

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE
Escherichia coli CUANDO HAY CAMBIOS EN EL pH DEL MEDIO**

NATALIA LORENA PARADA HERNÁNDEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

2006

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE
Escherichia coli CUANDO HAY CAMBIOS EN EL pH DEL MEDIO**

NATALIA LORENA PARADA HERNANDEZ

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniera Química**

**Director:
THOMAS K. WOOD
Ingeniero Químico Ph.D.**

**Revisor de texto:
ALVARO RÁMIREZ GARCÍA
Ingeniero Químico Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA**

2006

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

UNIVERSIDAD DE TEXAS A&M

Ph.D. THOMAS K. WOOD, por permitirme trabajar en su grupo de investigación y brindarme todos los medios necesarios para llevar a cabo llevar a cabo esta investigación.

Ph.D. ALVARO RAMIREZ GARCÍA, por brindarme apoyo continuo en todos los años de mi carrera.

Ph.D. ARISTÓBULO CENTENO HURTADO, por darme los consejos adecuados y guiarme siempre hacia la dirección correcta.

A DIOS, por permitirme vivir hasta el día de hoy y dejar que realice mi sueño de verme convertida en una ingeniera que se siente orgullosa de ser de la familia
UIS.

Al loro por chingarme todos estos años y lograr que me convierta en una persona de bien y ahora profesional. Por todos sus esfuerzos que hoy hacen que me sienta orgullosa y feliz de poder tener una mamá tan especial

A mi papi, que aunque no esté ya entre nosotros, sé que se sentiría muy orgulloso de verme convertida en lo que soy.

A papito, por brindarme ayuda cuando su apretada agenda lo permitía y divertirme con todas sus locuras.

A toda mi familia, que de una u otra forma siempre estuvieron presentes para brindarme ayuda

A Dieguito, que siempre me ha brindado su apoyo y me ha alentado para seguir adelante, y puedo decir que cuento y contaré con un verdadero amigo.

Al mono, la monis... por que llevaba mucho tiempo sin conocer a una persona tan incondicional y especial

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1 CONCEPTOS BÁSICOS, LAS BACTERIAS	3
1.1.1 Estructura celular	3
1.2 GENETICA BACTERIANA.....	4
1.3 BIOPELÍCULAS	5
1.3.1 Definición	5
1.3.2 Formación de la Biopelícula.....	6
1.4 COMO CULTIVAR LAS BACTERIAS	9
1.4.1 Conservación de las cepas	9
1.4.2 Medios de Cultivo.	9
1.4.3 Esterilización sólidos.....	10
1.4.4 Crecimiento de la bacteria	10
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	13
2.1 CULTIVO DE LAS BACTERIAS	13
2.2 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	13
2.3 ANÁLISIS DE BIOPELÍCULA UTILIZANDO PLATOS DE 96 POZOS.....	14
2.4 ANÁLISIS DE MOTILIDAD	16
2.5 ANÁLISIS DE AGREGACION.....	16
2.6 ANÁLISIS DE INDOL EXTRACELULAR.....	17
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	18
3.1 ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.....	18
3.2 ANÁLISIS DE MOTILIDAD	22
3.3 ANÁLISIS DE AGREGACION.....	24
3.4 ANÁLISIS DE INDOL EXTRACELULAR.....	26
CONCLUSIONES	30

RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS	34

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepas usadas. Km ^R es Resistencia a la Kanamicina	14
Tabla 2. Valores Correspondientes a la Formación de Biopelícula en LB después de 24 h de incubación.....	18
Tabla 3. Valores Correspondientes a la Formación de Biopelícula en LB glu después de 24 h de incubación.	19

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Las cinco etapas de la formación de la biopelícula Bacteriana.....	6
Figura 2. Curva de crecimiento Microbiano	11
Figura 3. Inoculación de la Bacteria en el plato de 96 pozos	14
Figura 4. Lector de platos utilizado para medir la DO_{620}	15
Figura 5. Tinción de las Biopelículas formadas con cristal violeta	15
Figura 6. Muestra de Halos de Motilidad obtenidos para la E. coli	16

LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafico 1. Formación Total de Biopelícula en LB después de 24 h.	20
Grafico 2. Formación Total de Biopelícula en LB glu después de 24 h.....	21
Grafico 3. Valores de diámetro de motilidad después de 8 horas de incubación utilizando LB.	22
Grafico 4. Valores de diámetro de motilidad después de 8 horas de incubación utilizando LB glu.....	23
Grafico 5. DO ₆₀₀ obtenidas después de 24 h de Incubación en LB.....	24
Grafico 6. DO ₆₀₀ obtenidas después de 24 h de Incubación en LB glu.....	25
Grafico 7. Concentración de Indol Extracelular en LB para la cepa silvestre a una DO ₆₀₀ =1 y después de 6 y 9 horas de incubación. Fuente: Autor del proyecto	26
Grafico 8. Concentración de Indol en LB glu para la cepa silvestre a una DO ₆₀₀ =1 y después de 6 y 9 horas de incubación. Fuente: Autor del proyecto.....	27
Grafico 9. Crecimiento Total en LB. Fuente: Autor del proyecto.....	35
Grafico 10. Crecimiento Total en LB glu. Fuente: Autor del proyecto	35
Grafico 11. DO ₆₀₀ vs Tiempo usando LB.	37
Grafico 12. DO ₆₀₀ vs Tiempo utilizando LB glu.	37

ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. SIEMBRA POR AGOTAMIENTO	34
ANEXO B. CRECIMIENTO TOTAL DE LAS CEPAS OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA	35
ANEXO C. CURVA DE ESTANDARIZACION DEL INDOL	36
ANEXO D. DENSIDAD OPTICA OBTENIDA EN EL ANÁLISIS DE INDOL	37

RESUMEN

TITULO: **ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FORMACION DE BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* CUANDO HAY CAMBIOS EN EL pH DEL MEDIO.***

AUTOR: NATALIA LORENA PARADA HERNANDEZ**

PALABRAS CLAVES: pH, *E. coli*, formación de biopelícula, indol, motilidad, agregación

DESCRIPCION: La formación de biopelículas de *Escherichia coli* K-12 BW25113 y sus mutantes *ymgB* y *gadE* fueron estudiadas usando los medios de Luria Bertani (LB) y LB suplementado con 0.2% de glucosa (LB glu) a diferentes pHs. En este estudio preliminar se mostró que la formación de biopelícula de las cepas cambia cuando se cambia el pH del medio, encontrándose una tendencia a formar más biopelícula a medida que el medio se hace más ácido en LB, mientras que en LB glu se encontró una tendencia a formar mayor biopelícula a medida que el pH se hace más básico, especialmente para la cepa silvestre a pH 8.

Análisis de motilidad fueron realizados obteniéndose mayor motilidad de las cepas a pH ácido en los dos medios, esto debido a la represión de genes del regulador flagelar a pH básico (pH 8); hecho que podría explicar el aumento de la formación de biopelícula en LB. También se estudio la agregación celular, se observó que no existen cambios en la agregación de las células cuando el pH del medio se modifica.

Aunque se intento buscar alguna respuesta de los mutantes *ymgB* y *gadE* (relacionados con mecanismos de ácido-resistencia en la *E. coli*), se concluyó que estas mutaciones no afectan el comportamiento de la *E. coli* cuando se somete a cambios de pH en el medio.

Finalmente, el análisis de indol extracelular realizado para la cepa silvestre, deja ver una alta concentración de este a pH 8 para los dos medios usados, especialmente en LB glu, contradiciendo de este modo estudios recientes hechos por el grupo de investigación en los cuales se muestra que la presencia de indol inhibe la formación de biopelículas; quedando incluso el motivo por el cual se obtuvo una mayor formación de biopelícula en este medio

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicomecánicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Thomas K. Wood

ABSTRACT

TITLE: PRELIMINAR STUDY OF *Escherichia coli* BIOFILM FORMATION WHEN THERE ARE pH CHANGES IN THE MEDIUM¹

AUTHOR: NATALIA LORENA PARADA HERNANDEZ**

KEY WORDS: pH, *E. coli*, biofilm formation, indole, motility, aggregation

DESCRIPTION: *Escherichia coli* K-12 BW25113 and *ymgB* y *gadE* biofilm formation was studied using Luria Bertani (LB) and LB supplemented with 0.2% of glucose (LB glu) media at different pHs. In this preliminary, strains biofilm formation was shown to change as pH medium changes, finding a growing trend to form more biofilm as the LB medium pH decreases, whereas a growing trend to form more biofilm was found as the LB glu medium pH increases, especially for wild type at pH 8.

Motility assays were performed getting more motile strains at low pH in both media, because of gene repression of flagellar regulon at high pH (pH 8), fact that could explain the biofilm formation increase in LB. The cellular aggregation was studied too; it was shown that there were not changes on it when the pH medium is modified.

Although it was tried to get some response from *ymgB* and *gadE* mutant (related to *E. coli* acid-resistant pathways), it was concluded that this mutations do not affect the *E. coli* behavior when it is under pH medium changes.

Finally, the extracellular indole assay performed for the wild type allows to see a high concentration of indole at pH 8 for both media, especially in LB glu, contradicting, in this way, recent studies performed by the research group, in which it was shown that indole presence inhibits the biofilm formation; remaining unconcluded the reason why an increase in biofilm formation was obtained in this medium.

¹ Degree Work

** Physical- Chemical Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, Advisor: Ph.D. Thomas K. Wood

INTRODUCCIÓN

El término Biopelícula (Biofilm) puede ser para muchos desconocido, pero siempre ha estado presente entre nosotros. La placa que se forma en los dientes causando caries es una clase de biopelícula bacteriana, así mismo esa sustancia viscosa que empieza a aparecer en las paredes de los floreros y peceras, es un ejemplo de que allí se ha formado una biopelícula, de hecho, una biopelícula puede formarse en casi cualquier superficie expuesta a bacterias y cierta cantidad de agua.

