



Participación del Glutamato en la Adaptación Osmótica de *Pseudomonas aeruginosa*

¹Tortone, C. A.; ²Lucchesi, G. I.

¹Microbiología Especial y Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam.

²Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, UNRC.

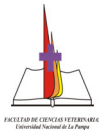
RESUMEN

En este trabajo se propuso evaluar la acción del glutamato como osmoprotector exógeno en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* crecidos en condiciones hiperosmolares. La adición de glutamato exógeno, a partir de una concentración 0,1mM, confiere osmoprotección cuando esta bacteria crece en presencia de NaCl, con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El efecto se pone de manifiesto por la disminución del tiempo de latencia, sin variaciones en el tiempo de generación. A diferencia del comportamiento observado con glutamato, la adición de colina como osmoprotector externo, disminuye ambos parámetros de crecimiento. Si glutamato y colina se suplementan simultáneamente a cultivos hiperosmolares, *P.aeruginosa* incorpora ambos compuestos y se observa un efecto sinérgico, con disminución del tiempo de latencia y el tiempo de generación. Ello demuestra que estos osmoprotectores no se excluyen mutuamente. En *P. aeruginosa* el transporte de glutamato responde a la alta fuerza osmótica, siendo dependiente del estado energético de la célula y de la síntesis de nuevas proteínas. El estudio de metabolitos intracelulares obtenidos luego de incubar las células en condiciones hiperosmolares en presencia de [14C] glutamato, mostró que, una vez incorporado, este metabolito no se acumula como tal. El análisis del contenido intracelular por HPLC y 13C-NMR revela la presencia de N-acetilglutaminil-glutamina amida (NAGGA) y confirma que el glutamato adicionado exógenamente actúa como precursor de este dipéptido. La identificación por 13C-NMR de los solutos compatibles acumulados cuando *P. aeruginosa* crece hasta fase logarítmica en condiciones hiperosmolares con glutamato 1 mM, mostró la presencia de glutamato, NAGGA y trealosa. En base a estos resultados es posible atribuir al glutamato una doble función: actuar como un mediador químico y como un osmolito genuino.

Palabras claves: osmoadaptación, *Pseudomonas aeruginosa*, glutamato, osmoprotector

SUMMARY

In this work is intended to evaluate the action of the glutamate as exogenous osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa* grown under osmotic stress conditions. The addition of exogenous glutamate, starting from a concentration 0,1mM, confers osmotic tolerance when this bacterium grows in presence of NaCl, with glucose and ammonium as carbon and nitrogen sources, respectively. The effect shows for the decrease significantly the lag period of growth, without variations in the time of generation. Contrary to the observed behavior with glutamate, the addition the choline like external osmoprotectant, it diminishes both parameters of growth. If glutamate and choline are simultaneously present in growth medium can be observed a synergist effect,



P. aeruginosa incorporates both compounds with decrease of the lag period growth and the time of generation. It demonstrates that these osmoprotectants is not excluded mutually. In *P. aeruginosa* the glutamate uptake responds to a hyper-osmotic upshock, being dependent of the energetic state of the cell and of the synthesis of new proteins. The study of intracellular metabolites obtained after incubating the cells under conditions hyperosmotic in presence of [¹⁴C] glutamate, it showed that, once incorporate, this metabolite doesn't accumulate as itself. The analysis of the intracellular contained for HPLC and ¹³C-NMR reveals the presence of N-Acetylglutaminyglutamine amide (NAGGA) and it confirms that the exogenous glutamate acts as precursor of this dipeptide. The identification for ¹³C-NMR of the accumulated compatible solutes in stressed cells of *P. aeruginosa* grows until logarithmic phase under hiperosmotic conditions with the addition of 1 mM glutamate; it showed the presence of glutamate, NAGGA and trehalose. According to these results is possible to attribute the glutamate a double function: to act as a chemical mediator and as a genuine osmolite.

Key words: osmoadaptation, *Pseudomonas aeruginosa*, osmoprotectant, glutamate.

INTRODUCCIÓN

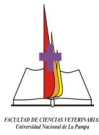
Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo, patógeno oportunista que causa infecciones importantes en huéspedes que tienen un sistema de defensa dañado como resultado de una enfermedad subyacente o un tratamiento específico. Se considera una de las bacterias gramnegativas no fermentadoras que más frecuentemente causa infecciones en pacientes hospitalizados, siendo responsable de producir septicemias, endocarditis, otitis, infecciones en la piel de quemados, a nivel del tracto urinario y respiratorio, heridas quirúrgicas, etc (Botzenhart y Döring, 1993).

En todas las especies animales *P. aeruginosa* es responsable de abscesos, diarreas, infecciones urinarias, genitales, respiratorias y de heridas. Como ejemplo, en caninos y felinos se han descrito otitis externa, conjuntivitis, infecciones urinarias, óseas, muerte perinatal, prostatitis, piómetra, infecciones y septicemias postquirúrgicas; en yeguas, asociada a *Klebsiella pneumoniae* produce metritis e infertilidad, infecciones oculares, abscesos pulmonares, aborto; en bovinos, mastitis, aborto, artritis, infecciones en piel; en cerdos enteritis y procesos respiratorios (Stanchi, 2005).

La ubicuidad y versatilidad que posee esta bacteria le ofrecen la capacidad de adaptarse a distintos medios nutricionales, de tal forma que es capaz de utilizar una gran variedad de sustancias como nutrientes para rendir energía y permitir su crecimiento. Esta flexibilidad implica que *P. aeruginosa* percibe el ambiente y responde ajustando el nivel de expresión de sus genes en respuesta a señales producidas por cambios en la osmolaridad, temperatura, pH, calcio, hierro u oxígeno (Botzenhart y Döring, 1993).

Las características que presentan los pulmones de pacientes que padecen fibrosis quística (viscosidad, mucus deshidratado, células rotas, electrolitos) ayudan a vincular la adaptación de *P. aeruginosa* al estrés osmótico con su patogenicidad (D'Souza Ault et al., 1993).

Se ha descrito para distintas bacterias patógenas, tanto gramnegativas como grampositivas, la relación entre condiciones estresantes debido a la alta osmolaridad y la virulencia. Factores que contribuyen a una infección exitosa están involucrados en estrategias complejas de respuesta al estrés osmótico y se suman a los factores de virulencia "verdaderos": toxinas, enzimas de difusión, etc (Sleator y Hill, 2002).



La exposición de células a la hiperosmolaridad causa una disminución tanto en el contenido de agua interno como en la presión de turgencia, lo que lleva a una reducción del volumen citoplasmático. Como consecuencia, las concentraciones de los metabolitos intracelulares se incrementan pudiendo ser perjudiciales para los procesos celulares. Generalmente para proliferar en un medio con alta fuerza osmótica, el microorganismo responde aumentando las concentraciones de un limitado número de solutos. Estas moléculas que se acumulan en el citoplasma no son inhibitorias de los procesos celulares y se denominan solutos compatibles, (Csonka, 1989; Welsh, 2000). Entre ellos los principales descriptos son: polialcoholes (azúcares, glicerol), aminoácidos (glutamato, prolina), derivados de aminoácidos (glicina-betaína, ácido gamma-aminobutírico), péptidos (N-acetilglutaminilglutamina amida), metilaminas y urea (Csonka, 1989; Smith y Smith, 1989; Welsh, 2000). Esta acumulación intracelular puede resultar tanto del aumento de la síntesis como del transporte desde el medio de cultivo (Csonka, 1989). Por ejemplo, en un gran número de especies bacterianas se ha descrito la acumulación intracelular de glicina-betaína cuando se adiciona exógenamente al medio de crecimiento hiperosmolar que contiene fuentes de carbono y nitrógeno preferenciales (Csonka y Hanson, 1991).

Se han discutido roles alternativos para estos solutos compatibles, como constituir reservas intracelulares de carbono, nitrógeno y energía, o como metabolitos del estrés, que estabilizan la estructura de las proteínas, más generalmente involucrados en proteger a la célula bacteriana contra otras condiciones estresantes del medio: desecación, calor o congelación (Welsh, 2000; Sleator y Hill, 2002).

Un soluto es considerado osmoprotector, cuando incrementa la velocidad de crecimiento de células osmóticamente estresadas una vez adicionado al medio de cultivo (Csonka, 1989; Welsh, 2000).

