

## Adaptación de *Salmonella entérica* a las sales biliares como un mecanismo en la formación del biofilm

García Andrade Alejandro<sup>1</sup>, Barrera Chávez Isaac Daniel<sup>1</sup>, López González Gabriela Josefina<sup>2</sup>, López Briones Sergio<sup>1</sup>, Hernández Luna Marco Antonio<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina y Nutrición, División Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato.  
Correo electrónico: a.garciaandrade@ugto.mx

### Resumen

Las sales biliares son compuestos capaces de desnaturalizar proteínas, dañar las membranas celulares, inducir estrés oxidativo y daño al DNA. Adicionalmente, se ha observado que la concentración de sales biliares está involucrada con la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunológica del huésped. Por otra parte, se ha descrito que algunas especies bacterianas, entre las que figura *Salmonella entérica*, pueden adaptarse a la concentración de sales biliares mediante mecanismos relacionados con la remodelación de su membrana celular y la respuesta al estrés, favoreciendo la infección de la bacteria mediante la formación de estructuras como el biofilm, en donde la bacteria aprovecharía las sales biliares para incrementar la formación de esta estructura debido a una mayor producción de las proteínas que conforman esta estructura. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las sales biliares sobre la formación del biofilm en dos cepas de *Salmonella entérica*, realizando curvas de crecimiento bacteriano de las cepas *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella choleraesuis* (aislado clínico) en medio Lysogeny Broth (LB) y medio LB suplementado con las sales biliares de colato y coleato de sodio a distintos porcentajes (1, 3 y 5%). La presencia del biofilm se determinó a partir de un subcultivo de 24 horas de las cepas, crecidas en medio LB con o sin suplementar con sales biliares a las mismas concentraciones que las curvas de crecimiento en placas de 96 pozos, por el método de cristal violeta. La cuantificación, se realizó por espectrofotometría a 550 nm. Nuestros resultados muestran que la concentración de sales biliares disminuye el crecimiento bacteriano, pero puede incrementar la formación del biofilm en cepas de *Salmonella entérica*

**Palabras clave:** SALMONELLA ENTERICA; BIOFILM; SALES BILIARES.

### Introducción

*Salmonella entérica* (*S. entérica*) son bacilos gramnegativos móviles, intracelulares facultativos, lábiles en ácido y productores de sulfuro de hidrógeno, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. La taxonomía actual divide el género *Salmonella* en 2 especies *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. En general, hay más de 2500 serovares de *Salmonella* en todo el mundo, teniendo cada subespecie de *Salmonella* múltiples serovares, particularmente dentro de las subespecies entéricas se encuentran los serovares más significativos asociados a patologías en el humano. Algunos de los serovares más comunes son *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella newport* y *Salmonella javiana*. Los serovares *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* conducen a la tifoidea (*la Salmonella tifoidea se limita a los humanos*) causando fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea, además de causar una serie de infecciones clínicas con diferentes características como gastroenteritis, comúnmente por la producción de sulfuro de hidrogeno, fiebre entérica, bacteriemia y estado de portador crónico, también provoca infecciones cruzadas entre humanos y animales. Muchos animales son portadores de *Salmonella* por ejemplo las aves de corral y el cerdo. El consumo de carne contaminada con *Salmonella* ocasiona una diarrea inflamatoria. Así mismo, la infección de *Salmonella* causa una infección focal significativa en pacientes con condiciones inmunocomprometidas.<sup>1</sup>

La mayoría de las bacterias pueden crecer como una sola célula o en una biopelícula conocido como biofilm, que es una comunidad de microorganismos que se agregan, crecen y están rodeados por una matriz extracelular. La matriz extracelular está compuesta de proteínas, ácidos desoxirribonucleicos extracelulares y exopolisacáridos, lo que promueve la unión covalente a superficies vivas e inactivas. Además, les ayuda a desarrollar una alta resistencia a moléculas con actividad antibacteriana. El desarrollo del biofilm a menudo ocurre en respuesta a estímulos ambientales negativos percibidos como cambios en el pH, la temperatura, el oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. En este nicho, las bacterias crecen y maduran, momento en el

que algunas células se descomponen y vuelven al crecimiento individual, repitiendo el proceso. Por otra parte, el biofilm está asociado con infecciones crónicas y persistentes que afectan negativamente a diversas áreas médicas. Además, los agentes antibacterianos tradicionales no responden de forma adecuada, producen una mayor tasa de morbilidad y mortalidad, además de generar un costo mayor a los sistemas de salud <sup>2</sup>.