Técnicamente las biopelículas se pueden definir como agregaciones microbianas que se adhieren a una superficie y así mismas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ellas mismas secretan. De este modo se forma una comunidad en donde sus habitantes tienen la capacidad de comunicarse entre ellos para coordinar cierto comportamiento cuando alcanzan un cierto número, a esta habilidad que tienen estos organismos – entre ellas las bacterias – se le conoce como Quorum Sensing. Esta es una de las características que hace de las biopelículas complejos difíciles de erradicar.

Por esta razón, los investigadores han centrado su interés más que en tratar de encontrar un antibiótico efectivo, en tratar de entender todos los factores y mecanismos que regulan e influyen en la formación de la biopelícula, para de esta forma poderlas atacar adecuadamente; y es que las biopelículas microbianas no solo causan un enorme costo en la salud humana, ya que son responsables de cerca del 80% de las infecciones, también producen costos por equipos dañados (corrosión de tubos, cascos de barcos), contaminación de productos, taponamiento de tuberías entre otros.

Un mejor entendimiento de como funcionan las biopelículas no solo permite la búsqueda de soluciones para combatirlas, este conocimiento se puede utilizar

para efectos industriales y ambientales positivos como la biorremediación de aguas residuales, subterráneas y del suelo, biofiltración de agua industrial entre otros.

Por las razones anteriormente nombradas y en pro de tratar de contribuir a un mejor entendimiento acerca de la formación de biopelículas, en este estudio se quiso experimentar con cambios de pH del medio de crecimiento de la *E. coli*. K12, para analizar posibles cambios en la formación de biopelícula y de este modo sembrar las pautas que podrían dar origen a un estudio mas riguroso. Aunque se cuenta con suficiente información acerca de la dependencia de genes, proteínas y mecanismos en la *E. coli* al pH, en las referencias consultadas no se encontró alguna que relacionara los cambios de pH con la formación de biopelículas. Una razón más para empezar un estudio acerca de este tema.

1. MARCO TEÓRICO

En este capítulo, se trata de revisar y definir conceptos que pueden ayudar al mejor entendimiento del tema tratado en este estudio.

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS, LAS BACTERIAS

Existen dos tipos de organización celular, la procariótica y la eucariótica. Dentro de los seres vivos con organización procariótica, existen dos grandes dominios: *Bacteria* (las eubacterias o bacterias clásicas) y *Archaea* (llamadas antes arqueobacterias). Las bacterias se reproducen asexualmente por fisión binaria originando colonias de clones (organismos genéticamente idénticos)

1.1.1 Estructura celular

Las bacterias no poseen núcleo celular, la pared celular consiste en un esqueleto macromolecular rígido llamado peptidoglucano. Por diferencias en la estructura celular se pueden dividir en Gram-negativas y Gram-positivas. En las Gram-negativas, el peptidoglucano está rodeado por una membrana externa e inmersa en un espacio periplásmico. También pueden contener otras estructuras extracelulares como las fimbriae y los flagelos que son usados para la motilidad (movilidad), adherencia, entre otros. También pueden presentar cápsulas que consisten en acumulación de material mucoso o viscoso, situado externamente respecto de la pared celular.

En el interior, el citoplasma bacteriano alberga la información genética en el **nucleoide**. Las bacterias son organismos haploides (tienen un solo cromosoma) y en la mayoría es circular, como el de la *Escherichia coli*, cuyo tamaño aproximado es de 4.700 pares de kilobases (kb). Aunque es correcto decir que en

el genoma de la bacteria se encuentra un solo cromosoma, en algunos casos se pueden encontrar plásmidos, los cuales se replican autónomamente y si llegan a perderse, la bacteria sigue siendo viable. Los plásmidos son utilizados como vehículos de clonación ya que tienen la capacidad de conferir caracteres fenotípicos en las células huésped, como los plásmidos R, que confieren resistencia a antibióticos. También se encuentran los ribosomas, encargados de la síntesis de proteínas.

1.2 GENÉTICA BACTERIANA

La transcripción del ADN es el primer paso de la expresión genética en el que secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa. Como resultado se produce ARN mensajero que da inicio a la síntesis de proteínas. El ADN procariota se organiza en paquetes coherentes denominados **OPERONES**, en los cuales genes bacterianos relacionados con la misma función genética se agrupan de forma contigua. Los hay de expresión constitutiva (se transcriben constantemente, independiente de condiciones ambientales) y operones cuya expresión esta regulada en función de condiciones ambientales, pueden ser de expresión inducible y expresión reducible

Un operón consiste en:

- ‡ **un operador:** controla el acceso de la ARN polimerasa al promotor
- ‡ **un promotor:** donde la ARN polimerasa reconoce el sitio de inicio de la transcripción
- ‡ **un gen regulador:** controla el tiempo y velocidad de transcripción de otros genes
- ‡ **un gen estructural:** codifica las enzimas relacionadas o las proteínas estructurales

El gen **regulador** codifica para una proteína que **se pega al operador**, obstruyendo al **promotor** (y por lo tanto a la transcripción), del gen estructural. El regulador no tiene que estar adyacente a los otros genes en el operón. Cuando se remueve la proteína represora, puede producirse la transcripción. El **operador** y el **promotor** son sitios de unión sobre el ADN y no se transcriben.

1.3 BIOPELÍCULAS

En el siglo XVII, Antón von Leewenhoek, el inventor del microscopio, observó agregaciones microbianas (conocidas hoy como biopelículas [2, 5, 8, 15]) en las superficies de los dientes. Pero fue William Costerton, en 1978, quien puso adelante una teoría de biopelículas que explicaba los mecanismos por los cuales los microorganismos se adhieren a materiales vivientes y no vivientes y los beneficios acrecentados por este nicho ecológico. Desde entonces investigadores han centrado su interés en un mejor entendimiento acerca de la formación y funcionamiento de las biopelículas.

1.3.1 Definición. Una biopelícula es una ensambladura de células microbianas (bacteria, fungi, alga, y protozoo) que están irreversiblemente asociadas a una superficie e incluidas en una matriz de material polisacárido principalmente. Las biopelículas presentan características como: adherencia a la superficie, heterogeneidad, diversidad de microambientes (pH, tensión O₂, concentración de iones, carbono y nitrógeno), presencia de un sistema circulatorio primitivo, resistencia a las defensas del hospedero y capacidad de comunicación intercelular (Quorum sensing)

Los microorganismos asociados a la biopelícula, exhiben un comportamiento diferente al de su contraparte planctónica, – células que nadan libremente en algún medio líquido –. Esta diferencia radica en los genes que estas transcriben, es decir se encienden y apagan genes específicos.

1.3.2 Formación de la Biopelícula. Cuando una biopelícula empieza a formarse, pasa por diferentes etapas las cuales se muestran en la Figura 1

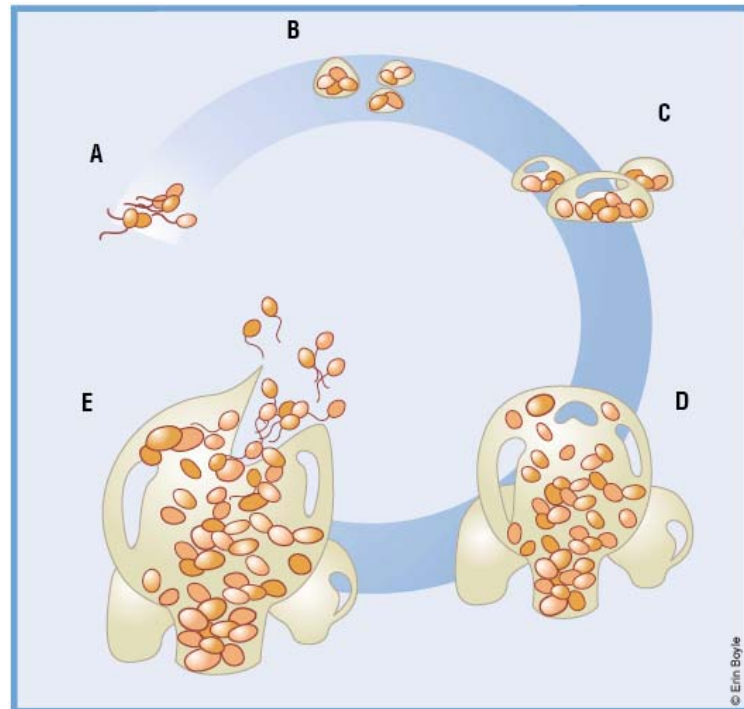


Figura 1. Las cinco etapas de la formación de la biopelícula Bacteriana. Fuente: Nature Biotechnology.

En la primera etapa (A), **la bacteria se adhiere reversiblemente a un sustrato**; células bacterianas que nadan libremente aterrizan en una superficie arrojándose en clusters y adhiriéndose. Las células se adhieren inicialmente mediante fuerzas de Van der Waals débiles y reversibles

En la segunda etapa (B), **la bacteria se vuelve irreversiblemente adherida y agregada para empezar a formar la matriz**. La adhesión es un proceso complejo donde influyen diferentes factores como el tipo de sustrato, la hidrodinámica del fluido, característico del medio y propiedades de la célula. Se ha mostrado que superficies rugosas e hidrofóbicas, así como incrementos en la velocidad de flujo, temperatura y nutrientes podrían acelerar el proceso de

adhesión. Los flagelos y las fimbrias también contribuirían a la adhesión, probablemente venciendo la barrera inicial de repulsión electrostática entre las células y el sustrato.

