

Efecto de la concentración de glucosa en la biosíntesis de prodigiosina por *Serratia marcescens*

J. G. Lorén y J. Guinea

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Barcelona - 7

(Recibido el 13 de junio de 1977)

J. G. LOREN and J. GUINEA. *Effect of Glucose Concentration on the Biosynthesis of Prodigiosin by Serratia marcescens*. Rev. esp. Fisiol., 34, 247-252. 1978.

Serratia marcescens is an enterobacteria which produces a characteristic red pigment denominated prodigiosin.

To study the effect of glucose on the kinetics of this secondary metabolite, cultures of *Serratia marcescens* S10 were incubated at 30° C in the mineral medium GL, with glucose (2 g/l) as the carbon source. Prodigiosin production in relation to glucose consumption is studied, and parallel-wise, the effect of various concentrations of glucose on prodigiosin production.

The kinetics data show the close correlation between glucose consumption and the synthesis of prodigiosin. This substrate inhibits the synthesis of pigment in cultures grown on solid medium GL with concentrations of glucose up to 15 g/l.

Serratia marcescens es una enterobacteria caracterizada por la producción de un pigmento rojo denominado prodigiosina. Este pigmento es un metabolito secundario cuya biosíntesis se realiza a partir de acetato, alanina, serina, prolina y metionina (7, 11). La síntesis de prodigiosina puede ser inducida en células no proliferantes por diversos aminoácidos (7). Se han descrito algunos efectos antagónicos que condicionan la síntesis de este pigmento en poblaciones de *Serratia marcescens* (12-14).

El objeto del presente trabajo es el estudio de la cinética de la producción de prodigiosina en poblaciones proliferantes

de este microorganismo, respecto al consumo de glucosa. Un segundo aspecto es el que considera la inhibición de la biosíntesis del pigmento, en función de la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

Material y métodos

Organismos y medios de cultivo. La cepa *Serratia marcescens* S10 procede de un aislamiento verificado a partir de aguas naturales. *S. marcescens* SL, proviene de la Universidad de Liverpool. El medio de cultivo utilizado en todos los experimentos es un medio mineral, modificado del de

BUNTING (2), que contiene: K_2HPO_4 , 8 g; citrato amónico, 5 g; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,5 g; $Fe(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$, 0,02 g; NaCl, 0,5 g; agua destilada, c.s.p. 1 l, y concentraciones variables de glucosa, constituidas por 2, 4, 6, 8, 10, 15, 17 y 20 g/l. En todos los casos, la glucosa se esteriliza independientemente de las sales minerales. Los medios sólidos se obtienen por adición de 15 g/l de agar (Bacto-Agar, Difco). En ambos casos, el pH final del medio es de 7,0.

Control de la población bacteriana. Se ha llevado a cabo mediante la determinación del número viable, utilizando como medio de cultivo el Agar Nutritivo, Merck (AN). Muestras representativas de los cultivos se suspenden en Ringer 1/4 y se realizan diluciones sucesivas de estas suspensiones. Volúmenes de 0,1 ml, correspondientes a los distintos niveles de dilución, se siembran en placas de Petri de 10 cm, con AN. Las placas se incuban a 30° C durante 24 horas. Con las placas que contienen un número de colonias comprendido entre 90 y 150, se verifica el conteo total correspondiente a dos muestras problema con el mismo tiempo de incubación.

Determinación de la producción de prodigiosina. La determinación de la cantidad de prodigiosina producida por los cultivos de *Serratia marcescens* S10 se lleva a cabo mediante una modificación del método de HUBBARD y RIMINGTON (6). El crecimiento correspondiente a la población bacteriana problema, contenido en 10 ml de medio de cultivo, se centrifuga a 6.000 rpm durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante, reemplazándose por 3 ml de etanol clorhídrico (HCl al 1 % en etanol absoluto). La prodigiosina se extrae del sedimento por agitación y el extracto se separa de los restos celulares por una nueva centrifugación a 6.000 rpm. El proceso se repite dos veces más. El sobrenadante recogido en las tres operaciones (aproximadamente 9 ml), se ajusta a

10 ml en matraz volumétrico, con alcohol clorhídrico. El contenido en prodigiosina se determina espectrofotométricamente a 535 nm.

