

Universidad Miguel Hernández
Facultad de Ciencias Experimentales



BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

**Estudio del crecimiento y la autólisis de
Streptococcus pneumoniae a pH básico**

Selene Cuadrado Monte

Tutor: Manuel Sánchez Ángulo

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

2023-2024

Grado en Biotecnología

Resumen y palabras clave

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram-positiva conocida por ser la principal causa bacteriana de infecciones como la neumonía, la meningitis y la sepsis. En este estudio se investiga cómo el pH básico influye en el crecimiento y si afecta al proceso de autólisis mediado por la autolisina LytA, una enzima clave que degrada la pared celular bacteriana, facilitando la lisis celular y la liberación de componentes tóxicos que contribuyen a la patogénesis.

Para ello, se utilizó la cepa no virulenta R6CIB17 y la cepa mutante M32 de *S. pneumoniae* que carece de la autolisina LytA. El estudio evaluó el crecimiento bacteriano bajo condiciones de pH básico utilizando recuento de viables y técnicas de microscopía óptica. Los resultados mostraron diferencias significativas en el comportamiento de ambas cepas. Estos hallazgos son relevantes para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el control de infecciones neumocócicas, considerando la creciente resistencia a los antibióticos.

Palabras clave: autólisis, pH básico, crecimiento microbiano, agregación celular

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium known as the leading bacterial cause of infections such as pneumonia, meningitis, and sepsis. This study investigates how basic pH influences the growth and the autolysis process mediated by the autolysin LytA, a key enzyme that degrades the bacterial cell wall, facilitating cell lysis and the release of toxic components that contribute to pathogenesis.

For this purpose, the non-virulent R6CIB17 strain and the mutant strain M32 of *S. pneumoniae* lacking the LytA autolysin were used. The study evaluated bacterial growth under basic pH conditions using viable counts and optical microscopy techniques. The results showed significant differences in the behavior of both strains. These findings are relevant for the development of new therapeutic strategies in controlling pneumococcal infections, considering the growing resistance to antibiotics.

Keywords: autolysis, basic pH, microbial growth, cell aggregation.

Contenido

Introducción	3
La bacteria <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
Pared celular neumocócica.....	4
Respuesta autolítica del neumococo: la autolisina LytA.....	5
Antecedentes y objetivos	7
Materiales y métodos.....	9
Cepas utilizadas.....	9
Medio de cultivo.....	9
Mantenimiento de las cepas	9
Crecimiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
Crecimiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en medio básico.....	11
Recuento de viables	11
Microscopía óptica	13
Resultados.....	14
Crecimiento de la cepa R6CIB17 de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
Crecimiento de la cepa R6CIB17 en medio básico.....	16
Resultados a pH 8,42	16
Resultados a pH 9,03	21
Curva de crecimiento de la cepa mutante M32 de <i>S. pneumoniae</i>	25
Crecimiento de la cepa mutante M32 en medio básico.....	27
Curva de crecimiento	27
Recuento de viables.....	29
Microscopía óptica.....	30
Discusión.....	32
Conclusiones y proyecciones futuras.....	35
Bibliografía	36

Introducción

La bacteria *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, también conocida como neumococo, es una bacteria Gram-positiva, patógeno oportunista, que coloniza de manera asintomática el tracto respiratorio superior. Entre un 27-65% de los niños y menos del 10% de los adultos son portadores de esta bacteria, lo que implica una relación de comensalismo entre la bacteria y el hospedador. Es la principal causa bacteriana de infecciones como la otitis media, la neumonía adquirida en comunidad, la sepsis y la meningitis (1).

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó a *Streptococcus pneumoniae* como uno de los 12 patógenos prioritarios (1). Está expandida tanto en países desarrollados como no desarrollados, llevando a 1.6 millones de muertes al año, la mitad de los cuales son niños. La transmisión del neumococo requiere contacto estrecho con un hospedador, siendo esta más común durante los meses más fríos y secos.

Las estrategias para luchar contra esta bacteria se basan en la vacunación y en el tratamiento con antibióticos (2). Se utilizan vacunas conjugadas neumocócicas, gracias a las cuales se ha reducido la enfermedad invasiva causada por varios serotipos, los cuales se incluyen en la vacuna. A pesar de los avances en este tipo de vacunas, las estrategias de vacunación actuales chocan con varias dificultades. Por un lado, debido a las diferencias en la inmunohistoquímica del polisacárido capsular de la bacteria, se han descrito 94 serotipos distintos, de los cuales entre 30 y 40 se han asociado con enfermedades neumocócicas (2). Otros obstáculos son la falta de protección en países en desarrollo debido a la predominancia de serotipos diferentes o la insuficiente accesibilidad a los programas de vacunación.

En cuanto a la terapia con antibióticos, desde la década de 1960 se ha detenido casi por completo el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos, a pesar del aumento de la resistencia antimicrobiana. La resistencia de *S. pneumoniae* a los antibióticos β -lactámicos es ahora generalizada, con un 35% de aislamientos no susceptibles a la penicilina en EE.UU. en 2004 y niveles de hasta el 50% en algunas regiones del sur de Europa. También está aumentando la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos (3).

Ante esta situación, un requisito fundamental para desarrollar nuevas estrategias de control es comprender la interacción que se da entre el neumococo y las células del hospedador. La interacción está medida principalmente por los componentes externos, el polisacárido capsular, la pared celular bacteriana y las proteínas ancladas en la pared celular (4).

Pared celular neumocócica

La pared celular del neumococo es una estructura compleja compuesta de múltiples capas de peptidoglicano (mureína) y ácidos teicoicos (TA) unidos covalentemente a la pared celular o a la membrana lipídica, estos últimos se denominan ácidos lipoteicoicos (LTA). La estructura del peptidoglicano consiste en unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidos a través de enlaces $\beta(1,4)$. Las unidades repetitivas de TA y LTA tienen una estructura química idéntica, lo cual es una propiedad única de los neumococos. La estructura de la unidad repetitiva en el TA y LTA neumocócico es de una complejidad química inusual e incluye colina, un aminoalcohol que es abundante en eucariotas y se encuentra raramente en bacterias (2,4).

Los grupos de fosforilcolina presentes en el ácido teicoico de la envoltura del neumococo están implicados en múltiples funciones fisiológicas. Son reconocidos por la proteína C reactiva (CRP) y la L-ficolina, elementos del sistema inmunitario que inducen la activación del complemento, protegiendo al huésped contra infecciones. *S. pneumoniae* tiene un requisito auxotrófico único para la colina, la cual toman del medio y la incorporan en las unidades repetitivas de LA y LTA.. Los neumococos pueden crecer en presencia de análogos de colina como la etanolamina, que se incorpora en el TA, pero esto causa alteraciones funcionales y morfológicas (2,4).

La pared celular neumocócica contiene diversas proteínas de superficie diferentes de las involucradas en la síntesis y renovación de la pared celular, las proteínas de unión a colina (CBPs, *Choline Binding Proteins*). Estos polipéptidos están presentes en todas las cepas neumocócicas y su número varía de 13 a 16. En este grupo se incluyen hidrolasas de mureína, que tienen un papel clave en la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y la división bacteriana, así como adhesinas a células del hospedador y otros factores de virulencia. Además, la familia CBP también incluye varias enzimas líticas codificadas por bacteriófagos (2,4).

Los miembros de la familia CBP (*Figura 1*) tienen una estructura modular con un módulo activo y un módulo de unión a colina que ancla las proteínas a la pared celular. Este módulo contiene repeticiones de unos 20 aminoácidos. La familia CBP incluye factores de virulencia para adhesión y colonización.

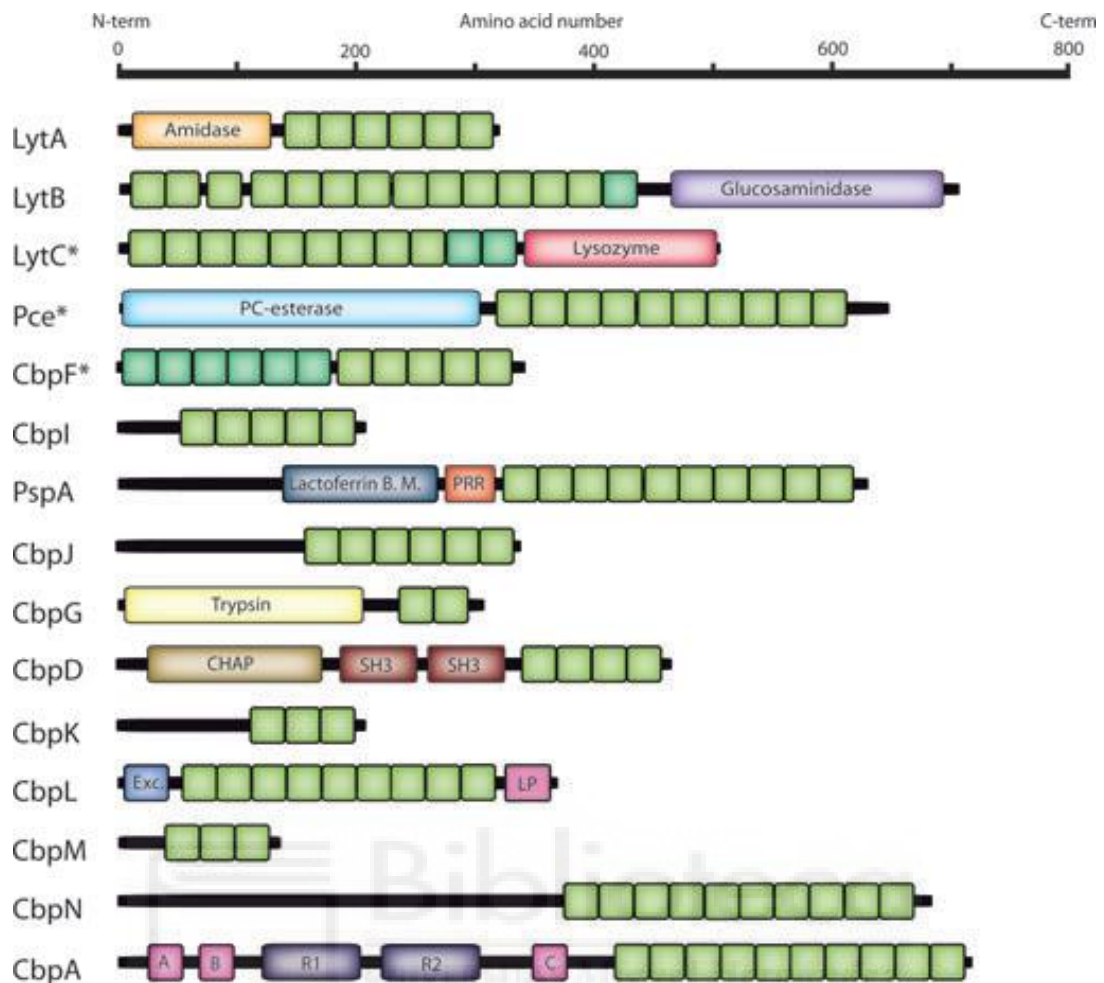


Figura 1. Organización modular de las proteínas de unión a colina (CBPs). Las proteínas de la familia CBP comparten un módulo N-terminal o C-terminal de unión a colina formado por repeticiones homólogas de aproximadamente 20 aminoácidos (representados por cuadrados verdes). Por otro lado, presentan un módulo catalítico o funcional que llevan a cabo diferentes actividades. (Pérez-Dorado I, Galan-Bartual S, Hermoso JA. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. 2012).

Respuesta autolítica del neumococo: la autolisina LytA

El neumococo tiene una respuesta autolítica, que se induce durante la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria, y lleva a una lisis excesiva de cultivos *in vitro*. La inducción de la respuesta autolítica de *S. pneumoniae* fue descubierta en 1900, y más tarde caracterizada en los años 20 por Avery *et al.* (5). Décadas más tarde, la autólisis se relacionó con la lisis causada por la penicilina, se clonó el gen de la autólisis *lytA* y se determinó la estructura del dominio asociado a la pared celular.

LytA es una amidasa responsable la autólisis celular, a partir de la cual media las sustancias tóxicas que dañan las barreras endoteliales y epiteliales y permite al neumococo acceder al torrente sanguíneo y diseminarse por el cuerpo. Se ha demostrado que el

neumococo está protegido de la activación lítica de LytA durante el crecimiento exponencial, pero no en la fase estacionaria (4).

LytA está estructuralmente organizada como una proteína de dos módulos, con un módulo N-terminal, que cataliza la escisión del enlace N-acetilmuramoil-L-alanina de la cadena peptidoglicano neumocócico, y un módulo de unión a colina en el C-terminal. Este último es responsable de la unión de la pared celular, y está formado por un tándem de seis repeticiones imperfectas de 20 residuos, conocidos como motivos o repeticiones de unión a colina (5,6).

El análisis estructural de LytA ha proporcionado información valiosa sobre su mecanismo de acción. El dominio de unión a colina ancla LytA a la pared celular del neumococo, mientras que el dominio catalítico escinde específicamente los enlaces de peptidoglicano, provocando la ruptura de la pared celular y la posterior lisis bacteriana. Los estudios han identificado mutaciones específicas que alteran la actividad autolítica de LytA y pueden afectar la virulencia neumocócica (5,6).

LytA se encuentra principalmente en el citoplasma (~95%) durante la fase exponencial de crecimiento, con solo una pequeña fracción (~5%) asociada a la pared celular extracelular. Durante esta fase, la autolisina no induce autólisis debido a su baja concentración en la pared celular. Sin embargo, en la fase estacionaria, la fracción extracelular de LytA aumenta gradualmente hasta alcanzar aproximadamente el 30%, lo que precede a la autólisis y la liberación masiva de la autolisina. A pesar de esta acumulación, el mecanismo exacto de translocación de LytA desde el citoplasma a la pared celular sigue sin estar claro, dado que no posee un péptido señal reconocible para su secreción (5).

Desde una perspectiva terapéutica, se sabe que LytA contribuye a la lisis de neumococos inducida por penicilina y vancomicina. Apoyando la relación entre el tratamiento con antibióticos y LytA, se ha demostrado que la resistencia a la penicilina y vancomicina entre los aislados clínicos está parcialmente relacionada con la actividad de LytA (7).

Además, algunos estudios han demostrado que la expresión y actividad de LytA están reguladas por las condiciones ambientales y factores de estrés (9). Por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes, la densidad celular y la presencia de otros factores bacterianos pueden influir en la actividad autolítica. La regulación de LytA es importante no sólo para el proceso de autólisis sino también para la liberación de ADN extracelular que promueve la transformación genética y la adquisición de resistencia a los antibióticos.

La importancia de LytA va más allá de su papel en la autólisis. Se ha demostrado que la autolisina participa en la formación de biofilms (8), estructuras multicelulares que protegen a las bacterias de las condiciones adversas y los tratamientos antimicrobianos. La capacidad

del neumococo para formar biofilms en superficies mucosas es un factor clave en su patogenicidad y persistencia en el huésped.