Las primeras colonizadoras, brindan más sitios de adhesión a las otras al empezar a construir la matriz extracelular; la cual esta formada en su mayor parte por sustancias poliméricas extracelulares (EPS, siglas en inglés). Las EPS pueden variar en las propiedades físicas y químicas, pero son los polisacáridos hechos por microbios residentes los que forman el mayor componente extracelular de la matriz. En el caso de las bacterias gram negativas, hacen biopelículas neutrales o polianiónicas, lo cual representa una ventaja ya que por ejemplo, las EPS aniónicas interactúan con iones metálicos ofreciendo estabilidad a la matriz.

La tercera etapa (C), es una **fase de maduración: la bacteria se dispone en capas y los efectos de Quorum Sensing (QS) empiezan [16]**; la formación de la biopelícula implica más que la adhesión de la bacteria a un sustrato, los organismos de forma individual, se van agregando con los de su clase, y con frecuencia se congregan con miembros de otras especies. La bacteria logra esto mediante la secreción de componentes – similares a las hormonas – llamadas autoinductores (autoinducer), las cuales son producidas por estas a un nivel bajo. Cuando estos autoinductores alcanzan un nivel de concentración, indicando que la población de microbios ha alcanzado una densidad mínima, interactúan con los reguladores transcripcionales de la bacteria, lo que significa regulación de la expresión de los genes, en otras palabras los organismos experimentan cambios fenotípicos.

Resumiendo, QS es un mecanismo en el cual las bacterias se comunican una con la otra; “habla” con el fin de coordinar cierto comportamiento y acciones entre ellas dependiendo de su número.

Existen diferentes tipos de señales, entre estas la AI-2 (furanosylborate), que es producido por la *E. coli*. Esta habilidad de comunicarse se da no solo entre organismos de la misma especie, estas señales pueden interferir con las QS señales de otra. Las señales de QS están relacionadas en diferentes funciones biológicas importantes como: luminiscencia, motilidad, virulencia, formación de biopelícula, entre otras.

En la cuarta etapa (D), **los clusters alcanzan máxima densidad**. Una técnica llamada “Microscopía confocal mediante escaneo láser”, permitió cambiar la idea que se tenía acerca de la biopelícula como una única capa uniforme. Esta técnica permitió ver diferentes capas a diferentes profundidades dentro de una biopelícula viviente y ponerlas juntas para crear una representación en tres dimensiones. Aprovechando esta técnica se pudo mostrar que las bacterias crecían en pequeños enclaves (microcolonias), separadas por una red de canales. El flujo que pasa a través de estos pequeños conductos brinda a cada agregación de microbios nutrientes y los libera de productos indeseables (basura).

La densa agregación de células y la matriz actúan como barreras para el flujo de agua, es por esto que las células ubicadas en el exterior se dan por bien servidas por el flujo de nutrientes, mientras que las que están en el interior, deben hacer que los nutrientes se difundan hacia ellas. Esta es una tarea fácil mientras que la sustancia no reaccione con las células o el material de la matriz a lo largo de su camino. Estos gradientes químicos promueven la coexistencia de diversas especies y estados metabólicos.

Estas condiciones difieren marcadamente de la típica uniformidad observada en los cultivos de los laboratorios. Es por esta razón, que los antibióticos que funcionan contra organismos en estado planctónico (como lo hacen la mayoría de los antibióticos), con frecuencia, no funcionan con los mismos organismos en la

biopelícula, o simplemente, el antibiótico reacciona antes de poder llegar al interior de la biopelícula.

En la quinta y última etapa (E), el **escape de bacterias planctónicas de la matriz**, algunas células vuelven a su estado planctónico, este desprendimiento puede deberse a una separación de las células hijas de las células crecientes activamente, de los niveles de nutrientes y QS o por fuerzas físicas, es decir desprendimiento debido al flujo o por choque de partículas que vienen en el fluido.

1.4 COMO CULTIVAR LAS BACTERIAS

Las bacterias necesitan un medio adecuado para crecer y técnicas asépticas para garantizar su pureza. Aunque existen diferentes técnicas de conservación, medios de cultivos, a continuación solo se van a explicar aquellos utilizados en el desarrollo experimental de este trabajo.

1.4.1 Conservación de las cepas. La congelación se aplica en el laboratorio para conservar las cepas durante largos periodos de tiempo. Las cepas se conservan en pequeños tubos que contienen glicerol (50% v/v) y se mantienen refrigeradas a -80°C.

1.4.2 Medios de Cultivo. Los medios de cultivos son soluciones acuosas que contienen todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, en la búsqueda de simplicidad en algunos pasajes de este trabajo se referirá a ellos simplemente como medios. Para el crecimiento de la *E. coli* se utilizó un medio complejo (complex medium), como lo es el Luria Bertani (LB), el cual se obtiene añadiendo a un litro de agua destilada: 10 gramos de NaCl, 10 gramos de Triptona y 5 gr de Extracto de levadura. Este medio es comúnmente utilizado cuando se trata de obtener un buen crecimiento bacteriano.

Al adicionar Kanamicina lo convierte en uno selectivo en cuanto crecen sólo las cepas resistentes al mismo, en este caso las mutantes *yngB* y *gadE*.

También se encuentran los medios sólidos, que consisten en el mismo medio líquido nutritivo (complejo o selectivo) adicionado con un gelificante como el agar, el cual puede ser vertido en placas de petri donde se solidificará; a estos se le llaman placas de agar. En las placas de agar se pueden sembrar las cepas para obtener colonias puras (Anexo A), que después serán inoculadas en el medio líquido.

1.4.3 Esterilización. Para lograr mantener los instrumentos y medios de cultivos libres de contaminación se utiliza la llama directa y el Autoclave. Para esterilizar el asa de siembra esta se somete unos instantes a la llama (hasta que adquiere un color rojizo) y después se deja enfriar por unos segundos ya sea para realizar la siembra en las placas de agar o para realizar la inoculación. Para esterilizar los sólidos (erlenmeyers, pipetas, tubos de centrifuga, etc) se utiliza un ciclo seco de aproximadamente 1 hora. Mientras que para los líquidos (medios de cultivos, glicerol) el ciclo es de aproximadamente 30 minutos.

1.4.4 Crecimiento de la bacteria. Una vez el medio es inoculado empieza el crecimiento de la bacteria. Este es un sistema de cultivo cerrado [1] ya que no hay aporte continuo de nutrientes, ni drenaje de células ni de desechos. Las bacterias en un sistema como este, experimentan diferentes fases como las que se muestran en la Figura 2

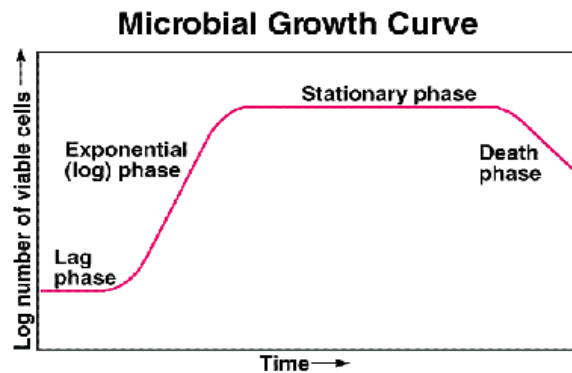


Figura 2. Curva típica de crecimiento Microbiano. Fuente: Microbiología General

La primera fase, **la fase de retardo (lag phase)**, es el periodo de adaptación del inóculo a las condiciones del medio nuevo donde fue sembrado, hay un ajuste metabólico. La segunda fase de transición, **de crecimiento acelerado** que conduce a la tercera fase, es **la fase exponencial o logarítmica**, donde las células están en un crecimiento balanceado o equilibrado (en el que todos los componentes aumentan una misma proporción por unidad de tiempo). Cuando el crecimiento cesa como consecuencia de la terminación de un único nutriente esencial, mientras los demás aun están disponibles, esto conlleva a la cuarta fase, **una fase de aceleración negativa**. Seguida a esta fase, esta la **fase estacionaria**, el coeficiente neto de crecimiento es cero pero aún existe crecimiento, lo que sucede es que el crecimiento bruto se compensa con las muertes celulares. En esta fase el metabolismo es diferente al de la exponencial. Finalmente la sexta y ultima fase, **fase de muerte exponencial**, en la cual hay una muerte masiva, exponencial del cultivo por agotamiento de reservas de energía.

Es posible saber en que etapa de crecimiento se encuentra la bacteria en el cultivo, mediante un método indirecto para saber su número, como lo son los métodos turbidimétricos (ópticos), los cuales consisten en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano. La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

Es por esta razón que se utiliza el espectrofotómetro, para medir la densidad óptica (DO), es decir la absorbancia.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describirán los procedimientos realizados para llevar a cabo esta investigación. Estos procedimientos hacen parte de protocolos establecidos en el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Texas A&M, el cual es dirigido por el Dr Thomas K Word.

2.1 CULTIVO DE LAS BACTERIAS

Con un asa estéril se toma la muestra del glicerol y se siembra en un plato de agar para la cepa silvestre y de agar+50 µg/ml de Kanamicina para las cepas mutantes. Las placas son incubadas a 37 °C durante toda la noche. Después se procede a inocular el medio líquido, para el cual se toma una asa esterilizada y se toca una sola colonia del plato, esta se introduce en el medio de LB (cepa silvestre) y LB+Kan50 (cepa mutante) que se encuentra en un Erlen Meyer debidamente esterilizado. Este cultivo se deja crecer a 37°C, en constante agitación.