Control del consumo de glucosa. Se determinó en todos los experimentos, valorando la concentración de glucosa en el medio de cultivo mediante el método de la antrona. El protocolo experimental seguido se basa en un procedimiento analítico adaptado a la determinación del contenido de glucosa en cultivos bacterianos (5).

AMPc. Se prepara una solución acuosa de AMPc (Sigma Chemical Co.) 0,33 M. La concentración final de trabajo (3×10^{-2} M) se consigue por adición de 1 ml de la solución anterior a un tubo con 10 ml de cultivo.

Resultados

Producción de prodigiosina en función del consumo de glucosa. Las figuras 1 y 2 muestran la cinética de la producción de prodigiosina, en función de la concentración de glucosa en el medio de cultivo, respecto a poblaciones de células viables convenientemente controladas. En todos los casos, se observa una relación entre el consumo de glucosa y el incremento de la producción de prodigiosina. La máxima producción se alcanza hacia las 80 horas (15). Respecto a la población bacteriana, expresada por el logaritmo del número de células viables, el inóculo procede, en todos los casos, de una población en pleno crecimiento exponencial, trasladada a un medio fresco con idéntica temperatura, por lo que no se produce una fase de latencia apreciable.

La glucosa, expresada en mg/ml, con una concentración inicial de 2 g/l, desciende gradualmente en todos los casos para alcanzar un mínimo, inapreciable para el método de la antrona, a partir de las 60 horas.

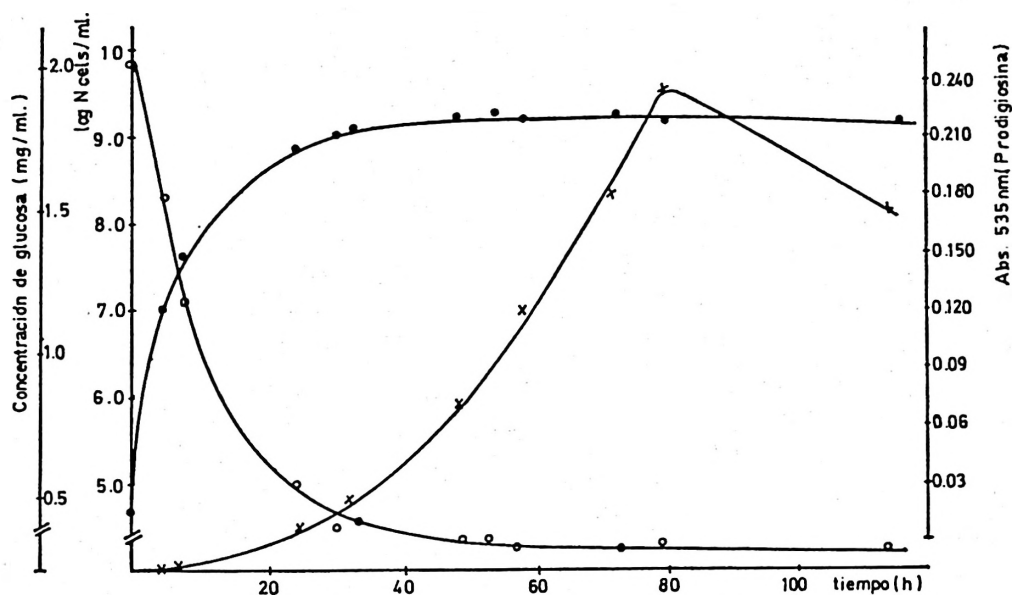


Fig. 1. Relación entre la síntesis de prodigiosina (x), concentración de glucosa en el medio de cultivo (O) y la concentración de células viables (●) respecto al tiempo de incubación, en poblaciones de *Serratia marcescens* S10 cultivadas en el medio mineral GL. Inóculo: 5×10^4 cel/ml. Valores medios de 12 experimentos.

