

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Formación de biofilm en *Leptospira interrogans* serovar Lai**

**Andrés Ricardo Trávez García**

**Tesis para la obtención de Grado de B.S. en Biotecnología**

**Quito**

**Mayo de 2008**

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Formación de biofilm en *Leptospira interrogans* serovar Lai**

**Andrés Ricardo Trávez García**

Sonia Zapata Mena, M.Sc

Directora de Tesis \_\_\_\_\_

Stella de la Torre, M.Sc, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales \_\_\_\_\_

Quito, mayo 2008

© Derechos de autor  
Andrés Ricardo Trávez García  
2008

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a Dios, que siempre me ha ayudado y bendecido a lo largo de mi carrera y me ha llenado de sabiduría para salir de mis problemas y seguir adelante en los momentos de incertidumbre y sobre todo que ha puesto a mi lado a personas que han sabido guiarme correctamente y muchas otras que me han sabido apoyar en todas mis decisiones.

En segundo lugar, todo el esfuerzo puesto en este proyecto también va dedicado a mis padres y a mis hermanos, que siempre me han apoyado y me han dado los ánimos para seguir adelante y han puesto todo de su parte para que pueda llegar a este punto de mi vida.

Y finalmente, a todas aquellas personas que pusieron su granito de arena y me brindaron su ayuda en algún punto del desarrollo del proyecto.

## **AGRADECIMIENTO**

Primero, tengo que agradecer a Dios por esa energía que siempre me supo guiar por el camino correcto y permitió que pueda culminar mi carrera con éxito.

Segundo, agradezco a mis padres y hermanos por ser esas personas que estuvieron a mi lado en cada momento y me brindaron su apoyo incondicional.

Un agradecimiento especial al Dr. Gabriel Trueba y a la Dra. Sonia Zapata por haberme guiado a lo largo de este proyecto y haber puesto en mí la confianza necesaria para poder llevar a cabo este proyecto y por brindarme sus valiosos conocimientos que me fueron muy útiles para la consecución de mis objetivos.

También quiero agradecer a Verónica Barragán y María Eugenia Mejía que me ayudaron a lo largo del proyecto y estuvieron pendientes del desarrollo del mismo y que en muchas ocasiones me compartieron tips importantes que fueron de mucha ayuda.

Y finalmente, le quedo muy agradecido a Deysi, aquella persona que simplemente con hacer su trabajo diario y en silencio, me tenía listo el material que le pedía para poder realizar mi proyecto.

## RESUMEN

El principal objetivo de este proyecto fue observar, *in vitro*, la formación de biofilm por parte de la *Leptospira* como una posible estrategia de supervivencia a condiciones ambientales adversas.

Para este estudio se utilizó la bacteria *Leptospira interrogans* serovar Lai que se obtuvo del laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. La bacteria fue cultivada en medio de enriquecimiento EMJH (Ellinghausen & McCullough, modificado por Johnson & Harries) (Acosta, 1994) y posteriormente se le privó de nutrientes al pasarlas a agua bidestilada, para asemejar las condiciones naturales de bajos nutrientes, con una placa de vidrio para proporcionar una superficie de adherencia a las bacterias.

Debido a la falta de nutrientes se pudo observar la producción del biofilm sobre la superficie de vidrio bajo microscopía de campo oscuro. Adicionalmente al biofilm se observó estructuras similares a vesículas que parecen ser una estrategia alterna de supervivencia a condiciones ambientales adversas.

La placa que contenía al biofilm fue teñida con cristal-violeta para confirmar su producción.

Por otro lado la placa con biofilm fue colocada nuevamente en el medio nutritivo EMJH y se observó es que ambas estructuras, tanto el biofilm como las vesículas, liberaban nuevamente espiroquetas.

Con estos resultados se puede comprobar la formación de estructuras complejas por parte de la *Leptospira* como estrategias de supervivencia a condiciones ambientales adversas.

## ABSTRACT

The main goal of this Project was to watch, *in vitro*, the biofilm formation in *Leptospira* like a survive strategy to adverse environment conditions.

The *Leptospira interrogans* serovar Lai of the Microbiology laboratory of the San Francisco de Quito University was used in this study. The bacterium was cultivated in an enrichment medium EMJH and then the nutrients were eliminated and the bacterium were putted in bidestilated water, to simulate normal environment conditions, with a glass plaque to give the bacterium a surface to get stick.

The biofilm was produced over the glass surface because the lack of nutrients and it was watched under dark field microscopy. Additionally to the biofilm, there were watched structures similar to bladders, that seems to be an alternative strategy of survive to adverse environment conditions.

The glass plaque with biofilm was dyed with crystal-violet to confirm it production.

Another glass plaque with biofilm was put again in EMJH médium and there was watch that both, the biofilm and the bladders, get the spirochetes free again.

These results let verify the formation of complex structures in *Leptospira* like strategies to survive to adverse environment conditions.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Generalidades del género <i>Leptospira</i> .....	1
1.2	Clasificación del género <i>Leptospira</i> .....	1
1.3	Epidemiología de la leptospirosis.....	2
1.4	Formación y características del biofilm.....	3
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
3.1	Objetivo general.....	10
3.2	Objetivos específicos.....	10
<b>4</b>	<b>AREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
5.1	Materiales.....	11
5.2	Métodos.....	12
5.2.1	Cultivo inicial de <i>Leptospira</i> .....	12
5.2.2	Obtención de células de <i>Leptospira</i> libres de medio.....	12
5.2.3	Conteo de células viables de <i>Leptospira</i> luego de la centrifugación.....	12
5.2.4	Formación de biofilm “in vitro”.....	13
5.2.5	Tinción de placa.....	13
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
6.1.1	Cultivo inicial de <i>Leptospira</i> .....	14
6.1.2	Obtención de células de <i>Leptospira</i> libres de medio.....	14
6.1.3	Conteo de células viables de <i>Leptospira</i> luego de la centrifugación.....	14
6.1.4	Formación de biofilm “in vitro”.....	14
6.1.5	Tinción de placa.....	16
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>9</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>11</b>	<b>TABLAS.....</b>	<b>24</b>
<b>12</b>	<b>FIGURAS.....</b>	<b>25</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Generalidades del género *Leptospira***

La *Leptospira* es una espiroqueta Gram-negativa, que produce una enfermedad denominada Leptospirosis, la cual es una zoonosis de distribución mundial causada por especies patógenas de *Leptospira*. Los síntomas en humanos tienen un amplio rango, desde una infección subclínica hasta un síndrome hemorrágico severo con infección en varios órganos y alta mortalidad. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Adolf Weil y por ello a la forma severa de Leptospirosis se la conoce con el nombre de “enfermedad de Weil” (Levet, 2001).