2.2 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas usadas en este estudio se encuentran listadas en la Tabla 1. Todas las células de *E. coli* fueron pre-cultivadas en 25 mL de LB a 37°C, en constante agitación. Tanto LB como LB suplementado con 0.2% (w/v) de glucosa (LB glu) fueron utilizados como medios de crecimiento en los experimentos realizados. Para la selección de cepas mutantes, se usaron 50 µg/ml de Kanamicina; para ajustar el pH de los medios, se utilizaron HCl 37% y NaOH 2M.

Ya que los mutantes *yngB* y *gadE* hacen parte de mecanismos conocidos de acido-resistencia en la *E. coli* y son objeto de investigación actual en este laboratorio, se propuso investigar la respuesta de los mutantes en cita a cambios de pH en el medio

CEPAS	GENOTIPO
<i>E. coli</i> K-12 BW25113	<i>lacI^f rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBA-D_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>
<i>E. coli</i> K-12 BW25113 <i>ΔgadE</i>	K-12 <i>ΔgadE::Km^R</i> , defectuoso en un regulador de resistencia acida
<i>E. coli</i> K-12 BW25113 <i>ΔymgB</i>	K-12 <i>ΔymgB::Km^R</i> , defectuoso en resistencia ácida

Tabla 1. Cepas usadas. Km^R es Resistencia a la Kanamicina. Fuente: Molecular Systems Microbiology

2.3 ANÁLISIS DE BIOPELÍCULA UTILIZANDO PLATOS DE 96 POZOS

Este análisis fue ligeramente modificado del reportado por Pratt y Kolter. Las cepas fueron cultivadas durante toda la noche; estos cultivos fueron diluidos hasta una DO₆₀₀ de 0.05 en LB y LB glu; el pH de cada uno de los medios fue ajustado previamente a valores de 4 hasta 9. De esta solución formada, 300 μL fueron inoculados en cada uno de los pozos del plato esterilizado como se puede observar en la Figura 3; las cepas crecieron durante 24 horas a 37° C sin agitación.

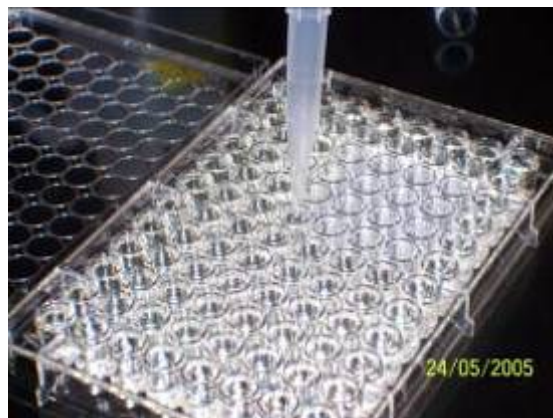


Figura 3. Inoculación de la Bacteria en el plato de 96 pozos.

Para obtener el crecimiento total de la bacteria, el plato fue puesto en un lector (Figura 4) con la longitud de onda ajustada en 620 nm. Para cuantificar la masa total de biopelículas formada, la suspensión de células fue removida y el plato fue lavado con agua tres veces.



Figura 4. Lector de platos utilizado para medir la DO_{620} .

Las biopelículas fueron teñidas con 0.1% de cristal violeta por veinte minutos (Figura 5) y el exceso de tinte fue removido lavando tres veces el plato con agua fría. La mancha remanente fue disuelta añadiendo 300 μ L de etanol 95% a cada uno de los pozos.



Figura 5. Tinción de las Biopelículas formadas con cristal violeta.

Finalmente se midió la densidad óptica a 620 nm para cuantificar la masa de biopelícula formada.

2.4 ANÁLISIS DE MOTILIDAD

Del cultivo de la noche anterior, 1 mL fue utilizado para re-inocular 25 mL de LB y LB glucosa. Una vez las células alcanzaron una $DO_{600} \approx 1$, fueron pinchadas con palillos esterilizados en un plato con agar. Los platos contenían 1% de triptona, 0.25 % de NaCl y 0.3% de agar con el pH previamente ajustado a 6, 7 y 8. Los halos de motilidad (Figura 6) fueron medidos después de 5 y 8 horas de incubación a 37°C. Dos platos fueron utilizados para evaluar la motilidad de cada cepa a cada valor de pH del plato. El experimento fue realizado en duplicado.



Figura 6. Muestra de Halos de Motilidad obtenidos para la E. coli en LB a pH 8.
De izquierda a derecha: la cepa silvestre, *yngB* y *gadE*

2.5 ANÁLISIS DE AGREGACIÓN

Este análisis fue adaptado de [14] Roux et al. Los cultivos de las cepas de la noche anterior fueron diluidos en 3 mL de LB y LB glucosa con el pH ajustado a 6, 7 y 8. La DO_{600} de los cultivos diluidos fue ajustada a 2.5 sin antibióticos y estos fueron puestos en tubos esterilizados.

Estos tubos fueron incubados sin agitación a 37°C por 24 horas, la DO₆₀₀ fue medida 5 mm por debajo de la superficie para determinar la concentración de células por una medida indirecta de la agregación celular.

2.6 ANÁLISIS DE INDOL EXTRACELULAR

Los cultivos de la noche anterior fueron diluidos 1:100 en 25 mL de LB y LB glu con el pH ajustado en 5, 7 y 8; las concentraciones de indol fueron medidas, para una DO₆₀₀ ≈ 1 (fase exponencial) y después de 6 y 9 horas (fase estacionaria) de hacerse la re-inoculación.

Para medir las concentraciones de indol extracelular se tomaron muestras de 1 mL y la DO₆₀₀ fue medida; las muestras fueron centrifugadas en una microcentrífuga a velocidad máxima (14.000 rpm) durante aproximadamente un minuto y medio. El sobrenadante fue transferido a un tubo donde fue mezclado con 0.4 mL del reactivo de Kovacs (5 g de *p*-dimetilamino-benzaldeído, 25 mL de HCl y 75 mL de alcohol amílico). La solución fue mezclada y centrifugada para permitir separarla en dos fases (si hay presencia de indol, la parte superior adquiere un color rosado, rojo o morado). De la mezcla de la reacción, 0.1 mL fueron diluido con 0.9 mL de una mezcla de HCl-alcohol amílico (30 mL de HCl y 90 mL de alcohol amílico) y la absorbancia fue medida a 540 nm. La concentración de indol fue calculada con la curva de calibración.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se muestran y discuten los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados en esta investigación. Se trata de dar una interpretación y relacionar los cambios observados en los fenotipos de la bacteria con los cambios observados en la formación de biopelículas al cambiar el pH del medio.

3.1 ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Una vez obtenidos los datos se calculó la formación de biopelícula para cada una de las cepas como sigue; la lectura obtenida para los pozos inoculados sin bacteria – alcohol al 95% (el blanco) –, fue restada de la lectura correspondiente a la formación de biopelícula. Cada valor obtenido en la Tabla 2 y Tabla 3 es el resultado del promedio de dos cultivos independientes, cada uno replicado en 10 pozos.

Tabla 2. Valores Correspondientes a la Formación de Biopelícula en LB después de 24 h de incubación.

pH del Medio	DO ₆₂₀ de las Cepas		
	<i>E. coli</i> silvestre	<i>ymgB</i>	<i>gadE</i>
pH= 3	0.009 ± 0.004	0.006 ± 0.003	0.009 ± 0.004
pH= 4	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.001
pH= 5	0.400 ± 0.069	0.384± 0.035	0.263 ± 0.020
pH= 6	0.493 ± 0.236	0.385 ± 0.100	0.278 ± 0.083
pH= 7	0.324 ± 0.076	0.287 ± 0.031	0.222 ± 0.031
pH= 8	0.205 ± 0.034	0.213 ± 0.001	0.156 ± 0.000
pH= 9	0.067 ± 0.031	0.018 ± 0.002	0.047 ± 0.004

Tabla 3. Valores Correspondientes a la Formación de Biopelícula en LB glu después de 24 h de incubación.

pH del Medio	DO ₆₂₀ de las Cepas		
	<i>E. coli</i> silvestre	<i>yngB</i>	<i>gadE</i>
pH= 3	0.020 ± 0.005	0.011 ± 0.003	0.015 ± 0.004
pH= 4	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.002	0.005 ± 0.002
pH= 5	0.057 ± 0.012	0.075 ± 0.009	0.047 ± 0.009
pH= 6	0.033 ± 0.010	0.087 ± 0.035	0.133 ± 0.146
pH= 7	0.069 ± 0.043	0.149 ± 0.023	0.340 ± 0.135
pH= 8	0.658 ± 0.318	0.375 ± 0.027	0.529 ± 0.073
pH= 9	0.534 ± 0.067	0.177 ± 0.015	0.073 ± 0.010

Para observar mejor la diferencia en la formación de biopelículas entre los diferentes pHs, los medios y las distintas cepas, se realizaron las siguientes graficas:

Al analizar el Grafico 1 se puede observar una diferencia clara en la formación de biopelícula para cada valor de pH; existe una tendencia creciente a formar biopelícula a medida que el pH es más ácido, exceptuando la formación de biopelícula a pH 5, para el cual se muestra una pequeña disminución respecto a la formación de biopelícula a pH 6.