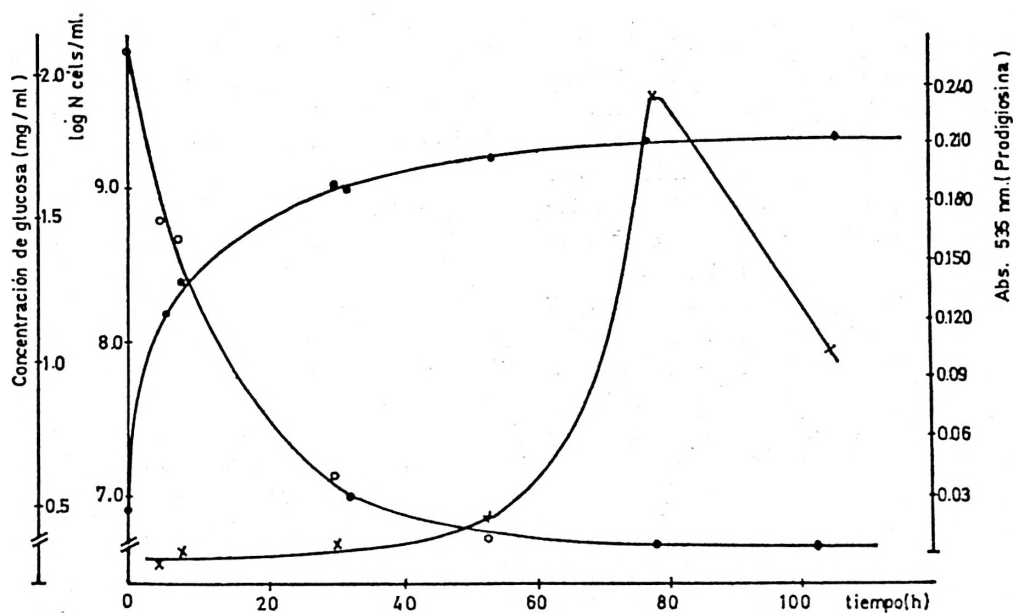


Fig. 2. Relación entre la síntesis de prodigiosina (x), concentración de glucosa en el medio de cultivo (O) y la concentración de células viables (●) respecto al tiempo de incubación, en poblaciones de *Serratia marcescens* S10 cultivadas en el medio mineral GL. Inóculo: 8×10^6 cel/ml. Valores medios de 8 experimentos.

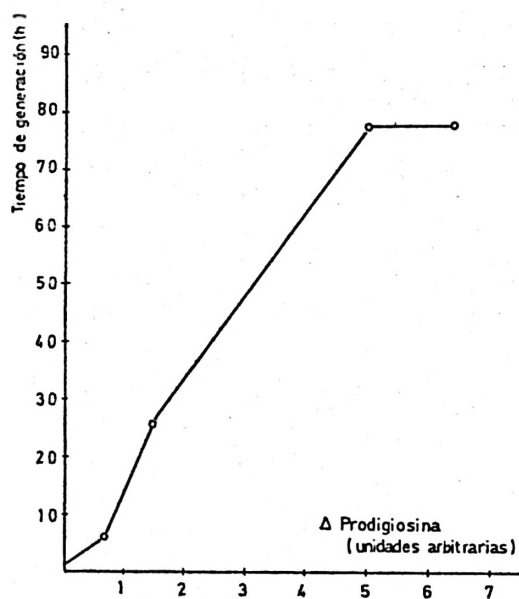


Fig. 3. Síntesis de prodigiosina en función del tiempo de generación en el medio mineral GL.

