

DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Morado Gutiérrez, Iris Andrea (1), Gutiérrez Sánchez, Flor de María (1), Barboza Corona, José Eleazar (2), Casique Arroyo, Gabriela (2)

1 [Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [cire183@hotmail.com; flordemaria6302@gmail.com]

2 [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [josebar@ugtomx.onmicrosoft.com; gcasiqea@gmail.com]

Resumen

Algunos microorganismos útiles y bacterias patógenas como por ejemplo *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, tienen la capacidad de adherirse y crecer en los alimentos y/o en las superficies que están en contacto con ellos formando biopelículas. Estas tienen mucha importancia en la industria alimentaria porque causan serios problemas que dificultan las operaciones y los procesos. Considerando este gran problema esta investigación se ha enfocado en determinar y estandarizar las mejores condiciones de producción de la biopelícula que forman las *Pseudomonas* para en un futuro proyecto crear un biosensor que pueda destruir a *Pseudomonas aeruginosa* y su biopelícula. Para esto se analizaron tres cepas de supuestas *Pseudomonas* a diferentes condiciones de temperatura y con diferentes medios de cultivo para establecer los parámetros óptimos para su desarrollo. Se estableció que una temperatura de 28°C y un medio de cultivo mínimo propiciaron óptimas condiciones para la formación de la biopelícula.

Abstract

Some useful microorganisms and pathogenic bacteria such as *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, have the ability to adhere and grow in foods and / or surfaces that are in contact with them forming biofilms. These are very important in the food industry because they cause serious problems that hinder operations and processes. This is a big problem with this research and has been focused to determine and improve the best biofilm production conditions that form the *Pseudomonas* for a future project to create a biosensor that can destroy *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilm. For this, three strains of *Pseudomonas* were analyzed at different temperature conditions and with different culture media to establish optimal parameters for its development. It was established that a temperature of 28 C and a minimum culture medium propitiated optimal conditions for the formation of the biofilm.

Palabras Clave

Pseudomonas; biopelícula; patógenos, micro placa, Absorbancia.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células se pueden adaptar porque se adhieren a superficies, que generalmente están contenidos dentro de una matriz orgánica polimérica de origen microbiano. Una biopelícula se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, incluyendo superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales [1]. A lo largo de la historia de la microbiología, investigadores han encontrado que las bacterias crecen en forma diferente después de su adhesión en superficies y posterior formación de biopelículas [1]. Podemos encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) [2].

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos [3]. *Pseudomonas aeruginosa* produce una gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares lo que le permite unirse a superficies de materiales inorgánicos, como el acero inoxidable. Dentro de la biopelícula puede coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos formando biopelículas multiespecíficos mucho más estables y resistentes [3].

El desarrollo en biopelículas es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad se considera que, en condiciones ambientales adecuadas, la mayoría los microorganismos son capaces de formar biopelículas [4].

Justificación

En el laboratorio de microbiología y biotecnología se encuentran tres cepas que teóricamente son *Pseudomonas*, y se quiere comprobar y estandarizar la productividad de biopelículas

hechas por ellas, por lo cual se ha decidido trabajarlas y establecer los parámetros óptimos para su mejor desarrollo.

Hipótesis

Pseudomonas es una bacteria que es fluorescente y crece en temperaturas de 10 a 42°C formando una biopelícula en las paredes donde se encuentre.

Objetivo

El objetivo de esta investigación fue, evaluar el crecimiento y la producción de biopelícula, de tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en diferentes medios y condiciones de temperatura para estandarizar las condiciones óptimas de su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La capacidad de formación de biopelícula por tres cepas (Norma, Sai e Itesi), llamadas así para fines de diferenciación fue evaluada con la metodología propuesta por O'Toole G.A. [5]. Pero incluyendo algunas modificaciones. Se estudió la interferencia de variables como el tipo de medio de cultivo, la utilización de diferentes temperaturas en el pre-inóculo y en la incubación final.

Se estudió la formación de biopelículas en tres medios de cultivo siendo dos de ellos medios mínimos (uno adicionado con casaminoácidos). Como medio rico en nutrientes se utilizó TSB.