En resumen, LytA no solo es un factor crucial en la autólisis de *Streptococcus pneumoniae*, sino que también desempeña roles importantes en la patogénesis, la formación de biofilms y la respuesta a los tratamientos antibióticos. Comprender los mecanismos que regulan la actividad de LytA y su interacción con otros componentes celulares es esencial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y mejorar los enfoques existentes para el control de las infecciones neumocócicas.

Antecedentes y objetivos

La autólisis en *Streptococcus pneumoniae* es un proceso crítico que afecta la dinámica de crecimiento y la liberación de componentes celulares, y se regula a través de varios mecanismos. En estudios anteriores se demostró que la variación del pH del medio puede ser un factor de regulación de la autólisis. Encontramos tres artículos destacables donde se evidencia el efecto del pH del medio sobre la autólisis del neumococo.

En 1929, Goebel y Avery (9) publicaron un estudio centrado en la autólisis de *Streptococcus pneumoniae*. En este artículo se discute el efecto del pH en la autólisis del neumococo. Los autores observaron que la tasa de autólisis varía significativamente con el pH del medio de cultivo, realizando experimentos ajustando el pH del medio y midiendo la actividad autolítica. La autólisis se ve favorecida en medios ligeramente alcalinos, observándose una mayor descomposición celular a pH más altos, mientras que, en medios ácidos, la tasa de autólisis se reduce considerablemente, indicando que un pH bajo inhibe la actividad de las enzimas responsables de la autólisis. El efecto del pH sugiere que las enzimas involucradas en este proceso tienen una actividad óptima en un rango de pH alcalino.

En 1977, Ronda-Lain *et al.* (10) examinaron el papel de la autolisina pneumocócica en la liberación de fagos progenitores y en la lisis inducida por fagos en células bacterianas. Este estudio reveló que la autolisina es crucial no solo para la degradación de la pared celular que facilita la liberación de nuevos fagos, sino también para la lisis de las células bacterianas durante la infección por fagos. Además, se observó que la acidificación del medio, que puede resultar de la actividad metabólica bacteriana o de la acción de fagos, aumenta la actividad de la autolisina. Este hallazgo sugiere que la acidificación del medio puede inducir o potenciar la actividad autolítica de la autolisina, facilitando así la liberación de fagos y contribuyendo a la dinámica de la población bacteriana en condiciones ácidas.

Por último, en 2008, Piñas *et al.* (11) estudiaron cómo el estrés ácido induce la autólisis en esta bacteria a través de una vía independiente del péptido de comunicación (CSP) y de la proteína reguladora ComE. En este estudio, se observó que, bajo condiciones de estrés ácido, *S. pneumoniae* activa un mecanismo de autólisis que no depende de las vías de señalización usuales mediadas por CSP y ComE, indicando la existencia de una ruta alternativa para la regulación de la autólisis en respuesta a cambios ambientales adversos.

En el estudio realizado en este trabajo se comprueba el efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* (12), en este caso bajo condiciones de pH básico, utilizando como medio de cultivo el THY (Todd Hedwit Yeast). Este es un medio de cultivo estándar que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del neumococo.

Por otra parte, se estudia el efecto de estas condiciones en el crecimiento de una cepa mutante de *Streptococcus pneumoniae*, la cepa M32, la cual no posee la autolisina LytA (13). Se verá la diferencia con la cepa silvestre, utilizando para ello recuento de viables y técnicas microscópicas.



Materiales y métodos

Cepas utilizadas

Para la realización de los experimentos, se utilizó la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae*, obtenida de una colección de laboratorio. Esta es una cepa no virulenta, ya que no presenta la cápsula característica de las cepas patogénicas, por lo tanto, presenta un nivel de bioseguridad 1 (BSL1) (12). Los instrumentos y cultivos que fueron manipulados en el laboratorio estaban en condiciones asépticas, haciendo uso de un mechero Bunsen para garantizar la esterilidad y evitar contaminaciones.

Por otra parte, se utilizó el mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* (13), el cual carece de la autolisina LytA. También se obtuvo de una colección de laboratorio ya existente.

Medio de cultivo

El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo en medio líquido THY (Todd Hewitt-Yeast). Este es un medio general utilizado principalmente para el crecimiento de estreptococos.

El medio fue preparado en el laboratorio, en tandas de 400 mL. Para ello, se añadieron a 400 mL de agua destilada 12 gramos de medio Bacto Todd Hewitt (Oxoid) y 2 gramos de Bacto Extracto de levadura (Oxoid). Se repartió el volumen preparado en botes de 100 mL y se midió el pH utilizando para ello un pHmetro de la marca Crison. El valor obtenido fue de 7,3, un pH neutro.

Para ajustar el pH del medio para obtener un valor de pH básico, se utilizó una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 M. Utilizando una pipeta Pasteur se fue añadiendo la disolución utilizando una pipeta Pasteur a uno de los botes con 100 mL de medio, hasta obtener un valor de pH de 11.

Por último, el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 1,2 atmósferas de presión de vapor. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Mantenimiento de las cepas

Las cepas utilizadas se guardaban congeladas en alícuotas a -80 °C para su posterior descongelación y uso en los experimentos realizados. Las alícuotas se obtuvieron de un primer inóculo, el cual fue preparado en un tubo con 4 mL de medio THY y 50 µL de inóculo. Los tubos utilizados fueron de la marca SASRTEDT de 5 mL de volumen y de paso óptico de 1 mL. Este fue incubado en un baño de agua a 37 °C, y se fue midiendo la densidad óptica en espectrofotómetro marca ZUZI modelo 4201/50 a 600 nm, hasta que esta alcanzó el valor de 0,4.

Una vez alcanzado este valor, se detuvo el crecimiento, pasando el tubo a un baño con agua y hielo. Se añadieron 400 μ L de glicerol puro y se homogeneizó la disolución por agitación. Finalmente se obtuvo una concentración de glicerol al 10%. Se distribuyó la disolución final en alícuotas de congelación, añadiendo en cada una de ellas 400 μ L. Se etiquetaron los tubos con la cepa correspondiente, la densidad óptica medida en el momento y la fecha en la que se preparó la alícuota.

Para realizar la congelación se utilizó la técnica de ultracongelación con nieve carbónica y etanol, la cual consiste en poner los tubos rodeados de hielo seco en un recipiente y se añade etanol. Tras un par de minutos el contenido de los tubos queda congelados, y se almacenan a -80 °C para su posterior uso.

Crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*

Para el crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* se prepararon el día anterior al seguimiento del crecimiento 4 tubos de ensayo, en los cuales se añadieron 4 mL de medio de cultivo THY a pH 7,3. Uno de ellos sirvió como control de esterilidad, para comprobar que la única bacteria que crece es la que interesa, además de servir como blanco para las medidas en espectrofotómetro. En los tres tubos restantes se añadieron 50, 100 y 200 μ L de las alícuotas congeladas. Los tubos se depositaron en un baño termostatzado a temperatura inferior a 15 °C, para que la bacteria permanezca en estado de latencia hasta el día siguiente, cuando comenzará el seguimiento de la curva de crecimiento. Se dejó programado un temporizador que encendía el baño a una hora determinada de la madrugada para que se caliente a 37 °C y comience el crecimiento de *S. pneumoniae*. Tras aproximadamente 3 horas de crecimiento la bacteria se encuentra en su fase exponencial de crecimiento. De esa forma se evita que el cultivo llegue a la fase estacionaria y se active la autólisis. Tras medir la densidad óptica a 600 nm se escogió el tubo con un valor menor a 0,3 y se diluyó para obtener una densidad óptica por debajo de 0,05 y así comenzar el seguimiento de la curva de crecimiento. Para ello, se calculó la dilución necesaria, y se prepararon de nuevo dos tubos de ensayo, donde se añadió la cantidad necesaria de medio de cultivo THY precalentado a 37 °C y el volumen del tubo de ensayo con la bacteria en fase exponencial que sea necesario.

Se depositaron los nuevos tubos de ensayo en el baño a 37 °C y se tomaron medidas de la densidad óptica a 600 nm cada 20 minutos, hasta que esta llegó a su fase exponencial, a un valor de densidad óptica por debajo de 0,4.

Para la cepa mutante de *S. pneumoniae* se realizó el protocolo de manera distinta debido a su lento crecimiento. En este caso, se prepararon el día anterior 3 tubos, también con 4 mL de medio THY a pH 7,3 cada uno. El primero sirvió de control, y en los otros dos

tubos se añadieron 200 μ L de la alícuota congelada. Se llevó al baño termostatzado y se programó el temporizador a una hora determinada para que comience el crecimiento de la bacteria una vez alcanza los 37 °C. La bacteria mutante llega a su fase de crecimiento exponencial tras aproximadamente 7 horas. Se siguió el crecimiento midiendo cada 20 minutos la densidad óptica a 600 nm, y una vez alcanza un valor de 0,4 aproximadamente, se realizó el cambio a medio THY con pH básico. Destacar que, durante el crecimiento de la bacteria mutante, los tubos se agitaron para poder medir de manera correcta la densidad óptica ya que tiende a sedimentar muy rápidamente. Se tomaron datos de la densidad óptica antes y después de agitar los tubos.

Crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico

El siguiente protocolo se realizó de igual manera tanto para la cepa R6CIB17 de *S. pneumoniae* como para el mutante M32. Se estableció un cultivo exponencial a 37 °C y en un volumen de 4 mL y se dejó crecer hasta que alcanzó una DO_{600} de 0,4. En ese momento se dividió el cultivo en dos alícuotas de 2 mL. Se diluyó el medio de cultivo añadiendo 2 mL del cultivo inicial en 2 mL de medio THY a pH 7,3 precalentado a 37 °C. Al diluir a la mitad el cultivo, la densidad óptica quedaba cercana a 0,2 por lo que continúa en la fase de crecimiento exponencial. A partir de ese momento se consideró como el tiempo 0 y se tomaron mediciones de densidad óptica, viables y microscopía a los tiempos indicados.

Se ensayaron dos medios básicos a pH distinto. El pH más básico se consiguió diluyendo el cultivo con 2 mL de medio THY a pH 11 con lo que el pH final era de 9,03. Un pH menos básico se consiguió realizando previamente una mezcla al 50% de medio THY pH 7,3 y medio THY pH 11 para conseguir el medio básico. De esa forma el pH final del cultivo era de 8,42.

Finalmente, tras realizar el seguimiento de la curva de crecimiento por completo, se tomaron mediciones del pH del medio.

Recuento de viables

Para la realización del recuento de viables se utilizaron placas de agar sangre de las marcas Bioagar y BD.

Se tomaron muestras a los tiempos 0, 40 y 80 minutos de los tubos control y básico, y se realizaron diluciones seriadas para comprobar la viabilidad de las bacterias a dichos tiempos. Para la realización de las diluciones se utilizó una placa multipocillo, donde previamente se prepararon pocillos con 90 μ L de medio THY neutro, a una temperatura de 4

°C, para parar el crecimiento de las bacterias en el momento de la toma de muestras. Esto se realizó por duplicado para cada una de las muestras.

Las diluciones se llevaron a cabo tomando 10 μ L de los tubos control y básico, añadiéndolos al primer pocillo con los 90 μ L de medio y homogeneizando con la micropipeta. A continuación, se toman otros 10 μ L del primer pocillo y se pasan al segundo, volviendo a homogeneizar. Esto se realiza hasta llegar al último pocillo, donde la dilución será la correspondiente a su número de pocillo. Este proceso se puede ver de manera más esquemática en la *Figura 2*.

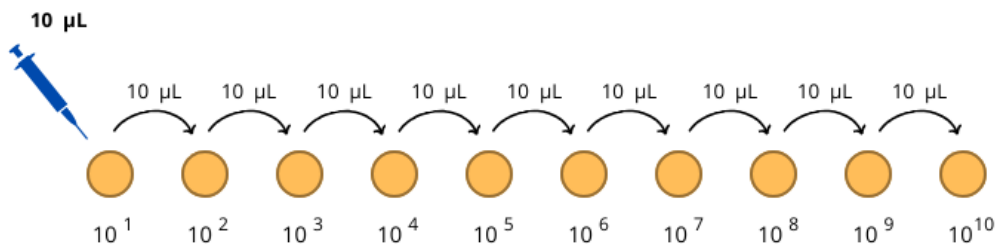


Figura 2. Diluciones realizadas para el recuento de viables. Se comienza pipeteando 10 μ L del medio de crecimiento donde las bacterias están proliferando en 90 μ L en el primer pocillo, y a continuación, tras homogeneizar, se pasan 10 μ L del primer pocillo al segundo. Esto se realiza hasta llegar a la dilución de 10^{10} .

Las diluciones se cultivan en placas de agar sangre, añadiendo 10 μ L de cada una de las diluciones depositados en una gota, que se deja secar y a continuación se lleva a la incubadora a 37 °C hasta el día siguiente.

Para el recuento de viables se utilizó una lupa y se contaron las colonias de las gotas donde podían ser discriminadas de manera individual.

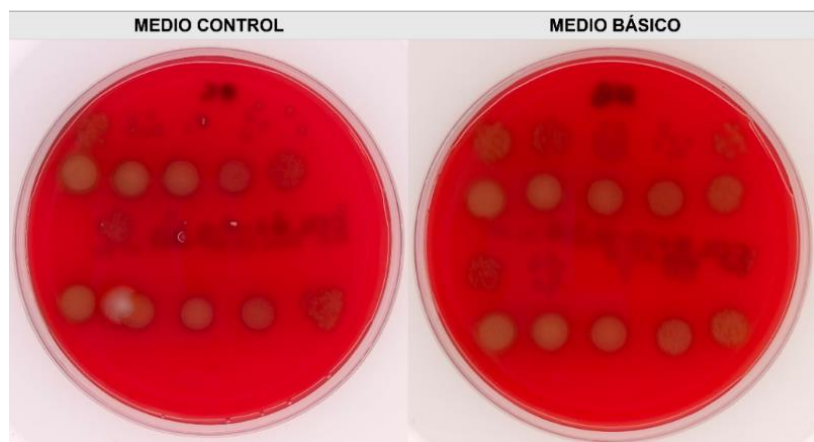


Figura 3. Placas de agar sangre con colonias de *Streptococcus pneumoniae*. Se observan las diluciones realizadas por duplicado desde 10^{10} en la esquina superior derecha de la placa. La imagen de la izquierda corresponde a las colonias crecidas en medio control a tiempo 0', mientras que la imagen de la derecha a las colonias crecidas en medio básico a tiempo 0'.

Para el cálculo de las concentraciones se hizo la media de las colonias obtenidas en cada una de las diluciones del duplicado, y se multiplicó este valor por 100 y por el factor de dilución para obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Microscopía óptica

Se tomaron muestras para microscopía óptica cada 20 minutos. Para ello, se tomaron 50 µL del cultivo de la bacteria en tubos Eppendorf y se les añadieron 5 µL de formaldehído 10% para conseguir una concentración final de 1%, para fijar las muestras. Seguidamente, se almacenaron a 4 °C, hasta su posterior observación mediante microscopía óptica.

