

**OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BURBUJEO PARA LA REMOCIÓN DE
BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDC**

María Camila Ospina Pérez

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C
JULIO 2008**

**OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BURBUJEO PARA LA REMOCIÓN DE
BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDC**

María Camila Ospina Pérez

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de**

Microbióloga Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C
JULIO 2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BURBUJEO PARA LA REMOCIÓN DE
BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* MDC**

María Camila Ospina Pérez

APROBADO

Ingrid Schuler Ph. D
Decana Académica

Janeth Arias Palacios MSc
Directora de Carrera

RESUMEN

La remoción de biopelículas en superficies sólidas por el paso de burbujas de aire sobre las superficies se ha implementado como una alternativa para el desprendimiento de estas, sin embargo aun falta evaluar las condiciones óptimas de utilización para obtener una eficacia total del método. Se permitió la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* MDC durante 1 hora en láminas de vidrio hidrofílicas hasta alcanzar una densidad de $8,6 \times 10^6$ cel/cm² ($p > 0,05$). Luego se construyó un recipiente de flujo paralelo de burbujas de aire en el cual se ensayaron 5 tratamientos donde las variables evaluadas fueron la solución de remoción (NaCl 0,02 M en tampón fosfato 5mM; agua destilada), tiempo (2 y 5 minutos) y el acoplamiento del burbujeo a sonicación. El tratamiento 1 (tampón sin filtrar por 2 minutos) removió 71,3%, tratamiento 2 (Tampón sin filtrar por 5 minutos) 91,2%, tratamiento 3 (Tampón filtrado por 2 minutos) 94,3%, tratamiento 4 (agua destilada por 2 minutos) 98,7% y el tratamiento 5 (agua destilada por 2 minutos acoplado a sonicación por 3 minutos) 100%. Se logró establecer que el tiempo suficiente de exposición de los sustratos a las burbujas es de 2 minutos, ya que a más tiempo la remoción no aumentó significativamente; además que la solución de remoción es un factor determinante a la hora de realizar la remoción. Asimismo, a partir del tratamiento 5 se identificaron “footprints” dejadas atrás por las bacterias removidas, las cuales podrán servir como referencia en estudios posteriores para la identificación química y molecular de estos.

Palabras Clave: Biopelícula; “footprints”; *Pseudomonas aeruginosa*; Remoción por burbujeo.

ABSTRACT

Biofilm removal from solid surfaces by the passage of air- bubbles upon the surfaces, it's been employed as an alternative for detachment of biofilms, however it's still need to evaluate the optimum conditions to obtain method total efficiency. *Pseudomonas aeruginosa* MDC was allowed to adhere during 1 h in hydrophilic glass slides until reach $8,6 \times 10^6$ cell/ cm² ($p > 0,05$). It was built an air- bubble parallel floe recipient in which were tested 5 treatments, the assessment variables were the removal solution (NaCl 0,02 M in PBS 5 mM; distilled water), time (2 and 5 minutes) and coupling method with sonication. Treatment 1(PSB non- filtered during 2 minutes) removed 71,3%, treatment 2 (PBS non filtered during 5 minutes) 91,2%, treatment 3 (PBS filtered during 2 minutes) 94,3%, treatment 4(distilled water during 2 minutes) 98,7% and treatment 5 (distilled water during 2 minutes coupling sonication for 3 minutes) 100%. It was established that enough time to exposure substratum to bubbles is 2 minutes, because with more time detachment wasn't significantly increased, it was also set that removal solution was determinant for removal. Moreover, treatment 5 permitted footprints identification left behind by microorganisms already removed, these footprints will be useful as reference in subsequent studies for their chemical and molecular identification.

Key Words: Biofilms; Bubble detachment; Footprints; *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA DE CONTENIDO

Número	Título	Página
	Dedicatoria	
	Agradecimientos	
	Resumen	
	Abstract	
	Lista de Figuras	I
	Lista de Tablas	III
1	Introducción	7
2	Marco Teórico	9
2.1	Biopelículas	9
2.1.1	Ciclo de vida	9
2.1.1.1	Transporte y adhesión	9
2.1.1.2	Microcolonias	12
2.1.1.3	EPS y Maduración	13
2.1.1.4	Dispersión	17
2.2	Efectos de las Biopelículas	18
2.3	Remoción de Biopelículas por Microburbujeo	20
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.5	Biopolímeros adhesivos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.6	"Footprints" o Huellas Celulares	26
3	Planteamiento de problema de investigación y justificación	27
4	Objetivos	29
4.1	Objetivo General	29
4.2	Objetivos Específicos	29
5	Materiales y Métodos	30
5.1	Microorganismo de Estudio	30
5.1.1	Determinación de Pureza	30
5.1.2	Conservación de banco de prueba	30
5.2	Determinación de Viabilidad del Microorganismo	31
5.2.1	Inóculo	31
5.2.2	Curva de Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	31
5.3	Test de Adhesión	31
5.3.1	Preparación de la muestra	31
5.3.1.1	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	31
5.3.1.2	Lavado y obtención del precipitado	31
5.3.2	Test de Adhesión	32
5.3.2.1	Preparación del material	32
5.3.2.2	Adhesión	32

5.4	Remoción de biopelículas y obtención de "Footprints"	33
5.4.1	Burbujeo	33
5.5	Análisis microscópico para la determinación de presencia de "Footprints"	35
5.5.1	Microscopia electrónica de barrido	35
6	Resultados y Discusión	36
6.1	Curva de Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	36
6.2	Test de Adhesión inicial	37
6.3	Test de Remoción	40
6.3.1	Test de Adhesión para cada tratamiento de remoción	41
6.3.2	Remoción	42
6.3.3	Análisis microscópico para la determinación de presencia de "footprints"	50
7	Conclusiones	53
8	Recomendaciones	54
9	Bibliografía	55
	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Ciclo de crecimiento bacteriano y formación de la biopelícula	17
2	Estructuras de la biopelícula madura y desarrollo en una superficie inerte	18
3	Biopelícula formado en catéter cardiaco	19
4	Volumen de líquido a ser drenado para la formación de la tercera fase de contacto entre partícula - burbuja y fuerzas interfaciales de desprendimiento partículas pequeñas y grandes	21
5	Fuerzas hidrodinámicas que intervienen en el desprendimiento de una célula a una superficie	22
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	23
7	Biopelícula formada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	24
8	Mecanismo de remoción para biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC	33
9	Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC en medio TSB representación no logarítmica	36
10	Representación logarítmica del crecimiento exponencial de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC, la recta de regresión lineal indica el intervalo de crecimiento exponencial	37
11	Test de adhesión. Ensayo 4	38
12	Test de adhesión inicial de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC, las barras permiten observar la densidad poblacional de cada lámina del test de adhesión inicial y la respectiva desviación estándar de cada uno.	38
13	Promedio de logaritmo de células/cm ² del test inicial de adhesión y del realizado para cada tratamiento de remoción, las barras indican la densidad poblacional del test inicial y de cada tratamiento con su respectiva desviación estándar.	41
14	Microscopía de contraste de fase para los 5 tratamientos. 1 a. Tratamiento 1 (2 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 sin filtrar) antes de la remoción. 1 b. Tratamiento 1 después de la remoción. 2 a. Tratamiento 2 (5 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 sin filtrar) antes de la remoción. 2b. Tratamiento 2 después de la remoción. 3 a. Tratamiento 3 (2 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 filtrada) antes de la remoción. 3b. Tratamiento 3 después de la remoción. 4 a. Tratamiento 4 (2 minutos de remoción con agua destilada) antes de la remoción. 4b. Tratamiento 4 después de la remoción. 5 a. Tratamiento 5 (2 minutos de remoción con agua destilada y sonicación por 3 minutos) antes de la remoción. 5d. Tratamiento 5 después de la remoción.	43
15	Promedio de la concentración de cel/cm ² antes de la remoción y después de la remoción de cada tratamiento expresada en logaritmo. Las barras azules indican la densidad poblacional de células de cada test de adhesión para cada tratamiento con su respectiva desviación estándar. Las barras rojas indican las células que permanecieron adheridas después de la remoción y su respectiva desviación estándar.	45

16	Porcentaje promedio de la remoción para cada tratamiento	46
17	Microscopia electrónica de Barredura. a: Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC luego de remoción con burbujeo acoplado a sonicación (tratamiento 5, lámina 2; Aumento 50000X). b: “Footprints” de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDC después de remoción con burbujeo acoplado a sonicación (tratamiento 5, lámina 3; Aumento 40000X). c: Partículas de carácter externo depositadas en la superficie. Remoción por burbujeo acoplado a sonicación (Tratamiento5, lamina 4; Aumento 50000X).	52

1. INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son resultado del crecimiento de organismos sobre diversos tipos de superficies. La formación de estas estructuras representa una de las estrategias que brinda mayor supervivencia a los microorganismos envueltos en este proceso. Estas estructuras proveen condiciones ideales de supervivencia, como el captar nutrientes que son esenciales para el crecimiento, incrementando así la probabilidad de desarrollo y de crecimiento de los organismos, por generar protección ante la desecación, predadores y toxinas.

Estas estructuras están compuestas por células bacterianas, minerales, sustancias ambientales y exopolímeros; los exopolímeros son moléculas compuestas principalmente de carbono orgánico, como fosfolípidos, sustancias húmicas, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas. Estas moléculas son de gran importancia para la biopelícula ya que generan adhesión y protección a superficie, proveen la estructura tridimensional de este, lo hidratan y brindan un soporte nutricional a los microorganismos que los producen.

En la mayoría de los ecosistemas, células microbianas crecen sobre diversas superficies, convirtiéndose en comunidades estructuradas; para esto, las bacterias se adaptan rápidamente al estrés hidrodinámico y químico, por eso las células sufren cambios fisiológicos durante el proceso de adhesión; esto genera la formación de estas estructuras en cualquier clase de ecosistema, siempre y cuando estén sometidos a alguna clase de fluido. Esto hace de las biopelículas un problema, puesto que, por su capacidad de adaptación se torna un inconveniente a nivel clínico, ambiental e industrial.

Por esta razón se han desarrollado diversos métodos de remoción y desprendimiento, no obstante durante los últimos años se ha venido implementando el burbujeo como una manera mas efectiva de remoción, puesto que el desprendimiento proviene directamente de la intensidad y el flujo del

fluido, que en este caso sería el paso de la interface líquido-aire sobre la superficie, el cual causa el desprendimiento por fuerzas perpendiculares opuestas a las fuerzas de adhesión.

Aunque estos métodos remueven algunas células y han dado resultados satisfactorios, todavía falta elucidar las condiciones correctas de utilización para la eficacia total de este y la determinación de huellas celulares, puesto que estas sirven de señales y de sustrato para la regeneración de la biopelícula; de ahí la importancia y finalidad de este estudio, la cual es optimizar los protocolos de la remoción por burbujeo para la posterior obtención de huellas celulares o “footprints”.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos, los cuales se encuentran irreversiblemente asociados a una superficie, se caracterizan por estar recubiertos por una matriz compuesta principalmente de polímeros (fosfolípidos, sustancias húmicas, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas), la cual ayuda a retener el alimento y proteger de agentes tóxicos; además, permanecen fijas a una superficie y pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Donlan, 2002; Davey y O'Toole, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002; Piera, 2003). Son una manera usual en la que los microorganismos se asocian para colonizar todo tipo de superficies donde el crecimiento sea posible. Estos representan un modo de existencia protegida que le permite a las células sobrevivir en un amplio rango de diferentes ambientes y algunas veces extremos, como temperaturas desde -5 hasta 120 °C, pH desde 0 hasta 13 y presiones de hasta 100 MPa (Denkhaus *et al.*, 2007).

Dentro de la estructura de los biopelículas existen diferentes tasas de crecimiento, respuestas fisiológicas y diferente morfología y fisiología celular, tanto entre las especies que componen la biopelícula y las células planctónicas, esto hace que esta sea una estructura compleja (McLandsborough *et al.*, 2006), la cual posee canales abiertos de agua que le permite mantener el paso de nutrientes y oxígeno; esta arquitectura es afectada en su mayoría por fuerzas de cizalla, que inducen el paso de agua por los canales hasta partes muy profundas del complejo, permitiendo el paso e intercambio de nutrientes, colaborando a su vez en la ganancia de espesor y complejidad (Stoodley *et al.*, 2002). Aunque el paso de nutrientes y oxígeno ayuda a mantener la estructura, las bacterias reciben menos oxígeno y menor cantidad de nutrientes, y es este hecho el que permite a las bacterias sobrevivir y crecer bajo una gran variedad de condiciones, debido a que

la alteración fisiológica confiere mayor resistencia a agentes tóxicos de las células en comunidad que a las células planctónicas (Simões *et al.*, 2005).

La adherencia de microorganismos a superficies y el desarrollo de biopelículas se encuentra comúnmente en ambientes naturales, industriales y clínicos; solo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, puesto que pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas (Kraigsley, *et al.*, 2002; Denkhaus, *et al.*, 2007). En ambientes naturales aproximadamente 99% de la biomasa bacteriana sobrevive adherida a superficies dentro de la estructura de biofilmes. (Donlan y Costerton, 2002; Suarez- Gómez *et al.*, 2002); existen desde hace mas de 3.8 billones de años y hoy en día son cosmopolitas (Sothey-Pillig *et al.*, 2005).

2.1.1 Ciclo de Vida

2.1.1.1 Transporte y Adhesión

El primer paso en la formación de la biopelícula consiste en el transporte del organismo a una superficie sólida; esto puede ocurrir, ya sea por la movilidad del organismo, la difusión de este en el ambiente o por convección natural o forzada del sistema, este desarrollo puede incluir todos estos mecanismos en un solo momento o cada uno en diferentes etapas (Abbas *et al.*, 2007). Es claro que estructuras de movilidad como los flagelos y pilli están envueltos en la actividad celular, además promueven el transporte del organismo a la superficie y son un factor de gran importancia en el transporte y adhesión inicial (Bruinsma *et al.*, 2001)

Ya cuando los organismos se encuentran cercanos a la superficie, fuerzas de interacción física influyen la adhesión inicial como fuerzas de atracción de Van der Waals (mayores a 50 nm de la superficie), fuerzas electrostáticas de repulsión y atracción (2- 10 nm de la superficie) e interacciones hidrofóbicas (0.5- 2 nm de la superficie) (Boss, *et al.*, 1999, Mclandsborough *et al.*, 2006). Las fuerzas de Van der Waals en estos casos pueden ser dipolo- dipolo, a dipolo- dipolo

inducido y dipolo inducido- dipolo inducido, las cuales son fuerzas de atracción. Las fuerzas electrostáticas surgen porque las células, el desarrollo de la matriz y la superficie poseen una permanente carga negativa llevando esto a la formación de una doble capa electrostática difusa. Las bacterias a su vez como la mayoría de las superficies solidas, generalmente poseen carga negativa, sin embargo el origen de esta carga es la combinación de varias cargas que poseen los diferentes grupos funcionales que constituyen la membrana celular, como aminos, carboxilos, fosfatos y algunos grupos sulfatos y macromoléculas capsulares (Ista, *et al.*, 1999). La magnitud de las interacciones electrostáticas esta influenciada por la naturaleza del ambiente como el pH, fuerza iónica, la valencia de los diferentes iones y la naturaleza del solvente (McLandsborough *et al.*, 2006).