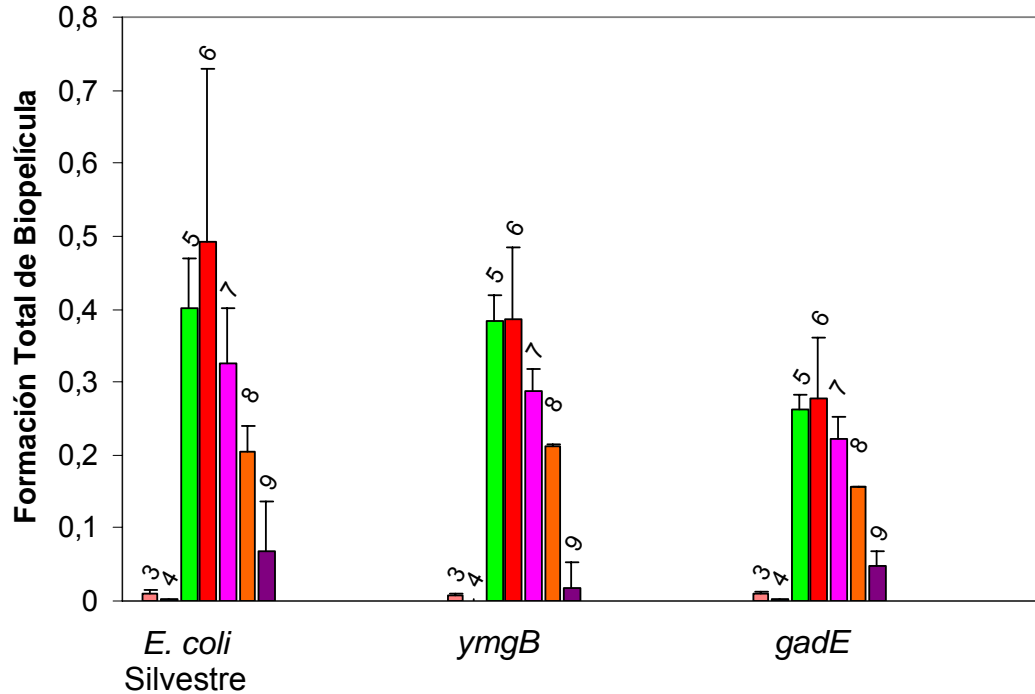


Grafico 1. Formación Total de Biopelícula en LB después de 24 h.

Para los pHs 3, 4 y 9, hay una drástica disminución en la formación de biopelícula, comparada con la del pH 7; al comparar el crecimiento total (ver anexo B) obtenido para los pHs del 5 al 9, – una DO_{600} de aproximadamente 0.037 – con la de los otros pHs (3, 4 y 9), la cual va de 0.6 hasta 1, se puede concluir que en el medio de LB a los pHs: 3, 4 y 9, no es posible el crecimiento de las cepas, por consiguiente no hay formación de biopelícula.

Al comparar la formación de biopelícula de los mutantes respecto a la cepa silvestre, se observó que para todos los pHs la formación de los mutantes fue levemente menor que la de la cepa silvestre.

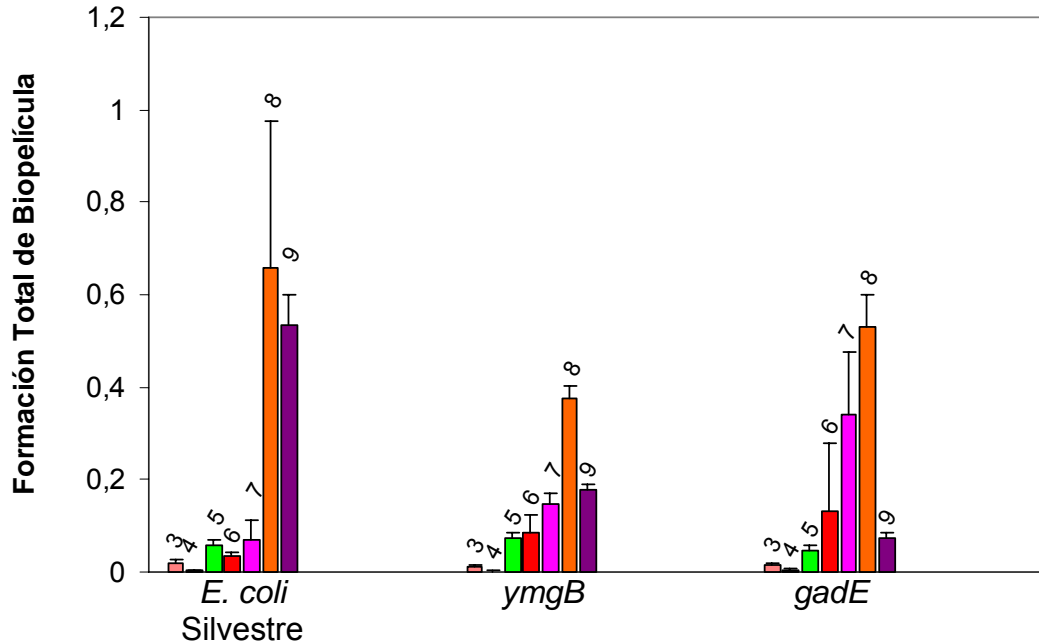


Grafico 2. Formación Total de Biopelícula en LB glu después de 24 h.

En el Grafico 2 se puede observar una tendencia a formar más biopelícula a pHs básicos encontrándose una marcada diferencia entre pH 7 y 8 especialmente para la cepa silvestre, 9.5 veces más formación de biopelícula. Esta misma tendencia se puede observar cuando se analiza el crecimiento total, hay más crecimiento de las cepas a medida que el medio es más básico.

Al comparar la formación de biopelícula de las cepas mutantes *ymgB* y *gadE*, con la de la cepa silvestre, se puede observar que hubo una mayor formación de los mutantes a los pHs 5, 6 y 7; siendo a pH 7 donde se obtuvo el cambio más significativo; *ymgB*, 2 dobles y *gadE*, 5 dobles más que la cepa silvestre.

Estas dos tendencias obtenidas al cambiar el pH del medio, mayor formación de biopelículas a pH bajos en LB y mayor formación de biopelículas a pHs altos en LB glu, le dieron la importancia necesaria a estos resultados para seguir investigando si se obtendrían cambios similares en otros fenotipos de la bacteria, y

de este modo, establecer las relaciones necesarias que traten de explicar la razón de este comportamiento.

3.2 ANÁLISIS DE MOTILIDAD

Para realizar el análisis de la motilidad de las cepas se utilizaron los diámetros de motilidad medidos a 8 horas, ya que transcurrido este tiempo se pueden observar diámetros más definidos permitiendo establecer relaciones de una forma más clara y precisa.

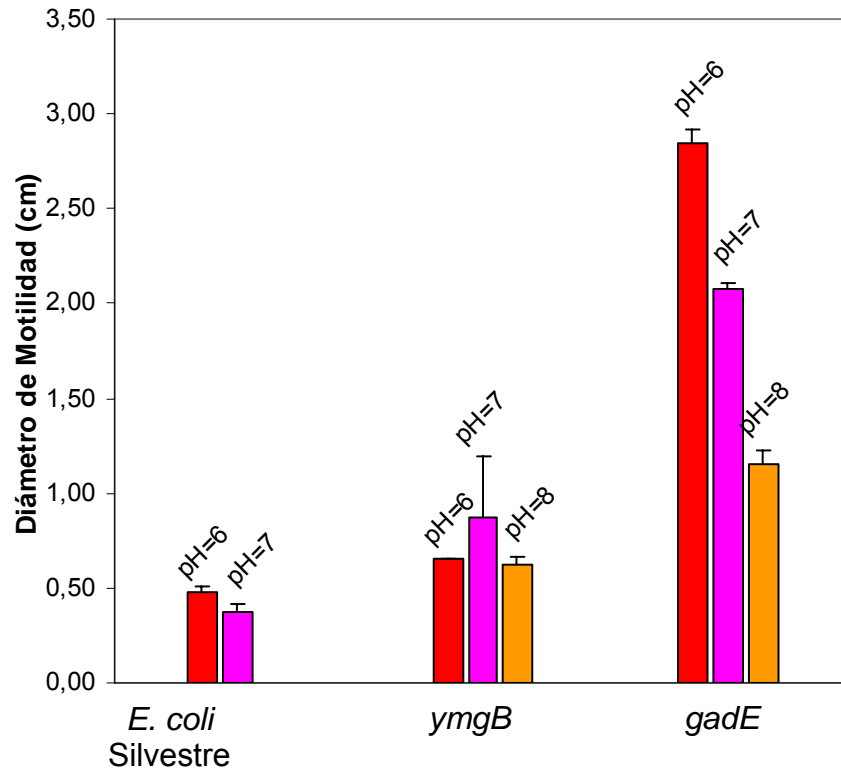


Grafico 3. Valores de diámetro de motilidad después de 8 horas de incubación utilizando LB.

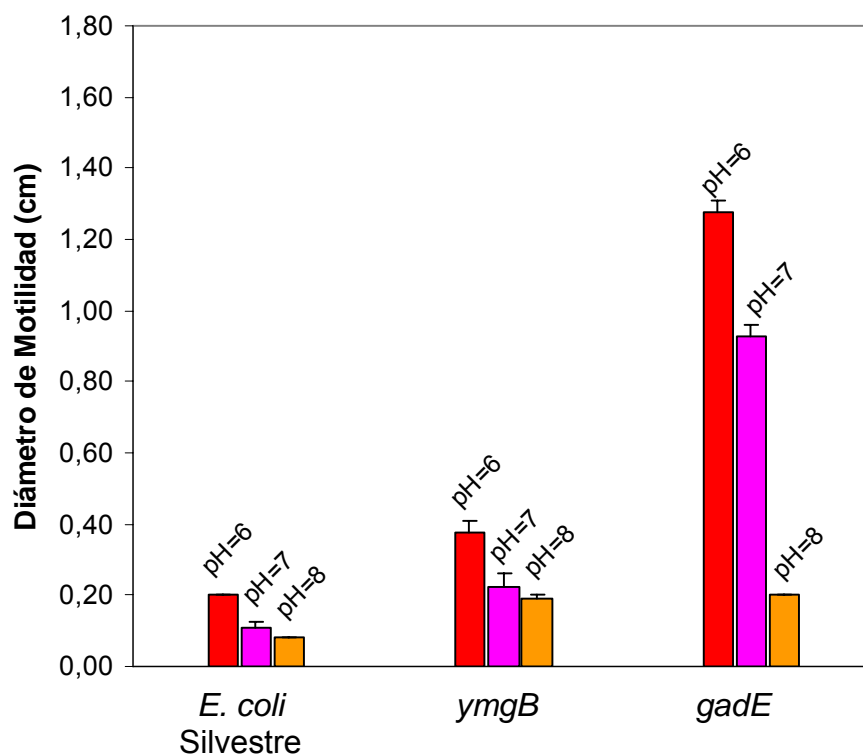


Grafico 4. Valores de diámetro de motilidad después de 8 horas de incubación utilizando LB glu.

