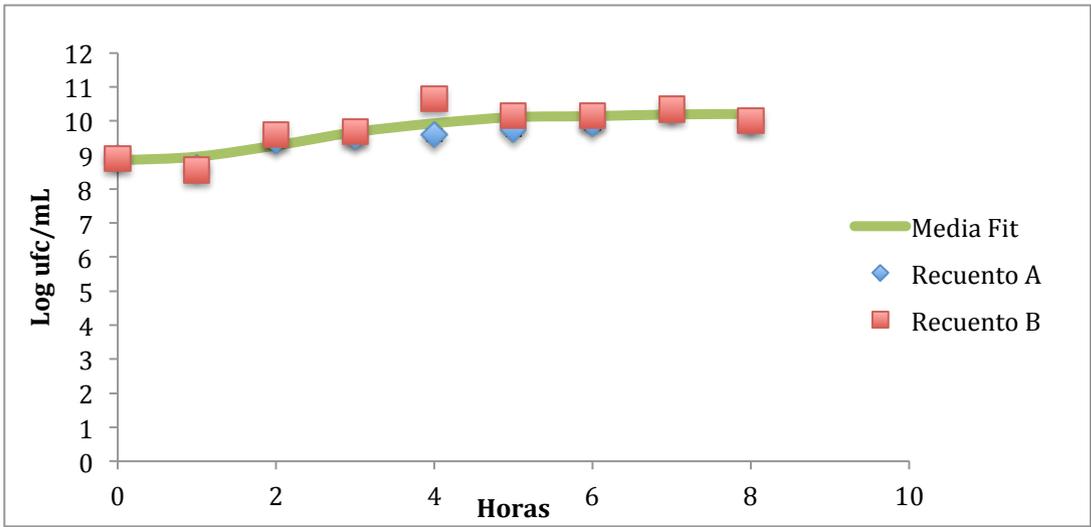


Figura 10. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB con una población inicial de 10^9 ufc/mL.

5.1.2. TSB centrifugado

En las imágenes 11 y 12 se exponen los resultados del crecimiento de *C. sakazakii* en medio TSB centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos, y a dos concentraciones distintas de inóculo (10^3 y 10^9 ufc/mL), mantenidas a 37°C.

La figura 11 recoge los datos procedentes del crecimiento de *C. sakazakii* durante 8 horas partiendo de una población inicial de 10^3 ufc/mL a 37°C. En esta curva el crecimiento se inició a una concentración microbiana de $4,2 \pm 0,15$ Log ufc/mL, alcanzando una población máxima de $8,7 \pm 0,03$ Log ufc/ml a las 7 horas. Iniciando la fase exponencial de crecimiento a las 3 horas. Las dos replicas siguieron una tendencia similar y las desviaciones entre las mismas se solapan lo que indica que la dos curvas son muy similares.

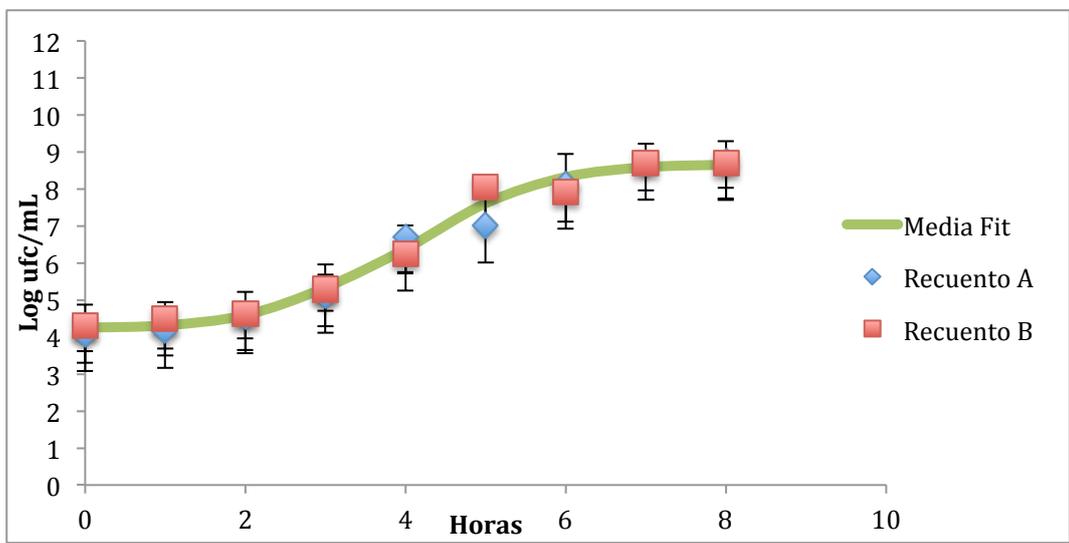


Figura 11. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB centrifugado con una población inicial de 10^3 ufc/mL.

La figura 12 muestra los resultados recogidos del crecimiento de *C. sakazakii* durante de 8 horas a 37°C y con un nivel de población inicial de 10^9 ufc/mL. El crecimiento comienza con una población de $9,8 \pm 0,02$ Log ufc/mL, alcanzando un máximo de $10,03 \pm 0,02$ Log ufc/mL a las 8 horas. En esta curva podemos observar un ligero incremento $1,11 \pm 0,02$ Log de ufc/mL, que se inició a partir de la segunda hasta la quinta hora.

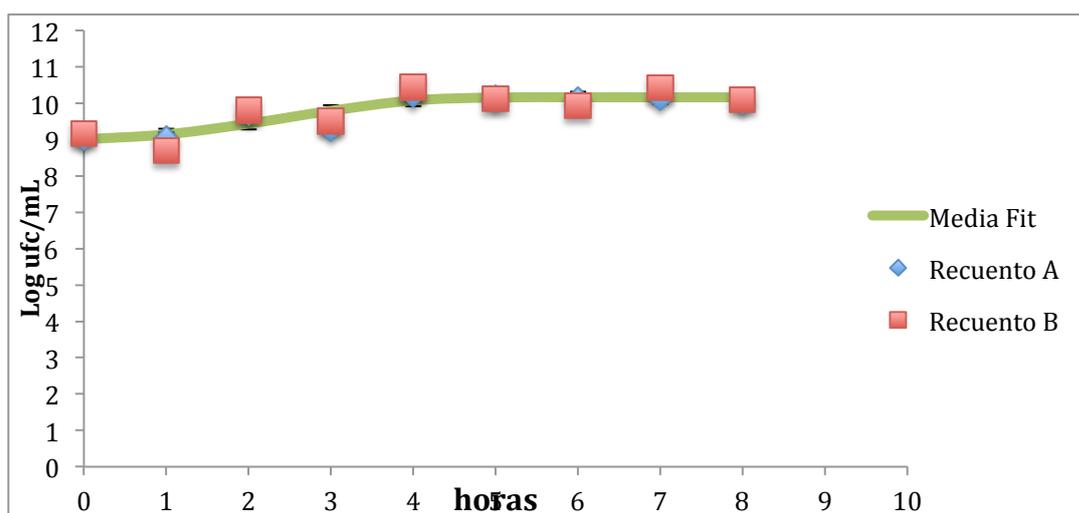


Figura 12. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB centrifugado con una población inicial de 10^9 .