Además de *Salmonella typhi*, muchos otros serovares de *Salmonella entérica* poseen la capacidad de colonizar y potencialmente causar enfermedades en humanos y/u otros huéspedes animales. La formación del biofilm en está muy conservada dentro del género *Salmonella*, lo que sugiere que la capacidad de formar el biofilm sirve como una ventaja evolutiva durante el ciclo de infección y transmisión de la bacteria.<sup>3</sup> Al igual que con otras bacterias formadoras de biofilm, *Salmonella entérica* está dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que consta de proteínas, carbohidratos y DNA extracelular (eDNA). La composición exacta de las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm de *Salmonella* puede variar según el serovar y las condiciones ambientales, pero consiste principalmente en una red de fibras proteicas de curli fimbriae, celulosa y eDNA. Los componentes adicionales de las sustancias poliméricas extracelulares pueden incluir apéndices celulares como flagelos o varias fimbrias adhesivas; proteínas de superficie celular tales como la proteína de superficie BapA asociada a biopelícula grande; y otros exopolisacáridos como el ácido colánico o la cápsula del antígeno O. Estas sustancias poliméricas extracelulares colectivamente permiten que las células se adhieran de forma segura tanto a las superficies como a otras células dentro del biofilm, ayudando a retener la humedad en ambientes secos y posiblemente retardan la difusión de moléculas dañinas como péptidos antimicrobianos y antibióticos.<sup>3</sup>

Por otra parte, las sales biliares provienen de la reacción de neutralización de los ácidos biliares conjugados al unirse con un ion de sodio o potasio, por lo tanto, pueden ser sales sódicas o potásicas. La formación de una sal biliar es la manera en la que el cuerpo humano almacena los ácidos biliares en la vesícula biliar para después ser secretados a la hora de la digestión. La segregación de sales biliares, bilirrubina, colesterol, fosfolípidos, agua y electrolitos realizada por los hepatocitos se determina como bilis, la función de esta es eliminar los productos de desecho del cuerpo como la bilirrubina y el colesterol, además de promover la digestión y absorción de grasas. Así mismo, las sales biliares son compuestos capaces de desnaturalizar proteínas, dañar las membranas celulares, inducir estrés oxidativo y con ello ocasionar el daño al DNA. Además, se ha observado que la concentración de las sales biliares está ligada a la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunológica del huésped, por lo tanto, son bacteriostáticas, y benefician la esterilidad de la vía biliar directamente, así como, reduciendo el crecimiento bacteriano en el duodeno, a la vez que limitan la traslocación de endotoxinas bacterianas gracias al efecto detergente que tienen sobre las mismas.<sup>5</sup>

Por último, se ha descrito que algunas especies bacterianas, entre las que figura *Salmonella entérica*, tienen la capacidad para adaptarse a los ácidos biliares mediante mecanismos relacionados con la remodelación de la membrana celular y las respuestas al estrés, favoreciendo la infección de la bacteria, mediante la formación de estructuras como el biofilm, en donde la bacteria aprovecharía las sales biliares para incrementar la formación de esta estructura <sup>4</sup>. Por esta razón en este trabajo evaluamos el efecto de la concentración de las sales biliares sobre la formación del biofilm de *Salmonella entérica*.

## Objetivo

Evaluar el efecto de las sales biliares sobre el crecimiento y la formación del biofilm de dos serovares de *Salmonella entérica* (*Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis*).

## Materiales y métodos

### Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano por triplicado de las cepas *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella choleraesuis* (aislado clínico) en medio Lysogeny Broth (LB) y medio LB suplementado con distintos porcentajes de las sales biliares de colato y coleato de sodio (1, 3 y 5%) por un periodo de 6 horas. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

### Ensayo del biofilm

La presencia del biofilm se determinó por el método de cristal violeta a partir de un subcultivo de 24 horas de las cepas, crecidas en medio LB con y sin suplementar con sales biliares a los mismos porcentajes que las curvas de crecimiento en placas de 96 pozos. La cuantificación, se realizó por espectrofotometría a 550 nm.

## Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos de las diferentes *Salmonellas* y condiciones se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de t de student (en muestras independientes), con un intervalo de confianza del 95%. En todos los casos se muestra el promedio de tres o más experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar (DE).