En el Grafico 3 y Grafico 4, puede observarse que hay menor motilidad de las cepas a medida que el medio se hace más básico. Esta misma tendencia fue obtenida en ambos medios. Estos resultados habían sido reportados previamente [12]; los autores atribuyen esta disminución de motilidad a la represión de genes del regulador flagelar, además de algunos de los genes *che* y *mot* (relacionados con la quimiotaxis) a un pH alto.

El hecho de que las cepas hayan tenido una mayor motilidad a un menor pH, podría estar relacionado con la mayor formación de biopelícula observada a pH básicos al utilizar el medio de LB, ya que en estudios previos [13] se ha mostrado que la motilidad juega un papel importante en las primeras etapas de la formación de las biopelículas.

En el caso de el medio de LB glucosa, esta hipótesis no se ajusta, ya que las tendencias apuntan a direcciones contrarias, es decir se obtuvo mayor formación de biopelícula a pH básicos, y mayor motilidad a pH ácidos. Esto quiere decir que existe otra razón por la cual se ha obtenido mayor formación de biopelícula a pH altos en LB glu.

Las cepas mutantes *gadE* y *yngB*, presentan más motilidad que la cepa silvestre, especialmente la *gadE*. A pesar de haber una mayor motilidad de las mutantes, no se obtuvo una mayor formación de biopelícula por parte de estas respecto a la cepa silvestre cuando los dos medios fueron usados.

3.3 ANÁLISIS DE AGREGACION

Las DO_{600} obtenidas para cada pH después de 24 horas de incubación fueron graficadas para cada cepa.

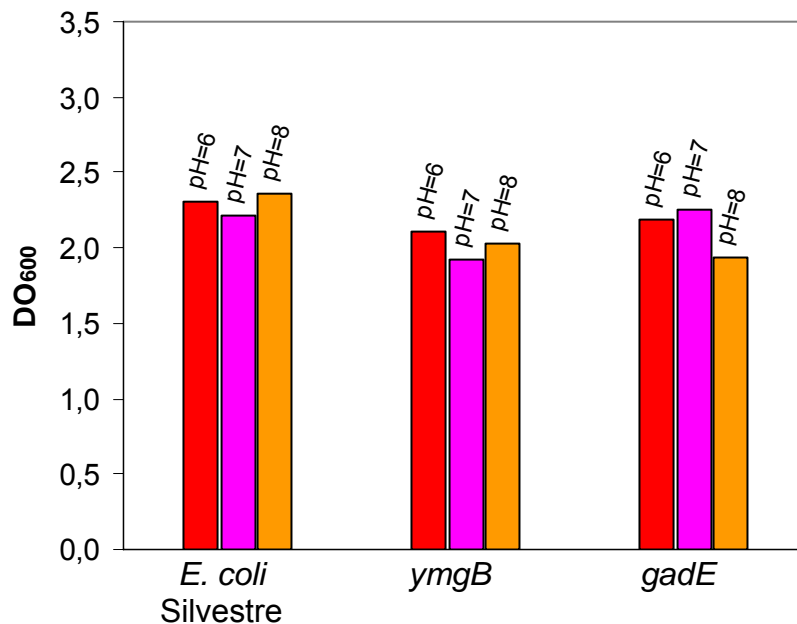


Grafico 5. DO_{600} obtenidas después de 24 h de Incubación en LB.

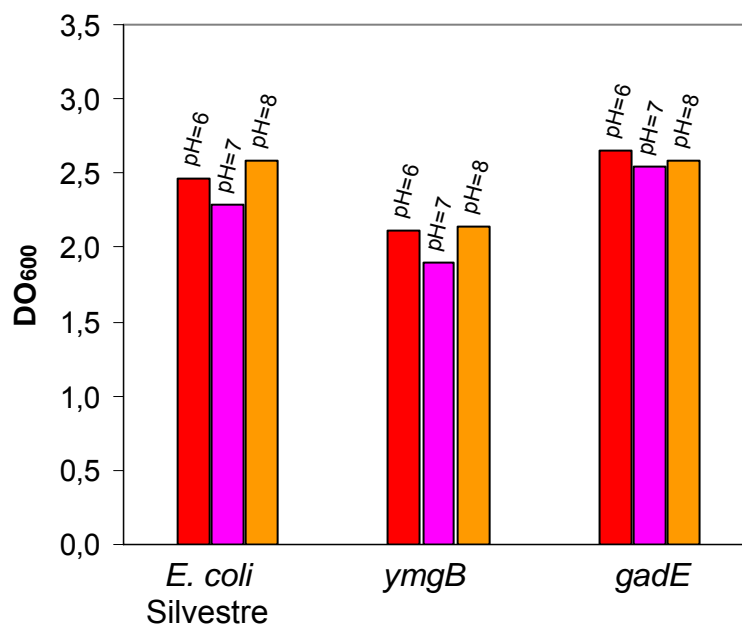


Grafico 6. DO_{600} obtenidas después de 24 h de Incubación en LB glu.

Se ha demostrado que la formación de agregados regula el desarrollo de biopelículas en la *Serratia liquefaciens* MG1 [10]; disminuye la motilidad e incrementa la formación de biopelícula de la *E. coli* [9]. Siguiendo este orden de ideas se quiso investigar si existía algún cambio en la agregación de las células cuando se sometían a un cambio de pH en el medio.

Al analizar los resultados obtenidos y mostrados en los gráfico Grafico 5 y el Grafico 6, se pudo observar que no hubo variación significativa en la agregación de las células cuando hubo cambio en el pH de el medio en LB y LB glu.; se concluye que no hay ninguna relación entre el aumento de formación de biopelícula con el pH y la agregación de las células.

Las cepas mutantes *ymgB* y *gadE*, mostraron el mismo comportamiento observado en la cepa silvestre tanto en la formación de biopelícula como en los

ensayos de motilidad al variar el pH; dejando ver de este modo que la carencia de estos genes no afecta el comportamiento de la *E. coli* cuando se somete a cambios de pH.

3.4 ANÁLISIS DE INDOL EXTRACELULAR

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia de las muestras, se procedió a calcular la concentración de Indol presente mediante la ecuación obtenida de la curva de calibración (ANEXO D):

$$\text{Indol } (\mu\text{M}) = 110(\text{OD}_{540})^2 + 121(\text{OD}_{540}) + 5.3$$

Para normalizar las concentraciones obtenidas estas fueron divididas por la DO_{600} .

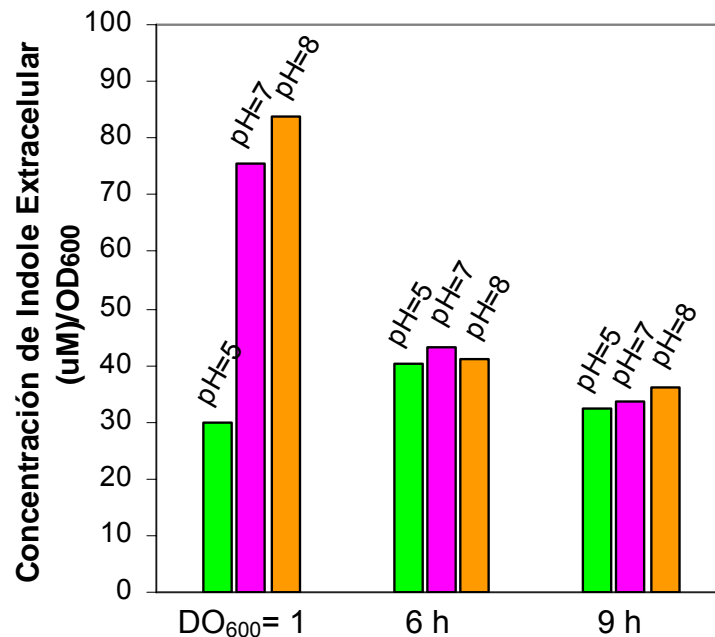


Grafico 7. Concentración de Indol Extracelular en LB para la cepa silvestre a una $\text{DO}_{600}=1$ y después de 6 y 9 horas de incubación.

En el Grafico 7 se puede observar una mayor concentración de indol a medida que el pH aumenta cuando la cepa se encuentra en la fase exponencial tardía ($DO_{600}=1$); presentándose una marcada diferencia entre pH 5 y 7 (2.5 veces más concentración de indol a pH 7 que a pH 5). Este aumento en la concentración de indol estaría relacionado con la inducción de la proteína Triptofanasa (TnaA) a un pH alto [3, 18].

Para la fase estacionaria, las concentraciones de indol permanecieron prácticamente invariables con el pH. Este hecho podría estar relacionado con el pH medido en el momento en que la prueba fue realizada, un valor de 8.5 para el pH inicial de 5; 8.7 para el pH inicial de 7 y 8.8 para el pH inicial de 8; el valor es prácticamente el mismo para los tres pH utilizados inicialmente.