5.1.3. TSB concentrado

En las imágenes 13 y 14 se exponen los resultados del crecimiento de *C. sakazakii* en medio TSB concentrado sin previo crecimiento (C) y TSB con sobrenadantes concentrado y reconstituido con TSB normal (MC S9), e inoculado con 10^3 ufc/mL.

En la figura 13 se recogen los datos obtenidos del crecimiento de *C. sakazakii* a lo largo 9 horas incubación en TSB concentrado sin previo crecimiento. El crecimiento de *C. sakazakii* se inició con una población de $2,2 \pm 0,02$ Log ufc/mL a las 0 horas y alcanzando un valor máximo de población de $5,1 \pm 0,25$ Log ufc/ml a las 9 horas. El incremento total en 9 horas de incubación fue de $2,0 \pm 0,21$ Log ufc/mL.

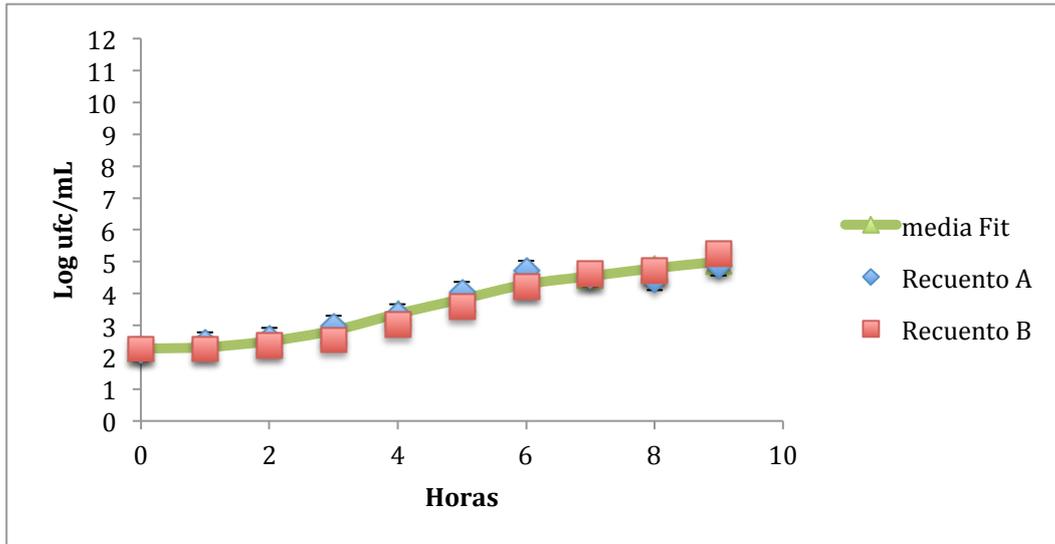


Figura 13. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB sin crecimiento concentrado

Finalmente, en la figura 14, se pueden observar los valores obtenidos relativos al crecimiento de *C. sakazakii* en sobrenadantes (que previamente alcanzó un crecimiento de 10^3 ufc/mL) concentrado y reconstituido con medio TSB normal. Como podemos observar en la mencionada figura la población de *C. sakazakii* se observó un ligero incremento durante la primera hora de incubación ($0,81 \pm 0,23$ Log ufc/m) para posteriormente mantener prácticamente sin cambios ($0,26 \pm 0,02$ Log ufc/mL) durante las primeras 6 horas de incubación, a partir de este tiempo se observa un incremento en la población microbiana hasta de $3,3 \pm 0,08$ Log ufc/mL. El incremento total en 9 horas de incubación fue de $4,4 \pm 0,04$ Log ufc/mL.

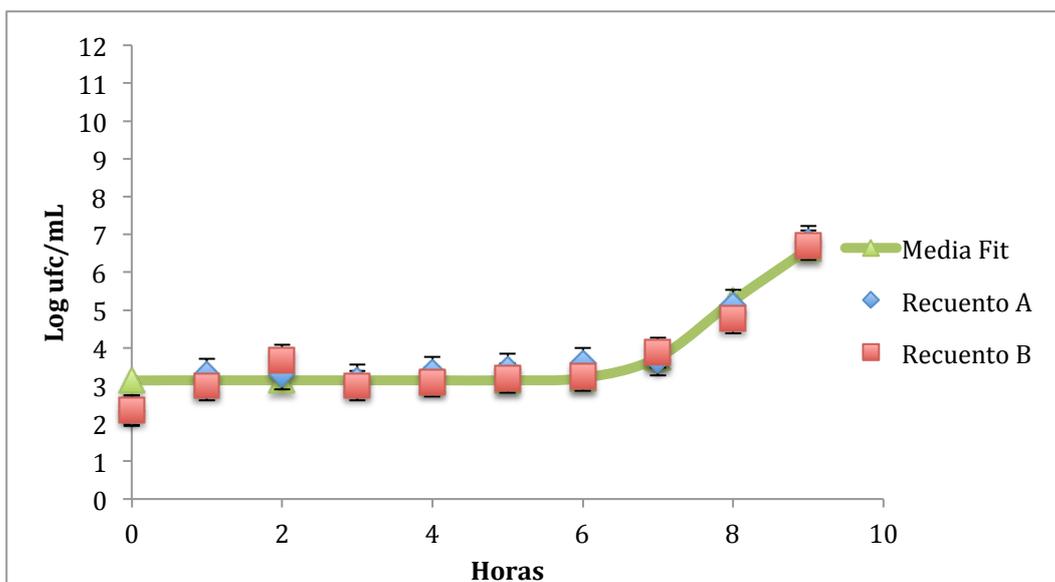


Figura 14. Crecimiento de *C. sakazakii* en TSB con una población de 10^9 concentrado