Como respuesta a los cambios de turgencia, se ha descrito en bacterias patógenas, que el transporte primario de K^+ está regulado positivamente por a la alta fuerza osmótica, dando como resultado un aumento en la concentración intracelular del ión K^+ , la cual alcanza concentraciones proporcionales a la osmolaridad del medio de crecimiento. Concomitantemente al incremento de ión K^+ aumentan los niveles intracelulares de glutamato, siendo ambos compuestos los responsables de una respuesta primaria en células sometidas a alta fuerza osmótica. La concentración de glutamato de potasio es considerada una señal intracelular en respuesta al estrés osmótico que actúa sobre la regulación de genes involucrados en la respuesta adaptativa (Csonka, 1989; Sleator y Hill, 2002).

La acumulación de glutamato, ha sido observada en varias especies de bacterias crecidas en medios hiperosmolares sin la adición exógena de este aminoácido, lo que indica en estos casos, que el incremento de dicho aminoácido se debió a un aumento en su velocidad de síntesis (Csonka, 1989; McLaggan et al., 1990).

A pesar de las investigaciones realizadas hasta el momento (González et al., 1990; Helling, 1994), todavía no se ha establecido claramente cual es el camino de biosíntesis del glutamato que lleva a su acumulación en microorganismos crecidos bajo condiciones de estrés osmótico.

En *Klebsiella aerogenes* se ha demostrado que la actividad GDH (glutamato dehidrogenasa) es sensible al pH (pH óptimo: 8), y que la exposición al estrés osmótico resulta en una rápida salida de protones desde el citoplasma. Se propuso entonces que la alcalinización del citosol podría aumentar la actividad GDH lo que llevaría a un incremento de la síntesis de glutamato. En varias especies de bacterias gramnegativas y grampositivas también se ha observado que el ión K^+ a altas concentraciones estimula la actividad GDH, y se sugirió que la acumulación de este ión bajo condiciones



hiperosmolares es la señal regulatoria para la síntesis de glutamato (Wels, 2000; Sleator y Hill, 2002).

En *Streptococcus lactis* se mostró que hay una regulación entre la velocidad de incorporación de glutamato y glutamina y el pH citoplasmático. El transporte de glutamato se incrementa notablemente cuando el pH aumenta de 6 a 7,4 (Poolman et al., 1987).

Tanto en bacterias gramnegativas como en grampositivas, aún no se ha descrito si la incorporación de glutamato es sensible a la fuerza osmótica del medio de crecimiento. En *Escherichia coli*, sólo se ha observado que condiciones de hiperosmolaridad, producidas por la adición de altas concentraciones de sacarosa, estimulan el sistema de alta afinidad de glutamina, mientras que el sistema de baja afinidad no se ve afectado. Microorganismos afectados en su sistema de transporte, son incapaces de metabolizar glutamato (Gehring et al., 1990).

Se conoce que los solutos compatibles acumulados en un microorganismo varían según los osmoprotectores disponibles en el medio de crecimiento.

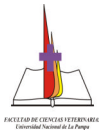
En cultivos de *P. aeruginosa* osmóticamente estresados crecidos en presencia de glucosa como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuentes de nitrógeno, se ha detectado la acumulación del dipéptido N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGA), de glutamato y trealosa. El compuesto dominante NAGGA fue previamente descrito en *Rhizobium meliloti* y *Pseudomonas fluorescens* (Smith y Smith, 1989) pero en estas especies el glutamato es el soluto más abundante. En *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense* no se ha encontrado este dipéptido y de cuatro especies de *Rhizobium* estudiadas sólo se ha descrito en *R. meliloti* (D'Souza Ault et al., 1993).

En *E. coli* y *R. meliloti* se ha observado que la ectoína (tetrahidropirimidina), un compuesto que exhibe propiedades osmoprotectoras semejantes a las de glicina-betaína, no se acumula intracelularmente. Por lo tanto no reprime la síntesis de solutos compatibles (glutamato, NAGGA, trealosa) pudiendo jugar un papel clave en provocar la síntesis de osmolitos endógenos actuando como un mediador químico (Talibart et al., 1994).

En varias experiencias se ha mostrado que colina, betaína o carnitina actúan como osmoprotectores, permitiendo el crecimiento de *P. aeruginosa* en un medio hiperosmolar que contiene succinato, cloruro de amonio y fósforo inorgánico como fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato respectivamente (Lisa et al., 1994; Lucchesi et al., 1995). Otros compuestos nitrogenados como dimetilglicina, acetilcolina y fosforilcolina fueron menos efectivos como osmoprotectores. Además se observó crecimiento bacteriano en medios hiperosmolares con colina o carnitina como únicas fuentes de carbono y nitrógeno. En estas condiciones ambos compuestos también actúan como osmoprotectores (Lisa et al., 1994; Lucchesi et al., 1995).

Bajo condiciones nutricionales iso e hiperosmolares en los cuales colina o carnitina están presentes como fuentes de carbono y nitrógeno, se ha observado la síntesis de tres actividades enzimáticas: acetilcolinesterasa (Che), fosfatasa ácida (Pasa) y fosfolipasa C (PLC) (Lucchesi et al., 1989; Lisa et al., 1994 y Lucchesi et al., 1995). A través de la acción coordinada de estas enzimas *P. aeruginosa* puede utilizar varios compuestos que pueden encontrarse en el hospedador (acetilcolina, del epitelio corneal; dipalmitoilfosfatidilcolina, de la sustancia surfactante del pulmón; fosfatidilcolina, que integra membranas celulares), lo que permitió explicar el asentamiento y mantenimiento de la infección producida por esta bacteria (Lisa et al., 1994).

Si colina o carnitina actúan únicamente como un osmoprotector, la síntesis de PLC, Pasa y Che no ocurre. En este caso, la patogenicidad de *P. aeruginosa* no puede ser



explicada por la sola acción de estas enzimas (Lisa et al., 1994; Lucchesi et al., 1995). Probablemente involucre otros factores de virulencia, controlados por la alta osmolaridad (Berry et al., 1989 y Deretic et al., 1990).

En medios hiperosmolares con alta concentración de fosfato y con colina o carnitina como fuente de carbono y nitrógeno o como osmoprotector, el metabolito acumulado es, principalmente betaína (Casale et al., 1994; Lucchesi et al., 1995).

En *P. aeruginosa* la adición de glicina-betaína como osmoprotector exógeno en medios de cultivo que contienen glucosa y amonio, conduce a la acumulación del mismo, si bien ello no implica la total desaparición de NAGGA, trealosa y glutamato. Esto demuestra que la acumulación de glicina-betaína modula los niveles intracelulares de los tres osmolitos endógenos (D'Souza Ault et al., 1993).

Utilizando una cepa mutante de *Salmonella typhimurium* deficiente en glutamato sintetasa, se ha demostrado que la acumulación de glutamato intracelular es necesario para el óptimo crecimiento de las células en medios hiperosmolares deficientes en NH_4^+ , pero no para la inducción del transporte prolina y glicina-betaína, y que el osmoprotector glicina-betaína aparentemente no puede sustituir al glutamato (Csonka et al., 1994).

Por otro lado se ha estudiado que cuando células de *Bacillus subtilis* son cultivadas en medios con altas concentraciones de ClNa o glicerol, adquieren tolerancia a la sal si se adiciona al medio glutamato o KCl , como osmoprotectores, y se acumula glutamato y K^+ en el citoplasma (Ikeuchi et al., 2003).

En función de los antecedentes citados, en este trabajo se pretendió conocer si la adición de glutamato exógeno confiere o no protección a células de *P. aeruginosa* crecidas en condiciones hiperosmolares, identificar los solutos mayoritarios acumulados en dicha condición y evaluar si el glutamato exógeno es capaz de modular la respuesta de *P. aeruginosa* al estrés osmótico, tal como ocurre con colina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana: *Pseudomonas aeruginosa* Fildes III, 1924; National Culture type Collection, Reino Unido.