Estas bacterias son extremadamente móviles, flexible, espirales, aerobias obligadas y viven en ambientes húmedos con pH neutro o ligeramente alcalino con una temperatura óptima entre 28 y 30°C (Levet, 2001; Trueba, 2002) y pueden producir catalasa y oxidasa (Levet, 2001). El tamaño de estas varía entre 0,1 a 0,2 µm de ancho y de 6 hasta 20 µm de largo (Betancourt, 2000; Levet, 2001), aunque se han encontrado algunas bacterias más largas pero son esporádicas (Levet, 2001). Adicionalmente poseen estructuras como ganchos en los extremos y 2 endoflagelos que los utilizan para su movilidad (Betancourt, 2000; Levet, 2001).

### **1.2. Clasificación del género *Leptospira***

En la actualidad el género *Leptospira* ha sido clasificado genotípicamente en 16 genespecies diferentes. Algunas de estas especies corresponden a bacterias de vida libre y otras de vida parasítica. En algunos casos la misma especie puede tener ambos tipos (Levet, 2001).

### **1.3. Epidemiología de las Leptospirosis**

La manera en que esta bacteria ingresa al organismo es por medio de las mucosas, especialmente de los ojos, nariz y boca y por heridas o raspones que liberan hemoglobina, esta última es la sustancia que atrae a las leptospiras patógenas debido a su afinidad por ella (Betancourt, 2000). Para cultivar éste tipo de bacterias se requiere de un medio enriquecido con vitaminas (B2, B12 y factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga (como fuentes de carbono) y sales de amonio (Levet, 2001).

El predominio de su distribución está en las zonas tropicales (Betancourt, 2000). Las espiroquetas patógenas están asociadas en la naturaleza a los riñones de los animales que los portan (Levet, 2001; Trueba 2002). La forma en la que la leptospirosis se distribuye es mediante orina y agua contaminada con la orina de animales infectados. Además algunos estudios sugieren que la lluvia incrementa la supervivencia de estas bacterias en el agua al diluir las sales y metabolitos microbianos (Trueba, 2002).

Por ejemplo en el año de 1995 se presentó en Nicaragua un brote importante de leptospirosis con alrededor de 2000 casos y más de 50 muertes. Tres años más tarde, debido a la presencia del huracán Mitch en la zona de Centroamérica, se presentó un nuevo brote de leptospirosis, siendo Honduras el país más afectado, lo curioso es que en Honduras la leptospirosis no era notificada con frecuencia y debido a la falta de conocimiento de la enfermedad llegó a confundírsela con meningitis aséptica, dengue, influenza o hepatitis (Naranjo, 2007).

Adicionalmente, se ha demostrado que la *Leptospira* puede permanecer en el agua por largos períodos de tiempo y dividirse en agua destilada e incluso mantener su motilidad rotativa durante 98 días (Trueba, 2002).

Por otro lado es muy probable que una de las formas en que la leptospira sobreviva a ambientes acuáticos naturales con bajas concentraciones de nutrientes sea

debido a una interacción con otro tipo de organismos ambientales a los cuales los pueda utilizar como fuente de nutrientes como sucede con *Vibrio cholerae* (Trueba, 2002).

Las leptospiras, junto a *Treponema dentricola* y *Brachyspira*, son las únicas espiroquetas patógenas que pueden vivir en el ambiente y sin un organismo vivo porque existen otras espiroquetas patógenas que requieren de un huésped como *Treponema pallidum* o *Borellia burdoferi* (Vinetz, 1996).

Una forma de supervivencia en el ambiente es el biofilm, su producción puede jugar un papel importante en el transporte crónico de las leptospiras en reservorios animales. Incluso se ha demostrado que la leptospira posee genes que codifican proteínas envueltas en la producción de exopolisacáridos que pueden contribuir con la colonización de superficies bióticas y abióticas (Picardeau, 2008).

#### **1.4. Formación y características del biofilm**

Los biofilms son aglomeraciones de microorganismos que crecen tanto en superficies inertes como en tejidos vivos, el primer microorganismo se adhiere a la superficie mediante *adhesinas* que son producidas por los mismos microorganismos y cuando llegan a formar un grupo comienzan a producir una matriz extracelular que va a ser la estructura externa del biofilm (Herrera, 2004; Lasa, 2005).

Las bacterias producen biofilms debido a que perciben cambios adversos en el ambiente que afectan su crecimiento o incluso producir su muerte. Estos cambios pueden darse en la temperatura, el pH, los nutrientes y algunas características más que afectan al desarrollo de las bacterias. En realidad la estructura de un biofilm está dividida en tres componentes. La masa de células (que puede estar conformada por una o varias especies de bacterias), los espacios intercelulares y la matriz extracelular, formada por los exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos, por ello los biofilms llegan a tener una forma tridimensional que varía dependiendo del tipo

de bacterias que lo estén formando y del motivo por el que fue formado, ya que su formación pudo darse por una variación desfavorable de la temperatura ambiental o por disminución de los nutrientes disponibles. La variedad de condiciones desfavorables que pueden surgir permiten la formación de un biofilm diferente en cada una de ellas (Greenberg, 2000; Lasa, 2005).

El biofilm es producido por los organismos se inicia con la detección de inductores moleculares, las acil-homoserina lactonas (acyl-HSLs) en el caso de las bacterias Gram-negativas, y algunos péptidos en el caso de las Gram-positivas (Greenberg, 2000; Lasa, 2005). En algunos casos estos inductores son producidos por la misma bacteria creando de esta forma un sistema de autoinducción denominado “*quorum sensing*”. Este sistema depende de la concentración de autoinductores en el ambiente para que empiece su funcionamiento, ya que mientras mayor sea la cantidad de inductor existente en el ambiente mayor va a ser la rapidez que los microorganismos respondan a él (Greenberg, 2000; Lasa, 2005).

Al mismo tiempo que existen moléculas que activan el proceso de *quorum sensing*, también existen otras moléculas que lo inhiben, como es en el caso de las bacterias gram-negativas que se ha descubierto una molécula denominada “*furanona*” que es secretada por un alga, *Delinea pulcra*, que posee una estructura muy similar a las acil-homoserina lactonas, pero la gran diferencia es que ésta furanona tiene una actividad contraria inhibiendo el proceso de *quorum sensing*. Por otro lado en el caso de las Gram-positivas se ha encontrado un péptido en *Staphylococcus aureus*, al que se le ha denominado RIP, que inhibe el proceso de *quorum sensing* y, por ende, la formación de biofilm (Lasa, 2005).

