

# SUPERVIVENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Vibrio*

## *cholerae* SOBRE QUITINA DE CAMARÓN

Milagro Fernández-Delgado, Paula Suárez, Zoilabet Duque, María Alexandra García-Amado y Mónica Contreras

### RESUMEN

La formación de biopelículas de *Vibrio cholerae* es un fenómeno que influye en el ciclo de vida de este patógeno humano y en su función ecológica en el ambiente. En este trabajo se propuso evaluar la supervivencia y formación de biopelículas de aislados de *V. cholerae* de origen clínico y ambiental con quitina natural. Se inocularon suspensiones bacterianas en medio sin nutrientes y caldo nutritivo con quitina obtenida de exoesqueleto de camarón, incubados a diferentes pH y temperaturas. En los ensayos de supervivencia, los aislados mantuvieron la capacidad de formar colonias por 31 días en condiciones de inanición y exposición a quitina como única fuente de carbono y nitrógeno. En el estudio de microscopía electrónica de barrido en modo ambiental se observó adhesión bacteriana a la superficie de qui-

tina, matriz extracelular y formación de biopelículas por 4-46h en presencia de nutrientes para ambos microorganismos. El aislado ambiental mostró en 25h arquitectura en las biopelículas con pilares y canales, mientras que el clínico presentó biopelículas en menor tiempo, sin formación de estructuras tridimensionales. En ambos aislados se detectó por PCR el gen *vpsR*, reportado para esta bacteria en la formación de biopelículas. Estos resultados muestran que *V. cholerae* aislado de humanos y aguas marino-costeras puede sobrevivir por periodos prolongados en asociación a organismos con cubierta de quitina y formar biopelículas. Esta investigación contribuye al conocimiento sobre las estrategias de supervivencia ambiental de *V. cholerae* y sus posibles vías de transmisión en humanos.

### Introducción

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en los ambientes marinos, luego de la celulosa, y soporta más del 10% de la producción bacteriana de estos ecosistemas (Lipp *et al.*, 2002). Este polisacárido está compuesto de cadenas de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) arreglados con configuraciones paralelas ( $\alpha$ ) o antiparalelas ( $\beta$ ). Ambas formas son encontradas en los ambientes marinos. Las formas  $\alpha$  constituyen la estructura de los caparzones de crustáceos, mientras que la  $\beta$ -quitina es producida por diatomeas y es el principal componente de la espina de los calamares (Hunt *et al.*, 2008; Pruzzo *et al.*, 2008). Los vibrios son miem-

bros ubicuos de la comunidad del bacterioplancton de los ambientes marinos costeros y heterótrofos obligados que pueden utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono, incluyendo la quitina, para obtener energía.

*Vibrio cholerae*, el agente causal del cólera, es una bacteria versátil que habita distintos ecosistemas acuáticos en forma de vida libre y en asociación a organismos invertebrados (Pruzzo *et al.*, 2006; Vezzulli *et al.*, 2010), que infecta el tracto gastrointestinal humano (Colwell, 2004). La adhesión de *V. cholerae* a quitina es un fenómeno de interés en la ecología microbiana y uno de los mejores ejemplos de interacción bacteria-sustrato que influye determinadamente en el

ciclo de vida de este patógeno dentro y fuera del hospedador humano, y en su función ecológica en el ambiente acuático (Colwell, 2004). Este microorganismo puede colonizar copépodos, crustáceos y otros invertebrados con cubierta de quitina, utilizándola como fuente de nutrientes y superficie de adhesión que favorecen su supervivencia ambiental (Meibon *et al.*, 2005; Vezzulli *et al.*, 2010).

*V. cholerae* es un componente importante de las biopelículas encontradas en las superficies del plancton y organismos acuáticos, y por ello ha sido considerado un modelo prominente para su estudio. Se han determinado tres fases distintivas en su formación, que incluyen la unión inicial a una

superficie, seguida por la formación de microcolonias y finalmente la maduración de estas microcolonias dentro de una biopelícula madura cubierta de exopolisacáridos (EPS; Davey y O'toole, 2000; Yildiz y Visick, 2009). En *V. cholerae* el EPS actúa como un estabilizador de las interacciones bacterianas con la superficie y contribuye con la formación tridimensional y arquitectura de las biopelículas (Watnick y Kolter, 1999; Pruzzo *et al.*, 2008).

Los genes *vps* son requeridos en la formación de biopelículas, expresión de morfología rugosa de las colonias y producción del polisacárido de *Vibrio* (VPS) en *V. cholerae* (Rashid *et al.*, 2004; Yildiz, 2007). El gen *vpsR* se encuen-

### PALABRAS CLAVE / Ambientes Acuáticos / Biopelículas / ESEM / Quitina / *Vibrio cholerae* /

Recibido: 11/09/2012. Modificado: 07/06/2013. Aceptado: 14/06/2013.