5.2. Parámetros de crecimiento en las distintas condiciones

La tabla 1 muestra los valores ajustados de las poblaciones iniciales y finales, periodo de latencia, velocidad máxima, R^2 y DS de las curvas obtenidos mediante el programa Combase predictor <http://browser.combase.cc/DMFit.aspx>. Aparecen representados los valores obtenidos en las diferentes muestras realizadas por duplicado. En la tabla podemos observar que teniendo en cuenta el mismo nivel de inóculo la velocidad de crecimiento de *C. sakazakii* fue prácticamente similar (valor medio $1,15h^{-1}$) para las dos condiciones de crecimiento TSB sin ninguna modificación que para el centrifugado. Respecto al crecimiento de estos microorganismos, la velocidad de crecimiento fue superior en el medio TSB que contenía sobrenadante (TSBCS $\mu=1.50 h^{-1}$) que en el medio TSB que no contenía sobrenadante (TSBC $\mu=0,50 h^{-1}$). Sin embargo, la fase de latencia fue hasta 3 veces superior en el medio TSBCS versus TSBC. Estas diferencias se han podido también observar en las curvas de crecimiento anteriormente comentadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos el centrifugado no influye en la cinética de crecimiento microbiano de *C. sakazakii*, a dos niveles de concentración. Sin embargo, comparando los resultados de las curvas de crecimiento y los parámetros calculados en cada una de las cinéticas de crecimiento de los medios concentrados, estos en primer lugar presenta una gran diferencia entre el medio TSB sin concentrar y el medio TSB concentrado. Además, podemos observar también diferencias entre el medio TSBC y el TSBCS, esto puede ser posible a la posible presencia de comunicadores bacterianos, pero se requieren más estudios para poder conocer la causa.

Tabla 1: Valores ajustados de las poblaciones iniciales y finales, periodo de latencia, velocidad máxima, R2 y DS de las curvas obtenidos mediante el programa							
	Xt	Xi	λ	μ	Xf	R	
	ufc/ mL	Log ufc/mL	$h^{-1} \pm DS$	$h^{-1} \pm DS$	Log ufc/mL	R^2	DE
TSB sin modificación	10^3	3,86±0,14	2,03 ±0,22	1,61±0,17	8,67 ±0,12	0,992	0,20
		3,78±0,13	1,26 ±0,22	0,88±0,04	8,7 ±0,13	0,996	0,12
	10^9	8,82±0,23	0,39±2,10	0,22±0,09	10,16±0,24	0,787	0,24
		8,75±0,29	1,17±1,17	0,64±0,41	10,26±0,15	0,779	0,32
TSB centrifugado	10^3	4,07±0,19	1,76±0,40	0,99±0,11	8,80 ±0,23	0,984	0,24
		4,42±0,21	2,44±0,42	1,32±0,25	8,53 ±0,21	0,971	0,32
	10^9	9,02±0,26	0,75±1,64	0,31±0,18	10,13±0,14	0,706	0,27
		8,99±0,33	1,20 ±1,80	0,42±0,43	10,19±0,18	0,6	0,37
TSB concentrado	10^3 C	2,34±0,14	2,08 ±0,54	0,60±0,11	4,66 ±0,11	0,966	0,19
		2,20±0,11	2,10 ±0,46	0,46 ±0,03	-	0,982	0,15
	10^3 CS	3,20±0,14	6,78±0,37	1,56±0,33	-	0,906	0,38
		3,08 ±0,15	6,69± 0,39	1,51 ±0,32	-	0,901	0,39

Xt: población teórica; **Xi:** población inicial ajustada; λ : fase de latencia (horas); μ : fase exponencial (horas); **Xf:** población final ajustada; DS: Desviación Estándar; TSB CS: TSB concentrado con sobrenadante

5.3 Detección de n-acil homoserina lactonas

En los cromatogramas de los extractos de los caldos de cultivo a las 8 horas de incubación con independencia de las condiciones de tratamiento no se detectaron más n-acil homoserina lactonas que el estándar interno n-heptanoil homoserina lactona. El estándar interno se añadió a los caldos en una concentración de 3,3 ppm (o 16 μ M) y fue detectado sin problemas. El método utilizado tiene un límite de detección mayor a 0,1 ppm (aproximadamente 0,6 μ M). Por lo tanto, cabe concluir que las cantidades de n-acil-homoserina lactonas producidas por la bacteria estudiada en las condiciones utilizadas (considerando los distintos medios) y a las 8 horas de incubación fueron inferiores al límite de detección del medio. Por lo tanto el método, que ha sido probado con éxito con otras bacterias y condiciones [30], no serviría para detectar estos compuestos en las condiciones de este estudio por

formarse en menores condiciones a las detectables o porque existen otros exista otros tipos de comunicadores que actúen bajo esta condiciones

Otra posibilidad de no haberlas encontrado, aunque remota, es que se hubiesen perdido esos compuestos durante su extracción pudiendo atribuir esa pérdida al proceso de filtración por membrana de 0,45 mm previo a la inoculación del estándar interno por algún proceso de adsorción de las n-acil homoserina lactonas en los grupos funcionales de las membranas de filtración. Aunque esta posibilidad parece poco probable se debería comprobar, filtrando después de la adición del estándar interno y comprobando si la filtración tiene algún efecto sobre su recuperación.

En la figura 15 se muestran los cromatogramas (modo SCAN arriba y modo SIM, m/z 143, en medio) obtenidos a partir del estándar interno n-heptanoil-homoserina lactona. Además se muestra el espectro en la parte de abajo el espectro obtenido del pico correspondiente al estándar interno (tiempo de retención 10,75 minutos).