Para el análisis de las muestras y la visualización de la morfología de ambas cepas se utilizó un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX5. La toma de las muestras se realizó tomando 5 µL de cada uno de los tubos Eppendorfs en los cuales se habían tomado las muestras a los tiempos correspondientes del experimento. Se depositaron en un portaobjetos, y se cubrió la muestra con un cubreobjetos.

Se ajustó y enfocó el microscopio a un aumento de 40x en primer lugar, y seguidamente a un aumento de 100x, utilizando en este último aceite de inmersión para la correcta visualización de las muestras.

Se tomaron 5 fotos de cada una de las muestras tomadas, utilizando para ello una cámara OPTIKA 4083.13H. Dichas fotos se analizaron y se utilizaron para posteriores conclusiones en cuanto a la morfología de las distintas cepas en los diferentes medios.

Resultados

Crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae*

Se realizó este experimento en múltiples ocasiones, y en todas ellas se pudo observar que el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* R6CIB17 no variaba considerablemente en ninguna, por lo que solamente se mostrará el resultado de uno de los experimentos. Un cultivo O/N fue dividido en tres alícuotas con diferente grado de dilución (50, 100 y 200 μL) tal y como está descrito en materiales y métodos. Posteriormente se midió la DO_{600} de los tres cultivos cada 20 minutos, durante 5 horas y 40 minutos. Los datos obtenidos se representaron gráficamente, obteniendo la *Figura 4*.

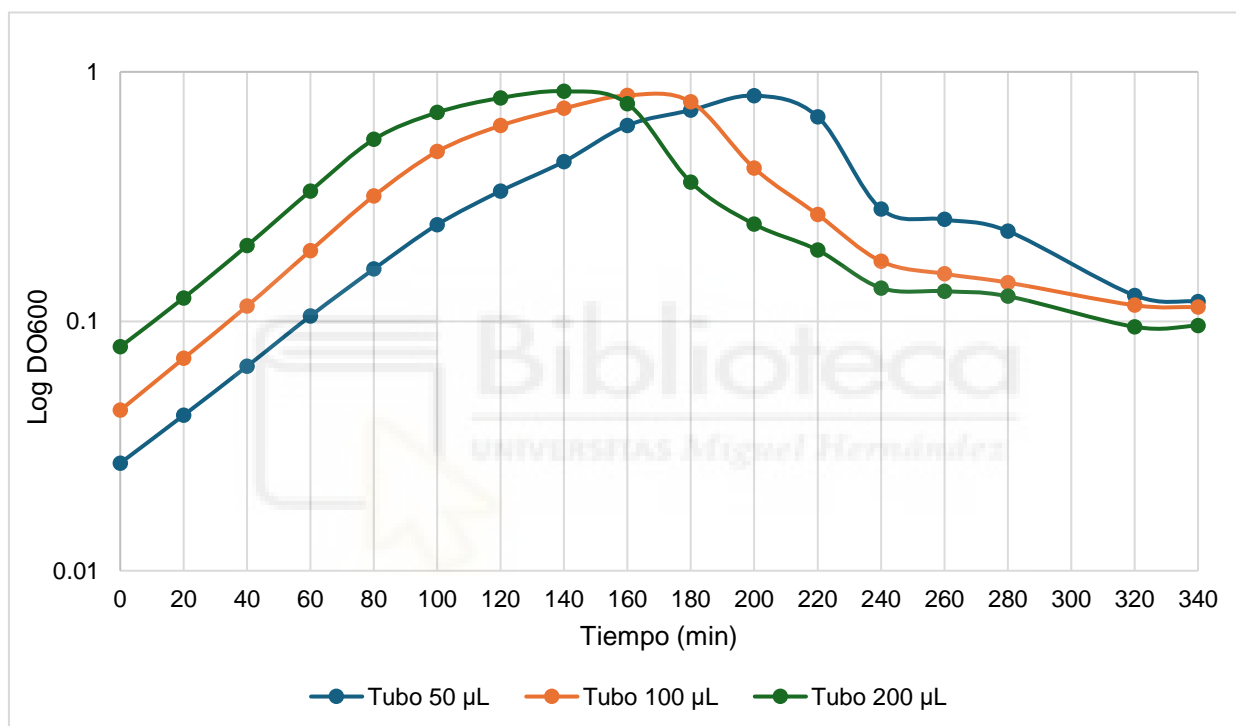


Figura 4. Logaritmo de la densidad óptica frente al tiempo de un cultivo en medio THY de la cepa R6CIB17, a diferentes concentraciones de inóculo inicial.

Se observa que la curva de crecimiento consta de un aumento considerable de la densidad óptica durante los primeros 200 minutos, si tomamos de referencia el tubo de 50 μL . Esto corresponde con la fase exponencial o de crecimiento de la bacteria. Tras este aumento, se observa una estabilización de la densidad óptica que se corresponde con la fase estacionaria y luego una caída de la misma. Esto es debido inicialmente a que la bacteria comienza a formar cadenas que acaban sedimentando, para finalmente comenzar la autólisis en la fase de muerte.

Para cada una de las concentraciones estudiadas, se observa una relación con el tiempo que tarda en alcanzar el máximo de densidad óptica. Se ve cómo el máximo de

densidad óptica de la concentración a 200 μL se alcanza en menor tiempo que en las demás concentraciones.

Por otro lado, con los datos de DO_{600} recopilados, es posible realizar el cálculo de la velocidad de crecimiento y del tiempo de generación de *Streptococcus pneumoniae* R6CIB17. Para ello, utilizamos las fórmulas adecuadas:

Velocidad de crecimiento: $\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{t}$, donde μ es la velocidad de crecimiento, X la densidad óptica a cierto tiempo, X_0 la densidad óptica a tiempo 0, y t el tiempo transcurrido entre n_0 y n. Las unidades son min^{-1} .

Tiempo de generación: $\tau = \frac{\ln 2}{\mu}$, donde τ es el tiempo de generación y μ es la velocidad de crecimiento de la bacteria.

Se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación para el crecimiento del tubo de 50 μL , pues en este se puede observar el crecimiento desde el principio. Se calcula solamente para la fase exponencial del crecimiento, debido a que es en esta donde se puede observar adecuadamente el tiempo que tarda la bacteria en dividirse y la velocidad a la que lo hace.

Los datos de los cálculos realizados se representaron gráficamente para visualizar de manera correcta cómo variaba la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación a lo largo del tiempo en la fase exponencial de la cepa R6CIB17. Estas representaciones gráficas se observan en la *Figura 5* y *Figura 6*.

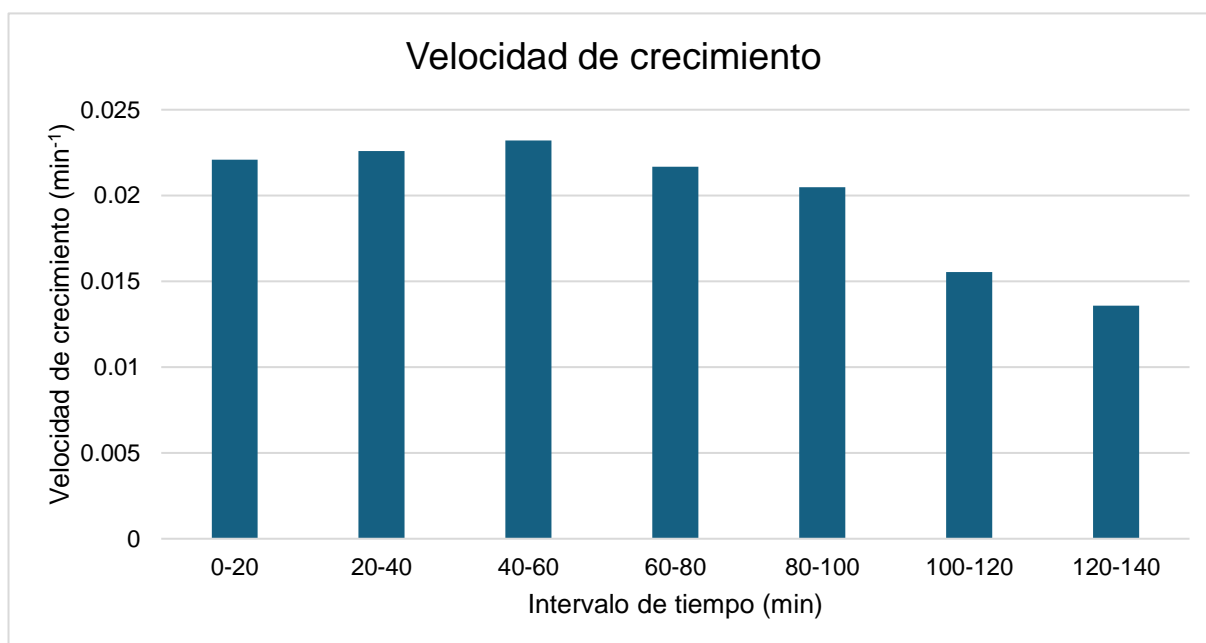


Figura 5. Velocidad de crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio THY en condiciones de pH neutro (7,3). El eje x representa el intervalo de tiempo en el cual se ha calculado dicha velocidad.

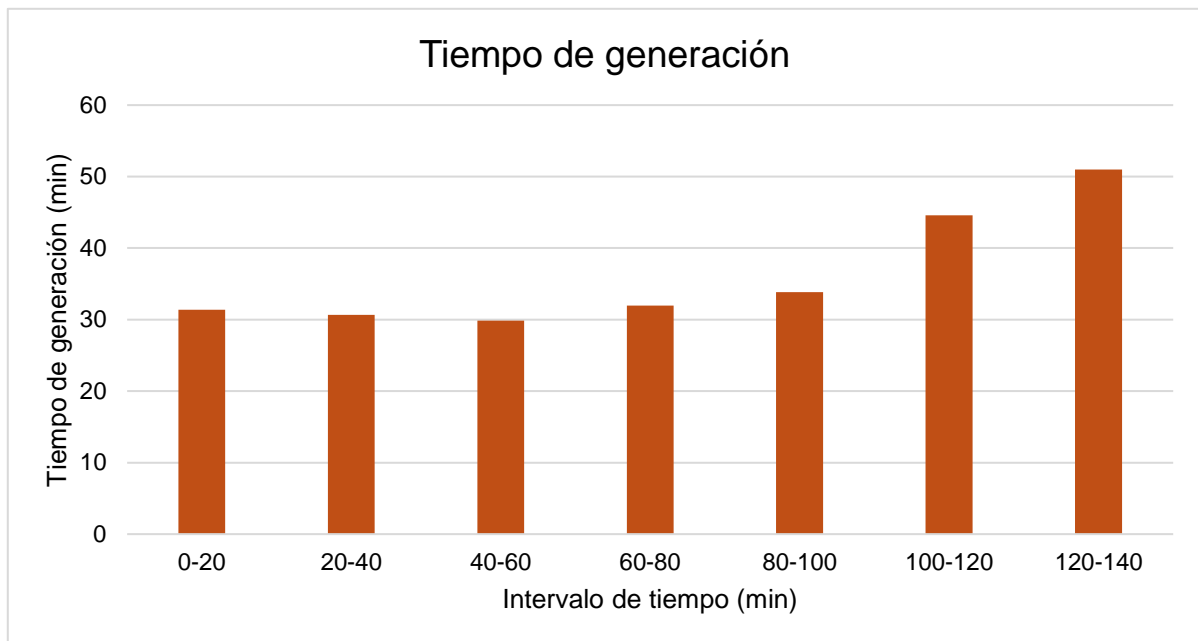


Figura 6. Tiempo de generación de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio THY en condiciones de pH neutro (7,3). El eje x representa el intervalo de tiempo en el cual se ha calculado dicho tiempo.

En las figuras se observa con claridad cómo la velocidad de crecimiento es inversamente proporcional al tiempo de generación, siendo este mayor a menor velocidad de crecimiento que presenta la cepa bacteriana.

La cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* presenta una velocidad de crecimiento media de $0,019 \text{ min}^{-1}$, y un tiempo de generación de 36,19 minutos, cuando crece exponencialmente en un medio THY en condiciones de pH neutro y a 37°C .

Crecimiento de la cepa R6CIB17 en medio básico

Se realizaron múltiples curvas de crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae*. Estas fueron muy similares entre ellas, por lo que se mostrará el resultado de una representando al resto.

Para evaluar cómo el pH básico afecta el crecimiento de la bacteria, se realizaron experimentos en dos condiciones de pH diferentes, 8,42 y 9,03, tal y como se describe en materiales y métodos.

Resultados a pH 8,42

Curva de crecimiento

Se tomaron medidas de la DO_{600} durante 480 minutos. Estos se representaron gráficamente, obteniendo la *Figura 7*.

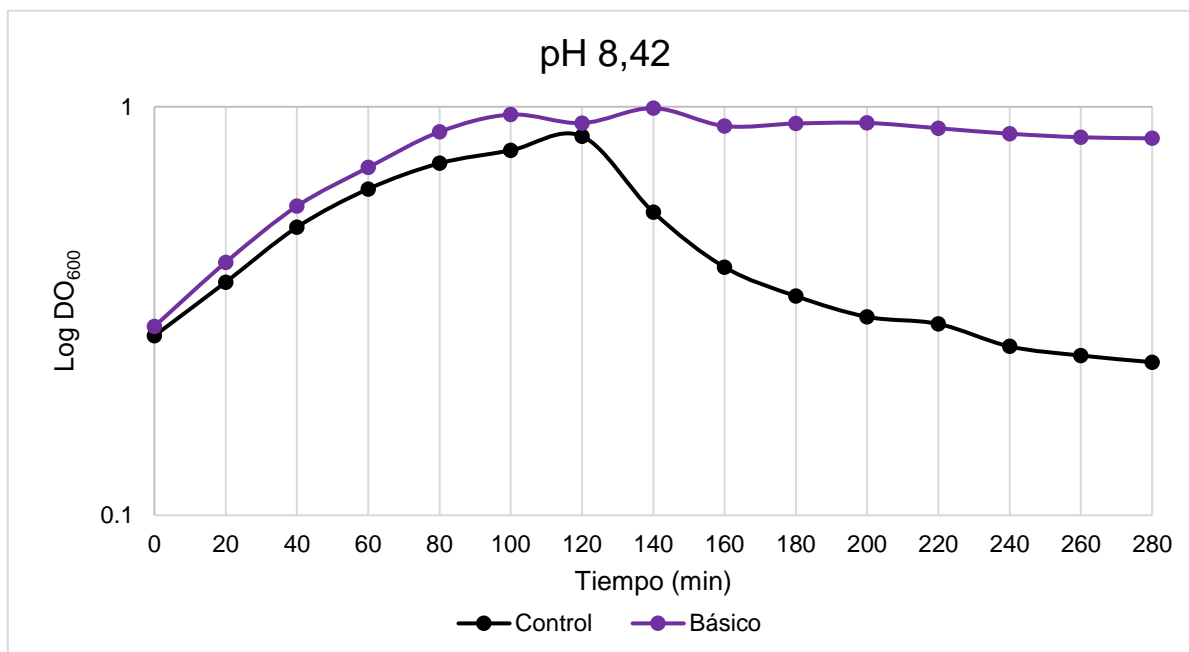


Figura 7. Logaritmo de la densidad óptica frente al tiempo en minutos para las medidas tomadas del crecimiento de un cultivo en medio básico pH 8,42 (línea morada) comparado con un cultivo a pH normal (línea negra).