En ambientes naturales, las células bacterianas son repelidas por la superficie ya que presentan cargas eléctricas iguales; en el caso de adhesión se habla de superficies modificadas por compuestos orgánicos e inorgánicos, estas superficies modificadas pueden ser el filme condicionante al cual las bacterias pueden adherirse (Banin *et al.*, 2005). Generalmente una superficie expuesta a un medio acuoso se convierte inevitablemente en un filme condicionante revestido de polímeros del medio, esta modificación afecta el rango y extensión de la unión celular (Donlan, 2002).

En el momento en el que las bacterias encuentran el filme condicionante, forman una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria; las fuerzas de Van der Waals son las directamente involucradas en la adhesión reversible ya que se caracterizan por ser fuerzas de larga distancia. Si esta fuerza se mantiene suficiente tiempo, aparecen fuerzas de adhesión lo suficientemente fuertes para sobrepasar las fuerzas de repulsión electrostática, pasando a ser la adhesión permanente e irreversible (O'Toole *et al.*, 2000; Kraigsley *et al.*, 2002, Seo *et al.*, 2008). Durante la unión reversible las células bacterianas aún muestran movimiento Browniano, y se pueden desprender fácilmente. Todos los ambientes acuáticos son electrolitos, es decir, contienen cantidades variables de sales disueltas. La mayoría de las superficies de organismos y de sustratos en ambientes

acuáticos poseen carga eléctrica negativa. Las superficies con carga negativa de los microorganismos y los sustratos atraen cationes (+) y repelen los aniones (-) de la solución formando una dupla camada eléctrica donde el equilibrio iónico de la solución es alterado por la carga de la superficie del sustrato o el microorganismo. Las bacterias se dislocan en dirección al sustrato por el transporte hidrodinámico, a través de movimiento Browniano o por medio de la movilidad propia que le confieren los flagelos (Pratt *et al.*, 1998; Kraigsley *et al.*, 2002).

Es de gran importancia la superficie sólida a la que se une el microorganismo la cual debe tener algunas características que son importantes en este proceso. Se sabe que la colonización microbiana aumenta en superficies más ásperas porque las fuerzas de repulsión se hacen menores y la superficie de adherencia se hace mayor. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también ejercen una fuerte influencia en el rango de adhesión (Rochex *et al.*, 2007).

Las interacciones hidrofóbicas son mas fuertes que las fuerzas de Van der Waals a distancias menores, por eso estas interacciones son las responsables de la adhesión irreversible. La exclusión de agua entre las dos superficies permite de manera más directa la interacción entre la bacteria y la superficie y esto a su vez disminuye la energía libre del sistema, permitiendo así una unión mucho más fuerte, haciéndola así irreversible (Parsek *et al.*, 2004).

2.1.1.2 Microcolonias

Luego la extensión de la colonización microbiana depende de la hidrofobicidad del sustrato y de la célula; y también de la composición de la superficie celular, como proteínas extracelulares, pilis, flagelos y polisacáridos (Denkhaus *et al.*, 2007).

La base estructural de la biopelícula es la microcolonia, por la actividad que existe entre las células dentro de esta, suministrando así, un ambiente para la creación de gradientes de concentración de nutrientes, intercambio genético y quorum sensing. Estas están compuestas por múltiples especies de microorganismos y gran variedad de nutrientes como nitrógeno, sulfuros y carbono; dentro de estas estructuras ocurren reacciones redox, tanto en biopelículas acuáticas como en sólidas (Kirisits *et al.*, 2005).

La adhesión irreversible de la célula al sustrato ocurre cuando son formados un gran número de ligaciones entre los biopolímeros adhesivos y el sustrato, esto también fortalece la formación y crecimiento, ya en la unión irreversible hay un anclaje de apéndices bacterianos y producción de expolímeros, lo cual significa que la acción mecánica necesaria para desengancharlo será mayor cuanto mas tiempo lleve activa la biopelícula (Chen y Chain *et al.*, 2006).

Luego de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a expandirse sobre la superficie en una monocapa sintetizando polímeros extracelulares los que hacen mas fuerte la unión irreversible y van formando microcolonias; luego las células cambian su comportamiento y dan lugar a la arquitectura del biofilme maduro (Chen y Chain *et al.*, 2006). El mas evidente de los cambios es el origen de la matriz de exopolisacáridos, y si las condiciones ambientales lo permiten, se puede extender hacia aéreas no infectadas, o liberar algunas células que recuperan las cualidades planctónicas para depositarse en nuevas superficies (Danesse *et al.*, 2000; Piera, 2003).

2.1.1.3 EPS y Maduración

En contraste con microorganismos planctónicos, las biopelículas secretan múltiples expolímeros (EPS), los cuales forman de un 50 – 90% de la materia orgánica total del biofilme. Los EPS se caracterizan por contener principalmente polisacáridos, sin embargo también se han identificado proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y algunas sustancias húmicas. Los EPS determinan la

integridad funcional y estructural de las biopelículas microbianas, y contribuyen significativamente a la organización de los mismos. Además, están envueltos en la formación y mantenimiento de la matriz (Denkhaus *et al.*, 2007), y a su vez mejoran la captura de alimento y proveen resistencia al estrés ambiental y a agentes antimicrobianos impidiendo el transporte de antibióticos a través de la estructura de la biopelícula (Donlan, 2002, Mclandsborough *et al.*, 2006, Stoodley *et al.*, 2002).

La composición del exopolímero consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares como glucosa, fructosa, manosa, N- acetil glucosamina y otros; los cuales se excretan desde la pared celular de manera radicular, se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, las cuales le suman a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos, ácidos nucleicos y teicoicos (Purevdorj *et al.*, 2002); las bacterias se sirven de ellos para retener nutrientes y para proteger a las bacterias de los diversos biocidas.

La presencia de ácidos urónicos y piruvatos le confieren propiedad aniónica, propiedad importante que permite la asociación de cationes divalentes como el calcio y magnesio que se sabe enlazan con el polímero y proporcionan buena fuerza de unión en la biopelícula desarrollada.(Donlan, 2002)

Los EPS son altamente hidratados porque pueden incorporar grandes cantidades de agua en su estructura por la unión de hidrógenos. Algunos pueden ser hidrofóbicos, aunque la mayoría son tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, esto hace que varíe su solubilidad. La composición y estructura de los polisacáridos determina la conformación primaria de algunos EPS, estos son más rígidos, menos deformables y en algunos casos menos solubles o insolubles (Tabla 1). Otro factor que determina características importantes en la estructura de un EPS es la uniformidad, ya que hay muchos que no son uniformes y varían temporalmente y espacialmente (Webb *et al.*, 2003). Son polímeros de alto peso molecular; las masas moleculares de estos pueden variar entre 500 y 2000 kDa.

Pueden asociarse e interactuar con otros componentes de la matriz como lectinas, lípidos, iones, proteínas y otras macromoléculas de la superficie celular, de esta manera se forma una red de polímeros, la cual determina la viscosidad del biofilm (Denkhaus *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación de EPS

Acción del exopolímero	Componentes de exopolímero	Función
Constructivo	Polisacáridos	Componentes estructurales
	Amiloides	Componentes estructurales
Absorción	Polisacáridos hidrofóbicos	Intercambio iónico, absorción
Actividad	Enzimas extracelulares	Degradación de polímeros
Actividad en superficie	Amfifílicos	Interacciones de interface
	Vesículas de membrana	Exportación desde el exterior, absorción
Información	Lectinas	Especificidad, reconocimiento
	Ácidos nucleicos	Información genética, estructura
Actividad redox	Polímeros bacterianos recuperados	Donador y aceptor de electrones
Nutrientes	Varios polímeros	Fuente de C, N, P

(Fleming *et al.*, 2007).

La matriz protege las células contra la acción de biocidas y de productos tóxicos y garantiza la cohesión de las células en el interior de la biopelícula y así mismo, su fijación al substrato. Las células microbianas ensambladas en una biopelícula están irreversiblemente asociadas en la matriz; en la cual pueden encontrarse también materiales no celulares como cristales, partículas de corrosión, limo y componentes celulares, esto depende del ambiente en el cual esta se desarrolle (Donlan 2002; Oldak *et al.*, 2005).

Estas células se caracterizan por poseer crecimiento lento y porque pueden coexistir a poca distancia una de la otra. Los gradientes de aceptores de electrones y substratos que se crean en el interior de la biopelícula crean una gran diversidad

de ambientes; es el ejemplo de organismos aerobios y anaerobios, los cuales pueden coexistir a poca distancia unos de otros debido al gradiente de O₂ generado en el interior de la matriz por la actividad metabólica de los organismos aerobios (Liu *et al.*, 2003). Todo el intercambio de nutrientes, de oxígeno y metabolitos de la biopelícula con el ambiente se da por medio de canales que permeabilizan la estructura (Mercier M *et al.*, 2004).

La señalización célula-célula juega un papel de gran importancia en la adherencia y desprendimiento de una biopelícula, esto está regulado genéticamente ya que existen algunos genes que modulan la expresión de las fimbrias en *Porphyromonas gingivalis*; así como en *Pseudomonas aeruginosa* existen dos diferentes sistemas diferentes de señalización involucrados en la formación de biopelículas. A medida que la densidad poblacional es mayor las señales alcanzan las concentraciones requeridas para la activación de genes involucrados en la diferenciación de esta. (Abbas *et al.*, 2007)

En la maduración, el ambiente favorece el crecimiento y la división de las células; la mayor parte del volumen está ocupado por la matriz laxamente organizada (75-95%) alrededor de algunas bacterias (5-25%), esto proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible. En la fase de la maduración se genera la arquitectura compleja, los canales, poros y la redistribución de las bacterias. (Piera; 2003, Stoodley, *et al.*, 2002), (Figura 1).

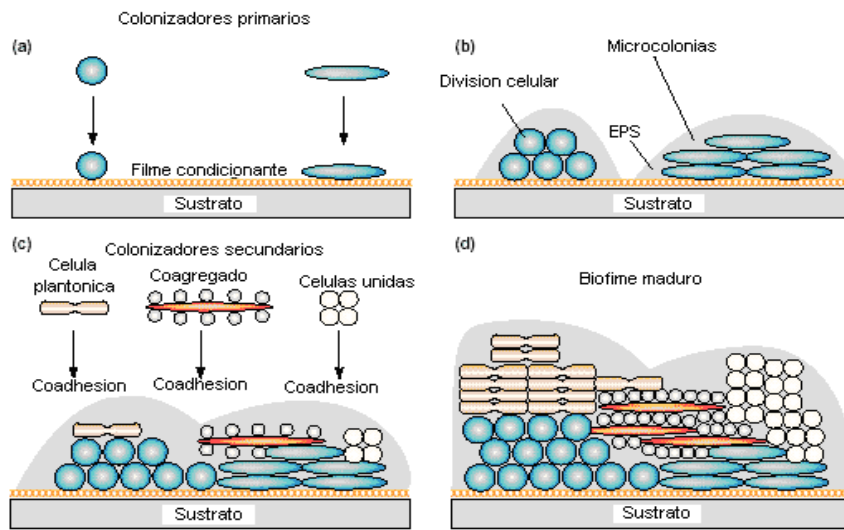


Figura 1. Ciclo de crecimiento bacteriano y formación de la biopelícula (Adaptado de Thomas y Nakaishi, 2006).

2.1.1.4 Dispersión

Las células pueden ser dispersas cuando las células madre liberan células hijas, puede también ser una respuesta a los niveles nutricionales, al quorum -sensing o a la remoción de pequeñas porciones de la biopelícula por causa del cambio en la fuerza del fluido; también procesos internos del biofilm como degradación endógena enzimática o por la liberación de EPS o proteínas ligadoras de superficie. En algunas especies, la dispersión parece ser un proceso activo el cual ayuda a la colonización de nuevos nichos (Thomas y Nakaishi, 2006, Stoodley *et al.*, 2004).

El desprendimiento es específico de especies, para *Pseudomonas fluorescens* primero hay una dispersión y luego una recolonización de una nueva superficie esto hace que las células migren de áreas muy colonizadas que algunas veces ya no tienen como más expandirse, de esta manera las células se transportan a

superficies donde puede haber mas posibilidad de nutrición y soporte para el crecimiento (Hunter y Beveridge, 2005).

Hasta el momento se han identificado tres estrategias de dispersión: dispersión de “semillas” de nuevas bacterias en las que células individuales son liberadas de una microcolonia al fluido que la rodea, otra es dispersión por aglutinación en la que los agregados de células son arrojados al medio y la ultima es la dispersión por superficie en la que estructuras de la biopelícula se transportan a través de la superficie (Stoodley *et al.*, 2004) (figura 2).