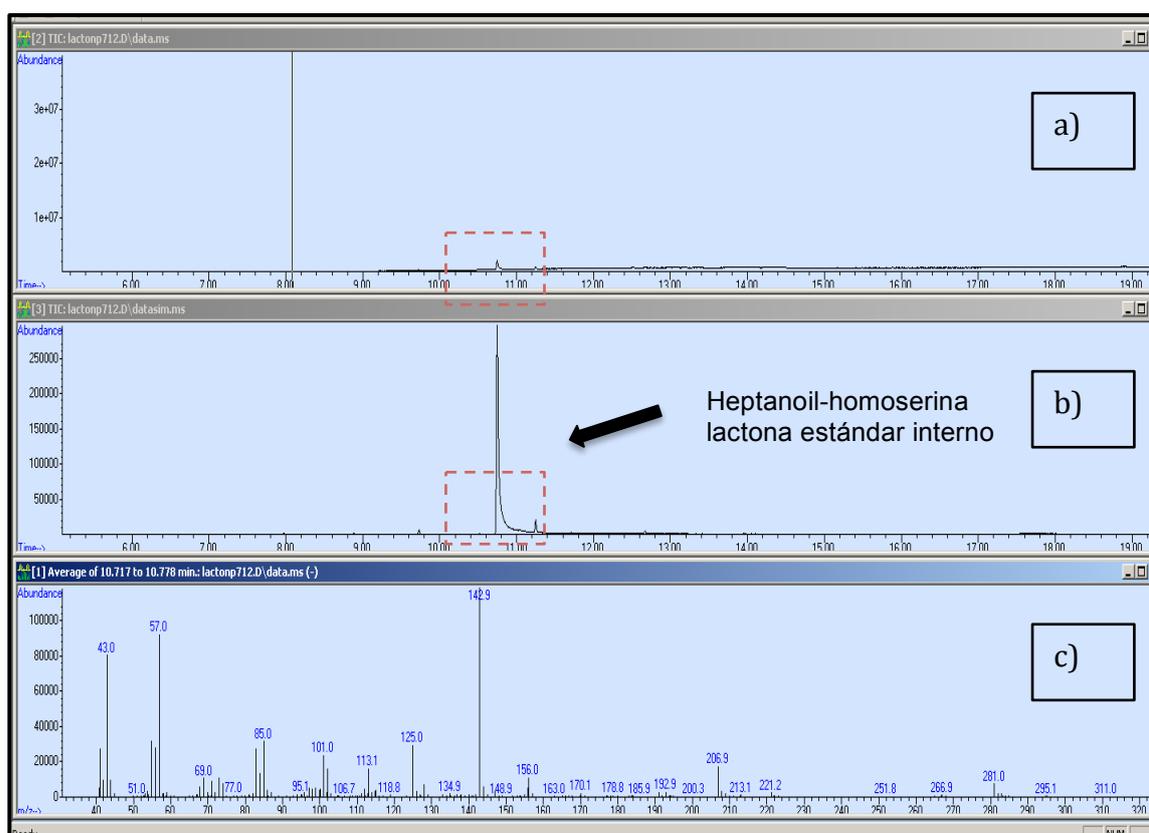


Figura 15. Cromatogramas obtenidos del análisis del estándar interno (1,5 mg/ml de metanol) y su espectro de masas. a): cromatograma en modo SCAN (40-350 m/z); b): el cromatograma en modo SIM (143 m/z); c) el espectro de masas obtenido del pico correspondiente al estándar interno (tiempo de retención 10,75 min).

En la Figura 16 se muestran los cromatogramas (modo SCAN arriba y modo SIM, m/z 143 abajo) obtenidos a partir de una muestra de caldo de cultivo de TSB concentrado a partir de un cultivo con una población de 10^9 ufc/mL después de 8 horas de incubación (Figura 14) y el espectro de masas obtenido a partir pico correspondiente al estándar interno (minuto 10,74).

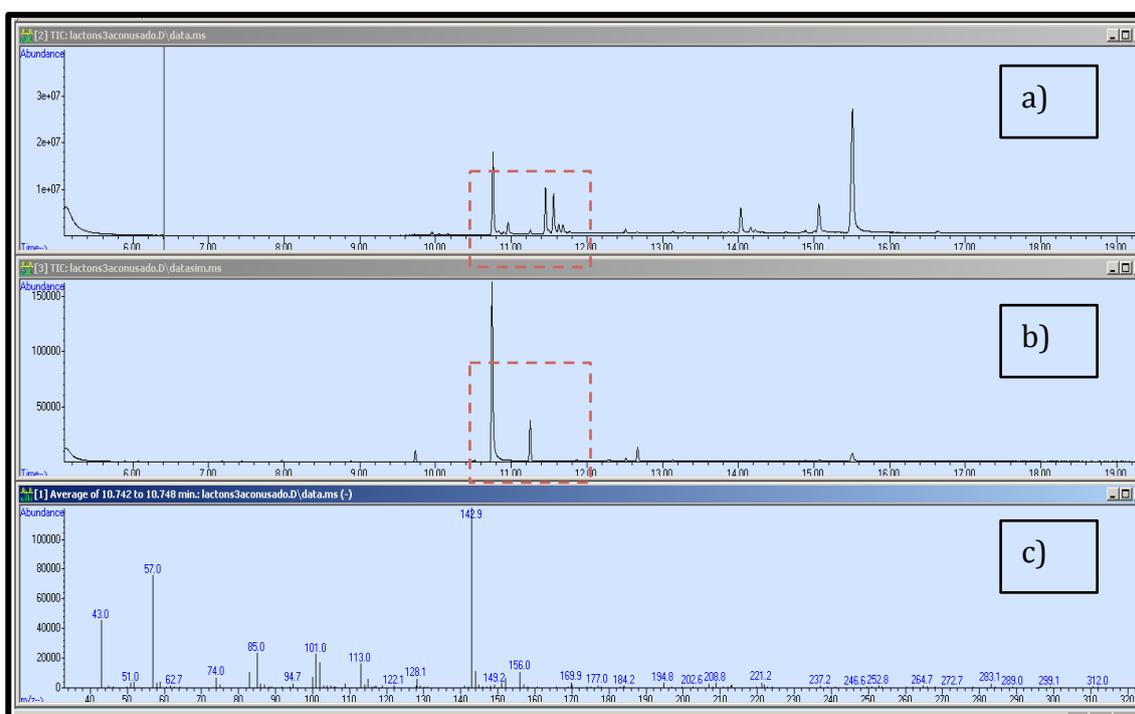


Figura 15. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra obtenida a partir de un cultivo de TSB concentrado 10^9 ufc/mL después de 8 horas de incubación. **a)** cromatograma en modo SCAN (40-350 m/z); **b)** el cromatograma en modo SIM (143 m/z); **c)** el espectro de masas obtenido del pico correspondiente al estándar interno (tiempo de retención 10,75 min).

También a modo de ejemplo en la Tabla 2 se muestra la relación de compuestos detectados en el cromatograma de la muestra correspondiente a la Figura 16, identificados a partir de sus espectros de masas. Estos datos constituyen un ejemplo de lo obtenido con los análisis cromatográficos de todas las muestras analizadas. A partir de ellos se puede evidenciar que no se detectaron n-acil-homoserina lactonas más allá del estándar interno (min 10,75). Por el contrario se detectaron principalmente metil ésteres de ácidos grasos y dipéptidos cíclicos. Estos dipéptidos están relacionados con el mecanismo del QS [48] pero la interpretación de su presencia se sale de las pretensiones de este estudio.