En cuanto a la matriz del biofilm, está hecha por exopolisacáridos que proveen una protección extra a las bacterias que se encuentran en su interior (Lasa, 2005).

Debido a este tipo de asociación bacteriana es que pueden sobrevivir e incluso crecer en la naturaleza (Herrera, 2004). Adicionalmente las bacterias que se encuentran en las capas de la base son metabólicamente inactivas, y es por ello se hacen resistentes a los antibióticos. Esta resistencia es la que hace de los biofilms estructuras de difícil eliminación y control de los mismos, tanto en el campo de la medicina, como en el de la industria. (Piera, 2003).

La importancia del biofilm es que hace a las bacterias más infectivas porque pueden llegar a tener más de 100 veces la resistencia a antibióticos que una bacteria que no esté formando parte del biofilm, incluso pueden llegar a ser resistentes a biocidas oxidantes como al cloro, al yodo o al ozono (Lasa, 2005). Incluso debido a este comportamiento las bacterias pueden vivir en lugar inhóspitos para la mayoría de seres vivos. Adicionalmente los microorganismos dentro del biofilm representan un reservorio de bacterias y ser factores para producir una contaminación cruzada (Piera, 2003)

La forma en que esta estructura empieza a formarse en algunas bacterias por acción de los flagelos o pilis que éstas poseen (en el caso de las Gram-negativas) o de algunas proteínas de superficie como AtlE, o Bap (en el caso de las Gram-positivas). Estas estructuras les permiten adherirse a cualquier superficie. Aunque los mecanismos antes mencionados no son los únicos que les permiten agruparse, también existen otros mecanismos como la síntesis de celulosa (para adherirse a las plantas) o las adhesinas (para adherirse a superficies e incluso a otras bacterias). Estas últimas con las que permiten la formación inicial de biofilms conformados por varias bacterias en la parte interna se puede observar una cooperación metabólica y un intercambio de sustratos y nutrientes e incluso el transporte horizontal de genes mediante fagos o plásmidos (Lasa, 2005).

Una ventaja que presenta el biofilm es que atrapan los nutrientes del ambiente, lo que permite que las bacterias en su interior puedan sobrevivir. (Lasa, 2005)

Una vez dada la adhesión a la superficie comienza la división celular, en este punto se empieza a formar una colonia y posteriormente al existir déficit de nutrientes comienza la producción de exopolisacáridos por parte de los microorganismos que van a dar la forma tridimensional final del biofilm (Lasa, 2005), que se podría decir que es una forma avanzada de colonia, o el grado más elevado de la misma. Al final de la formación del biofilm, como paso final del mismo, algunas de las bacterias se liberan para colonizar nuevas superficies (Lasa, 2005), pero estas bacterias tienen una ventaja ya que estas al salir del biofilm están más preparadas que las iniciales ya que las que son expulsadas del biofilm ya poseen exonucleasas en la superficie, lo que les permite adherirse con mayor facilidad a un nuevo sustrato (Piera, 2003). Con el proceso de colonización, se cierra el ciclo del proceso de desarrollo de un biofilm (Lasa, 2005).

La estructura de un biofilm no es solamente bacterias, es más las bacterias junto con la matriz de exopolisacáridos solo llegan a representar un 3% del contenido total del biofilm, el 97% restante está básicamente formado por agua, lo que permite que las bacterias que se encuentran en el interior del biofilm puedan acceder a los nutrientes y oxígeno que se encuentran en el exterior del mismo, esto se da mediante el flujo del agua a través de canales que se forman dentro de la matriz permitiendo la circulación, tanto de nutrientes, como de oxígeno (Lasa, 2005), importante en el caso de las *Leptospira* que son bacterias aerobias obligadas. Esta estructura tridimensional proporciona varios ambientes internos en donde se pueden encontrar pequeñas variaciones de pH o concentración de oxígeno. Por ello es que solamente las bacterias en la superficie son las que siguen multiplicándose, ya que se crean diferencias en los

metabolismos de las bacterias en cada una de las diferentes capas que se crean en el biofilm (Lasa, 2005).

Actualmente se conoce que la *Leptospira* posee genes que codifican señales que le ayudan a la formación del biofilm, incluso se conocía su capacidad por formar agregaciones de bacterias como una forma de sobrevivir en agua fresca (Trueba, 2004). Pero no es hasta el presente año que se pudo demostrar que esta agregación bacteriana se debe a la formación de biofilm (Ristow, 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto se realizó dada la importancia que tiene la leptospirosis en el campo de la salud pública, asociada principalmente a inundaciones donde se producen la mayoría de brotes. Por otro lado, es importante conocer cuáles son las estrategias que tiene la *Leptospira* para mantener su infectividad en el agua cuando se generan dichas condiciones.

La leptospirosis es una zoonosis que se encuentra muy difundida en el mundo y causa muchos perjuicios económicos (Naranjo 2007). En países de Latino América esta enfermedad ha sido diagnosticada con mayor frecuencia en los últimos años, y este aumento se debe a algunos fenómenos ambientales que han favorecido su propagación, como es el caso del fenómeno del Niño (Levet, 2001).

Al ser una enfermedad que se encuentra principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, los países que están presentes en dichas zonas son los más afectados por ella, pero lo que hace que esta enfermedad cobre importancia son las condiciones ambientales como las precipitaciones de lluvias, el aumento del caudal de los ríos, variaciones en la temperatura y humedad relativa e incluso el pH y la composición de los suelos (Levet, 2001).

Como se mencionó en el párrafo anterior, uno de los fenómenos naturales que han ayudado a la distribución de estas espiroquetas a lo largo de países tropicales es el fenómeno del Niño, que traen con él el aumento en las precipitaciones de lluvias, el aumento en el caudal de los ríos, que en algunos casos llegan a inundar ciudades y con ello facilitar el contacto entre la *Leptospira* y los animales huéspedes y el humano.

Las dos primeras condiciones ambientales, precipitación de lluvias y aumento del caudal de los ríos, son las más importantes al momento de la transmisión de la enfermedad, debido a que ha sido demostrado que el agua es el principal vehículo de

transporte para la *Leptospira* y en el cual puede permanecer por largos períodos de tiempo con escasos o nulos nutrientes (Trueba et al, 2002).

Al ser el Ecuador un país que se encuentra situado en una zona tropical y que sufre los ataques de fenómenos naturales como el del Niño, es de gran importancia conocer sobre la leptospirosis y el comportamiento de la bacteria que causa.