En la *Figura 7* se observa cómo a un pH básico de 8,42 el cultivo sigue creciendo de manera muy parecida al cultivo control. Sin embargo, a diferencia de éste, al llegar al final de la fase estacionaria no hay una bajada de la DO₆₀₀. Esto es debido a que en el medio básico la bacteria no floculaba y se quedaba suspendida en el medio, a diferencia del control, el cual se observa que su DO₆₀₀ comienza a descender a partir de los 120 minutos.

También se calcularon los parámetros de velocidad de crecimiento y tiempo de generación. Se representaron gráficamente, obteniendo la *Figura 8* y la *Figura 9*.

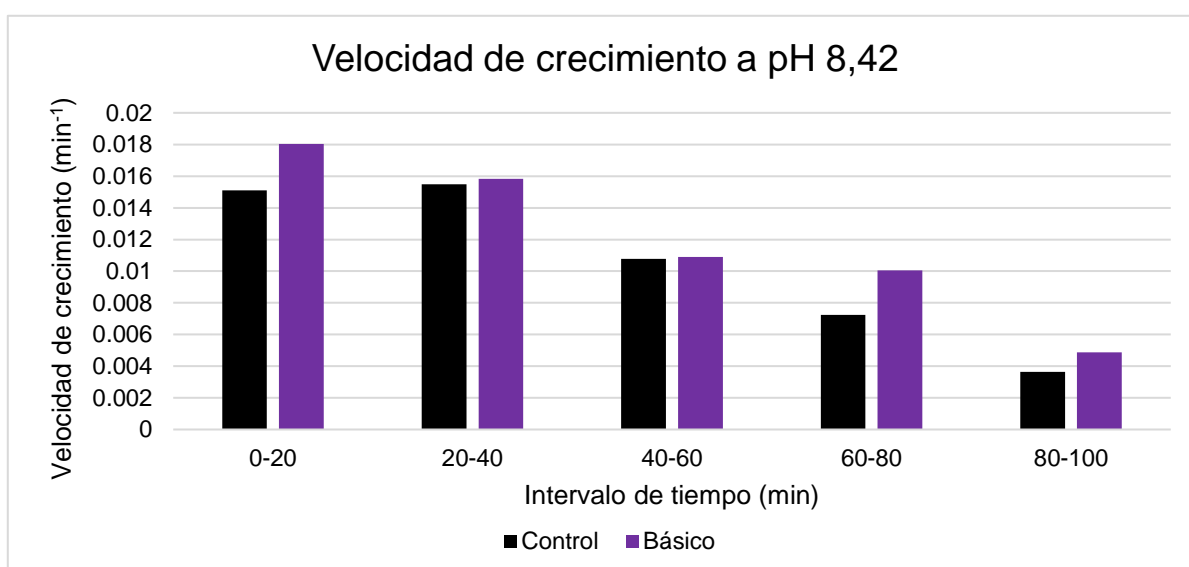


Figura 8. Velocidad de crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 8,42 (barras moradas) comparada con la velocidad de crecimiento en medio control (barras negras).

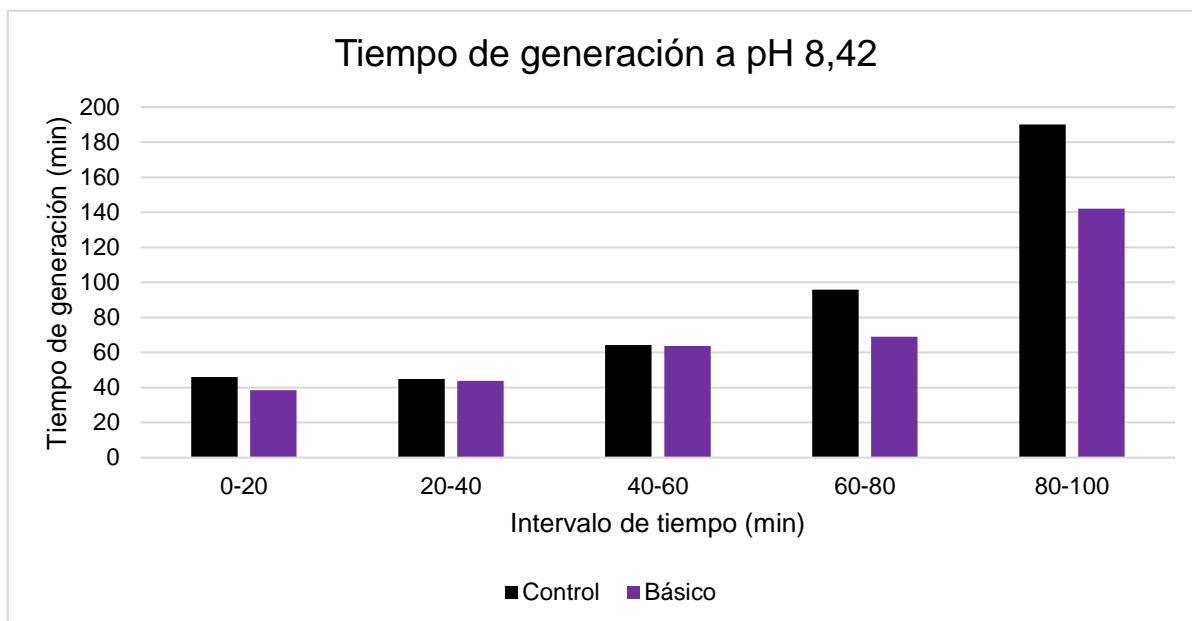


Figura 9. Tiempo de generación de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 8,42 (barras moradas) comparada con el tiempo de generación en medio control (barras negras).

En la *Figura 8* se observa que a pH 8,42, la velocidad de crecimiento de la cepa R6CIB17 es comparable a la del medio control, pues ambas son bastante parecidas, con la diferencia de que la velocidad del medio control parece disminuir cuando las bacterias entran en fase estacionaria. Del mismo modo, en la *Figura 9*, el tiempo de generación, que es inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento, no presenta diferencias significativas entre el medio básico y el control.

Se midió por otro lado el pH del medio de crecimiento una vez finalizado el seguimiento de la densidad óptica. Para el medio control, se obtuvo un pH de 4,95. Para el medio básico, el pH final del experimento fue de 5,91. Como se observa, el crecimiento de *S. pneumoniae* tanto en un medio neutro como en un medio básico, acidifica el medio debido a la producción de ácidos orgánicos por el metabolismo de la bacteria.

Recuento de viables

Se realizó el recuento de viables tal y como se describe en materiales y métodos. Se representaron gráficamente las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹), en escala semilogarítmica para una correcta visualización de los resultados.

En la *Figura 10* se observa cómo conforme aumenta el tiempo de incubación, aumentan las unidades formadoras de colonias, tanto en el medio control como en el medio a pH 8,42.

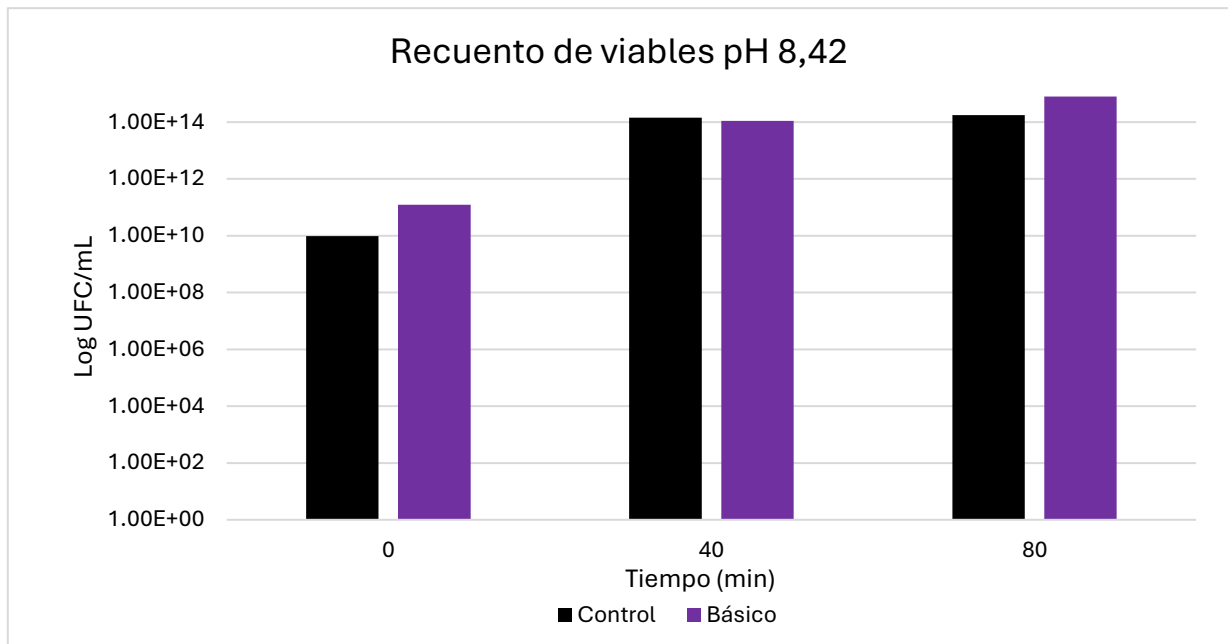


Figura 10. Efecto del pH 8,42 en los cultivos de neumococo a diferentes tiempos. Las barras negras representan el cultivo control y las barras violetas el cultivo a pH 8,42.

Microscopía óptica

Se tomaron muestras de microscopía tal y como se explica en materiales y métodos, a los tiempos 0, 40, 80 y 120 minutos. Las fotografías tomadas a estos tiempos se pueden observar en la *Figura 11*. Destacar que la morfología de la bacteria era la misma tanto en medio control como en medio básico, las diferencias radican en la formación de agrupaciones y flóculos.

En el medio control se observó que conforme aumentaba el tiempo de incubación de la bacteria, esta iba formando flóculos y agrupaciones, los cuales podemos observar en las fotografías de la *Figura 11*. Estos flóculos aumentaban su tamaño a mayor tiempo, observándose así a tiempo 80' algunos de pequeño tamaño, y a tiempo 180' se ven flóculos de gran tamaño, los cuales no se pudieron captar en su totalidad en el campo de la fotografía. Estos flóculos sedimentan y por eso se observa la bajada de densidad óptica.

En cuanto al medio básico, se observó que en este las bacterias no formaban las agrupaciones que se vieron en el medio control. En este caso, se veía que conforme aumentaba el tiempo de incubación, había más cantidad de bacterias en el medio, pero estas estaban formando cadenas de tamaño pequeño y medio.

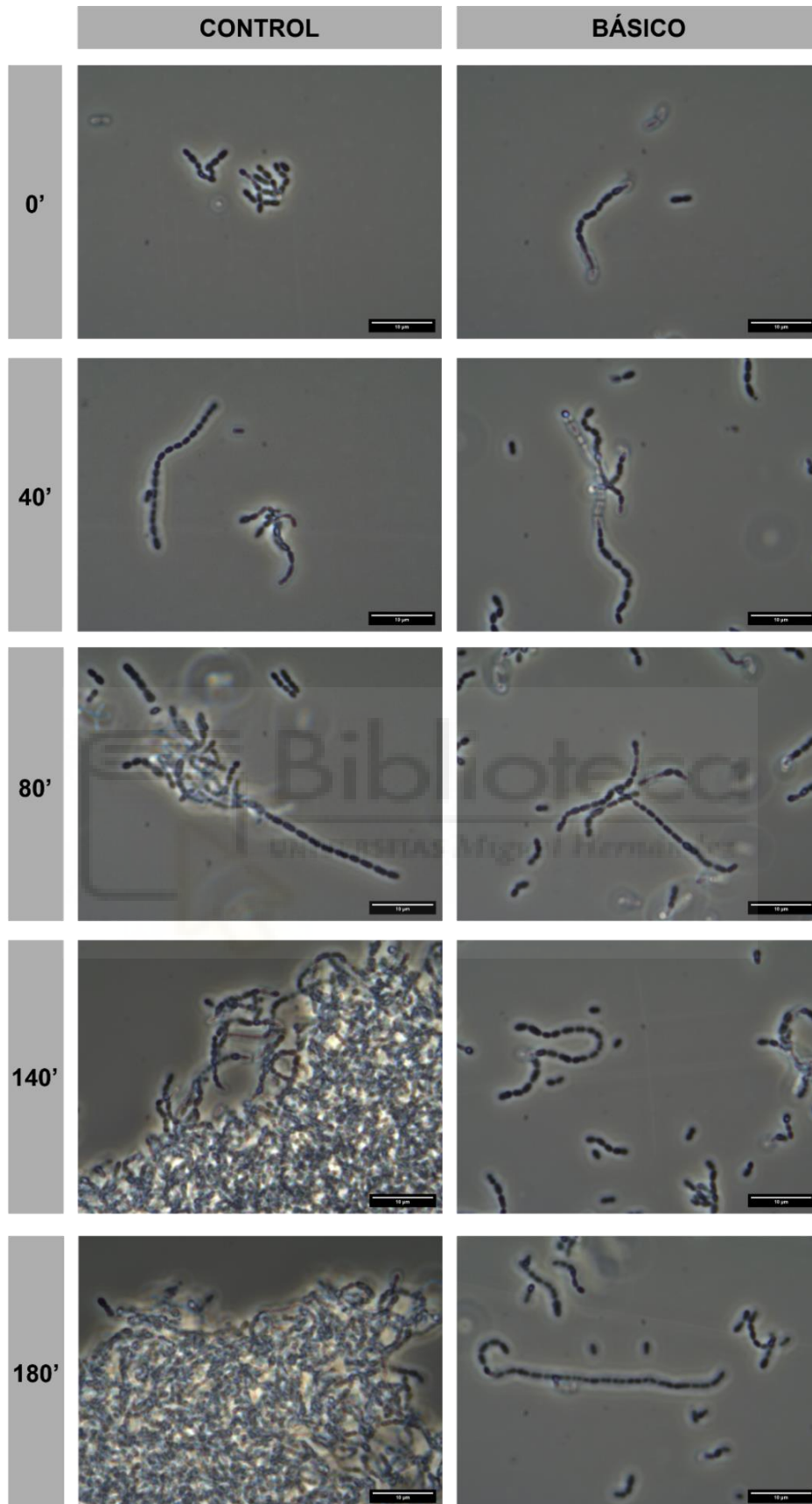


Figura 11. Muestras de la cepa R6CIB17 de *S. pneumoniae* al microscopio óptico a diferentes tiempos de crecimiento. Las imágenes de la izquierda corresponden a las bacterias crecidas en medio control, mientras que las de la derecha a las bacterias crecidas en medio básico con pH 8,42. La barra de tamaño corresponde a 10 micras.