Paralelamente, la relación entre la concentración de glucosa del medio y la producción de prodigiosina se puede explicar gráficamente, utilizando un sistema que relacione el tiempo de generación y la síntesis del pigmento, expresada por el incremento de la absorción a 535 nm. La figura 3, que representa el promedio de 8 experiencias, pone de manifiesto un incremento irregular de la producción de prodigiosina, hasta alcanzarse un tiempo de generación de 2,6 horas. Al desaparecer del medio una concentración apreciable de glucosa (figs. 1 y 2), el incremento se hace máximo y constante. Este aumento cesa al alcanzarse un tiempo de generación de 72,8 horas, valor que expresa el cese de la multiplicación celular.

Efecto de concentraciones crecientes de glucosa sobre la síntesis de prodigiosina. En la tabla I se expresan los resultados obtenidos a distintos niveles de glucosa en la pigmentación de las colonias de *Serratia marcescens* S10. Las lecturas se han verificado, de un modo constante,

Tabla I. Efecto de los distintos niveles de glucosa en la pigmentación de las colonias de *S. marcescens* S10 y *S. marcescens* SL +: pigmentación positiva; —: ausencia de pigmentación; ±: pigmentación disminuida respecto a la de la cepa salvaje.

Cepa	Glucosa en el medio (g/l)							
	2	4	6	8	10	15	17	20
S10	+	+	+	+	±	—	—	—
SL	+	+	+	+	±	—	—	—

tomando como referencia el aspecto de las colonias a las 48 y 72 horas, respectivamente. El número de colonias por placa oscila entre 60 y 150. Concentraciones crecientes de glucosa de 2, 4, 6 y 8 g/l, no inhiben la síntesis de prodigiosina. A partir de una concentración de 10 g/l comienza a manifestarse el efecto inhibitor de este sustrato. Niveles superiores, del orden de 15 y 20 g/l, inhiben de tal modo la producción de prodigiosina que toda la población, manifestada en forma de colonias discretas desarrolladas en el medio GL, ha perdido la capacidad de acumulación de pigmento. Los resultados obtenidos con *S. marcescens* SL confirman los hallados con la cepa S10 de *Serratia marcescens*.

Discusión

Los resultados obtenidos aportan ideas originales sobre aspectos del comportamiento cromogénico de *Serratia marcescens*.

Es evidente la existencia de una interrelación que condiciona la producción de prodigiosina respecto a la concentración de glucosa del medio de cultivo en poblaciones proliferantes de *Serratia marcescens* S10. WEINBERG (12), ha señalado un efecto paralelo en poblaciones de células no proliferantes, de *S. marcescens* inducidas para la síntesis del pigmento. Una apreciación falsa del fenómeno consistiría en el supuesto que interpretase la producción de prodigiosina como un hecho indepen-

diente del consumo de glucosa, ya que el pigmento se produce al alcanzarse la fase estacionaria. La hipótesis se descarta al considerar el mismo fenómeno en medio sólido, con una concentración de glucosa de 20 g/l. En estas condiciones y pese a que la población entra en fase estacionaria, la producción de prodigiosina es nula en todos los casos.

En este mismo sentido, se ha demostrado la perfecta sincronización que condiciona la cinética de producción de prodigiosina respecto al descenso de la concentración de glucosa, obviamente relacionado con el número de células por ml. El nivel máximo alcanzado es el mismo para todos los casos (figs. 1 y 2), mientras que el incremento relativo de la acumulación de prodigiosina es una variable que se correlaciona con el consumo gradual de glucosa.

Las especulaciones que se pueden formular al estudiar este fenómeno, llevarían probablemente a un lugar común relacionado con muchos metabolitos secundarios (3, 4). Es enormemente atractivo pensar que la acumulación de prodigiosina sólo aparece cuando la célula se encuentra, en cierto modo, con la fuente de carbono y energía prácticamente agotada (1, 7). Esta hipótesis es concordante con la relación existente entre la síntesis de prodigiosina y el tiempo de generación de las poblaciones estudiadas (fig. 3).