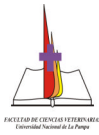
Medios de Cultivo:

a) *Medio nutritivo sólido*: La cepa bacteriana fue conservada mediante repiques mensuales en un medio de la siguiente composición: Triptona 1,0%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, agar 1,5% (Sambrook et al., 1989).

b) *Medio nutritivo líquido*: La composición de este medio fue idéntica a la ya descrita para el medio nutritivo sólido omitiéndose el agregado de agar. Se lo utilizó con el fin de obtener un buen rendimiento en masa celular bacteriana para realizar inóculos (Sambrook et al., 1989).

c) *Medio mínimo con alto fosfato (HPi-BSM)*: Medio líquido de la siguiente composición: KPO_4H_2 22mM, $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 17 mM, NaCl 8,5 mM y MgSO_4 0,8 mM. Para evitar precipitaciones salinas, la solución de MgSO_4 fue esterilizada por separado y mezclada con el resto del medio de cultivo, previamente llevada a pH 7,4, en el momento de su utilización, según lo descrito en Lisa (1985). A este medio basal se le agregó, fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Para determinar el efecto osmoprotector exógeno se utilizaron concentraciones entre 0,2 a 1mM de glutamato o 1mM de colina. Las condiciones hiperosmóticas se lograron agregando NaCl al medio mínimo.

Condiciones de cultivo y curvas de crecimiento: Las cepas bacterianas fueron cultivadas en frascos de erlenmeyers con el medio de cultivo apropiado en cada caso,



manteniéndose una relación 1/10 entre medio de cultivo y capacidad del frasco. El cultivo se inició con el agregado al HPi-BSM de un inóculo al 1% v/v, el que se hizo crecer previamente a 37°C con agitación durante 15 hs. Simultáneamente se adicionó la fuente de carbono y nitrógeno previamente esterilizadas. Los cultivos se mantuvieron en un baño de agua termostaticada a 37°C con agitación rotatoria (150 rpm). Para realizar las curvas de crecimiento se tomaron muestras de cultivo en forma estéril, a distintos tiempos y a las que se les determinó la absorbancia a 660 nm, para seguir el crecimiento. La elección de una longitud de onda de 660 nm se debió a que en la misma no se absorben los pigmentos pirocianos (Cheng et al., 1970).

Medición del consumo de glutamato o colina: Durante el crecimiento bacteriano en HPi-BSM con ClNa 0,5M, glucosa 20 mM y NH₄Cl 18,7 mM, suplementado con glutamato-[14C]glutamato (AE: 145 dpm/μmol) o colina-[metil-14C]colina (AE: 375 dpm/μmol) en concentraciones de 0,4 mM, se determinó el consumo de estos metabolitos como la pérdida de radiactividad en el sobrenadante del medio de cultivo, después de remover las células por centrifugación a 12.000xg por 10 minutos. La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido Beckman LS60001C.

Extracción del contenido celular: Luego del crecimiento bacteriano hasta una DO_{660nm} de 1, las células fueron cosechadas por centrifugación en frío a 10.000xg durante 10 minutos. El precipitado celular se lavó con un medio similar al de crecimiento. El pellet obtenido se trató con ácido perclórico al 7% y se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Después de centrifugar nuevamente a 10.000xg durante 10 minutos, el sobrenadante (fracción soluble) se neutralizó con OHK y se removió por centrifugación el KClO₄ resultante (D'Souza Ault et al., 1993).

Obtención de metabolitos intracelulares radioactivos: La cepa bacteriana se hizo crecer en 25 mL de HPi-BSM con glucosa y NH₄Cl, hasta una DO_{660nm} de 0,9. Las células fueron cosechadas por centrifugación en frío a 10.000xg durante 10 minutos. El precipitado celular se lavó con el medio isoosmolar semejante al de crecimiento, y luego se resuspendió hasta una DO_{660nm} de 0,6 con HPi-BSM hiperosmolar (ClNa 0,5 M), con las fuentes de carbono y nitrógeno y el agregado de 0,4mM de glutamato-[14C] glutamato (AE: 2.200dpm/μmol). Se incubaron en baño de agua con agitación rotatoria (150 rpm) a 37°C. A distintos tiempos se extrajeron alícuotas de 500 μL, las cuales se centrifugaron. El consumo de glutamato se determinó midiendo la radiactividad en el sobrenadante. Cuando se incorporó el 70% de éste, se tomaron alícuotas de 5 mL (120' y 180' de incubación) a las cuales se les extrajo el contenido celular como se describió anteriormente.

Análisis del contenido intracelular:

a) TLC (Thin Layer Chromatography): La fase soluble obtenida de la extracción con ácido perclórico, fue cromatografiada en placa de sílica gel 60 (Sigma), utilizando como solvente de desarrollo isopropanol/ácido acético/agua (4:1:1 v/v), o fenol/agua (75:25 v/v) según Pataki (1969). La placa se reveló por acción de vapores de yodo y posteriormente por tinción con ninhidrina al 0,3% en acetona (Marinetti y Stotz, 1986). Cuando fue necesario, se utilizó como solvente de desarrollo butanol/etanol/agua (5:5:4 v/v), y una tinción para compuestos orgánicos. El reactivo se preparó con etanol/SO₄H₂ (9:1 v/v). La reacción es positiva cuando aparecen manchas de color negro luego de calentar la placa en estufa.

b) HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Para determinar la presencia de dipéptidos en los extractos celulares obtenidos, se utilizó una columna C18 (fase reversa); siendo el solvente KPO₄H₂ 50mM, pH: 3 y el flujo de 3 mL/min. la detección



se realizó por UV a 214 nm (según Alltech, catálogo #200, 1989, con algunas modificaciones). Bajo esta condición el tiempo de retención atribuido al NAGGA fue de 6,7 min. Para la purificación del dipéptido se utilizaron las mismas condiciones pero se eluyó con agua, obteniéndose en este caso un tiempo de retención de 6,5 min. para el mismo y por debajo de 4 min para diferentes aminoácidos. Las determinaciones se realizaron en conjunto con el Lic. César Casale, del Dpto. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNRC.

c) ¹³C-MNR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy): La fase soluble neutralizada, obtenida de la extracción con ácido perclórico, se pasó a través de una columna Chelex-100 (vol.: 0,5 mL) eluyendo con agua tridestilada, y se liofilizó. El extracto liofilizado se resuspendió en D₂O. Se tomó como referencia interna dioxano en agua deuterada. Las determinaciones se realizaron en un equipo Bruker AC200. El número de barrido fue de 1636; el ángulo de pulso PW (3.8) de 70°; el periodo de relajación (RD) de 3 segundos y la amplitud espectral (SW) de 12000 Hertz. La frecuencia del espectrómetro fue de 50.323 MHz. Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. Virginia Sosa, del Dpto. de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.N.C.

Experimentos de transporte: Las células se hicieron crecer hasta la mitad de la fase exponencial en HPi-BSM isoosmolar o con NaCl 0,5 M. Se cosecharon por centrifugación a 10.000xg durante 10 minutos a 5°C, y se resuspendieron en el mismo medio con o sin ClNa, sin la adición de fuentes de carbono y nitrógeno, hasta una DO_{660nm} de 0,6. Para lograrla inhibición de la síntesis proteica, en los casos requeridos, se agregó en el momento de la resuspensión 100 µg de cloranfenicol por mL. Las suspensiones celulares se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser utilizados. Los experimentos de transporte fueron realizados por el método de filtración (Lisa, 1985; Salvano et al., 1989). Las células se preincubaron a 37°C en baño de agua con agitación rotatoria durante 10 minutos. Al cabo de ese tiempo se adicionó glutamato-[¹⁴C] glutamato (AE: 3000 dpm/nmol) a una concentración final de 5 µM. Para aquellos experimentos en los que se quiso observar si la incorporación era dependiente del estado energético de la célula, se adicionó a la suspensión celular glucosa o succinato 5mM, incubando 10 minutos más antes de agregar el glutamato marcado. A varios intervalos de tiempo, alícuotas de 800 µL de células fueron filtradas rápidamente utilizando filtros Millipore (tamaño del poro 0,45 µm). Los mismos se lavaron luego con 2 mL de HPi-BSM con glutamato 10 mM. De la misma manera que se describe en Lisa, (1985) y Salvano et al. (1989), las membranas de papel de filtro, una vez secas, fueron sumergidas en 2,5 mL de líquido de centelleo de la siguiente composición: 632 mL de tolueno, 368 mL de etanol, 4 g de PPO (2,5Diphenyloxazole) y 0,125 g de POPOP (1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene; phenil-oxazolyl-phenyl-oxazolylphenyl). La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido Beckman LS60001C.

