



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la capacidad de *Vibrio shilonii*
para formar biopelículas

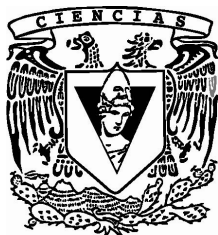
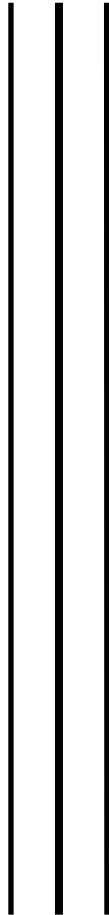
**REPORTE DE
INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANET RIVERA OSORIO



TUTORA
DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno Rivera Osorio Anet 56 22 92 22 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 099260033</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Rosa Laura Camarena Mejía</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Georges Dreyfus Cortés</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra Clelia Domenzain Reyna</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr Saúl Cano Colín</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Gabriela González Cerón</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Estudio de la capacidad de <i>Vibrio shilonii</i> para formar biopelículas 40 p 2010</p>

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser más que mi Alma Mater, por haberse convertido en mi hogar durante estos largos años que me ha permitido ser parte de ella.

A la Facultad de Ciencias, porque en ella encontré mi vocación y las ganas de seguir adelante.

A mi tutora la Dra. Laura Camarena por haber creído en mí y por la confianza que me ha dado, por abrirme nuevas puertas tanto formación académica como profesional, por todos los momentos en los que compartimos y de los cuales aprendo mucho. Gracias.

A mis sinodales: Dr. Georges Dreyfus, Dra. Clelia Domenzain, Dr. Saúl Cano y la Mtra. Gabriela González, por tomarse el tiempo de leer y hacer correcciones valiosas a mi trabajo.

A Aurora Osorio por el apoyo técnico a este trabajo.

A mis padres, quienes siempre han estado ahí para apoyarme y alentarme, por dejarme tomar siempre mis propias decisiones, por estar siempre y en todos los momentos en los que los he necesitado, por ser esos pilares de donde parte mi existencia; simplemente por amarme, gracias.

A mis Hermanos, Axel y Audrey, por ser mis compañeros de vida, por estar ahí en los momentos indicados y porque son una parte esencial de mi existencia, gracias a los dos por todo.

A mis compañeros del laboratorio, Clelia, Víctor, Salvador, Sebastián y los recién llegados Lili, Omar y Manuel, por hacer las innumerables horas del laboratorio siempre amenas, gracias.

A mi queridísimo club de Toby, Arturo, Avelino, Felipe y Horacio, estricto orden alfabético, por ser más que mis amigos, por estar siempre, en las buenas, en las malas, en las peores, en las mejores, los quiero mucho, gracias a todos y cada uno de ustedes por dejarme ser parte de sus vidas, los amo.

A mis entrañables amigos de la universidad, Abril, Itzel, Ximena, Marisol, Diego, Alfredo, Netzi, Mariana, Mario, Marco Antonio, Juan Manuel, Onasis y seguramente muchos más que en estos momentos he omitido por descuido, gracias por todos los momentos que me han dejado compartir con ustedes, por hacerme la vida mucho más fácil y feliz en todos estos años que hemos compartido juntos, sin ustedes mi vida no sería la misma, los quiero.

A mis amigas de toda la vida, Ana Luisa y Diana Silvia, porque en todos estos años de amistad he creado con ustedes de los lazos más fuertes y perdurables, gracias hermanas por ser parte importantísima en mi vida.

A Emmanuel, por los tantos momentos compartidos, por las charlas interminables, por la música compartida, por los errores cubiertos, pero

sobre todo porque de ti aprendí una de las lecciones más duras e importantes en mi vida, gracias por ser y estar, te agradezco que sigas formando parte de mi vida.

A mis compañeros y amigos en mis aventuras musicales y corales el coro de Ciencias, el coral de Coapa, especialmente a Valeria, Eduardo, Sam, Miguel y muchos, muchísimos más, por enseñarme siempre el valor de la humildad, gracias a ustedes por compartir tantos bellos momentos conmigo.

Y a todos los demás amigos que posiblemente no nombre, pero que indudablemente forman y seguirán formando parte inigualable en mi vida, gracias a todos, porque sin ustedes yo no sería quien soy ahora.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

La vida bacteriana puede encontrarse en la naturaleza en dos estados: 1) bacterias planctónicas de vida libre y 2) bacterias asociadas a superficies formando biopelículas **(Xavier J.R., & Foster K.R., 2007)**.

Las biopelículas son la forma más común de crecimiento que presentan las bacterias, se ha estimado que en los ambientes naturales el 99% de las bacterias existen en esta forma **(Costerton, J.W. 1999)**.

En el año de 1943 Claude Zobell observó que el número de bacterias asociadas a las superficies era mucho más numeroso que el de las bacterias en suspensión **(Zobell, C.E., 1943)**, desde entonces la combinación de diversas técnicas de microscopía ha demostrado que las biopelículas no son simples ensamblajes pasivos de células que se agregan a las superficies, sino más bien sistemas biológicos dinámicos y complejos **(Hall-Stoodley, L., et. al. 2004)**.

Las biopelículas fueron definidas inicialmente como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido **(Costerton, J.W., 1987)**. Estudios posteriores demostraron que las células dentro de las biopelículas están unidas unas a otras por medio de una matriz extracelular producida por ellas mismas. Asimismo, las bacterias que forman la biopelícula muestran un fenotipo diferente, en relación a las

células planctónicas tanto en su índice de proliferación celular como en la expresión de sus genes **(Costerton, J.W., 1999)**.

Estructura y desarrollo de las biopelículas

Las biopelículas pueden formarse sobre una variedad de superficies, bióticas y abióticas **(Donlan, R.M., 2002)**. Sin embargo, no obstante las diversas superficies o condiciones sobre las cuales pueden formarse las biopelículas, las características correspondientes al crecimiento y desarrollo de las mismas son similares, lo que significa que éstas tienen importantes estrategias convergentes de supervivencia **(Hall-Stoodley, L., et. al., 2004)**.

Estudios recientes han propuesto que el desarrollo de las biopelículas es el resultado de un proceso secuencial compuesto por 5 etapas **(Hall-Stoodley, L., et. al., 2004)**. Éstas han sido identificadas como: 1) estado planctónico, 2) adhesión, 3) formación de la microcolonia, 4) formación de la macrocolonia y 5) dispersión (Fig. 1) **(O'Toole, G.A., & Monds, R.D., 2008)**.