## Resultados

Como primer paso se analizó el crecimiento de las bacterias empleadas en este estudio, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis*. Nuestros resultados mostraron que *S. typhimurium* presenta un mayor crecimiento se *S. choleraesuis* en medio LB. Adicionalmente *S. choleraesuis* alcanzó la fase de meseta a las 5 horas mientras que *S. typhimurium* continúa en su fase exponencial (figura 1).

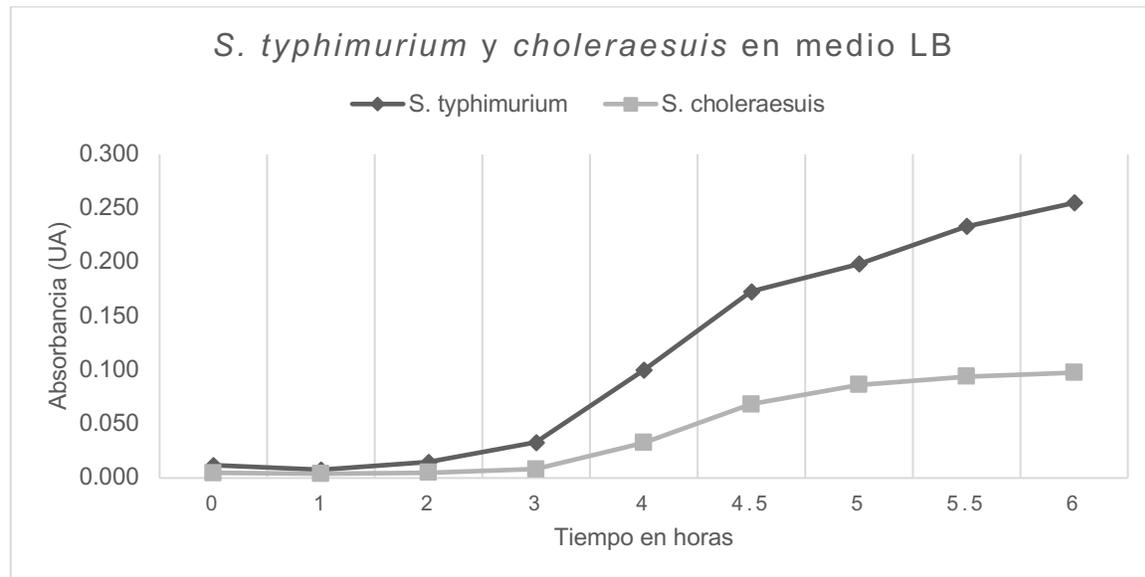


Figura 1. Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* en medio LB

## Efecto de la concentración de las sales biliares sobre el crecimiento de *Salmonella* entérica

Nuestros resultados muestran que el crecimiento de *Salmonella typhimurium* se ve afectado por la concentración de colato de sodio, y a mayor concentración de esta se observó menor crecimiento después de 6 horas de cultivo (figura 2). De forma interesante, aunque se observó un menor crecimiento en presencia de las distintas concentraciones de colato de sodio el comportamiento de las curvas de crecimiento fue similar al crecimiento de la bacteria en medio sin suplementar.

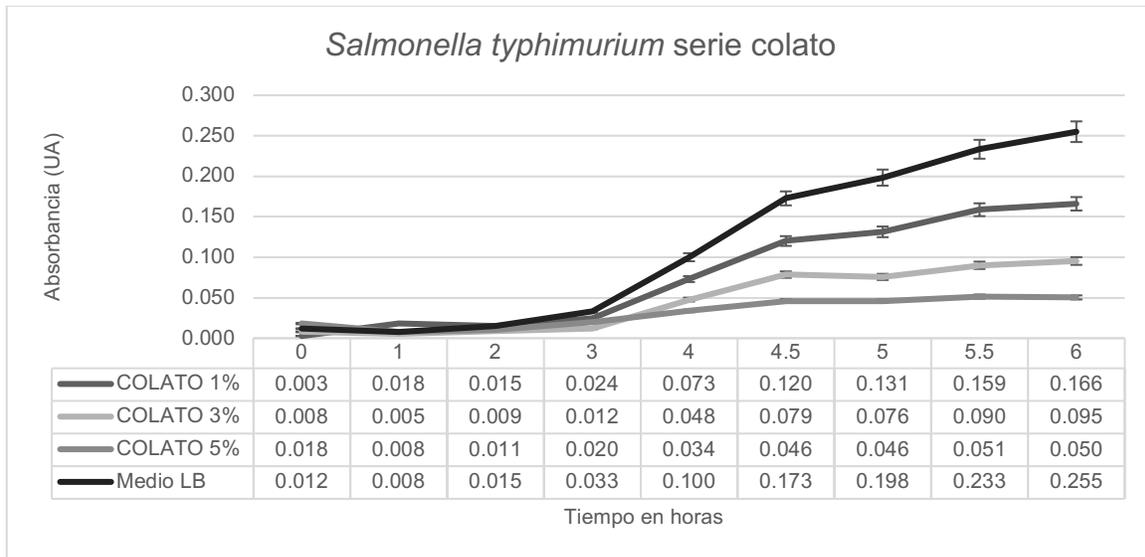


Figura 2. Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en medio LB suplementado o sin suplementar con colato de sodio al 1,3 y 5%.