Resultados a pH 9,03

Curva de crecimiento

En este caso, se tomaron medidas de la DO_{600} durante 180 minutos, debido a que a partir de ese momento la DO_{600} de ambos cultivos se igualaba. Los datos recopilados se representaron gráficamente, obteniendo la *Figura 12*.

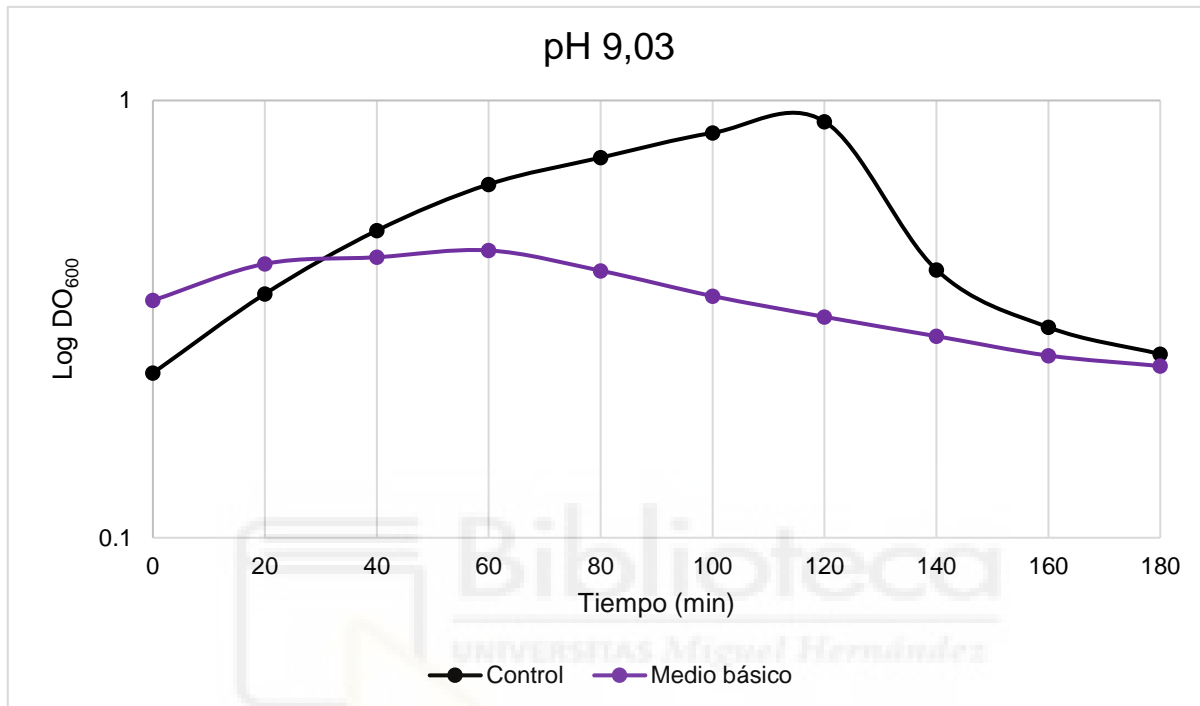


Figura 12. Logaritmo de la densidad óptica frente al tiempo en minutos para las medidas tomadas del crecimiento de un cultivo en medio básico pH 9,03 (línea morada) comparado con un cultivo a pH normal (línea negra).

Mientras que el cultivo en el medio THY normal sigue creciendo normalmente hasta alcanzar la fase estacionaria, el cultivo a pH de 9,03 crece a mucha menor velocidad durante los primeros 20 minutos y luego detiene su crecimiento.

Por otro lado, también se realizó el cálculo de la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación. Se representaron gráficamente los resultados, obteniendo la *Figura 13* y *Figura 14*.

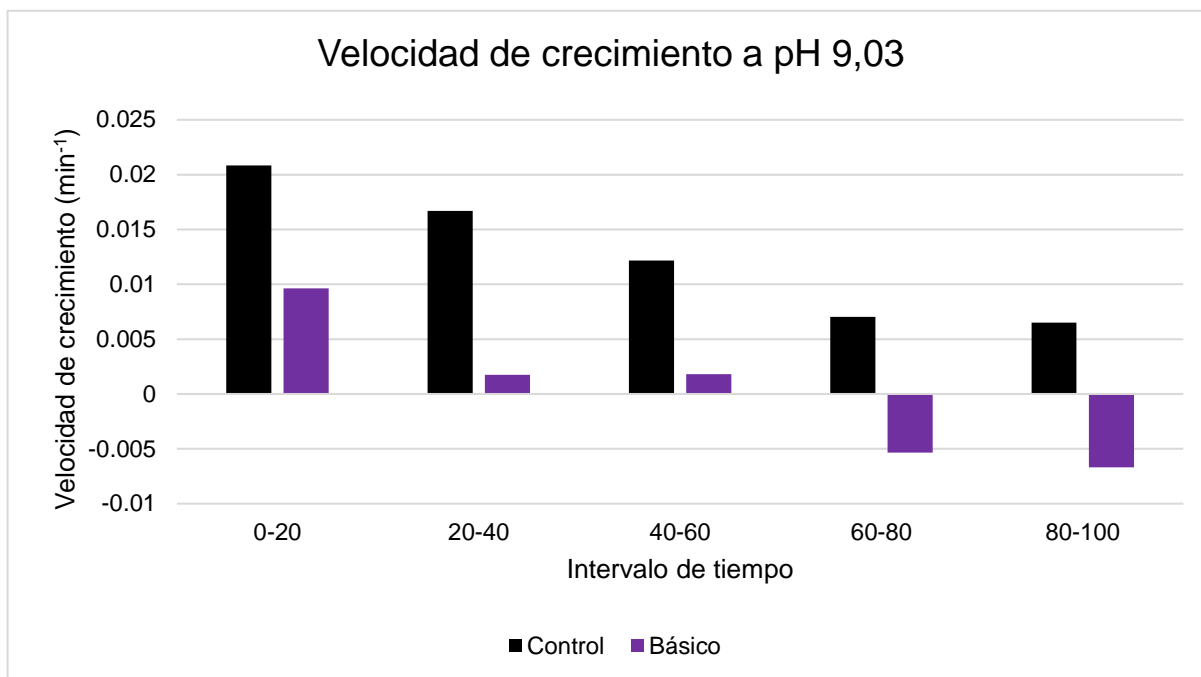


Figura 13. Velocidad de crecimiento de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 9,03 (barras moradas) comparada con la velocidad de crecimiento en medio control (barras negras).

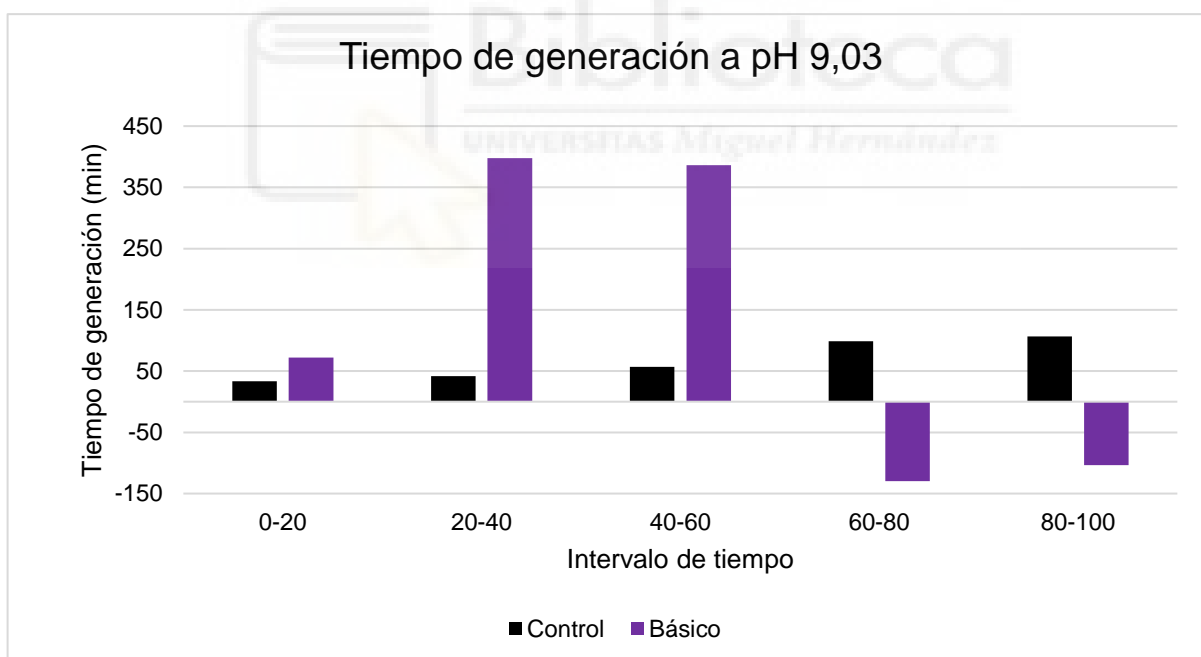


Figura 14. Tiempo de generación de la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 9,03 (barras moradas) comparada con el tiempo de generación en medio control (barras negras).

A pH 9,03, la cepa R6CIB17 muestra una detención de su crecimiento en comparación con el medio control. Solo crece durante los primeros 20 minutos de incubación. A consecuencia de ello, el tiempo de generación en este medio básico es mayor, lo que indica

que, a mayor alcalinidad del medio, mayor inhibición de la capacidad de *S. pneumoniae* replicarse eficientemente, comparado con el comportamiento observado en el medio control.

En este caso, también se tomaron medidas del pH tras el crecimiento de *S. pneumoniae*. Se obtuvo un valor de 5,08 para el cultivo control, mientras que para el cultivo en medio básico el pH descendió de 9,03 a 8,91, un cambio muy pequeño.

Recuento de viables

En la *Figura 15* se observa cómo la concentración de bacterias del medio control aumenta conforme aumenta el tiempo de incubación, mientras que en medio básico a pH 9,03 disminuyen las unidades formadoras de colonias conforme pasa el tiempo. En el minuto 80 hay 400 veces menos UFC por mililitro que en el cultivo control.

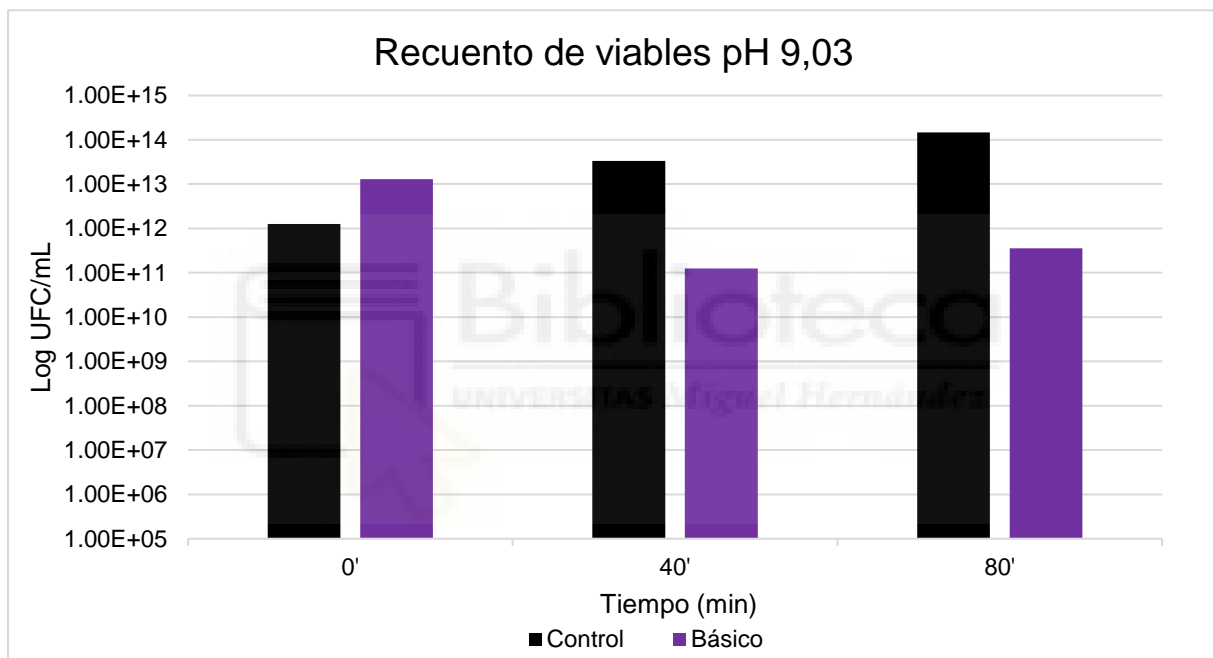


Figura 15. Efecto del pH 9,03 en los cultivos de neumococo a diferentes tiempos. Las barras negras representan el cultivo control y las barras violetas el cultivo a pH 9,03.

Esto se corresponde con los datos de densidad óptica obtenidos, pues a los tiempos correspondientes con los tomados para el recuento de viables la densidad óptica del medio básico había descendido con respecto a la densidad óptica a tiempo 0 minutos, lo que indica que las bacterias efectivamente son menos visibles en condiciones de pH alcalino 9,03.

Microscopía óptica

Se tomaron fotografías de las muestras en medio control y medio básico a los tiempos 0', 40', 80' y 120', tal y como se realizó con el medio a pH 8,42. Dichas fotografías se pueden observar en la *Figura 16*.