El último brote epidémico de importancia se lo reportó en 1998, durante el fenómeno del Niño, dicho brote comenzó en el mes de enero del mencionado año y empezó en la provincia del Guayas debido a fuertes lluvias que produjeron serias inundaciones y desbordamientos de ríos. En dicho año, en el mes de octubre según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador se reportaron 338 casos de leptospirosis que incluían 19 fallecimientos, debido a la mencionada enfermedad, en varias provincias de la Costa ecuatoriana. (Ministerio de Salud Pública, 1998).

El propósito de este proyecto es recrear *in vitro* las condiciones ambientales a las que la *Leptospira* se ve expuesta y estudiar las estrategias de cómo es que esta bacteria puede sobrevivir y mantener su virulencia en el agua en condiciones adversas. Cabe recalcar que este es el primer estudio sobre la formación de biofilm como mecanismo de sobrevivencia de la *Leptospira* en el agua que se ha hecho en el Ecuador.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

El propósito de este estudio fue investigar *in vitro* el comportamiento de la *Leptospira* en agua.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar la posibilidad de formación de biofilm como mecanismo de supervivencia en *Leptospira*.
- Intentar la formación de biofilm en diferentes superficies para determinar en cuál de ellas se podía observar mejor la formación de biofilm.
- Utilizar técnicas de microscopía y tinción para comprobar la formación de biofilm.

### **4. AREA DE ESTUDIO**

La bacteria utilizada en este estudio, fue *Leptospira interrogans* serovar Lai del cepario del laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. El manejo y la experimentación de esta bacteria se la realizaron en el laboratorio de microbiología de la USFQ. Adicionalmente todo el trabajo de laboratorio se realizó con material autoclavado y dentro de la cámara de flujo laminar.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Cultivo de *Leptospira***

- Medio EMJH (Ellinghausen & McCullough, modificado por Johnson & Harries) (Acosta, 1994) que consta de 2 partes:
  - Medio Basal =  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; Piruvato de Sodio; Tiamina; Glicerol;  $\text{NaCl}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
  - Suplemento de albúmina =  $\text{FeSO}_4$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; BSA;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Cianocobalamina (vitamina B12).
- Agua Bidestilada
- Estufa Lab-line Imperial II

#### **5.1.2. Centrifugación de *Leptospira***

- Centrífuga Eppendorf 5415D

#### **5.1.3. Conteo de supervivencia de *Leptospira* luego de centrifugación**

- Cámara de Petroff – Hausser
- Microscopio de campo oscuro Olympus BX40

#### **5.1.4. Cultivo de *Leptospiras* en agua y observación de biofilm**

- Agua Bidestilada Estéril pH 7.2
- Estufa Lab-line Imperial II
- Microscopio de campo oscuro Olympus BX40

#### **5.1.5. Tinción de placa**

- Cristal violeta
- Microscopio de campo claro Leica

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Cultivo inicial de *Leptospira***

La bacteria utilizada en este estudio fue *L.interrogans* serovar Lai, obtenida del cepario del laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

El cultivo inicial comenzó el 18 de agosto del 2007 en el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

La *Leptospira* fue cultivada en el medio EMJH (Ellinghausen & McCullough, modificado por Johnson & Harries) (Acosta, 1994) a 27°C en tubos de ensayo de 25 mls (Figura 1). Cada tubo contenía 10 ml de medio EMJH y 1 ml del cultivo de *L.interrogans* serovar Lai. Se cultivaron 4 días a las bacterias antes de obtener un crecimiento logarítmico y poderla utilizar para realizar un cultivo masivo. Para el cultivo masivo se tomó 1 ml de bacterias que se encontraban en crecimiento logarítmico y se las añadió a 100 ml de nuevo medio EMJH en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (Figura 2). Con el cultivo masivo se consiguió una concentración importante de células para realizar los siguientes experimentos.

### **5.2.2. Obtención de células de *Leptospira* libres de medio**

Luego de 5 días el cultivo masivo fue dividido en 4 tubos, de 25 ml cada uno, y fueron centrifugados durante 5 minutos a 5000rpm a una temperatura de 25°C.

### **5.2.3. Contaje de células viables de *Leptospira* luego de centrifugación**

Posterior se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en agua estéril pH 7,2 en cada uno de los 4 tubos, a continuación se midió la concentración de las bacterias colocando 3µl de la re suspensión de bacterias en la placa de conteo de Petroff-Hauser. Se realizó el conteo de 10 cuadrantes al azar y con ellos se sacó un promedio para obtener la concentración de células viables. Al final se utilizó ese promedio para obtener el número total de leptospiras por mililitro utilizando la fórmula:

$$Z = [\text{promedio} \times 400 \times 50 \times 1000].$$

#### **5.2.4. Formación de biofilm “*in vitro*”**

Como paso siguiente se colocaron 15ml de la re suspensión de *Leptospira* Lai y 10 ml de agua bidestilada estéril pH7.2 en un tubo Falcon de 50ml y posteriormente se colocó un portaobjetos estéril de forma vertical dentro del tubo Falcon (Figura 3). Por cada ensayo se realizaron 7 tubos Falcon.

Finalmente los tubos fueron colocados en la estufa a 27°C e incubó durante 15 días (Figura 4).

Luego del mencionado período, los porta objetos de los tubos Falcon fueron observados en el microscopio de campo oscuro en el lente 40x en tiempos diferentes. La primera placa se la observa inmediatamente después de sacarla del tubo Falcon y las 3 siguientes se las observe con 30 minutos de diferencia durante 1 hora y media.

#### **5.2.5. Tinción de placa**

Al mismo tiempo una placa fue introducida en metanol durante 5 minutos para fijarla y luego se la tiñó con cristal-violeta colocando 5 gotas del colorante sobre la placa y se lo dejó actuar por 3 minutos, posteriormente se decoloró la placa con agua hasta eliminar el exceso de colorante, finalmente se observó la placa en el microscopio de campo claro en el lente de 100x con aceite de inmersión (Figura 5).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1.1. Cultivo inicial de *Leptospira***

Inicialmente se cultivaron 12 tubos con *L. interrogans* serovar Lai y conforme estas iban madurando se los colocó en nuevo medio para mantener el cultivo. Algunos tubos se contaminaron con hongos o cocos y fueron eliminados. Al final, para terminar el estudio, se utilizaron dos tubos puros del cultivo inicial con *Leptospira*.

### **6.1.2. Centrifugación de *Leptospira***

En esta parte del estudio se registraron una serie de problemas al momento de extraer el sobrenadante ya que en algunas ocasiones el pellet de *Leptospira* se desprendía del fondo de los tubos y tenía que ser centrifugado nuevamente. Luego de algunos experimentos se llegó a estandarizar el proceso en 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 25°C.