RESULTADOS

Efecto del glutamato sobre el crecimiento de P. aeruginosa en medios con alta fuerza osmótica:

Para determinar si el glutamato es capaz de ejercer un efecto osmoprotector sobre el crecimiento de P. aeruginosa en condiciones de alta osmolaridad, las células se cultivaron en HPi-BSM con glucosa y cloruro de amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. La fuerza osmótica se logró por la adición de NaCl. El glutamato se suplementó a una concentración final de 1mM. En la Tabla 1 se muestran

los valores obtenidos de los parámetros tiempo de latencia y tiempo de generación calculados de las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl con o sin el agregado de glutamato. Se puede observar que, tanto en ausencia como en presencia de glutamato, a medida que se incrementa la concentración de NaCl en el medio de cultivo, aumenta el tiempo de latencia y el tiempo de generación con respecto a cultivos que no contienen NaCl. La adición de glutamato estimula el crecimiento bacteriano. En esta condición la velocidad de crecimiento no se modifica con respecto a cultivos que no contienen glutamato, pero sí se observa una notable disminución en el tiempo de latencia. Para una misma concentración de NaCl, por ejemplo 0,5 M, el tiempo de generación fue de 3,2 y 3,4 horas, mientras que el tiempo de latencia fue de 4,4 y 9,2 horas para cultivos con y sin glutamato, respectivamente.

Considerando estos resultados, se quiso determinar si este efecto se pone de manifiesto con concentraciones menores de glutamato. En la Tabla 2 se resumen los datos que muestran la acción de distintas concentraciones de glutamato sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en medio hiperosmolar. Se puede observar que si bien no existen variaciones en el tiempo de generación, el tiempo de latencia disminuye significativamente a medida que aumenta la concentración de glutamato, por lo menos hasta las concentraciones estudiadas.

Tabla 1: Efecto del glutamato sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en condiciones de hiperosmolaridad.

Concentración de NaCl (M)	Sin adición		Con glutamato ^a	
	Tg	Tlag	Tg	Tlag
0,0	1,3	1,6	1,3	1,5
0,2	1,5	4,4	1,5	1,8
0,4	1,8	4,0	2,0	1,8
0,5	3,4	9,2	3,2	4,4
0,6	3,7	9,8	3,9	6,0
0,7	7,5	11,2	7,2	11,0

El crecimiento de *P. aeruginosa* se realizó en HPI-BSM con glucosa y cloruro de amonio, en presencia de distintas concentraciones de NaCl como se indica en la tabla.

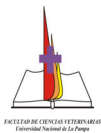
^aEl glutamato se suplementó en una concentración de 1mM.

Tg Tiempo de generación (h).

Tlag Tiempo de latencia (h).

Tabla 2: Efecto de diferentes concentraciones de glutamato sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en condiciones de alta osmolaridad.

Concentración de glutamato (mM)	Tg	Tlag
	----- horas	
0,0	2,66	9,20
0,1	2,70	6,80
0,2	2,66	6,40
0,4	2,80	6,10
1,0	2,80	5,10



Las células se hicieron crecer en HPI-BSM en presencia de NaCl 0,5 M con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El glutamato se adicionó variando su concentración como se indica en la tabla.

Tg Tiempo de generación (h).

Tlag Tiempo de latencia (h).

Efecto de colina sobre el crecimiento bacteriano en condiciones de estrés osmótico

Tal como se indicó en la introducción del presente trabajo, se conoce que colina actúa como osmoprotector cuando es adicionado a cultivos de *P. aeruginosa* crecidas en condiciones osmóticamente estresantes. Por lo tanto, resultó de interés realizar estudios paralelos con este osmoprotector en las mismas condiciones nutricionales en las que se estudió el glutamato. Para ello las bacterias fueron cultivadas en HPI-BSM con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, a distintas concentraciones de NaCl y con el agregado de 1mM de colina. En estas condiciones de cultivo, este compuesto actuó estimulando el desarrollo microbiano, concordando con datos obtenidos con este microorganismo en otras condiciones nutricionales (Lisa et al., 1994).

En la Tabla 3 se puede observar que colina modifica tanto el tiempo de latencia como el tiempo de generación. El efecto osmoprotector encontrado es diferente y más marcado que el observado con glutamato, ya que en este último caso sólo se modificó el tiempo de latencia (Tabla 1).

Tabla 3: Efecto osmoprotector de colina sobre crecimiento de *P. aeruginosa* en medios de cultivo hiperosmolares

Concentración de NaCl (M)	Sin adición		Con colina ^a	
	Tg	Tlag	Tg	Tlag
0,0	1,3	1,6	1,2	1,6
0,2	1,5	4,4	1,4	3,2
0,4	1,8	4,0	2,1	3,4
0,5	3,4	9,2	2,3	4,0
0,6	3,7	9,8	3,2	9,0
0,7	7,5	11,2	3,6	11,0

Se determinó el crecimiento de *P. aeruginosa* en HPI-BSM con glucosa y amonio, como fuentes de carbono y nitrógeno, variando las concentraciones de NaCl como se indican en la tabla.

^aColina se suplementó en una concentración de 1mM.

Tg Tiempo de generación (h).

Tlag Tiempo de latencia (h).

Efecto del glutamato y colina sobre el crecimiento de P. aeruginosa en condiciones hiperosmolares

Como se mostró en los resultados anteriores, tanto el glutamato como colina ejercieron una estimulación del crecimiento de *P. aeruginosa* en condiciones de alta osmolaridad. A los efectos de conocer con más detalle la influencia de estos compuestos sobre el desarrollo bacteriano, se determinaron los parámetros de crecimiento cuando las bacterias crecieron en HPI-BSM con distintas concentraciones de NaCl y con la adición simultánea de glutamato y colina a concentraciones finales de 1mM. En la Tabla 4 se muestran los valores de los parámetros de crecimiento obtenidos de las curvas de crecimientos en estas condiciones de estrés.

Con la adición simultánea de colina y glutamato, se observa una disminución del tiempo de generación con respecto a cultivos que no contienen osmoprotectores exógenos.

Tabla 4: Efecto de colina y glutamato simultáneamente adicionados sobre el crecimiento de *P.aeruginosa* en condiciones hiperosmolares.

Concentración de NaCl (M)	Sin adición		Con colina y glutamato ^a	
	Tg	Tlag	Tg	Tlag
0,0	1,3	1,6	1,2	1,4
0,2	1,5	4,4	1,5	2,2
0,4	1,8	4,0	1,7	2,2
0,5	3,4	9,2	1,9	3,0
0,6	3,7	9,8	2,2	4,0
0,7	7,5	11,2	2,7	4,8

Las células se hicieron crecer en HPi-BSM con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno variando las concentraciones de NaCl.

^aColina y glutamato se adicionaron en concentraciones de 1mM.

Tg Tiempo de generación (h).

Tlag Tiempo de latencia (h).

Si se compara este comportamiento con los resultados obtenidos cuando los osmoprotectores fueron adicionados por separado (Tabla 1 y 3), los valores indican que si ambos compuestos están presentes simultáneamente en el medio de cultivo muestran un efecto sinérgico.

Este efecto sinérgico se puede observar más claramente en el siguiente cuadro donde se han resumido resultados tomados de las Tablas 1, 3 y 4, para una misma concentración de CINa (0,5 M):

Cuadro resumen: resultados tomados de tablas 1, 3 y 4

Parámetro	sin adición	con colina	con glutamato	con colina y glutamato
Tg (h)	3,4	2,3	3,2	1,9
Tlag (h)	9,2	4,0	4,4	3,0

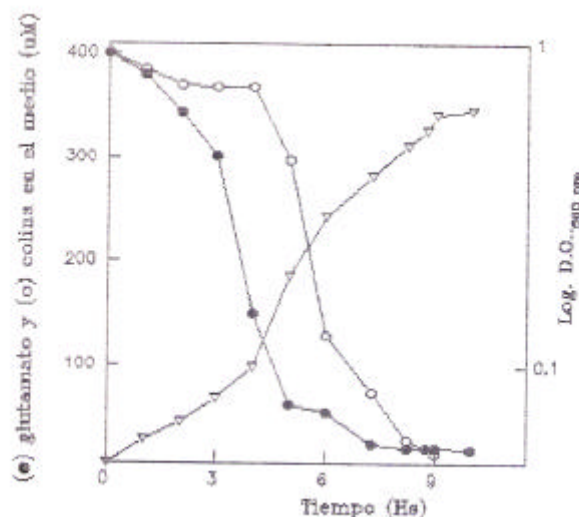
Consumo del glutamato durante el crecimiento bacteriano:

En un intento de evaluar con mayor profundidad el papel del glutamato como osmoprotector exógeno, se estudió su consumo a lo largo del desarrollo bacteriano. Para ello durante el crecimiento de las células en medio HPi-BSM hiperosmolar con glucosa y cloruro de amonio, suplementado con glutamato-[14C] glutamato, se midió la desaparición de su radioactividad en el sobrenadante luego de remover las células por centrifugación, tal como se describe en materiales y métodos. La Figura 1 muestra que aproximadamente el 100% del glutamato es consumido al comenzar la fase exponencial de crecimiento.