En la curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* suplementada con coleato de sodio se encontró igualmente un menor crecimiento en los medios suplementados al 1, 3 y 5% (figura 3), sin embargo, a diferencia del medio suplementado con colato de sodio, observamos que el crecimiento no es inversamente proporcional a la concentración, además de que el crecimiento en el medio con los porcentajes de 3 y 5% de coleato de sodio presentan el mismo crecimiento a partir de las 4.5 horas. Por lo tanto, podemos pensar en una adaptación de la bacteria a la concentración del medio suplementado con coleato de sodio.

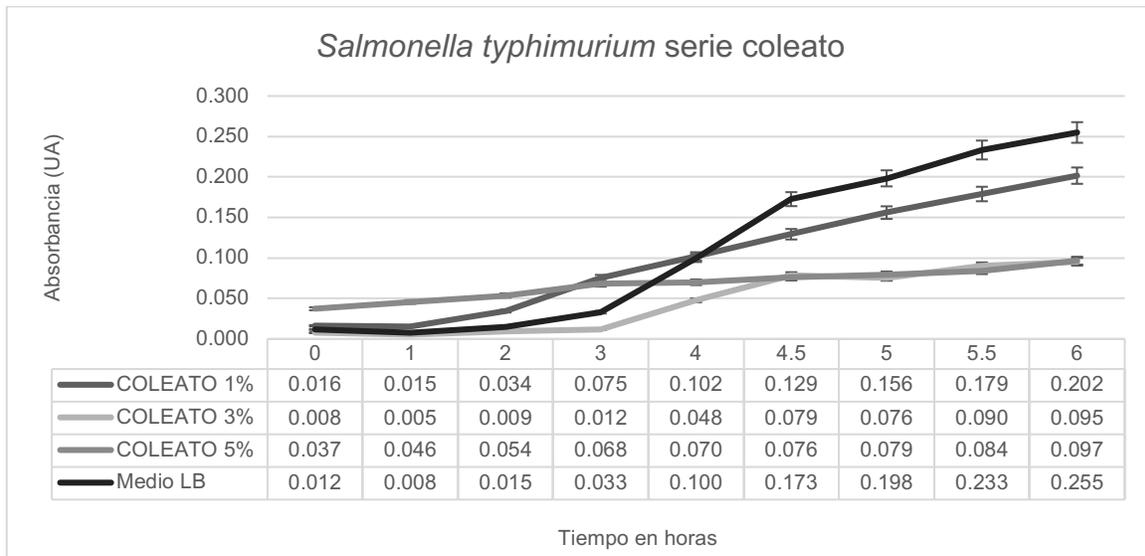


Figura 3. Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en medio LB suplementado con coleato de sodio al 1,3 y 5%.

Por otra parte, en la curva de crecimiento de *Salmonella choleraesuis* suplementada con colato de sodio se encontró un aumento en el crecimiento en la concentración de 1% en comparación con el medio no suplementado, sin embargo, en el resto de las concentraciones (3 y 5%) hubo un menor crecimiento de la bacteria (figura 4). Estos datos muestran que a bajas concentraciones de colato de sodio el crecimiento de *Salmonella choleraesuis* se ve favorecido, mientras que mayor concentración disminuye significativamente su crecimiento.