### **6.1.3. Conteo de supervivencia de *Leptospira* luego de centrifugación**

El conteo de *Leptospira* en la cámara de Petroff-Hauser siempre produjo un promedio diferente en cada experimento realizado, esto se debió a que el estado de crecimiento de las bacterias siempre era diferente aunque el número de días de cultivos en la estufa y las condiciones de crecimiento eran las mismas. En la Tabla 1 se muestra el número de experimento y la cantidad de bacterias que se obtuvo en cada uno de ellos.

### **6.1.4. Cultivo de *Leptospira* en agua y observación de biofilm**

La formación de biofilm se pudo observar a los 15 días de realizado el cultivo a 27°C (Figura 6), en la placa se observó a algunas *Lestospira* inmovilizadas en una matriz translúcida, que estaban formando parte del biofilm, otras que estaban alrededor del mismo y también se podía evidenciar la matriz del mismo. Adicionalmente alrededor del biofilm se observaban formas similares a vesículas, que posiblemente se

traten de otra forma adaptativa de las *Leptospira* para sobrevivir a condiciones adversas. En esta etapa la actividad de las bacterias era baja, muy poca movilidad.

En una segunda observación, luego de colocar la placa con biofilm en medio EMJH durante 10 minutos, se pudieron observar las mismas estructuras que en la placa inicial, pero en esta ocasión, las bacterias que estaban formando parte del biofilm se empezaron a desprenderse del mismo y a volverse más móviles (Figura 8).

La observación siguiente se llevó a cabo a los 20 minutos de colocar la placa en medio EMJH y los resultados fueron muy similares a los vistos a los 10 minutos, solo que en esta ocasión algunas bacterias más se desprendieron del biofilm y un número mayor de vesículas desaparecieron (Figura 9).

Conforme aumentaba el tiempo de la placa en medio EMJH el biofilm iba desapareciendo, aunque la placa de los 20 minutos y la de los 30 minutos no muestra una diferencia sustancial, la única diferencia notoria fue que luego de los 30 minutos se observaban más *Leptospira* libres y móviles y se observaron menos vesículas (Figura 10).

Luego de dejar a la placa de biofilm durante una hora en medio EMJH la cantidad de biofilm observado fue mínima y ya casi no se observaron vesículas, por el contrario el número de *Leptospira* libres y móviles era aún mayor y se las podía diferenciar fácilmente del biofilm (Figura 11).

Y finalmente luego de 1 hora y media de colocada la placa en medio EMJH solo unas pocas *Leptospira* estaban formando parte del biofilm, ya casi ninguna vesícula y más bien lo que se podía observar eran manchas en la placa que parece ser las zonas de contacto de las bacterias con la superficie de la placa, lo que sugiere que pueden ser las adhesinas o sustancias que les permiten a las bacterias adherirse a la superficie (Figura 12).

### **6.1.5. Tinción de placa**

En cuanto a la tinción de la placa de biofilm con cristal-violeta lo que se pudo observar es a los exopolisacáricos teñidos de morado como se puede ver en la Figura 5 (conjunto de cuatro fotos), aunque la fijación del biofilm no fue homogénea, y debido a ello el biofilm se dividió y se observan a la capa de exopolosacáridos en diferentes lugares de la placa. Lo importante de la tinción es que el hecho que haya una tinción es una evidencia que comprueba la producción de exopolisacárido por parte de las bacterias.

## 7. DISCUSIÓN

Estudios preliminares han demostrado que la *Leptospira* puede mantenerse viable en el agua por períodos de tiempo largos (Trueba, 2002), y probablemente lo consigue gracias a la formación de biofilm y/o asociaciones microbianas favorables. Recientemente se ha reportado la formación de biofilm por parte de *Leptospira* saprofítica y patógena en condiciones de ambruna (Ristow, 2008).

La capacidad de *Leptospira* de mantenerse viable por largos períodos de tiempo en el agua facilitaría el aumento de espiroquetas en el ambiente y facilitar la infección. Por lo tanto, esta táctica de sobrevivencia en el agua juega un rol muy importante en la transmisión y la epidemiología de la leptospirosis. Con este estudio se trató de demostrar que la formación de biofilm es una de las estrategias que utiliza la *Leptospira* para sobrevivir en el agua y a la vez mantener su virulencia, aun cuando las fuentes de nutrientes y las condiciones ambientales sean adversas para su desarrollo.

Durante este estudio se observó la formación *in vitro* de biofilm de *Leptospira interrogans* serovar Lai bajo condiciones similares al medio ambiente. Adicionalmente, en un estudio anterior (Mejia, 2007), se demostró que la *Leptospira* patogénica puede formar asociaciones favorables con otras bacterias ambientales, por lo tanto es posible que la sobrevivencia de esta bacteria dependa de estas dos estrategias.

Desde hace algún tiempo se han venido formulando hipótesis sobre cómo es que la *Leptospira* puede mantenerse viable en el medio ambiente, ya que en la naturaleza existen factores adversos como cambios de pH, salinidad, temperatura, entre otros, que pueden afectar su supervivencia, incluso la composición química del suelo y el grado de sombra pueden afectar su crecimiento. Al parecer una hipótesis sugiere que la asociación con otras bacterias es una vía por las cuales la *Leptospira* puede vivir en condiciones adversas. (Karaseva, 1973; Smith, 1961). Ahora se suma a este hecho la

capacidad de *Leptospira* de formar biofilm como mecanismo de sobrevivencia en el medio acuático.

En cuanto a la formación de biofilm en laboratorio se pudo observar estructuras semejantes a quistes o vesículas, que ha sido previamente descrito como un cambio morfológico que optan ciertas bacterias para sobrevivir a condiciones adversas (Czekalowski, 1953). Este evento ya ha sido mencionado por algunos leptospirólogos que han descartado la posibilidad de un cambio de morfología por parte de *Leptospira*. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de estas vesículas está asociada a la formación de biofilm de *Leptospira* (Ristow, 2008). Por lo tanto, el estudio de estas estructuras como un posible estado de latencia o de resistencia en respuesta a condiciones ambientales desfavorables debe ser motivo de otra investigación.