Por otro lado se trató de determinar si existía alguna preferencia por el consumo de colina o glutamato cuando ambos compuestos se adicionaban conjuntamente al medio de crecimiento. Las células se hicieron crecer en HPi-BSM con CINa 0,5M, glucosa, amonio y la adición de glutamato-[14C] glutamato o colina-[metil-14C] colina. Los resultados también se muestran en la Figura 1, se puede observar que, si bien ambos compuestos son incorporados, *P. aeruginosa* prefiere en primer término incorporar

glutamato. Cuando se ha incorporado prácticamente el 90% de glutamato, sólo se ha consumido el 26% de colina.

Figura 1: Consumo del glutamato (●), colina (○) y crecimiento (▽) de *P. aeruginosa* en HPI-BSM con NaCl 0,5M. Se utilizó glucosa 20 mM y cloruro de amonio 18,7mM, como fuentes de carbono y nitrógeno. A los tiempos indicados se sacaron muestras de 1mL, las cuales se centrifugaron a 12000xg por 10 minutos. El consumo de glutamato-[14C] glutamato (AE: 145 dpm/nmol, 5µM) y colina-[metil14C] colina (AE: 375 dpm/nmol, 5µM) se determinó en el sobrenadante.

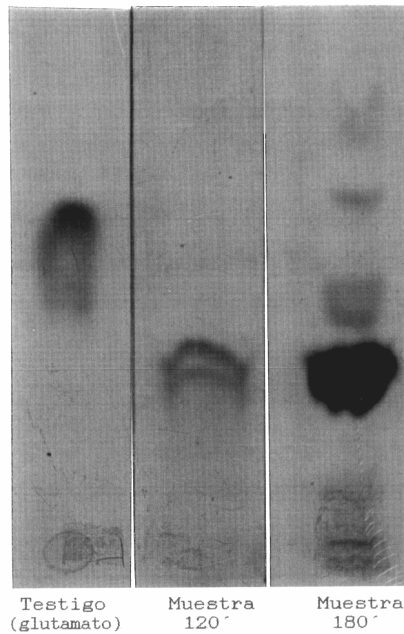


Destino del [14C] glutamato exógeno en cultivos de P. aeruginosa bajo condiciones hiperosmolares

Con el propósito de conocer el destino del glutamato adicionado exógenamente al medio de cultivo, se estudiaron los metabolitos intracelulares obtenidos cuando las bacterias crecen con el osmoprotector marcado radioactivamente. Debido a que el glutamato se incorpora antes de iniciarse la fase exponencial de crecimiento (Figura 1), y con el propósito de obtener mayor masa celular, las bacterias se hicieron crecer en medio isoosmolar hasta fase logarítmica (D.O._{660nm}: 0,8). En ese momento, se cosecharon y se resuspendieron en medio hiperosmolar con glucosa y amonio y el agregado de glutamato-[14C] glutamato. A diferentes tiempos se tomaron muestras a las que se les extrajo el contenido intracelular como se describe en materiales y métodos. Las fracciones solubles obtenidas se sometieron a cromatografía en capa fina (TLC) y posterior autorradiografía. Se utilizó como testigo [14C] glutamato.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos. A medida que el glutamato es incorporado desde el medio de crecimiento, comienza la acumulación de compuestos marcado en el interior de las células osmóticamente estresadas. Es notable que en la muestra obtenida a los 180 minutos de incubación, haya un compuesto mayoritariamente marcado. Puede observarse que las manchas radioactivas pertenecientes a las distintas muestras no se corresponden con la del testigo glutamato (Rf: 0,61).

Figura 2: Destino del [14C] glutamato en cultivos de *P. aeruginosa* crecidas en condiciones hiperosmolares. Las células se hicieron crecer en HPI-BMS con glucosa 20mM y amonio 18,7 mM hasta DO660nm de 0,8. En ese momento se cosecharon, lavaron y resuspendieron en HPI-BMS con ClNa 0,5 M y [14C] glutamato 0,4mM (AE: 3700dpm/mol). Se tomaron alícuotas de 5 mL a los 120' y 180' de incubación, a las cuales se le realizó la extracción de metabolitos intracelulares con ácido perclórico. Las fracciones solubles obtenidas se sometieron a cromatografía en capa fina y posteriormente se realizó autorradiografía, siendo el solvente de desarrollo isopropanol/ácido acético/agua (4:1:1).



Análisis del contenido celular por TLC

Los metabolitos extraídos de células de *P. aeruginosa* crecidas en condiciones de hiperosmolaridad, en presencia de glucosa y cloruro de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, y glutamato como osmoprotector, se sometieron a cromatografía en capa fina. Se utilizaron como testigos prolina, glutamina, glutamato, ornitina, arginina y trealosa. Ninguno de ellos se correspondió con el posible metabolito intracelular mayoritario detectado en la muestra problema (datos no mostrados). Es necesario destacar que en todas las muestras cromatografiadas, se notó la presencia de manchas ninhidrina negativas no identificadas.

Identificación del NAGGA por HPLC

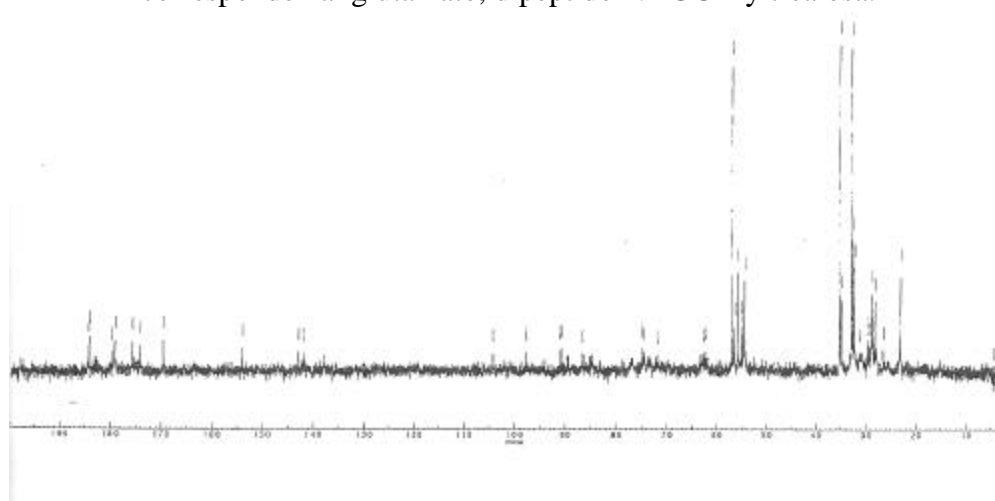
Como se describió en la introducción del presente trabajo, se ha demostrado que el dipéptido NAGGA es uno de los solutos compatibles mayoritarios cuando *P. aeruginosa* crece en un medio mínimo hiperosmolar con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno (D'Souza Ault et al., 1993). La detección de este compuesto utilizando métodos químicos de análisis habituales es complicada debido a que sus grupos carboxilos y aminos terminales se encuentran bloqueados. Por ello se procedió al análisis por HPLC.