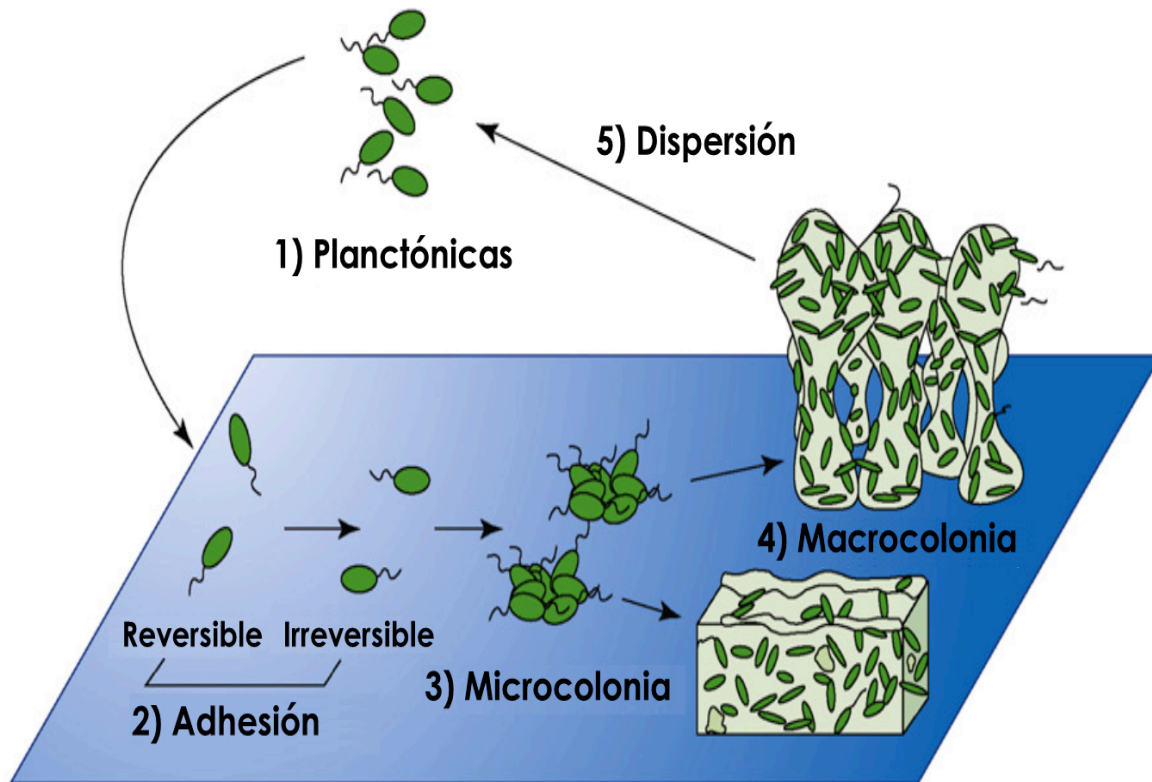


Fig. 1 Desarrollo de las biopelículas. Modificado de **O'Toole, G.A., et. al., 2008**

Debido a que la adhesión inicial a la superficie es a menudo débil ésta usualmente se divide en: fase reversible y fase irreversible, (**O'Toole, G.A., & Monds, R.D., 2008**). La interfase sólida-líquida entre la superficie y el medio acuoso provee el ambiente ideal para la adhesión y el crecimiento de los microorganismos. Esta adhesión está altamente influenciada por el tipo de sustrato, por las condiciones ambientales, por las características del medio y por ciertas propiedades de la célula (presencia de flagelo, pili, etc).

La superficie o sustrato posee muchas características que son importantes para el proceso de la adhesión. Algunos investigadores han encontrado que los microorganismos se adhieren, preferentemente, a las superficies hidrofóbicas no polares, como algunos plásticos, más que a las (hidrofóbicas) polares, como el vidrio o el metal.

Las características del medio acuoso como el pH, los niveles de nutrientes, la fuerza iónica y la temperatura, juegan un papel importante en la tasa de adhesión al sustrato **(Donlan, R.M., 2002)**.

Durante la formación de las microcolonias, las biopelículas desarrollan una arquitectura de canales de agua. Algunas microcolonias individuales, pueden separarse de la superficie o bien revertir a células planctónicas que nadan o flotan lejos de las estructuras de la matriz, dejando huecos remanentes que se convierten en parte de los canales de agua **(Stoodley, P., et. al. 2002)**.

Las microcolonias crecen en dimensiones y coalescencia para formar las macrocolonias. El arquetipo de macrocolonia consiste en torres con forma de hongo, separadas por vacíos llenos de fluido, sin embargo es posible que se formen otras estructuras. Las células se incorporan a la macrocolonia a través de la matriz de exopolisacáridos (EPS), la cual puede contener células muertas y DNA extracelular. Finalmente, de las macrocolonias pueden,disgregarse algunas células las cuales se liberan para regresar a su estado planctónico **(O'Toole, G.A., & Monds, R.D., 2008)**.

Ventajas de la formación de biopelículas

Se considera que la capacidad bacteriana para colonizar diversos sustratos en forma de biopelícula le confiere a estas la habilidad de expandir y diversificar su hábitat **(Hall-Stoodley, L., et. al., 2004)**. Además, la formación de las biopelículas les confiere protección a una gran variedad de retos ambientales como son: la exposición a rayos UV, toxicidad metálica, exposición a ácidos, deshidratación e incluso resistencia a fagocitosis, así como a diversos antibióticos y agentes antimicrobianos. Se piensa que esta protección es otorgada, en gran medida, por la matriz de EPS que compone a las biopelículas **(Davey, M. E., & O'toole, G. A., 2000)**.

Otra ventaja que poseen las biopelículas es su capacidad de contener células con diferente grado de especialización y/o diferenciación; de éste modo la formación de comunidades bacterianas complejas le permite a la población contender y adaptarse a un sinnúmero de estímulos.

De forma adicional, una gran cantidad de biopelículas consisten de un complejo consorcio de especies, el cual posee no sólo las características propias de cada especie, sino además, estas complejas biopelículas adquieren capacidades metabólicas que son el resultado de

las interacciones sinérgicas entre las diferentes especies (**Breugelmans, P., et. al., 2008**).

Motilidad mediada por el flagelo

Como ya hemos visto, las bacterias usualmente prosperan en comunidades multicelulares asociadas a las superficies, lo que les provee ventajas sobre las células individuales. Sin embargo, la formación de biopelículas no es el único estilo de vida que pueden adoptar las bacterias cuando se encuentran en una superficie. Existe también el “swarming” (movimiento en enjambre), mediante el cual las bacterias pueden avanzar sobre las superficies húmedas de una manera coordinada. Esto requiere de la funcionalidad del flagelo junto con la producción de una capa surfactante, que permitirá el flujo de agua para que la superficie se mantenga húmeda (**Verstraeten, N., et. al. 2008**).

El “swarming” es un cambio reversible en respuesta al ambiente, su naturaleza social indica que las señales extracelulares o célula-célula son sus estímulos centrales. Estas señales pueden ser recibidas y descifradas a través de los sistemas reguladores de dos componentes: reguladores citosólicos y por los flagelos de la superficie celular (**Fraser, M. & Hughes C., 1999**).

El acoplamiento entre motilidad y formación de biopelículas tiende a ser un proceso complejo, porque ambos fenómenos incluyen componentes similares en ciertos estadios y condiciones específicas. Por ejemplo, la fase de adhesión durante la formación de biopelículas, generalmente requiere del flagelo y, por otro lado, la motilidad en una superficie puede ser crucial para la arquitectura de la biopelícula. Sin embargo, las bacterias pueden seleccionar entre motilidad ("swarming") y la formación de biopelículas, la cual será (una decisión importante) para los microorganismos que viven en distintos hábitats **(Verstraeten, N., et. al. 2008)**.

Quorum sensing

Durante el ciclo de vida de las bacterias existen procesos críticos que permiten la supervivencia de éstas como son: la formación de biopelículas, secreción de factores de virulencia, bioluminiscencia, producción de antibióticos, esporulación, entre otros. Sin embargo, estos procesos no se pueden estudiar de manera aislada en un individuo de la población, ya que estos no involucran a una sola célula, sino más bien al conjunto de ellas. Recientemente, se ha descrito un complejo sistema de comunicación celular, en donde las bacterias usan la producción y detección de químicos extracelulares, llamados autoinductores, para monitorear la

densidad de población y permitir a las bacterias sincronizarse en la expresión génica (como grupo) y entonces actuar al unísono **(Ng, W.L., & Bassler, B.L., 2009)**. A este sistema se le conoce como “Quorum Sensing” (QS).

Los pasos fundamentales involucrados en la detección y respuesta a las fluctuaciones en la densidad poblacional son análogos en todos los sistemas de QS conocidos. Primero, se lleva a cabo la síntesis de autoinductores en el interior de las células. Segundo, las moléculas de autoinductor son secretadas al exterior de las células en donde comienzan a acumularse. Tercero, una vez acumulada la cantidad necesaria para ser detectada, los receptores correspondientes se unen a los autoinductores y disparan una cascada de transducción de señales, la cual va a promover cambios en la expresión génica debido al aumento poblacional **(Ng, W.L., & Bassler, B.L., 2009)**.

Tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas presentan sistemas de QS para regular diversos procesos, no obstante, existen diferencias entre estos grupos de bacterias. Las bacterias Gram positivas utilizan oligopéptidos modificados como autoinductores, mientras que las bacterias Gram negativas utilizan lactonas de homoserina aciladas (AHL) **(Ng, W.L., & Bassler, B.L., 2009)**.

Otros ejemplos en donde se ve involucrado el QS son: la producción de antibióticos por *Streptomyces spp.*, el desarrollo del cuerpo fructífero en *Myxococcus xanthus* y en la conjugación en *Enterococcus faecalis* (Miller, M.B., & Bassler, B.L., 2001).

El primer autoinductor AHL y su circuito regulador se descubrió en la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri*, la cual coloniza el órgano productor de luz en el calamar *Euprymna scolopes*, en donde encuentra el ambiente idóneo para crecer, incrementar su densidad poblacional y utilizar el sistema de QS para activar la expresión del operón de luciferasa y producir luz, que será utilizada por el calamar como una estrategia antidepredación. (Ruby, E.G., 1996). *V. fischeri* utiliza un circuito de QS de tres partes para coordinar esta simbiosis, constituido por la señal autoinductora, una sintetasa y su receptor. La sintetasa LuxI, produce el autoinductor AHL (3-oxo-hexanoyl lactona de homoserina), el cual difunde hacia el exterior del organismo; una vez que se ha acumulado la cantidad suficiente de AHL en el medio extracelular, el autoinductor difunde al interior de otras células y se une a su receptor correspondiente que en este caso es el factor de transcripción LuxR. Posteriormente, el complejo AHL-LuxR se une a los promotores de los genes de QS para activar su transcripción, estos genes están involucrados en los procesos de simbiosis y de bioluminiscencia.

Aunque existen al menos otras dos moléculas señalizadoras producidas por *V. fischeri*, el octanoil-HSL sintetizado por AinS y el furanosil borato diéster sintetizado por LuxS, éstas han sido mucho menos estudiadas.

Muchos sistemas de QS en bacterias Gram-negativas, poseen proteínas reguladoras homólogas a LuxI y LuxR. **(Mattmann, M. E. & Blackwell, H. E., 2010).**

En 1998, el grupo de Davies y colaboradores, demostraron que había al menos dos tipos de sistemas de señalización en *Pseudomonas aeruginosa*, para la expresión de los genes de virulencia, homólogos al sistema *luxR-luxI*, los cuales fueron denominados *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*, **(Daniels, R., et. al., 2004)**, estos sistemas están involucrados en la formación de biopelículas y en la producción de ciertos factores de virulencia (Fig. 2).

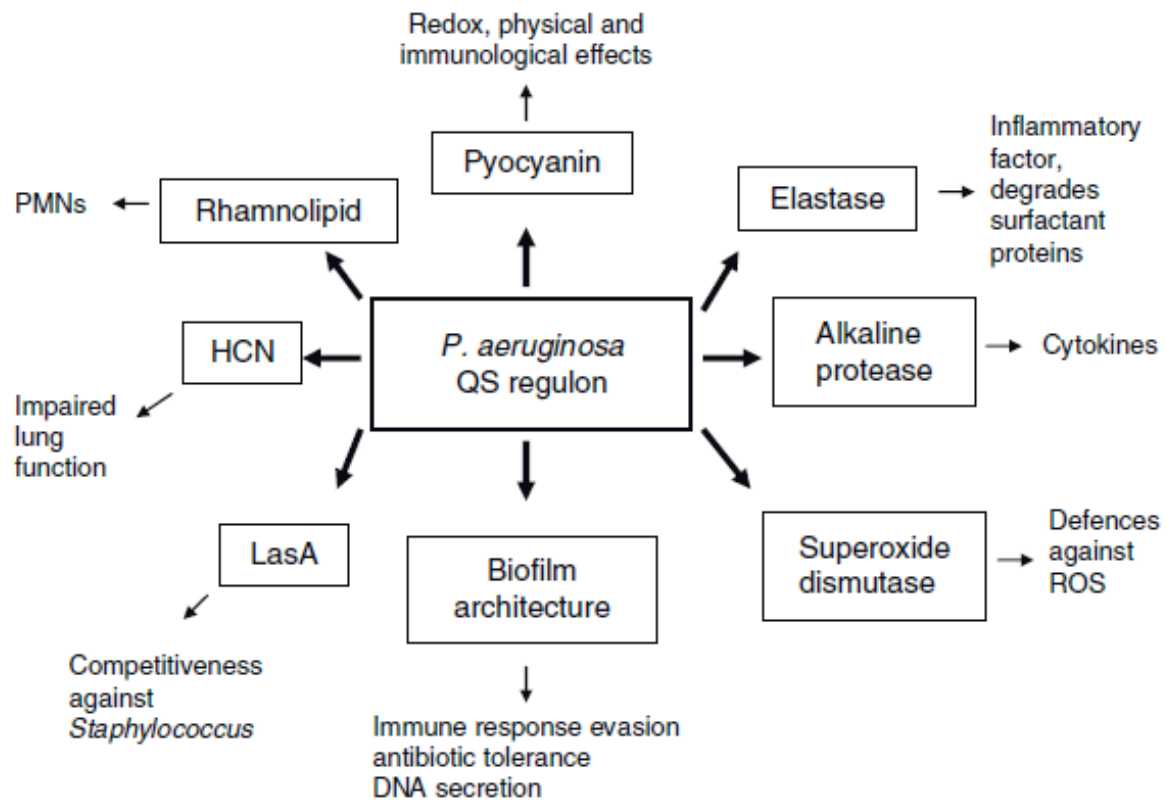


Fig. 2 Procesos regulados por el sistema de Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa* .Modificado de **Winstanley & Fothergill, 2009**

Vibrio shilonii

La bacteria marina *Vibrio shilonii*, (Fig. 3) es actualmente el modelo más estudiado en la patogénesis de los corales. Esta bacteria se aisló en 1996 del coral *Oculina patagonica*, en la costa de Israel en el Mar Mediterráneo describiéndola como una nueva especie (**Kushmaro, A., et. al., 1997**).

Vibrio shilonii, es una bacteria Gram-negativa, móvil por la acción de un flagelo monotrico polar (**Kushmaro, A., et. al., 2001**) este depende para su rotación de un gradiente electroquímico de iones sodio, (**González, Y., 2010**).

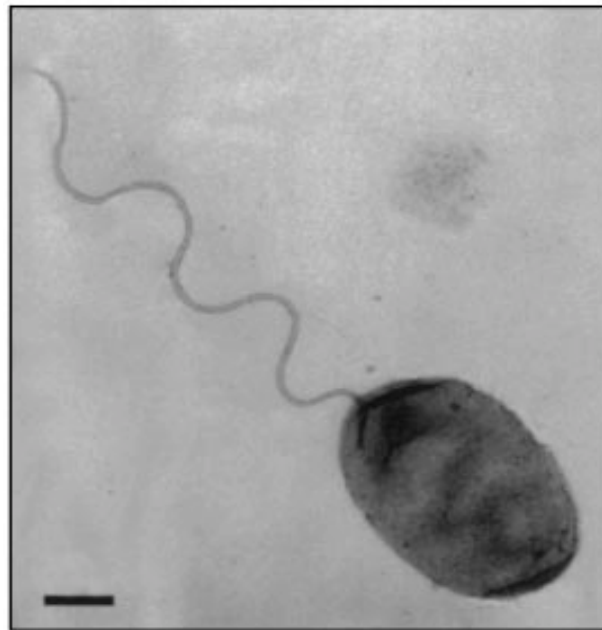


Fig. 3 *Vibrio shilonii*, micrografía electrónica, modificado de (Kushmaro, 2001)

Las especies del género *Vibrio*, son ubicuas en ecosistemas acuáticos. A pesar de que muchas especies de este género son planctónicas, un pequeño grupo de ellas pueden ser patogénicas o simbioses con hospederos eucariontes, lo que les permitirá alternar entre la fase planctónica y la biopelícula, resultando en una ventaja adaptativa para su supervivencia en los ambientes acuáticos (**Yildiz, F.H., & Visick, K.L., 2008**).

La adaptación de las especies de *Vibrio*, a los cambios en los parámetros de los ecosistemas acuáticos ha sido crucial para su supervivencia y el éxito en la colonización; siendo la formación de biopelículas un factor clave para lograrlo.

En muchas bacterias, la motilidad mediada por el flagelo promueve la formación de los estados iniciales de las biopelículas, usualmente potenciando los movimientos hacia la superficie **(Davey, M. E., & O'toole, G. A., 2000)**.

En las especies del género *Vibrio*, el impacto de la motilidad se extiende más allá de la adhesión a la superficie. En *Vibrio cholerae*, la pérdida de genes flagelares generalmente resulta en un decremento de la adhesión, en comparación con la cepa silvestre; sin embargo, se ha demostrado que las cepas mutantes en los genes flagelares sí pueden formar biopelículas, pero requieren un tiempo mayor para su formación **(Yildiz, F.H., & Visick, K.L., 2008)**.

El género *Vibrio* es representativo de las bacterias patógenas marinas y debido a que el agua juega un papel determinante en la formación de biopelículas, son un modelo para estudiar la formación y producción de biopelículas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad que posee la bacteria *Vibrio shilonii*, para formar biopelículas en condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la capacidad de *Vibrio shilonii* para formar biopelículas en diferentes medios de cultivo, comparándola con la bacteria marina *Vibrio harveyi*, la cual se sabe que forma biopelículas en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la formación de biopelículas a diferentes temperaturas y condiciones de agitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas en este trabajo

Los experimentos fueron realizados utilizando la cepa silvestre de *Vibrio shilonii* AK-1 (ATCC BAA-91) y la cepa silvestre de *Vibrio harveyi* BB120 como control positivo.

Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: medio marino (Difco) y TBSW el cual contiene: Triptona (1%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.863%) (35mM), $CaCl_2$ (0.078%) (7mM), KCl (0.052%) (7mM) y NaCl (1.5%). Para crecer los cultivos en cajas petri la concentración de agar que se utilizó fue del 1.5%.

Para los cultivos de toda la noche (ON), se utilizaron tubos de ensayo de 10 mL, inoculando las cepas en 3 mL de medio líquido (MB o TBSW) y la temperatura de incubación fue de 30°C.

Conservación de las cepas en glicerol

Para preservar las cepas, a un vial con glicerol al 65% se le agregan 500 μ L provenientes de cultivo líquido en fase estacionaria. Se agita

vigorosamente, e inmediatamente se congela en hielo seco y se almacena a una temperatura de -70°C .

Ensayos de formación y detección de biopelículas

Para los ensayos de formación de biopelículas, se pusieron a crecer cultivos ON, de ambas cepas, en medio MB y en TBSW y se siguió el protocolo de O'Toole previamente descrito, con algunas modificaciones **(O'Toole G. A., et. al. 1999)**.

Se sembraron las placas de microtitulación de 96 pozos de PVC no tratadas, haciendo una dilución 1/100 del cultivo ON e inoculando en cada pozo 150 μL .

Se incubaron durante: 24, 48, 72 y 96 horas, a 30°C sin agitación y a temperatura ambiente (T.A.) con y sin agitación.

Para cuantificar la cantidad de biopelícula producida, una vez concluido el tiempo de incubación correspondiente, se retiró el medio de cultivo y se hizo un prelavado con 170 μL de agua estéril para quitar las células que no estuvieran adheridas a la superficie.

Posteriormente, se agregaron 100 μL de Cristal Violeta (CV) al 0.5% a cada pozo, y se dejó incubando 15 minutos; Finalmente, se hicieron 3 lavados con 120 μL de agua estéril para remover los residuos de CV.

La biopelícula fue eluida con 100 μ L de DMSO (dimetil sulfoxido) al 100%, mezclando cuidadosamente para remover la totalidad de la biopelícula adherida a la superficie del pozo.

Posteriormente, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 595 nm.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Análisis morfológicos

Para los análisis morfológicos, se pusieron a crecer 150 μ L de cultivo ON (diluido previamente 1/100) de *Vibrio shilonii*, en una placa de microtitulación con medio fresco TBSW a T.A. sin agitación. Así mismo, se inocularon 150 μ L de cultivo ON (sin diluir) de *V. shilonii* en 3 mL de medio TBSW los cuales se incubaron a 30°C con agitación.

Se tomaron muestras del cultivo líquido a las 24 horas de incubación, mientras que la placa con los cultivos de biopelículas se muestreó a las 72 hrs. Para obtener una muestra proveniente de la biopelícula, se procedió a retirar el medio de cultivo de cada pozo y posteriormente se lavaron los pozos 5 veces con 170 μ L de agua estéril para finalmente resuspender la biopelícula que se había adherido al pozo en 50 μ L de agua.

Una vez obtenidas las muestras correspondientes, se observaron al microscopio óptico (1000x).

RESULTADOS

1. Formación de Biopelículas

Para determinar si la bacteria *Vibrio shilonii* era capaz de formar biopelículas, se probaron dos diferentes medios de cultivo, dos diferentes temperaturas así como variaciones en las condiciones de agitación (Tabla 1). Asimismo, el desarrollo de la biopelícula fue evaluado respecto al tiempo. Para ello, en todos los experimentos se determinó la cantidad de biopelícula formada cada 24 horas abarcando un periodo de 92 horas.

La cuantificación de la cantidad de biopelícula formada se realizó siguiendo el protocolo descrito por O'Toole en 1999, con algunas modificaciones, las cuales se puntualizan en la sección de materiales y métodos.

Medios de Cultivo	Condiciones
* MB (medio marino)	* T. A. (Temperatura Ambiente) sin agitación
* TBSW	* T. A. con agitación
	* 30°C sin agitación

Tabla 1. Diferentes condiciones de crecimiento para la formación de biopelículas.

1.1 Formación de biopelículas en diferentes medios de cultivo

Lo primero que nos interesaba responder era si la bacteria era capaz de producir biopelículas y determinar si podía producirlas en la misma cantidad en diferentes medios de cultivo. En la figura 4A se muestra la gráfica de la cantidad de biopelícula que formó *V. shilonii* en medio MB y en medio TBSW. En la fig. 4B se muestran los resultados obtenidos al utilizar *Vibrio harveyi*, la cual representa el control positivo para la formación de biopelícula.

Podemos observar que en ambos medios, *Vibrio shilonii* inicia la formación de la biopelícula desde las 24 horas de incubación; sin embargo, se observó una mayor cantidad de biopelícula en medio TBSW en comparación al medio MB.

Con el paso del tiempo se puede observar que en el medio TBSW la cantidad de biopelícula va aumentando, en contraste a la cantidad detectada en medio MB, este resultado nos podría indicar que en el caso del medio MB las células sólo están haciendo agregados iniciales sin desarrollar biopelículas propiamente, no así en el medio TBSW donde el aumento en la cantidad de biopelícula es evidente.

Para *Vibrio harveyi* se observaron resultados similares, no obstante es conveniente subrayar que este microorganismo mostró una mayor habilidad para formar biopelículas durante su crecimiento en medio TBSW,

sobre todo a las 72 y 96 horas de incubación en donde se alcanzó un valor de absorbancia a 595 nm, tres veces mayor al detectado para *Vibrio shilonii*.

De estos resultados podemos concluir que un medio relativamente pobre en nutrientes favorece la formación de biopelículas en las dos especies probadas.

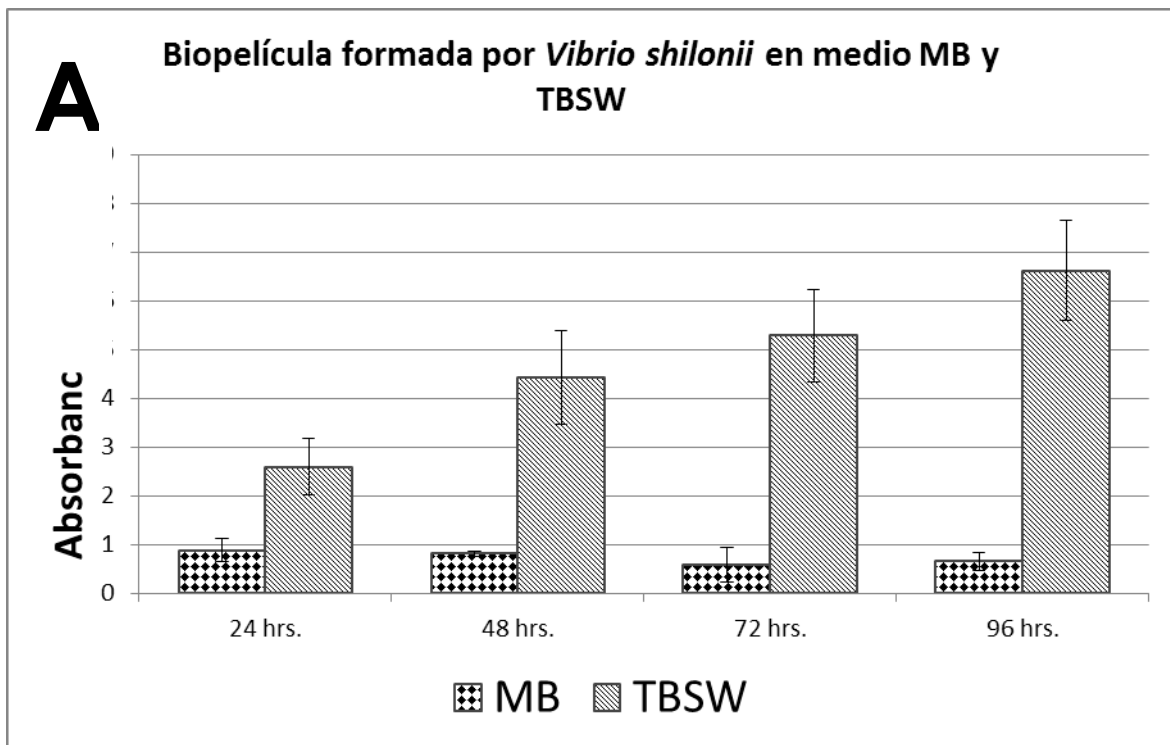


Fig. 4A Evaluación de la cantidad de biopelícula formada por *Vibrio shilonii* en medio MB y TBSW, a T.A. sin agitación.

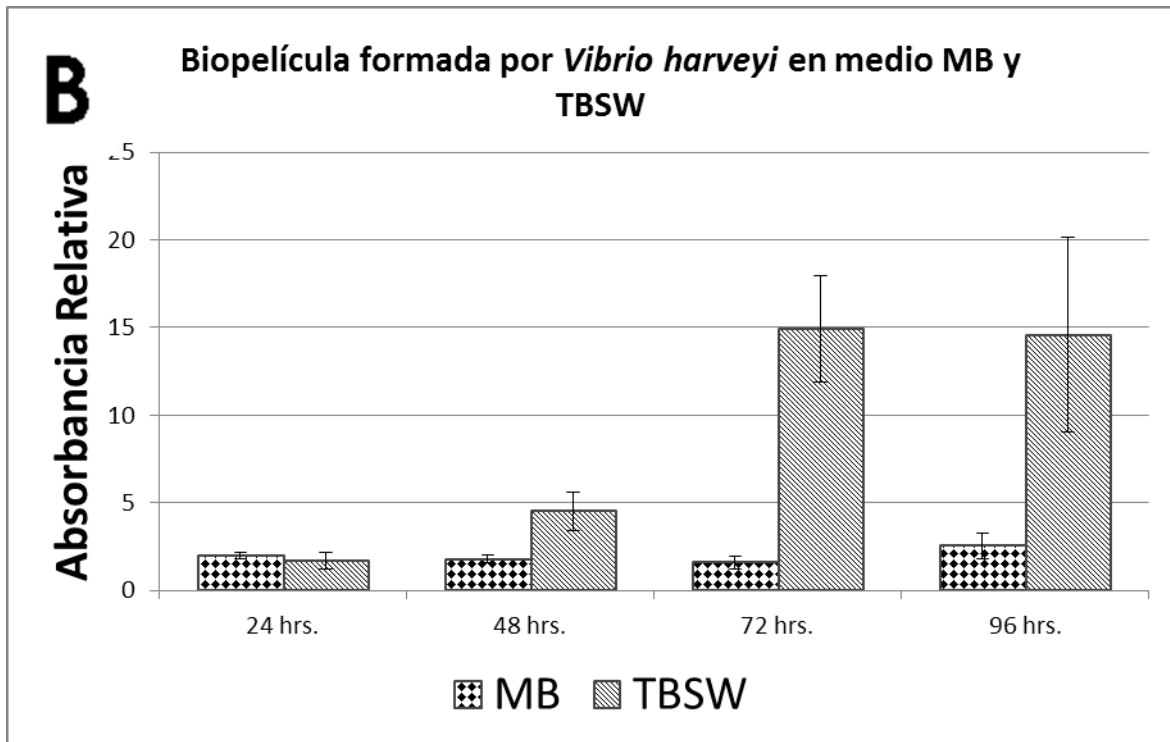


Fig. 4B Evaluación de la cantidad de biopelícula formada por *Vibrio harveyi* en medio MB y TBSW, a T.A. sin agitación.

1.2 Formación de biopelículas en diferentes condiciones de temperatura y agitación.

Debido a la diferencia en la cantidad de biopelícula formada en los diferentes medios de cultivo, los siguientes análisis se realizaron utilizando medio TBSW.

El experimento anterior demostró que la cantidad de la biopelícula formada iba en aumento respecto al tiempo en medio TBSW a T.A. sin agitación; con esto como base se decidió evaluar si variaciones en las

condiciones de temperatura y/o agitación alteraban el desarrollo de la biopelícula. Por lo tanto, se probaron las condiciones de crecimiento en medio TBSW a 30°C sin agitación y a T.A. con agitación.

En la figura 5 se muestra la gráfica correspondiente a la biopelícula que formó *Vibrio harveyi* (control positivo) en las 2 condiciones antes mencionadas incluyendo TBSW a T.A. sin agitación como control. En la gráfica se observa que la cantidad de biopelícula formada a las 24 horas fue similar a lo reportado previamente en la literatura (**Anetzberger, C., et al. 2009**), siendo semejante en las condiciones evaluadas. Sin embargo, a pesar de que a las 24 horas de incubación la cantidad de biopelícula fue similar en las tres condiciones, el desarrollo que presentó a lo largo del tiempo fue diferente. Mientras que para las condiciones a T.A (con y sin agitación) se aprecia que la cantidad de biopelícula va en aumento respecto al tiempo de incubación alcanzando su máximo entre las 72 y 96 h; a 30°C (sin agitación) se observa un ligero aumento de las 24 a las 48 h de incubación, sin embargo, después de ese tiempo, la cantidad de biopelícula disminuye prácticamente a la mitad y no se observa una acumulación posterior.

Una posible causa de este efecto es que a las 48 horas a 30°C haya comenzado la dispersión de las células que forman la biopelícula. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para determinar la causa de la pobre formación de biopelícula en esta condición.

Nuestros resultados nos permiten concluir que a temperaturas más bajas, el desarrollo de la biopelícula respecto al tiempo se ve favorecido, lo cual es coincidente a lo reportado previamente para *Vibrio cholerae*, en donde la formación de biopelícula es claramente más alta a temperaturas más bajas (30°C vs 37°C) (Hořtacká, A., et.al., 2010).

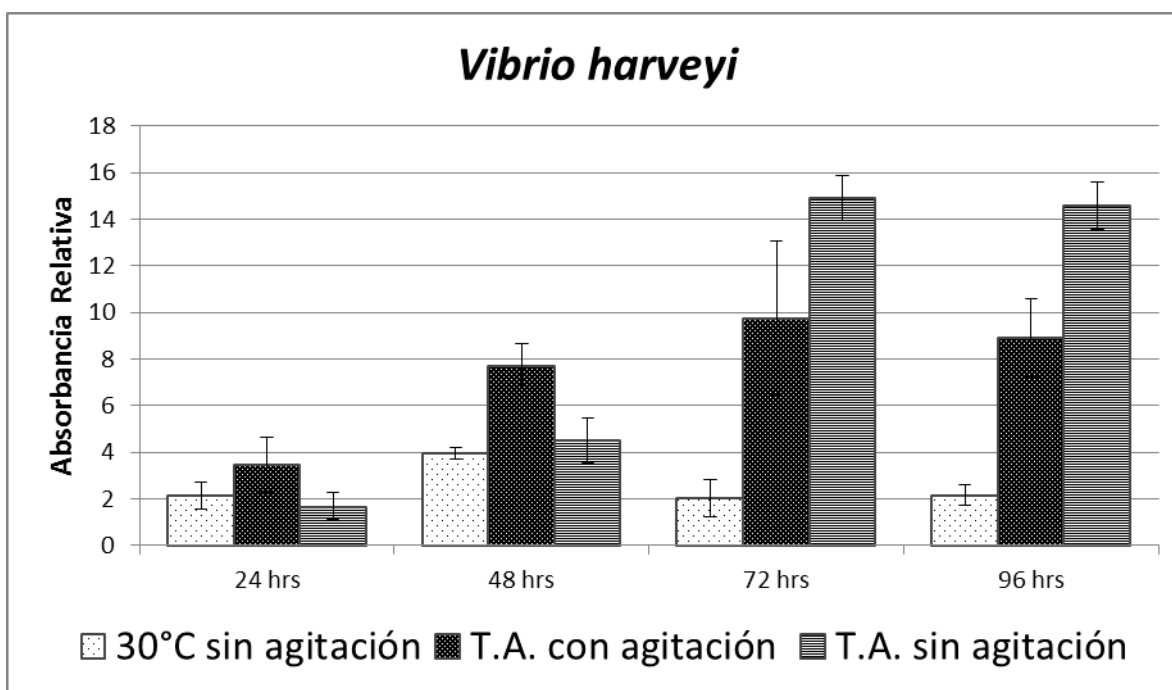


Fig. 5 Cantidad de biopelícula formada por *Vibrio harveyi* en medio TBSW y diferentes condiciones de crecimiento.

En la figura 6 se muestra la gráfica correspondiente a la cantidad de biopelícula formada por *V. shilonii* en las 3 condiciones ya mencionadas. Como se puede observar, a las 24 h la cantidad de biopelícula formada es similar en las tres condiciones de crecimiento. Sin embargo, a partir de este punto se aprecian claras diferencias en la acumulación de biopelícula

para cada condición. En dicha gráfica, se puede observar que la formación de biopelículas se vio favorecida al incubar los cultivos a T.A., esta respuesta es análoga a lo observado para *Vibrio harveyi*. Dichos resultados podrían explicarse sugiriendo que a 30°C lo único que observamos es la adhesión inicial reversible, mientras que a T.A. si hay un desarrollo efectivo de la biopelícula. Este hecho es interesante porque se ha sugerido que *Vibrio shilonii* es infectivo a altas temperaturas (30°C) y la infección inicia con la adhesión de la bacteria a la superficie del coral **(Rosenberg E., & Falkovitz L., 2004)**.

V. shilonii se adhiere a la epidermis del coral y posteriormente las bacterias penetran al epitelio causando dicha infección **(Rosenberg E., & Falkovitz L., 2004)**. El planteamiento anterior nos lleva a pensar que cuando *V. shilonii* infecta al coral (*Oculina patagonica*) no lo hace mediante la formación de biopelículas.

Nuestros resultados muestran que en medio TBSW a T.A. con o sin agitación hay formación de biopelícula y ésta va aumentando respecto al tiempo.

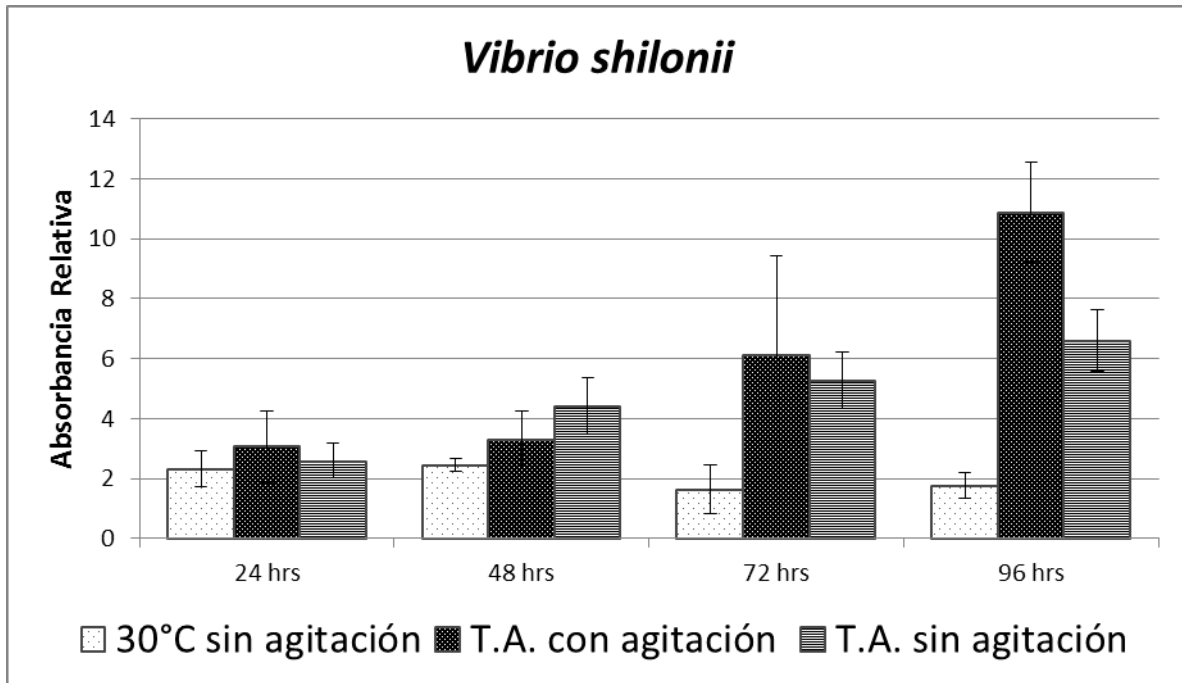


Fig. 6 Cantidad de biopelícula formada por *Vibrio shilonii* en medio TBSW en diferentes condiciones de cultivo.

2. Morfología de las células dentro de las biopelículas.

Debido a las diferencias que existen entre las formas de vida bacteriana (planctónica y formando biopelículas), se decidió examinar si habría cambios morfológicos en las células que forman la biopelícula respecto a las células en crecimiento planctónico. Para este análisis, las muestras de cada condición se observaron al microscopio óptico y se tomaron microfotografías en el aumento de 1000x.

En la figura 7 se observa, en el panel A, una muestra de células de *Vibrio shilonii* tomada a partir de una biopelícula de 72 h, mientras que en el panel B, se muestran las células planctónicas.

Como se puede observar las células provenientes de la biopelícula se aprecian densamente agrupadas, esto se debe a la presencia de una matriz que recubre a la biopelícula y dificulta su observación. No obstante en algunas células individuales se observa una morfología diferente a la que muestran las células planctónicas, haciéndose redondeadas y pequeñas.

Posiblemente este cambio morfológico favorezca la adhesión de las células a la superficie o entre ellas mismas. En este sentido, se ha observado que las células de *V. parahaemolyticus* pierden el flagelo en las etapas iniciales de formación del biopelícula (lo cual se atribuye al contacto de la bacteria con la superficie), este evento desencadena un programa genético el cual es indispensable para la maduración de la biopelícula (**Davey, M. E., & O'toole, G. A., 2000**).