En este estudio se observó que las leptospiras y vesículas formadoras de biofilm, inicialmente inmóviles e inmersas en la matriz de exopolisacárido, recuperaron la movilidad cuando fueron transferidas a medio de cultivo EMJH. En *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito que cuando un biofilm es colocado en un medio con nutrientes suficientes, las bacterias dejan su estado béntico (adherido a una superficie) para volver a su estado plantónico (libre en el medio) (Bester, 2005; Claeson, 2006). Esto demuestra que cambios en la composición del agua, serían las señales para que *Leptospira* deje su estado béntico en busca de un organismo hospedador.

## **8. CONCLUSIONES**

- Se comprobó, *in vitro*, la formación de biofilm por parte de *Leptospira* en agua.
- El tamaño del biofilm formado está directamente relacionado a la cantidad de leptospiras iniciales en el medio. Al ser un estudio de laboratorio, con condiciones controladas, el número de leptospiras no podía aumentar, como

suele darse en la naturaleza por ingreso de nuevas leptospiras a un biofilm establecido para hacerlo más grande.

- A la formación del biofilm le acompaña la creación de aparentes vesículas, por parte de las leptospiras, que podrían ser estructuras de latencia que forman para su sobrevivencia.
- Las bacterias y vesículas provenientes del biofilm al ser colocados en medio EMJH se liberan y generan espiroquetas libres y móviles, por lo que la formación de ambas estructuras podrían ser procesos reversibles.
- El comportamiento de la *Leptospira* en el agua es muy similar a la de otras bacterias como *Vibrio*, esto se comprueba ya que ambos tipos de bacterias poseen una vida dual y tienen genomas de gran tamaño, dentro de los cuales pueden estar genes involucrados en la supervivencia de estas bacterias en el medio ambiente, contrariamente a bacterias con genomas pequeños que han perdido la capacidad de sobrevivir en el ambiente y dependen del encuentro con un hospedador para su supervivencia.
- En el medio ambiente existen diversas técnicas que utilizan los microorganismos para sobrevivir, una de ellas es la formación de biofilm.

## **9. RECOMENDACIONES**

Realizar la observación del biofilm con microscopía electrónica, para caracterizar con precisión las estructuras esféricas (vesículas) que acompañan al biofilm.

Adicionalmente realizar inmunofluorescencia para comprobar que las bacterias formadoras del biofilm son verdaderamente leptospiras.

Estudiar a las estructuras similares a vesículas, para determinar su forma y composición, de igual manera en este tema sería importante utilizar microscopía electrónica para ello.

Por otro lado, sería interesante realizar un video de alta definición del comportamiento de las vesículas cuando se las vuelve a colocar en medio para ver cómo es que dejan su estado de latencia y vuelven a su estado plántico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta H, Moreno CH, Viáfara D (1994) Leptospirosis: Revisión Del tema. Colombia Médica 25: 36-42.
2. Bester E, Wolfaardt G, Joubert L, Garny K & Softic S (2005). Planktonic-Cell Yield of a Pseudomonad Biofilm. Applied and Environmental Microbiology Dec 71(12): 7792-7798.
3. Betancourt JA, Viamontes A, Navarro LM, González T (2000). Evaluación de campo de una vacuna cubana contra la Leptospirosis. Rev. Prod. Anim. 12: 79-82.
4. Cleason S, Li J, Compton J & Bisson P (2006). Response of nutrients, biofilm, and benthic insects to salmon carcass addition. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63: 1230-1241.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial Biofilm: A Common Cause of Persistent Infections. Microbes, Immunity and Diseases. May 284: 1318-1322.
6. Czekalowski JW, Eaves G (1953) Formation Of Granular Structures by Leptospirae as Reveled by the Electron Microscope. 67: 619-627.
7. Greenberg EP (2000) Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in Bacteria. The Journal of Microbiology Vol 38. 3: 117-121.
8. Herrera MT (2004) El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. NOVA Publicación científica ISSN 2:70-80.
9. Karaseva EV, Chernukha YK, Piskunova LA (1973). Results of Studying the Time of Survival of Pathogenic Leptospira under Natural Conditions. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. Mar; 17(3):339-45.
10. Lasa I (2005) Biofilms bacterianos. Atualidad SEM. 37:14-18

11. Lasa I, Del Pozo LJ, Penadés JR, Leiva J (2005) Biofilms bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar.: Vol28. 2: 163-175.
12. Levett PN (2001) Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. Vol 14. 2:296-325.
13. Mejía ME (2007). Relaciones Simbióticas y Antagónicas entre *Leptospira saprofitica* y bacterias fotosintéticas. Tesis Universidad San Francisco de Quito.
14. “Ministerio de Salud Pública; Cambio climático y enfermedades infecciosas: Consecuencias del fenómeno El Niño. Subcomité de planificación y programación del Comité Ejecutivo. SPP30/5 (Esp.) febrero de 1998”
15. Naranjo M, Suárez M (2007) Confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis en Honduras tras el paso del huracán Mitch y potencialidad profiláctica de vax-SPIRAL. Vacci Monitor, año 16, 3: 13-18.
16. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, et al. (2008) Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the evolution of *Leptospira* and Pathogenesis of Leptospirosis. PLoS ONE 3: e1607: 1
17. Piera G (2003) Estudio de biofilm: Formación y consecuencias. Escola de Prenció Seguretat Integral 1-27.
18. Ristow P, Bourthy P, Picardeu M, et al (2008) Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology 154: 1309-1317.
19. Smith G, Turner LH (1961) The effect of pH on the Survival of Leptospire in Water. Bull Wld Hlth Org 24: 33-43.
20. Trueba G, Zapata S (2002) Adaptación de *Leptospira interrogans (sensu stricto)* al agua dulce. Rev Cubana Med Trop 54(1): 11-4.

21. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P & Haake D (2004), Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35-40.
22. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC (1996). Sporadic urban leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125: 794-798.

## 11. TABLAS

<b>Número de experimento</b>	<b>Promedio (bact. X cuadrante)</b>	<b>Número de bacterias x ml</b>
Experimento N°1	6,2	124'000.000
Experimento N°2	10,4	208'000.000
Experimento N°3	4,0	80'000.000

**Tabla 1.** Número de experimento y cantidad de *Leptospira* que se contó en cada uno de ellos después de realizada la centrifugación y la resuspensión en agua.