**Milagro Fernández-Delgado.** Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Investigadora, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela. Dirección: Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Km 11 carretera

Panamericana, Altos de Pipe, Apartado 1080, Venezuela. e-mail: milagrof@ivic.gob.ve

**Paula Suárez.** Doctora en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Profesora, USB, Venezuela.

**Zoilabet Duque.** Doctora con Suficiencia Investigadora en Biodeterioro de Materiales, Universidad Politécnica de Madrid, España. Investigadora y Coordinadora, Unidad de Investigación y Desarrollo Biodeterioro Industrial, Fundación INZIT, Venezuela.

**María Alexandra García-Amado.** Doctora en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Investigadora, IVIC, Venezuela.

**Mónica Contreras.** Doctora en Microbiología General, Université de Paris XI, Paris, Francia. Investigadora, IVIC, Venezuela.

## ***Vibrio cholerae* SURVIVAL AND BIOFILM FORMATION ON SHRIMP CHITIN**

Milagro Fernández-Delgado, Paula Suárez, Zoilabet Duque, María Alexandra García-Amado and Mónica Contreras

### **SUMMARY**

*Vibrio cholerae* biofilm formation is a phenomenon that influences the life cycle of this human pathogen and its ecological function in the environment. The present work aimed to evaluate the survival and biofilm formation of *V. cholerae* of clinical and environmental origins with natural chitin. Bacterial suspensions were inoculated in a medium without nutrients and nutritive broth with chitin obtained from shrimp exoskeleton, incubated at different pH and temperatures. In the survival assays, the isolates retained their capacity to form colonies for 31 days in starvation conditions and exposure to chitin as the only source of carbon and nitrogen. In environmental scanning electron microscopy of both microorganisms, bacterial adhesion to the chitin surface was observed, as well as extracellu-

lar matrix and biofilm formation during 4-46h in the presence of nutrients. The environmental isolate at 25h had a biofilm architecture with pillars and channels, while the clinical one showed biofilms in less time, without formation of tridimensional structures. In both isolates, PCR detected the gene *vpsR*, reported for this bacterium in the formation of biofilm. These results demonstrate that *V. cholerae* isolated from humans and coastal marine waters are able to survive for prolonged periods in association with organisms having a chitin cover and to form biofilms. This research is a contribution to the understanding of environmental survival strategies of *V. cholerae* and the possible pathways for transmission to humans.

## **SUPERVIVÊNCIA E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Vibrio cholerae* SOBRE QUITINA DE CAMARÃO**

Milagro Fernández-Delgado, Paula Suárez, Zoilabet Duque, María Alexandra García-Amado e Mónica Contreras

### **RESUMO**

A formação de biofilmes de *Vibrio cholerae* é um fenômeno que influi no ciclo de vida de este patógeno humano e na sua função ecológica no ambiente. Neste trabalho é proposto avaliar a supervivência e formação de biofilmes de isolados de *V. cholerae* de origem clínico e ambiental com quitina natural. Inocularam-se suspensões bacterianas em meio sem nutrientes e caldo nutritivo com quitina obtida de exoesqueleto de camarão, incubados a diferentes pH e temperaturas. Nos ensaios de supervivência, os isolados mantiveram a capacidade de formar colônias por 31 dias em condições de inanição e exposição à quitina como única fonte de carbono e nitrogênio. No estudo de microscopia eletrônica de varredura em modo ambiental se observou adesão bacteriana à superfície de quitina, matriz

extracelular e formação de biofilmes por 4-46h em presença de nutrientes para ambos os micro-organismos. O isolado ambiental mostrou em 25h arquitetura nos biofilmes com pilares e canais, enquanto que o clínico apresentou biofilmes em tempo menor, sem formação de estruturas tridimensionais. Em ambos isolados se detectou por PCR o gene *vpsR*, relatado para esta bactéria na formação de biofilmes. Estes resultados mostram que *V. cholerae* isolado de humanos e águas marinho-costeiras pode sobreviver por períodos prolongados, em associação a organismos com cobertura de quitina, e formar biofilmes. Esta investigação é uma contribuição ao conhecimento das estratégias de supervivência ambiental de *V. cholerae* e possíveis vias de transmissão a humanos.

tra asociado a la supervivencia ambiental de esta bacteria y regula la expresión de los genes *vps* y la síntesis de la matriz del polisacárido extracelular (Yildiz *et al.*, 2001). La sobreproducción de EPS confiere resistencia al estrés osmótico y oxidativo y agentes bactericidas. La expresión de este gen y las propiedades fenotípicas y de supervivencia ambiental que éste le confiere a *V. cholerae* tienen importancia crítica en su ciclo de vida en el ambiente y su potencial de transmisión y patogenicidad en los humanos (Yildiz, 2007).

La técnica de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) es una variante especial de microscopía elec-

trónica de barrido que permite la visualización *in situ* de biopelículas crecidas naturalmente sobre superficies. La ventaja del ESEM es la conservación de las muestras completamente hidratadas debido a un sistema de bombeo que controla la presión de gas (generalmente agua de vapor) dentro del microscopio y evita cambios en la morfología de la muestra o daños ocasionados por los métodos de fijación estándar (McGregor y Donald, 2010). Se ha reportado la formación de biopelículas en *V. cholerae* por otros métodos microscópicos (Kierek y Watnick, 2003; Yildiz y Visick, 2009); sin embargo, no se ha encontrado en la literatura estudios previos que analicen la es-

tructura tridimensional de biopelículas de *V. cholerae* *in situ* sin alterar su morfología natural, como lo permite la técnica ESEM.