Tabla 2: Relación de compuestos detectados en el cromatograma		
Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área de pico
Metil tetradecanoato	9,731	5027719
Desconocido	9,956	14957273
Desconocido	10,169	3351296
Heptanoil-homoserina lactona estándar interno	10,758	281328708
Desconocido	10,959	44397689
Metil hexadecanoato	11,248	23005724
Ciclo-leucil-prolil-diquetopiperacina (Cyclo -Leu-Pro) isómero 1*	11,453	136941852
Ciclo-leucil-prolil-diquetopiperacina (Cyclo -Leu-Pro) isómero 2	11,556	109805956
Ciclo-leucil-prolil-diquetopiperacina (Cyclo -Leu-Pro) isómero 3	11,629	25060638
Metil octadecenoato	12,512	28142360
Metil octadecanoato	12,668	13449663
L-fenilalanina diquetopiperacina (Cyclo -Phe-Pro) isómero 1**	14,031	49931116
L-fenilalanina diquetopiperacina (Cyclo -Phe-Pro) isómero 2	14,159	11036627
L-fenilalanina diquetopiperacina (Cyclo -Phe-Pro) isómero 3	15,061	62741466
L-fenilalanina diquetopiperacina (Cyclo -Phe-Pro) isómero 4	15,495	326724789

* Nombre completo en inglés: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-

** Nombre completo en inglés: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado por un lado, el crecimiento de *C. sakazakii* en un medio TSB preparado a distintas condiciones, sin modificar, centrifugado, concentrado y en un sobrenadante reconstituido con el medio de cultivo normal (2:8) y por otro lado, ha comprobado el funcionamiento de un método de detección para autoinductores a partir de medio de crecimiento obteniéndose las siguientes conclusiones:

- No se observó efecto de la centrifugación sobre el crecimiento de *C. sakazakii*, porque cuando comparamos los parámetros de crecimiento (λ , μ) de ambas curvas estos son muy similares.
- En el estudio del crecimiento de *C. sakazakii* en el medio concentrado sin sobrenadante y con sobrenadante se observan diferencias entre las dos cinéticas de crecimiento, especialmente en la fase de latencia (λ) que fue hasta 3 veces mayor para el medio concentrado que contenía un sobrenadante *versus* medio concentrado sin sobrenadante

- c) Respecto a la detección de autoinductores se ha podido comprobar el adecuado funcionamiento del método a través de la Cromatografía de Gases. Sin embargo, no se ha podido detectar las N-acil-homoserina lactonas responsables del mecanismo de QS en *C. sakazakii* en las condiciones estudiadas en este trabajo.
- d) Finalmente, al analizar los cromatogramas de las muestras se han encontrado dipéptidos cíclicos de leucina-prolina y fenilalanina-prolina que podrían estar también relacionados con el mecanismo del QS como inhibidores o inductores del mismo
- e) Se requieren más estudios para conocer la implicación de los mencionados compuestos en el mecanismo QS.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Skovgaard N. New trends in emerging pathogens. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(3):217-24
2. Cleaveland S, Haydon DT, Taylor L. Overviews of pathogen emergence: which pathogens emerge, when and why?. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:85-111
3. Farmer J.J., Asbury M.A., Hickman F.W, Brenner D.J. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980;30: 569–584.
4. Clark A.G, Szumski F.M, Bell K.A, Keith L.E, Houtz S, Merriwether, D.A. Direct and correlated responses to artificial selection on lipid and glycogen contents in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res (Camb.)* 1990;56:49-56
5. Friedeman, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.* 2007;116: 1–10.
6. Forsythe, J.S. New Insights into the Emergent Bacterial Pathogen *Cronobacter*, In *Food Safety; Emerging Issues, Technologies and Systems*. Eds, Steven C. Ricke, Janet R. Donaldson and Carol A. Phillips, Academic Press. Elsevier. London. 2014
7. Castro J, Gomez CA, Rangel E. *Cronobacter sakazakii*. 2005.
8. Kucerova E, Clifton S.W, Xia X.-Q, Long F, Porwollik S, Fulton L, et al. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS One* 5, e9556.
9. Kucerova E, Joseph S, Forsythe S. The *Cronobacter* genus: ubiquity and diversity. *Qual. Assur. Saf. Crops Food* 2011;3:104–122.
10. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Food Saf.* 2011;1
11. Zhao Z, Wang L, Wang B, Liang H, Ye Q, Zenga M, 2014. Complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* strain CMCC 45402. *Genome Announc.* 2, e01139-13.
12. Iversen C, Forsythe S.J. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.* 2004;21, 771–776.
13. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. 2007;17:7-64

14. Grimm M, Stephan R, Iversen C, Manzardo G, Rattei T, Riedel K, et al. Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. J. Food Prot. 2008;71:13-18.
15. Block C, Braden C, Buchanan R, Carlos C, Cole M, Forsythe S, et al. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes. 2005
16. Forsythe S.J, Dickins B, Jolley K.A, Cronobacter, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. BMC Genomics 2014;15, 1121.
17. Santos R.F.S, Da Silva N. Amstalden Junqueira, V.C. Kajsik M, Forsythe, S., Pereira J.L. Screening for cronobacter species in powdered and reconstituted infant formulas and from equipment used in formula preparation in maternity hospitals Annals of Nutrition and Metabolism 2013;63(1-2):62-68
18. Harris L.S, Oriel P.J, Heteropolysaccharide produced by *Enterobacter sakazakii*. United States Patent number 1989;4:806-636.
19. Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci. Technol. 2003;14:443–454.
20. Elika.net. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria [sede Web] [actualizada 28 de Febrero de 2013; citado 15 jun de 2017]
Disponible en:
http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento88/Copia%20de%2010.Cronobacter.pdf
21. Townsend S.M, Hurrell E, Gonzalez-Gomez I, Lowe J, Frye, J.G., Forsythe, et al. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. Microbiology 2007;153:3538–3547.
22. Townsend S, Hurrell E, Forsythe S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with neonatal intensive care unit outbreak. BMC Microbiol.2008;8:64.
23. Kim K, Kim K.P, Choi J, Lim J.A, Lee J, Hwang S, Ryu S, Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:5188–5198.
24. Gallardo Nelson MJ. Búsqueda del regulón “Quórum Sensing” de *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante estudios proteómicos y determinación del efecto del fe²⁺ sobre las AHLs producidas por la bacteria. [tesis doctoral]. Chile: departamento de bioquímica y biología molecular, Universidad de Chile; 2009.