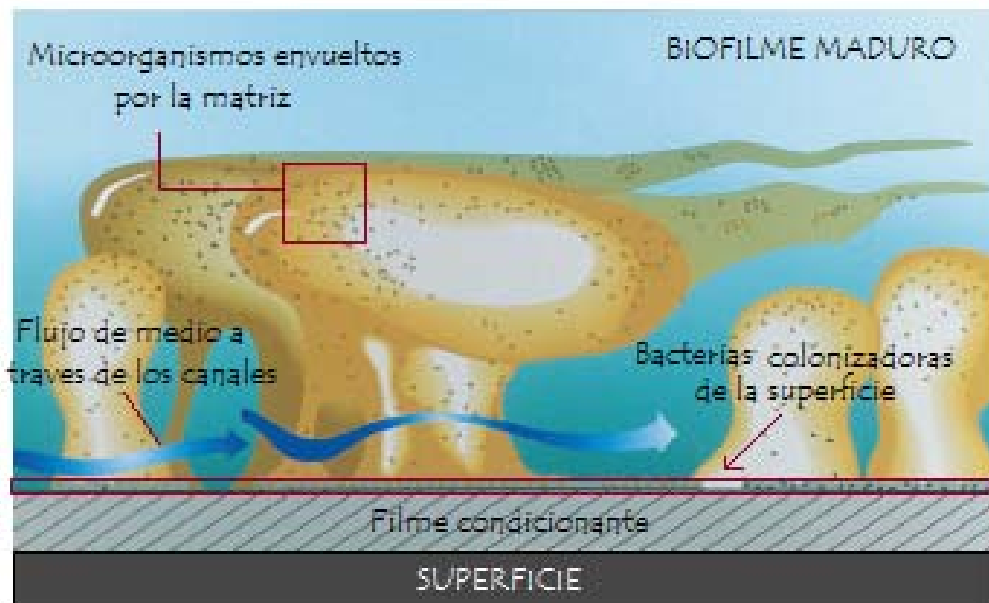


Figura 2. Estructura de la biopelícula madura desarrollada en una superficie inerte (Adaptado de Donlan y Consternon, 2002).

2.2 Efectos de las biopelículas

En la naturaleza las biopelículas pueden ser encontradas en el suelo, bajo el agua y en superficies bajo ambientes de humedad. En ecosistemas acuáticos y terrestres son importantes componentes de cadenas alimenticias, y están envueltos en procesos de autopurificación en suelo, agua y sedimentos y en la biodegradación

de compuestos orgánicos, incluyendo contaminantes ambientales. Estas propiedades ofrecen oportunidades de aplicaciones ambientales e industriales como purificación de agua residual y agua de consumo humano por biofiltración, biorremediación y formación de biobarreras para protección del suelo y el agua subterránea (Romeo, 2006). Por otro lado los biofilms pueden ser una amenaza para el ser humano, al crecer en implantes médicos como prótesis y válvulas cardíacas lo que conlleva a infecciones (Singh, 2002); pueden ser fuentes de patógenos, causando contaminación en procesos de manufactura de alimentos y en sistemas de distribución de agua potable (Figura 5). Asimismo pueden causar efectos negativos en la ingeniería debido al incremento indeseado de biofouling y biocorrosión, puesto que las biopelículas pueden aumentar la resistencia al calor en sistemas de refrigeración, alteraciones en la industria papelera, minera y petrolera, ya que las pérdidas a causa de estos problemas ascienden a billones de dólares, por este motivo se han desarrollado trabajos de investigación enfocados principalmente a biopelículas, encaminados de acuerdo a la morfología, función y remoción de estas (Little *et al.*, 2007), (Figura 3).



Figura 3. Biopelículas formadas en catéter cardíaco (Donland y Costerton, 2002)

2.3 Remoción de Biopelículas con Burbujeo

Micropartículas adheridas a superficies pueden ser desprendidas aplicando una interface líquido- aire (microburbujeo) sobre dichas partículas. Teóricamente, la eficiencia del desprendimiento depende de la velocidad, la tensión superficial del líquido, la viscosidad y las fuerzas de interacción partícula- substrato. Gómez-Suárez y colaboradores en 1999, comenzaron estudios de microburbujeo aplicando diferentes velocidades, distintas tensiones superficiales y empleando burbujeo en una cámara de flujo paralelo; estudiaron el desprendimiento de partículas de poliestireno en cuarzo, encontrando que la remoción de partículas podía ser incrementada por el paso de múltiples burbujas de aire.

Mas adelante se analizó desprendimiento con bacterias adheridas a superficies; *Streptococcus sobrinus* HG1025, *Streptococcus oralis* J22, *Actinomyces naeslundii* T14V-J1, *Bacteroides fragilis* 793E, y *Pseudomonas aeruginosa* 974K adheridas a vidrio hidrofílico y vidrio recubierto con dimetildiclorosilano en una cámara de flujo paralelo, luego de permitir el desarrollo del filme condicionante de cada una de las bacterias y aplicar burbujas de aire, se encontró que la remoción aumenta cuando la velocidad del flujo de aire disminuye y las tensiones superficiales son mayores, independientemente de la cepa y la hidrofobicidad de la superficie (Kaplan *et al.*, 2002). Sin embargo, los porcentajes de desprendimiento si varían dependiendo de la cepa y substratos envueltos. A bajas velocidades de burbujeo la hidrofobicidad del substrato no tiene influencia alguna, pero a altas velocidades hay mayor remoción en vidrio hidrofílico y a estas velocidades la morfología celular posee gran influencia en la eficiencia de remoción. (Gómez- Suárez *et al.*, 2001)

El desprendimiento de partículas coloidales empleando burbujas de aire incluye la aproximación e intercepción de la burbuja de aire a la partícula, disminución de la película líquida entre la esta y la burbuja, ruptura del filme líquido y la subsecuente formación de la tercera fase de contacto, estabilización del agregado partícula- burbuja y finalmente transporte de la partícula lejos de la superficie; en

todo este proceso el tamaño de las partículas también es un factor importante, al hablar de desprendimiento inducido por burbujeo, partículas pequeñas son menos sensibles a las velocidades de burbujeo que partículas de mayor tamaño, de igual forma partículas grandes son menos sensibles a las variaciones de tensión interfacial líquido- aire que las partículas de menor tamaño (Liu *et al.*, 2003). Por lo tanto, se ha propuesto que en partículas grandes la cantidad de líquido entre la burbuja y la partícula toma mas tiempo en disminuir y formar la tercera fase de contacto necesaria para inducir la fuerza de desprendimiento (Figura 4).

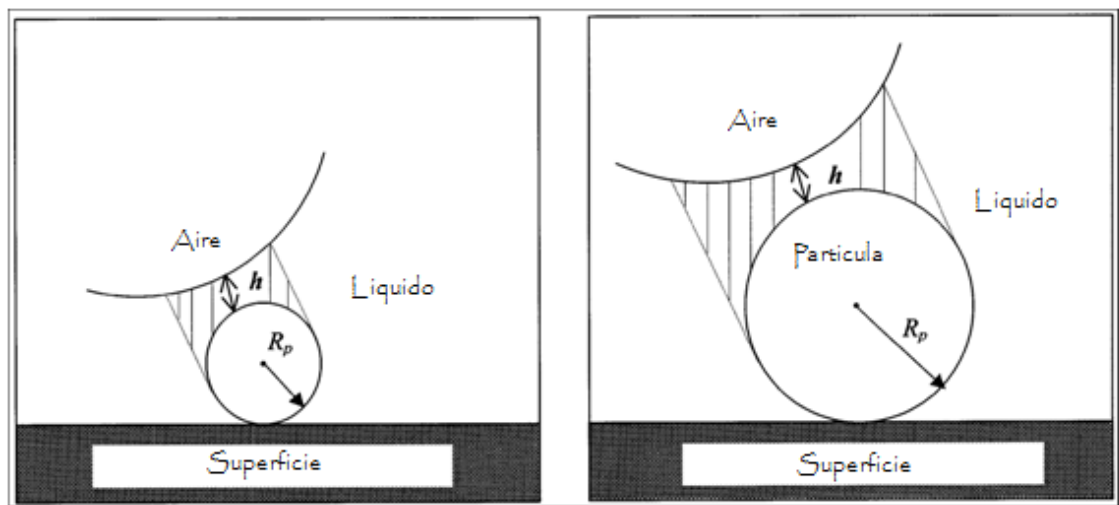


Figura 4. Volumen de líquido (área marcada) a ser drenado para la formación de la tercera fase de contacto entre la partícula- burbuja y fuerzas interfaciales de desprendimiento. Partículas pequeñas y grandes (Adaptado de Gómez- Suarez *et al.*, 1999).

Sharma y colaboradores en 2005 demostraron que el desprendimiento bacteriano se incrementa de un 40% a un 98% en algunas especies en presencia de microburbujas, a diferencia del flujo normal en el que estas se pueden encontrar inmersas; pero encontraron que aunque las microburbujas permiten el desprendimiento, estas no lo consiguen en coágulos bacterianos, es más efectivo en cepas bacterianas solitarias.

El paso de la interface gas – líquido dentro del sustrato causa fuerzas perpendiculares de desprendimiento en este y se opone a las fuerzas de adhesión (Figura 5). El análisis detallado de las fuerzas de desprendimiento, indica que

parte de estas fuerzas son dadas por impulsos semiconductores, para que el método de desprendimiento de partículas coloidales y bacterias de una superficie con cambios de flujo sea exitoso (Hunt *et al.*, 2004). Estas fuerzas superficiales de desprendimiento de 10^{-9} a 10^{-7} N, dependen de la fuerza gravitacional, de flotabilidad y fuerzas hidrodinámicas que actúan en los microorganismos (Sharma *et al.*, 2005).

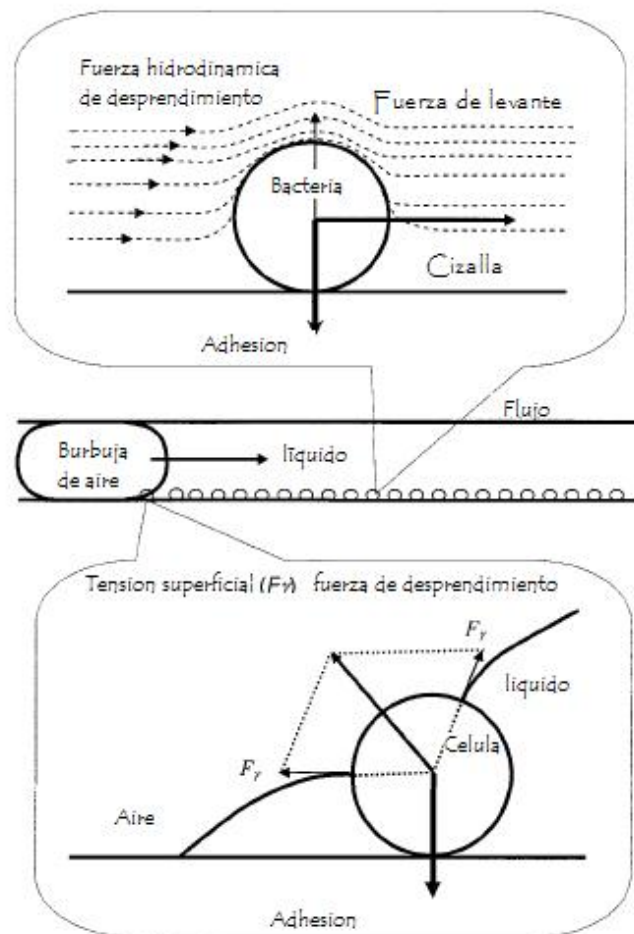


Figura 5 .Fuerzas hidrodinámicas que intervienen en el desprendimiento de una célula adherida a una superficie (Adaptado de Sharma *et al.*, 2005).

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo de 0,5 - 0,7 μm de espesor por 1,5 – 3,0 μm de largo. Es una bacteria ubicua de vida libre, no esporulada, aerobia, que puede crecer en ausencia de oxígeno, si el nitrato estuviese disponible en el medio de cultivo (Figura 6 y 7). Esta especie es quimiorganotrófica con un metabolismo respiratorio no fermentativo de carbohidratos y es capaz de utilizar acetato como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* de ambientes como el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón; esta bacteria sobresale entre otras por su extraordinaria capacidad de adaptación, ya que vive en ambientes muy diversos (Purevdorj *et al.*, 2002).

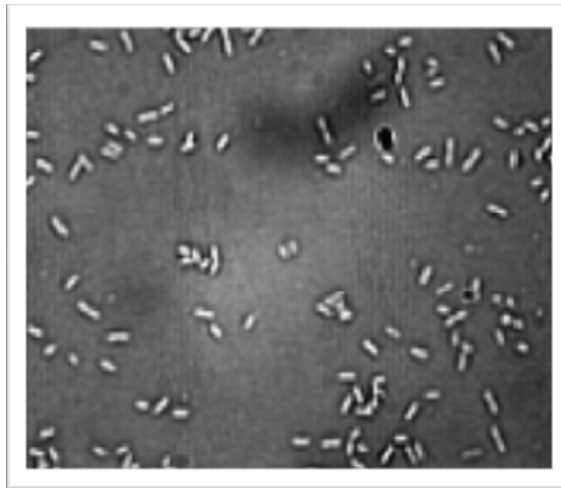


Figura 6. *Pseudomonas aeruginosa*. (Purevdorj, *et al.*, 2002)

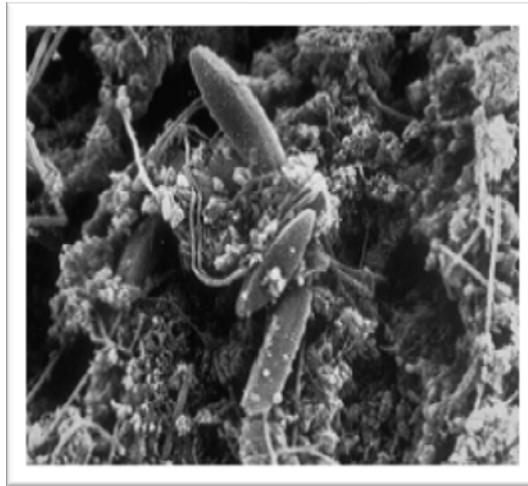


Figura 7. Biopelícula formada por *Pseudomonas aeruginosa* (Donlan, 2002).

El contenido de C+G de DNA de *Pseudomonas aeruginosa* es cerca de 67,2 mol%. El tamaño aproximado del genoma de esta bacteria es cerca de 6,3 millones de pares de bases (bp), que codifican 5570 genes. La clasificación taxonómica del género ha sufrido una serie de modificaciones los últimos años. Gracias al estudio filogenético molecular, nuevos criterios taxonómicos han surgido para reclasificar con mayor exactitud las especies de este género (Whiteley, 2001).

Se considera que la mayor proporción de las células de *Pseudomonas aeruginosa* que viven en el medio ambiente se encuentran formando biopelículas. *Pseudomonas aeruginosa* tiene tres formas de desplazarse, en medios líquidos se desplaza “nadando” mediante un único flagelo polar mientras que sobre las superficies tiene dos formas para moverse (Fonseca y Sousa, 2007). Una de ellas es, independiente de la presencia del flagelo, por un mecanismo llamado “twitching” que depende de las fimbrias o pili tipo IV. La motilidad tipo “swarming” se realiza en medios semi-sólidos y representa un movimiento concertado de las células en las que se vuelven alargadas y presentan múltiples flagelos (Lillehoj *et al.*, 2002).