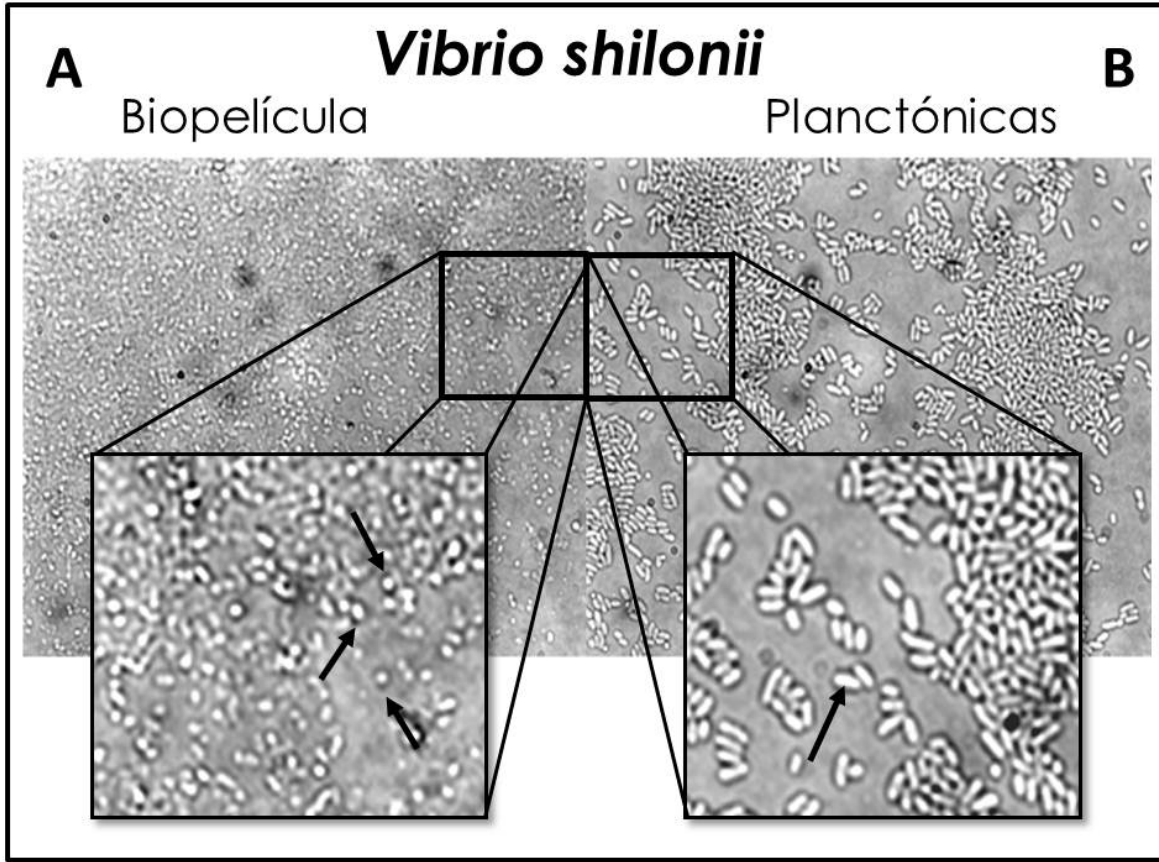


Fig. 7 Microfotografías de *Vibrio shilonii*, A) biopelícula, B) planctónicas. Las flechas señalan las células en donde se aprecia su tamaño con claridad.

CONCLUSIONES

En este trabajo se muestra que:

- 1) La bacteria marina *Vibrio shilonii* es capaz de formar biopelículas.
- 2) La formación de biopelículas es favorecida por el crecimiento en un medio relativamente bajo en nutrientes como lo es el TBSW.
- 3) La formación de biopelículas es favorecida a baja temperatura.
- 4) La morfología de las células presentes en las biopelículas, difiere de las planctónica, siendo éstas pequeñas y redondeadas.

PERSPECTIVAS

- 1) Estudiar la arquitectura de la biopelícula formada por *Vibrio shilonii* mediante microscopia de fluorescencia e identificar sus diferentes etapas.
- 2) Aislar mutantes incapaces de formar biopelículas y evaluar su capacidad de infección.
- 3) Evaluar la contribución de la motilidad y la presencia del flagelo en la formación de biopelículas.

BIBLIOGRAFÍA

- * **Anetzberger, C., Pirch, T. & Jung, K., 2009**, Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*, *Molecular Microbiology*, 73(2):267-277.
- * **Breugelmans, P., Barken, K.B., Tolker-Nielsen, T., Hofkens, J., Dejonghe, W. & Springael, D., 2008**, Architecture and spatial organization in a triple-species bacterial biofilm synergistically degrading the phenylurea herbicide linuron, *FEMS Microbiol Ecol*, 64: 271–282
- * **Costerton, J. W., 1987**, Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41: 435 - 64.
- * **Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P., 1995**, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-22.
- * **Costerton, J.W., 1999**, Introduction to biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 217-221.

- * **Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J., 2004**, Quorum sensing and swarming migration in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 28:461-289

- * **Davey, M. E., & O'toole, G. A., 2000**, Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* , 54: 49-79. *Antimicrobial Agents*, 11: 217-221.

- * **Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. 1998**, The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science*, 280:295-298.

- * **Donlan, R.M., 2002**, Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* , 8,9: 881-890.

- * **Fraser, M. & Hughes C., 1999**, Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology* , 2: 630-635.

- * **González, Y., Venegas, D., Mendoza-Hernandez, G., Camarena, L. & Dreyfus, C., 2010**, Na⁺ and H⁺ dependent motility in the coral pathogen *Vibrio shilonii*. *FEMS, Microbiology Letters*, (en prensa)

- * **Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley P., 2004**, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* , 2: 95-108.

- * **Hostacká, A., Ciznár, I. & Stefkovicová, M., 2010**, Temperature and pH Affect the production of Bacterial Biofilm, *Folia Microbiol.* **55** (1), 75–78.
- * **Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M. & Loya, Y., 1997**, Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series* , 147: 159-165.
- * **Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E. & Rosenberg, E., 2001**, *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 51: 1383-1388.
- * **Mattmann, M. E. & Blackwell, H. E., 2010**, Small molecules that modulate quorum sensing and control virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *The Journal of organic chemistry*.
- * **McCarter L., 1999**, Dual Flagellar Systems Enable Motility under Different Circumstances, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7:18–29
- * **Miller, M.B., & Bassler, B.L., 2001**, Quorum sensing in bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 55: 195-199.
- * **Mireles II J. R., Toguchi, A. & Harshey, R. M., J.R., et. al. 2001**, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with

altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin inhibits biofilm formation, *Journal of Bacteriology*, 183 (20): 5848–5854. **Mireles, J. R., Toguchi, A. & Harshey, R. M.**

- * **Ng, W.L., & Bassler, B.L., 2009**, Bacterial Quorum Sensing Network Architectures, *Annual Review of Genetics*, 43: 197-222.
- * **O'Toole, G.A., & Monds, R.D., 2008**, The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* , 17, 2: 73-87.
- * **O'Toole G. A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. & Kolter, R., 1999**, Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzimology* , 310: 91-109.
- * **Rosenberg E., & Falkovitz L., 2004**, The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching, *Annual Review of Microbiology*, 58:143-159.
- * **Ruby, E.G., 1996**, Lessons from a cooperative bacterial-animal association The *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50:591–624
- * **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton J.W., 2002**, Biofilms as differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* , 56: 187-209.

- * **Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant J., & Michiels, J., 2008**, Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* , 16, 10: 496-506.
- * **Winstanley, C., & Fothergill, J.L., 2009**, The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS, Microbiology Letters*, 290:1-9.
- * **Xavier J.R., & Foster K.R., 2007**, Cooperation and conflict in microbial biofilms. *PNAS* , 104: 876–881.
- * **Yildiz, F.H., & Visick, K.L., 2008**, *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology* , 17, 3: 109- 118.
- * **Zobell, C.E., 1943**, The effect of solid surfaces on bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46:39-56.