Muchos factores involucrados en la interacción de *V. cholerae* con la quitina y la formación de biopelículas no se conocen por completo y requieren de mayor investigación para el entendimiento de los mecanismos de supervivencia de esta bacteria en los ambientes acuáticos (Vezzulli *et al.*, 2010). En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la supervivencia, adhesión y formación de biopelículas de aislados de origen clínico y ambiental de *V. cholerae* sobre superficies de quitina natural obtenida de exoesquele-

to de camarón, utilizando métodos de cultivo y observación por ESEM.

### **Metodología**

#### *Aislados bacterianos*

Para esta investigación se utilizó un aislado clínico de referencia de *V. cholerae* O1 (biotipo El Tor, serotipo Ogawa; CVCM 306) y un aislado ambiental de *V. cholerae* no-O1, no-O139 de agua de mar del Refugio de Fauna Silvestre Cuare, denominado D3-TCBS (Fernández-Delgado *et al.*, 2009). Estos aislados fueron cultivados en el medio TCBS (Merck) y repicados en el medio nutritivo BHI (Infusión Cerebro Corazón, HIMEDIA).

### *Supervivencia in vitro de V. cholerae en exposición a quitina natural*

Se realizaron ensayos de supervivencia bacteriana con los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* cultivados en caldo BHI a 37°C hasta fase exponencial, en exposición a una fuente natural de quitina. Estos cultivos fueron centrifugados por 15min a 2380g y lavados dos veces en solución salina (0,85% NaCl) por 10min a 2380g, para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo. La quitina utilizada en los ensayos fue obtenida pulverizando exoesqueletos de camarones que fueron lavados en agua destilada y secados en estufa a 50°C por ~24h. Se inocularon 0,5ml de las suspensiones de D3-TCBS y *V. cholerae* Ogawa en tubos de borosilicato que contenían 2,5mg de quitina y 4,5ml de solución fosfato de potasio (50mM) a pH 6,0 y 8,0, previamente esterilizados a 121°C por 20min. Se utilizaron tubos por quintuplicado para cada pH y aislado en estudio, incubados a 30 y a 37°C. Adicionalmente, se incluyeron controles negativos de las soluciones de fosfato de potasio a cada pH y temperatura con quitina sin inóculo bacteriano y controles de crecimiento de los aislados de *V. cholerae* en estas soluciones a pH 6,0 y 8,0 sin quitina para cada temperatura de incubación. Se determinó la densidad óptica por espectrofotometría a 600nm en un espectronic 20 (Bausch & Lomb) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en agar BHI para todas las condiciones de estudio y aislados bacterianos a distintos intervalos de tiempo (0, 1, 7, 21 y 31 días), expresándose los resultados como la media ( $\pm$  desviación estándar) de 5 réplicas. Con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas en el crecimiento de los aislados de *V. cholerae* para las distintas condiciones de cultivo estudiadas, los datos fueron analizados por la Prueba F de Fisher con un nivel de

significancia de  $p < 0,05$  utilizando el paquete estadístico Matlab versión 7.6.0.

### *Formación de biopelículas de V. cholerae con quitina*

Alicuotas de 0,5ml de cultivos en fase exponencial de los aislados clínico y ambiental fueron inoculadas en viales que contenían 4,5ml de caldo BHI y exoesqueletos de camarones de 1cm<sup>2</sup>, denominados 'cupones' para efectos del estudio. Los cupones fueron lavados previamente en agua destilada, colocados en estufa a 60°C por ~24h y esterilizados en autoclave a 121°C por 15min. Se consideraron cuatro réplicas de estos cultivos incubados a 37°C por 4, 25 y 46h, y controles por duplicado sin inóculo bacteriano. Dos réplicas de los cupones fueron extraídas de los cultivos en cada período de incubación para la observación de biopelículas por ESEM y las otras dos réplicas fueron destinadas para el conteo del crecimiento poblacional sénil (células adheridas a la superficie). Para la evaluación del crecimiento poblacional sénil se desprendió la biopelícula aplicando sonicación a los cupones por 1min a 30% de amplitud entre 37 y 40°C bajo condiciones de esterilidad en un equipo Cole Parmer Ultrasonic Processor. Un volumen de 1ml del sonificado fue preparado para el conteo de células vivas y totales séviles usando la tinción Baclight LIVE/DEAD viability kit (Molecular Probes Inc.) y un microscopio de epifluorescencia modelo Leica DM2500M con filtros de luz de longitud de onda de 480 y 550nm, y magnificación de 100 $\times$ .