Pseudomonas aeruginosa, al igual que otras bacterias cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten modificar la expresión de distintos genes en

respuesta de cambios en el medio ambiente. Producen cantidades muy pequeñas de alginato, el cual es un copolímero lineal con enlaces b-1,4 de D-manuronato y su epímero C-5, L-guluronato, el cual es uno de los componentes del exopolisacárido del biofilm formado por esta bacteria. (Kirisits *et al.*, 2005)

El lipopolisacárido (LPS) es un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El LPS de *Pseudomonas aeruginosa* es un factor de virulencia, y a diferencia del de otras bacterias esta molécula presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B. La banda A es un polímero de D-ramnosa que producen la mayoría de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la banda B tiene una estructura variable y determina el serotipo de las cepas (Southey-Pillig *et al.*, 2005).

2.5 Biopolímeros adhesivos de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa posee biopolímeros adhesivos que contribuyen a la adhesión de la bacteria a sustratos bióticos. Estos se ligan a receptores encontrados en las superficies de tejidos animales y vegetales.

Existen técnicas alternativas para el estudio de biopolímeros adhesivos no específicos, como el aislamiento de estos polímeros de “huellas celulares” que se forman después de la remoción de células adheridas por la acción de enzimas proteolíticas, por fuerza mecánica o por el paso de interface aire-liquido en el interior del biofilme. Las “huellas celulares” (footprints) contienen todos los biopolímeros de la superficie del microorganismo con afinidad al sustrato (Webb, *et al.*, 2003).

Los biopolímeros específicos para *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser flagelos celulares (Lillehoj *et al.*,2002) pilis (pili tipo IV) (Touhami *et al.*,2006) pseudo-pili, fimbrias, lectinas (Shroll *et al.*,2003), exoenzimas S (Baker *et al.* ,1991) y A y otras proteínas de membrana.

2.6 “Footprints”

Los “Footprints” o “huellas celulares” son estructuras microbianas abandonadas en la superficie por el microorganismo, después de un proceso de remoción.

Estos “Footprints” contienen fragmentos celulares de superficie y materiales excretados por este, además de biosurfactantes (Simões *et al.*, 2004) como los glicolípidos (Ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*), los cuales reducen la tensión superficial entre microorganismo- superficie (Hoogmoed *et al.*, 2000) y exopolisacárido.

Los exopolímeros son responsables de la interacción de los microorganismos con las superficies, además de actuar como la sustancia absorbente de la biopelícula; generalmente estos son entendidos como compuestos de polisacáridos microbianos, sin embargo por definición, otras sustancias extracelulares poliméricas pueden ser asociadas mas comúnmente a las biopelículas, por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos y compuestos poliméricos lipolíticos, que son los compuestos residuales que pueden encontrarse en los “Footprints” luego de una remoción o desprendimiento del biofilme (Neu *et al.*,2001).

Finalmente, estas estructuras forman una nueva superficie partiendo de la redeposición y desarrollando un ambiente óptimo para una nueva generación de microorganismos (Gómez- Suarez *et al.*, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Las biopelículas son acumulaciones de poblaciones de microorganismos, los cuales sobreviven en diversas superficies, que están inmersas en soluciones acuosas; estas condiciones incentivan la producción de sustancias, que a largo plazo ocasionan el deterioro de las superficies (Piera, 2003).

La fijación de las biopelículas es muy fuerte, esto causa modificación a nivel químico y biológico, mientras capta nutrientes y nuevas bacterias, con las cuales se dará inicio a más cambios enzimáticos y fisiológicos.

Por eso, una biopelícula en la última etapa de desarrollo es resistente, ya que estos consorcios sobreviven a condiciones extremas, debido a sus productos metabólicos y a su densidad poblacional, las cuales les brindan protección, tornándose un problema cuando se requiere un entorno limpio y desinfectado, ya que estas biopelículas brindan protección a diversos microorganismos, los cuales involucran contaminación cruzada, daños a nivel ambiental y ponen en riesgo la salud humana (Stoodley *et al.*, 2004).

Por esta razón, la remoción de biopelículas por medio de métodos físicos y biológicos son de gran importancia ya que se plantea como una posible solución a los problemas de carácter medioambiental, industrial y de salud, puesto que son la mejor herramienta para la desaparición de las biopelículas y de los demás problemas que originan estos consorcios bacterianos (Simões *et al.*, 2004).

Para la remoción de biopelículas se han planteado y desarrollado diferentes técnicas de tipo físico como el burbujeo con aire, fluido por estrés de choque y sonicación. Estas técnicas han sido modificadas de tal manera que contribuyen cada vez más al mejoramiento de los resultados de remoción, sin embargo no han

sido lo suficientemente eficientes para remover la biopelículas en su gran mayoría.

Finalmente, con este proyecto se busca contribuir en el desarrollo de técnicas de remoción de biofilme por medio del método de burbujeo, con el mejoramiento de los protocolos de remoción.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar los protocolos de remoción de células individuales y biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* MDC por el método de burbujeo para la obtención de footprints.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar un recipiente de flujo paralelo de burbujas de aire para remoción de *Pseudomonas aeruginosa* MDC en superficies de vidrio.
- Determinar la eficiencia del método por medio del tipo de agua utilizada en la remoción, tiempo y la asociación de los procedimientos de burbujeo y sonicación.
- Obtener footprints de *Pseudomonas aeruginosa* MDC por medio del método de burbujeo.
- Identificar morfológicamente footprints de *Pseudomonas aeruginosa* MDC en superficies de vidrio por medio de Microscopia Electrónica de Barrido.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo de Estudio

Se utilizó la cepa control de *Pseudomonas aeruginosa* MDC de biopelículas en una caja de agua de una industria con problemas de calidad de agua en la ciudad de São Paulo; la cual se encontraba conservada a -20°C en glicerol al 20%.

5.1.1 Determinación de pureza

Se realizó por medio de diluciones seriadas hasta 10^8 en solución de tampón KH_2PO_4 a una concentración final de 15mM.L^{-1} . Las diluciones 10^6 , 10^7 , y 10^8 se sembraron en medio sólido TSA (ver anexo1) y fueron incubadas durante la noche a 37°C. La uniformidad de las colonias y las características fenotípicas se analizaron macroscópicamente y las colonias fueron escogidas de forma aleatoria para ser analizadas por microscopia de contraste de fase.

5.1.2 Conservación de banco de prueba de *Pseudomonas aeruginosa*

El microorganismo fue cultivado en medio TSB estéril a 37°C en shaker a 157 rpm. El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica en un espectrofotómetro Ultrospec 100 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England), hasta alcanzar valores OD_{580} entre 0,540 a 0,650 que corresponden a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, alícuotas del cultivo se distribuyeron en tubos eppendorf de 1 ml, con glicerol al 20% y 80% de cultivo de células (v/v). Estos tubos se congelaron a -80°C.

5.2 Determinación de viabilidad del microorganismo

5.2.1 Inóculo

Se transfirió un inóculo de bacteria congelada a -80°C a 100 ml de medio TSB (ver anexo 1) estéril, se incubó durante 12 horas a 37°C en agitación constante a 157 rpm.

5.2.2 Curva de Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDC

Se retiró 1ml de inóculo y fue transferido a 100ml de medio TSB (ver anexo 1) estéril, la lectura de densidad óptica (OD) se observó cada 20 minutos desde el inicio del experimento hasta alcanzar un OD_{580} de 1,3 donde se hicieron evidentes los primeros indicios de la fase estacionaria.

5.3 Test de Adhesión

5.3.1 Preparación de la Muestra

5.3.1 .1 Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDC

Una alícuota de 1 μl de las muestras preservadas de *Pseudomonas aeruginosa* MDC fue resuspendida en 100 ml de medio TSB (ver anexo 1) estéril, fue mantenida bajo incubación a 37°C , en shaker a 157 rpm, por un periodo de 10 a 13 horas, hasta la mitad de la fase exponencial, con un OD entre 0,51 a 0,65 con una longitud de onda de 580 nm (Bejarano,2005).

5.3.1.2 Lavado y Obtención del Precipitado

Al alcanzar esa OD la muestra se dividió en dos tubos Falcón, con capacidad de 50 ml y se centrifugó por 5 min, a 6000 rpm a 4°C . Luego de la primera centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 ml de solución salina 0,02 M en tampón fosfato 5mM (pH 7.0) (ver anexo 2).

La centrifugación, el descarte y la resuspensión se realizaron por triplicado, y al término de la tercera el precipitado de los dos tubos se mezcló en un solo tubo, el contenido se resuspendió en solución salina 0,02 M en tampón fosfato 5mM (pH 7.0) suficiente para alcanzar un OD de 1,0 (Bejarano, 2005).

5.3.2 Test de Adhesión

5.3.2.1 Preparación del Material

Todo el material que incluía 9 laminas de vidrio de 7,5 cm alto x 2,5 cm ancho, cámara de vidrio y soporte fueron lavados primero con agua y Extran al 2%, y enjuagados con agua destilada; luego en seguida todo se sumergirá en solución sulfonítrica por un periodo de 1 hora, luego se lavaron con agua MiliQ en abundancia y todo el material se colocó a secar a 47°C (Bejarano, 2005).

5.3.2.2 Adhesión

Una gota (50 a 70 μ l) de suspensión celular fue colocada en contacto sobre el sustrato (vidrio). Las células quedaron en contacto durante 1 hora en el interior de la cámara con 100% de humedad (cámara de vidrio con solución salina 0,02 M en tampón fosfato 5 mM (ver anexo 2), con el sustrato colocado sobre el soporte. Luego del tiempo requerido, el sustrato fue lavado con la misma solución tampón para remover los microorganismos adheridos en la etapa reversible. Las células que permanecieron adheridas después del lavado fueron contadas por microscopia de contraste de fase. La desviación estándar en cada experimento se calculó a partir del recuento de células adheridas en 16 campos distintos en cada lámina y se expresó en células/cm² (Bejarano, 2005).

5.4 Remoción de Biofilmes y obtención de “footprints”

5.4.1 Burbujeo

Previo al desarrollo del método de burbujeo, se realizó nuevamente el procedimiento de adhesión, descrito en el numeral 5.3.2. Luego se construyó un recipiente plástico el cual consta de un soporte vertical para fijación de las láminas; en su base se instaló un tubo de silicona de 0,4 cm de diámetro, con hoyos de 0,075 mm de diámetro, acoplado a un compresor de aire. La extremidad del tubo opuesta a la bomba fue sellada, forzando así el paso del aire por los orificios (figura 8).

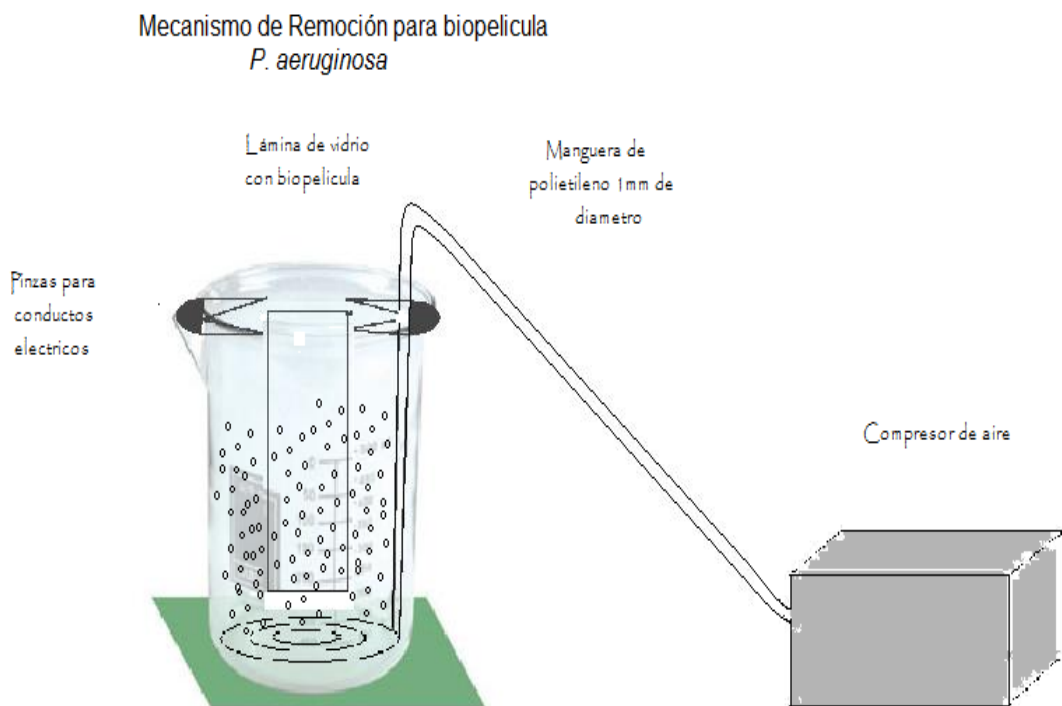


Figura 8. Mecanismo de remoción para biopelículas de *P. aeruginosa* MDC.

Se plantearon 5 tratamientos de remoción, los cuales se diferenciaron principalmente por el tipo de agua con la que se realizó la remoción y el tiempo de exposición a la nube burbujas de aire (Tabla 2). Todos estos tratamientos fueron realizados llenándose el recipiente de remoción con 500 mL de solución de remoción y fueron expuestos durante 2 y 5 minutos a la nube de burbujas. Luego del proceso, las superficies se lavaron con solución de remoción, para retirar las células no adheridas. Para el quinto tratamiento, luego de la remoción por burbujeo, se utilizó un baño ultrasónico 28X, el cual fue desgasificado durante 10 minutos, a una temperatura de 37°C, nivel 10 de energía y 3 minutos de sonicación. El sustrato conteniendo las células adheridas fue inmerso en un bequer de 50 mL que contenía 40 mL de agua destilada estéril previamente desgasificada. Después de la sonicación las láminas fueron lavadas por tres veces con agua destilada estéril.