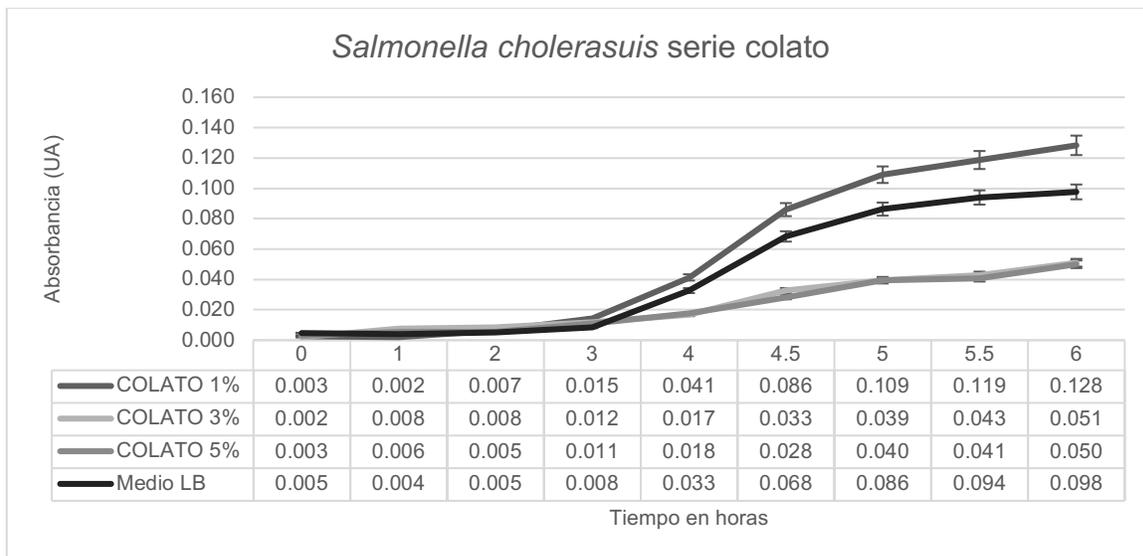


Figura 4. Curva de crecimiento de *Salmonella choleraesuis* en medio LB suplementado con colato de sodio al 1,3 y 5%.

Por último, el crecimiento de *Salmonella choleraesuis* en medio suplementado con coleato de sodio (figura 5), aunque hay menor crecimiento en los medios suplementados, de forma interesante observamos que en la concentración del 5% en las primeras 3 horas la bacteria presenta un mayor crecimiento incluso que la bacteria crecida en el medio sin suplementar, pero, alcanza la fase de meseta entre la hora 3 y 4 de cultivo, mientras que la bacteria en medio sin suplementar, y crecida en medio al 1% continuaron su crecimiento. Finalmente, observamos que la bacteria crecida en medio suplementado al 3% mostro un crecimiento menor en las primeras 5 horas de cultivo, y a partir de las 5.5 horas tuvo un mayor crecimiento mientras que en las demás condiciones ya se había alcanzado la fase de meseta. Estos datos nos hablan de la distinta capacidad de adaptación de *Salmonella choleraesuis* a la concentración de coleato de sodio.

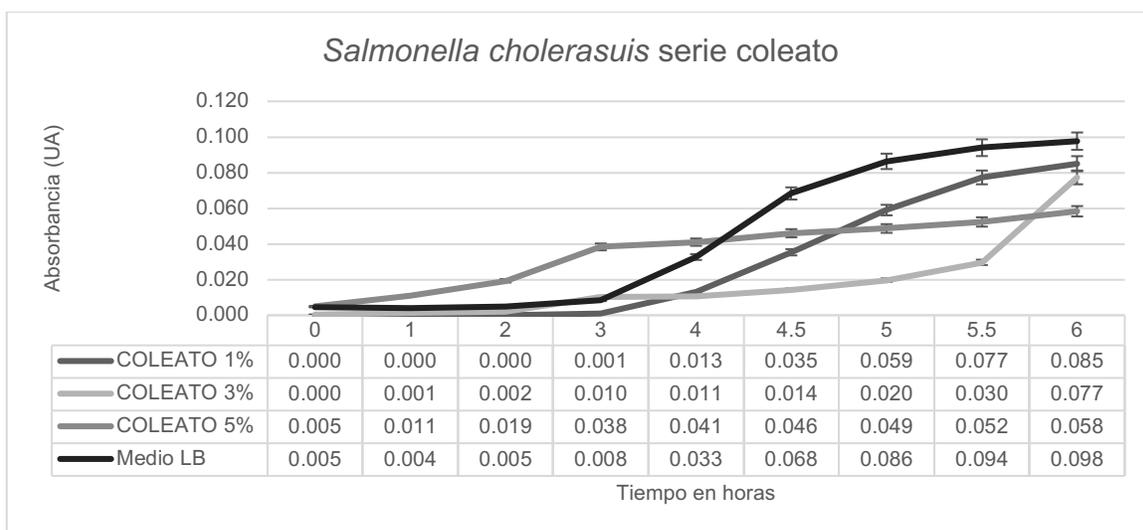


Figura 5. Curva de crecimiento de *Salmonella choleraesuis* en medio LB suplementado con coleato de sodio al 1, 3 y 5%.