La técnica ESEM fue usada en este estudio con el propósito de evaluar la formación de biopelículas de los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* en superficies de quitina. Para ello se empleó un microscopio modelo Quanta 200FEG (FEI Co.) operado con voltajes entre 3 y 8kV, y presiones de 100-190Pa. Una vez transcurrido cada tiempo de incubación de los cultivos bacterianos con

quitina, los cupones fueron extraídos del medio de cultivo, lavados tres veces con agua estéril y colocados en solución de glutaraldehído al 2,5% con buffer cacodilato (pH 7,4). El proceso de fijación se realizó a 4°C en condiciones de esterilidad bajo campana de extracción. Los cupones fueron lavados con agua miliQ y fijados con grafito (Ladd Research Industries, Inc.) en el portamuestras del microscopio. Se realizaron entre 10 a 15 observaciones en campos diferentes de la superficie de estudio.

### *Detección por PCR del gen vpsR de supervivencia ambiental de V. cholerae*

La presencia del gen *vpsR* reportado en la supervivencia ambiental, formación de biopelículas y producción de exopolisacárido (EPS) de cepas de *V. cholerae*, fue evaluado en los aislados clínico y ambiental de este estudio por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando (Yildiz *et al.*, 2001) cebadores específicos (VpsR2-F: 5'-GTT CTA TGA TGC CGA CTA CA-3' y VpsR2-R: 5'-ACG CTT CTC ACG CTA CTT T-3'). La reacción de PCR fue realizada mediante el estuche Ready-To-Go PureTaq PCR (Amersham Biosciences) utilizando un termociclador modelo Gen AMP 9700 (Applied Biosystems). Cada reacción contenía todos los componentes de PCR (dNTPs, Taq polimerasa y MgCl<sub>2</sub>), 1-2 $\mu$ l de ADN extraído de los aislados bacterianos y control positivo por el kit UltraCleanTM Microbial DNA Kit (MO BIO Inc.), 3 $\mu$ l de la mezcla de cebadores (5 $\mu$ mol l<sup>-1</sup>) y agua estéril hasta un volumen final de reacción de 25 $\mu$ l. Se empleó como control positivo una cepa de referencia de *V. cholerae* SVBE-9 serotipo Inaba (CVCM 749) y como control negativo agua estéril. Los productos de PCR se visualizaron mediante corrida en gel de agarosa-TBE al 2,0% y tinción con bromuro de etidio, observándose por transiluminación con una lámpara de UV.

## Resultados

### *Supervivencia in vitro de V. cholerae en presencia de quitina*

Los estudios de supervivencia *in vitro* de los aislados de *V. cholerae* clínico y ambiental expuestos a quitina en ausencia de nutrientes indicaron crecimiento y viabilidad de sus cultivos por 31 días bajo las condiciones de pH y temperatura evaluadas. Ambos aislados presentaron mayor crecimiento a pH 6,0 para las dos temperaturas de incubación, aumentando su densidad óptica entre 0,05 y 0,1 en 21 días (Figura 1). Los controles del ensayo no presentaron crecimiento durante el período de estudio.

La capacidad de formar colonias en medio BHI disminuyó de 1 a 3 órdenes de magnitud (de  $1,55 \times 10^8$  a  $7,80 \times 10^5$  UFC/ml a 37°C y de  $4,40 \times 10^8$  a  $5,25 \times 10^5$  UFC/ml a 30°C) en el término de 31 días para los dos aislados de *V. cholerae* en los pH estudiados, respectivamente; a excepción del aislado ambiental cultivado a pH 8,0 y 37°C que mostró aumento en el número de UFC/ml a partir de los 21 días y superó el conteo del tiempo inicial (de  $1,28 \times 10^6$  a  $1,05 \times 10^7$  UFC/ml; Tabla I), indicando que los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* se mantuvieron viables y cultivables por el período de estudio. No se observaron diferencias significativas en la cuenta total de colonias para los dos aislados bacterianos a los 31 días de cultivo bajo las distintas condiciones estudiadas por las funciones ANOVA y linhyptest ( $p > 0,05$ ).

### *Formación de biopelículas de V. cholerae en superficies de quitina*

Las imágenes de ESEM mostraron adhesión, agregados de células embebidos en matriz polimérica de EPS, microcolonias y biopelículas con características diferenciales para ambos aislados de *V. cholerae*. La evaluación microscó-