Tabla 2. Tratamientos establecidos

Tratamiento	Descripción
1	Remoción durante 2 minutos con solución 0,02 M NaCl con tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 SIN FILTRAR (Ver anexo 2)
2	Remoción durante 5 minutos con solución 0,02 M NaCl con tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 SIN FILTRAR (Ver anexo 2)
3	Remoción durante 2 minutos con solución 0,02 M NaCl con tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 FILTRADA (Ver anexo 2)
4	Remoción durante 2 minutos con AGUA DESTILADA
5	Remoción durante 2 minutos con AGUA DESTILADA Y SONICACION POR 5 minutos

Finalmente para determinar el porcentaje de remoción se compararon los datos iniciales del test de adhesión previos al test de remoción con burbujas de aire con los datos resultantes de adhesión luego del burbujeo.

5.5 Análisis Microscópico para la determinación de la presencia de “footprints”

5.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Fue utilizado el microscopio electrónico de barrido JSM-6100 G.JEOL (Tokio, Japón), equipado con una cámara HR SM- 45145, que se encuentra localizado en el departamento de Minas de la Escuela Politécnica de la Universidad de São Paulo.

Las células y “footprints” que quedaron en los sustratos luego de la remoción por burbujeo y la sonicación fueron fijados con una mezcla de glutaraldehído 8% y formol 4% en tampón fosfato ($0,1 \text{ M.L}^{-1}$), por dos horas.

Luego las muestras fueron deshidratadas en una serie de diluciones de etanol (30 minutos en etanol 15%, 30 minutos en etanol 30%, 30 minutos en etanol 50%, 30 minutos en etanol 75% y cuatro repeticiones de 15 minutos en etanol 100%). Las muestras fueron secadas en el secador de punto crítico *baltec* CPD 030 (Furstentum Liechtenstein) e metalizadas con una fina capa de oro de aproximadamente 15nm, usando el metalizador *balzers Union* SCP 040 (Furstentum Liechtenstein). Posteriormente las muestras fueron analizadas por Microscopía electrónica de barrido.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDC se realizo en medio TSB, presentando una fase de adaptación de la bacteria en los primeros 40 minutos, luego de esto se puede observar crecimiento exponencial durante el minuto 60 hasta el 400 (1: 40 a 6:40 hora), después de esto el crecimiento del organismo se vuelve mas lento y mas lineal, indicando que alcanzó la fase estacionaria (Figura 9). Asimismo, la recta de regresión en el grafico de crecimiento logarítmico (Figura 10), demuestra la fase exponencial significativa de la hora 100 minutos hasta 260 minutos (1:20 a 4:40 hora).

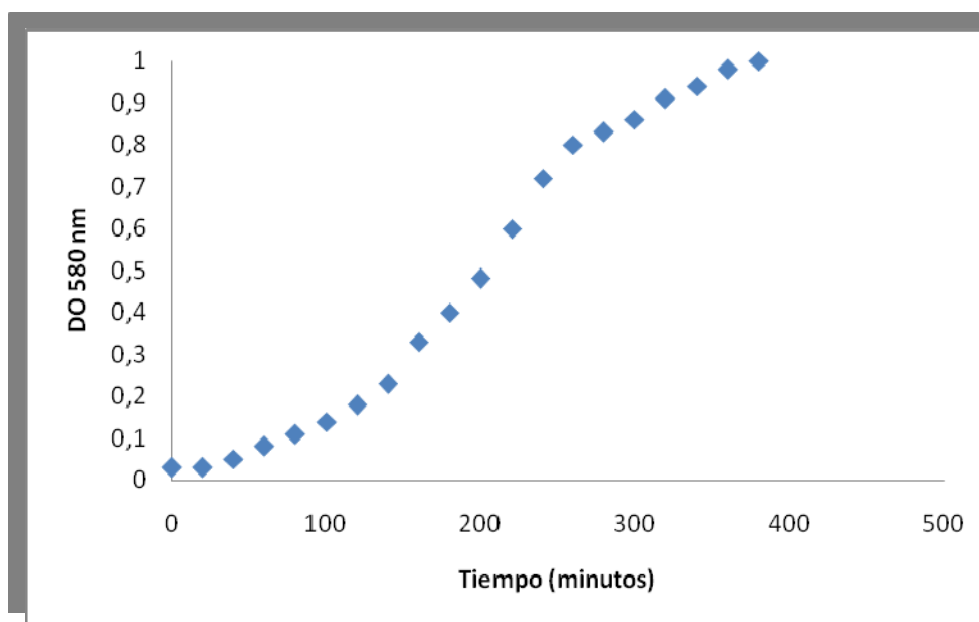


Figura 9. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDC en medio TSB, representación no logarítmica.

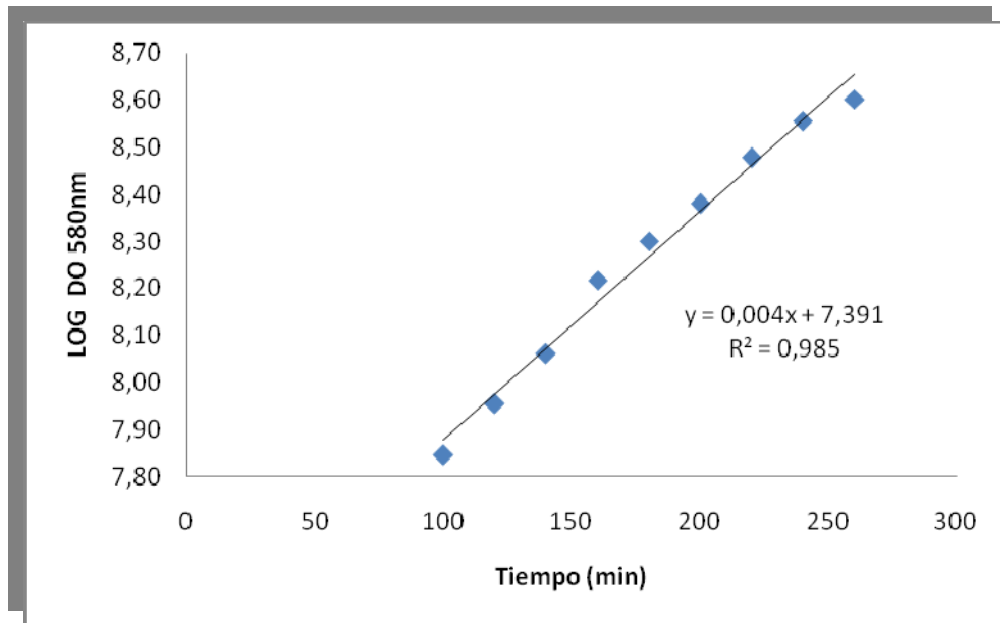


Figura 10. Representación logaritmico del crecimiento exponencial de *Pseudomonas aeruginosa* MDC, la recta de regresión lineal indica el intervalo de crecimiento exponencial.

6.2 Test de adhesión inicial

Se realizaron 9 ensayos independientes en laminas de vidrio y se observaron 16 campos diferentes para determinar la adhesión y el número de células por cm^2 ; evidenciándose por medio de microscopia de contraste de fase que las bacterias estaban realmente adheridas al sustrato inerte y que aún presentaban motilidad, después de realizado el test de adhesión (Figura 11).

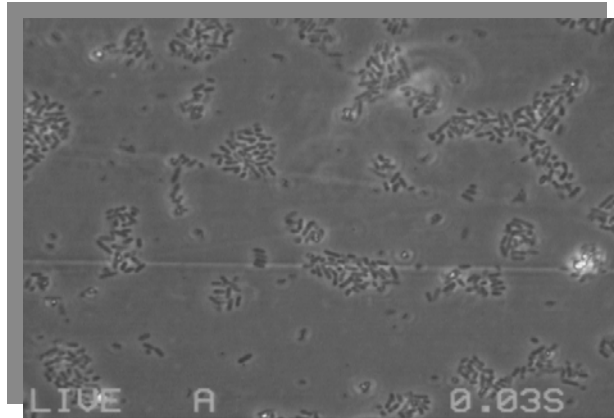


Figura 11. Test de adhesión inicial, ensayo 4

El periodo de adhesión fue efectuado por 1 hora de acuerdo con Bejarano (2005) y se realizaron diversos test, para observar la repetitividad y reproducibilidad de estos y su posible utilización como patrón en los ensayos subsiguientes. Además de esto, todos los test de adhesión efectuados, se realizaron con los microorganismos en fase exponencial (OD_{580} 0,72), puesto que durante esta etapa de desarrollo *P. aeruginosa* produce sustancias de adhesión y es más apta para la adherencia al sustrato inerte (Figura 12 y Tabla 3).

Los resultados de adhesión arrojados por Bejarano (2005) se encontraban en el rango de $10^6 \pm 10^5$ cel/cm² tanto para sustratos hidrofílicos como hidrofóbicos. Al observar la figura 12 se puede observar que para los 9 ensayos realizados en el test de adhesión inicial de este estudio el número de células/cm² se encontraba en el rango de $10^6 \pm 10^5$ cel/cm², con un promedio de células adheridas inicialmente de $8,60 \times 10^6 \pm 10^5$ cel/cm² (Tabla 3), estos datos además concuerdan con los obtenidos por diferentes autores donde la densidad poblacional promedio fue alrededor de 10^6 células/cm² (Gómez-Suarez *et al.*, 2001; Gómez-Suarez *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2008).

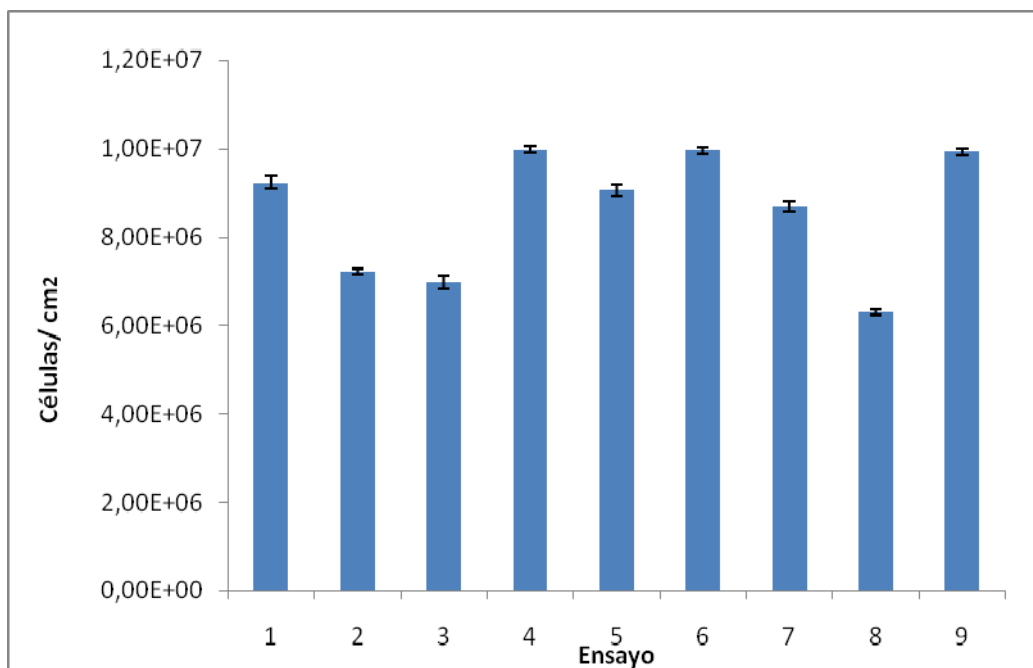


Figura 12. Test de adhesión inicial de *P. aeruginosa* MDC, las barras permiten observar la densidad poblacional de cada lámina del test de adhesión inicial y la respectiva desviación estándar de cada uno.

Tabla 3. Test de adhesión inicial con células *P. aeruginosa* MDC en la fase exponencial en sustrato inerte (vidrio).

Fase de Crecimiento	OD 580 nm	Tiempo (Horas)	Promedio de células adheridas (cel/cm ² ±DS)
Exponencial	0,72	4	8,60 x 10 ⁶ ± 10 ⁵

Además de esto, se tiene que tener en cuenta que la solución de adhesión ejerce un papel importante en esta, porque en soluciones con alta carga iónica como el tampón fosfato, el cual fue utilizado en todos los test de adhesión del presente estudio, decrece la repulsión electrostática y hay un aumento significativo de la adhesión entre la superficie y la partícula flotante, en este caso la bacteria (Bakker *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2008).

Asimismo, cabe resaltar que al realizar la adhesión en 1 hora, el proceso de maduración del biofilme se está iniciando; sin embargo a este tiempo, la adhesión irreversible está formada, puesto que la adhesión primaria; la cual está dada por la interacción de fuerzas de atracción de larga distancia de Van der Waals, la fuerza de repulsión electrostática generada por la dupla capa eléctrica, el filme condicionante y la bacteria, ya se originó (Bos *et al.*, 1999).

Las interacciones físico-químicas iniciales son ejercidas por fuerzas básicas no específicas (Van der Waals, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y movimiento Browniano) las cuales se dan como resultado de un proceso natural (Bussher y van der Mei, 1997), sin embargo el reconocimiento específico entre la célula y la superficie se atribuye a adhesinas específicas de cada bacteria; por esta razón se puede inferir que *Pseudomonas aeruginosa* MDC tuvo una adhesión eficiente, ya que por literatura, se sabe que este microorganismo presenta estructuras proteicas que participan en el proceso de adhesión y formación de biopelículas en sustratos inertes e incluyen flagelos (Heydorn *et al.*, 2002), pili (Deziel *et al.*, 2001; Touhami *et al.*, 2006) y fimbrias que facilitan la adhesión inicial a superficies abióticas (Vallet *et al.*, 2001).

6.3 Test de Remoción

Se realizaron 4 ensayos de cada tratamiento y se realizó conteo directo de células por microscopía de contraste de fase antes y después de la remoción, determinándose el porcentaje de células removidas.

6.3.1 Test de adhesión para cada tratamiento de remoción

Se llevaron a cabo 5 test de adhesión en momentos diferentes bajo las mismas condiciones (solución salina 0.2 M en tampón fosfato 0.5mM (pH 7.0) estéril durante 1 hora), y se determinó la concentración de bacterias adheridas al sustrato inerte (Figura 13) , proporcionando resultados equivalentes al test de adhesión inicial (Tabla 4).