Medios utilizados

- ✓ Medio mínimo

M63+ Glicerol (20%) + MgSO₄ + agua destilada

- ✓ Medio mínimo más casaminoácidos

M63+ Glicerol (20%) + MgSO₄ + agua destilada + casaminoácidos

- ✓ Medio rico en nutrientes, TSB Caldo soya tripticaseína

Experimentos de Biopelículas

Con la finalidad de comparar la formación de biopelícula entre las tres cepas de estudio, se estandarizó un mismo número de células en cada experimento. Para ello, se realizó un pre-inóculo de cada cepa en medio TSB, posteriormente se midió la densidad óptica (DO_{600nm}) de cada una de las cepas y se realizaron los cálculos necesarios para inocular un determinado volumen de cada cultivo, manteniéndolos en incubación toda la noche a 200 rpm con una temperatura de 28°C, o bien, a 37°C. Posteriormente con el cultivo de toda la noche se hizo una dilución 1:100 en diferentes medios: M63, M63 más casaminoácidos y uno rico en nutrientes, TSB (Caldo soya tripticaseína). Se depositaron 100 μ L de cada dilución en los pozos de una micro placa (8 pozos por muestra) y se dejó incubar 24 horas a 28°C o 37°C.

Tabla 1: Temperaturas en pre-inóculo, inóculo y micro placa por cada ensayo realizado

Ensayo	Temperaturas (°C)	
	Pre inóculo de toda la noche	Micro placa
1	37	37
2	28	28
3	28	37
4	28	28
5	28	28
6	28	28
7	37	28
8	28	28

Tinción de la biopelícula

Pasadas las 24 horas en incubación de los cultivos en diferentes medios depositados en la placa microtiter se procede a extraer cada medio, después se enjuagó una vez con 150 μ L de agua destilada, se tiñó con 125 μ L de cristal violeta al 0.1%, se dejó incubar por 15 min y se extrajo para

finalmente volver a enjuagar con 300 μ L de agua destilada. Seguidamente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Cuantificación de biopelículas

Se agregaron 125 μ L de ácido acético 30%, se incubó a temperatura ambiente 15 minutos, se transfirió el solubilizado a otra micro placa y se cuantificó a una $A_{550 nm}$.

Para estar seguras de que trabajamos con *Pseudomonas* se extrajo DNA de las cepas, por el método de extracción DNA Gram (-) de Wen ping Chen 1993. Mediante PCR se amplificó el gen 16s de cada cepa. Los amplicones fueron observados en un gel de agarosa al 1%, luego fueron purificados mediante acetato de amonio 3M y enviados para su secuenciación al Langebio (Cinvestav, Unidad Irapuato).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

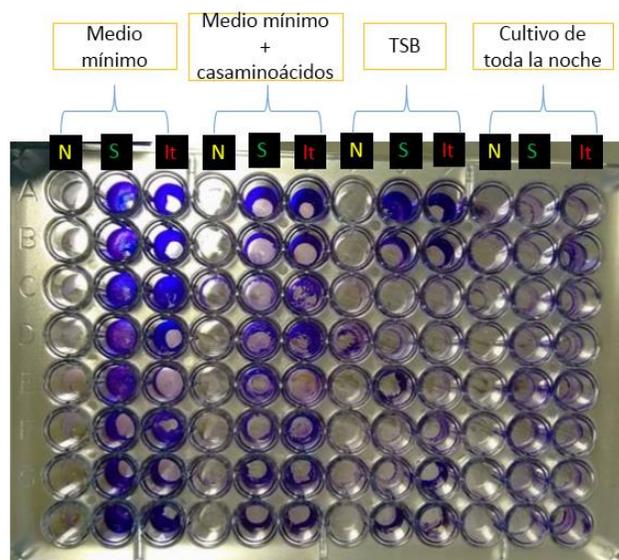


IMAGEN 1: Biopelículas formadas por el ensayo 2 con las cepas N (Norma), S (Sai), It (Itesi)

En el segundo ensayo mostrado en la imagen 1, se ve claramente que la cepa Norma no formó casi nada de biopelícula, por lo que podemos descartarla de ser *Pseudomonas*. Por otro lado es

evidente la formación de biopelícula en el medio mínimo, lo que está de acuerdo con estudios publicados anteriormente mostrando que tanto la adherencia bacteriana como la formación de biopelícula son estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes en el medio [5].