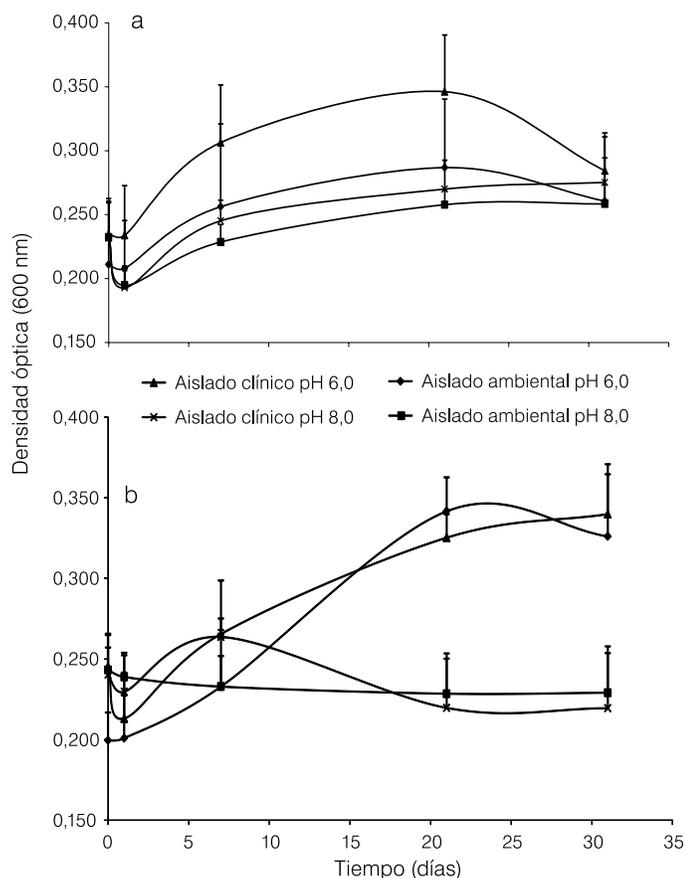


Figura 1. Crecimiento de aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* cultivados con quitina de exoesqueleto de camarón a diferentes pH (6,0 y 8,0) y temperaturas 37°C (a) y 30°C (b).

pica de los cupones en medio BHI sin inóculo bacteriano (controles negativos) descartó la presencia de células bacterianas adheridas a estas superficies de quitina. Se observó la morfología natural del exoesqueleto de camarón y la presencia de algunas partículas que procedían posiblemente del medio de cultivo (Figura 2).

El aislado clínico presentó agregados grandes de células embebidos en matriz polimérica a las 4h del estudio, indicando que las interacciones iniciales entre las células y la quitina ocurrieron rápidamente para formar biopelículas en un corto período. A las 25h se observó la presencia de algunos entramados celulares y notable desprendimiento de las

células de la superficie. En el período final de estudio (46h) se observó extensión de la población celular sobre la superficie de quitina embebida en matriz polimérica y ausencia de formas tridimensionales (Figura 2a). En el aislado ambiental D3-TCBS se observó en el período de 4h un número bajo de células adheridas a la superficie de quitina. Posteriormente, a las 25 y 46h fue evidente la formación de biopelículas en estos cultivos, destacándose a las 25h la presencia de estructuras tridimensionales en formas de pilares y canales elaborados sobre la superficie del exoesqueleto de camarón (Figura 2b).

La cuenta total de células adheridas a la superficie (crecimiento poblacional sésil) en el aislado clínico mostró una disminución de  $1,38 \times 10^5$  a  $7,03 \times 10^4$  células/ml entre 4 y 46h, presentando en este intervalo un conteo de células vivas entre  $2,24$  y  $6,06 \times 10^4$  células/ml. En el aislado ambiental D3-TCBS se determinó que el número total de células adheridas a la superficie de quitina se mantuvo en el orden de  $10^4$  células/ml para los tres tiempos de estudio, con un número de células viables que aumentó de  $1,49 \times 10^3$  a  $3,52 \times 10^4$  células/ml durante el período de estudio. El conteo de células vivas de ambos aislados se encontró al tiempo final del estudio (46h) en un orden de magnitud de  $10^4$  células/ml, sugiriendo viabilidad de estas poblaciones bacterianas y habilidad para adherirse y for-

mar biopelículas sobre las superficies de exoesqueleto de camarón.

#### Detección del gen *vpsR* de *V. cholerae*

El gen *vpsR* involucrado en la formación de biopelículas y supervivencia ambiental de *V. cholerae* fue detectado en los aislados clínico y ambiental utilizados en este estudio. Se observó la amplificación de un fragmento de 2890pb correspondiente a este gen (Figura 3), sugiriendo la presencia de la proteína VpsR reguladora de la síntesis del VPS y el potencial de estos aislados de formar biopelículas y sobrevivir en el medio acuático.

#### Discusión

La formación de biopelículas de *V. cholerae* es un fenómeno de interés en la ecología microbiana, que influye en el ciclo de vida de este patógeno humano y en su función ecológica en el ambiente. Los ensayos realizados en este estudio indican que los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* sobreviven *in vitro* por 31 días para las condiciones ensayadas de pH y temperatura, utilizando la quitina del exoesqueleto del camarón como única fuente de carbono y nitrógeno (Figura 1). En este período se evidenció crecimiento y viabilidad en ambos aislados en presencia de quitina como único nutriente por el aumento de la densidad óptica ( $\sim 0,1$  de absorbancia) y la capacidad de formar colo-

TABLA I  
CUENTA TOTAL DE COLONIAS DE CULTIVOS DE AISLADOS CLÍNICO Y AMBIENTAL DE *V. cholerae* CON QUITINA DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS EN AUSENCIA DE NUTRIENTES