La concentración de indol prácticamente constante obtenida para los tres pHs en LB sugiere que el indol no participa en el aumento de biopelícula observado en este medio.

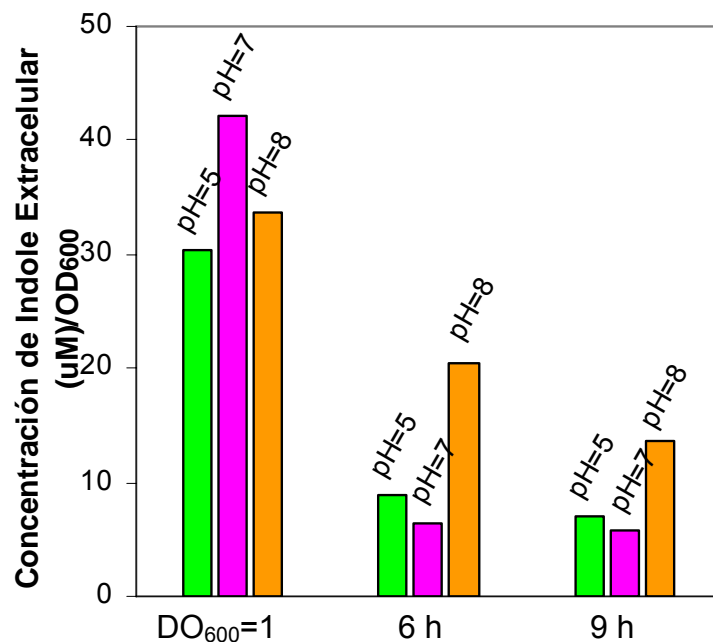


Grafico 8. Concentración de Indol en LB glu para la cepa silvestre a una $DO_{600}=1$ y después de 6 y 9 horas de incubación

Cuando el medio de LB glu fue usado (Grafico 8), se obtuvo una mayor concentración de indol a pH 7 en la fase exponencial de crecimiento y para la fase estacionaria se obtuvo una alta concentración a pH 8 comparado con la de pH 7, 3 y 2 veces mas concentración a 6 y 9 horas respectivamente. Esta diferencia podría explicarse también como consecuencia del pH medido en el momento de la prueba; para el pH 7 usado inicialmente, el pH medio al final fue alrededor 5, mientras que para el pH 8 fue de 7.8 después de 6 horas y 8.6 después de 9 horas de la inoculación. Adicionalmente, no solo hay una inducción de TnaA a un pH alto, también hay represión de esta en un ambiente externo ácido [3, 4, 17]

La gran diferencia obtenida en la concentración de indol entre pH 5 y 7, al igual que la gran diferencia en la formación de biopelícula entre estos dos pHs permitiría establecer la siguiente relación: a mayor concentración, mayor formación de biopelícula (como sucede a pH 8) y a menor concentración, menor formación de biopelícula (como sucede a pH 5). Estas relaciones podrían sustentarse con los resultados obtenidos en [6], los cuales mostraron que la adición de indol exógeno inducía la formación de biopelícula en la *E coli*. y la inactivación del *tnaA* (codifica para la síntesis de Triptofanasa) estaba asociado con la disminución de formación de biopelícula. Sin embargo, en estudios recientes hechos por el grupo [7, 11], se ha mostrado que el indol reduce la formación de biopelícula, resultados que contradicen la hipótesis anterior.

De igual forma, se observó que la DO en LB fue mayor a pH ácido, mientras que en LB glu, la DO fue mayor a pH básico. Esta tendencia observada en el análisis de indol se hizo evidente también en el análisis de formación de biopelícula. En consecuencia, se podría pensar que la mayor formación de biopelícula se debe al mayor número de células (DO alta), sin embargo, al normalizar los valores de indol y de formación de biopelícula (datos no mostrados) se elimina la interferencia del

crecimiento celular en la interpretación de resultados. Por consiguiente, se podría decir que las diferencias de pHs en los medios afecta la formación de biopelícula.

CONCLUSIONES

- * Existen cambios en la formación de biopelícula de la *Escherichia coli* cuando se cambia el pH del medio.
- * La formación de biopelícula de la *E. coli* en LB aumenta con la acidez del medio, fenómeno probablemente relacionado con el aumento de la motilidad cuando el pH se hace más ácido.
- * Los análisis realizados en este estudio no permiten explicar el aumento de la formación de biopelícula observado al utilizar LB glucosa.
- * A pesar que en los métodos no se podía controlar que el número de bacterias fuera igual para todas las mediciones, los resultados de los experimentos realizados apuntan a que existe una dependencia en la formación de biopelícula con respecto al pH. Sin embargo, no hay aún datos suficientes como para clarificar a que se debe este efecto.
- * La eliminación de los genes *yngB* y *gadE* no afecta el comportamiento de la *E. coli* cuando es sometida a cambios de pH en el medio.

RECOMENDACIONES

* Aunque la bibliografía ofrece una amplia información acerca de la dependencia de la expresión de algunos genes con el pH del medio, cabría realizar un microarreglo, no solo para confirmar estas hipótesis, sino para obtener unas nuevas que logren explicar a cabalidad, los cambios en la formación de biopelícula observados en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

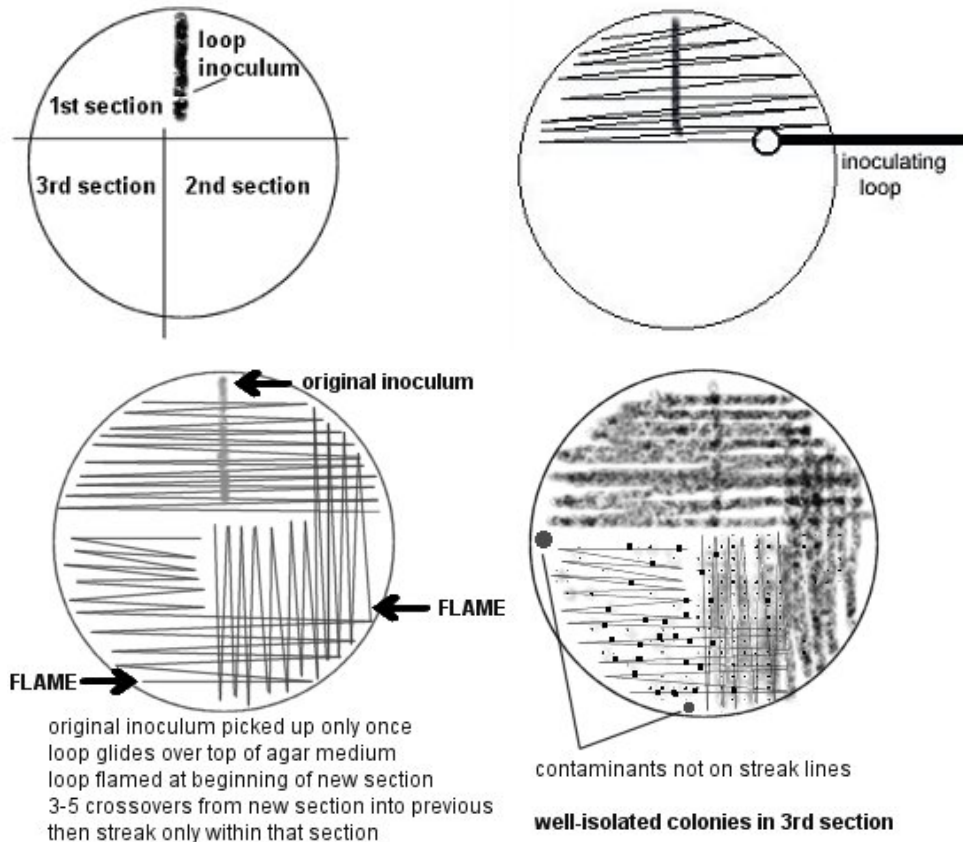
1. Microbiología General. Universidad de Granada. www.urg.com.
2. **Betancourth, M., J. E. Botero, and S. P. Riviera.** 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica* **35**:34-39.
3. **Blankenhorn, D., J. Phillips, and J. L. Slonczewski.** 1999. Acid- and base induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **181**:2209-2216.
4. **Botsford, J. L., and R. D. deMoss.** 1971. Catabolite repression of tryptophanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **105**:303-312.
5. **Costerton, J. W., and P. S. Stewart.** July 2001. Battling Biofilms. *Scientific American Magazine*.
6. **Di Martino, P., R. Fursy, L. Bret, B. Sundararaju, and R. S. Phillips.** 2003. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **49**:443-449.
7. **Domka, J., J. Lee, and T. K. Wood.** 2006. YliH (BssR) and YceP (BssS) Regulate *Escherichia coli* K-12 Biofilm Formation By Influencing Cell Signaling. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:2449-2459.
8. **Donlan, R. M.** 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. www.medscape.com.
9. **González Barrios, A. F., R. Zuo, D. Ren, and T. K. Wood.** 2006. Hha, YbaJ, and OmpA Regulate *Escherichia coli* K12 Biofilm Formation and Conjugation Plasmids Abolish Motility. *Biotechnology and Bioengineering* **93**:188-200.
10. **Labbate M., S.Y. Queck, K. S. Koh, S. A. Rice, M. Givskov, and S. Kjelleberg.** 2004. Quorum-sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186(3)**:692–698.