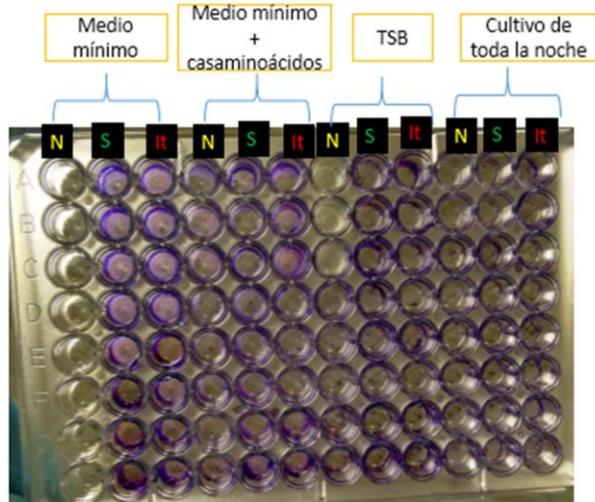


IMAGEN 2: Biopelículas formadas por el ensayo 7 (37°C en pre-inóculo) con las cepas N (Norma), S (Sai), It (Itesi)

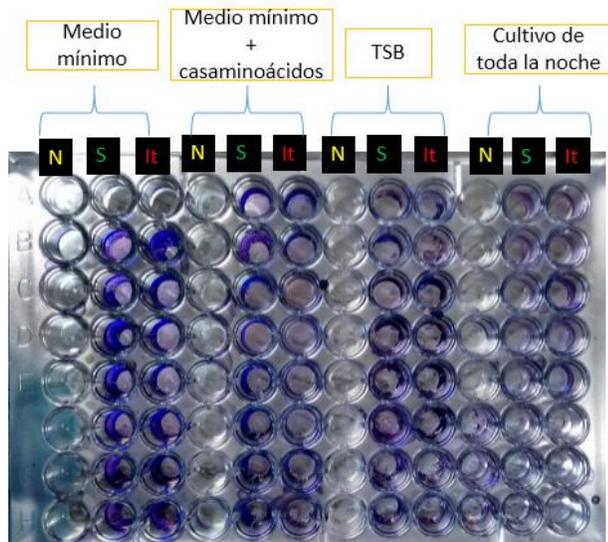


IMAGEN 3: Biopelículas formadas por el ensayo 8 (28°C en pre-inóculo) con las cepas N (Norma), S (Sai), It (Itesi)

Tanto la imagen 2 como la imagen 3 son una muestra clara de que las temperaturas a las cuales fueron sometidas las muestras son de suma importancia para el desarrollo de las biopelículas, ya que ambos ensayos fueron sometidos a una

misma temperatura en las micro placas, pero a diferentes temperaturas en el pre-inóculo viendo así en la imagen 3 nos muestra un mayor desarrollo de biopelícula en los 3 medios y en mayor proporción en el medio mínimo M63 seguido del M63 más casaminoácidos, de la misma manera se ve este mismo patron en la imagen 2, que representa una temperatura de 37°C en el pre-inóculo, pero en menor cantidad de biopelícula que los obtenidos en el ensayo 8, imagen 3.

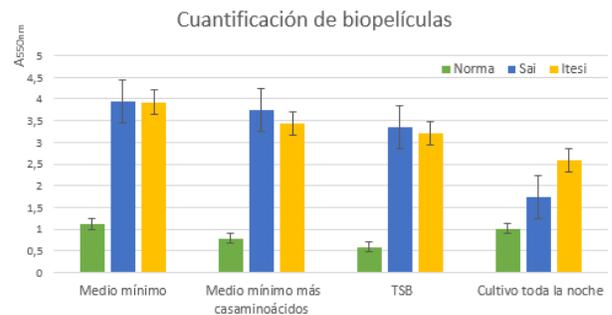


IMAGEN 4: cuantificación de biopelículas de las cepas Norma, Sai e Itesi en los diferentes medios contenidos en una micro placa