Aislado de <i>V. cholerae</i>	Condiciones de cultivo		Cuenta total de colonias (UFC/ml)				
	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (días)				
			0	1	7	21	31
Clínico	37	6	$6,60 \pm 2,88 \times 10^8$	$1,14 \pm 1,16 \times 10^7$	$1,10 \pm 2,18 \times 10^7$	$4,07 \pm 1,37 \times 10^5$	$9,02 \pm 9,63 \times 10^6$
		8	$2,52 \pm 1,63 \times 10^8$	$1,48 \pm 1,43 \times 10^7$	$3,57 \pm 5,57 \times 10^6$	$4,93 \times 10^6 \pm 1,01 \times 10^7$	$7,80 \pm 8,17 \times 10^5$
Ambiental	37	6	$1,55 \pm 2,92 \times 10^8$	$7,40 \pm 8,88 \times 10^6$	$5,50 \pm 5,20 \times 10^6$	$3,55 \times 10^5 \pm 9,98 \times 10^4$	$1,14 \times 10^6 \pm 6,02 \times 10^5$
		8	$1,28 \times 10^6 \pm 8,67 \times 10^5$	$8,80 \pm 5,40 \times 10^6$	$4,35 \pm 2,93 \times 10^5$	$2,73 \pm 3,59 \times 10^5$	$1,05 \pm 1,26 \times 10^7$
Clínico	30	6	$3,60 \pm 5,32 \times 10^9$	$8,20 \pm 7,40 \times 10^9$	$1,98 \pm 2,82 \times 10^6$	$1,90 \times 10^8 \pm 8,09 \times 10^7$	$2,20 \pm 2,08 \times 10^7$
		8	$4,40 \pm 3,91 \times 10^8$	$1,60 \times 10^9 \pm 5,48 \times 10^8$	$2,33 \pm 1,15 \times 10^8$	$1,95 \times 10^6 \pm 6,66 \times 10^5$	$5,25 \pm 4,43 \times 10^5$
Ambiental	30	6	$5,00 \pm 2,74 \times 10^9$	$1,72 \pm 1,28 \times 10^{10}$	$3,18 \pm 2,28 \times 10^6$	$1,84 \pm 1,91 \times 10^{10}$	$7,40 \pm 5,03 \times 10^8$
		8	$6,40 \pm 8,23 \times 10^8$	$6,00 \pm 4,47 \times 10^7$	$3,50 \pm 4,36 \times 10^5$	$2,37 \pm 1,58 \times 10^6$	$7,20 \pm 6,61 \times 10^6$

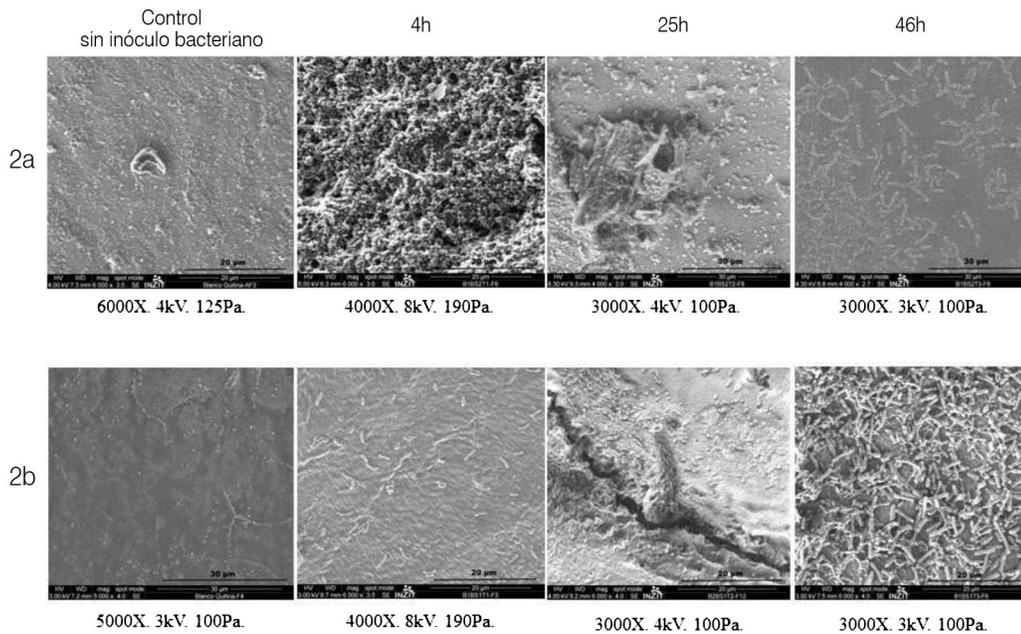


Figura 2. Fotomicrografías por ESEM de biopelículas de *V. cholerae* formadas *in vitro* sobre exoesqueleto de camarón, observadas durante 4, 25 y 46h de incubación. a: biopelículas de aislado clínico que presentan crecimiento rápido sobre la superficie a 4h y desprendimiento de las células de la superficie a las 25 y 46h; b: biopelículas de aislado ambiental que presentan crecimiento bacteriano a partir de las 25h con formación de estructuras tridimensionales (pilares) y canales.