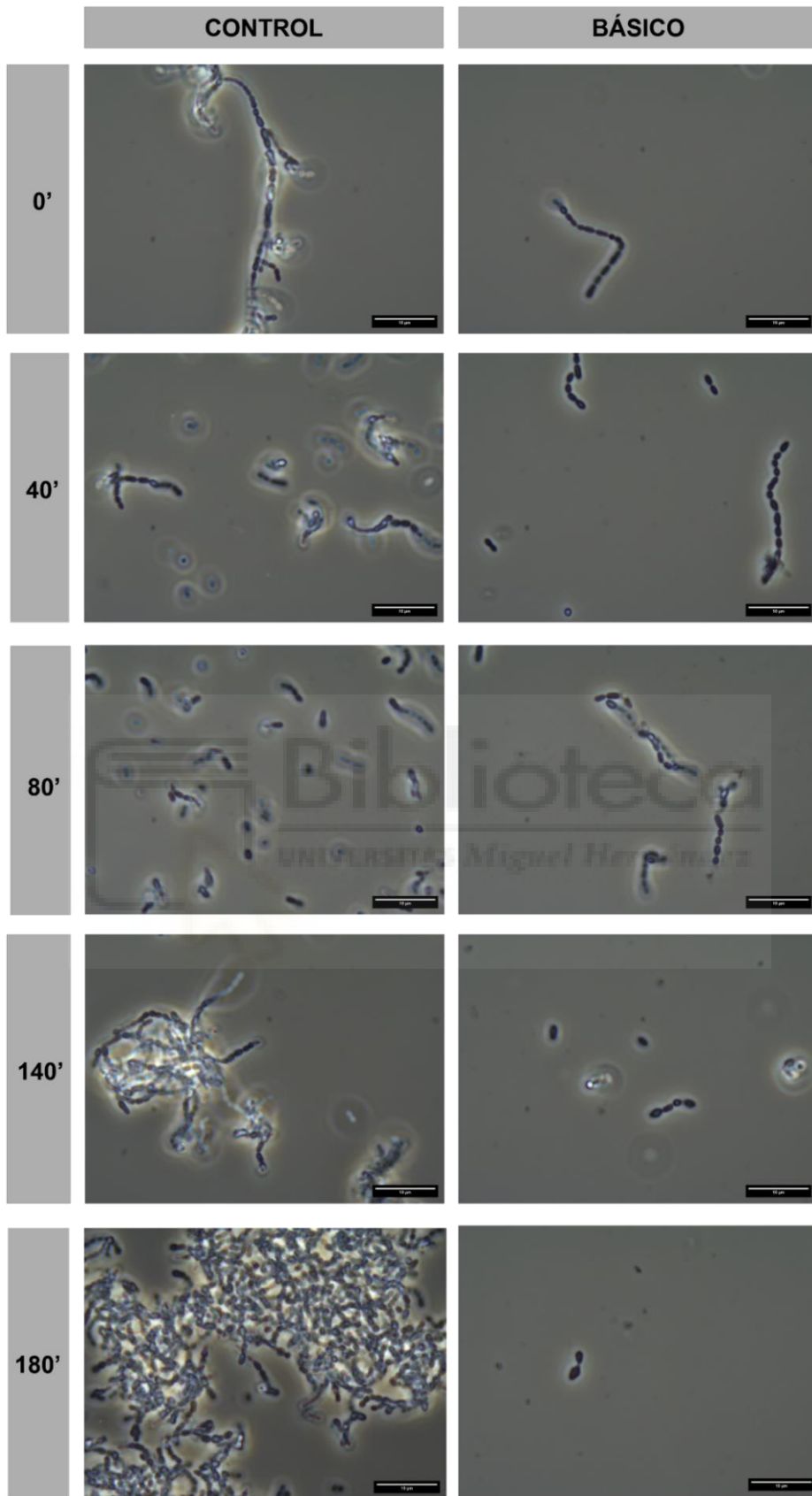


Figura 16. Muestras de la cepa R6CIB17 de *S. pneumoniae* al microscopio óptico a diferentes tiempos de crecimiento. Las imágenes de la izquierda corresponden a las bacterias crecidas en medio control, mientras que las de la derecha a las bacterias crecidas en medio básico con pH 9,03. La barra de tamaño corresponde a 10 micras.

En cuanto a las muestras observadas al microscopio del medio a pH 9,03, se observa que las bacterias crecidas en el medio control muestran una tendencia de crecimiento similar a las observadas en la *Figura 11*. En cambio, en medio a pH 9,03 se observa que hay grandes diferencias con respecto al medio a pH 8,42. Se puede ver cómo a tiempo 40' y 80' del crecimiento de la bacteria, esta forma algunas cadenas, pero son escasas. A tiempo 140' ya no se observan estas cadenas, y a tiempo 180' hay muy pocas células intactas, lo que indica que las bacterias morían y sedimentaban. Esto coincide con los datos de DO_{600} , pues a pH 9,03 se observaba que el crecimiento se detenía a los 60 minutos aproximadamente, y a partir de este momento comenzaba a descender la densidad óptica.

Curva de crecimiento de la cepa mutante M32 de *S. pneumoniae*

Nos preguntamos si la amidasa LytA podría estar involucrada en la adaptación al cambio a pHs alcalinos, por lo que se repitieron los experimentos con el mutante M32. Primeramente, se siguió la curva de crecimiento de la cepa mutante desde el inicio de la fase exponencial con una DO_{600} de 0,028 hasta que alcanzó la fase estacionaria, un tiempo total de 8 horas y 10 minutos. El tiempo fue prolongado debido al largo tiempo de generación que posee esta cepa mutante. Se tomaron en primer lugar medidas de la DO_{600} cada 30 minutos (*Figura 17*).

Por otro lado, esta cepa mutante tiende a flocular y sedimentar al comienzo de la fase exponencial, por lo que al alcanzar una DO_{600} de 0,06 se comenzó a agitar los tubos antes de la toma de medidas de densidad óptica (flecha en *Figura 17*).

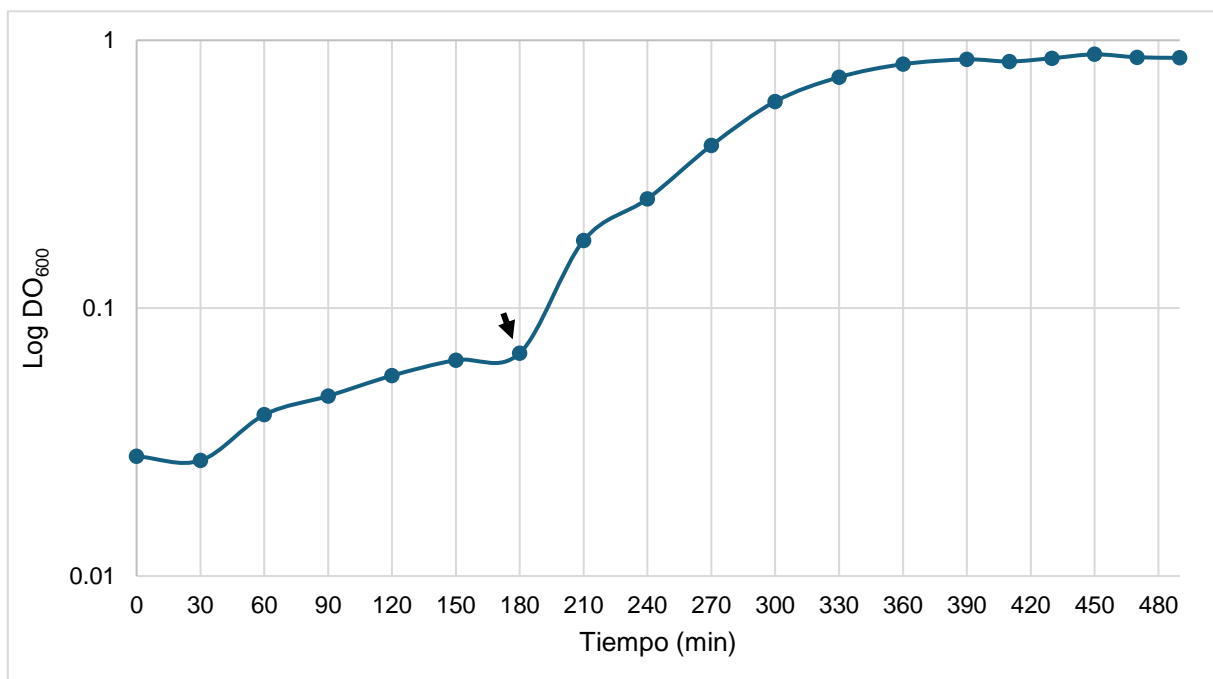


Figura 17. Logaritmo de la densidad óptica frente al tiempo en minutos para las medidas tomadas del crecimiento de un cultivo de la cepa mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* en medio THY.

Se observa que el crecimiento de la cepa mutante de esta bacteria es considerablemente más lento que la cepa silvestre. Por otra parte, debido a la agitación de los tubos, no se observa la caída de la densidad óptica como se podía ver en la curva de crecimiento de la cepa R6CIB17 en la fase estacionaria.

También se calcularon los parámetros de velocidad de crecimiento y tiempo de generación de esta cepa, obteniendo los resultados que se observan en la *Figura 18* y *Figura 19*.

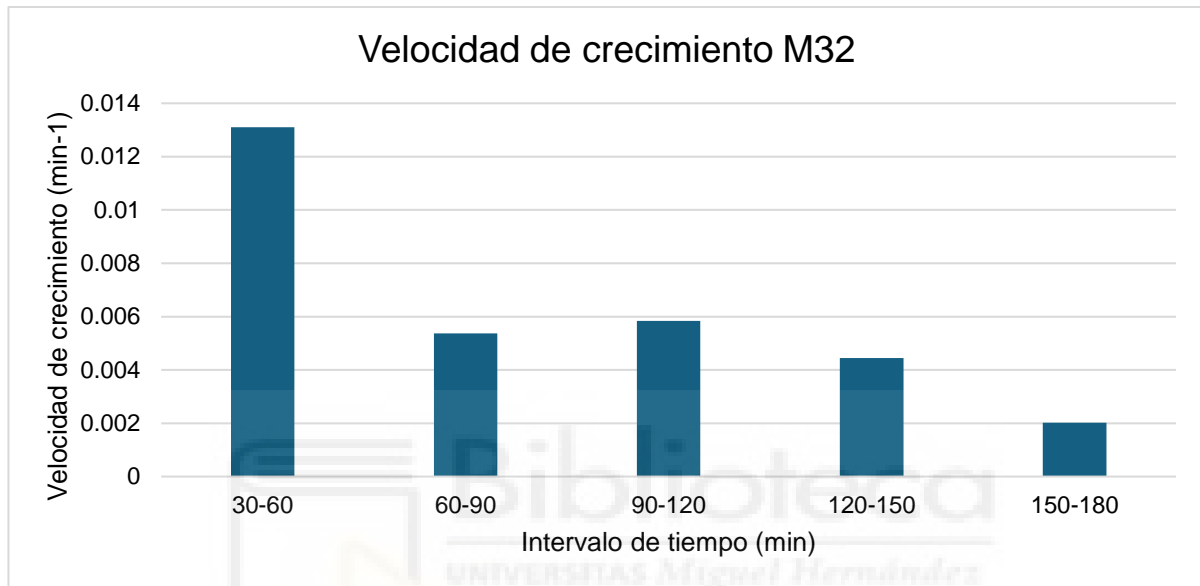


Figura 18. Velocidad de crecimiento de la cepa mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* en medio THY en condiciones de pH neutro (7,3). El eje x representa el intervalo de tiempo en el cual se ha calculado dicha velocidad.

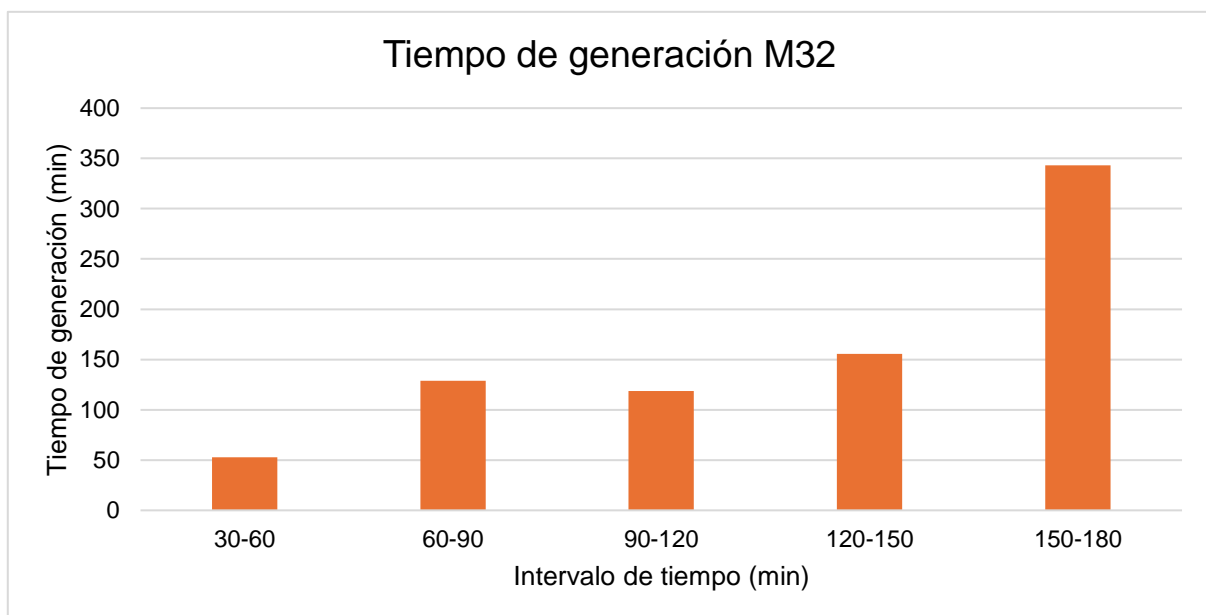


Figura 19. Tiempo de generación de la cepa mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* en medio THY en condiciones de pH neutro (7,3). El eje x representa el intervalo de tiempo en el cual se ha calculado dicho tiempo.

En el caso de la cepa mutante, se observa que esta posee una velocidad de crecimiento mucho más lenta y un tiempo de generación considerablemente más elevado que la cepa R6CIB17. Tiene una velocidad media de $0,0062 \text{ min}^{-1}$, y un tiempo de generación medio de 112,6 minutos.

Crecimiento de la cepa mutante M32 en medio básico

Para el estudio de la cepa mutante, se realizó únicamente el ensayo a pH 8,42, pues con la cepa R6CIB17 de *Streptococcus pneumoniae* se pudo observar que en este pH no se inducía la autólisis y la bacteria continuaba creciendo.

Curva de crecimiento

Se tomaron medidas hasta los 340 minutos del experimento, cuando ya se observaba que no había una variación de la densidad óptica considerable. Los resultados se representaron gráficamente, obteniendo la *Figura 20*.