Adicionalmente, se hizo la comparación del efecto de las sales biliares entre las dos cepas de *Salmonella* entérica que se utilizaron en este estudio. En el caso del colato de sodio observamos que el mayor crecimiento se dio en el medio suplementado al 1% de colato de sodio tanto en *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis*, siendo mayor para *S. typhimurium*. Con respecto a las bacterias crecidas en medio al 3% hay un mayor crecimiento de *Salmonella typhimurium* en comparación de *Salmonella choleraesuis*, bacteria que mostro el mismo crecimiento al 3 y 5%, siendo esta última concentración donde *S. typhimurium* tuvo el mismo comportamiento (Figura 6).

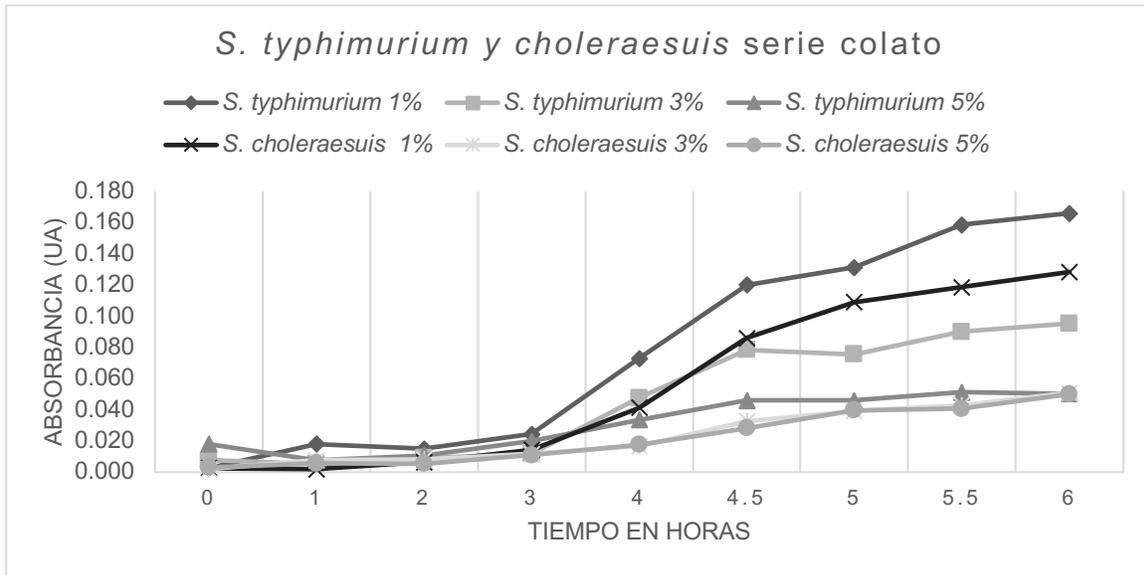


Figura 6. Comparación del crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* en medio suplementado con distintos porcentajes de colato de sodio

Por otra parte, la comparación de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* crecidas en medio suplementado con coleato de sodio el crecimiento de las bacterias fue similar a excepción de *S. typhimurium* en medio al 1% que mostro el mayor crecimiento (figura 7).