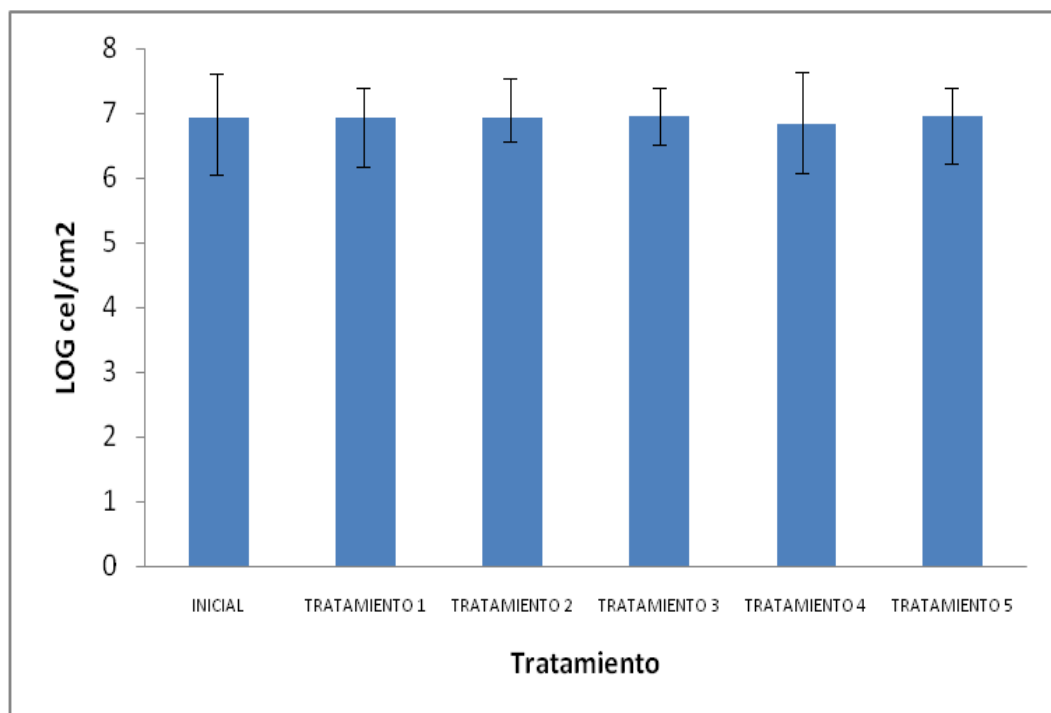


Figura 13. Promedio de logaritmo de células/cm² del test inicial de adhesión y del realizado para cada tratamiento de remoción, las barras indican la densidad poblacional del test inicial y de cada tratamiento con su respectiva desviación estándar.

Tabla 4. Promedio de la concentración de células/cm² en los test de adhesión realizados para cada tratamiento y para el inicial. (DS: desviación estándar)

Tratamiento	Promedio cel/cm ² ± DS
INICIAL	8,6 x 10 ⁶ ± 10 ⁵
1	8,6 x 10 ⁶ ± 10 ⁵
2	8,5 x 10 ⁶ ± 10 ⁵
3	9,0 x 10 ⁶ ± 10 ⁵
4	6,6 x 10 ⁶ ± 10 ⁵
5	8,8 x 10 ⁶ ± 10 ⁵

6.3.2 Remoción

En la figura 14 se puede observar microscópicamente el proceso de adhesión y de posterior remoción para cada tratamiento, reflejándose también en los porcentajes de remoción (Figura 16) y en la densidad observada en los sustratos de vidrio; ya que en los tres primeros tratamientos (Figura 14.1a , 14.1d; 14.2 a, 14.2d y 14.3 a ,14.3d) la densidad poblacional fue mayor a las observadas en el tratamiento 4 (Figura 14.4 a y 14.4d) y nula en el tratamiento 5 (Figura 14.5 a y 14.5d), donde, después de la remoción no hubo células adheridas.

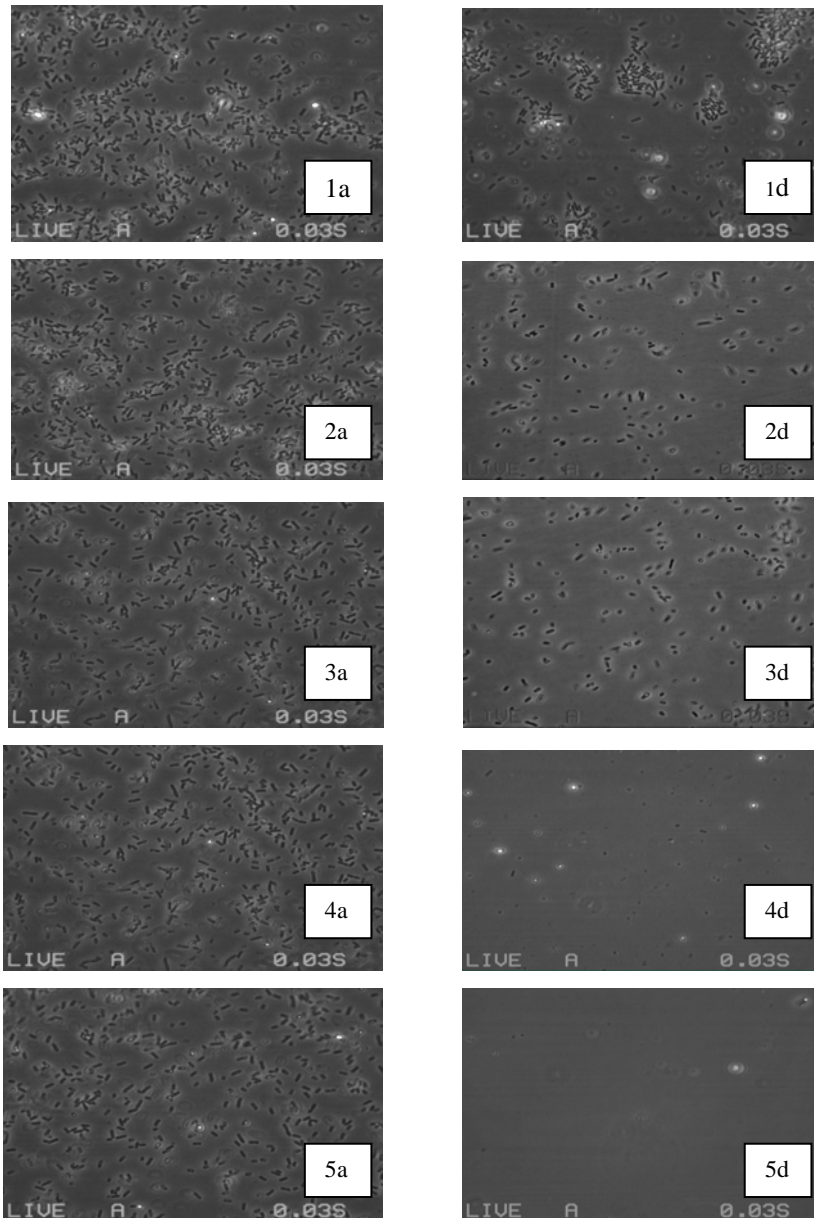


Figura 14. Microscopía de contraste de fase para los 5 tratamientos. **1 a.** Tratamiento 1 (2 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 sin filtrar) antes de la remoción. **1 b.** Tratamiento 1 después de la remoción. **2 a.** Tratamiento 2 (5 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 sin filtrar) antes de la remoción. **2b.** Tratamiento 2 después de la remoción. **3 a.** Tratamiento 3 (2 minutos de remoción con solución 0,02 M NaCl en tampón fosfato 5 mM, pH 7.0 filtrada) antes de la remoción. **3b.** Tratamiento 3 después de la remoción. **4 a.** Tratamiento 4 (2 minutos de remoción con agua destilada) antes de la remoción. **4b.** Tratamiento 4 después de la remoción. **5 a.** Tratamiento 5 (2 minutos de remoción con agua destilada y sonicación por 3 minutos) antes de la remoción. **5d.** Tratamiento 5 después de la remoción.

En el tratamiento 1 , las células adheridas al sustrato inerte fueron sumergidas en solución salina 0,02 M en tampón fosfato 0,5 mM no filtrado , para realizar la remoción con mecanismo de burbujeo, esta estrategia fue realizada por 2 minutos e inmediatamente después de hecho este procedimiento se contaron las células no desprendidas para determinar el porcentaje de remoción en cada ensayo del tratamiento y la reducción de la concentración de bacterias con respecto a las adheridas inicialmente, mostrando una baja disminución en la concentración de bacterias adheridas después de la remoción, expresada en logaritmo (Figura 15). Los resultados en este tratamiento demostraron que el porcentaje promedio entre los 4 ensayos de este fueron de 71,3% (figura 16); de acuerdo con lo anterior, este tratamiento fue el que mostró un menor porcentaje de remoción con respecto a los demás tratamientos expuestos, esto se debió a que este ensayo fue realizado en buffer fosfato sin filtrar, lo que pudo originar que algunas partículas suspendidas y células muertas en esta solución hayan sido adheridas al sustrato y por consiguiente, sirvieran de alimento y de posible sitio de anclaje a las bacterias; además de esto , el tiempo al cual fue expuesto el sustrato con la biopelícula a las burbujas de aire, fue de 2 minutos, arrojando porcentajes promedio de remoción de 63 a 75%, estos datos son similares a los encontrados en estudios realizados por Sharma y colaboradores en el 2005, en donde determinaron que al exponer una biopelícula de características similares a las realizadas en este ensayo se obtenían resultados de remoción del 70 al 80% ,sin embargo estos estudios se realizaron bajo la influencia de una tasa de flujo constante de 200, 235 y 300ml min⁻¹ y el presente estudio se realizó en carencia de flujo, demostrando con esto que el flujo laminar para este caso, no fue un factor determinante para que existiera remoción.

Así también, el tratamiento 2 fue realizado bajo las mismas condiciones que el mencionado anteriormente, pero durante 5 minutos, arrojando un porcentaje promedio de remoción de 91,3% (Figura 16) y la disminución de una unidad logarítmica en cada uno de los cuatro ensayos del tratamiento (Anexo 3). Al observar estos resultados se pudo concluir que al aumentar el tiempo de exposición (5 minutos) a la nube de burbujas ,el porcentaje de remoción aumento 20% con respecto tratamiento 1, este fue realizado también con tampón

fosfato sin filtrar, siendo el tiempo el factor determinante al momento de realizar la remoción y arrojando resultados de remoción (91,3%) poco satisfactorios ya que aunque hubo un aumento del 20%, el ideal es del 100%; con esto se confirmó que la remoción bacteriana ocurre predominantemente en los primeros dos minutos (Sharma *et al.*, 2005); de la misma manera esto se demostró al observar la similitud de resultados de remoción entre los tratamientos 2 (91,25%) y 3 (94,3%), los cuales fueron expuestos al burbujeo durante 5 y 2 minutos respectivamente.

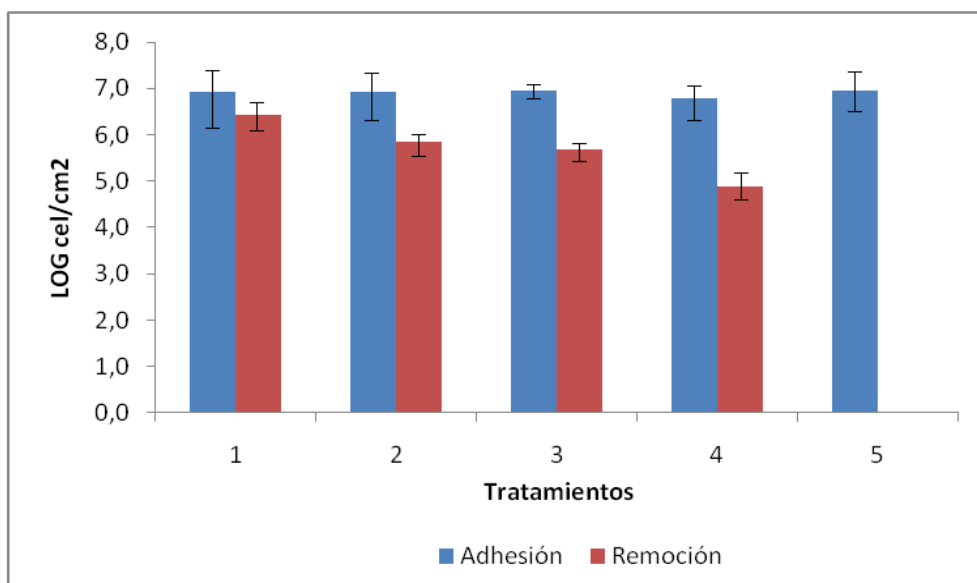


Figura 15. Promedio de la concentración de cel/cm² antes de la remoción y después de la remoción de cada tratamiento expresada en logaritmo. Las barras azules indican la densidad poblacional de células de cada test de adhesión para cada tratamiento con su respectiva desviación estandar. Las barras rojas indican las células que permanecieron adheridas después de la remoción y su respectiva desviación estandar.

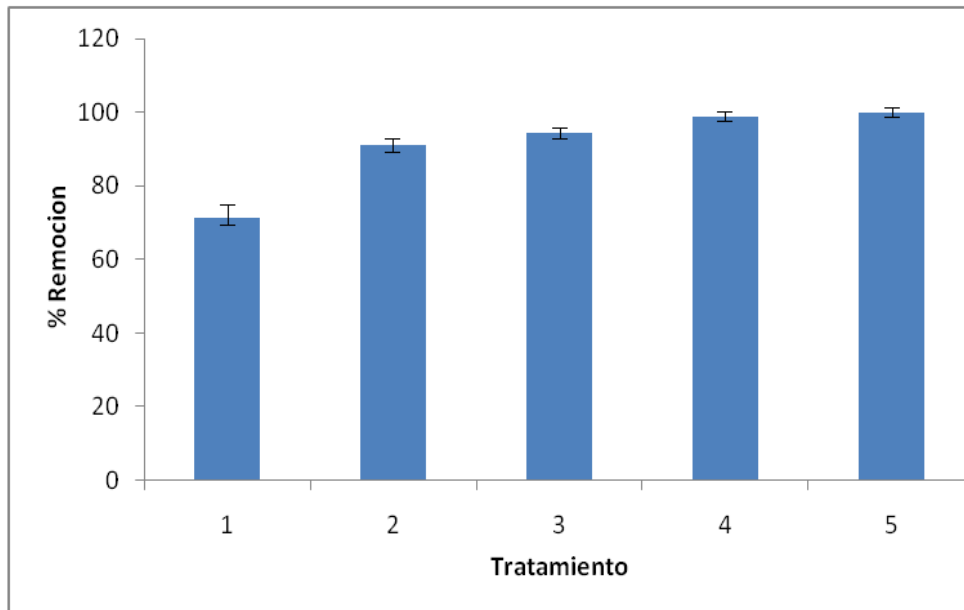


Figura 16. Porcentaje promedio de remoción para cada tratamiento, con su respectiva desviación estándar.