25. Keller L. y M.G. Surette. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4:249-58.
26. Bassler B.L. Small talk Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 2002;109:421-4.
27. Nealson K.H, Platt T, y J.W. Hastings. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 1970;104:313-22.
28. Waters C.M. y B.L. Bassler. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005;21:319-46.
29. Rosselló GA, Bouza JM. Quorum Sensing en bacterias y levaduras. *Med Clin (Barc).* 2013;141(8):353–357
30. Cataldi T, Bianco G, Palazzo L, Quaranta V. Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2007;361:226–235.
31. L. Gram, L. Ravn, M. Rasch, J.B. Bruhn, A.B. Christensen, M. Givskov, Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* 2002;78:79–97.
32. W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg, Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR–LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators, *Rev. Microbiol.* 1996;50:721–751.
33. Gonzalez J.E, Marketon M. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *MMBR.* 2003;67(4):574-592
34. Araújo F.D, Esper L.M, Kuaye A, Sircili M, Marsaioli A. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60: 585–592.
35. Eberhard, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 1972;109:1101-5.
36. Kaplan H.B. y E.P. Greenberg. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 1985;163:210-4.
37. Whitehead, N.A., y cols. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001;25:365-404.
38. González, J.E. y M.M. Marketon. Quorum sensing in nitrogen-fixing *rhizobia*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003;67:574-92.
39. Marketon, M.M., y cols. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* 2002; 184:5686- 95.
40. Hartmann A, Schikora A. Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. *J Chem Ecol.*

2012;38:704–13.

41. More, M.I., y cols. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*. 1996;272:1655-8.
42. Eglund KA, Greenberg EP. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. *J Bacteriol*. 2001;183:382–6.
43. Cataldi T, Bianco G, Frommberger M, Schmitt-Kopplin PH. Direct analysis of selected N-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *RCM*. 2004;18:1341–1344
44. Cataldi T, Palazzo L, Quaranta V. Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Biochem* 2006;361:226-235.
45. Chen, CY, Nace y Irwin, PL. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol. Methods* 2003;55:475-479
46. Fernández I. Estudio sobre el comportamiento de bacterias patógenas entéricas vehiculadas por alimentos [tesis doctoral]. Valladolid: departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Universidad de Valladolid; 2015.
47. Baranyi, J y Roberts, TA. Mathematics of predictive food microbiology. *Int J food Microbiol* 1995;26:199-218.
48. Durai S, Vigneshwari L, Balamurugan K. 2013. *Caenorhabditis elegans*-based in vivo screening of bioactives from marine sponge-associated bacteria against *Vibrio alginolyticus*. *J App Microbiol*.115, 1329--1342

8. ANEXO 1

imágenes obtenidas durante el desarrollo de experimento:

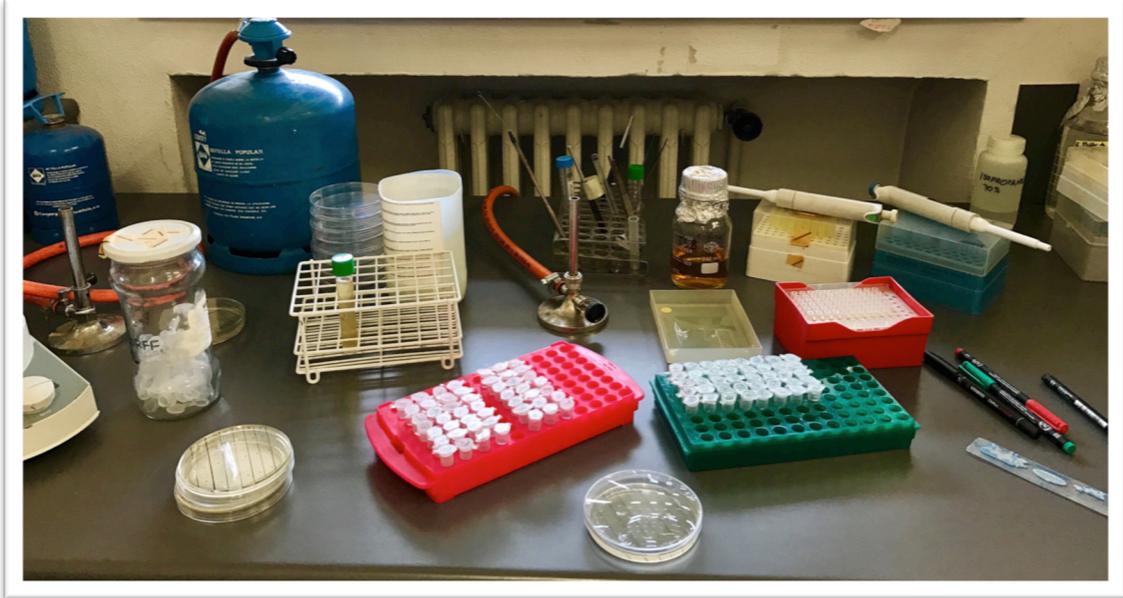


Figura 1: Materiales de trabajo

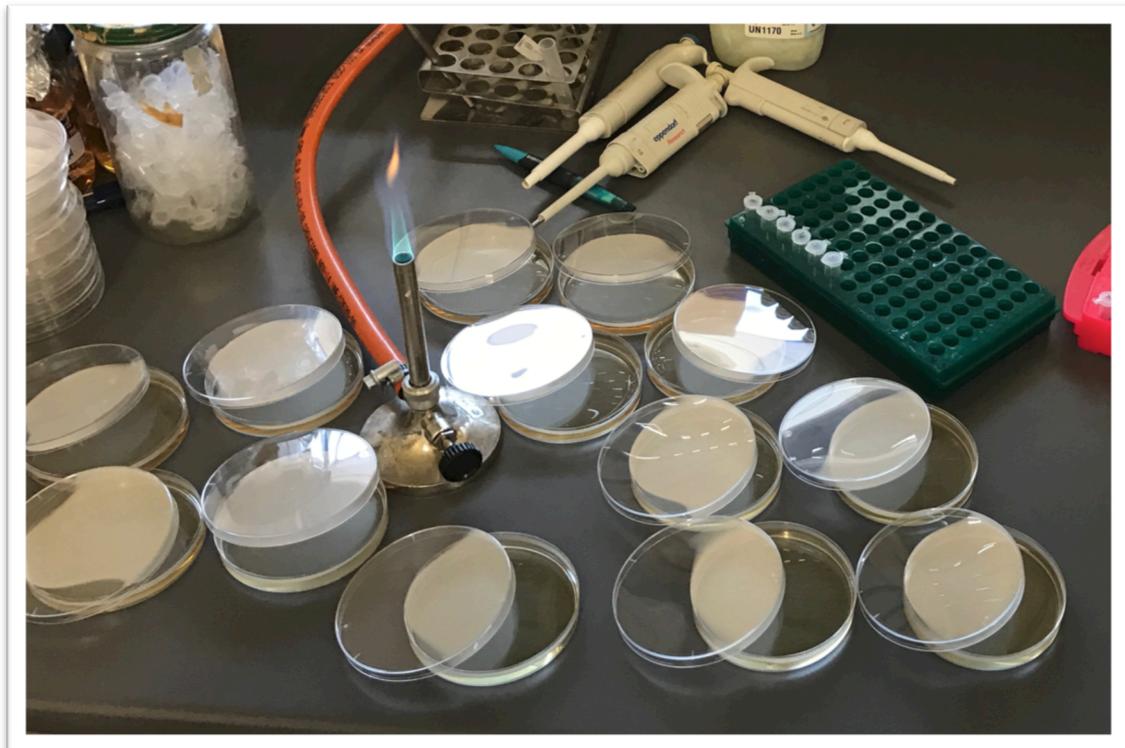


Figura 2: Placas para cultivo

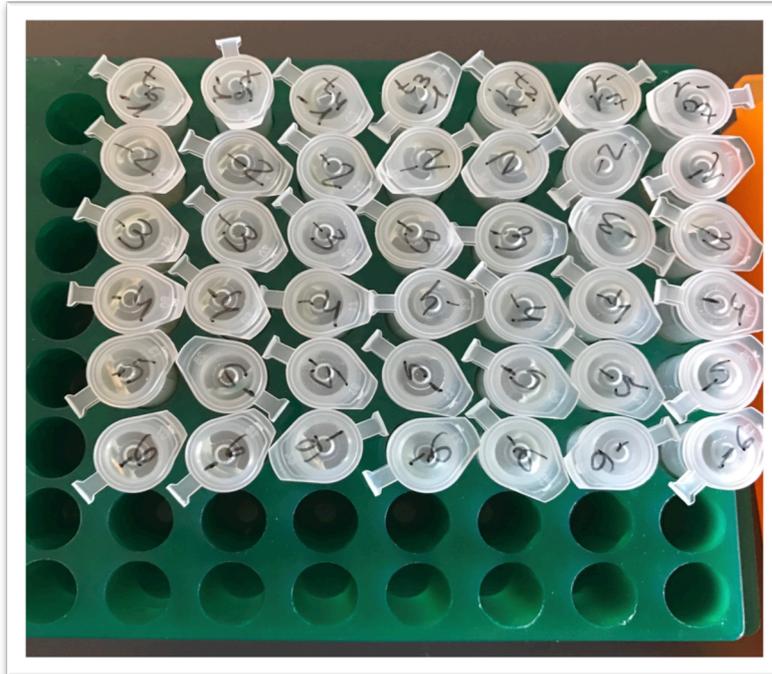


Figura 3: Obtención de las diluciones para la siembra con una población inicial de 10^9 ufc/mL.



Figura 4: Obtención de las diluciones para la siembra con una población inicial de 10^3 ufc/mL.

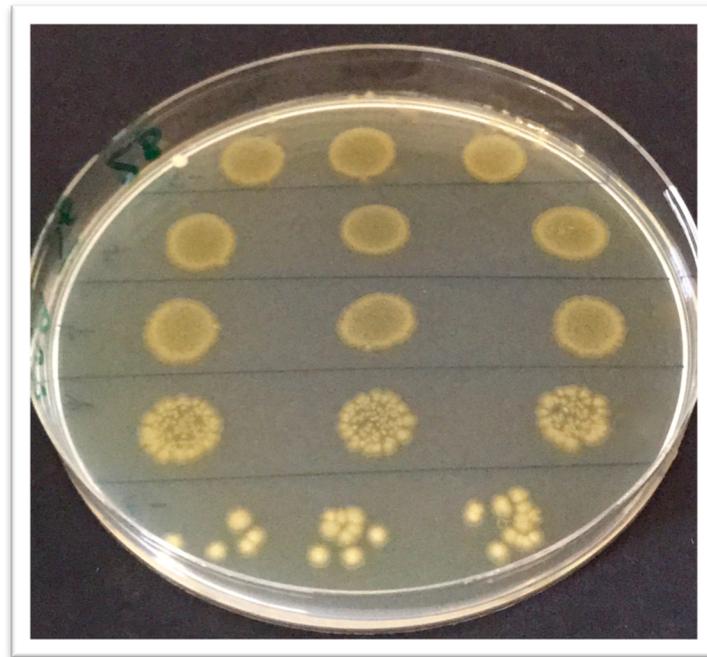


Figura 5: Recuento de *Cronobacter sakazakii* en agar triptona de soja después de 24 horas de cultivo a 37°C.

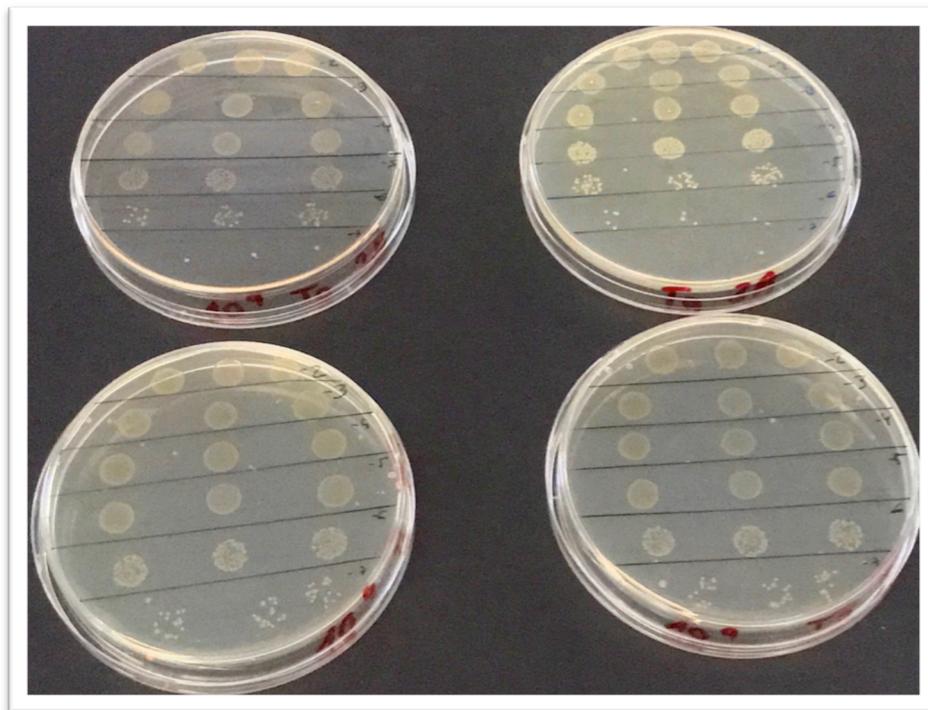


Figura 6: ejemplo del crecimiento de *C. sakazakii* con una población inicial de 10^9 ucf/mL, a las 24 horas