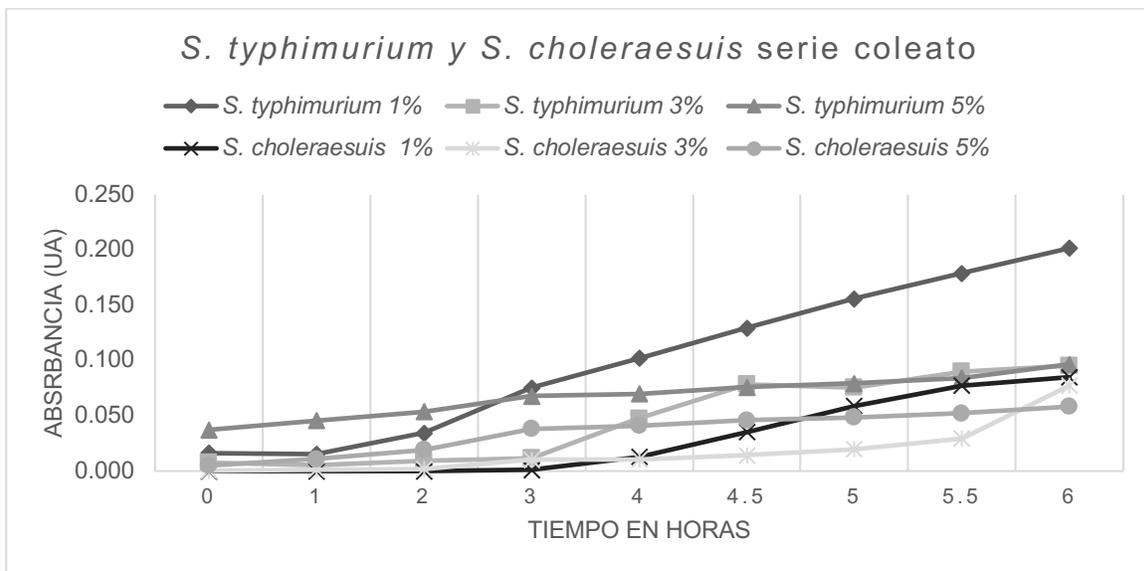


Figura 7. Comparación del crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* en medio suplementado con distintos porcentajes de coleato de sodio

## Efecto de la concentración de las sales biliares sobre la formación del biofilm de *Salmonella entérica*

En cuanto a la cuantificación del biofilm este se realizó por triplicado a partir de subcultivos de 24 horas de los serotipos de *Salmonella entérica* (*Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis*), crecidas en medio LB con y sin suplementar con sales biliares, a los mismos porcentajes que las curvas de crecimiento, en placas de 96 pozos, por el método de cristal violeta, obteniéndose los siguientes resultados.

En el caso de *S. typhimurium* crecida en medio suplementado con coleato de sodio observamos que la mayor formación de biofilm se dio a un porcentaje del 1%, mientras que al 3% se presentó la menor formación del biofilm, mientras que al 5% no hubo diferencia significativa, todas ellas con respecto a el control de la bacteria crecida en medio sin suplementar (Figura 8).

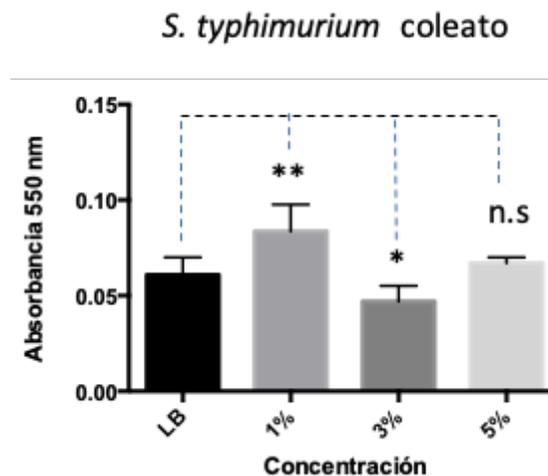


Figura 8. Efecto del coleato de sodio sobre la formación del biofilm de *S. typhimurium*. Cada columna representa la media y error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , n.s.: no significativo.

Para el biofilm de *S. typhimurium* en presencia de colato de sodio observamos un incremento en la formación del biofilm y esta fue mayor a una concentración del 3% (Figura 9).

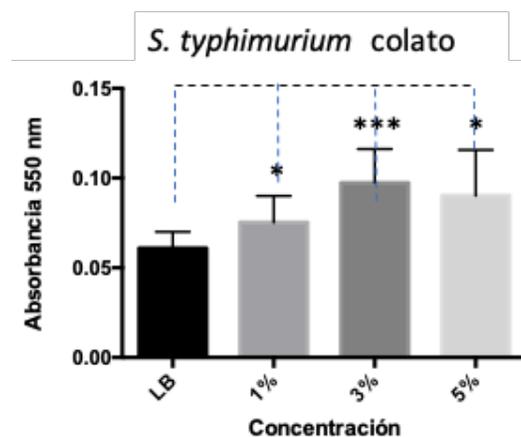


Figura 9. Efecto del colato de sodio sobre la formación del biofilm de *S. typhimurium*. Cada columna representa la media y error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , n.s.: no significativo

En el caso de *S. choleraesuis* no encontramos diferencias significativas en la formación del biofilm cuando la bacteria se creció en medio suplementado con distintos porcentajes de coleato de sodio (Figura10).