Por otra parte el tratamiento 3 fue realizado con la misma solución de remoción filtrada y expuesto por 2 minutos a la nube de burbujas, estableciéndose que el porcentaje promedio de remoción para este caso, fue de 94,3% (Figura 15), no obstante, aunque el porcentaje de remoción fue mayor a los tratamientos anteriores, no hubo una disminución significativa en la concentración de células adheridas con respecto al tratamiento 2 (Figura 15, Anexo 3). Los resultados anteriores se pudieron originar debido a que, en el tratamiento 2 se necesitó de mas tiempo para remover las células y partículas adheridas que en el tratamiento 3, donde solo fueron necesarios dos minutos; infiriéndose así, que la remoción de la biopelícula en presencia de tampón fosfato filtrado fue mas efectivo ya que no hubo arrastre de partículas ni de células muertas que pudieran ser fuente de nutrición para las bacterias, manteniendo la población constante.

Al observar los resultados de los tratamientos antes mencionados, se formularon estrategias para disminuir la densidad de células adheridas al sustrato y se plantearon posibles alternativas para incrementar la eficiencia de la remoción. Por esta razón en el tratamiento 4 se sustituyó la solución de remoción utilizada anteriormente, por agua destilada estéril; esto generó una disminución significativa de 2 unidades logarítmicas en la concentración de células/cm² (Figura 15) y un porcentaje promedio de remoción de 98,7%; aunque este no es el valor deseado si es un valor más alto con respecto a los obtenidos al utilizar tampón fosfato filtrado y no filtrado, esto se puede explicar teniendo claro que el pH de las reacciones de los medios biológicos deben mantenerse constantes, lo cual es fundamental para el mantenimiento de procesos estables (Túnez Fiñana *et al.*, 2000), en el caso del tampón fosfato, al ser una solución electrolítica, (NaCl, KH₂PO₄ y K₂HPO₄) esta se disocia en presencia de superficies cargadas negativamente, como las bacterias y superficies de adhesión, esta característica de carga hace que se afecte el equilibrio electrostático, puesto que estas repelen aniones y atraen cationes de la solución, formando la dupla camada eléctrica; en esta estructura, existen fuerzas de repulsión y fuerzas de atracción, las cuales interactúan con la superficie, la bacteria y el líquido en el que están inmersas. Todo lo anterior causa que los cationes al unirse con la superficie negativa, sean un punto de anclaje para la bacteria la cual también está cargada negativamente, aumentando las fuerzas de atracción.

Por otra parte, al ser el agua destilada una solución carente de electrolitos no existe un desequilibrio iónico dado por la disolución de iones, lo cual aumenta la repulsión entre superficie- bacteria puesto que poseen la misma carga, esto sumado al hecho de que el agua es un solvente en el cual los electrolitos aún presentes, provenientes de la solución de adhesión, se unen a las moléculas de agua, disminuyendo así los cationes que servían de unión entre la bacteria y la superficie (Bos *et al.*, 1999)

Aunque los porcentajes de remoción de los primeros tres tratamientos no fueron los ideales, se puede explicar que la razón por la cual se obtuvo remoción a

concentraciones bajas de NaCl (Bejarano, 2005) se pudo deber a la teoría de DLVO (Deryaguin- Landau- Verwey- Oberbeek) la cual explica que cuando los microorganismos están adheridos a superficies abióticas como en este caso, están controladas por el equilibrio de las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostática generada por los componentes de la interacción microorganismo- sustrato (Bos *et al.*, 1999). En soluciones con concentraciones bajas de sales o nulas, como el agua destilada, la fuerza de repulsión electrostática de la dupla camada eléctrica ubica al microorganismo a una distancia en donde las fuerzas de atracción de Van der Waals serán débiles o probablemente inactivas y no podrán aproximarlos al sustrato.

No obstante, para la obtención de footprints puros es necesaria una remoción total de bacterias, por eso el tratamiento 5 se realizó con agua destilada, acoplado a sonicación para la remoción de las bacterias restantes; esto demostró que de los cuatro ensayos realizados en este tratamiento, el ensayo 2 originó un porcentaje de 99,92% y los tres ensayos restantes 100% (Anexo 3), esto indica que el protocolo de remoción por burbujeo acoplado a sonicación fue efectivo en la remoción de las bacterias; se puede considerar que en el ensayo donde no se obtuvo 100%, se pudo deber a errores experimentales en el momento del lavado de la lámina o porque en el momento de retirar la lamina luego de la remoción, tanto en el burbujeo como en la sonicación, quedaron células en la solución de remoción y estas fueron arrastradas en la lamina generando una redeposición; disminuyendo la probabilidad de que el agregado partícula- burbuja permaneciera estable durante el transporte lejos de la superficie (Gómez- Suarez *et al.*, 2001).

Se debe tener en cuenta que durante los 5 tratamientos hubo otros aspectos que influyeron en los resultados obtenidos; dentro de estos se encuentran las fuerzas ejercidas sobre y desde la burbuja, bacteria y superficie. Estas hacen parte del proceso de remoción por burbujas de aire, la cual lleva en primer lugar al acercamiento de la burbuja con la bacteria adherida, la intercepción de la burbuja hacia la célula, la deformación de la burbuja, el drenaje del líquido proveniente del espacio burbuja-célula y por ultimo la formación de la tercera fase de

contacto, que lleva al desprendimiento de la superficie a la bacteria (Gómez-Suarez *et al.*, 2001).

Gómez-Suarez y colaboradores en el 2002, obtuvieron mayores porcentajes de remoción en superficies hidrofílicas con respecto a superficies hidrofóbicas, estos resultados confirman los obtenidos en el presente estudio, puesto que la superficie y sustrato del biofilme tenía características hidrofílicas, que aumentaron la remoción. De acuerdo con esto, en otros estudios realizados por Gómez-Suarez y colaboradores en el 2001, señalan que las fuerzas de desprendimiento se incrementan cuando las partículas están cargadas negativamente, como la superficie de las bacterias, puesto que la carga interviene en la interacción con el fluido al cual esta expuesto, tanto la superficie, como la bacteria.

Entre otras de las razones por las cuales los tres tratamientos realizados con tampón fosfato arrojaron menores porcentajes de remoción, con respecto a los realizados con agua destilada y con acoplamiento a la sonicación (Figura 17); se puede decir que el tampón fosfato por ser una solución, contiene diversas sustancias que lo hacen más viscoso que el agua destilada, en consecuencia a esto, cuando se forma el complejo bacteria-burbuja, la fuerza ejercida por la viscosidad del medio es mayor y se disminuye la probabilidad de remoción por parte de la burbuja (Gómez-Suarez *et al.*, 2001).

Es importante resaltar que la remoción realizada en este experimento se realizó en carencia de flujo laminar por parte del fluido de remoción, solo se generó movimiento con la nube de burbujas inmersas dentro de la solución, esto pudo producir movimiento cíclico del fluido en el ensayo, lo cual induce a la bacteria en un estado de estrés, puesto que hace que cambie su estructura y modifique las fuerzas de adhesión con respecto a la superficie (Ovazzani y Bentama, 2008). Esto se debe también a que los biofilms que se exponen a flujos turbulentos son más estables y rígidos, puesto que tienden a formar estructuras que crecen de manera no uniforme (Bussher y Van der Mei, 2005). Esto es de gran relevancia para el presente estudio, puesto que en estudios realizados por, Sharma y colaboradores

en el 2005, Rochex y Lebeault en el 2007 y Simões y colaboradores en el 2008, demostraron que el desprendimiento bacteriano se hace más eficiente si se realiza junto a una corriente o flujo laminar dado por el caudal de la solución de remoción.

6.3.3 Analisis Microscopico para la determinación de la presencia de “Footprints”

Al realizar la microscopia electrónica de barrido de 3 de las 4 láminas del tratamiento 5, se pudo observar la presencia de “footprints”. El uso de esta técnica permitió una mejor caracterización del proceso de remoción por burbujeo acoplado a sonicación, puesto que se pudo comprobar la eficiencia del método de desprendimiento de bacterias utilizado en este estudio.

Según lo observado en la lámina 2 del tratamiento 5 (figura 17a) se comprobó la ausencia parcial de bacterias sobre la superficie expuesta al burbujeo acoplado a sonicación, identificándose solo dos bacterias adheridas del total de campos examinados en la microscopia electrónica; además de esto, se confirmó la ausencia de bacterias y se identificaron footprints resultantes del desprendimiento de las células luego de aplicado el burbujeo acoplado a sonicación (tratamiento 5) en la lámina 3 (figura 17b).

Los “footprints” presentaron un tamaño que oscilaba entre 1,3-2,5 μm y se identificaron claramente por presentar morfología ovalada alargada; aunque estos presentaron tamaño similar al de las células identificadas (1,29 μm) y similar a la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* MDC (figura 17a), se cree que la morfología de los footprints esta asociada a los diferentes mecanismos de contacto de las células con la superficie y al número de puntos de contacto entre la superficie celular y el sustrato (Neu y Marshall, 1991; Bejarano y Schneider, 2004).

El material extracelular observado por medio de microscopia electrónica de barrido muestra diferentes tipos de partículas, las cuales probablemente eran polímeros extracelulares condensados luego de la deshidratación y pueden demostrar la posible participación de estos polímeros en los footprints microbianos (Figura 17c).

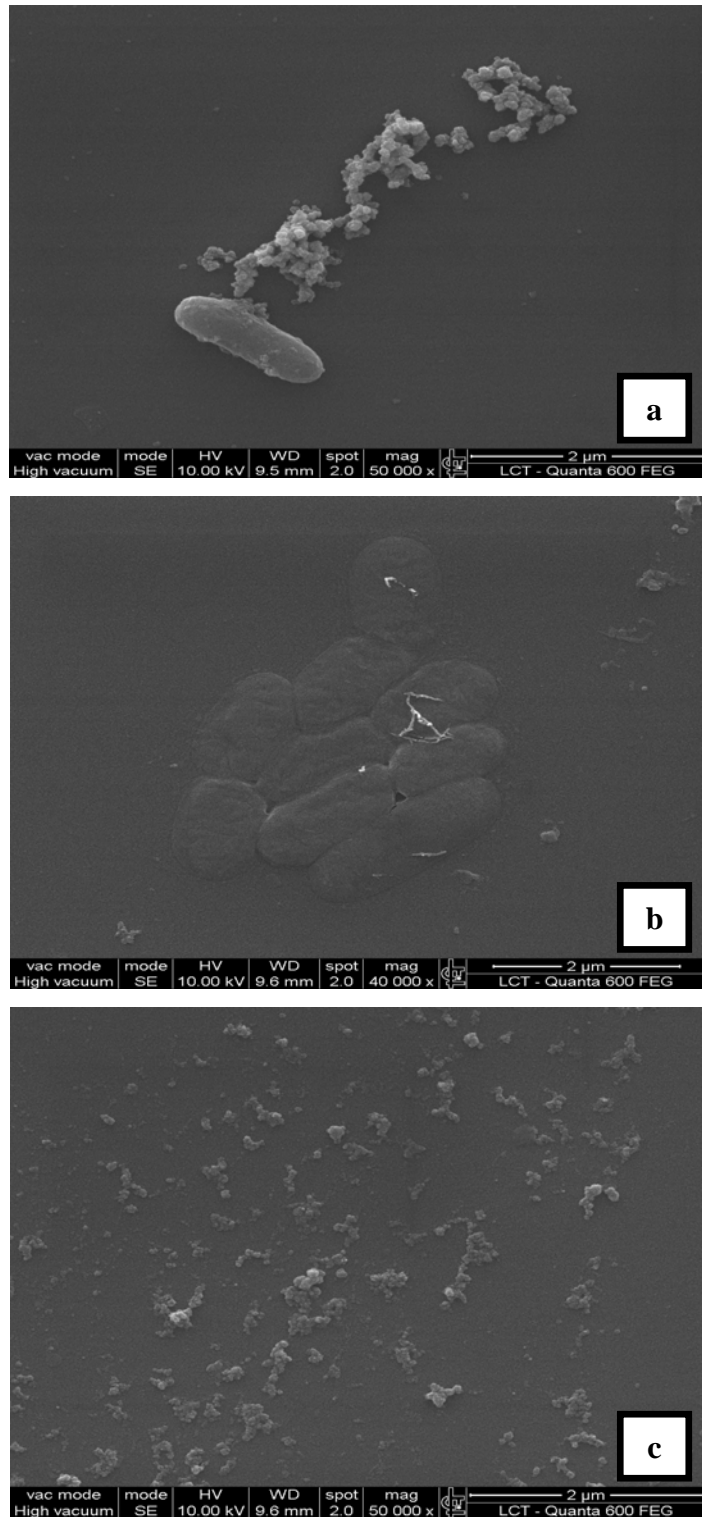


Figura 17. Microscopia electrónica de Barredura. a: Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* MDC luego de remoción con burbujeo acoplado a sonicación (tratamiento 5, lámina 2; Aumento 50000X). b: “Footprints” de *Pseudomonas aeruginosa* MDC después de remoción con burbujeo acoplado a sonicación (tratamiento 5, lámina 3; Aumento 40000X). c: Partículas de carácter externo depositadas en la superficie. Remoción por burbujeo acoplado a sonicación (Tratamiento5, lamina 4; Aumento 50000X).

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló un recipiente de flujo paralelo de burbujas de aire, con el cual se logró optimizar la remoción de *Pseudomonas aeruginosa* MDC en sustratos de vidrio, obteniendo porcentajes de remoción cercanos al 100%.

El agua es un factor determinante en la remoción de *Pseudomonas aeruginosa* MDC, puesto que se comprobó que al realizar la remoción con agua destilada esteril, se obtuvieron porcentajes de remoción encima del 98%.

El tiempo de remoción suficiente para cada ensayo fue de 2 minutos, ya que a más tiempo, esta no fue significativa.

Se obtuvieron footprints de *Pseudomonas aeruginosa* MDC, los cuales se lograron identificar por medio de microscopia electrónica de barrido.