11. **Lee, J., V. M. Cassone, A. Jayaraman, and T. K. Wood.** Submitted for publication.
12. **Maurer, L. M., E. Yohannes, S. S. Bondurant, M. Radmacher, and J. L. Slonczewski.** 2005. pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **187**:304-319.
13. **Pratt, L. A., and R. Kolter.** 1998. Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation: Roles of Flagella, Motility, Chemotaxis and Type I pili. *Molecular Microbiology* **30**:285-293.
14. **Roux, A., C. Beloin , and J. M. Ghigo.** 2005. Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: Application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *J Bacteriol* **187**:1001–1013.
15. **Schachter, B.** 2003. Slimy business, the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology* **23**:361-365.
16. **Sperandio, V., A. G. Torres, and J. B. Kaper.** 2002. Quorum Sensing *Escherichia coli* Regulators B and C (QseBC): a Novel Two-component Regulatory System Involved in the Regulation of Flagella and Motility by Quorum Sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology* **43**:809-821.
17. **Stancik, L. M., D. M. Stancik, B. Schmidt, D. M. Barnhart, Y. N. Yoncheva, and J. L. Slonczewski.** 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:4246-4258.
18. **Yohannes, E., D. M. Barnhart, and J. L. Slonczewski.** 2004. pH-Dependent Catabolic Protein Expression during Anaerobic Growth of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **186**:192-199.

ANEXOS

ANEXO A. SIEMBRA POR AGOTAMIENTO

Haciendo una siembra por agotamiento en placas de agar, se puede obtener un cultivo puro, es decir se obtienen colonias aisladas que provienen de una sola célula. Para esto se toma la muestra (que se encuentra conservada en el glicerol) con el asa estéril y se hacen extensiones hasta la mitad de la placa. Se esteriliza nuevamente extendiendo parte de la primera extensión en otra dirección, esta operación se repite extendiendo parte de la segunda extensión en otra dirección. Después de incubar a 37°C durante la noche, se obtendrán colonias aisladas en la tercera zona.



ANEXO B. CRECIMIENTO TOTAL DE LAS CEPAS OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

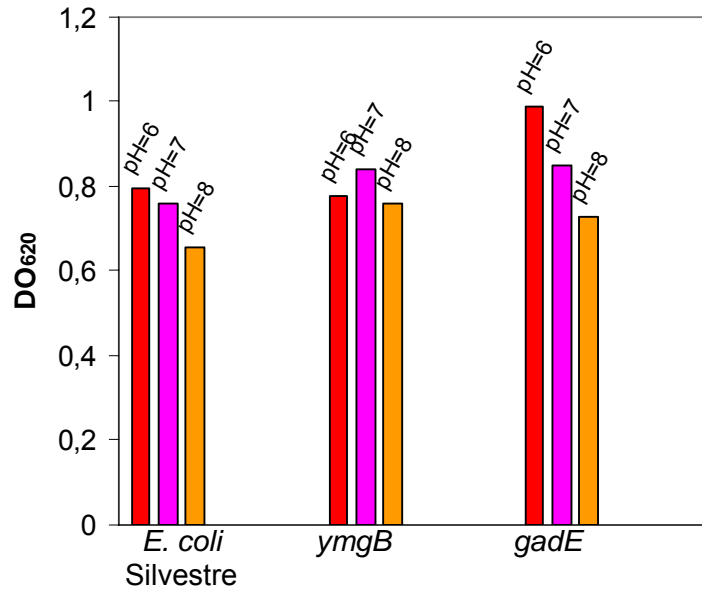


Grafico 9. Crecimiento Total en LB. Fuente: Autor del proyecto.

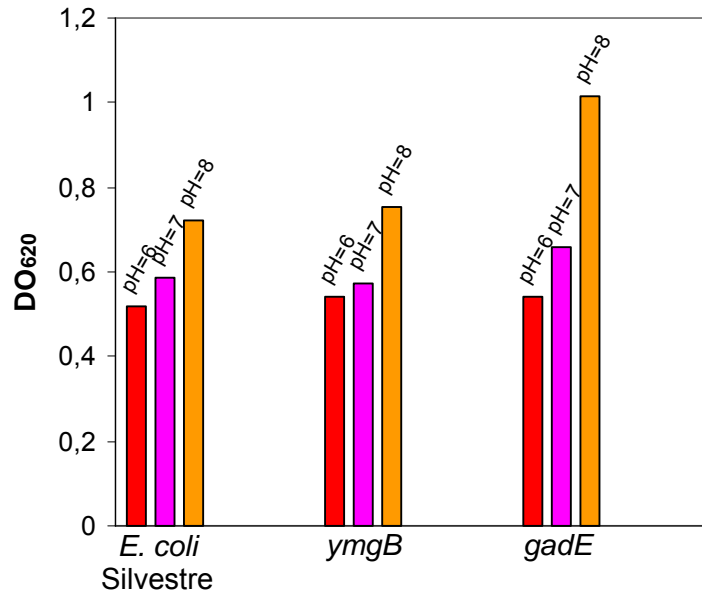
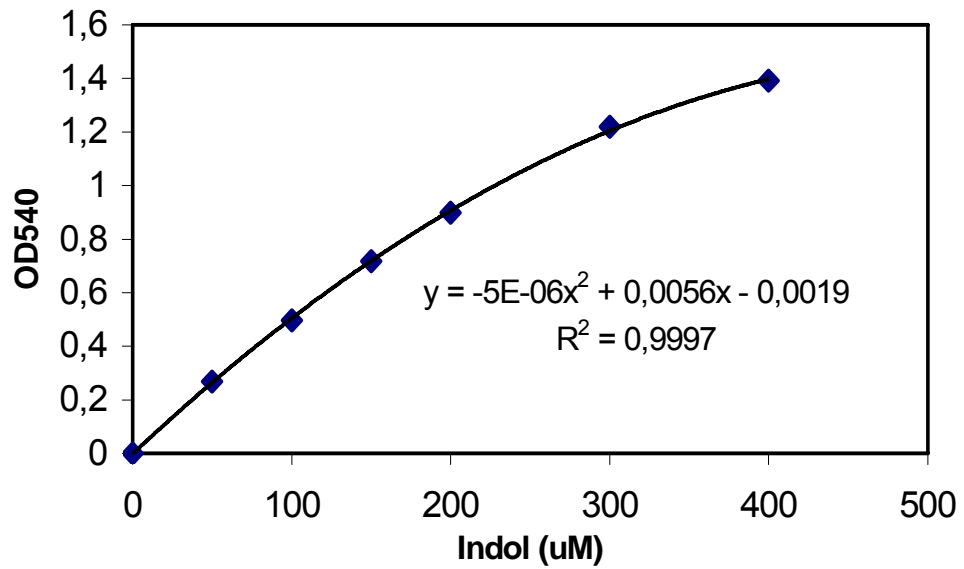


Grafico 10. Crecimiento Total en LB glu. Fuente: Autor del proyecto

ANEXO C. CURVA DE ESTANDARIZACION DEL INDOL



Fuente: Protocolo Laboratorio Dr Thomas Wood

ANEXO D. DENSIDAD OPTICA OBTENIDA EN EL ANÁLISIS DE INDOL

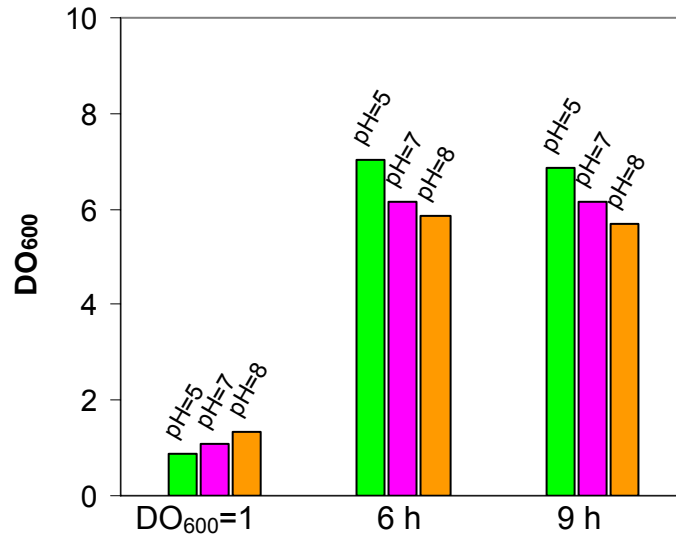


Grafico 11. DO₆₀₀ vs Tiempo usando LB.

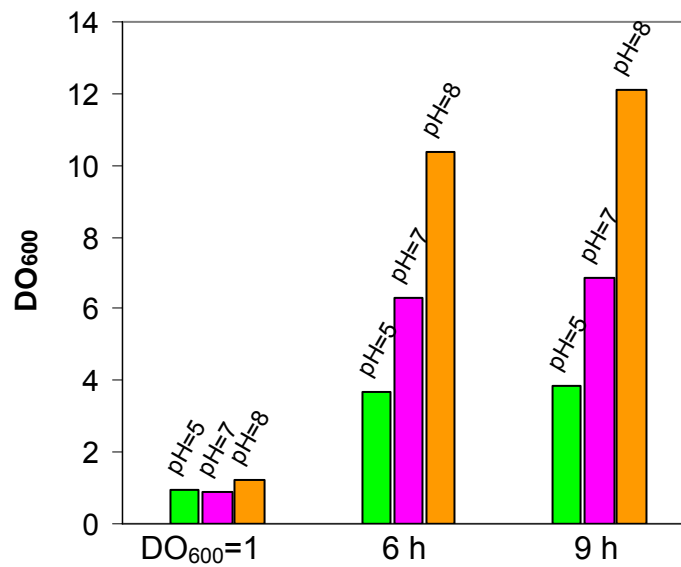


Grafico 12. DO₆₀₀ vs Tiempo utilizando LB glu.