Se compararon los tiempos de retención de los picos obtenidos en el análisis por HPLC de las fracciones solubles extraídas con perclórico de *P. aeruginosa* crecidas tanto en condiciones iso como hiperosmolares. El cromatograma del extracto celular analizado, perteneciente a condiciones hiperosmolares, mostró un pico con un tiempo de retención de 6,7 min., no encontrado en condiciones isoosmolares. Para comprobar si este pico correspondía al dipéptido, el mismo se cromatografió utilizando H₂O como solvente. En esta condición, los tiempos de retención para todos los aminoácidos se encontraron por debajo de los 3 min (tiempo de retención en las condiciones anteriores: glutamato 3,7; glutamina 3,5; acetilglutamina 5,7; acetilglutamato, 8,2; [Casale, comunicación personal]) y para el pico sospechoso 6,5 min. Se colectó nuevamente la fracción, se llevó a sequedad y se resuspendió dividiéndola en dos partes. A una de ellas se le realizó una reacción con ninhidrina que resultó negativa. La otra fracción se hidrolizó con HCl y alta temperatura y resultó positiva la reacción con ninhidrina. Esta fracción hidrolizada se inyectó nuevamente al cromatógrafo y no se detectó el pico con un tiempo de retención de 6,5 min. Los nuevos picos resultantes se correspondieron con los tiempos de retención del glutamato. El mismo procedimiento se realizó con la fracción soluble obtenida luego de incubar las células durante 180 min. en medio hiperosmolar con glutamato-[¹⁴C] glutamato. En este caso el 80% de radioactividad se detectó cuando se colectó el pico con tiempo de retención 6,5 min.

Identificación de los metabolitos intracelulares por ¹³C-NMR:

Para identificar los solutos intracelulares mayoritarios de células bacterianas crecidas en medio mínimo en presencia de NaCl 0,5M con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno y el agregado de glutamato 1mM, se realizó el análisis por ¹³C-NMR utilizando las condiciones de trabajo que se detallan en materiales y métodos. El espectro de las fracciones solubles obtenidas de la extracción con ácido perclórico, mostró picos de resonancia idénticos a los descritos en *P. aeruginosa* (D'Souza Ault et al., 1993), para los tres compuestos compatibles mayoritarios: N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGA) (179.1, 177.0, 175.7, 54.1, 32.3, 27.8, y 23.1 ppm) glutamato (182.0, 176.5, 56.5, 35.2 y 28.8 ppm) y trealosa (94.9, 74.3, 73.8, 72.8, 71.5 y 62.0 ppm) (Figura 3).

Figura 3: Espectro de ¹³CNMR del contenido intracelular de *P. aeruginosa* crecida en HPI-BSM con ClNa 0,5M, glucosa 20mM, cloruro de amonio 18,7mM y glutamato 1mM. La preparación de la muestra y los parámetros del ¹³CNMR se describen en materiales y métodos. Los picos de resonancia se detallan en los resultados y corresponden al glutamato, dipéptido NAGGA y trealosa.

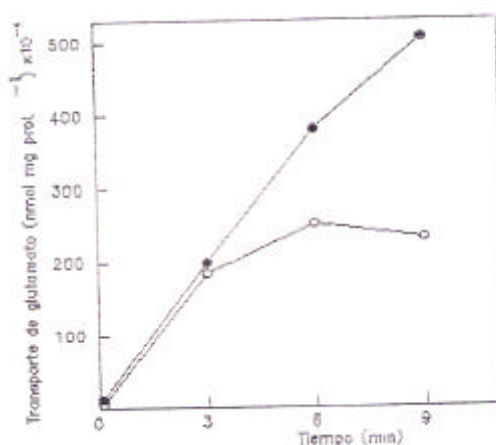


Captación de glutamato en P. aeruginosa.

Con el propósito de conocer en mayor profundidad la participación del glutamato en la adaptación osmótica de *P. aeruginosa*, se comenzó el estudio de su sistema de transporte. La Figura 4 muestra la incorporación de glutamato en función del tiempo, en bacterias crecidas con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, en condiciones iso e hiperosmolares. La incorporación de glutamato fue mayor en aquellas células crecidas en medios hiperosmolares y resuspendidas en las mismas condiciones (omitiendo las fuentes de carbono y nitrógeno), que en las células crecidas y resuspendidas en isoosmolaridad. En esta última condición, las células son capaces de captar glutamato a pesar de que este compuesto no está presente en el medio de cultivo. Ello indica que este sistema de transporte es constitutivo.

Por otro lado, la mayor captación obtenida en células crecidas en hiperosmolaridad, podría ser atribuida a la existencia de más de un sistema de transporte que estarían controlados osmóticamente y respondiendo a una señal general del medio.

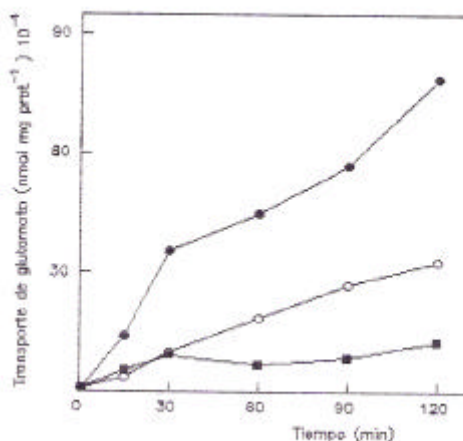
Figura 4: Captación de glutamato en función del tiempo en *P. aeruginosa*. La medición del mismo se llevó a cabo en HPI-BSM iso e hiperosmolar (0,5M de NaCl) con glutamato-[14C] glutamato. Las células se hicieron crecer en medio iso (○) e hiperosmolar (●) en presencia de glucosa y amonio, hasta DO660 de 0,6 y luego se cosecharon y resuspendieron en los mismos medios, sin el agregado de fuentes de carbono y nitrógeno y con la adición de glutamato-[14C] glutamato 5μM (AE: 3708 dpm/nmol).



Para determinar si la incorporación de este compuesto en condiciones hiperosmolares es inducida y si depende del estado energético de la célula, se realizó la siguiente experiencia. Las células se hicieron crecer en condiciones isoosmolares con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno. Seguidamente se resuspendieron en medio hiperosmolar y se dividieron en tres partes. Una de ellas se mantuvo como control. Al resto se le agregó: 1) succinato 5mM, 2) cloranfenicol 100 μg/mL y succinato 5mM. La Figura 5 muestra el transporte de glutamato determinado en las tres condiciones.

La inhibición que se observa cuando las células se expusieron a un medio con cloranfenicol, está indicando que para que el glutamato sea transportado en hiperosmolaridad, es necesaria la síntesis de nuevas proteínas. Si se observan los datos obtenidos con células energizadas y no energizadas (condiciones 1 y 2), se desprende que la incorporación del glutamato es dependiente del estado energético de la célula.

Figura 5: Inducción y energización del transporte de glutamato en *P. aeruginosa*. La incorporación se llevó a cabo en HPI-BSM con 0,5 M de NaCl y glutamato-[¹⁴C] glutamato 5 μ M (AE: 3500 dpm/nmol). Antes del ensayo, las células se hicieron crecer en isoosmolaridad y luego se transfirieron a un medio hiperosmolar con (●) o sin (○) succinato 5 mM, o en el mismo medio conteniendo succinato 5 mM y 100 μ g/mL de cloranfenicol (■).



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La adición de glutamato exógeno es capaz de conferir osmoprotección a células de *Pseudomonas aeruginosa* crecidas en condiciones de estrés osmótico. En medios de cultivos hiperosmolares obtenidos por la presencia de NaCl que contiene glucosa y cloruro de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, el efecto se pone de manifiesto disminuyendo significativamente el tiempo de latencia, sin observarse variaciones en el tiempo de generación (Tabla 1).

La adición de este compuesto a partir de una concentración 0,1mM (Tabla 2), protege notablemente el crecimiento bacteriano en condiciones hiperosmolares, por lo cual puede ser considerado como osmoprotector.

En bacterias Gram negativas, el glutamato ha sido descrito como uno de los solutos compatibles que generalmente sintetizan y acumulan los microorganismos, ante situaciones de estrés osmótico (Csonka, 1989). Sin embargo, adicionado exógenamente, en miembros de la familia Enterobacteriaceae, la acumulación intracelular de glutamato, ha sido atribuida a un aumento de la síntesis endógena y no a una incorporación del medio (Csonka, 1991). Por otra parte, sólo en células de *Bacillus subtilis* cultivadas en medios con NaCl o glicerol se ha estudiado que el glutamato adicionado exógenamente confirió osmoprotección y se acumuló en el interior de las células juntamente con K⁺ (Ikeuchi et al., 2003).