8. RECOMENDACIONES

Realizar la remoción por burbujeo en presencia de flujo en movimiento para maximizar la eficiencia del método.

Determinar la velocidad del flujo de burbujas para evitar variaciones en la tasa del burbujeo, además conocer el tamaño de las burbujas.

Realizar identificación química y molecular de “footprints” de *Pseudomonas aeruginosa* MDC .

9. BIBLIOGRAFÍA

- **Abbas, A; Adams, C; Scully, N; Glennon, J y O’Gara, F.** 2007. A Role for TonB1 in Biofilm Formation and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Federation of European Microbiological Societies*. 274: 269-278.
- **Baker, N.R; Minor, V; Deal, C; Shahrabadi, M.S y Simpson, D.A.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S is an Adhesin. *Infection and Immunity*. 2859- 2863.
- **Banin, E; Vasil, M y Greenberg, E. P.** 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *PNAS*. 102: 11076- 11081.
- **Bejarano, E.** 2005. Extração e Identificação dos Biopolímeros Adesivos não Específicos da Estrutura de “Carimbo Celular” de *Pseudomonas aeruginosa* MDC. Doutor em Ciências (Microbiologia). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de Concentração: Microbiologia. São Paulo. 1- 132
- **Bejarano, E y Schneider, R.P.** 2004. Use of Fluorescent Lectin Probes for Analysis of Footprints from *Pseudomonas aeruginosa* MDC on Hydrophilic and Hydrophobic Glass Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4356- 4362.
- **Bos, R; van der Mei, H.C y Busscher, H.J.** 1999. Physico- chemistry of Initial Microbial Adhesive Interaction- its Mechanisms and Methods for Study. *FEMS (Microbial Reviews)*. 23: 179- 230.
- **Bruinsma, G; Rustema- Abbing, M; Van der Mei, H y Buscher, H.** 2001. Effects of Cell Surface Properties and Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology Methods*. 45: 95-101.

- **Chen, M y Chain, L.** 2006. A Theoretical Analysis on Self- organized Formation of Microbial Biofilms. *Physica*. 370: 793- 807.
- **Danese, P. N; Pratt, L. A y Kolter, R.** 2000. Exopolysaccharide Production is Required for Development of *Escherichia coli* K- 12 Biofilm Architecture. *Journal of Bacteriology*. 182: 3593- 3596.
- **Davey, M.E y O'Toole, W.** 2000. Microbial Biofilms from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 847- 867.
- **Denkhaus, E; Meisen, S; Telgheder, U y Wingenger, J.** 2007. Chemical and Physical Methods for Charterization of Biofilms. *Microchimica Acta*. 158: 1- 27.
- **Deziel, E; Comeau, Y y Villemur, R.** 2001. Initiation of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP Correlates with Emergence of Hiperpilated and Highly Adherent Phenotypic Variants Deficient in Swimming, Swarming and Twitching Moltilities. *Journal of Bacteriology*. 183: 1195- 1204.
- **Donlan, R.** 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces Perspectives. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 881- 889.
- **Donlan, R y Consternon, W.** 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:167- 193.
- **Flemming, H., neu, T y Wozniak, D.** 2007. The EPS matriz: The “House of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*. 189:7945-7947.

- **Fonseca, A y Sousa, J.** 2007. Effect of Shear Stress on Growth, Adhesión and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* with Antibiotic-induced Morphological Changes. *International Journal of Antimicrobial*. 30: 236- 241.
- **Gómez- Suárez, C; Busscher, H y Van der Mei.** 2001. Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2531-2537.
- **Gómez- Suárez, C; Noordmans, J; Van der Mei, H.C y Busscher, H.J.** 1999. Removal of Colloidal Particles from Quartz Collector Surfaces as Stimulated by the Passage of Liquid- Air Interface. *Langmuir*. 15: 5123-5127.
- **Gómez- Suárez, C; Pasma, J; Van der Borden, A; Wingender, J; Flemming, H; Buscher, H y Van der Mei, H.** 2002. Influence of Extracellular Polymeric Substances on Deposition and Redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to Surfaces. *Microbiology*. 148: 1161- 1169.
- **Gómez- Suárez, C; Van der Mei, H.C. y Busscher, H.J.** 2000. Air Bubble- induced Detachment of Positively and Negatively Charged Polystyrene Particles from Collector Surfaces in a Parallel- plate Flow Chamber. *Journal of Adhesión Science Technology*. 14: 1527- 1537.
- **Gómez- Suárez, C; Van der Mei, H.C. y Busscher, H.J.** 2000. Air Bubble- induced Detachment of Polystyrene Particles with Different Sizes from Collector Surfaces in a Parallel Plate Flow Chamber. *Colloids and Surfaces*. 186: 211- 219.
- **Gómez- Suárez, C; Van der Mei, H.C y Busscher, H.J.** 2001. Air-bubble Induced Detachment of Polystyrene Particles with Different Size

from Collector Surface in a Parallel Plate Flow Chamber. *Coll. Surf.* 186: 211- 219.

- **Heydorn, A; Ersboll, R; Kato, J; Hentzer, M; Parsek, M.R; Nielsen, T.T; Givskop, M y Molin, S.** 2002. Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell- to-cell Signaling, and Stationary Phase Sigma Factor Expression. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. 68: 2008- 2017.
- **Hunter, R y Beveridge, T.** 2005. Application of a pH- sensitive Fluoroprobe (C- SNARF-4) for pH Microenvironment analysis in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 2501- 2510.
- **Hunt, S; Werner, E; Huang, B; Hamilton, M y Stewart, P.** 2004. Hypothesis for Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7418- 7425.
- **Hoogmoed, C; Kuijil- Booi, M; Mei, C y Busscher, H.J.** 2000. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS Adhesion to Glass with and without a Salivary Conditioning Film by Biosurfactant- Releasing *Streptococcus mitis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 659- 663.
- **Ista, L; Perez, V y Lopez, G.** 1999. Surfaces- Grafted, Environmentally Sensitive Polymers for Biofilm Release. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1603- 1609.
- **Kaplan, J; Meyenhofer, M y Fine, D.** 2002. Biofilm Growth and Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Bacteriology*. 185: 1399- 1404.

- **Kirisits, M.J; Margolis, J; Purevdorj- Gage, B; Vaughan, B; Chopp, D; Stoodley, P y Parsek, M.** 2007. Influence of the Hydrodynamic Environment on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 189: 8357- 8360.
- **Kirisits, M.J; Prost, L; Starkey, M y Parsek, M.** 2005. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4809- 4821.
- **Kraigsley, A; Ronney, P.D y Finkel, Se.** 2002. Hydrodynamic Influences on Biofilms Formation and Growth.
- **Liu, Y; Lin, Y; Yang, S y Tay, J.** 2003. A Balanced Model for Biofilms Developed at Different Growth and Detachment Forces. *Process Biochemistry*. 38: 1761- 1765.
- **Lillehoj, E; Kim, B.T; Chul Kim, K y Physiol Lung, A.J.** 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin as an Adhesin for Muc1 Mucin. *Cellular Molecular Physiology*. 751- 756.
- **Little, B., Lee, J y Ray, R.** 2007. The influence of marine Biofilms on Corrosion: A concise review. *Electrochimica Acta*. 1: 1-13
- **McLandsbough, L; Rodriguez, A; Canesa, D y Weiss, J.** 2006. Biofilms: At the Interfaces Between Biophysics and Microbiology. *FOBI*. 1: 94- 110.
- **Mercier, M; Ovazzani, K; Schmitz, P y Lorthois, S.** 2004. Study of Bioadhesion on a Flat Plate with a yeast/glass Model System. *Journal of colloid and Interface Science*. 271: 342- 350.

- **Neu, T., Swerhone, G y Lawrence, J.** 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm system. *Microbiology*.147: 299-313.
- **Neu, T.R. y Marshal, K.C.** 1999. Microbial “Footprints”- A New Approach to adhesive Polymers. *Biofouling*. 3: 101- 112.
- **Oldak, E y Tranfny, E.** 2005. Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 3281- 3288.
- **O’ Toole, G.O.** 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*. 54: 49-79.
- **Ovazzani, K y Bentama, J.** 2008. Bio- fouling in Membrane Processes: Micro- organism/ surface Interactions, Hydrodynamic Detachment Method. *Desalination*. 220: 290- 294.
- **Parini, M.R. y Pitt, W.G.** 2006. Dynamic Removal of Oral Biofilms by Bubbles. *Colloids and Surfaces*. 52: 39- 46.
- **Parsek, M ; Fugua, C.** 2004. Biofilms 2003 : emerging themes and Challenges in studies of surface-Associated Microbial life. *Journal of Bacteriology*.186: 4427-3596.
- **Piera, G.** 2003. Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencias. Escola de Prevenció i Seguretat Integral. *Vinculada a la UAB*.
- **Pratt, L. A y Kolter, R.** 1998. Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30: 285- 293.

- **Purevdorj, B; Costerton, J.W and Stoodley, P.** 2002. Influence of Hydrodynamics and Cell Signaling on the Structure and Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 4457- 4464.
- **Rochex, A y Lebeault, J.M.** 2007. Effects of Nutrients on Biofilm Formation and Detachment of a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from a Paper Machine. *Water Research*. 41: 2885- 2892.
- **Romeo, T.** 2006. When the Party is Over: a Signal for dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 188: 7325- 7327
- **Seo, Y y Bioshop, P.** 2008. The monitoring of Formation in a biowall Barrier and Its effect on performance. *Chemosphere*. 70: 480- 488.
- **Singh, P.K.** 2002. A Component of Innate Immunity Prevents Bacterial Biofilm Development. *Nature*. 417: 552- 555.
- **Sharma, P; Gibcus, M; van der Mei, H y Busscher, H.** 2005. Influence of Fluid Shear and Microbubbles on Bacterial Detachment from a Surface. *Applied and environmental Microbiology*. 71: 3668- 3673.
- **Sharma, P.K; Gibcus, M; van der Mei, H.C. y Busscher, H.J.** 2005. Microbubble- induced Detachment of Coadhering Oral Bacteria from Salivary Pellicles. *European Journal of Oral Sciences*. 113: 326- 332.
- **Shroll, R.M y Straatsma, T.P.** 2003. Molecular Basis for Microbial Adhesion to Geochemical Surfaces: Computer Simulation of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to Goethite. *Biophysical Journal*. 1762- 1772.

- **Simões, M; Pereira, M.O y Vieira, M.J.** 2004. Action of a Cationic Surfactant on the Activity and Removal of Bacterial Biofilms Formed under Different Flow Regimes. *Water Research*. 39: 478- 486.
- **Simões, M; Pereira, M.O. y Vieira, M.J.** 2005. Effect of Mechanical Stress on Biofilms Challenged by Different Chemicals. *Water Research*. 39: 5142- 5152.
- **Simões, M; Simoes, L.C; Cleto, S; Pereira, M.O Y Vieira, M.J.** 2008. The Effects of a Biocide and a Surfactant on the Detachment of *Pseudomonas fluorescens* from Glass Surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 121: 335- 341.
- **Stoodley, L; Costerton, J; Stoodley, P.** 2004. Bacterial Biofilms from the Natural Enviromental to infectious Diseases. *Reviews*. 2: 97- 108.
- **Stoodley, P; Sauer, K; Davies, D y Costerton, W.** 2002. Biofilms as Complex Differentiated Commities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187- 209.
- **Southey- Pillig, C; Davies, D y Sauer, K.** 2005. Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. 187: 8114- 8126.
- **Touhami, A; Jericho, M.H y Boyd, J.M.** 2006. Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Bacteriology*.128: 370- 377.
- **Túnez Fiñana, I; Galvan, A y Fernandez, E.** 2000. pH y Amortiguadores: Tampones Fisiológicos. 1- 11.
- **Vallet, I; Olson, J.W; Lory, S; Lazdunski, A y Filloux, A.** 2001. The Chaperone Usher Pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of

- **Webb, J., Thompson, L., James, S., Chalton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M y Kjelleberg, S.** 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Journal of bacteriology*. 185: 4585-4592.
- **Whiteley, M.** 2001. Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Nature*. 413: 860- 864.

ANEXO 1

Medio TSB

Componente	Cantidad g/ L
Peptona de Caseína	17
Peptona de Harina de Soja	3
D- glucosa	2.5
Cloruro Sódico	5
Hidrogenofosfato Dipotásico	2.5

Medio TSA

Componente	Cantidad g/ L
Peptona de Caseína	15
Peptona de Harina de Soja	5
Cloruro Sódico	5
Agar- agar	15

ANEXO 2

Buffer Fosfato de Potasio 5 mM, NaCl 0,02 M (pH 7.0)

Componente	Cantidad
K_2HPO_4	3,075 ml/ L
KH_2PO_4	1,925 ml/L
NaCl	1,17 g/ L

ANEXO 3

Determinación de la concentración de células/cm² expresada en Logaritmo y porcentaje de remoción en los ensayos de cada tratamiento

TRATAMIENTO	ENSAYO	Adhesión (LOG cel/cm ²)	Remoción (LOG cel/cm ²)	% Remoción	P
1	1	6,9	6,4	63,3	>0,05
	2	6,8	6,3	79,7	
	3	7,0	6,5	67,4	
	4	7,0	6,4	74,9	
2	1	6,9	6,0	87,6	>0,05
	2	7,0	5,9	90,2	
	3	6,9	5,6	95,1	
	4	6,8	5,7	92,1	
3	1	6,9	5,8	91,9	>0,05
	2	6,9	5,7	93,6	
	3	6,8	5,6	94,6	
	4	7,0	5,4	97,2	
4	1	6,9	4,8	99,2	>0,05
	2	6,9	5,1	98,5	
	3	6,4	4,6	98,6	
	4	6,7	4,9	98,5	
5	1	6,9	NA*	100,0	>0,05
	2	6,9	3,8	99,9	
	3	6,9	NA*	100,0	
	4	6,9	NA*	100,0	

*No Aplica

Test de adhesión inicial (expresado en logaritmo) de cada ensayo de cada tratamiento, conteo de células que permanecieron adheridas luego de cada test de remoción (expresado en logaritmo) de cada ensayo de cada tratamiento y el respectivo porcentaje de remoción para cada uno. Valor de p para cada tratamiento, indicando que todos fueron > 0,05 lo cual significa que no son estadísticamente significativos, por lo tanto no hay diferencias entre los ensayos de cada tratamiento.