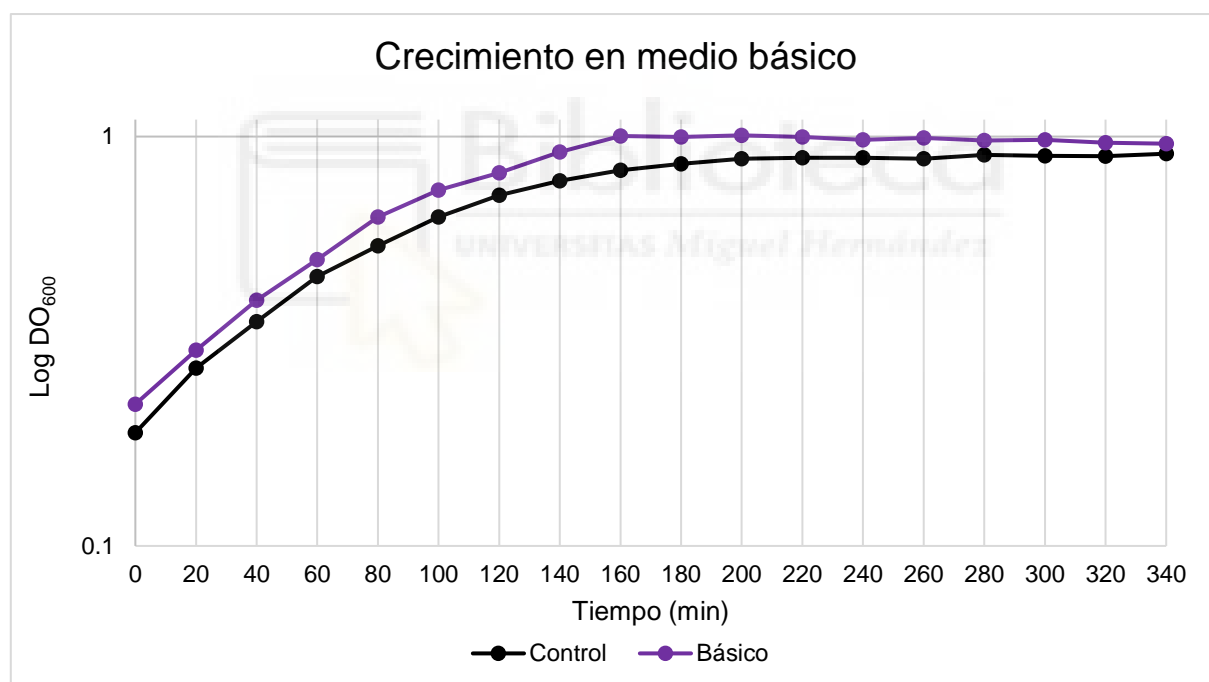


Figura 20. Logaritmo de la densidad óptica frente al tiempo en minutos para las medidas tomadas del crecimiento de un cultivo con agitación en medio básico (línea morada) comparado con un cultivo a pH normal (línea negra).

El crecimiento de la cepa mutante en medio control sigue un crecimiento similar al de la cepa R6CIB17. Se observa la fase de exponencial de crecimiento. A continuación de esta se debería observar un descenso de la densidad óptica, pero en este caso, al agitar los tubos antes de las mediciones, este descenso no se pudo ver, sino que cuando llega a su fase estacionario la DO_{600} no varía y se mantiene estable con el tiempo.

En cuanto al crecimiento de la cepa mutante en medio básico, esta no muestra un descenso en la densidad óptica, sino que llega un punto donde esta se estabiliza y se mantiene a lo largo del tiempo. Esto se observó visualmente en los tubos donde estaba el medio de crecimiento, pues se veía cómo en el tubo control, antes de agitarlo para tomar medidas, había precipitación de las bacterias. En cambio, en el medio básico no existía esta precipitación, por lo que la densidad óptica se mantenía estable cuando las bacterias llegaban a su punto máximo del crecimiento.

Por otra parte, se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación, representando gráficamente los resultados. Se obtuvieron la *Figura 21* y la *Figura 22*.

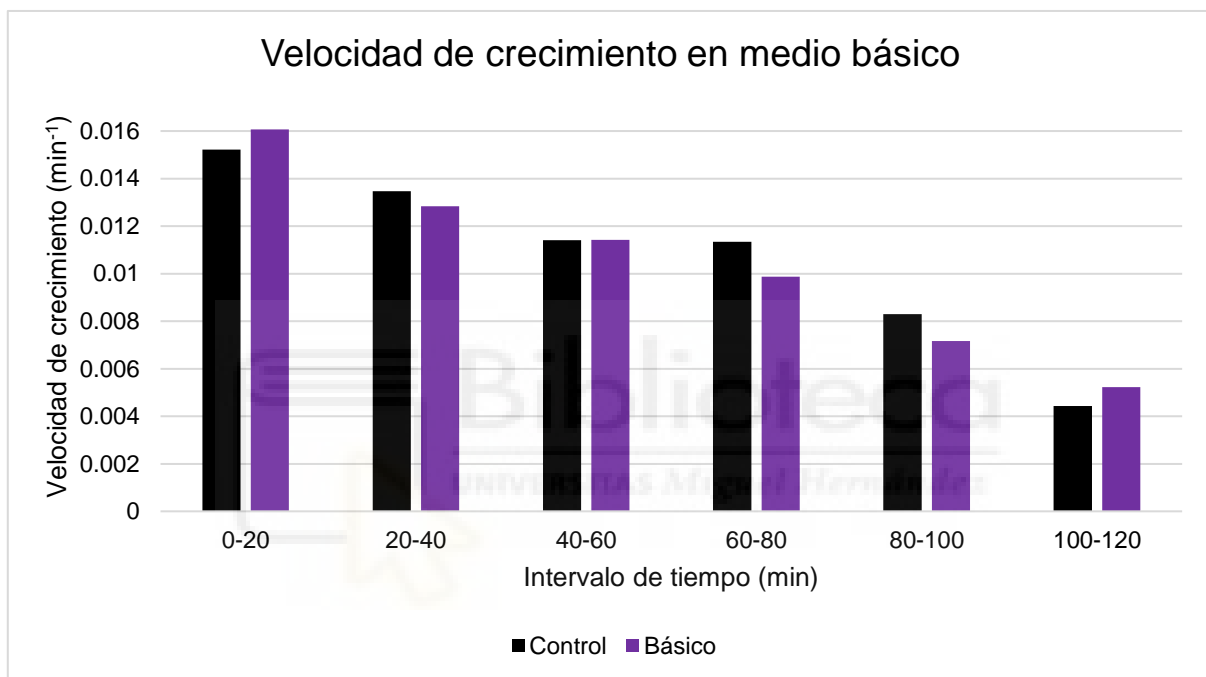


Figura 21. Velocidad de crecimiento de la cepa mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 8,42 (barras moradas) comparada con la velocidad de crecimiento en medio control (barras negras).

En el caso de la cepa mutante M32, la velocidad de crecimiento no se ve afectada de manera significativa por el medio básico, y a consecuencia de ello, el tiempo de generación tampoco.

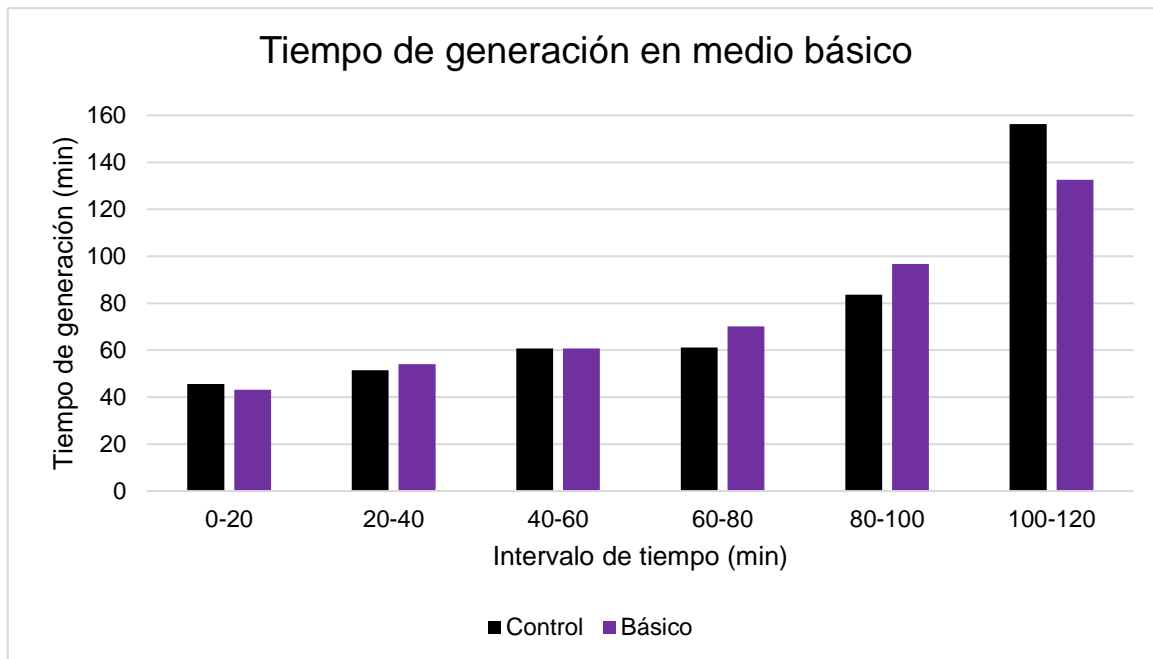


Figura 22. Tiempo de generación de la cepa mutante M32 de *Streptococcus pneumoniae* en medio básico a pH 8,42 (barras moradas) comparada con el tiempo de generación en medio control (barras negras).

Finalmente, se tomaron medidas del pH tras el crecimiento de la cepa mutante. El medio control bajó su pH hasta 4,95. El medio básico bajó de 8,42 a 5,93. Estos resultados coinciden con los de la cepa R6CIB17.

Recuento de viables

Para el recuento de viables de la cepa mutante de *Streptococcus pneumoniae*, se tomaron medidas a tiempo 0, 40, 80 y 160 minutos, debido a que el crecimiento de esta era más lento y fue necesario una medida más con respecto a la cepa silvestre para poder observar de manera óptima cómo afectaba el medio básico a esta cepa.

Los datos recopilados se representaron gráficamente obteniendo la *Figura 24*. Se observa que, a mayor tiempo de incubación, existen más unidades formadoras de colonias, tanto en medio control como en medio básico.

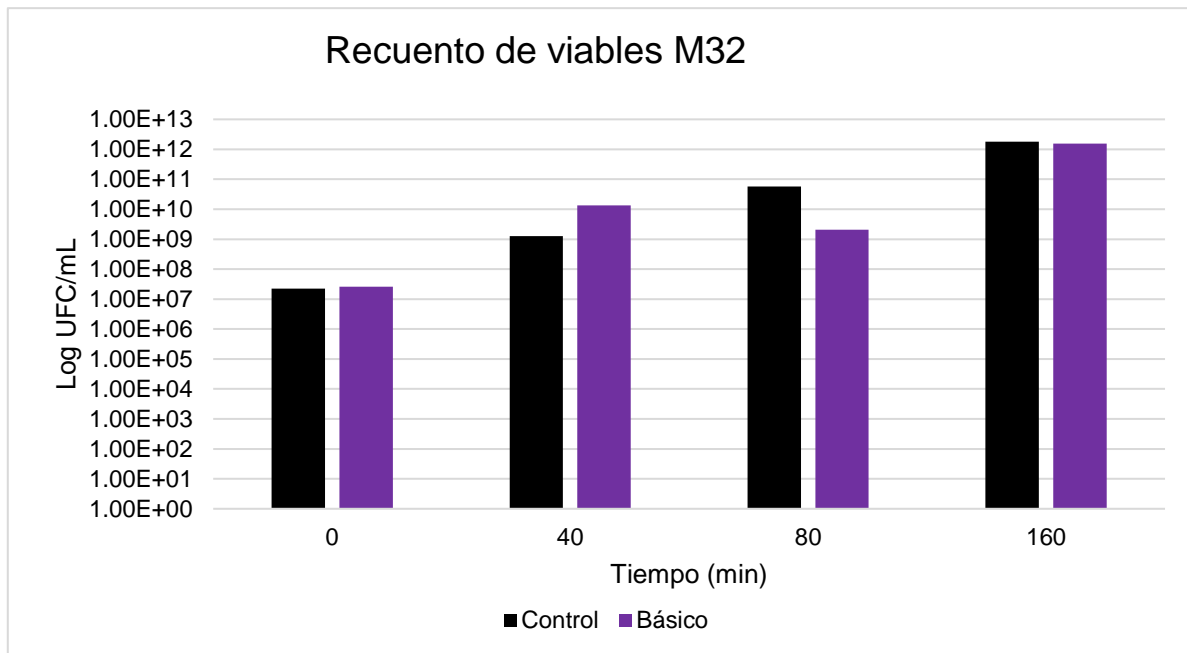


Figura 24. Efecto del pH básico en los cultivos de la cepa mutante de neumococo a diferentes tiempos. Las barras negras representan el cultivo control y las barras violetas el cultivo a pH

Microscopía óptica

En el caso de la cepa mutante de *Streptococcus pneumoniae*, se observaron muestras de microscopía a los tiempos 0, 40, 80, 160 y 220 minutos, puesto que su crecimiento era más lento que el de la cepa R6CIB17.

Se observó que la bacteria en medio control a tiempo 0' se encontraba formando cadenas de tamaño medio y sobre todo aisladas y en agrupaciones de 2 o 3 bacterias. A tiempo 40' se observa que la cepa empieza a formar agrupaciones de pequeño tamaño, las cuales aumentan su tamaño conforme avanza el tiempo, pues en tiempo 80' ya se ven grandes agrupaciones, y en tiempo 160' se aprecia una gran masa de células. En tiempo 220' se observan todavía grandes agrupaciones, aunque de menor tamaño que en el tiempo anterior.

Por otro lado, en el caso del crecimiento en medio básico, se ve una tendencia similar al medio control, con la diferencia de que en este caso las agrupaciones de células que se forman no son de tamaño tan grande como en medio control, además de que estas empiezan a aparecer en mayor medida a partir de 160', es decir, las bacterias no flocculan tan rápidamente como en el medio control.