Los resultados encontrados en *P. aeruginosa* (Tabla 1 y 2) nos permiten concluir que, a diferencia de lo descrito para otros microorganismos por Csonka (1991), y a semejanza de lo que ocurre con colina y carnitina en esta bacteria, (Lisa et al., 1994; Lucchesi et al., 1995), la adición exógena de glutamato modula la adaptación de este microorganismo al estrés osmótico.

Bajo las mismas condiciones nutricionales en las cuales se estudió el efecto del glutamato, colina también actúa como osmoprotector modificando tanto el tiempo de latencia como el tiempo de generación (Tabla 3). Este comportamiento fue similar al



descripto cuando *P.aeruginosa* crece en medios hiperosmolares en presencia de otras fuentes de carbono y de nitrógeno (colina, carnitina, succinato, amonio) (Lisa et al., 1994; Lucchesi et al., 1995). Ello permite establecer, que el efecto osmoprotector de este compuesto es independiente de la fuente de carbono y nitrógeno presente en el medio de cultivo.

Por otro lado, si se compara el efecto encontrado con colina (Tabla 2) con el detectado por la presencia de glutamato (Tabla 1), se puede concluir que si bien ambos compuestos promueven el crecimiento bacteriano en condiciones hiperosmolares, el efecto osmoprotector de cada uno de ellos se pone de manifiesto en forma diferente. Aparentemente podría considerarse que colina, al disminuir el tiempo de latencia y el tiempo de generación, es un osmoprotector más eficiente. Esto estaría apoyado por las características zwitteriónicas de este compuesto, lo que se traduce en una mejor interacción con macromoléculas celulares (Sleator y Hill, 2002).

Cuando *P. aeruginosa* crece en medios hiperosmolares, con la adición simultánea de glutamato y colina como osmoprotectores exógenos, ambos compuestos son incorporados y se observa un efecto sinérgico, con disminución del tiempo de latencia y del tiempo de generación (Tabla 4). Este efecto, no descripto antes en este microorganismo, demuestra que ambos compuestos no son mutuamente excluyentes.

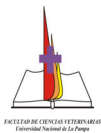
En *E. coli* se demostró que los osmoprotectores ectoína y prolina compiten por los dos sistemas de transporte descriptos para glicina-betaína (Jebbar et al., 1992). Ello se traduce en una exclusión de osmoprotectores según cual de ellos esté presente en forma simultánea en el medio de cultivo. En *P. aeruginosa*, para el caso de colina y glutamato es posible que estos compuestos utilicen diferentes vías de entrada y, ante la necesidad de la célula de contrarrestar el estrés, incorpore ambos osmoprotectores.

Aproximadamente el 90% del glutamato es incorporado al comenzar la fase exponencial de crecimiento, cuando sólo se ha consumido el 26% de colina (Figura 1). Esta preferencia por glutamato podría deberse a diferentes niveles de activación y/o inducción de los sistemas de transporte en condiciones de hiperosmolaridad.

En *P. aeruginosa* el sistema de transporte de glutamato, en condiciones isoosmolares, es constitutivo. En hiperosmolaridad se observa un aumento en la captación de este compuesto, y no puede descartarse con los estudios realizados hasta el momento, la existencia de diferentes sistemas de transporte que se expresen por la alta fuerza osmótica. Por el contrario, el sistema de transporte de colina, tanto en condiciones iso como hiperosmolares, es inducible (Salvano et al., 1989).

Como se ha descripto en otros microorganismos (Csonka, 1989; Sleator y Hill, 2002), en una primera respuesta al estrés osmótico, las concentraciones del ión K^+ y del glutamato aumentan conjuntamente. La célula al crecer en un medio con glutamato exógeno, prefiere incorporar este compuesto, evitando su síntesis. Ello se traduce en la disminución del tiempo de latencia con respecto a cultivos que no tienen osmoprotector. Si además está presente colina, la célula también incorpora este compuesto, teniendo la ventaja de utilizar un osmoprotector altamente eficiente provisto por el medio de crecimiento. El efecto se pone de manifiesto con la disminución del tiempo de generación.

El estudio de metabolitos intracelulares obtenidos luego de incubar las células en presencia de $[^{14}C]$ glutamato, mostró que, una vez incorporado, este metabolito no se acumula como tal. El análisis por autorradiografía de la fase soluble extraída con ácido perclórico (Figura 2), no mostró trazas de radioactividad en glutamato. En función de ello, analizando el contenido celular por cromatografía en capa fina (TLC), se descartaron que estos solutos fueran prolina, glutamina, ornitina, arginina o trealosa. Distintas fueron las razones que llevaron a elegir estos compuestos. Prolina y trealosa



han sido descriptos en *P. aeruginosa* como solutos compatibles (D'Soulza Ault et al., 1993; Csonka, 1989). Glutamina, la cual puede sintetizarse a partir de glutamato, incrementa su concentración en cultivos de *E. coli* (Mc Laggan et al., 1990) y *Salmonella typhimurium* (Csonka, 1989), crecidas en condiciones de estrés osmótico. Si bien ornitina y arginina no han sido descriptos como solutos compatibles, estos compuestos son intermediarios de las distintas vías metabólicas que puede seguir el glutamato en *P. aeruginosa* y que pueden llevar a la síntesis de osmoprotectores (Voellmy y Leisinger, 1978).

El análisis del contenido intracelular por HPLC de la fracción obtenida cuando las células se incubaron con [¹⁴C] glutamato, reveló un pico con un tiempo de retención de 6,7 min. El cual presentó el mayor porcentaje de radioactividad. El hecho que este pico resulte positivo a la reacción con ninhidrina sólo luego de una hidrólisis drástica, conducen a pensar que se trataría del dipéptido NAGGA, ya descripto como soluto compatible en *P. aeruginosa* (D`Soulza Ault et al., 1993).

En base a estos resultados, es posible suponer que, en *P. aeruginosa*, bajo condiciones hiperosmolares, el glutamato exógeno actúa como precursor de este dipéptido.

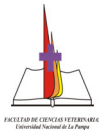
En células crecidas hasta final de la fase logarítmica, en presencia de NaCl 0,5M y con glutamato 1mM, los solutos intracelulares mayoritarios identificados por ¹³C-NMR fueron el dipéptido NAGGA, trealosa y glutamato. Estos datos coinciden con los resultados descriptos en la bibliografía, sobre los metabolitos intracelulares acumulados por *P. aeruginosa* en las mismas condiciones nutricionales pero sin la presencia de glutamato exógeno (D`Soulza Ault et al., 1993).

Al detectar la presencia del NAGGA, sumados a los resultados encontrados con [¹⁴C]glutamato, aportan datos suficientes que permiten afirmar que el glutamato adicionado exógenamente es el precursor del dipéptido NAGGA, ya que este compuesto no se acumula como tal ni se deriva hacia la síntesis de trealosa.

Teniendo en cuenta que el análisis por ¹³C-NMR (Figura 3) mostró la presencia de glutamato (posiblemente de origen endógeno), es posible atribuirle al glutamato una doble función: actuar como mediador químico y como un osmolito genuino. Por lo contrario, el efecto osmoprotector de colina se muestra diferente al obtenido con glutamato. En trabajos realizados por algunos autores (Lisa et al., 1994; Casale et al., 1994), muestran que si colina está presente en el medio, lleva al acúmulo intracelular de betaína y no de otros solutos compatibles.

Existen antecedentes que sugieren que la acumulación intracelular del NAGGA, trealosa y glutamato es una respuesta general a la alta osmolaridad, cuando *P. aeruginosa* crece en medios hiperosmolares con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno. El estrés osmótico producido, ya sea por la adición de NaCl, KCl, sacarosa, K₂HPO₄, K₂SO₄, puede inducir este comportamiento (D`Soulza Ault et al., 1993). Se ha observado en este microorganismo, que si el amonio del medio es reemplazado por glutamato como fuente de nitrógeno, el compuesto intracelular mayoritario es trealosa, en lugar del dipéptido NAGGA.