## 12. FIGURAS

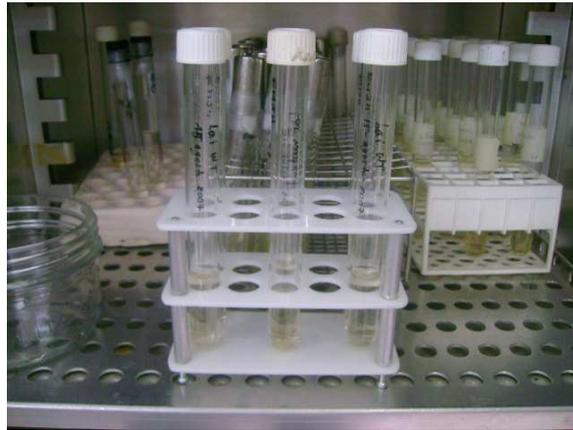


Figura 1: Cultivo primario de *Leptospira* en medio EMJH



Figura 2: Cultivo masivo de *Leptospira* en matraz Erlenmeyer

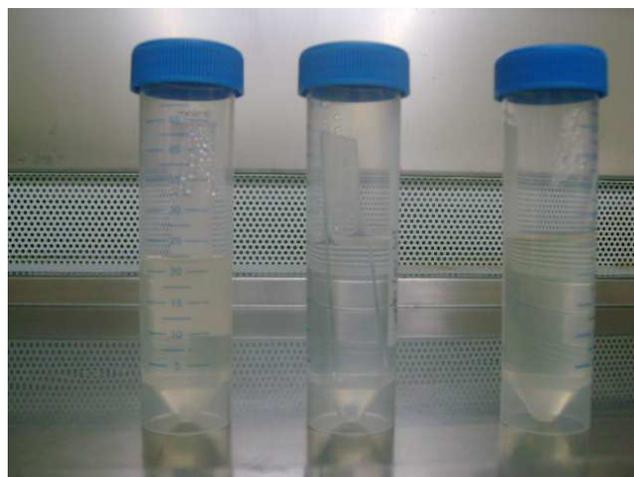
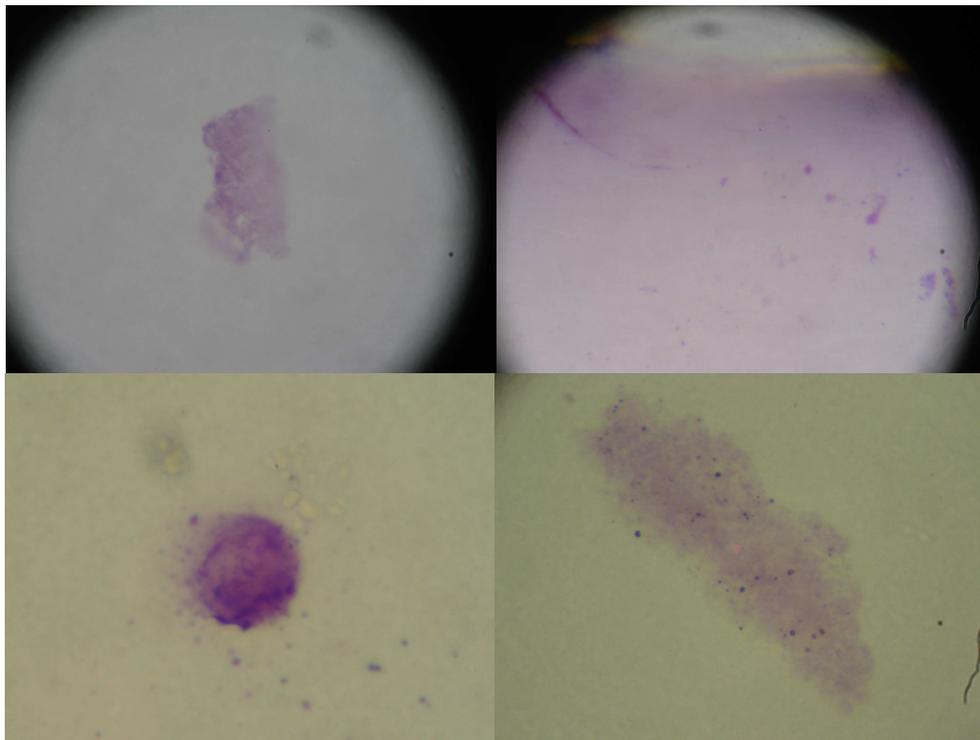


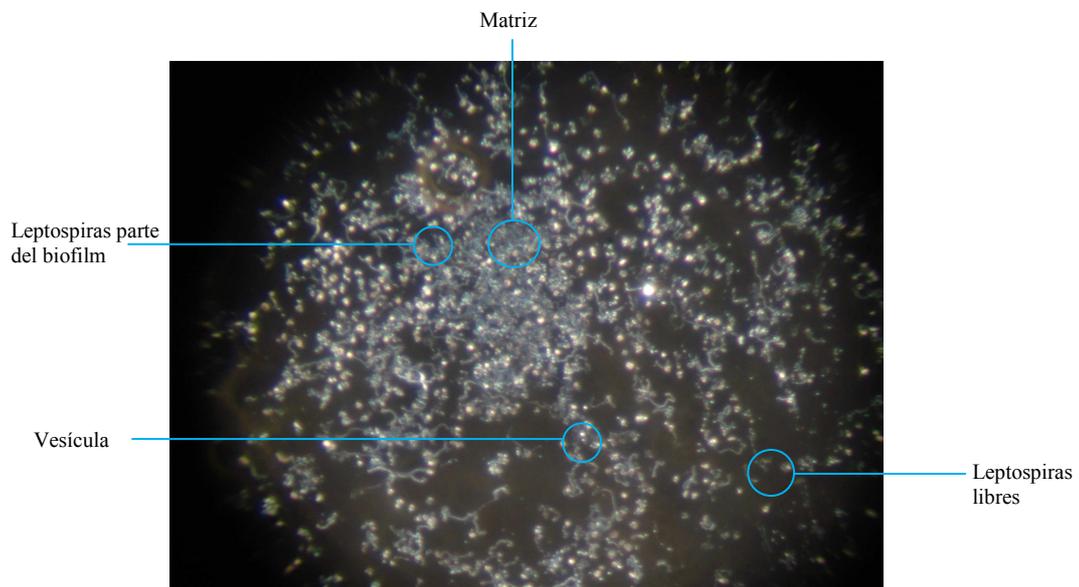
Figura 3: Cultivo de *Leptospira* en agua en tubos Falcon con portaobjetos