nias superior al orden de  $10^5$  UFC/ml a pH 6,0 y 30°C entre los días 1 y 21 del estudio. Similarmente, Hunt *et al.* (2008) determinaron crecimiento en cultivos de aislados ambientales de *V. cholerae* incubados con formas  $\alpha$  de quitina (caparazón de cangrejo) cuando fue registrado un incremento de la densidad óptica de 0,01 a 0,1 al día 30 de los experimentos (Hunt *et al.*, 2008). En aislados marinos de *Vibrio* se ha reportado que el pH 6,0 es óptimo para la actividad quitinasa y la utilización de la quitina como única fuente de carbono y nitrógeno (Osawa y

Koga, 1995; Zhou *et al.*, 1999). Los ensayos de cultivos de los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* con exoesqueleto de camarón evidencian su supervivencia en condiciones de inanición o limitación de nutrientes por la utilización de la quitina.

La asociación de los aislados clínico y ambiental de *V. cholerae* a la quitina de crustáceos fue comprobada por su habilidad de adherirse a las superficies de exoesqueletos de camarón y formar biopelículas en un periodo de 46h. La visualización por ESEM de las muestras de estudio permitió deter-

minar las estructuras de las biopelículas en su estado natural, evitando la deshidratación ocasionada en las técnicas microscópicas de alto vacío y la introducción de artefactos en las muestras (McGregor y Donald, 2010). En las biopelículas desarrolladas por el aislado ambiental de *V. cholerae* se observó adhesión inicial de las células en forma dispersa, formación de agregados de células o microcolonias y estructuras tridimensionales diferenciadas con canales y pilares, como ha sido reportado previamente para la formación de biopelículas por este microorganismo en los ambientes acuáticos (Watnick *et al.*, 2001; Pruzzo *et al.*, 2008; Yildiz y Visick, 2009). Más aún, el conteo de células vivas superior al orden de  $10^4$  células/ml hasta el tiempo de 46h, corrobora la viabilidad y capacidad de multiplicación de este aislado observada en los estudios de supervivencia y crecimiento con quitina de exoesqueleto de camarón.

Otros estudios han demostrado por microscopía electrónica de transmisión y microscopía láser confocal de barrido

que *V. cholerae* es capaz de formar biopelículas tridimensionales sobre superficies que les proveen de un microambiente protector y le permiten incrementar su productividad bacteriana y supervivencia en condiciones de adversidad ambiental, tales como la escasez de nutrientes (Watnick *et al.*, 2001; Pardío, 2007; Pruzzo *et al.*, 2008; Yildiz y Visick, 2009). En las biopelículas formadas por el aislado clínico de *V. cholerae* no se observó la arquitectura tridimensional reportada para este microorganismo en los tiempos ensayados, pero sí se visualizaron biopelículas desde el tiempo inicial de observación hasta las 24h; es decir, el aislado clínico produjo biopelículas en aproximadamente la mitad del tiempo requerido por el aislado ambiental. En la colonización intestinal, *V. cholerae* se adhiere y multiplica rápidamente en la mucosa del intestino delgado humano, produce toxinas y es liberado de las células por la acción de factores reguladores que reprimen los genes relacionados con la formación de biopelículas (Salyers y Whitt, 1994; Fernández y Alonso, 2009). Nelson *et al.* (2008) han postulado un modelo de transmisión rápida del cólera que acelera la colonización intestinal y su liberación del hospedador en un tiempo menor a 24h, con la urgencia de establecer un nuevo punto de infección y continuar su ciclo de transmisión. Un comportamiento similar a lo reportado en el intestino humano para *V. cholerae* se observó en los ensayos de adhesión a quitina de camarón con el aislado clínico usado en este estudio.

En las observaciones microscópicas por ESEM fue notable la presencia de entramados celulares y matrices poliméricas distintivas de la producción de exopolisacáridos entre el aislado clínico y ambiental de *V. cholerae*. La matriz de exopolisacárido estabiliza la biopelícula madura y su sobreproducción le confiere a la bacteria resistencia al estrés osmótico y oxidativo y a los agentes bactericidas

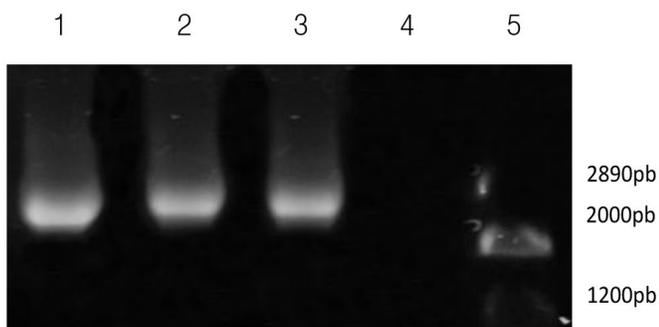


Figura 3. Amplificación de un fragmento de 2890pb del gen *vpsR* en aislados clínico y ambiental de *V. cholerae*. 1: aislado clínico; 2: aislado ambiental; 3: control positivo *V. cholerae* Inaba; 4: control negativo de PCR; 5: marcador de peso molecular de ADN.

