



Maestría en 
Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente



MEMORIAS

5 Congreso Internacional por el **Desarrollo Sostenible** y el **Medio Ambiente**



El pensamiento y las acciones estatales, universitarias, empresariales e investigativas al servicio de la sostenibilidad.

Empleo de metodologías para el análisis de biopelículas presentes en reactores de biodiscos

González María Elena¹, Arroyave Joan Amir², López Jesús María³, Zapata Julieth Alexandra⁴, Ramírez Viviana⁵, Cañas Mariana⁵, Palacio Valentina⁵, Arango Alejandro⁵

Resumen

Introducción: Los microorganismos adheridos a una biopelícula juegan un papel importante en la degradación y transformación de contaminantes presentes en aguas residuales. Para la formación de la biopelícula, estos emplean diferentes mecanismos como la producción de exopolisacáridos que determinan la estructura, la presencia de flagelos y moléculas señalizadoras (quórum sensing). En el tratamiento de aguas residuales, es necesario el estudio de la

¹Bacterióloga, Especialista en Gestión Ambiental. Docente investigador grupo Biociencias. Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

²Ingeniero Sanitario, Especialista en Construcción Sostenible, Estudiante Maestría en Medio Ambiente y Desarrollo. Docente investigador grupo Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad, Facultad de Arquitectura e Ingeniería, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

³Biólogo, Magíster en Biotecnología, Docente investigador grupo Biociencias. Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

⁴Bacterióloga, Estudiante de la Especialización en Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

⁵Estudiante pregrado Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

Proyecto en curso: "Evaluación de la eficiencia de la remoción de la materia orgánica empleando biodiscos en un agua residual sintética a escala de laboratorio".

Correspondencia: María Elena González Duque. e-mail: maria1.gonzalez@colmayor.edu.co

Teléfono: 4445611 ext 163, celular 3113156148. Fax: 2648824. