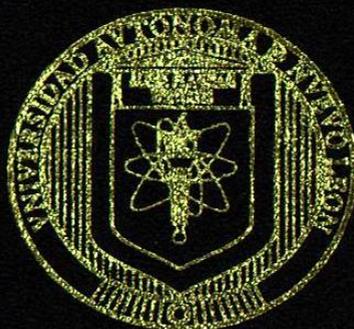


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



EFEECTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION
SOBRE LA PRODUCCION DE EXPOLISACARIDO
POR UNA CEPA NATIVA DE

Enterobacter cloacae

Por
FERNANDO RICARDO FLORES TORRES

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado
de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Industrial

Abril de 2004

TM

Z552 1

FCQ

2004

.F5



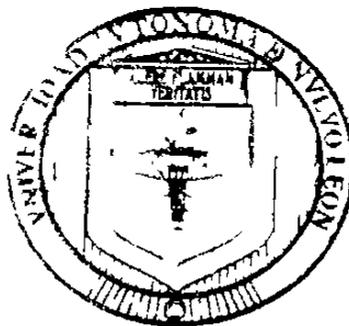
2

~~5~~

-

-

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION
SOBRE LA PRODUCCION DE EXPOLISACARIDO
POR UNA CEPA NATIVA DE

Enterobacter lactic

Por
FERNANDO RICARDO FLORES TORPES

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado
de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Industrial

Abril de 2004

7 863

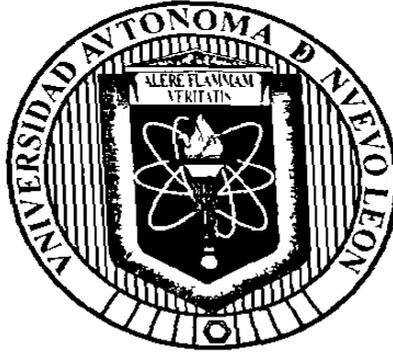
M
Z552
F00
2004
.F5



FONDO
ZESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO
POR UNA CEPA NATIVA DE
Enterobacter cloacae.**

Por

FERNANDO RICARDO FLORES TORRES

**Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Industrial.**

Abril de 2004

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO
POR UNA CEPA NATIVA DE
Enterobacter cloacae.**

Aprobación de la Tesis:

**M.C. Sergio S. Fernández Delgadillo
Director de la Tesis**

Evaluador (a) de la Tesis

Evaluador (a) de la Tesis

**Dr. Juan Manuel Barbarín Castillo
Sub-Director de Estudios de Postgrado**

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
Hipótesis.	6
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. Características Generales de <i>Enterobacter cloacae</i>	9
2.2. Exopolisacáridos de Origen Microbiano	11
2.3. Las Biopelículas Bacterianas como Comunidades Diferenciadas.	14
2.4. Actividades Relativas de las Células en Suspensión y las que Forman Parte de una Biopelícula.	16
2.4.1. Procesos Celulares y Actividad Metabólica.	16
2.4.2. Biopelículas Delgadas de una Sola Especie.	19
2.5. Los Sistemas de Regulación Biológica en Relación a los Proceso de Formación de Biopelículas.	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Obtención de la Biopelícula.	28
3.2. Aislamiento y Selección de la Cepa en Mayor Proporción en la Biopelícula.	30
3.3. Identificación de la Cepa Seleccionada.	30
3.4. Conservación de la Cepa.	30
3.5. Medios de Cultivo Experimentales.	31
3.6. Preparación del Inóculo.	32
3.7. Cultivos Experimentales.	32
3.7.1. Nivel Matríz.	32
3.8. Métodos Analíticos.	33

Capítulo	Página
3.8.2. Determinación de la Acumulación de Exopolisacáridos	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Aislamiento, Selección e Identificación del Microorganismo	34
4.2. Medio de Cultivo Formulado para la Realización de los Experimentos.	35
4.3. Efecto de la Presencia de Diferentes Fuentes de Carbono sobre el Crecimiento <i>Enterobacter cloacae</i>	36
4.4. Efecto del pH y la Presencia o Ausencia de Calcio sobre el Crecimiento de <i>Enterobacter cloacae</i> con Glucosa o Maltosa como Fuentes de Carbono	37
4.5. Efecto del pH Sobre la Velocidad de Consumo de Glucosa o Maltosa por <i>Enterobacter cloacae</i> Creciendo en Presencia o Ausencia de Calcio.	39
4.6. Efecto del pH Sobre la Acumulación de Exopolisacárido por <i>Enterobacter cloacae</i> Creciendo en Glucosa o Maltosa y con o sin la Presencia de Calcio.	42
6. CONCLUSIONES.	52
7. RECOMENDACIONES	53
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación Diafragmática de la Estructura de una Biopelícula Bacteriana Basada en el Análisis Sistemático de Imágenes Obtenidas con MCLB.	15
2. Aspecto de la Biopelícula en su Ambiente Natural, Sobre las Cadenas de un Transportador y Derramada en el Piso del Área de Empaque.	29
3. Aspecto Macroscópico de las Colonias de <i>Enterobacter cloacae</i> Creciendo en Agar Nutritivo por 24 Horas a 35°C.	34
4. Curvas de Crecimiento de <i>Enterobacter cloacae</i> Utilizando Diferentes Carbohidratos como Fuente de Carbono.	36
5. <i>Enterobacter cloacae</i> Utilizando Diferentes Carbohidratos como Fuente de Carbono.	37
6. Efecto del pH, la Fuente de Carbono y la Presencia o Ausencia de Calcio Sobre la Velocidad de Crecimiento de <i>Enterobacter Cloacae</i>	38
7. Efecto del pH y el Calcio Sobre la Velocidad de Consumo de Glucosa (Glu) y Maltosa (Mal) por <i>Enterobacter Cloacae</i> : (A) Calcio, (B) sin Calcio.	40
8. Efecto del pH, la Fuente de Carbono y la Presencia o Ausencia de Calcio Sobre la Velocidad de Acumulación del Exopolisacárido por <i>Enterobacter cloacae</i> (la Concentración de Azúcares se Expresa en Moles de Carbono/ Litro). A: Glucosa + Calcio, B: Maltosa + Calcio, C: Glucosa Sin Calcio, D: Maltosa sin Calcio.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Medio de Cultivo MPEPS General.	31
II. Perfil Bioquímico y Fisiológico de la Cepa Seleccionada.	34
III. Medio de Cultivo MPEPS.	35
IV. Efecto del pH Sobre las Velocidades de Crecimiento Mostradas por <i>Enterobacter cloacae</i> en Diferentes Condiciones de Cultivo.	39
V. Efecto del pH Sobre la Velocidad de Consumo de Carbohidratos por <i>Enterobacter cloacae</i> , Calculada a Diferentes Tiempos Durante los Experimentos de Crecimiento.	41
VI. Comparación de Rendimientos Obtenidos en la Producción de Exopolisacáridos por Microorganismos en Procesos a Nivel Laboratorio.	49

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentaje
μm	Micrometros
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
α	Alfa
β	Beta

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
Hep-2	Células Intestinales a los cuales puede adherirse <i>E. coli</i>
CO ₂	Dioxido de Carbono
ml	Mililitros
O-acetilo	Orto-acetilo
β-glucano	Beta-glucano
conc	Concentración
g	Gramos
l	Litros
M	Concentración Molar
mM	Concentración Milimolar
g/l	Gramos/Litro
N	Concentración Normal
rpm	Revoluciones por Minuto
MPEPS	Medio Para la Producción de Exopolisácaridos
MCLB	Microscopía Confocal Láser de Barrido
uv	Ultravioleta
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potasio Monobásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potasio Dibásico
H ₂ S	Ácido Sulfhídrico
nm	Nanometros
pH	Potencial de Hidrógeno

RESUMEN

Fernando Ricardo Flores Torres Fecha de Graduación: Abril, 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO
POR UNA CEPA NATIVA DE Enterobacter cloacae**

Número de páginas: 60

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Microbiología Industrial**

Area de Estudio: Microbiología Industrial

Propósito y Método del Estudio: Una cepa nativa de Enterobacter cloacae fue obtenida de una biopelícula formada en las cadenas transportadoras de una embotelladora de refrescos, la cual fue identificada como un microorganismo formador de biopelícula. Observaciones acerca del efecto combinado del pH, la presencia de glucosa o maltosa y la presencia o ausencia de calcio sobre el crecimiento y la habilidad de acumular exopolisacárido, fueron hechas cuando se inoculó un cultivo joven de la cepa en el medio de cultivo MPEPS, todo esto con el fin de simular las características nutricionales disponibles en el nicho ecológico industrial de la cual fue originalmente aislada dicha cepa nativa formadora de biopelícula. De los experimentos realizados a pH, 5, 7 y 9, se observó al comparar los de pH 7 y pH 9, un patrón de crecimiento muy similar. De lo cual se concluye que esta cepa tiene desarrollada una capacidad especial para crecer a niveles de pH alcalinos. El pH 5 tiene un efecto negativo sobre el crecimiento del microorganismo cuando fue comparado contra otros niveles de pH dentro de las mismas condiciones nutricionales de crecimiento. Cuando la cepa fue probada en presencia o ausencia de calcio, solo se observaron ligeras diferencias en los resultados obtenidos. Las velocidades de acumulación de exopolisacáridos, muestran mejores resultados en los cultivos a pH alcalino, seguido por el de pH ácido y finalmente por el neutro. Es necesario puntualizar, que se observó que el nivel bueno de acumulación de exopolisacárido para todos los casos fue durante el tiempo en el que el microorganismo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Cuando el microorganismo se experimentó el medio a pH 7 y en presencia de calcio, la acumulación de exopolisacárido prácticamente desapareció, sin embargo en ausencia de calcio la acumulación puede continuar durante la fase estacionaria de crecimiento.

Contribuciones y Conclusiones La cepa nativa de Enterobacter cloacae fue totalmente adaptable a el microambiente artificialmente formado durante los experimentos realizados. La presencia de calcio en el medio de cultivo a pH 7, inhibe la acumulación de exopolisacárido cuando el microorganismo ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. No se observaron diferencias en los resultados obtenidos cuando se utilizaron glucosa o maltosa como fuente de carbono. Se propone un medio de cultivo para observar in vitro el efecto de la variación de nutrientes en la habilidad para acumular exopolisacárido por Enterobacter cloacae

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN.

Los microorganismos son generalmente considerados como criaturas simples cuando se les compara con los organismos "superiores", sin embargo, el estudio mas detallado del desarrollo microbiano ha mostrado que los microorganismos son capaces de presentar comportamientos complejos y diferenciados. Un ejemplo de ello es la formación de esporas por *Bacillus subtilis*, proceso en el que las células vegetativas individuales integran múltiples signos internos y externos para sintetizar exitosamente una nueva estructura morfológica que esta adaptada para sobrevivir en una variedad de ambientes hostiles. Otro buen ejemplo es el caso de *Myxococcus xanthus* que toma esta complejidad a otro nivel mediante la "coreografía" del comportamiento de una población entera, que forma un cuerpo fructífero multicelular que contiene esporas resistentes.

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos que están adheridas a una superficie. Las biopelículas pueden estar compuestas de una simple especie o de múltiples especies microbianas, y se pueden formar sobre una variedad de superficies bióticas y abióticas. Aunque las biopelículas de especies mixtas son predominantes en muchos ambientes, las biopelículas de especies únicas existen en una gran variedad de infecciones y sobre la superficie de los implantes médicos, (Adal y Farr 1966, Archibald 1997) .

El esfuerzo concertado para estudiar las biopelículas microbianas se inició hace apenas 2 décadas con el redescubrimiento de que en los sistemas acuáticos naturales las bacterias se encuentran predominantemente adheridas a superficies, (Gessey y colab. 1977). Sin embargo el primer estudio documentado que se tiene de las biopelículas viene de 1933 por Henrici, en el

que él establece "es contundentemente evidente, que la mayor parte de las bacterias en el agua no flotan libremente, sino que crecen sobre superficies sumergidas", (Henrici 1933). Más aún, el deterioro de las corazas de los barcos por los microorganismos de los ambientes acuáticos, había sido ya reconocido como un problema serio un buen número de años antes de la publicación de Henrici, (Agosto 1923).

En el ambiente acuoso natural, las células microbianas encuentran una gran variedad de superficies sólidas que pueden alterar de manera importante su comportamiento fisiológico y ecológico. El movimiento de los microorganismos a través de estas superficies puede ser el resultado del flujo de algún líquido, de los movimientos de los propios microorganismos o por una combinación de ambos procesos. Entre los microorganismos, las bacterias en particular pueden ser consideradas como pequeñas partículas coloidales, (Marshall 1976), dado que cuando se encuentran cerca de algún material sólido, ellas son sujetas a varias fuerzas de atracción y repulsión que pueden resultar en una rápida adhesión (Marshall 1985), que es debida solamente a la interacción fisicoquímica entre la bacteria y la superficie, o a una adhesión que involucra una fase intermedia de atracción, seguida de respuestas fisiológicas en la bacteria inducidas por la presencia de la superficie (Goodman y Marshall, 1995), virtualmente todos los materiales son adecuados para la formación de una biopelícula bacteriana y esto se da en función directa de su humectabilidad. La adhesión firme a la superficie es generalmente mediada por exopolímeros bacterianos en un proceso llamado "enlace polimérico". La naturaleza y fuerza de adhesión dependen de las características fisicoquímicas del sustrato, la fuente de las moléculas en la biopelícula y las especies y el estado fisiológico de los organismos involucrados, (Schneider y Marshall 1994). En la naturaleza, los materiales orgánicos acumulados en las superficies inmersas en las aguas de los océanos o los esteros son muy similares a las sustancias húmicas, (Loeb y Neihof 1975). El humus es el producto de un proceso complejo que involucra a los compuestos biológicos excretados por los organismos vivos o materiales de descomposición de los organismos muertos. La naturaleza compleja de las

sustancias húmicas hace difícil su análisis estructural, pero se puede decir que el humus es aniónico, con muchos grupos carboxilo (por lo que es débilmente ácido), contiene de un 1 a un 5 % de nitrógeno y es este material proteináceo el que más fácilmente se adhiere a las superficies expuestas a aguas naturales (Baier y colab. 1972). La rápida y espontánea formación de películas orgánicas macromoleculares sobre una superficie sumergida incluyen a las glicoproteínas, a los polisacáridos, y a las moléculas de hidrocarburos, siendo todos ellos los que acondicionan la superficie para que posteriormente ocurra el crecimiento de los microorganismos. Por lo tanto, la adhesión celular depende de la adsorción de las películas macromoleculares.

En los últimos años se ha dejado de considerar que la formación de la biopelícula es solamente una actividad fisiológico-bioquímica de los microorganismos, se han encontrado una serie de efectos fisicoquímicos que deben darse para que el fenómeno sea factible. Por un lado, la hidrofobicidad de las células mismas, detalla que les obliga a formar clusters o floculas que tienden a escaparse de la matriz acuosa. La presencia de grupos moleculares polares sobre la superficie de una célula microbiana favorece las interacciones con las moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno, por lo que se esperaría una reducción en la hidrofobicidad total de esa superficie, sin embargo, al analizar varias bacterias se encontró que su hidrofobicidad esta relacionada inversamente a la concentración de oxígeno sobre la superficie celular. La hidrofobicidad, ha sido directamente relacionada con la fracción de carbono superficial correspondiente a las estructuras hidrocarbonadas de las proteínas, las lipoproteínas, los fosfolípidos o los lipopolisacáridos, (Mozes y colab. 1988, Mozes y colab 1987). Y por el otro lado las fuerzas electrostáticas o eléctricas que se dan en todas las superficies de los materiales generalmente utilizados en la industria de alimentos, tanto en las áreas de producción como en los empaques, entre los que encontramos una infinidad de plásticos, o algunos materiales metálicos. A pesar de que las interacciones hidrofóbicas son predominantes en el proceso de adhesión de células hidrofóbicas, las interacciones electrostáticas están siempre presentes e influyen su adhesión.

Hay reportes en la literatura que hablan del efecto del pH (Mozes y Rouxet 1987), o del efecto de la carga iónica y del tipo de iones que existen en la solución (Smyth y colab 1978, Vander Mei y colab 1989) sobre el proceso de formación de un biopelícula.

En el campo de su actividad fisiológica, las biopelículas actúan como comunidades de microorganismos creciendo en procesos simbióticos o de interacción bioquímica, (Huang y colab. 1995, Morris y colab 1995, Okabe y colab 1995, Xu y colab. 1998). En dichas comunidades predominan microorganismos que tienen la capacidad de producir polisacáridos extracelulares (Degeest y Vuyst 1999, Gibello y colab 1995) que les permiten adherirse firmemente a superficies sólidas, fenómeno que conduce a la formación de la biopelícula. En algunos microorganismos la formación del polisacárido extracelular es parte de su fisiología natural, pero en algunos otros casos, estos materiales son producidos como consecuencia de un efecto negativo del medio ambiente, como lo puede ser el agotamiento de nutrientes o el pH (Huang y colab. 1998, Lapaglia y Hartzell 1997), por ejemplo, algunas bacterias y algas verde azuladas secretan en sus superficies materiales limosos o gomosos y cuando estos materiales están acomodados en forma compacta alrededor de la superficie de la célula se denominan cápsulas, mientras que cuando están pobremente unidas y sólo forman una capa difusa se denominan capas de limo. Estas cápsulas y capas de limo están usualmente formadas de polisacáridos, polipéptidos o complejos polisacárido-proteína, (Degeest y Vuyst 1999). La capacidad para producir estas estructuras es una característica heredada en el organismo, pero las cápsulas no son componentes celulares absolutamente esenciales. En cultivos puros son capaces de crecer normalmente como cepas mutantes sin cápsula. Los tratamientos especiales con enzimas específicas que rompen las estructuras capsulares no matan a las células. Las cápsulas se forman solamente cuando un organismo crece en un cierto medio de cultivo. Por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides* forma su cápsula de dextrano solamente cuando crece sobre sacarosa, porque la enzima

que produce dextranos (dextrano sacarasa) solamente usa la sacarosa como su sustrato, (Hehre 1964).

A pesar de que las cápsulas no son estructuras esenciales para la célula, probablemente tienen valor en la sobrevivencia del organismo en la naturaleza. Por ejemplo, las cepas de *Streptococcus pneumoniae* que causan la pulmonía en el hombre, siempre tienen cápsulas, lo cual hace que los fagocitos del huésped ingieran estas bacterias y las destruyan. El pneumococo capsulado tiene por lo tanto una buena habilidad para crecer en el cuerpo humano y causar enfermedades, mientras que los pneumococos no capsulados son no patogénicos. En otro caso, las bacterias que causan deterioro dental, se adhieren a la superficie del diente mediante una cápsula.

Algunos organismos producen un limo adhesivo no sobre toda la superficie de la célula sino solamente en una región localizada que usualmente es un extremo. Esta capa localizada de limo es conocida como sostén fuerte (holdfast) porque permite a la célula unirse a una superficie específica por uno de sus extremos, (Poindexter 1964).

La interacción de las bacterias es inicialmente reversible y eventualmente irreversible. El proceso de adhesión irreversible se inicia por la fijación de la bacteria a la superficie por medio del exopolisacárido. Las células hijas producidas como resultado de la división celular están enlazadas mediante la matriz glicocalítica

El desarrollo de colonias adheridas conduce habitualmente a la formación de biopelículas continuas sobre la superficie colonizada. A pesar de que la producción de mucoexopolisacárido es algunas veces asociada con células supersensibles a los antibióticos, como es el ejemplo de *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria asociada a biopelículas que tiende a ser mucho más resistente a los antibióticos y bactericidas, que las células de ella misma cultivadas en el laboratorio, y hay dos posibles razones para explicar esto, una de ellas se refiere a los cambios fisiológicos en las células y la otra a la penetración de las barreras presentadas por la matriz exopolisacárida.

El subcultivo de las células in vitro, resulta en la pérdida del exopolisacárido y la reimposición de la sensibilidad a los biocidas, (Costerton 1987).

Sobre la base de los elementos anteriormente expuestos, se estableció la siguiente:

HIPÓTESIS

“En algunas etapas del procesamiento industrial de alimentos se establecen condiciones ambientales y nutricionales que favorecen el crecimiento de *Enterobacter cloacae*, y le inducen a producir exopolisacáridos que le permiten establecerse como una biopelícula”.

Para el desarrollo de este trabajo se definieron los siguientes objetivos:

1. El aislamiento e identificación de la especie presente entre los microorganismos de en una biopelícula, obtenida de cadenas de transportadores en una planta productora de alimentos establecida en el sudeste de México.
2. La formulación de un medio de cultivo que permita el crecimiento de la especie microbiana aislada y la producción de exopolisacáridos durante su cultivo.
3. El análisis bajo condiciones de laboratorio del efecto combinado de algunos nutrientes (carbohidratos como fuentes de carbono) y factores ambientales como el pH y la presencia/ausencia de calcio, sobre la capacidad de la especie microbiana asilada para producir exopolisacáridos durante el proceso de formación de una biopelícula.

Tareas a desarrollar.

1. Aislamiento y selección del tipo de microorganismos presentes en ella.
2. La aplicación de los procesos de identificación descritos en el Manual de Bergey de bacteriología sistemática para establecer género y especie de la cepa presente en la película.
3. Formular un medio de cultivo que permita reproducir las características nutricionales que en forma regular se encuentran en las áreas del proceso de producción de alimentos de las que el microorganismo fue obtenido.
4. El cultivo del microorganismo seleccionado en el laboratorio, bajo las condiciones previamente definidas, y evaluar analíticamente su capacidad de producción de exopolisacáridos.

Este trabajo presenta los siguientes aspectos novedosos.

- ❖ Se establece conocimiento acerca del efecto del pH del medio en el que se desarrolla sobre la fisiología del crecimiento y producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae*.
- ❖ Se establece conocimiento acerca del efecto de algunos carbohidratos sobre la respuesta de *Enterobacter cloacae* para acumular exopolisacáridos.
- ❖ Se establece conocimiento acerca del efecto nulo de la presencia de calcio en el medio de crecimiento de *Enterobacter cloacae* sobre el proceso de acumulación de exopolisacáridos.

Aportes teóricos y prácticos de estos resultados.

Este estudio aporta conocimientos que permiten entender el efecto de los factores ambientales y nutricionales sobre el crecimiento de *Enterobacter cloacae*, y sobre sus capacidades de producción y acumulación de exopolisacáridos.

Este conocimiento amplía las posibilidades de establecer mecanismos para el control de estos microorganismos.

La observación del efecto de algunos nutrientes como carbohidratos (glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y sacarosa), sobre la velocidad de acumulación de exopolisacáridos por el microorganismo creciendo en un medio de cultivo líquido regulado a diferentes pH, aporta conocimientos útiles para entender por que algunos microorganismos bajo ciertas condiciones ambientales y de nutrición comúnmente encontradas en la industria de alimentos, crecen formando biopelículas con capacidades especiales de adherencia a superficies sólidas.

En general el conocimiento derivado de esta investigación científica sería aplicable a los desarrollos tecnológicos siguientes: En el mejoramiento de los procesos o procedimientos asociados a la producción de alimentos; En la selección de los tipos de materiales que pueden ser predominantemente utilizados en la estructura de los equipos o herramientas de producción; En el mejoramiento de los sistemas de producción en referencia a los procedimientos de limpieza y desinfección, ya que al entender los mecanismos de formación de las biopelículas microbianas y el efecto que tienen algunas sustancias químicas sobre su formación, automáticamente se harían ajustes a dichos procedimientos. Todo ello conduce a tener reducciones de los costos en la producción de alimentos y a la obtención de alimentos más sanos factores de gran importancia en el contexto del desarrollo sostenible.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Características generales de *Enterobacter cloacae*.

Los microorganismos pertenecientes a este género y especie están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran con frecuencia en el agua, en el suelo, en los drenajes, en las plantas, en los vegetales y en los excrementos de los seres humanos y los animales de sangre caliente. Microscópicamente se presentan como bastones rectos con un tamaño entre 0.6 y 10 μm de grosor y de 1.2 a 3.0 μm de largo, son gram negativos, presentan movilidad mediante flagelos peritricos, son anaerobios facultativos y quimioorganotróficos, tienen metabolismo de los tipos respiratorio y fermentativo. Su óptima temperatura de crecimiento es entre los 30 y 37°C. La D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Son indol negativos. Voges-Proskauer positivos y citrato de Simmons positivo. La reacción al Rojo de Metilo es variable. Es lisina negativo y ornitina positivo. El malonato es usualmente utilizado y la gelatina es lentamente licuada. Estos microorganismos no producen H_2S , lipasas ni desoxiribonucleasas. Los carbohidratos fermentados por todas o la mayoría de las especies del género *Enterobacter* incluyen a la L-arabinosa, la celobiosa, la maltosa, D-manitol, la D-manosa, la salicina y la trehalosa. *Enterobacter cloacae* es un patógeno oportunista que causa infecciones de heridas, ampollas y el tracto urinario y ocasionalmente puede producir septicemia y meningitis.

La diferenciación de *Enterobacter* y sus géneros relacionados se presenta en la tabla I.

Tabla I.- Diferenciación de *Enterobacter* y géneros relacionados

Prueba	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>
Movilidad	+	-	+	+
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	+
Arginina dihidrolasa	D	-	-	-
Desoxi-ribonucleasa	-	-	-	+
Utilización de citratos	+	+	-	+

Obtenido del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Ed., (Buchanan y Gibbons 1994) (D=variable)

En la literatura hay muy pocas referencias de *Enterobacter cloacae* en relación con la formación de biopelículas, y aunque se habla de sus capacidades de adherencia, los estudios con este microorganismo han sido principalmente enfocados a su participación como agente causal de infecciones. Se le identifica como integrante de la flora intestinal humana, y las enfermedades asociadas con sus procesos infecciosos se reportan como el resultado de factores de predisposición del huésped y algunos determinantes de virulencia bacteriana como lo es su resistencia a la actividad bactericida del suero, su habilidad para producir aerobactina y hemaglutinina sensible a manosa y su capacidad para adherirse e invadir las células HEp-2, (Séller y colab. 1998, Keller y Colab. 1998). Por lo anteriormente expuesto, es obvio que los investigadores hayan dedicado esfuerzos al estudio de la farmacodinámica de los antibióticos efectivos contra este microorganismo, (Hyatt y colab. 1995)

En el campo de la microbiología industrial se han documentado los siguientes aspectos: La tolerancia y acumulación en este microorganismo de metales como el vanadio y el níquel, con la consecuente aparición de una resistencia inducida frente a algunos antibióticos. Sobresale en estos estudios, la capacidad de sorción de metales, detalle que es recomendable para ser considerado en los procesos de descontaminación de suelos y agua,

(Hernández y Colab. 1998). Por otra parte se le ha reportado también como un agente patógeno para frutas como la papaya, detalle que provoca grandes pérdidas económicas en las áreas de producción y almacenaje de éstas, (Alvarez y Nishijima 1987).

2.2. Exopolisacáridos de origen microbiano.

La presencia de exopolisacáridos como componentes esenciales de las biopelículas pueden ser demostrados por análisis químico o por examen directo de la biopelícula usando la microscopía o la microscopía electrónica. El desarrollo de métodos de tinción específicos ha revelado la adhesión y la presencia de microcolonias rodeadas de cantidades extensivas de exopolisacárido (Allison and Sutherland 1984). En estos experimentos de elaboración de biopelículas sobre superficies de vidrio en el laboratorio, se demostró una muy buena correlación entre la apariencia física del exopolisacárido y la cantidad de carbohidrato contenido en el material adherido al vidrio. El uso de colorantes como el rojo de rutenio un colorante que reacciona intensamente con los polisacáridos, hace posible su visualización bajo el microscopio electrónico de transmisión, evidenciando de esta manera que en las biopelículas hay poblaciones densas de células bacterianas envueltas en estas estructuras fibrosas (Gessey y colab. 1977).

Es probable que los exopolisacáridos encontrados en las biopelículas varíen grandemente en su composición y en sus propiedades físicas. Sin embargo ellos no parecen diferir mucho de un gran número de exopolisacáridos obtenidos de especies no formadoras de biopelículas (Sutherland 1977). Estudios de laboratorio usando biopelículas artificiales han probado que solamente un número limitado de componentes microbianos, y uno de los que resultó ser el más común fue una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* productora de alginato. Esto fue quizá la causa del pensamiento errado de que todos los polisacáridos de las biopelículas son iguales. Las principales diferencias entre los alginatos bacterianos y los de las algas residieron en la secuencia de los monosacáridos y en la presencia de grupos O-acetilo en la

estructura. Lo anterior hizo necesario observar a cada especie microbiana y a cada exopolisacárido como entidades distintas y con propiedades únicas, ya sea en el modo de crecimiento planctónico o como biopelícula. Esta idea recibió apoyo de experimentación con la intención de determinar si los exopolisacáridos eran verdaderamente específicos a la biopelícula, y los estudios demostraron que los exopolisacáridos producidos por células en estado planctónico y los producidos en una estructura de biopelícula, fueron destruidos por las mismas endoglucanasas específicas produciendo patrones similares de oligosacáridos (Hughes y colab. 1988). Para apoyar esta idea, en otro experimento se usaron anticuerpos contra los polisacáridos sintetizados por células en estado planctónico para demostrar su interacción con los materiales en la matriz de una biopelícula (Costerton y colab. 1981). Con todo esto quedó aún por demostrar la capacidad de los microorganismos formadores de biopelículas para sintetizar polímeros nuevos solamente en el estado de biopelícula pero esto no ha sido concluido en definitiva. Si embargo se sabe que esta habilidad esta presente en algunos microorganismos como *Escherichia coli* o *Rhizobium meliloti* y que es expresado solamente bajo condiciones fisiológicas específicas (Glazebrook and Walker, 1989; Grant y colab. 1969). La interacción sinérgica entre polisacáridos microbianos ha sido también observada cuando dos cepas de enterobacterias productoras de exopolisacáridos han sido cultivadas para producir una biopelícula mixta, ya sea siguiendo el tratamiento de una de ellas con el exopolisacárido de la otra o su manejo en cultivo mixto, en ambos casos la adhesión de las células bacterianas en la biopelícula fue aumentada (Skillman y colab. ,1997).

Estudios físicos hechos a un buen número de exopolisacáridos demostraron que la gran mayoría de esas macromoléculas pueden existir ya sea en forma ordenada o desordenada siendo esto último favorecido cuando se trató de tratamientos a altas temperaturas o cuando estuvieron en soluciones de muy baja concentración iónica. Por lo tanto, en ambientes naturales esos polímeros debieron ser siempre encontrados de alguna manera con la misma configuración (Sutherland 1990).

A nivel molecular, se ha encontrado que las propiedades físicas de los polisacáridos y por lo tanto de las biopelículas dependen de las interacciones entre sus cadenas, mediadas por las moléculas de agua y las entidades iónicas presentes. Estructuras que además resultaron ser fuertemente influenciadas por la presencia o ausencia de grupos aniónicos libres derivados de los ácidos urónicos, grupos fosfato, piruvato cetales o succinil esterés. Los puentes de hidrógeno que involucraron los grupos hidroxilo expuestos, también resultaron ser muy significativos. Las regiones hidrofóbicas, derivadas ya sea de los grupos O-acetilo o las 6 desoxihexosas tales como la L-rhamnosa o la L-fucosa resultaron tener también gran influencia.

Un polímero muy poco usual resultó ser el glucosaminoglucano de una biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*, en su estructura contiene de un 80 a 85% de residuos N-acetilados, siendo el resto de los residuos no acetilados por lo que con esta estructura se tuvo uno de los pocos exopolisacáridos básicos que puede estar formando parte de una biopelícula, (Mack y colab. 1996).

Muchos de los exopolisacáridos microbianos son altamente solubles en agua o soluciones salinas diluidas, mientras que otras son virtualmente insolubles en agua o forman geles rígidos cuando están en la forma ordenada, y entre ellos hay varios que son comúnmente encontrados en las biopelículas. Estructuralmente, esos polisacáridos presentan un pseudo-esqueleto en el que hay una predominancia de enlaces ya sea 1,3 o 1,4 en ya sea la configuración α - o más comúnmente la β -. Una vez sintetizados, los polisacáridos de este tipo resultaron ser moléculas extremadamente efectivas en el mantenimiento de la estructura de la biopelícula y sus componentes. La composición actual de los polisacáridos microbianos muestra un rango de posibilidades casi infinito. Algunos son simples homopolisacáridos que contienen un solo tipo de enlace, como por ejemplo el glucomutano obtenido de *Streptococcus mutans* que presenta enlaces 1,3, el curdlano de *Agrobacterium radiobacter* y algunas otras especies, o el 1,6- β -glucano conteniendo aminoazúcares obtenido de *Staphylococcus epidermidis*, (Mack y colab. 1996). Los polímeros más complejos pueden estar compuestos de 3 a 5 monosacáridos diferentes y

unidades repetitivas de hexa-, hepta- u octasacáridos. La complejidad se incrementa grandemente con la presencia de grupos acilo en la estructura principal. Un ejemplo de una estructura compleja de polisacárido puede ser observada en el ácido colánico. Este exopolisacárido es secretado por muchas cepas de *Escherichia coli* y también por otras especies entéricas como *Enterobacter cloacae*, la unidad repetitiva de este polímero es un hexasacárido compuesto de 4 azúcares en los cuales tanto los grupos acetilo como los grupo piruvato están presentes, (Lawson y colab. 1996).

2.3. Las biopelículas bacterianas como comunidades multicelulares diferenciadas.

En un principio, algunos especímenes deshidratados de biopelículas bacterianas fueron analizadas por microscopía de barrido y microscopía electrónica de transmisión, pero al examinarles del todo se puso en evidencia que su compleja arquitectura era realmente destruida durante los procesos de secado y el uso de artefactos de fijado. Solamente con el uso de la Microscopía Confocal Láser de Barrido (MCLB) se ha podido observar en vivo y en condiciones de hidratación, el detalle de sus características tridimensionales, poniéndose en evidencia la complejidad y sofisticación de las biopelículas, resumen del gran fenómeno de la plasticidad en la expresión fenotípica de las bacterias. Las bacterias adherentes crecen actualmente en micro colonias de una gran variedad de formas y tamaños en las que ellas se encuentran envueltas en una matriz de material polimérico que significa cerca del 85% del volumen de cada una de esas unidades estructurales en la biopelícula. Las micro colonias están separadas por canales de agua, sobre todo en biopelículas que han alcanzado un cierto grosor, y esos canales acarrear agua y nutrientes a toda la comunidad por flujo conectivo, Figura 1, ((Lewandowski y colab. 1993).

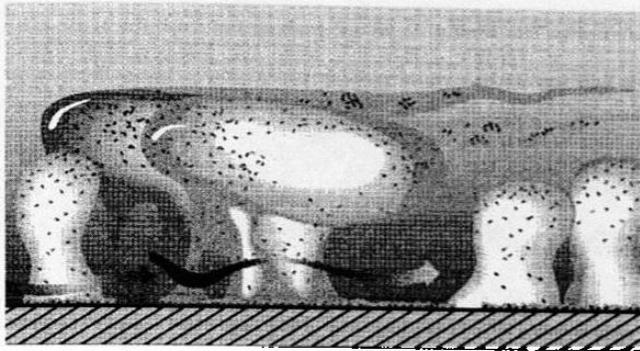


Figura 1.- Representación diafragmática de la estructura de una biopelícula bacteriana basada en el análisis sistemático de imágenes obtenidas con MCLB.

La observación directa de biopelículas vivas, muchas de las cuales han sido hechas por ingenieros de las biopelículas, muestran claramente dos hechos que hasta ahora se sostienen como características de los eucariontes multicelulares. Esos hechos son la formación de tejidos de células acumuladas, primitivos pero estructuralmente organizados y la presencia de un sistema circulatorio primitivo pero funcional.

Siempre cuando las células están inmovilizadas en una masa estructurada, como una microcolonia encerrada en una matriz, las leyes de la física y la química dictan que los microambientes locales de células individuales serán diferentes. Las células periféricas dispondrán de los nutrientes y el oxígeno en una forma más real que las células que se encuentran más profundamente en la biopelícula y el fenotipo de cada célula adherida será dictado por las características especiales de su propio micronicho dentro de la estructura completa, (Costerton y colab. 1994). Los ingenieros de las biopelículas han hecho mediciones directas de algunos parámetros como el oxígeno disuelto y el pH en áreas muy específicas dentro de la biopelícula, y en ello han encontrado asombrosas variaciones, (DeBeer y colab. 1994). La diversidad fisiológica de las células adherentes en una biopelícula, en la que algunas de ellas crecen aeróbicamente, justo décimas de micrón del sitio en el que otras células crecen anaeróbicamente, puede ser interpretado como una forma de especialización celular y anotado como otra característica usualmente atribuida a los eucariontes multicelulares. Con lo anterior, se puede visualizar a las biopelículas como un mosaico de diferentes fenotipos que están funcionalmente integrados en una comunidad multicelular. Es axiomático que la diversidad

fenotípica confiera una medida de sobrevivencia y acondicionamiento saludable a una comunidad, y esto es exactamente lo que pasó cuando la comunidad médica, empezó a atacar las biopelículas patógenas con antibióticos, (Costerton y colab. 1999), pero el fenotipo de agotamiento-sobrevivencia y el fenotipo de la biopelícula es de mucha mas importancia para la ecología microbiana.

Esta avalancha de nuevas percepciones concernientes a los fenotipos bacterianos y su relación con la ecología microbiana, presenta cuestionamientos a los sistemas tradicionales de recuperación y cultivo de las bacterias en el laboratorio y pondera la relevancia de hacer estudios directos de las poblaciones vivas en sus ambientes naturales.

La apariencia, y las funciones comunes de las bacterias en una biopelícula, es lo que hace que sea mejor estudiar poblaciones completas, sin la selección intermediaria y cultivo de los fenotipos raros y las especies raras que crecen sobre la superficie del agar seleccionado o cuando son sacadas de sus hábitat naturales y son depositados en placas de recuperación.

Como en todos los sistemas, en los que un gran error ha sido corregido, podemos adelantarnos a ver un renacimiento de la ecología microbiana, que sobrepasará el estallido fenomenal de actividad en los estudios de fisiología microbiana y la genética bacteriana que emocionó a los microbiólogos del siglo pasado.

2.4. Actividades relativas de las células en suspensión y las que forman parte de una biopelícula.

2.4.1.- Procesos celulares y actividad metabólica

Hay una gran variedad de tipos diferentes de actividades metabólicas asociadas a los microorganismos. Y mientras muchas de ellas, tales como las reacciones de oxido reducción como generadoras de energía o la biosíntesis de proteínas, son comunes a todas las formas de vida, otras se encuentran de una manera mas selectiva solamente en algunas especies particulares, como por ejemplo la metanogénesis, la reducción de sulfatos durante el crecimiento

anaerobio, la oxidación de fuentes inorgánicas de energía metabólica, la asimilación de CO₂ como única fuente de carbono. Sin embargo, cada una de esas actividades tiene significación limitada cuando se consideran en forma aislada. Es la integración de todas las actividades metabólicas y su orquestación dentro de ciertos procesos celulares fundamentales lo que nos da una verdadera medida de la actividad biológica. Esos procesos son:

A.- El crecimiento – con un incremento en biomasa y/o en el número de células.

B.- Mantenimiento – donde el número de células y su viabilidad permanece constante.

C.- Muerte – en el que el número de células viables decrece, con o sin decrementos paralelos en número total de células.

Otros procesos celulares que son menos universales pero que en ciertas circunstancias y con microorganismos particulares pueden ser de importancia mayor, son por ejemplo; la biosíntesis de materiales poliméricos extracelulares y la esporulación. Sin embargo, idealmente cualquier estudio comparativo de células en suspensión o como individuos formando una biopelícula, debe considerar (a) todo el potencial constante de las variables y (b) examinar uno o mas de los procesos celulares fundamentales.

Un hecho especialmente importante de esos procesos es que hay mediciones de actividad celular con referencia directa al ambiente experimental en la que esta realizándose; el crecimiento de una biopelícula no puede ser determinado por remoción de las células de la biopelícula y determinar la extensión o proporción de su crecimiento en otras condiciones particulares. Esto puede ser sin embargo, un importante obstáculo práctico, que debe considerarse en la construcción de sistemas modelo y el diseño experimental. De cualquier manera se hace necesario remover muestras de la biopelícula para hacer determinaciones de número de células, viabilidad, etc. sin perturbar el proceso de las células dentro de la biopelícula misma, o pueden obtenerse datos del sustrato y flujos de productos metabólicos a través del sistema con extrapolaciones para deducir la cinética y estequiometría del proceso en la biopelícula.

Como se indicó arriba, cada uno de los procesos celulares fundamentales esta compuesto en si mismo de muchas reacciones individuales y secuencias metabólicas mas complejas como por ejemplo, el catabolismo del sustrato, la generación de energía al nivel de sustrato, oxidativa o por fosforilación fotosintética. En muchas situaciones puede ser más simple y más directo medir el consumo de nutrientes o la respiración que intentar cuantificar un incremento o decremento en el crecimiento o en el grado de esporulación.

Por la razón de que los procesos celulares están compuestos de muchas reacciones individuales separadas, no es posible analizar cualquier efecto registrado en términos de los mecanismos moleculares sin tener datos directamente relacionados a secuencias de reacciones específicas en lugar de simplemente referir el proceso global. Siendo posible describir los efectos del hábitat en una biopelícula en términos de una o varias mediciones separadas de actividad biológica, se puede contribuir de gran manera al entendimiento de los mecanismos, resultando como consecuencia, el tomar el análisis mas allá del puramente descriptivo.

Por otro lado, las actividades metabólicas tales como el consumo de nutrientes, o la respiración, no están asociadas con cualquiera de los procesos celulares en particular, así que tomándolo como tal, un efecto simulado de la respiración, por ejemplo, no puede ser establecido en referencia al proceso fundamental de crecimiento celular y desarrollo. Una vez mas, ésta se limita al simple establecimiento de observación de los efectos.

Entonces, lo que se requiere para la comparación significativa de las actividades de las células en suspensión o formando una biopelícula son las mediciones *in situ* de los procesos celulares fundamentales, soportados idealmente por los análisis de las actividades metabólicas relevantes para que una interpretación en términos de los mecanismos moleculares involucrados pueda agregarse al análisis estequiométrico y cinético del proceso celular.

Tales análisis de actividad celular, deben asumir el principio básico de que los microorganismos y sus actividades no son fundamentalmente alterados por su adsorción a una superficie o su inclusión en una biopelícula. En donde esto

puede sostenerse como cierto, al menos en una primera aproximación, a las bacterias adheridas en microcolonias o a biopelículas delgadas de una sola especie, y parece ser menos aplicable a biopelículas más complejas que tienden a ser caracterizadas por una flora microbiana mixta, cantidades copiosas de exopolisacárido, inclusiones orgánicas atrapadas y microambientes con regiones anaerobias en particular (Costerton 1987). La naturaleza cualitativa del ambiente, las células y sus actividades, pueden ser modificadas en gran manera cuando el sustrato acumulado en la biopelícula, también sirve como sustrato, suministrando al menos una porción de sus requerimientos nutricionales a los organismos en la biopelícula. Examinando las actividades relativas de las células en suspensión o formando una biopelícula, debemos ser especialmente cuidadosos en no necesariamente establecer comparaciones cara a cara.

Por lo tanto en este punto, debemos examinar la naturaleza de las biopelículas y en particular la forma en la cual sus variadas características podrían influenciar las actividades de los microorganismos que las componen.

2.4.2.- Biopelículas delgadas de una sola especie.

A pesar de que en la naturaleza las biopelículas son generalmente de carácter multiespecie, las biopelículas monoespecie son realmente demostrables y han sido el sujeto de estudio experimental (Characklis 1984). Las velocidades de los procesos celulares y las secuencias de reacciones metabólicas individuales dentro de la biopelícula son susceptibles de ser limitadas por el sustrato como un resultado de una resistencia a la transferencia de masa entre la fase líquida y la biopelícula y la resistencia a la difusión dentro de la biopelícula misma. Estas consideraciones refieren no sólo a las fuentes orgánicas de carbono y energía sino también a los iones inorgánicos, donde ellos pueden actuar tanto como limitantes del crecimiento como aceptores terminales de electrones, incluyendo el oxígeno para las especies aeróbicas.

En un sistema bien mezclado o con fase líquida de flujo turbulento parece no ser importante que la resistencia a la transferencia de masas sea un factor significativo y determinante de la velocidad general del proceso en la biopelícula. Pero esto no puede ser asumido a bajas velocidades de fluido o a bajas concentraciones de nutrientes. Bajo esas condiciones, la ausencia de resistencia a la transferencia de masa debe ser establecida experimentalmente para que se puedan obtener valores reales en el proceso de formación de la biopelícula.

La resistencia a la difusión es influenciada por la concentración de sustrato y el grosor de la biopelícula. Characklis y sus colaboradores (Characklis 1984) han notado que la velocidad en la reducción de sustrato se incrementa en proporción al grosor de la biopelícula hasta un grosor crítico ó activo y que este grosor crítico de la biopelícula se incrementa al incrementar la concentración de sustrato. Es claro que cuando el grosor de la biopelícula es mayor que el grosor crítico o activo y la velocidad de remoción del sustrato se hace constante e independiente del grosor de la biopelícula, la velocidad de remoción del sustrato no puede ser usada para determinar las constantes de velocidad de los procesos celulares fundamentales en la biopelícula.

Las velocidades de difusión a través de la biopelícula han sido estimadas entre un 60 y 100% del valor para una sustancia en el agua pura (Nielsen 1987). Una complicación adicional es que al mismo tiempo en el que el nutriente o componente inorgánico se difunde a través del grosor activo de la biopelícula, éste esta siendo utilizado y reducido en concentración como resultado directo de esas actividades.

En la comunidad de la biopelícula esos efectos alcanzan su punto más dramático con el desarrollo de anaerobiosis dentro de una biopelícula aeróbica, lo cual puede derivar en un efecto de ablandamiento o el crecimiento de especies anaeróbicas tales como las bacterias sulfato reductoras.

Con biopelículas monoespecie de *Pseudomonas aeruginosa* en un reactor de mezcla homogénea, el grosor de la biopelícula no excede los 50 μm y la resistencia a la difusión no resultó significativa (Bakke y colab. 1984). Sin

embargo esto no puede ser asumido para otras biopelículas naturales y como con la resistencia a la transferencia de masas, es de gran importancia que las características de resistencia a la difusión sean determinadas experimentalmente para cada sistema individual.

2.5. Los sistemas de regulación biológica en relación a los proceso de formación de biopelículas.

En solamente dos décadas hemos aprendido que las biopelículas comprenden comunidades encerradas en una matriz altamente estructurada (Costerton y Stewart 2001) cuyas células expresan genes en un patrón que difiere profundamente de sus contrapartes en suspensión (planctónicas) (Sauer y colab 2002). De lo anterior se ha derivado el conocimiento de que el proceso inicial de formación de las biopelículas puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la redistribución de las células adheridas por movilidad sobre la superficie (Dalton y colab. 1996) , Un segundo mecanismo resulta de la división binaria de las células adheridas (Heidorn y Colab. 2000). Y el tercero en un mecanismo de agregación de las células del líquido sobrenadante para su posterior conformación como una biopelícula (Tolker-Nielson y colab. 2000). Las biopelículas pueden tomar alrededor de 10 días para alcanzar su madurez estructural, basado en dimensiones físicas medidas microscópicamente y comparación visual (Heidorn y Colab. 2000). Por esta razón debemos ser cuidadosos de no malinterpretar retrasos en los eventos iniciales de adhesión de la biopelícula, lo cual es causado por un tipo de "aletargamiento" en los genes, que resulta en la supresión del desarrollo de la biopelícula.

En referencia a la diferenciación en las biopelículas, Nivens y colaboradores reportaron en 2001, que las cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* producen colonias estructuralmente mas diferenciadas que las cepas no mucoides y mas específicamente que también se requirió de la O-acetilación del alginato (el principal componente del exopolisacárido de las cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa*).

Hentzer y colaboradores encontraron en 2001 que se puede inducir la complejidad estructural en las biopelículas planas formadas por cepas no mucoides del tipo silvestre de *Pseudomonas aeruginosa* mediante una sobreexpresión de los genes que codifican para la producción de alginato. Esas biopelículas sobreproductoras de alginato formaron aglomerados de células con formas de hongo o de globo, separados por canales de agua similares a aquellos formados por las cepas del tipo salvaje mucoides (Nivens 2001).

La conexión entre la formación de exopolisacáridos y la estructura diferenciada en la biopelícula fue también documentada en otros trabajos (Danese y colab. 2000, Watnick y colab. 2001), en los que se reporta que el ácido colánico y el exopolisacárido son requeridos para el desarrollo de estructuras complejas en biopelículas de *Escherichia coli* K-12 y en las de *Vibrio cholerae* 0319 respectivamente.. Estos estudios también mostraron que el rompimiento del exopolisacárido no solo resultó en una menor complejidad estructural, sino que también la confiere mayor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, mientras que la sobreproducción de exopolisacárido tiene un efecto opuesto.

Staphylococcus aureus, un patógeno común asociado a infecciones hospitalarias, ha sido reportado como un ganador de resistencia a los agentes antimicrobianos a través de la formación de biopelículas y esta capacidad ha sido relacionada a la producción de una toxina llamada alfa-toxina, codificada en el gene *hla* y que es requerida para la interacción célula - célula durante la formación de la biopelícula (Caiazza y O'Toole ,2003).

Estudios mas detallados acerca de los fenómenos de regulación que impactan en la formación de las biopelículas y sus estructuras diferenciadas, han sido recientemente descritos por George A. O'toole en mayo de 2003.

2.6. Herramientas para el estudio de las biopelículas.

El gran impacto de las biopelículas en el entorno económico y en la salud pública ha promovido en gran manera la actividad de los fisiólogos microbianos y los ingenieros de las biopelículas. Una serie de dispositivos en los que las

biopelículas pueden ser observadas en vivo han sido reportados en la literatura, el más reciente, reportado por Finelli y sus colaboradores, refiere a un nuevo dispositivo para la disección exhaustiva de las biopelículas e identificar los genes involucrados en el desarrollo de la misma por *Pseudomonas aeruginosa* (Finelli y colab. 2003).

Dispositivos en forma de disco hechos del material de los catéteres han sido usados para el estudio in vitro del desarrollo de biopelículas de hongos (Hawser y Douglas 1994) entre ello la capacidad de *Candida albicans* para formar biopelículas sobre un amplio rango de superficies abióticas como el latex, el PVC (poli vinil cloruro) y el elastómero de silicón.

Hentzer y colaboradores en 2001, describen un reactor para la producción continua de biopelículas en un estudio para analizar el como la sobreproducción de alginato afecta la forma y estructura de las mismas.

Este tipo de experimentos en los que se describen pruebas de adherencia a implementos de laboratorio, han sido utilizados para discriminar cepas de *Salmonella enteritidis* con diferente nivel de virulencia (Solano y colab. 1998).

2.7. Los microorganismos formadores de biopelículas como contaminantes de los alimentos y de las áreas de su procesamiento industrial.

La formación de biopelículas causa problemas en muchas áreas tales como los sistemas de agua industrial (Flemming 1991, Mittleman 1991, Block 1992), en medicina (Costerton y colab. 1981 y 1987, Marrie y Costerton 1982 y 1983) y en la industria procesadora de alimentos (Pontefract 1991, Holah y colab. 1988, Holah y Kearney 1992, Mattila-Sandholm y Wirtanen 1992, Carpentier y Cerf 1993, Zottola y Sasahara 1994, Wong y Cerf 1995). La industria del papel ha peleado por años contra los limos y biopelículas (Mentu 1996). La formación de biopelículas ha tenido implicaciones positivas y negativas para los procesos relacionados con la producción de alimentos (Wong y Cerf 1995). Las biopelículas han sido usados de manera efectiva en el tratamiento de aguas residuales (Janning y Harremoës 1995) y en la industria de alimentos, como por

ejemplo en la producción de vinagre (Zottola y Sasahara 1994) y en la producción de cerveza (Kronlöf 1994).

Pero la industria de alimentos es aún más susceptible que las otras de ser afectada por las biopelículas en sentido negativo, por que en muchas sus instalaciones se proporcionan los materiales nutritivos adecuados para favorecer la reproducción y en consecuencia, los microorganismos formadores de biopelículas suelen provocar problemas para la mayoría de los alimentos procesados.

En la industria azucarera y derivados azucarados, especies como *Leuconostoc* y *Bacillus* provocan los principales problemas en las mieles, concentrados de frutas, dulces y jarabes. Su origen es la materia prima y su destrucción esta basada en la alta presión osmótica generada en los derivados azucarados, sin embargo algunos microorganismos osmófilos pueden sobrevivir en tales condiciones, (Hucker y Pederson 1942).

En la industria de los vegetales también se encuentran microorganismos que causan estos problemas, principalmente en vegetales apilados y húmedos, (Tomkins 1951).

En los productos cárnicos se pueden presentar biopelículas superficiales que pueden ser causadas por el crecimiento de algunas especies de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Micrococcus*. Algunas especies de *Bacillus* pueden también producirlas. La temperatura y la humedad disponible influyen el tipo de microorganismos que proliferan: a temperaturas de congelación y alta humedad se favorece el crecimiento de *Alcaligenes* y *Pseudomonas*. En ambientes menos húmedos se podrán encontrar *Micrococcus* y levaduras y con aún menos humedad, algunos hongos podrán desarrollarse. Se requiere un número muy alto de contaminantes por centímetro cuadrado para que la apariencia y/o el olor a descomposición pueda ser detectados, (Evans y Niven 1955).

Las especies *Alcaligenes* y *Micrococcus* pueden también ser detectados como problema en los productos cárnicos de origen avícola.

En algunos productos de carácter ácido como el sauerkraut (coles ácidas) algunas variedades encapsuladas de *Lactobacillus plantarum* pueden formar biopelículas o dar al producto un carácter viscoso o baboso.

La corrosión microbiana es también un hecho importante a considerar en estos equipos, ya sea con la formación o no de biopelículas (Marshall y Blainey 1991, Chamberlain 1992, Videla y Characklis 1992, Morton and Surman 1994,).

La desinfección después de la remoción de las biopelículas usando los procedimientos de limpieza adecuados es indispensable en las plantas de alimentos, donde las superficies húmedas proveen condiciones favorables para el crecimiento de los microbios (Mosteller y Bishop 1993). En la práctica, las biopelículas residuales que quedan en las superficies limpiadas inadecuadamente son una barrera entre los microbios y los desinfectantes, antibióticos ó biocida usados en su contra (Kinniment y Wimpenny 1990, Nickols 1989, 1991, Wirtanen 1995). El efecto de muchos de los antibióticos se basa en la inhibición del crecimiento activo. Se ha dicho que muchas de las bacterias en las biopelículas no están creciendo activamente y que por lo tanto su resistencia está alterada. La resistencia de los microbios en una biopelícula no puede ser probada sin controlar su velocidad de crecimiento (Gilbert y colab. 1990). La barrera en la permeabilidad de la biopelícula afecta considerablemente la eficiencia de esos agentes (Nickols 1991). Las células bacterianas creciendo en hidrogeles pueden ser usadas para estudiar los efectos de los desinfectantes sobre las bacterias contaminadoras de alimentos así como en los patógenos.

En la industria de alimentos, el diseño del equipo juega un rol muy importante en el combate a las biopelículas (Christy y Moo-Young 1994, Holah y Timperley 1999). El sistema debe ser diseñado sin bordes, cavidades o espacios muertos. Debe ser limpiado con frecuencia para evitar la acumulación de la biopelícula. La elección de los materiales y el tratamiento de las superficies, como por ejemplo el lijado y pulido, son factores importantes en la inhibición de la formación de las biopelículas y en la promoción de la limpieza de las superficies. Los tratamientos para el rechazo de las biopelículas usados

en los materiales en las superficies actúan para remover o retardar pasivamente la recurrencia de la biopelícula. La limpieza de las superficies, la capacitación del personal y las buenas prácticas de diseño y manufactura son las herramientas más importantes para el combate a los problemas de las biopelículas en la industria de alimentos.

Además de causar problemas de limpieza e higiene (Hood y Zottola 1995), las biopelículas pueden causar pérdidas de energía y atascamientos en los tubos de condensación, los sistemas de enfriamiento, los circuitos de agua y agua residual, y los intercambiadores de calor (Characklis 1991, Wirtanen 1995). Las biopelículas pueden también causar riesgos a la salud debido al desprendimiento de patógenos en los sistemas de distribución del agua potable. Las biopelículas pueden también entrar en el sistema de producción en una planta procesadora de alimentos y provocar problemas en la eficiencia de los intercambiadores iónicos ó en la filtración con membranas (Wittaker y colab. 1984, Muchetti 1995). En los sistemas de suministro de agua en el procesado de alimentos, las biopelículas causan problemas en las columnas de carbón activado granulado, las membranas de ósmosis inversa, los sistemas de intercambio iónico, los degasificadores, los tanques de almacenaje de agua y los filtros de membranas microporosas (Mittleman 1991). Se ha encontrado también que hay una relación directa entre el nivel bacteriano en el agua purificada usada y los defectos de funcionamiento encontrados en los implementos microelectrónicos.

La conductividad, la electro migración y la corrosión en las capas de óxido han sido observados en implementos electrónicos fabricados con agua insuficientemente purificada (Mittleman 1991). La acumulación de biopelículas con poblaciones mixtas en las que se incluyen las bacterias sulfato reductoras, causan corrosión en los sistemas de agua industrial. Los mecanismos que contribuyen a la degradación del acero al carbón indican la cooparticipación de procesos químicos y biológicos Marshall y Blainey 1991, Videla y Characklis, 1992). La corrosión relacionada con las bacterias sulfato reductoras esta invariablemente relacionada a la formación de biopelículas sobre la superficie

del metal, como por ejemplo los sistemas cerrados de agua en las fábricas de papel (Lee y colab. 1995).

Las industrias de alimentos en las que se han hecho estudios sobre la formación de biopelículas producen alimentos enlatados, productos cárnicos, panes, pizzas, tortas de pescado, queso, productos lácteos, cerveza, sazonadores y vegetales picados y ensaladas (Notermans y colab. 1991, Wirtanen 1995). Como se puede ver, hay una gran lista de problemas generados por las biopelículas que pueden estar en cualquier parte en los procesos de producción de alimentos si el diseño del equipo y su mantenimiento son impropios.

Los residuos de alimento que como derrames pueden contaminar los fluidos en las diferentes áreas, mezclados con los productos químicos comúnmente usados como lubricantes, detergentes o aditivos, pueden resultar en una solución compuesta de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, compuestos nitrogenados no orgánicos, hidrocarburos, etc., cocktail que resulta bastante rico en nutrientes para favorecer el crecimiento de microorganismos.

La temperatura, pH y la concentración de los productos químicos son siempre parámetros controlados en estos procesos, por ejemplo, la operación de un pasteurizador tradicional de túnel, se realiza a temperaturas que van de 25 a 65 °C, una temperatura medianamente alta que puede ser tolerada por muchos de los microorganismos comunes del aire o del agua. La operación de los transportadores se hace a temperatura ambiente y en condiciones aeróbicas plenas, la condición adecuada para muchos de los microorganismos antes mencionados.

La insuficiente adición de compuestos antimicrobianos al mencionado cocktail puede promover el desarrollo de algunos tipos de resistencia o la selección de aquellos que la tienen en forma natural. Por otro lado, los agentes tenso activos y los dispersantes regularmente presentes en los aditivos, detergentes y lubricantes, pueden hacer que los nutrientes estén mas disponibles para las células microbianas. En suma, los factores mencionados más una superficie sólida pueden conducir al establecimiento de “ecosistemas” en los que se ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de biopelículas.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de la biopelícula.

La cepa microbiana original fue obtenida de una biopelícula natural que aparece consistentemente en las cadenas de los transportadores en una planta de procesadora de refrescos instalada en el sureste de México, área geográfica de ambientes húmedos y cálidos. Las muestras de biopelícula fueron tomadas de la parte inferior de la cadena (charolas) mediante el uso de pinzas de disección estériles y vaciadas en condiciones de asepsia en frascos estériles. Los frascos cerrados fueron transportados por avión en recipientes con hielo hasta nuestro laboratorio en la ciudad de Monterrey, Nuevo León. El tiempo de traslado fue de 5 - 6 horas.

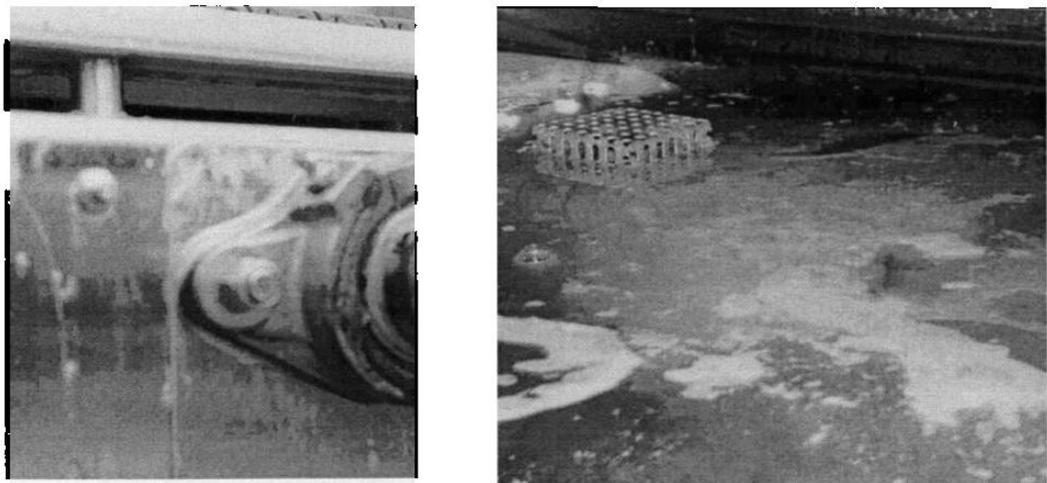


Figura 2. Aspecto de la biopelícula en su ambiente natural, sobre las cadenas de un transportador y derramada en el piso del área de empaque.

3.2 Aislamiento y selección de la cepa en mayor proporción en la biopelícula.

Las muestras de biopelícula fueron mezcladas con agua fría y tratadas por disrupción mecánica hasta obtener una suspensión de células homogénea evitando que la temperatura de la mezcla no subiera por encima de los 10° Celsius (°C). De la suspensión resultante se hicieron diluciones con solución salina a una dilución suficiente para que al sembrar sobre superficie en agar nutritivo (Merck), se pudieran obtener colonias aisladas. Las placas sembradas se incubaron a 35°C por 24-48 horas y de las placas mostrando colonias aisladas en una cantidad de 25 a 30 colonias por placa, se hizo un análisis de las características microscópicas de las mismas, considerando una de apariencia viscosa como la más valiosa.

3.3. Identificación de la cepa seleccionada.

El microorganismo seleccionada, de color crema, con bordes redondeados, elevadas y con apariencia viscosa, fue entonces cultivado en tubos de rosca de 18x150 ml conteniendo caldo nutritivo (Merck) estéril, durante 18 horas para luego ser observado en el microscopio y conocer sus características microscópicas. Al asegurar la homogeneidad en las características microscópicas de la colonia seleccionada, se procedió a realizar pruebas bioquímicas de acuerdo a lo descrito en el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Buchanan y Gibbons 1994).

3.4. Conservación de la cepa.

El microorganismo de colonias viscosas seleccionada al azar y de corroborada identidad, fue mezclado en un tubo de 20X200 ml conteniendo caldo nutritivo estéril (proceso para asegurar la participación de todos los fenotipos resultantes del genotipo original). De este tubo se sembraron por estrias 20 tubos con tapón de rosca de 18x150 ml conteniendo agar nutritivo

inclinado, se incubaron por 72 horas a 35 °C y posteriormente fueron almacenadas en el refrigerador. De estos tubos se tomarán muestras para obtener los pies de cultivo para los experimentos.

3.5. Medios de cultivo experimentales.

3.5.1. Medio base, MPEPS (Medio Producción de Exopolisacáridos).

Para simular las condiciones naturales de nutrición en las que se da la formación de la biopelícula, se formuló el medio de cultivo MPEPS descrito a continuación.

De la misma manera, este medio resultó útil para la evaluación del efecto de variaciones en algunos parámetros asociados a la producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae*.

Tabla I.- Medio de Cultivo MPEPS General.

Componente	Concentración
Parte I	
Ingrediente A	25 gramos/ litro en el medio final.
Parte II	
Combinaciones de fosfatos disueltos en 0.2 litros de agua destilada usados para ajustar el pH de los experimentos	pH5 (KH ₂ PO ₄ = 2 g) pH7 (KH ₂ PO ₄ = 0.46 g + K ₂ HPO ₄ =1.55 g) pH9 (KH ₂ PO ₄ = 0.076 g + K ₂ HPO ₄ =2.0 g)
Parte III	
Extracto de levadura	1.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.2 g
Cloruro de calcio	0.1g
Agua destilada	0.3 litros
Parte IV	
Ingrediente B	3 ml
Agua destilada	0.197

Ingrediente A: Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa o Xilosa.

Ingrediente B: Mezcla de Ácidos Grasos.

Las partes completas y por separado fueron esterilizadas en el autoclave a 121°C durante 15 minutos, posteriormente enfriadas a temperatura ambiente y almacenadas en el refrigerador para ser mezcladas y aforada la mezcla a 1 litro en condiciones de asepsia inmediatamente antes del experimento.

La sal de calcio fue retirada de la parte III para la realización de los experimentos en su ausencia.

Primero se realizaron experimentos en los que se probaron los diferentes carbohidratos, y la concentración las sales de fosfatos fueron en las siguientes proporciones el $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.8 \text{ g/l}$ y el $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0.2 \text{ g/l}$, en esta prueba solo se quería ver el efecto de cada uno de los carbohidratos sobre el crecimiento y producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae*, ver Tabla I.

3.6. Preparación del inóculo.

De los tubos con agar inclinado se tomaron muestras al azar para ser transferidas a tubos de ensayo de 18x 150 ml conteniendo 15 ml de caldo nutritivo y después ser incubados a 35 ° C durante 24 horas. De los cultivos anteriores se transfirieron 10 ml a un matraz de Erlenmeyer de 250 ml. Conteniendo 100 ml del medio MPEPS estéril. En esta etapa se involucraron series de matraces conteniendo como fuente de carbono en forma individual los carbohidratos y demás componentes descritos en la tabla 1, para observar el efecto de los factores ambientales y nutricionales sobre la acumulación de los exopolisacáridos.

3.7. Cultivos experimentales.

3.7.1. Nivel matríz.

Los cultivos experimentales se realizaron por triplicado bajo las siguientes condiciones.

Se usaron matraces de 250 ml conteniendo 150 ml del medio MPEPS. Todos los experimentos de corrieron a 35°C, agitados en un Orbit Environmental

Shaker ajustado a 200 rpm. El tiempo de incubación fue de 24 horas. La toma de muestras para análisis se realizó al azar a tiempos 0,3,6,9 y 24 horas, en forma aleatoria y sin reemplazo. Las muestras fueron definidas como un matraz para cada tiempo de muestreo por condición experimental. Los matraces retirados fueron utilizados para la ejecución de procesos analíticos.

3. 8. Métodos Analíticos

3.8.1.Crecimiento de los microorganismos.

En los experimentos para corroborar el crecimiento de la biomasa en un medio líquido sin materiales sólidos, se hicieron mediciones de la densidad óptica a 600 nm, usando un espectrofotómetro visible

3.8.2. Determinación de la acumulación de exopolisacáridos

Para cuantificar la cantidad de exopolisacáridos producidos durante el proceso de fermentación, se hizo un centrifugado de las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos para separar las células del medio y del sobrenadante se hicieron las determinaciones siguientes: se usó el método del Fenol-Acido Sulfúrico para carbohidratos totales (Dubois y colab. 1956). Y para cuantificar el consumo de azúcares a lo largo de la fermentación, se usó el método del ácido 3,5 dinitro salicílico para azúcares reductores (Miller 1959). Mediante la expresión de los valores obtenidos en ambos procedimientos en moles de carbono/litro, la diferencia entre ellos mostró de manera relativa la proporción de exopolisacárido acumulada en cada experimento.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1. Aislamiento, selección e identificación del microorganismo.

El proceso de búsqueda, aislamiento y selección aplicado a la comunidad microbiana presente en la biopelícula natural, mostró la presencia de varias cepas, pero eligiéndose una de ellas, y que de acuerdo a sus características, coincidió con las descritas en el manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Buchanan y colab. 1994) para *Enterobacter cloacae*. Las características Microscópicas se describen en la Tabla II. En su apariencia Macroscópica, este microorganismo muestra colonias de bordes redondeados, de elevación convexa, de color amarillo claro, translúcidas y de aspecto viscoso, Figura 3. En incubaciones prolongadas a temperatura de 35°C, no se observan deformaciones que indiquen segregación, las colonias mantienen sus características originales hasta por 45 días,.

TABLA II.- PERFIL BIOQUÍMICO Y FISIOLÓGICO DE LA CEPA SELECCIONADA

PRODUCCIÓN DE INDOL	-
PRODUCCIÓN DE H ₂ S	-
MOVILIDAD	+
CRECIMIENTO EN CITRATO	+
VOGES-PROSKAUER	+
ROJO DE METILO	-
LACTOSA FERMENTACIÓN	+
GLUCOSA FERMENTACIÓN	+
SACAROSA FERMENTACIÓN	+
PRODUCCIÓN DE CO ₂	+
ALANINA-DESHIDROGENASA.	-
ARGININA-DESCARBOXILASA	+
ORNITINA-DESCARBOXILASA	+

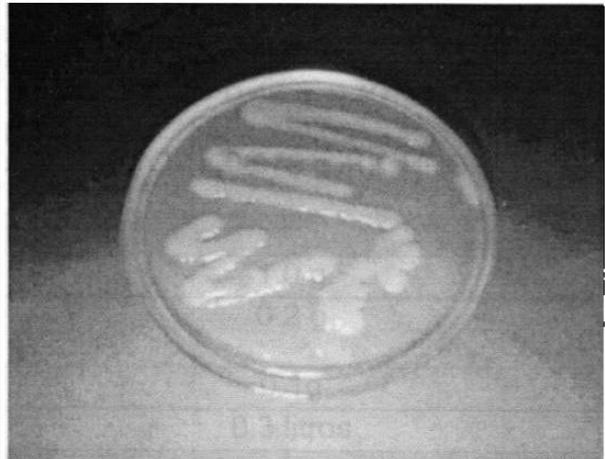


Figura 3.- Aspecto macroscópico de las colonias de *Enterobacter cloacae* creciendo en agar nutritivo por 24 horas a 35°C.

4.2.- Medio de cultivo formulado para la realización de los experimentos.

El medio de cultivo que se describe en la Tabla III es el resultado del análisis de los factores nutricionales que se disponían en el nicho natural del microorganismo y las reproduce en su mayor parte cuando se le trabaja conteniendo glucosa como fuente de carbono, sin adición de calcio y el pH ajustado a 9. *Enterobacter cloacae* presenta niveles adecuados de crecimiento por lo que permite el análisis de las variables involucradas en el diseño experimental, como lo son: variaciones en el pH, variaciones en las bases de la composición de nutrientes básicos.

De la misma manera, este medio resultó útil para la evaluación del efecto de variaciones en algunos parámetros asociados a la producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae*.

Tabla III.- Medio de Cultivo MPEPS

Componente	Concentración
Parte I	
Ingrediente A	25 gramos/ litro en el medio final.
Parte II	
Combinaciones de fosfatos disueltos en 0.2 litros de agua destilada usados para ajustar el pH de los experimentos	pH5 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 2 \text{ g}$) pH7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.46 \text{ g} + \text{K}_2\text{HPO}_4 = 1.55 \text{ g}$) pH9 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.076 \text{ g} + \text{K}_2\text{HPO}_4 = 2.0 \text{ g}$)
Parte III	
Extracto de levadura	1.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.2 g
Cloruro de calcio	0.1g
Agua destilada	0.3 litros
Parte IV	
Ingrediente B	3 ml
Agua destilada	0.197

Ingrediente A: Glucosa y Maltosa.

Ingrediente B: Mezcla de Ácidos Grasos.

4.3.- Efecto de la presencia de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento *Enterobacter cloacae*.

Los resultados obtenidos para esta condición se muestran en la Figura 4, y observamos que las velocidades de crecimiento durante las primeras horas son muy similares para los carbohidratos del tipo hexosa, pero para los de tipo pentosa como la xilosa la velocidad es mucho menor, en base a esto se tomo la decisión de utilizar glucosa y maltosa, para continuar con el experimento pero a diferentes valores de pH y con la presencia y/o ausencia de calcio.

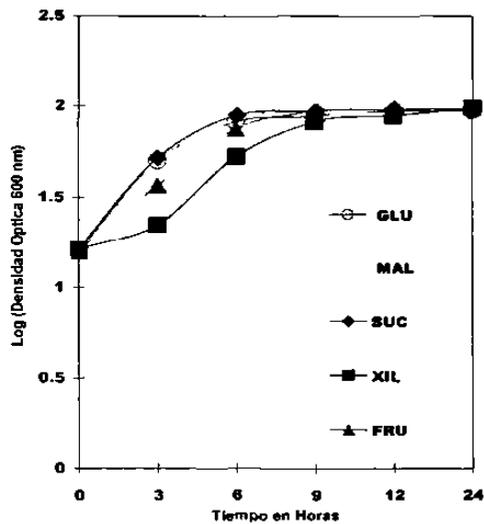


Figura 4 .- Curvas de crecimiento de *Enterobacter cloacae* utilizando diferentes carbohidratos como fuente de carbono.

En la Figura 5 podemos observar visualmente el aspecto y la cantidad del exopolisacarido producido por *Enterobacter cloacae*, utilizando los diferentes carbohidratos.

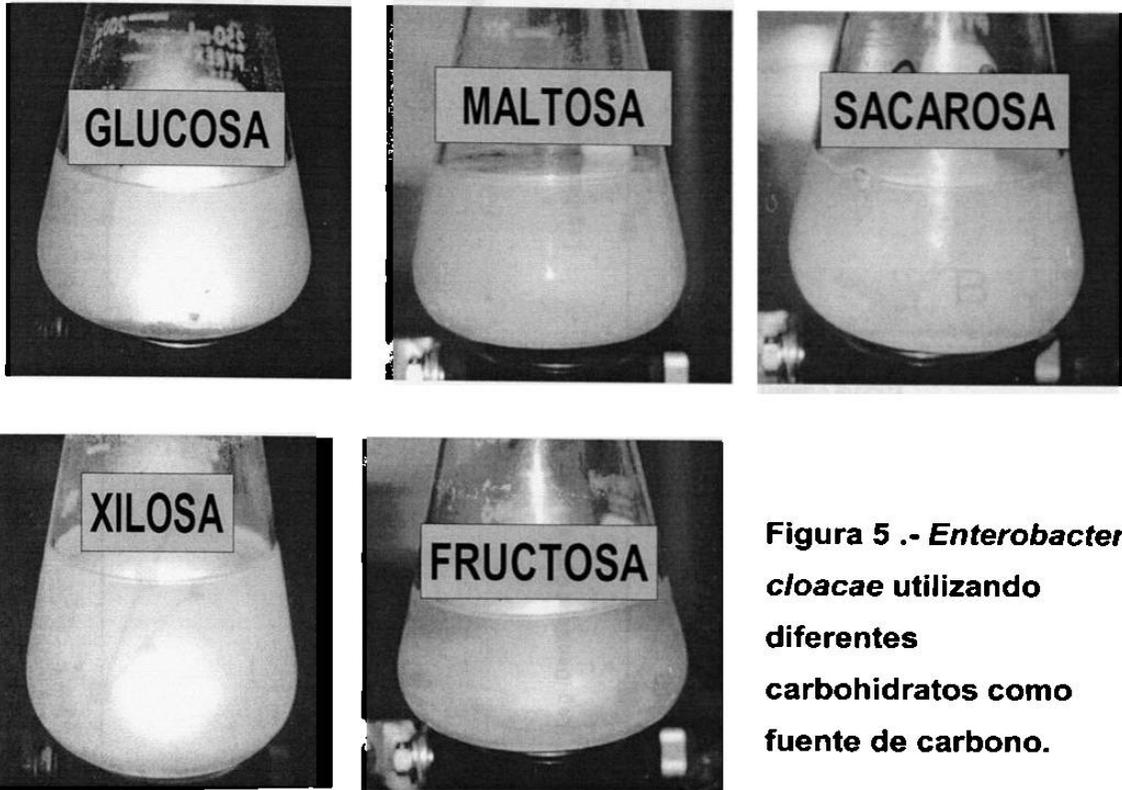


Figura 5 .- *Enterobacter cloacae* utilizando diferentes carbohidratos como fuente de carbono.

4.4.- Efecto del pH y la presencia o ausencia de calcio sobre el crecimiento de *Enterobacter cloacae* con glucosa o maltosa como fuentes de carbono.

Los resultados obtenidos para esta condición experimental se muestran en la Figura 6, en la que se puede observar claramente el efecto de la presencia de calcio cuando las gráficas A y B son comparadas con las gráficas C y D.

Las velocidades máximas de crecimiento con los experimentos en presencia de calcio se observaron dentro de las primeras tres horas de incubación cuando los pH fueron ajustados a 7 y 9, mientras que las velocidades de

crecimiento mas altas obtenidas en ausencia de calcio a los mismos valores de pH se observaron a lo largo de un período de seis horas (Tabla IV).

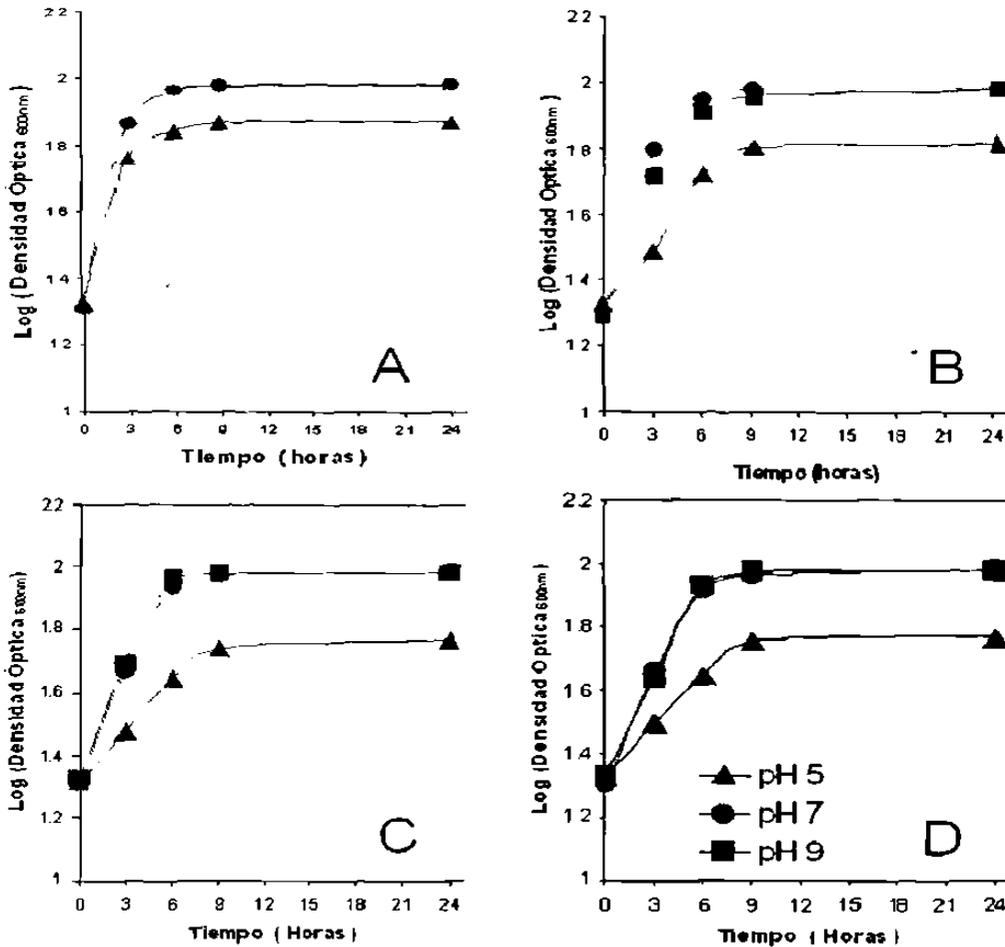


Figura 6.- Efecto del pH, La fuente de carbono y la presencia o ausencia de calcio sobre la velocidad de crecimiento de *Enterobacter cloacae*.

A: glucosa + calcio, B: maltosa + calcio, C: glucosa sin calcio, D: maltosa sin calcio.
(Los valores en la tabla son logaritmos del promedio aritmético de tres resultados experimentales)

A pH 5, se observaron valores mayores de velocidad máxima de crecimiento para glucosa en presencia de calcio que las observadas para maltosa en la misma condición. La máxima velocidad de crecimiento para glucosa en presencia calcio fue observada a lo largo de las primeras tres horas de incubación, mientras que en el caso de maltosa la velocidad máxima fue mantenida a lo largo de seis horas. En los experimentos realizados en ausencia

de calcio no se observaron diferencias importantes entre los resultados obtenidos para cada uno de los carbohidratos, las velocidades mas altas se observaron en un período de seis horas (Tabla IV).

La biomasa final obtenida después de 24 horas de experimentación (expresada como densidad óptica) presentó resultados iguales para los pH de 7 y 9 independientemente de las otras variables involucradas.

En el caso de los experimentos realizados a pH 5 y en presencia de calcio, cantidades ligeramente menores de biomasa se produjeron cuando maltosa fue agregada al medio de cultivo mientras que en ausencia de calcio, con ambos carbohidratos se acumuló una cantidad significativamente menor.

Tabla IV.- Efecto del pH sobre las velocidades de crecimiento mostradas por *Enterobacter cloacae* en diferentes condiciones de cultivo.

[Log DO2-LogDO1/0.301]/tiempo

CARBOHIDRATO	PERIODO (Horas)	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Número de Divisiones por Hora					
		Con Calcio			Sin Calcio		
		pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
GLUCOSA	0 - 3	0.499	0.616	0.616	0.189	0.417	0.417
	3 - 6	0.092	0.109	0.109	0.181	0.302	0.303
	6 - 9	0.033	0.014	0.014	0.109	0.055	0.052
MALTOSA	0 - 3	0.200	0.542	0.452	0.189	0.410	0.412
	3 - 6	0.391	0.165	0.215	0.181	0.301	0.302
	6 - 9	0.096	0.033	0.052	0.109	0.053	0.055

4.5.-Efecto del pH sobre la velocidad de consumo de glucosa o maltosa por *Enterobacter cloacae* creciendo en presencia o ausencia de calcio.

Las velocidades de consumo de carbohidratos por *Enterobacter cloacae* determinadas experimentalmente se muestran en la Figura 7, en ella puede observarse que no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos en presencia o ausencia de calcio. Las más altas velocidades de consumo para

ambos azúcares y a cualquiera de los pH ensayados, se observaron en el período entre la primera y la tercera hora de experimentación, el mismo período en el que se observaron las mayores velocidades de crecimiento.

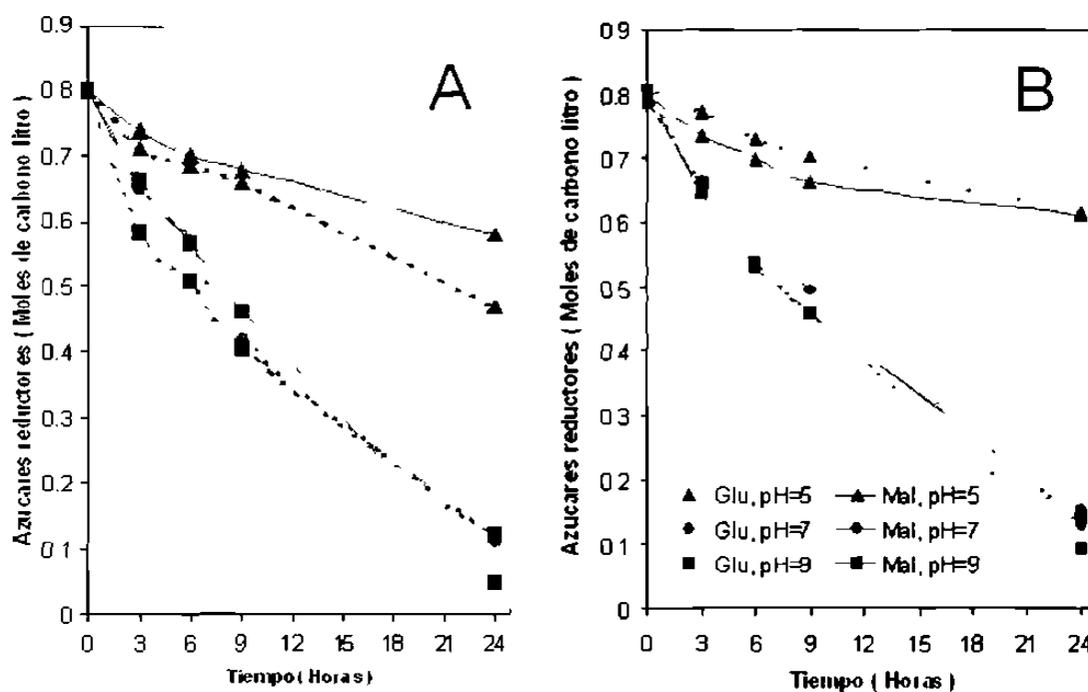


Figura 7.- Efecto del pH y el calcio sobre la velocidad de consumo de glucosa (Glu) y maltosa (Mal) por *Enterobacter cloacae*: (A) calcio, (B) sin calcio.

Las graficas A y B de la figura 7 muestran que la velocidad de consumo de azúcares no fue reducida al tiempo en que las fases estacionarias máximas de crecimiento fueron alcanzadas (Ver figura 6), La Tabla V resume los cambios en las velocidades de consumo de carbohidratos observadas con los diferentes pH y a diferentes tiempos de cultivo.

Tabla V .- Efecto del pH sobre la velocidad de consumo de carbohidratos por *Enterobacter cloacae*, calculada a diferentes tiempos durante los experimentos de crecimiento.

pH	Velocidad de consumo (Moles de carbono /litro /Hora).					
	Con Ca (II)			sin Ca (II)		
	0-3 Horas	3-6 Horas	6-24 Horas	0-3 Horas	3-6 Horas	6-24 Horas
9	0.053	0.028	0.028	0.050	0.022	0.022
7	0.053	0.028	0.028	0.050	0.022	0.022
5	0.032	0.032	0.010	0.013	0.013	0.005

Para los experimentos iniciados a pH 7 y 9 y en presencia de calcio, las velocidades de consumo de azúcares inicialmente observadas, calculadas en 0.053 moles de carbono/ litro/ hora, se mantuvieron a lo largo de las primeras tres horas de ensayo, disminuyéndose luego a 0.028 moles de carbono/ litro/ hora. por las horas restantes del experimento (de las 3 a las 24 horas), lo cual representa la mitad del valor inicial. En ausencia de calcio, la velocidad de consumo de carbohidratos en el período de las 3 a las 24 horas, fue registrada como 0.022 moles de carbono/ litro/ hora, valor ligeramente menor al reportado con calcio.

En los experimentos a pH 5, las velocidades iniciales de consumo en presencia o ausencia de calcio resultaron significativamente diferentes. En presencia de calcio, se observó un consumo de 0.032 moles de carbono/ litro/ hora durante las primeras seis horas del experimento, pero luego esta velocidad fue disminuida a un valor calculado como promedio en 0.010 moles de carbono/ litro/ hora. En este período se observó una diferencia en velocidades de consumo entre ambos carbohidratos, siendo mayor la disminución para maltosa que para glucosa. En ausencia de calcio, las velocidades de consumo de carbohidratos se mantuvieron constantes hasta la sexta hora del experimento. La velocidad inicial registrada para este período fue de 0.013 moles de

carbono/ litro/ hora, y como en presencia de calcio, aquí también se presentó una segunda etapa en la que la velocidad de consumo es disminuida, registrándose para este caso una velocidad de consumo de 0.005 moles de carbono/ litro/ hora, velocidad que resultó ser igual para ambos carbohidratos y hasta las 24 horas de incubación.

4.6.- Efecto del pH sobre la acumulación de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae* creciendo en glucosa o maltosa y con o sin la presencia de calcio.

Estos experimentos mostraron un patrón de comportamiento similar con relación a los pH de inicio de los experimentos, La máxima acumulación de exopolisacárido se registró en los experimentos realizados a pH 9, seguidos por la acumulación a pH 5 y posteriormente por el de pH 7, aunque en el período comprendido entre las 3 y las nueve horas de ensayo muestra diferencias importantes. En la figura 8 puede observarse que para los experimentos realizados a pH 7 en ausencia de calcio, la acumulación del exopolisacárido se continuó después de que la fase estacionaria de crecimiento se había establecido y hasta las 24 horas de incubación (Figura 7 C y D), mientras que en presencia de calcio, la acumulación del exopolisacárido se detuvo al alcanzarse esta etapa de crecimiento, incluso es posible observar que se dio un retraso de tres horas en el inicio de la producción del exopolisacárido en el caso de maltosa a este mismo pH (Figura 7 A y B).

En la figura 8 puede observarse también que con ambos carbohidratos experimentados en presencia de calcio y a pH 9 y 5, la cantidad de exopolisacárido acumulada fue más pequeña que la acumulada en su ausencia.

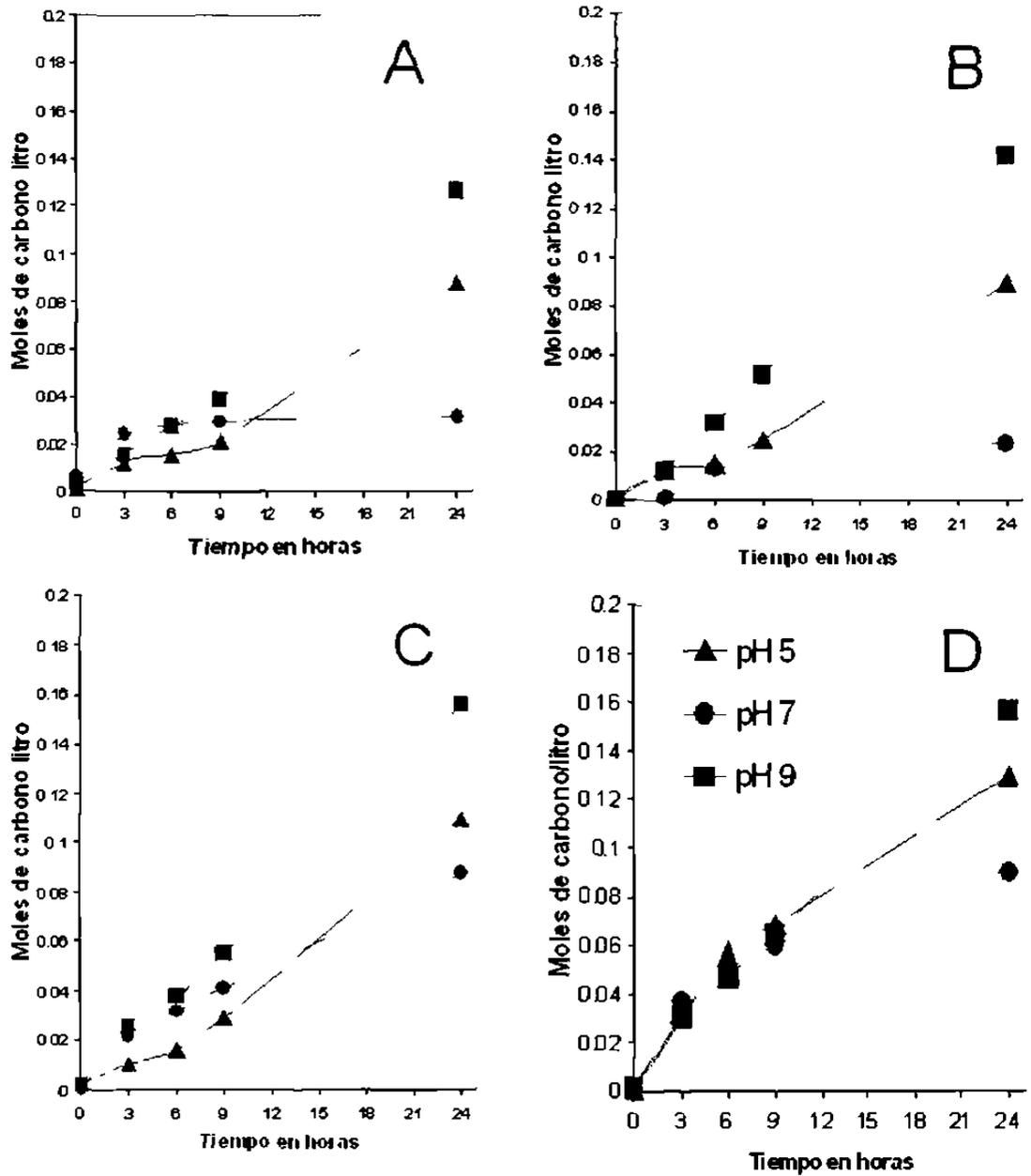


Figura 8.- Efecto del pH, La fuente de carbono y la presencia o ausencia de calcio sobre la velocidad de acumulación del exopolisacárido por *Enterobacter cloacae* (la concentración de azúcares se expresa en moles de carbono/litro). A: glucosa + calcio, B: maltosa + calcio, C: glucosa sin calcio, D: maltosa sin calcio.

También se observa que se presentaron retrasos en el inicio de la acumulación del exopolisacárido cuando se realizaron los cultivos a pH 5, con la única excepción del experimento con maltosa en ausencia de calcio (Figura 8 D).

Para los experimentos realizados a pH 9, se observa que entre la sexta y novena hora de experimentación se establece la acumulación de exopolisacárido a una velocidad que continúa igual hasta el final del experimento

CAPITULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Enterobacter cloacae es una bacteria que no ha sido considerada importante por los científicos en lo referente a la formación de biopelículas, en muy pocas publicaciones se hace referencia a ella y por lo general siempre formando parte de bioconsorcios que es la forma común en que se la podría encontrar en la naturaleza. En la industria de alimentos no se tiene un procedimiento analítico que de forma particularizada, solamente se le involucra en el universo de bacterias que pudiera ser evidenciado en una cuenta total de células viables. Sin embargo este microorganismo es capaz de reproducirse en una forma acelerada y provocar serios problemas en las líneas de producción, sobre todo en aquellas áreas en donde la humedad es persistente y hay abundancia de nutrientes, la Figura 9 nos da una idea de lo anteriormente mencionado. En ella podemos observar la biopelícula instalada en una cadena transportadora, posteriormente es tirada al piso durante el proceso de lavado de la maquinaria y finalmente podemos observar una imagen de cómo se desarrolló en la línea de drenaje, lo cual es indicativo de que ninguna de las sustancias químicas usadas durante el proceso de lavado fue lo suficientemente fuerte para matar los microorganismos contenidos en ella, pero además de esto, las imágenes muestran de manera contundente que la biopelícula no se deshace, sino que mantiene su estructura aún después de ser desprendida de las paredes del tubo de drenaje, siendo estas las razones que plantearon la necesidad de conocer más de cerca a los microorganismos que son capaces de formar tan elaboradas estructuras durante su proceso de crecimiento.

El resultado del proceso de aislamiento y selección de los microorganismos en la biopelícula mostró que *Enterobacter cloacae* representa una proporción del 80 % de la población total, lo cual indica que las características de la biopelícula en buena parte están influenciadas por sus características fisiológicas y bioquímicas, y que el nicho ecológico en el que se encuentra completaría del juego de influencias.

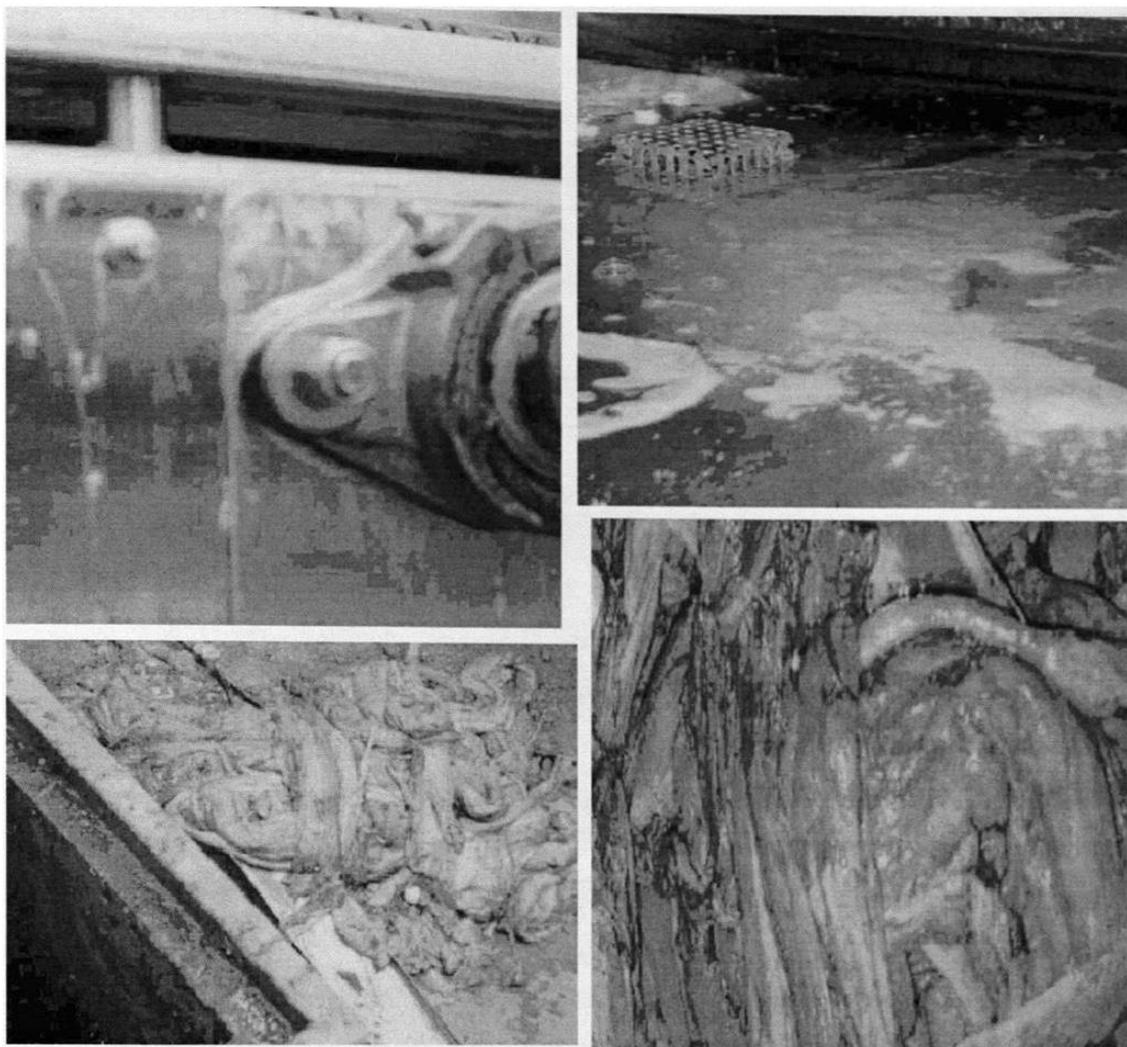


Figura 9.- Aspecto de la biopelícula en su nicho ecológico; arriba a la izquierda, imagen de la biopelícula derramándose de la cadena transportadora de envases; arriba a la derecha, biopelícula derramada en el piso; abajo a la izquierda, biomasa retirada del tubo de drenaje; abajo derecha, acercamiento del aspecto de la biopelícula.

Los cultivos en medio sólido de *Enterobacter cloacae* en el laboratorio, mostraron que este microorganismo forma colonias viscosas (Figura 3), detalle que sugiere que la producción de exopolisacáridos es una condición natural del microorganismo, los cultivos en medios líquidos también muestran una apariencia viscosa, pero en períodos prolongados de incubación (72 horas o

más) en forma estática, se inicia la formación de una estructura en forma de nata que finalmente conduce a la formación de una biopelícula.

El medio de cultivo MPEPS utilizado en los experimentos de evaluación del crecimiento y el efecto de los factores nutricionales, fue pensado en función de simular las características nutricionales disponibles en el nicho ecológico. La presencia de glucosa o maltosa en el medio se hizo con la intención de evaluar si la diferencia que las bacterias presentan en su fisiología de transporte de monosacáridos y disacáridos tiene un efecto sobre la producción de la biopelícula. (el transporte de glucosa, que se hace por un mecanismo uniporte y el transporte de maltosa que se hace por un mecanismo en el que ocurre un simporte de protones). Los resultados indican que este no es un factor de influencia en la producción del exopolisacárido.

La parte IV del medio de cultivo contiene ingredientes que son comúnmente encontrados en formulas de lubricación de las cadenas transportadoras de envases, su función es disminuir la fricción que se da cuando los envases corren sobre la superficie de la cadena. La adhesión de estos materiales a la superficie sólida de la cadena o del cuerpo del envase, y sus características de hidrofobicidad, facilitan la formación de la biopelícula.

El medio de cultivo MPEPS favorece el crecimiento de *Enterobacter cloacae* tal y como se muestra en las Figura 6, La fase de crecimiento exponencial se inicia inmediatamente después del momento del inóculo, lo cual indica que el proceso de subcultivos involucrado en su preparación, resultó ser efectivo para evitar una fase de adaptación prolongada.

La fase de crecimiento exponencial se prolongó por un período se entre seis y nueve horas de cultivo para dar paso a la fase estacionaria máxima, este tiempo parece ser muy corto si se considera que el consumo de carbohidratos de prolongó por las 24 horas del experimento. Esta situación parece resultar de la habilidad del microorganismo para sintetizar exopolisacáridos. Hay reportes en la literatura que presentan resultados similares, por ejemplo: *Streptococcus thermophilus* LY03 creciendo en medio MRS, crece y acumula

exopolisacáridos durante su fase de crecimiento exponencial que ocurre entre la sexta y novena hora de cultivo (en este caso se involucra una fase Lag de seis horas), (Degeest y colab. 1999); Otro reporte habla de *Lactobacillus bulgaricus* que también crece del momento del inóculo a las 15 horas de cultivo y acumula exopolisacárido durante esta etapa y se continúa durante su fase estacionaria máxima que se prolonga hasta las 25 horas cuando se le cultiva en un medio rico en factores de crecimiento, (Grobben y colab. 1998); Uno más habla de la producción de ácido poly(3-Hidroxibutírico-Co-4-Hidroxibutírico) y ácido Poly(4-Hidroxibutírico) por *Hydrogenophaga pseudoflava*, que crece exponencialmente durante las primeras 8 horas de cultivo y entra de lleno en una fase estacionaria máxima que se prolonga hasta las 50 horas, mientras que la acumulación del exopolisacárido es continuada durante las dos etapas, (Choi y colab. 1999); Otro más habla de *Enterobacter amnigenus* que crece en presencia de sacarosa y fucosa mostrando una fase de crecimiento exponencial entre la primera y la octava hora de cultivo y una fase estacionaria máxima a partir de la novena y hasta la treintava hora, y en donde la acumulación del exopolisacárido se presenta sólo durante la primera, (Tallgren y colab. 1999); similar a este último, hay un reporte de Kimmel y colaboradores que en 1998 publicaron un artículo haciendo referencia a *Lactobacillus delbruekii* subesp. *bulgaricus* que produce exopolisacáridos sólo en la fase de crecimiento exponencial que ocurre entre la quinta y la doceava horas cuando se la cultiva en un medio rico en factores de crecimiento (este proceso muestra una fase Lag de cinco horas).

Según este análisis, la acumulación de exopolisacáridos es un fenómeno concurrente al proceso del crecimiento poblacional en varias especies microbianas. Sin embargo, la acumulación de exopolisacáridos no se extiende en todos los casos a la fase estacionaria máxima, en donde el crecimiento del microorganismo ha pasado por una desaceleración y la acumulación del exopolisacárido mantiene velocidades similares a las mostradas en la fase de crecimiento exponencial o ligeramente menores, tal y como sucede con *Enterobacter cloacae* creciendo en el medio MPEPS.

La tabla VI muestra los rendimientos en la producción de exopolisacáridos resultantes de procesos de fermentaciones a nivel laboratorio.

Tabla VI.- Comparación de rendimientos obtenidos en la producción de exopolisacáridos por microorganismos en procesos a nivel laboratorio.

Microorganismo	Rendimiento en g/l de medio de producción	Referencia
<i>Cyanospira capsulata</i>	4	Vincenzini M., 1990
<i>Methylophilus sp.</i>	5.4	Dawes E.A., 1990
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	9	Dawes E.A., 1990
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	0.36	Kimmel S.A., 1998
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.95	Este trabajo, 2003

En ninguno de los trabajos mencionados se indica si la acumulación del exopolisacárido es un fenómeno concurrente con la formación de una biopelícula, pero en el caso de nuestro microorganismo ambos fenómenos confluyen.

El proceso de experimentación para ver el efecto del pH sobre el crecimiento del microorganismo y acumulación del exopolisacárido, demuestra que dentro del rango ácido, se tiene un efecto negativo para ambos ya que la acumulación de exopolisacárido presenta resultados menores en comparación a los obtenidos trabajando en el rango alcalino. Esto es el resultado de que el pH del nicho ecológico de donde procede el microorganismo es alcalino (pH entre 9 y 11) y el microorganismo debió haberse adaptado a vivir en él.

Los resultados obtenidos en presencia de calcio demuestran que este ión tiene un efecto negativo para el proceso de acumulación del exopolisacárido, ya que en su ausencia, ambos carbohidratos mostraron un nivel de acumulación bueno en el tiempo en el que el microorganismo se encontraba en

plena fase de crecimiento exponencial, con un incremento en la velocidad de acumulación registrada después de la sexta hora de incubación, cuando el microorganismo ya había entrado a la fase estacionaria máxima.

A pH 7 la acumulación de exopolisacárido y el crecimiento del microorganismo muestran comportamientos diferentes cuando el calcio estuvo presente o ausente del medio de cultivo. En ausencia de calcio la velocidad de acumulación es buena durante el tiempo de la fase de crecimiento exponencial, y en forma moderada durante la fase estacionaria máxima. Si lo anterior se analiza con relación a las curvas de crecimiento, observaremos que en presencia de calcio se registró una mayor velocidad de crecimiento por parte del microorganismo, detalle que no es observable para las mismas curvas obtenidas en su ausencia.

Lo anterior puede conducirnos a pensar que a pH 7 y en presencia de calcio, el microorganismo crece sin inducir los procesos de acumulación de exopolisacárido ya que el fenómeno del pH se repite en los procesos mencionados para otros microorganismos, en donde el medio de cultivo fue ajustado a 6.5 - 7 al inicio del experimento (Tallgren y colab. 1999, Kimmel y colab. 1998). Y en los experimentos donde se usaron niveles de pH de 6 o menos, la acumulación del exopolisacárido se continuó aún después de haber iniciado la fase estacionaria máxima), (Degeest., 1999, Choi y colab. 1999, Grobber y colab. 1998).

A pH 9, los niveles de acumulación de exopolisacárido y el crecimiento del microorganismo registraron los valores mas altos para todas las condiciones ensayadas.

Entre las dos fuentes de carbono orgánicas, la diferencia observada en la velocidad de acumulación del exopolisacárido puede deberse a que el extracto de levadura contiene proteínas, péptidos y aminoácidos y vitaminas que además de ser utilizados como fuentes de nitrógeno pueden también ser utilizadas como fuentes de carbono. Esto último ofrece ventajas nutricionales y de factores de crecimiento que pueden resultar en mejores actividades enzimáticas para el microorganismo.

Lo anterior es soportado por los resultados mostrados con *Streptococcus thermophilus* LY03 en cuyo proceso de acumulación de exopolisacáridos, la cantidad y tamaño de éstos son fuertemente influenciado por la fuente de nitrógeno (Degeest., 1999).

Por todo lo anterior se concluye que la cepa aisladas de *Enterobacter cloacae* es un mutante ambiental y que es capaz de producir exopolisacáridos cuando se le cultiva In Vitro en el medio de cultivo MPEPS conteniendo maltosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno, regulado a pH 9 y sin adición de calcio.

El exopolisacárido producido por *Enterobacter cloacae* presenta características muy similares a las de la Goma de Guar, un polisacárido comúnmente utilizado en la industria de alimentos y que contiene unidades de glucosa y galactosa, sin embargo hay un trabajo publicado por Lawson y colaboradores en 1969 en donde se establece que cepas de *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* producen ácido colánico, un hexasacárido compuesto de 4 azúcares en los cuales están presentes grupos acetilo y piruvato.

0127847

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Los resultados presentados y lo anteriormente discutido nos proporciona los conocimientos suficientes para concluir lo siguiente:

1. *Enterobacter cloacae* forma parte de la biopelícula natural en referencia con las poblaciones microbianas existentes en la misma y es capaz de formar *in vitro* biopelículas monoespecie mediante la excreción de exopolisacáridos.
2. El medio de cultivo MPEPS permite el crecimiento de *Enterobacter cloacae* a diferentes niveles de pH.
3. Los niveles de pH por debajo de 6 permiten el crecimiento de *Enterobacter cloacae* en el medio de cultivo MPEPS pero tienen un efecto inhibitorio sobre proceso de acumulación de exopolisacáridos cuando el cultivo ha llegado a la fase estacionaria máxima.
4. *Enterobacter cloacae* es capaz de formar biopelículas mediante la excreción de exopolisacáridos que están formados de cadenas de azúcares que se enlazan entre sí mediante puentes de calcio.
5. El ión calcio no tiene efectos importantes sobre el crecimiento de *Enterobacter cloacae* a diferentes niveles de pH, pero tiene efecto negativo en la acumulación de exopolisacárido cuando el medio de cultivo se ajusta a pH 7.
6. *Enterobacter cloacae* es una bacteria capaz de producir exopolisacáridos y desarrollar biopelículas, pero este desarrollo es afectado por las condiciones ambientales y nutricionales.

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES.

El trabajo aquí presentado da pie para la realización de proyectos de investigación que completen el entendimiento del fenómeno de producción de exopolisacáridos que *Enterobacter cloacae* acumula cuando el medio ambiente o nutricional le es nocivo.

- El conocimiento del gasto energético derivado de la producción y acumulación de los exopolisacáridos en *Enterobacter cloacae*.
- Efecto de fuentes de nitrógeno y la relación de las mismas sobre la acumulación de exopolisacáridos.
- Elucidar la estructura del exopolisacárido para conocer y entender sus propiedades físicas y químicas.
- La definición de un procedimiento aplicable en el ámbito industrial para la inhibición de la producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae*, en vías de mantener los procesos en condiciones adecuadas sanitarias.
- La optimización del proceso para la producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae* a nivel Bench Top, para indagar los posibles usos de los mismos en el nivel comercial.

CAPITULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **Adal K.A., Farr B.M.**, 1966. Central venous catheter-Related infections: a review. *Nutrition*. 12(3):208-213
- **Allison D.G., Sutherland I.W.**, 1984. A staining technique for attached bacteria and its correlation to extracellular carbohydrate production. *J. Microbiol. Methods*. 2:93-99
- **Alvarez, A.M., Nishijima W.T.**, 1987. Postharvest diseases of papaya. *Plant. Dis.* 71:681-686
- **Baier, R.E.** 1968. Influence of the initial surface condition of materials on bioadhesion,. In: Proceedings of the third international congress on marine corrosion and fouling. National Bureau of Standards, Gaithersburg. Md. p. 633-639
- **Bakke R., Trulear M.G., Robinson J.A., and Characklis W.G.** 1984. Activity in *pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 26:1418-1424.
- **Block J.C.** 1992. Biofilms in drinking water distribution systems. In: *Biofilms – Science and Technology*, L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher, and C. capdeville, Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 469-485.
- **Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons.** 1994. *The Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9TH ed., The William's and Wilkin's Co. Baltimore.
- **Carpentier B. and Cerf O.** 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499-511
- **Chamberlain A.H.L.** 1992. Biofilms and Corrosion. In: *Biofilms – Science and Technology*, L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher, and C. capdeville, Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 207-217.
- **Characklis W.G.** 1984. Biofilm development: a process analysis. In: *microbial adhesion and aggregation* , Ed. K.C. Marshall, pp 137-157. Dahelm Konferenzen. Berlin: Springer.
- **Characklis W.G.** 1991. Biofouling: Effects and Control. . In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Flemming and Gessey Eds. Berlin Heidelberg: Springer –Verlag, pp 7-27.
- **Choi M.H., Yoon S.CH., Lenz R.W.** 1999. Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid- Co-Hydroxybutyric acid) and Poly(4-Hydroxybutyric Acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4): 1570-1577.
- **Christy Y. and Moo-Young M.** 1994. Cleaning In Place systems for industrial bioreactors: Design validation and operation. *J. Ind. Microbiol.* 13:201-201.
- **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J., Lad T.I., Nickel J.C.,**

- Dasgupta M., Marrie T.J.** 1987. Bacterial biofilms in Nature and disease. *Annu Rev. Microbiol.*, 41: 435 - 464.
- **Costerton J.W., Irving R.T., Cheng K.** 1981. Bacterial glycoocalix in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35 :299-324.
 - **Costerton J.W., Lewandowski D., deBeer D., Caldwell D., Korber D., and James G.** 1994. Biofilms. The customized microniche. *J. Bacteriol.* 176:2137-2142
 - **Costerton J.W., Stewart P.S.** 2001. Battling biofilms. *Sci. Am.* 285: 75-81.
 - **Costerton J.W., Stewart P.S., and Greenberg E,P,** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322
 - **Dalton H.M., Goodman A.E., Marshall K.C.** 1996. Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 17:228-234.
 - **Danese P.N., Pratt L.A., Kolter R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182:3593-3596.
 - **Dawes E.A.,** 1990. Novel microbial polymers: Introduction overview, Novel biodegradable microbial polymers. Pp 3 – 16.
 - **DeBeer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowsky Z.,** 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43:1131-1138.
 - **Degeest, B. and Vuyst L.** 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 2863 - 2870.
 - **Dubois, M., K.A. Guilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
 - **Evans, J.B. and C.F. Niven,** 1955. Slime and mold problems with prepackaged processed meat products. *Am. Meat Inst. Found. Bull.* 24.
 - **Finelli A., Gallant C.V., Jarvi K., and Burrows L.** 2003. Use of In-Biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development *J. Bacteriol.* 185:2700-2710.
 - **Flemming H.C.** 1991 Biofouling in water treatment. In: *Biofouling and Biorrosion in Industrial Water Systems.* Flemming and Gessey Eds. Berlin Heidelberg: Springer –Verlag, pp 47-80.
 - **Gessey G.G. , Richardson W.T., Yeomans, H.G. Irving R.T., Costerton J.W.** Microscópic examination of natural sessile bacterial populations from an Alpine stream. 1977. *Can. J. Microbiol.* 23(12):1733-1736
 - **Gibello, A., Ferrer E., Sanz J. , Martin M.** 1995. Polymer production by *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxiphenil acetic acid hydrolase genes cloned in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(12): 4167- 4171.
 - **Gilbert P., Collier P.J. and Brown R.W.** 1990. Influence of growth rate

- on susceptibility to antimicrobial agents, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34: 1865-1868.
- **Glazebrook J., Walker G.C.** 1989 A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium melioli*. *Cell.* 56: 661-672.
 - **Goodman, A.E. and Marshall K.C.** 1995. Genetic Responses of Bacteria at Surfaces, p. 80-98. In H:M: Lappin-Scott and J.W. Costerton (ed.), *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
 - **Grant W.D., Sutherland I.W., Wilkinson J.F.** 1969 Exopolysaccharide cholanic acid and its occurrence in the enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 100: 1187-1193.
 - **Grobben G.J., Chin-Joe I., Kitzen V.A., Boels I.C., Boer F., Sikkema, J., Smith M.R., and Bont, J.A.M.**, 1998 Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1333-1337.
 - **Hauser S.P. and Douglas L.J.** 1994. Biofilms formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 39(9):2128-2131.
 - **Hehre, E.J.** 1964. *J. Biol. Chem.* 163:221-233.
 - **Henrici A.T.** 1933. Studies of fresh water bacteria. I. A direct microscopic technique *J. Bacteriol.* 25:277-287.
 - **Hentzer M., Teitzel G.M., Blazer G.J., Heydorn A., Molin S., Givskov M., and Parsek M.** 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm function and structure. *J. Bacteriol.* 183(18):5395-5401.
 - **Hernández A, Mellado R.P., Martínez J.L.** 1998. Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11):4317-4320.
 - **Heydorn A., Nielsen A.T. Hentzer M., Sternberg C., Givskov M.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146:2395-2407.
 - **Holah J.T., and Kearny L.R.** 1992. Introduction to biofilms. In: *Biofilms – Science and Technology*, L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher, and C. Capdeville, Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 35-41.
 - **Holah J.T., Betts R.P., Thorpe R.H.** 1988 The use of direct epifluorescent microscopy DEM and the direct epifluorescent filter technique DEFT To assess microbial population on food contact surfaces. *J. Appl. Bact.* 65:215-221.
 - **Hood S.K. and Zottola E.A.** 1995. Biofilms in food processing. *Food Control.* 6:9-18.
 - **Huang, C., Xu K.D., McFeters G.A., Stewart P. S.** 1998. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4):1526-1531.

- **Huang, C., Yu F.P., McFeters G.A., Stewart P. S.** 1995. Non uniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6):2252-2256.
- **Hucker, G.J. and Pederson C.S.** 1942. A review of the microbiology of commercial sugar and related sweetening agents. *Food Res.* 7: 459-480.
- **Hughes K.A., Sutherland I.W., Jones M.V.** 1988. The function of biofilm exopolysaccharides production following exposure to antimicrobial agents and enhanced desiccation resistance. *Microbiol* 144:3039-3047.
- **Hyatt J.M., Nix D.E., Stratton C.W., Schentag J.J.** 1995. In vitro pharmacodynamics of piperacillin and ciprofloxacin alone and in combination against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 39(8): 1711-1716
- **Janning K.F. and Harremoës.** 1995. Kinetics in a full scale submerged denitrification filter. Proceedings of biofilm structure, growth and Dynamics: Biotechnological Sciences, Delft Leiden, pp. 126-133.
- **Keller R., Pedrozo M.Z., Ritchmann R., Silva R.M.** 1998. Occurrence of virulence-Associated Properties in *Enterobacter Cloacae*. *Infect. Immun,* 66(2): 645-649.
- **Kimmel S.A., Robert F.R. and Ziegler G.R.,** 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* RR grown in semidefined media. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 659-664.
- **Kinniment S. and Wimpenny W.T.** 1990. Biofilms and Biocides. *Int. Biodeterior.* 26:181-194
- **Kronl6f J.** 1994. Immobilized yeast in continuous fermentation of beer. VTT publications 167. Espoo: The technical research center of Finland, 96p. + app.47p.
- **Lapaglia C. and Hartzell P.** 1997. Stress-induced production of biofilms in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8):3158-3163.
- **Lawson C.J., Mc Leary C.W., Nakada H.I. , Rees D.A., Sutherland I.W., Wilkinson J.F.,** 1969, Structural studies of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and based catalyzing fragmentation. *J. Biochem.,* 115:947-958.
- **Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P.H. and Hamilton W.A.** 1995. Role of Sulfate-Reducing bacteria in corrosion of mild steel.: a review. *Biofouling* 8:165-194
- **Lewandowski Z., Altobelli S.A., and Fukushima E.** 1993. NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and Kinetics on biofilms. *Biotechnol. Prog.* 9:40-45
- **Loeb, G.I and Neihof R.A.** 1975 *Adv. Chem. Ser.* 145: 319-335
- **Mack D., Fisher W., Krokotch A. Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178: 175-183

- **Marrie T.J. and Corterton J.W.** 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pace maker lead. *Circulation*. 66:1339-1341.
- **Marrie T.J. and Corterton J.W.** 1983. A scanning and transmission electron microscopic study of uropathogen adherence to a plastic surface. *Appl. Environm. Microbiol.* 45:1018-1024.
- **Marshall, K.C.** 1985. Mechanisms of Bacterial Adhesion at solid Liquid Interfaces, p. 131 - 161. In D.C. Savage and M. Fletcher (ed.), *Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance*, Plenum press, New York.
- **Marshall, K.C. and Blainey B.L.** 1991. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Flemming and Gessey Eds. Berlin Heidelberg: Springer –Verlag, pp 29-46.
- **Marshall, K.C.** 1976. *Interfaces in Microbial Ecology*. Harvard University Press. Cambridge, Mass.
- **Mattila-Sandoholm T. and Wirtanen G.** 1992 Biofouling in the industry: a review. *Food Rev. Int.* 8:573-603
- **Mentu J.** 1996. Biofouling in paper machines. In: *Future prospects of biofouling and biocides*, VTT Symposium 165. Espoo: The Technical research center of Finland, P 23
- **Miller G.L.** 1959. use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- **Mittleman M.W.** 1991. Bacterial growth and biofouling control in purified water systems. In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Flemming and Gessey Eds. Berlin Heidelberg: Springer – Verlag, pp 133-154.
- **Morris, C.E., Monier J.M. and Jaques M.A.** 1998. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4789-4795.
- **Morton L.H.G. and Surman S.B.** 1994 Biofilms in biodeterioration – A review. *Int. Biodet. Biodeg.* 34:203 221.
- **Mosteller T.M. and Bishop J.R.** 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J. Food Prot.* 56:34-41.
- **Mozes, N. and P.G. Rouxet.** 1987. Methods for measuring the hydrofobicity of microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* 6:99-112.
- **Mozes, N., A.J. Léonard, and P.G. Rouxet.** 1988. On the relations between the elemental surface compositions of yeast and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 945:324-334.
- **Mozes, N., F. Marchal, M.P. Hermesse, J.L. Van Haecht, L. Reuliaux, A.J., Léonard A.J. and Rouxet P.G.** 1987. Immobilization of microorganisms by adhesion: Interplay of electrostatic and non electrostatic interactions *Biotechnol. Bioeng.* 30:439-450.
- **Mucchetti G.** 1995. Biological fouling and biofilm formation on membranes. *Int. Dairy Fed. Special issue No 9504*, 118-124.

- **Nickols W.W.** 1989. Susceptibility of biofilms to toxic compounds. Structure and Function of Biofilms, W.G. Characklis and P.A. Wilderer, Eds. New York: John Wiley, pp321-331.
- **Nickols W.W.** 1991. Biofilms, antibiotics and penetration. Rev. Med. Microbiol. 2:177-181.
- **Nielsen P.H.** 1987. Biofilm Dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 53:27-32.
- **Nivens D.E., Ohman D.E., Williams J., Franklin M.J.,** 2001. Role of alginato and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J. Bacteriol. 183:1047-1057.
- **Notermans S., Dormans J.A.M. and Mead G.C.** 1991. Contribution of surface attachment to establishment of microorganisms in food processing plants: a review. Biofouling. 5: 21-36.
- **O'Toole G.A.** 2003. to build a biofilm. J. bacteriol 185(9):2687-2689.
- **Okabe, S., Itoh T, Sato H. and Wanatabe Y.** 1999. Analysis of spatial distribution of sulfate-Reducing Bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms Appl. Environ. Microbiol. 65(11): 5107-5116.
- **Poindexter J.S.** 1964. Bacteriol. Rev. 28: 231-295.
- **Pontefract R.D.** 1991. Bacterial adhesion: Its consequences in food processing. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 24:113-117.
- **Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple genotypes development as a biofilm. J. Bacteriol. 184:1140-1154.
- **Schneider R.P. and K.C. Marshall.** 1994. Colloids Surf. B Interfaces. 2:387-396
- **Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A.** Approved List of Bacterial Names, International Committee on Systematic Bacteriology., American Society for Microbiology, Washington D.C. 1989.
- **Skillman L.C., Sutherland I.W., Jones M.V.** 1977. Cooperative biofilm formation between two species of Enterobacteriaceae. In. Wimpenny J.W.T., Handley P., Gilbert P. , Lappin-Scott H.M., Jones M.V. (eds). Biofilms: Community interactions and control. Bioline Publications, Caridff, pp 119-128.
- **Smyth C.J. , Johnson P., Olson E., Soderlind , Rosengren J., Hjertén S., and Wasdröm T.** 1978. Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. Infect. Immun. 22:462-472.
- **Solano C., Sesma B., Alvarez M., Humprey T.J.,Thorns C.J. and Gamazo C.** 1998. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with different levels of virulence by an In Vitro glass adherence Test. J. Clin. Microbiol. 36(3):674-678.
- **Sutherland I.W.** 1977. Microbial biofilm exopolysaccharides – superglues or velcro ? In. Wimpenny J.W.T., Handley P., Gilbert P. , Lappin-Scott H.M., Jones M.V. (eds). Biofilms: Community interactions and control. Bioline Publications, Caridff, pp 33-39.

- **Sutherland I.W.** 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press. Cambridge.
- **Tallgren A.T., Airaksinen U., Von Veissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J. and Leisola M.**, 1999, Exopolysaccharide producing bacteria from sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 862
- **Tolker_Nielson T., Brinc U.C., Ragas, P.C., Andersen J.B., Jacobsen C.S., Molin S.** 2000. Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J. Bacteriol.* 182:6482-6489.
- **Tomkins, R.G.** 1951. The microbiological problems in the preservation of fresh fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agr.* 2: 389-418.
- **Van der Mei, H.J., Brokke P., Dankert J., Feijen J., Rouxet P.G., and Busscher H.J.** 1989. Physicochemical surface properties of nonencapsulated and encapsulated coagulase negative Staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2806-2814.
- **Videla H.A. and Characklis W.G.** 1992. Biofouling and microbially influenced corrosion. *Biodeteriorat. Biodegradat.* 29: 195-212.
- **Vincenzini M., Phillips R., Sili C. Materassi R.**, 1990, A novel EPS form a filamentous *Cyanobacterium*: "Production, chemical characterization and rheological properties". Novel biodegradable microbial polymers. Pp 295-310.
- **Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R.** 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* 0139. *Mol. Microbiol.* 39:223-235.
- **Wirtanen G.** 1995. Biofilms formation and its elimination from food processing equipment. VTT Publication 251, Espoo: The Technical Research Center of Finland 106p. + app. 48 p.
- **Wittaker C., Ridgway H. and Olson B.H.** 1984. Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from reverse osmosis membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:395-403.
- **Wong A.C.L. and Cerf O.** 1995. Biofilms: Implications for hygiene monitory of dairy plant surfaces. *Bull. Int. Dairy Fed.* 302:40-50.
- **Xu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C., and McFeters G.A.**, 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 4035-4039.
- **Zottola E.A., and Sasahara K.C.** 1994. microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 23:125-148.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido alcanzar una de mis metas, por darme salud, una familia, el don de la vida y el amor, que me permiten crecer en plenitud, gracias Señor

A mi esposa **Elizabeth** por caminar conmigo, por escucharme y hacerme con tu amor mucho más fácil el camino; a una personita muy especial a mi hijo **Ricardo**, por haberme dado la dicha de ser padre, en especial a ustedes que me inyectan la vitalidad diaria que necesito para seguirme esforzando.

A **Ana Velia, Alejandro y J. Alejandro** por permitirme ser parte de su familia y por el apoyo incondicional y sincero que siempre me han demostrado.

A mis padres, **Ma. Mercedes y Ricardo (†)**, pero en especial a ti mamá por que en tu guiar diario lo hiciste como si los dos lo hubieran hecho a pesar de que el no estuviera con nosotros, y a ti papá que en el cielo estás.

A mis hermanos **Héctor, Luis y Leonardo**, que aunque nuestro convivir no es diario como en nuestra niñez, mis pensamientos siempre están con ustedes.

A la familia **Fernández Quiroga**, por brindarnos su amistad sincera.

A mis amigos, **Gerardo, Iván y Teo**, gracias por brindarme su amistad.

A todos mis familiares y amigos, que por el hecho de no mencionarlos a cada uno de ustedes no dejan de ser importantes en mi dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero y especial agradecimiento al **M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo**, por su excelente docencia y humildad para transmitirme sus valiosas y sabias enseñanzas durante la realización de esta tesis y mi formación profesional. Así como a la **M.C. Martha Alicia Suárez Herrera** por motivarme a realizar la maestría, a la **M.C. Ma. Teresa Garza González** por ser una excelente maestra.

A la Directora de la Facultad de Ciencias Químicas **M.C. Emilia Vázquez**, a la Maestra **Gloria Nelly Paéz Garza** y demás personal que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de dicho trabajo, mi mas sincero agradecimiento.

A la D.E.S. DE LA F.C.Q., compañeros y a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

A Dios que sin en el todo esto no seria posible.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido alcanzar una de mis metas, por darme salud, una familia, el don de la vida y el amor, que me permiten crecer en plenitud, gracias Señor

A mi esposa **Elizabeth** por caminar conmigo, por escucharme y hacerme con tu amor mucho más fácil el camino; a una personita muy especial a mi hijo **Ricardo**, por haberme dado la dicha de ser padre, en especial a ustedes que me inyectan la vitalidad diaria que necesito para seguirme esforzando.

A **Ana Velia, Alejandro y J. Alejandro** por permitirme ser parte de su familia y por el apoyo incondicional y sincero que siempre me han demostrado.

A mis padres, **Ma. Mercedes y Ricardo (†)**, pero en especial a ti mamá por que en tu guiar diario lo hiciste como si los dos lo hubieran hecho a pesar de que el no estuviera con nosotros, y a ti papá que en el cielo estás.

A mis hermanos **Héctor, Luis y Leonardo**, que aunque nuestro convivir no es diario como en nuestra niñez, mis pensamientos siempre están con ustedes.

A la familia **Fernández Quiroga**, por brindarnos su amistad sincera.

A mis amigos, **Gerardo, Iván y Teo**, gracias por brindarme su amistad.

A todos mis familiares y amigos, que por el hecho de no mencionarlos a cada uno de ustedes no dejan de ser importantes en mi dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero y especial agradecimiento al **M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo**, por su excelente docencia y humildad para transmitirme sus valiosas y sabias enseñanzas durante la realización de esta tesis y mi formación profesional. Así como a la **M.C. Martha Alicia Suárez Herrera** por motivarme a realizar la maestría, a la **M.C. Ma. Teresa Garza González** por ser una excelente maestra.

A la Directora de la Facultad de Ciencias Químicas **M.C. Emilia Vázquez**, a la Maestra **Gloria Nelly Paéz Garza** y demás personal que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de dicho trabajo, mi mas sincero agradecimiento.

A la D.E.S. DE LA F.C.Q., compañeros y a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

A Dios que sin en el todo esto no seria posible.