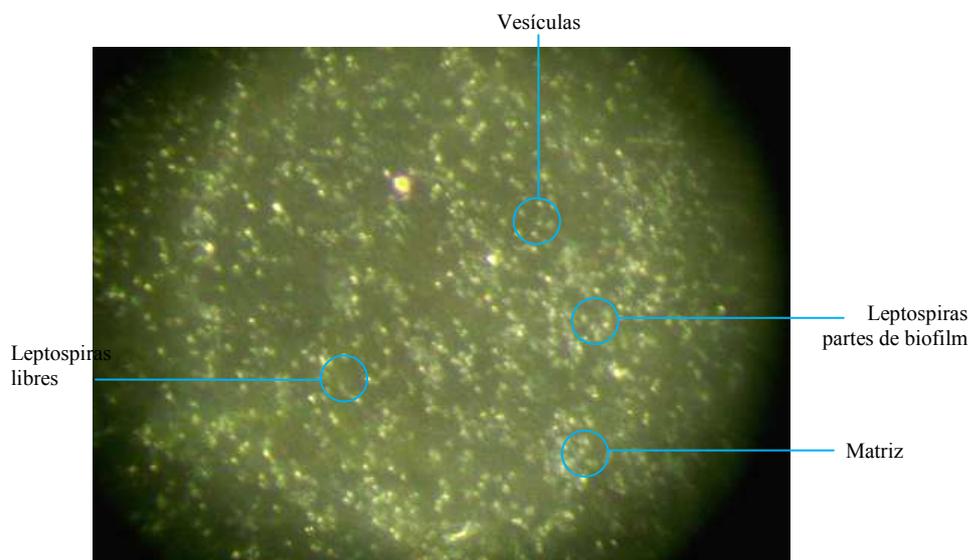
**Figura 4: Cultivos de tubos Falcon con portaobjetos**



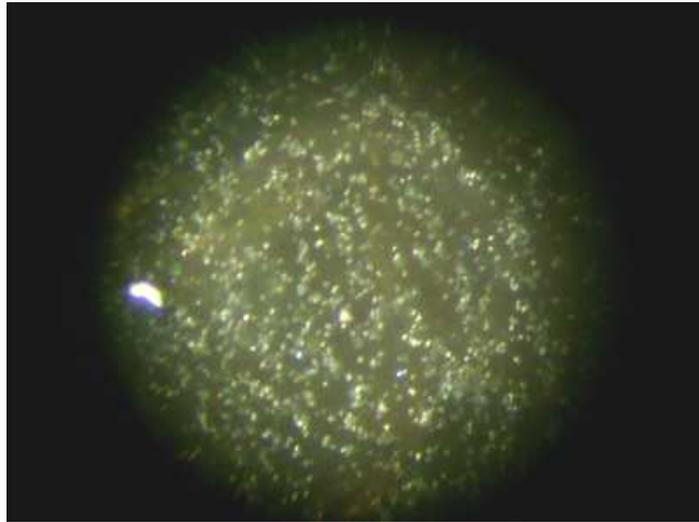
**Figura 5: Tinción de una placa con biofilm**



**Figura 6: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 15 días de cultivadas en agua**



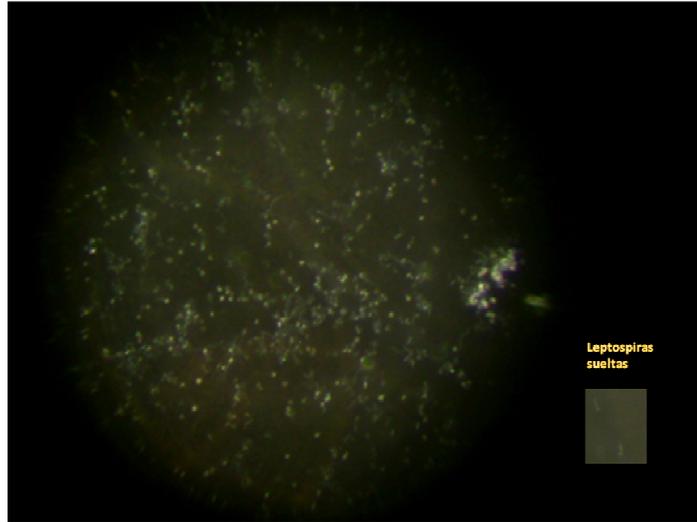
**Figura 7: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 1 mes de cultivadas en agua**



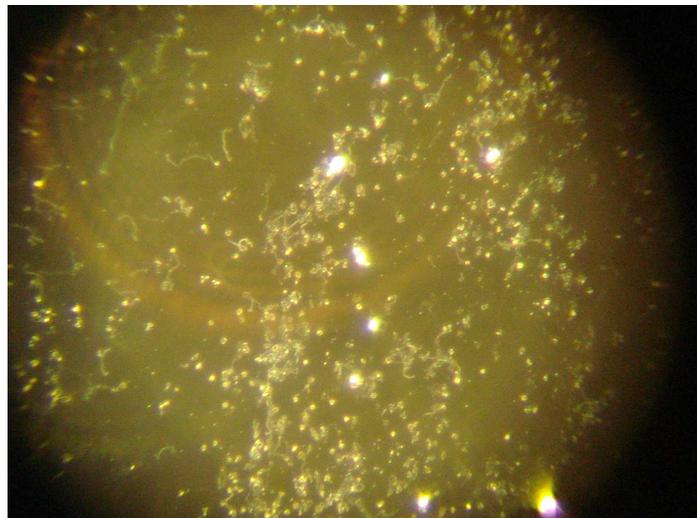
**Figura 8: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 10 minutos de colocadas en medio EMJH**



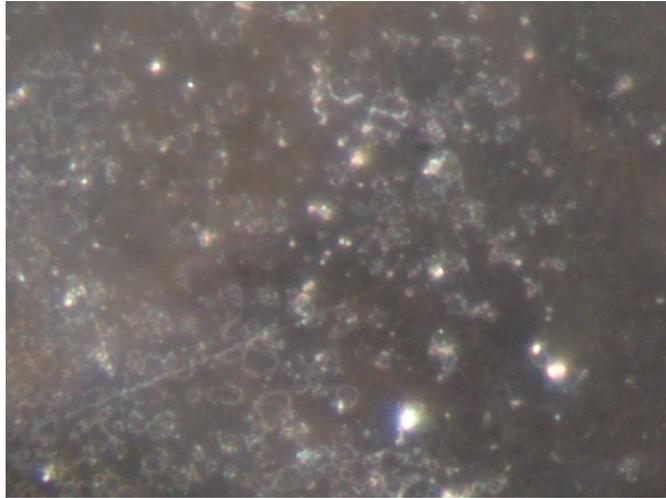
**Figura 9: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 20 minutos de colocadas en medio EMJH**



**Figura 10: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 30 minutos de colocadas en medio EMJH**



**Figura 11: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 1 hora de colocadas en medio EMJH**



**Figura 12: Observación de biofilm de *Leptospira*, después de 1 hora y 30 minutos de colocadas en medio EMJH**