Los resultados discutidos en este trabajo se obtuvieron utilizando condiciones nutricionales que incluyen altas concentraciones de amonio. En estos medios de crecimiento, y ante la presencia de NaCl, el glutamato adicionado exógenamente actúa como precursor del dipéptido NAGGA. Si bien no se realizaron determinaciones cuantitativas de los solutos acumulados intracelularmente, se puede suponer, pero no afirmar, que el NAGGA, en estas condiciones, es el metabolito mayoritario. *P. aeruginosa*, ante la diferente disponibilidad de nitrógeno, posiblemente responde acumulando solutos compatibles que sean eficientes durante la adaptación a la alta fuerza osmótica pero que no limiten su crecimiento. Por ejemplo, ante una situación de



estrés osmótico, cuando las concentraciones de amonio del medio son limitadas y debe utilizar alguna forma de nitrógeno orgánico, acumula compuestos que osmoprotegen pero que en su constitución molecular no requieran nitrógeno, tal como trealosa.

En *E. coli* se ha encontrado que la adaptación al shock hiperosmótico ocurre en dos fases (Csonka, 1989; Sleator y Hill, 2002). Primero el ión K^+ se incorpora rápidamente con la concomitante síntesis de glutamato. En la segunda fase, la concentración de ambos solutos decae, por la excreción de K^+ y la excreción o metabolización del glutamato, y comienza la síntesis de trealosa completando la adaptación osmótica y siendo éste el principal soluto acumulado.

Aparentemente, es posible que en *P. aeruginosa*, ocurra un “juego” regulatorio entre la acumulación de solutos compatibles, donde el glutamato podría tener un papel importante junto a otros factores del medio (presencia de glicina-betaína, medio limitado en nitrógeno, etc.).

En base a los resultados encontrados en este trabajo, y comparando con lo observado en *E. coli*, se podría pensar que la síntesis de trealosa y del NAGGA, se lleven a cabo para reemplazar el glutamato, sin que los niveles de este aminoácido disminuyan demasiado. Una respuesta a este cambio podría ser la mayor eficacia de estos compuestos para proteger a la célula osmóticamente estresada. Esta eficacia de los solutos depende, no solo de la capacidad para reemplazar al ión K^+ y al glutamato, sino también de otros factores, tales como la interacción con macromoléculas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

Berry, A., Devault, J. D., and Chakabarty, A. M. 1989. High osmolarity is signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal Bacteriology*, 171: 2312-2317.

Botzenhart, K., and Döring, G. 1993. Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. En *Pseudomonas aeruginosa as An Opportunist Pathogen* (Campa, M., Bendinelli, M. y Friedman, H. eds.). Plenum Press, New Cork. p. 1-13

Casale, C. H., Lisa, T. A., Lucchesi, G. I., and Domenech, C. E. 1994. The production of Labeled Betaine By Incubation of osmolyte-Free *Pseudomonas aeruginosa* with Radioactive Choline. *Current Microbiology*, 29: 295-299.

Cheng, K. W. J., Ingram, J. M. and Costerton, J. W. 1970. Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *Journal Bacteriology*, 104: 748-753.

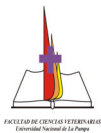
Csonka, L. N. 1989. Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiology Review*, 53: 121-147.

Csonka, L. N., and Hanson, A. D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annual Review Microbiology* 45: 569-606.

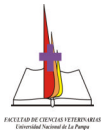
Csonka, L. N, Ikeda, T. P, Fletcher, S. A., and Kustu, S. 1994. The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella typhimurium* in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *Journal Bacterology*, 176: 6324-6333.

Deretic, B., Govan, J. R. W., Koneyecni, W. M., and Martin D. W. 1990. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Molecular Microbiology*, 4: 189-196.

D'Souza Ault, M. R.; Smith, L. T., and Smith, G. M. 1993. Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and Glycine Betaine in Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Osmotic Stress. *Applied Environmental Microbiology*, 50: 473-478.



- Gehring, K., Hofnung, M., and Nikaido, H. 1990.** Stimulation of Glutamine transport by Osmotic Stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal Bacteriology*, 172: 4741-4743.
- González, R. G., Botsford, J. L., and Lewis T. 1990.** Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: characterization of enzymes involved in glutamate síntesis. *Canadian Journal Microbiology*, 36: 469-474.
- Helling, R. B. 1994.** Why Does *Escherichia coli* Have Two Primary Pathways for Synthesis of Glutamate?. *Journal Bacteriology*, 176: 4664-4668.
- Ikeuchi, T.; Ishida, A.; Tajifi, M., and Nagata, S. 2003.** Induction of salt tolerance in *Bacillus subtilis* IFO325. *Journal Bioscience Bioengineering*, 96: 184-186.
- Jebbar, M., Talibar, R., Gloux, K., Bernard, T., and Blanco, C. 1992.** Osmoprotection of *Escherichia coli* by Ectoíne: Uptake and Accumulation Characteristics. *Journal Bacteriology*, 174: 5027-5035.
- Lisa, A. T. 1985.** Colina y sus metabolitos relacionados como agents inductors de colinesterasa, fosfatasa ácida y del sistema de transporte de colina en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Doctorado, U.N.R.C.
- Lisa, A. T, Casale, C. H., and Domenech, C. E. 1994.** Cholinesterase, Acid Phosphatase, and Phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* Under Hyperosmotic Conditions in a High-Phosphate medium. *Current Microbiology*, 28: 71-76.
- Lisa, A. T., Lucchesi, G. I., and Domenech, C. E. 1994.** Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Relationship to the Choline Metabolism Through the Action of Cholinesterase, Acid Phosphatase and Phospholipase C. *Current Microbiology*, 29: 193-199.
- Lucchesi, G. I., Lisa, A. T., and Domenech, C. E. 1989.** *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase C activity in a high-phosphate médium. *FEMS Microbiology Letters*, 57: 355-338.
- Lucchesi, G. I., Lisa, A. T., Casale, C. H., and Domenech, C. E. 1995.** Carnitine Resembles Choline in the Induction of Cholinesterase, Acid Phosphatase and Phospholipase C and in Its Action as an Osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology*, 30: 55-60.
- Marinetti, G. V., and Stotz, E. 1986.** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H. eds.) vol. 3 par. 2 pp 240-241.
- Mc Laggan, D., Longan, T. M., Lynn, D. G., and Epstein, W. 1990.** Involvement of α -glutamyl peptides in osmoadaptations of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 172: 3631-3636.
- Nandineni, M. R.; Laishram R. S., and Gowrishankar, J. 2004.** Osmosensitivity Associated with Insertions in *argP* (*iciA*) or *glnE* in Glutamate Synthase-deficient Mutans of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 186: 6391-6399.
- Pataki, G. 1969.** Techniques of Thin-Layers Chromatography in Amino Acids and Peptide Chemistry. Ann Arbor-Humphrey Science Publishers. Inc. pp 67.
- Poolman, B. Hellingwerf, K. J., and Konings, W. N. 1987.** Regulation of the Glutamate-Glutamine Transport System by Intracellular pH in *Streptococcus lactis*. *Journal Bacteriology*, 169: 2272-2276.
- Salvano, M. Lisa, A. T., and Domenech, C. E. 1989.** Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Cellular Biochemistry*, 85: 81-89.
- Sleator R. D., and Hill, C. 2002.** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Review*, 26: 49-71.
- Smith, L. T., and Smith, G. M. 1989.** An Osmoregulated Dipeptide in Stressed *Rhizobium meliloti*. *Journal Bacteriology*, 171: 4714-4717.



Facultad de Ciencias Veterinarias
General Pico - La Pampa, República Argentina

- Stambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Ed: Nolan, C. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbord.
- Stanchi, N. O. 2005.** Microbiología Veterinaria. 1º Ed. Editorial Inter-Médica. Argentina. P: 321-323.
- Talibart, R.; Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wroblewski, H., Blanco, C., and Bernard, T. 1994.** Osmoadaptation in Rhizobia: Ectoíne-Induced Salt Tolerance. Journal Bacteriology, 176: 5210-5217.
- Voellmy, R., and Leisinger, T. H. 1978.** Regulation of Enzyme Synthesis in the Arginine Biosynthetic Pathway of Pseudomonas aeruginosa. Journal General Microbiology, 109: 25-35.
- Welsh, D. T. 2000.** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. FEMS Microbiology Review, 24: 263-290.