En la imagen 4 se recopila la formación de biopelícula por las tres cepas de una de las micro placas, que por el tiempo sólo se pudo realizar el análisis de una, pero es muy significativo, por haber obtenido resultados muy similares. Se puede apreciar gráficamente que de las tres cepas, Norma fue la que menor biopelícula formó, por lo que la producción de Sai e Itesi es de 3, 4 y hasta 5 veces superior respecto a Norma, según el medio de cultivo utilizado. Así mismo, podemos decir que definitivamente la producción de biopelícula se incrementa cuando las bacterias presentan estrés por nutrientes, efecto que podemos observar al utilizar un medio con limitantes nutritivas, tal como el medio mínimo M63, en el cual se cuantificó una mayor cantidad de biopelícula respecto al medio rico TSB en las tres cepas

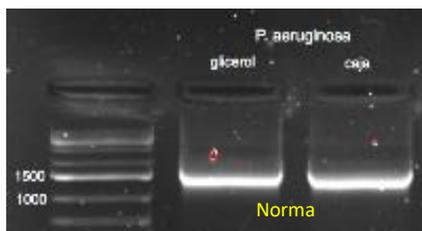


IMAGEN 5: amplificación 16s de la cepa Norma

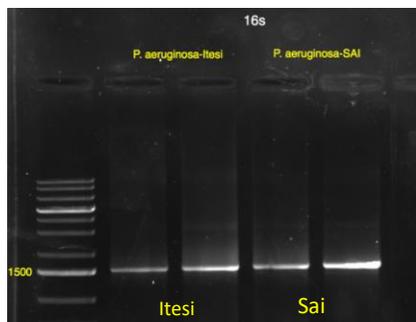


IMAGEN 6: amplificación 16s de las cepas Itesi y Sai

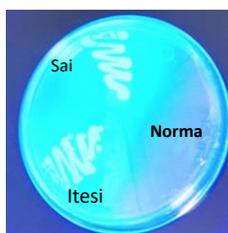


IMAGEN 7: tres cepas fluoresciendo en medio sólido King B

En las imágenes 5, y 6 se ven los amplicones del gen 16s de las tres cepas, mismas que están en un rango aproximado de 1.5 Kb. En la imagen 7 nos demuestra que el medio King B permite que la fluorescencia de las cepas Sai e Itesi sea visible.

CONCLUSIONES

La capacidad de formación de biopelícula fuerte y moderada fue observada en dos de las tres cepas (Sai e Itesi) pero solo en los medios M63 y M63 más casaminoácidos; en los medios enriquecidos las cepas se comportaron como formadoras débiles o como no formadoras.

Podemos decir que todos los factores influyen de una manera muy impactante en la formación de biopelícula. Asimismo, condiciones ambientales interfieren en la dispersión de la biopelícula entre

esas se incluyen la disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH y presencia de determinados compuestos químicos [6]. El estudio previo permite concluir que el medio M63 y una temperatura de 28°C son las condiciones ideales para la producción de biopelículas.

La producción de biopelículas por *Pseudomonas* sobre micro placas es un proceso método-dependiente por lo que es necesario definir claramente las condiciones experimentales en las que se realiza el estudio.

La baja producción de biopelículas por parte de la cepa Norma, así como la nula emisión de fluorescencia en el medio King B, nos hace suponer que dicha cepa no pertenece al género *Pseudomonas*.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), UG. División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, por darme la oportunidad de realizar el Verano de Investigación. Asimismo, agradezco a Dios y a todas las personas que me acompañaron y apoyaron en el trayecto de este verano, especialmente al Dr. José Eleazar Barboza Corona que me dio la oportunidad de estar trabajando en su laboratorio, a la Dra. Gabriela Casique Arroyo, Flor de María Gutiérrez Sánchez que estuvieron conmigo durante todo el verano y me ayudaron muchísimo y sin duda a mi familia, especialmente a mi mamá que siempre me apoya y acompaña en todo y a mis hermanos que me alegran los días.

REFERENCIAS

- [1] Costerton, J. (1999). Introduction to biofilm: Discussion, Int Antimicrob Ag., 11, pp. 217-221.
- [2] Kraigsley A., Ronney P.D., Finkel S.E. (2002). Dynamics of self propagating fronts of motile bacteria
- [3] Chmielewsky R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, pp: 22-32.

[4] Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp: 881-890

[5] O'Toole G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi: 10.3791/2437

[6] Yang HH, Vinopal RT, Grasso D, Smets BF. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 1528-1536.

[7] Goller CC, Romeo T. Environmental influences on biofilm development. In: *Bacterial biofilms*. Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 2008, 37-66