En estas circunstancias, la prodigiosina, que es un metabolito dotado de una antibiosis, antifúngica y antibacteriana, comprobada (1), mantendría, en cierto modo, el equilibrio de las poblaciones de *Serratia* situadas en los hábitats naturales para esta bacteria que, como es conocido, aun tratándose de una enterobacteria, está perfectamente adaptada a hábitats como agua y suelos. Estableciendo un símil, esta situación podría compararse a la de la inducción de la producción de esporas por las bacterias capacitadas para ello.

De las gráficas comentadas y los resultados de las experiencias en medio sólido

con distintas concentraciones de glucosa, se planteó la posibilidad de estudiar este fenómeno como el resultado de una acción mediatizada por los niveles celulares de AMP_c. Para ello se han empleado todas las técnicas descritas para el estudio de comportamientos semejantes en otras bacterias gram-negativas (8-10). En ningún caso se ha podido demostrar una acción directa que conduzca a una situación clásica de represión por catabolito.

Resumen

Se estudia el efecto de la glucosa en la biosíntesis de prodigiosina, metabolito secundario producido por *Serratia marcescens*. Las poblaciones de *S. marcescens* S10 se incuban a 30° C en el medio mineral GL, con glucosa (2 g/l) como fuente de carbono.

Se estudia la cinética de producción de prodigiosina en función del consumo de glucosa y paralelamente el efecto de distintas concentraciones de glucosa respecto a la producción de prodigiosina.

Los resultados obtenidos muestran una estrecha relación entre el consumo de glucosa y la síntesis de prodigiosina por *S. marcescens* S10. Este sustrato inhibe la síntesis del pigmento de los cultivos en medio sólido con concentraciones de glucosa superiores a los 15 g/l.

Bibliografía

1. ABRAHAM, E. P. y FLOREY, H. W.: En «Antibiotics», Vol. 1 (H. W. Florey, E. Chain, N. G. Heatley, M. A. Jennings, A. G. Sanders, E. P. Abraham y M. E. Florey, eds.), Oxford University Press, Oxford, 1949, pág. 537.
2. BUNTING, M. I.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11, 25-32, 1946.
3. DEMAINE, A. L.: *Lloydia*, 31, 395-418, 1968.
4. DEMAINE, A. L.: En «Environmental Control of Cell Synthesis and Function» (A. C. R. Dean, S. J. Pirt y D. W. Tempest, eds.), Academic Press, Londres, 1972, página 345.
5. HERBERT, D., PHIPPS, P. J. y STRANGE, R. E.: En «Methods in Microbiology», Vol. 5B, Academic Press, Nueva York, 1971, pág. 266.

6. HUBBARD, R. y RIMINGTON, C.: *Biochem. J.*, **46**, 220-225, 1950.
7. HUSSIAN QADRI, S. M. y WILLIAMS, R. P.: *Texas Rep. Biol. Med.*, **30**, 73-83, 1972.
8. PASTAN, I. y PERLMAN, R.: *Science*, **169**, 339-344, 1970.
9. PERLMAN, R. y PASTAN, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 151-157, 1969.
10. RICKENBERG, H. V.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**, 353-369, 1974.
11. WASSERMAN, H. H., SHAW, C. K. y SYKES, R. J.: *Tetrahedron Letters*, **33**, 2787-2790, 1974.
12. WEINBERG, E. D.: En «Advances in Microbial Physiology», Vol. 4 (A. H. Rose y J. F. Wilkinson, eds.), Academic Press, Londres, 1970, pág. 1.
13. WILLIAMS, R. P., GOLDSMITH, M. E. y GOTT, C. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 177-181, 1965.
14. WILLIAMS, R. P., GOTT, C. L., QADRI, S. M. H. y SCOTT, R. H.: *J. Bacteriol.*, **106**, 438-443, 1971.
15. WILLIAMS, R. P.: *Appl. Microbiol.*, **25**, 396-402, 1973.
16. WILLIAMS, R. P., SCOTT, R. H., LIM, D. V. y QADRI, S. M. H.: *Appl. Env. Microbiol.*, **31**, 70-77, 1976.