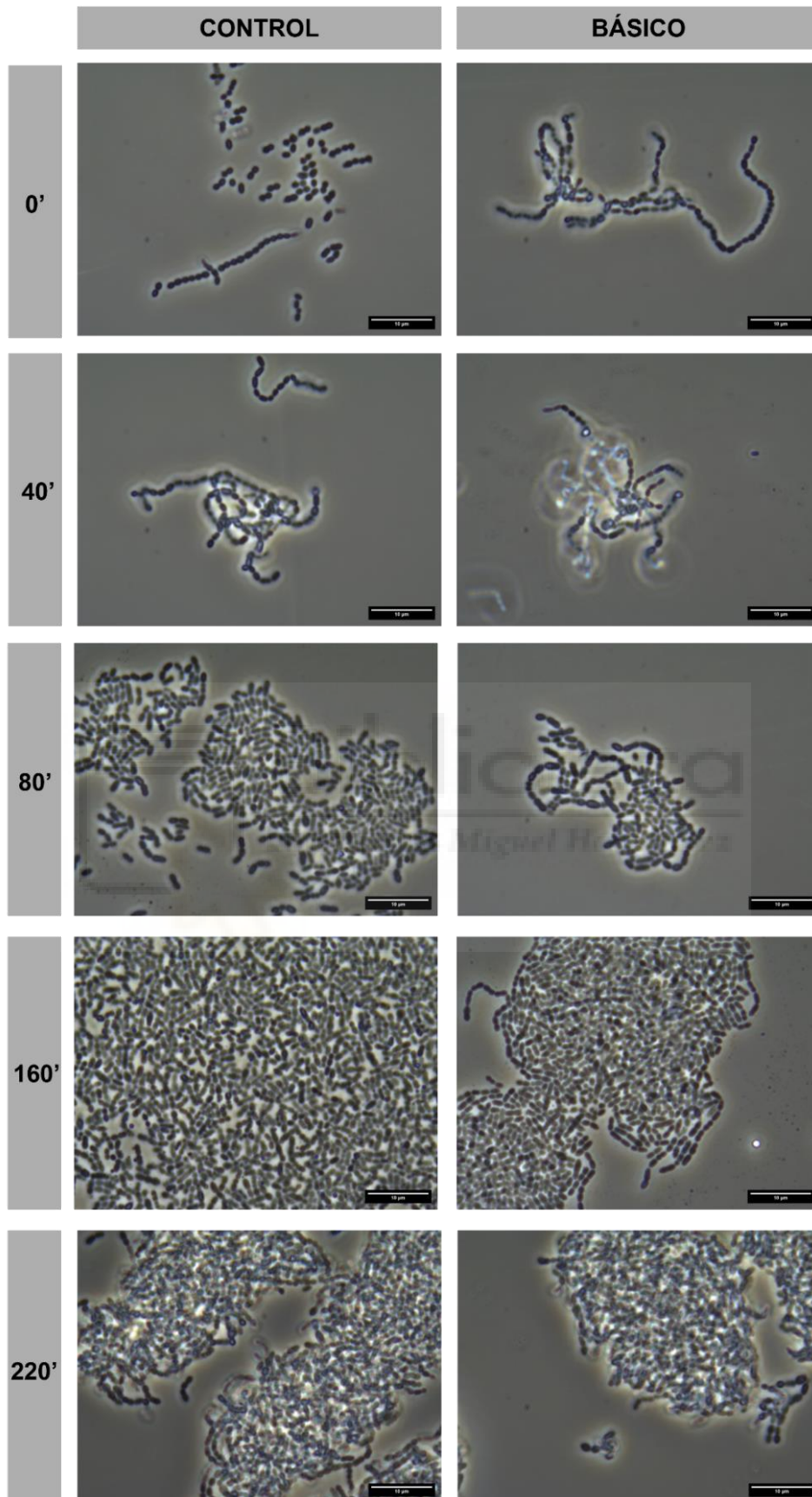


Figura 25. Muestras de la cepa mutante M32 de *S. pneumoniae* al microscopio óptico a diferentes tiempos de crecimiento. Las imágenes de la izquierda corresponden a las bacterias crecidas en medio control, mientras que las de la derecha a las bacterias crecidas en medio básico. La barra de tamaño corresponde a 10 micras.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* bajo condiciones de pH básico muestran cómo este factor ambiental afecta tanto a la velocidad de crecimiento bacteriano como a su morfología y capacidad de formar flóculos y a su capacidad de autólisis.

El análisis del crecimiento de la cepa R6CIB17 en medio básico mostró que la bacteria sigue una curva de crecimiento similar a la observada en condiciones de pH neutro, aunque con algunas diferencias clave. El cultivo en medio básico (pH 8,42) mantiene una DO_{600} estable incluso al final de la fase estacionaria, como se muestra en la *Figura 7*, comparado con el cultivo control donde se observa una disminución de la DO_{600} a partir de los 120 minutos. Este comportamiento indica que las bacterias en medio básico no forman flóculos de manera efectiva, lo que impide la sedimentación y, por lo tanto, la reducción de la densidad óptica. La ausencia de floculación podría estar relacionada con un retraso en los mecanismos de autólisis, dado que la autolisina LytA, responsable de la lisis celular en esta cepa, parece menos activa o suprimida en condiciones de pH elevado.

En cambio, a un pH más elevado (9,03), se observa una tendencia diferente (*Figura 12*). En este caso, la cepa R6CIB17 tiene una disminución significativa en la velocidad de crecimiento en los primeros 20 minutos de incubación. A continuación, se observa que el crecimiento se detiene por completo. Estos resultados confirman que el pH del medio afecta directamente la capacidad de la cepa para mantenerse viable en ambientes alcalinos.

El recuento de viables es otro aspecto importante para entender el efecto del pH en *Streptococcus pneumoniae*. Los resultados observados en las *Figuras 10 y 15* reflejan cómo el número de unidades formadoras de colonias (UFC) cambia con el tiempo y bajo diferentes condiciones de pH. En un pH de 8,42, el recuento de viables indica que las bacterias continúan creciendo, lo que coincide con lo observado en la densidad óptica. Sin embargo, a pH 9,03, se ve una clara disminución en las UFC a medida que avanza el tiempo, lo que indica que las condiciones de pH más alcalinas no solo inhiben el crecimiento, sino que posiblemente también aceleran la muerte celular o la incapacidad de formar colonias.

Estos hallazgos coinciden con la teoría de que el pH afecta tanto la estabilidad de la membrana celular.

Las observaciones realizadas mediante microscopía óptica dan una comprensión más visual del efecto del pH sobre la morfología celular y la formación de flóculos. Como se observa en la *Figura 11*, a un pH de 8,42, las bacterias en el medio control muestran una tendencia a formar grandes flóculos con el tiempo, alcanzando su mayor tamaño a los 180

minutos de incubación. Estas agrupaciones no se observan en el medio básico, donde las bacterias permanecen en cadenas pequeñas y medianas, sin llegar a formar las grandes agrupaciones que aparecen en el medio control.

En condiciones de pH más elevado (9,03), los resultados son todavía más claros, pues no se observan ni siquiera las cadenas de tamaño medio que se observan en el medio a pH 8,42. La ausencia de floculación y la disminución de las UFC, sugieren que la integridad celular se ve claramente afectada en estas condiciones. Es posible que la pérdida de la capacidad de formar flóculos esté relacionada con la alteración de la matriz extracelular o con la actividad de las proteínas involucradas en la adhesión celular, que podrían estar desnaturalizadas o menos activas en pH extremos.

La cepa mutante M32, que carece de la autolisina principal, mostró un comportamiento diferente bajo condiciones de pH básico. Como se observa en la *Figura 25*, las células de esta cepa tardaban más tiempo en formar agrupaciones, y estas eran de menor tamaño comparado con el control. A partir de los 160 minutos, las bacterias en medio básico comenzaban a formar estas agrupaciones, lo que sugiere que la falta de LytA quizás le da cierta resistencia a la floculación y, posiblemente, a la lisis bajo condiciones alcalinas.

Este resultado podría ser particularmente relevante ya que sugiere un posible papel regulador de LytA en la respuesta al estrés ambiental, especialmente relacionado a la supervivencia en condiciones de pH alcalino. La capacidad de la cepa mutante para evitar la formación de grandes flóculos podría estar relacionada con una menor exposición a procesos de autólisis, lo que le permite mantener su integridad celular por más tiempo.

Al comparar estos resultados con estudios previos, se observa que existe una contradicción con los estudios de Goebel y Avery (1929), quienes demostraron una mayor tasa de autólisis en *S. pneumoniae* en medios con pH alcalino. Una posible explicación es que en dicho artículo las células son centrifugadas y luego resuspendidas en un medio alcalino, mientras que en los experimentos aquí mostrados las bacterias están creciendo exponencialmente y son diluidas en el mismo medio y temperatura, pero con un pH alcalino. Este estudio además aporta información adicional, pues se observa que la eliminación de la enzima LytA tiene una ventaja relacionada con la resistencia a la lisis, sugiriendo que en ausencia de LytA, *S. pneumoniae* puede mantener su integridad celular incluso bajo condiciones de estrés ambiental significativo.

En conjunto, estos resultados muestran que el pH básico tiene un impacto significativo en la viabilidad, la capacidad de formación de flóculos y la morfología de *Streptococcus pneumoniae*. La cepa R6CIB17 muestra una disminución en su capacidad de floculación y viabilidad a pH más extremos, lo que indica un efecto inhibitorio directo del pH en los procesos

de autólisis y estabilidad celular. Por otro lado, la cepa mutante M32 presenta una resistencia relativa a estos efectos, lo que sugiere que la ausencia de la autolisina LytA puede ser ventajosa en ciertos entornos de estrés.

Aunque el estudio ha proporcionado información valiosa, es importante recalcar que este ha presentado también algunas limitaciones. En primer lugar, aunque los experimentos *in vitro* proporcionan un entorno controlado para evaluar la autólisis y el crecimiento bacteriano, es importante resaltar que estos resultados no reflejan completamente las condiciones *in vivo*. En un organismo vivo, *S. pneumoniae* está expuesto a un mayor número de factores estresantes, incluidos la respuesta inmune del huésped y la interacción con otras bacterias y células del huésped. Por lo tanto, aunque este tipo de estudios puede proporcionar una visión valiosa sobre las condiciones de crecimiento, futuras investigaciones deberían centrarse en validar estos resultados en modelos más complejos, incluyendo modelos *in vivo*.

Otro aspecto que se podría considerar como limitación es la falta de un análisis molecular detallado, que podría haber aportado una visión más profunda de los mecanismos relacionados con los cambios observados.

Por otro lado, el tiempo de observación del crecimiento de la bacteria podría no haber sido suficiente para ver de manera correcta los efectos a largo plazo de las condiciones alcalinas sobre este. Además, existe la variabilidad experimental. A pesar de que los experimentos se llevaron a cabo en múltiples ocasiones, obteniendo resultados similares, es posible que haya variaciones que se podrían considerar significativas si se hubiesen realizado más ensayos. Por lo tanto, este es un aspecto a tener en cuenta para futuras líneas de investigación.

Por último, hay que recalcar que el crecimiento de la cepa mutante solamente se estudió sobre medio básico a pH 8,42 y que a pH de 9,03 se detiene su crecimiento. Sería interesante comprobar su comportamiento en algún pH intermedio a estos valores.

Para superar estas limitaciones, futuros estudios podrían incorporar análisis de transcriptómica y proteómica, proporcionando una comprensión más valiosa de cómo el pH afecta la biología de *S. pneumoniae*. Además, se deberían llevar a cabo investigaciones *in vivo* en modelos animales para corroborar la relevancia de estos resultados en contextos clínicos.

Conclusiones y proyecciones futuras

Los resultados de este estudio dan una visión de cómo el pH básico afecta al comportamiento de *Streptococcus pneumoniae*, centrándose en la viabilidad, formación de flóculos y autólisis.

Un pH básico de 8,42 no impide el crecimiento bacteriano, pero sí altera considerablemente la capacidad de las bacterias para formar flóculos, lo que sugiere que existe una inhibición parcial de la autolisina LytA.

En condiciones más alcalinas (pH 9,03), se observa una inhibición del crecimiento y una rápida disminución en la viabilidad celular, lo que demuestra la sensibilidad de *S. pneumoniae* en condiciones de medio más alcalinos.

La cepa mutante M32, que carece de la autolisina principal, muestra cierta resistencia a los efectos del pH básico, con una menor capacidad de formar flóculos y un crecimiento más lento. La ausencia de LytA posiblemente evita algunos efectos del pH elevado, pero afecta a la cohesión celular y la eficiencia del crecimiento.

Esto sugiere que LytA juega un papel crucial en la respuesta bacteriana al estrés ambiental. Esta resistencia podría aprovecharse en aplicaciones biotecnológicas donde se requiere que las bacterias sobrevivan en entornos adversos, o en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para controlar la patogenicidad de *S. pneumoniae* en condiciones de estrés.

De cara al futuro, una línea de investigación prometedora sería explorar cómo la modulación de la autólisis mediada por LytA podría usarse para controlar las infecciones causadas por *S. pneumoniae*. Manipular el pH del entorno del patógeno podría considerarse una estrategia novedosa para reducir su capacidad de colonización y virulencia. Además, el desarrollo de cepas de *S. pneumoniae* modificadas genéticamente, que carezcan de autolisinas específicas, podría conducir a la creación de vacunas vivas atenuadas, capaces de inducir una respuesta inmunitaria eficaz sin causar la enfermedad.

La información obtenida en este estudio también podría ser utilizada en aplicaciones industriales, como en la ingeniería de bacterias resistentes a condiciones de pH extremo para fines biotecnológicos.

En conjunto, estos resultados amplían nuestra comprensión de la biología de *Streptococcus pneumoniae* y ofrecen nuevas posibilidades para su aplicación en medicina y biotecnología, estableciendo algunas bases importantes para futuras investigaciones y desarrollos tecnológicos.

Bibliografía

1. Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nature reviews. Microbiology*, 16(6), 355–367.
2. Maestro, B., & Sanz, J. M. (2016). Choline Binding Proteins from Streptococcus pneumoniae: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 5(2), 21.
3. Albrich, W. C., Monnet, D. L., & Harbarth, S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes. *Emerging infectious diseases*, 10(3), 514–517.
4. Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S., & Hermoso, J. A. (2012). Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Molecular oral microbiology*, 27(4), 221–245.
5. Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2012). LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), 11018–11029.
6. Romero, P., López, R., & García, E. (2007). Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in Streptococcus pneumoniae. *The Journal of biological chemistry*, 282(24), 17729–17737.
7. Vilhena, C., Du, S., Battista, M., Westermann, M., Kohler, T., Hammerschmidt, S., & Zipfel, P. F. (2023). The choline-binding proteins PspA, PspC, and LytA of *Streptococcus pneumoniae* and their interaction with human endothelial and red blood cells. *Infection and immunity*, 91(9), e0015423.
8. Ji, H., Zhou, Y., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, F., Bai, J., Li, Q., & Zhang, Z. (2023). Function analysis of choline binding domains (CBDs) of LytA, LytC and CbpD in biofilm formation of Streptococcus pneumoniae. *Microbial pathogenesis*, 174, 105939.
9. Goebel, W. F., & Avery, O. T. (1929). A study of pneumococcus autolysis. *The Journal of experimental medicine*, 49(2), 267–286.
10. Ronda-Lain, C., Lopez, R., Tapia, A., & Tomasz, A. (1977). Role of the pneumococcal autolysin (murein hydrolase) in the release of progeny bacteriophage and in the bacteriophage-induced lysis of the host cells. *Journal of virology*, 21(1), 366–374.
11. Piñas, G. E., Cortes, P. R., Orió, A. G. A., & Echenique, J. (2008). Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in Streptococcus pneumoniae. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 5), 1300–1308.

12. Roig-Molina, E., Sánchez-Angulo, M., Seele, J., García-Asencio, F., Nau, R., Sanz, J. M., & Maestro, B. (2020). Searching for Antipneumococcal Targets: Choline-Binding Modules as Phagocytosis Enhancers. *ACS infectious diseases*, 6(5), 954–974.
13. López, R., Sánchez-Puelles, J. M., García, E., García, J. L., Ronda, C., & García, P. (1986). Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular & general genetics : MGG*, 204(2), 237–242.