(Pardío, 2007). La producción del exopolisacárido de *V. cholerae* o VPS se debe a la expresión del gen *vpsR* (Yildiz y Visick, 2009) y la detección de este gen en los aislados de *V. cholerae* evidencia su potencial de producir la matriz de exopolisacárido y formar biopelículas sobre superficies de quitina. Se ha señalado que la formación de biopelículas de *V. cholerae* dependientes del VPS facilitan la supervivencia del microorganismo (Kierek y Watnick, 2003) y es un factor clave en su ciclo de vida, favoreciendo su persistencia en los ecosistemas acuáticos durante períodos interepidémicos (Pardío, 2007). Se requieren más estudios que ayuden a comprender si la diferencia en la formación de biopelículas entre aislados clínicos y ambientales de *V. cholerae* radica en el nivel de expresión del *vpsR*, así como han reportado otros autores diferencias en procesos regulatorios de la producción de biopelículas (Yildiz y Visick, 2009).

Este estudio aporta evidencias de la capacidad de aislados clínicos y ambientales de *V. cholerae* de sobrevivir por períodos de tiempo prolongados en asociación a sustratos quitinosos y formar biopelículas en un medio acuático, contribuyendo así al conocimiento de las estrategias de supervivencia ambiental y posibles vías de transmisión a los humanos de esta especie bacteriana de importancia para la salud pública.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Karina Balzan por la aplicación de las técnicas de conteo séstil, a Helen Inciarte por su colaboración en la microscopía electrónica, a Eric Plaza por la operación del microscopio electrónico, a Andreína Vargas por su colaboración inicial en la verificación de los parámetros de sonicación, a Carlos Alcánturi por su asesoría en el análisis estadístico y a Héctor Rojas por la edición de la Figura 3. Este trabajo fue financiado por subvenciones del Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar a P. Suárez, el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas a M.A. García-Amado y M. Contreras, y el Laboratorio de Biodeterioro del INZIT, dirigido por Z. Duque.

#### REFERENCIAS

Colwell RR (2004) Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. *Int. Microbiol.* 7: 285-289.

Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.

Fernández S, Alonso G (2009) Cólera y *Vibrio cholerae*. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"* 40: 50-144.

Fernández-Delgado M, García-Amado MA, Contreras M, Edgcomb V, Vitelli J, Gueneau P, Suárez P (2009) *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 associated with seawater and plankton from coastal marine areas of the Caribbean Sea. *Int. J. Env. Health Res.* 19: 279-289.

Hunt DE, Gevers D, Vahora NM, Polz MF (2008) Conservation of chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 44-51.

Kierek K, Watnick PI (2003) Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5079-5088.

Lipp EK, Huq A, Colwell RR (2002) Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 757-770.

McGregor JE, Donald AM (2010) ESEM imaging of dynamic biological processes: the closure of stomatal pores. *J. Microsc.* 239: 135-141.

Meibom K, Blokesch M, Dolganov N, Wu C, Schoolnik G (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310: 1824-1826.

Nelson EJ, Chowdhury A, Flynn J, Schild S, Bourassa L, Shao Y, LaRocque RG, Calderwood SB, Qadri F, Camilli A (2008) Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment. *PLoS Pathogens* 4: 1-15.

Osawa R, Koga T. (1995) An investigation of aquatic bacteria capable of utilizing chitin as the sole source of nutrients. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 288-291.

Pardío VT (2007) Influence of environmental factors on the presence of *Vibrio cholerae* in the marine environment: a climate link. *J. Infect. Develop. Count.* 1: 224-241.

Pruzzo C, Huq A, Colwell RR, Donelli G (2006) Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. En Belkin S, Colwell RR (Eds.) *Oceans and Health: Pathogens in the marine environment*. Springer. Nueva York, EEUU. pp. 217-252.

Pruzzo C, Vezzulli L, Colwell RR (2008) Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 10: 1400-1410.

Rashid MH, Rajanna C, Zhang D, Pasquale V, Magder LS, Ali A, Dumontet S, Karaolis DK (2004) Role of exopolysaccharide, the rugose phenotype and *VpsR* in the pathogenesis of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 105-113.

Salyers AA, Whitt DD (1994) *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. ASM Press. Washington DC, EEUU. pp. 141-155.

Vezzulli L, Pruzzo C, Huq A, Colwell RR (2010) Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Reports* 2: 27-33.

Watnick PI, Kolter R (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 34: 586-595.

Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilms development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* 39: 223-235.

Yildiz F, Dolganov N, Schoolnik G (2001) *VpsR*, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS<sup>str</sup>-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* 183: 1716-1726.

Yildiz FH (2007) Processes controlling the transmission of bacterial pathogens in the environment. *Res. Microbiol.* 158: 195-202.

Yildiz FH, Visick KL (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 17: 109-118.

Zhou SN, Yang CY, Lu YJ, Huang L, Cai CH, Lin YC (1999) Isolation and characterization of chitinase from a marine bacterium *Vibrio* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 745-746.