

Efectividad de la formación de *biofilms* por cepas de *pseudomona* y su capacidad de disminución de cloro y antagonica de bacterias coliformes

Effectiveness of biofilm formation by pseudomonas strains and their ability to decrease chlorine and antagonism of coliform bacteria

Oliver Rodríguez¹, Edgardo Abadia¹, Alexis De La Cruz^{2*}

¹Estudiantes de Biología, Centro Regional de Azuero, Universidad de Panamá, ²Docente de Microbiología, Centro Regional de Azuero, Universidad de Panamá

Resumen La efectividad de formación de *biofilms* o “biopelícula” por cepas de *Pseudomona* y su capacidad de disminución del cloro y antagonica para bacterias coliformes, permite en gran medida, estudiar la capacidad de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* para formar biopelícula. Para el diseño experimental se utilizaron cuatro tanques con agua potable, a la cual se le adicionó Tiosulfato de sodio para eliminar las concentraciones de cloro. Para efectuar la formación de *biofilms* se colocaron cuatro estructuras en forma de “T” de PVC, sostenidas con alambre dulce. Se utilizaron tres tratamientos, uno con *P. aeruginosa*, otro con *P. fluorescens* y la mixtura (combinación de ambas cepas). Para cada tratamiento se realizaron conteos, caracterización y cuantificación de colonias bacterianas. Con el objetivo de determinar la efectividad de formación de *biofilms* por cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, así como también su capacidad de disminución del cloro y antagonica para bacterias coliformes. Nuestros Resultados indican que *P. aeruginosa* presentó una mayor capacidad para formar *biofilms*, en comparación con los demás tratamientos. El *biofilms* formado mostró efectividad en disminuir las concentraciones de cloro utilizadas, así como también, gran poder de antagonismo contra *Escherichia coli*. *P. aeruginosa* mostró mayor capacidad de antagonismo con un halo de 1mm de diámetro. Hemos encontrado que las cepas de *Pseudomona* utilizadas producen *biofilms* eficientemente, el cual reduce las concentraciones de cloro.

Palabras clave *Biofilms*, cloro, desinfección.

Abstract The effectiveness of formation of biofilms or "biofilm" by strains of *Pseudomonas* and their capacity to reduce chlorine and antagonistic to coliform bacteria, allows to a large extent, study the ability of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* to form biofilm. For the experimental design four tanks with drinking water were used, to which sodium thiosulfate was added to eliminate chlorine concentrations. To make the formation of Biofilms, four PVC "T" structures were placed, supported with sweet wire. Three treatments were used, one with *P. aeruginosa*, another with *P. fluorescens* and the mixture (combination of both strains). Counting, characterization and quantification of bacterial colonies were carried out for each treatment. In order to determine the effectiveness of biofilm formation by strains of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, as well as their capacity to reduce chlorine and antagonistic to coliform bacteria. Our results indicate that *P. aeruginosa* showed a greater capacity to form biofilms, in comparison with the other treatments. The strains showed effectiveness in decreasing the concentrations of chlorine used, as well as, great power of antagonism against *Escherichia coli*. *P. aeruginosa* showed greater antagonism capacity with a 1mm diameter halo. We have found that the strains of *Pseudomonas* used produce biofilms efficiently, which reduces chlorine.

Keywords Biofilm, chlorine, disinfection.

* Corresponding author: alexisdelac@gmail.

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: a) bacterias planctónicas, de libre flotación, y b) bacterias formadoras de *biofilms*, en colonias de microorganismos sésiles [1]. El *biofilm* se define como comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una

matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo [2].

Cuando se corta una tubería de agua potable se puede observar la formación de un “limo” de color verde al cual denominamos *biofilm*. Esto nos trae a nuestras mentes muchas

interrogantes: ¿Será esto dañino para nuestra salud? ¿Es normal?

La formación de biopelícula está dada por el ingreso de microorganismos a la red, los cuales se adhieren a las tuberías por medio de las Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS), el cual forma una matriz microbiana que se alimenta de nutrientes del agua y de la tubería, que a su vez absorbe compuestos inorgánicos. Dentro de esta matriz se dan procesos de reproducción y desprendimiento que conllevan a la formación de nuevos agregados en otros puntos de la red. La formación de la biopelícula afecta en gran medida los índices de cloro y el flujo de agua dentro de las redes de distribución [3]. El crecimiento bacteriano en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable produce un deterioro de la calidad del agua, alterando su sabor y olor, aumentando la turbiedad e incluso puede llegar a afectar su conformidad con las normas microbiológicas de calidad [4].

Un *biofilms* desarrollado es muy resistente, y un problema cuando se precisa un entorno limpio y desinfectado. Los microbios del *biofilms* pueden significar un reservorio de bacterias, involucrarse en contaminaciones cruzadas, obturar las contaminaciones de líquidos, y poner serias dificultades a la higiene [5].

Pseudomonas constituyen un género específico de los bacilos, formado por bacterias oxidasa positivas (es decir, que producen esta enzima) y Gram negativas (ya que no adquieren una tonalidad azulada cuando se les aplica la coloración de Gram) [6].

El objetivo de esta investigación consistió en determinar la efectividad de formación de *biofilms* por cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, así como también, su capacidad de disminución del cloro y antagónica para bacterias coliformes.

2.

2.1. Construcción y preparación del sistema para el diseño experimental

Se utilizaron cuatro tanques con un volumen de 17,85 l c/u. Se utilizó cloro para limpiar las paredes internas de los tanques. A cada tanque se le adicionaron 14,28 l de agua potable y 1 ml de Tiosulfato de sodio, en cada uno de los tratamientos y el control, se colocaron cuatro estructuras en forma de "T" de PVC (Figura 1).



Figura 1. Estructuras en forma de "T" de PVC (1 Pulg) suspendidas en el tratamiento, se usaron para la formación de la biopelícula bacteriana o *biofilms*.

2.2. Inoculación bacteriana

Se utilizaron cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* aisladas de cultivos puros e inoculadas en caldo Tripticasa de soja (120 ml) por un periodo de 24 horas y posteriormente colocadas en los tratamientos (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y mixtura). Se agregó 10 ml del inoculo con la ayuda de una micropipeta, cada tanque etiquetado con su respectiva identificación y tapados herméticamente para evitar su contaminación.

2.3. Caracterización, formación y cuantificación de las colonias o cepas formadoras de *biofilms*

2.3.1. Caracterización y formación

Para verificar el desarrollo de las cepas formadoras de *biofilms* se realizaron cultivos en *agar Cetrimide* para los tratamientos y el control, cada cuatro días después de haber inoculado las cepas en los tanques en dos ocasiones, se aplicó la técnica de hisopado sobre las "T" de PVC y con la ayuda de un asa bacteriológica se realizó el cultivo. Se anotaron aspectos morfológicos, como: elevación, tamaño, borde, color y consistencia de las colonias bacterianas.

2.3.2. Cuantificación

Para efectuar el conteo de colonias (UFC) en los tratamientos se realizaron diluciones en serie con tubos de ensayo de 10 ml, los cuales contenían 6 ml de solución isotónica al 0,8 %, se realizó el hisopado en las "T" de PVC para el control y cada tratamiento, se utilizaron tres tubos para cada uno, se etiquetó y a partir de esas diluciones se procedió hacer cultivos de los dos primeros tubos en *agar Cetrimide*. Luego de obtener el crecimiento se procedió a realizar el conteo, utilizando el contador de colonias bacterianas.

2.4. Determinación de la capacidad fisiológica del *biofilms*

El *biofilms* formado en la "T" de PVC por *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y en mixtura se enfrentó a diferentes concentraciones de cloro (0.2 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm) y utilizando un control para cada tratamiento (0.6 ppm), se utilizaron cuatro envases con volumen de 3.78 l para cada concentración, se colocaron 3 l de agua en cada envase con las concentraciones de cloro antes mencionadas, en donde fueron colocadas las "T" de PVC. Se tomó lectura de cloro inicial, a las 12 y 24 horas. Los envases se taparon con papel aluminio para evitar cualquier tipo de contaminación.

2.5. Capacidad antagónica ante cepas de coliformes

Se realizaron dos pruebas por cada tratamiento. Se utilizó agar Bacteriológico y Tripticasa de soja en caldo. Se cortaron discos de papel filtro, los cuales fueron introducidos en tubos de ensayo con agua destilada estéril, se les inoculó *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y la mixtura obtenida de los tratamientos iniciales y luego se incubaron para su crecimiento a 37 °C por 24 horas. Esos discos fueron usados para medir la capacidad antagónica de cada una de las cepas contra

crecimiento en placas Petri con *E. coli*, colocando discos impregnados de estas cepas bacterianas.

3. Resultados y discusión

En la caracterización morfológica de las colonias para los tratamientos se pudo determinar que las cepas utilizadas iban en constante desarrollo y ambas presentaban morfologías muy parecidas. Sin embargo, al ser utilizadas en mixtura las características obtenidas concuerdan en su totalidad con las de *P. aeruginosa*, lo cual muestra un dominio de esta bacteria contra *P. fluorescens* (tabla 1).

Tabla 1. Características morfológicas de las colonias cultivadas a los 4 días de haberse inoculado las cepas en los tratamientos

Características	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	Control	Mixtura
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>		
Elevación	Plana	Convexa	-----	Plana
Tamaño	Grandes	Pequeñas	-----	Grandes
Color	Crema	Crema	-----	Crema
Borde	Ondulado	Redondo	-----	Ondulado
Consistencia	Cremosa	Cremosa	-----	Cremosa

De las cepas utilizadas, *P. aeruginosa*, presentó mayor capacidad de formación de *biofilms*, la cuantificación de colonias para este tratamiento fue altamente superior con respecto a los de *P. fluorescens* y mixtura. Sin embargo, al mezclar ambas cepas no presentaron gran cantidad de colonias (figura 2). La referencia [8] muestra que *P. aeruginosa* es el modelo bacteriano en el que se han realizado la mayoría de los estudios de formación de *biofilms* y regulación mediante *quorum sensing* (forma en que se comunican las bacterias). Es importante señalar que este es un estudio experimental, pero es necesario tomar en cuenta la capacidad de los microorganismos para formar biopelícula sobre cualquier material o sitio determinado, en este caso bacterias del género *Pseudomona*, las cuales muchas son patógenas para el ser humano.

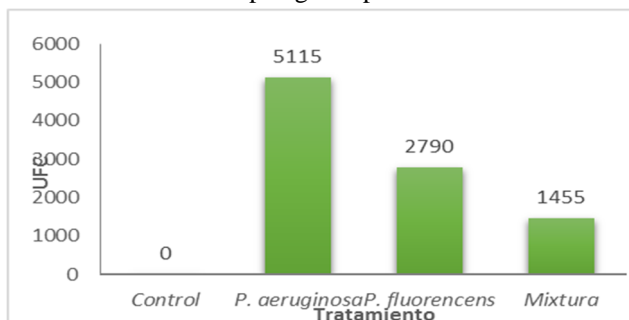


Figura 2. Cuantificación de colonias bacterianas (UFC) formadoras de *biofilms* en las estructuras en forma de "T" de PVC, 20 días después de haberse inoculado las cepas en cada tratamiento.

Para determinar la capacidad fisiológica y estructural del *biofilms* se realizó un ensayo, donde se someten las biopelículas formadas por los tratamientos (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y mixtura) a diferentes concentraciones de cloro, se realizan lecturas de la concentración de cloro inicial (0 horas); a las 12 horas y 24 horas. También, se utilizó un control, se obtuvo que las concentraciones de cloro disminuyeron totalmente para los tratamientos *P. aeruginosa* (figura 3), *P. fluorescens* (figura 4), y en mixtura (figura 5) y parcialmente para el control. La referencia [9] muestra que la investigación desarrollada en Francia demuestra que los procesos de desinfección química son solo parcialmente exitosos en la remoción del *biofilms*. Los bajos niveles de cloro en la red permiten que exista una alta carga de microorganismos circulando en el agua. Esto no solo se ve reflejado en un potencial problema de salud pública sino también en un problema técnico y económico, ya que existen microorganismos que han generado resistencias a los desinfectantes y que son potencialmente patógenos, lo que encarece el tratamiento e impide garantizar que el agua sea potable en todos los puntos de la red [7].

Hace falta comprobar más a fondo si las bacterias del género *Pseudomona*, y otros microorganismos desarrollan la capacidad de disminuir agentes químicos como el cloro y cuáles mecanismos utilizan. Posiblemente la disminución de cloro obtenida haya sido debido al *biofilms* formado por las cepas de *Pseudomona*, ya que existen otros factores como la volatilización, turbidez, pH y temperatura que pueden tener un efecto en la disminución de este.

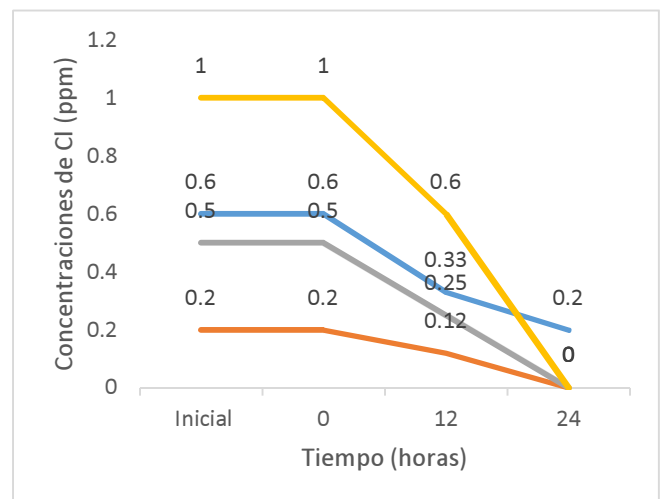


Figura 3. *Biofilms* formado por *P. aeruginosa* enfrentado a diferentes concentraciones de Cl.

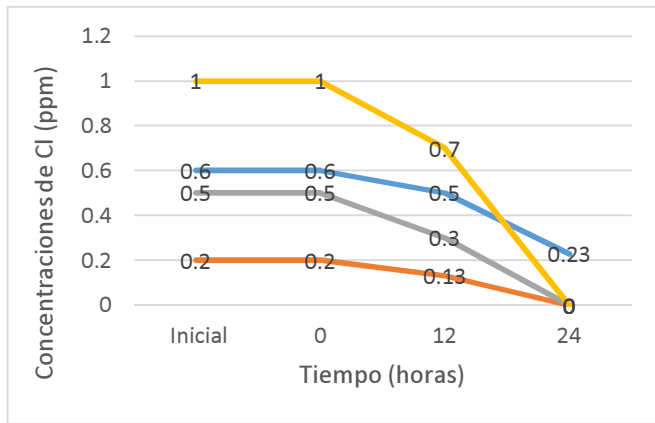


Figura 4. Biofilms formado por *P. fluorescens* enfrentado a diferentes concentraciones de Cl.

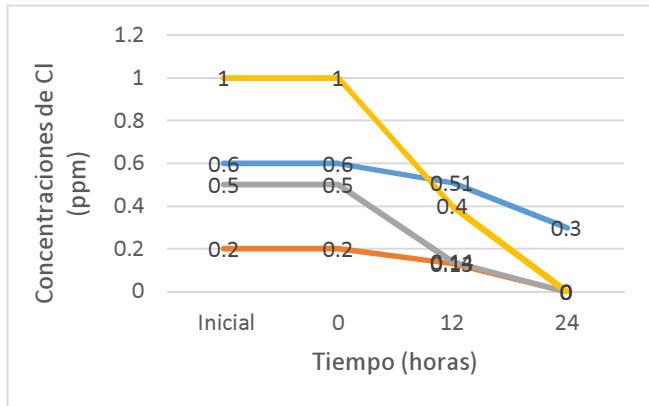


Figura 5. Biofilms formado por la mixtura enfrentado a diferentes concentraciones de Cl.

Las pruebas de antagonismo contra *Escherichia coli* muestran una efectividad en todos los tratamientos utilizados, cuyos espacios de inhibición resultan entre 0,9 a 1 mm de diámetro (tabla 2), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Ysasis y Flores, en donde comprobó que, *P. aeruginosa* produce antagonismo contra otros microorganismos [10]. Vale la pena diversificar este estudio, para determinar los metabolitos producidos por estas bacterias y la aplicación que puedan tener, por ejemplo, el biocontrol. También, evaluar el antagonismo contra otras especies de bacterias.

Tabla 2. Efectividad de antagonismo por las cepas de *Pseudomona* contra *E. coli*

Tratamientos	Diámetro de halo de antagonismo (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	1
<i>P. fluorescens</i>	0.9
Mixtura	1

4. Conclusiones

P. aeruginosa presentó mayor capacidad para formar biofilms en comparación con los demás tratamientos, se obtuvo disminución del cloro. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y en mixtura desarrollaron poder antagonico contra la bacteria *Escherichia coli*, el cual fue mayor para *P. aeruginosa* y la mixtura.

Se deben realizar estudios más profundos para verificar si esta disminución es debida a los microorganismos o se puede deber a otros factores, como: volatilización, temperatura, turbidez, etc.

Es importante comprobar profundamente si ciertas bacterias tienen la capacidad de reducir el cloro, y de esta manera pueden ser utilizadas para eliminar este elemento en el producto final de las plantas de tratamiento de aguas residuales, y evaluar los índices de cloro adicionados en las plantas de tratamiento de agua potable y al llegar a nuestros hogares, ya que, las biopelículas pueden tener un efecto en la disminución de este.

Las limitaciones de nuestro proyecto recaen en el espacio, tiempo y el requerimiento de mejores equipos de laboratorio y reactivos.

Este estudio abre las puertas a la realización de nuevas investigaciones relacionadas con la formación de biofilms sobre cualquier objeto, tejido o material y las implicaciones que pueda tener en la salud del ser humano, así como también, evaluar las formaciones de biopelículas en las redes de distribución de agua potable y el papel que desempeña en este sitio.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, darle gracias a Dios Todopoderoso por mantenernos con salud, motivación y dedicación para llevar a cabo este proyecto.

Al profesor Alexis De La Cruz por ser nuestro coordinador y brindarnos sus conocimientos en técnicas de microbiología, metodología, redacción, etc.

Al profesor Ítalo Goti por apoyarnos en la redacción del artículo.

Al Ministerio de Salud por permitirnos desarrollar la fase experimental del proyecto en el Laboratorio de Calidad de Agua en la Villa de Los Santos.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT), ya que, el autor (1) del presente escrito es becado de dicha institución.

REFERENCIAS

- [1] J. Nazar C, «Biofilms bacterianos», Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, vol. 67, n.o 1, pp. 161-172, abr. 2007.
- [2] I. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, y J. Leiva, «Biofilms bacterianos e infección», Anales del Sistema Sanitario de Navarra, vol. 28, n.o 2, pp. 163-175, ago. 2005.

- [3] «519». [En línea]. Disponible en: <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=http://ojsrevistaing.uniandes.edu.co/ojs/index.php/revista/article/viewFile/35/519>. [Accedido: 10-ago-2018].
- [4] J. K. Miranda y R. M. Sahuquillo, «Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica», *Ingeniería del agua*, vol. 4, n.o 2, jun. 1997.
- [5] G. P. Serra, «Formación y Consecuencias», p. 27.
- [6] «Definición de pseudomonas — Definicion.de», *Definición.de*. [En línea]. Disponible en: <https://definicion.de/pseudomonas/>. [Accedido: 10-ago-2018].
- [7] J. C. R. Ariza, A. J. Martínez, y D. C. Calvo, «Efecto del desprendimiento de las biopelículas formadas en una red de acueducto sobre la calidad del agua», *Revista de Ingeniería*, p. 6, 2013.
- [8] S. Téllez, «Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria», *VISAVET Outreach Journal*, may 2010.
- [9] G. González, M. Isabel, M. García Melián, M. Alonso, y M. de los Ángeles, «Importancia sanitaria de Pseudomonas aeruginosa en agua de hemodiálisis y su desinfección», *Revista Cubana de Salud Pública*, vol. 40, n.o 2, pp. 198-211, jun. 2014.
- [10] L. A. Ysasis y E. Flores, «Actividad antagónica en aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa», *UNIVERSIDAD DEL ZULIA*, vol. 14, p. 8, 2014.