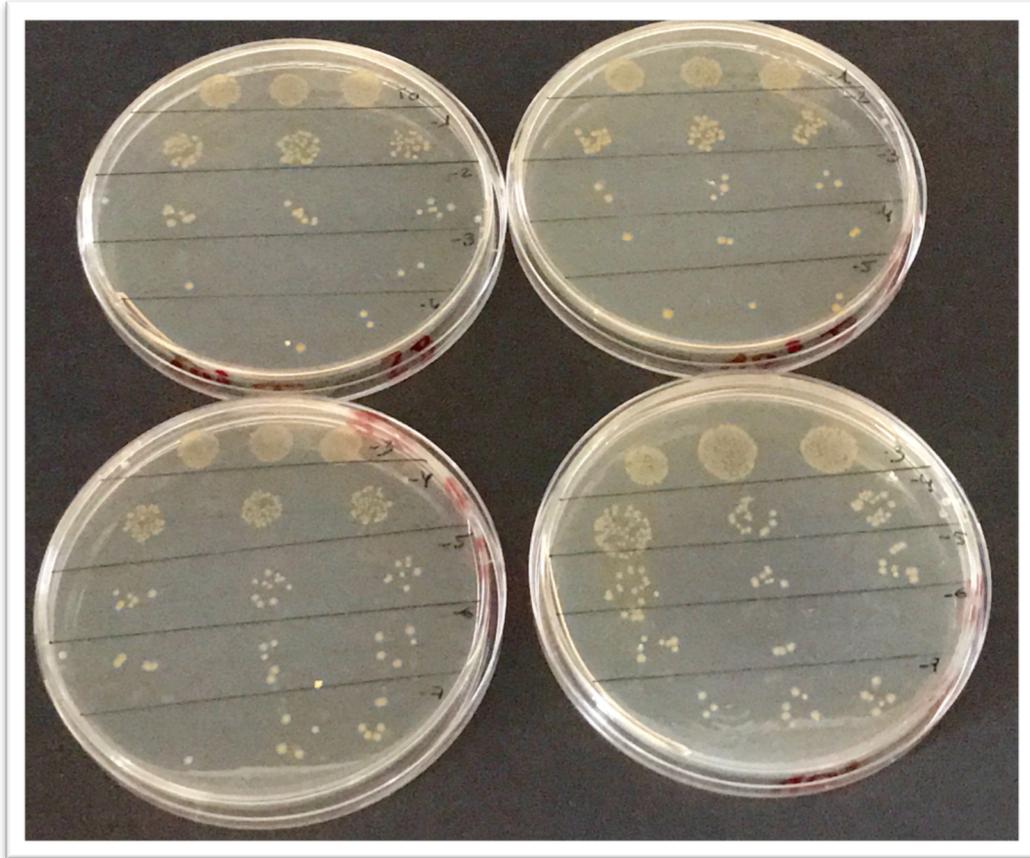


Figura 7: ejemplo del crecimiento de *C. sakazakii* con una población inicial de 10^3 ucf/mL, a las 24 horas



Figura 8: Centrifuga empleada para la obtención del medio de cultivo TSB centrifugado



Figura 9: Rotavapor empleado para la obtención de el medio de cultivo y el sobrenadante concentrado

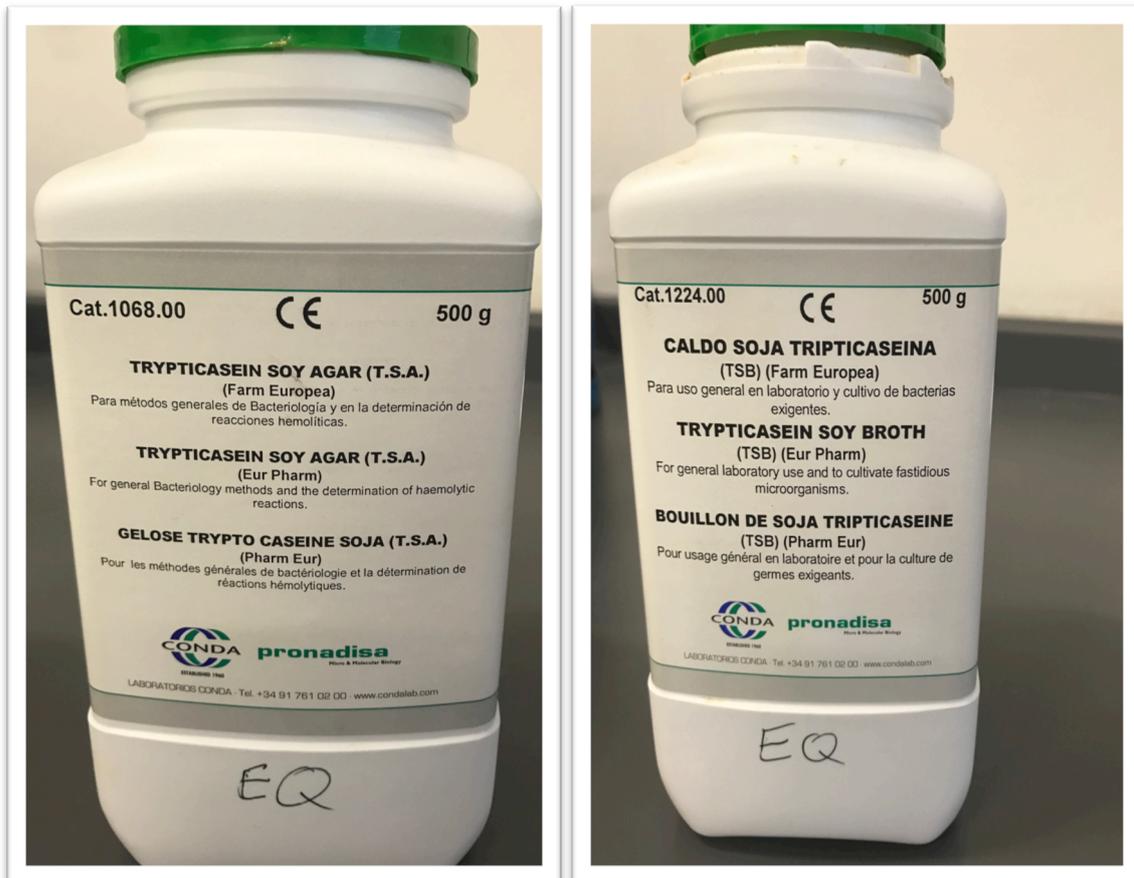


Figura 9: medios de cultivo empleados en este experimento