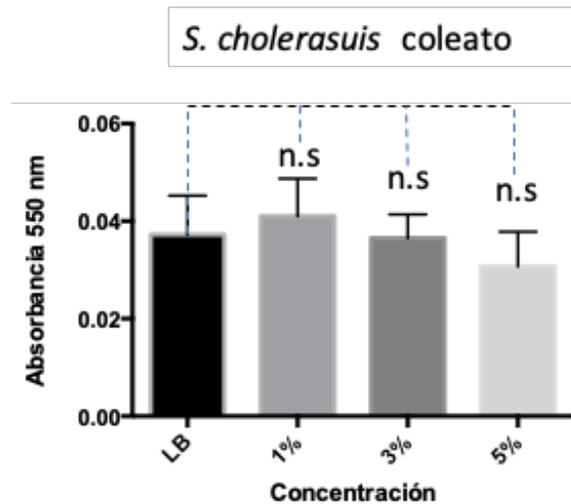


Figura 10. Efecto del coleato de sodio sobre la formación del biofilm de *S. choleraesuis*. Cada columna representa la media y error estándar de 3 experimentos independientes. n.s.: no significativo

Por último, observamos que *S. choleraesuis* solo mostro una mayor formación del biofilm cuando el medio fue suplementado con colato de sodio al 3%, mientras que al 1 y 5% no se encontraron diferencias significativas con respecto al control de la bacteria crecida en medio sin suplementar (figura 11).

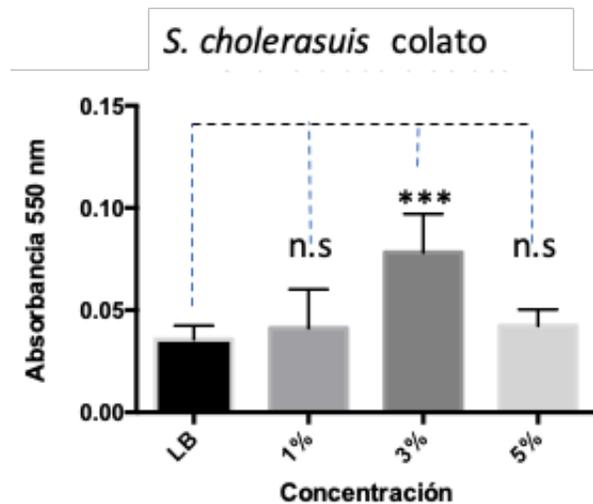


Figura 11. Efecto del colato de sodio sobre la formación del biofilm de *S. typhimurium*. Cada columna representa la media y error estándar de 3 experimentos independientes., \*\*\*  $p < 0.0005$ , n.s.: no significativo

## Conclusión

El crecimiento de los serotipos de Salmonella entérica estudiados en este trabajo se ve afectado negativamente en todos los medios LB suplementados con coleato y colato de sodio en comparación con las

bacterias que son crecidas en medio sin suplementar, sin embargo, se esperaría que al tener las propiedades previamente mencionadas las sales biliares fueran capaces de afectarlo aún más de lo que se demostró, además de que en algunos casos no existió un patrón conciso de crecimiento, por lo que serían necesarias más pruebas. En cuanto al crecimiento del biofilm observamos que la concentración de sales biliares puede favorecer la formación de esta estructura, pero esto es dependiendo del tipo de sal biliar y del serovar de Salmonella que se utilice, ya que nuestros resultados muestran que algunas cepas de Salmonella entérica no incrementan la formación del biofilm a pesar de la concentración de las sales biliares utilizadas. Por último, se requieren más experimentos para comprobar los resultados obtenidos en este trabajo

## Referencias

- Ajmera A, Shabbir N. Salmonella. [Updated 2022 Apr 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
- Ortega-Peña, Silvestre, & Hernández-Zamora, Edgar. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 79-88. <https://doi.org/10.24875/bmhim.m18000012>
- Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, J. S., & McLachlan, J. B. (2021). Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 624622. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Wahlig, T. A., Stanton, E., Godfrey, J. J., Stasic, A. J., Wong, A., & Kaspar, C. W. (2021). A Single Nucleotide Polymorphism in IptG Increases Tolerance to Bile Salts, Acid, and Staining of Calcofluor-Binding Polysaccharides in Salmonella enterica Serovar Typhimurium E40. *Frontiers in microbiology*, 12, 671453. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671453>
- Piñol Jiménez, F., Ruiz Torres, J., Segura Fernández, N., Proaño Toapanta, P., & Sánchez Figueroa, E. (2020). La vesícula biliar como reservorio y protectora del tracto digestivo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(1). Recuperado de <http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/259/788>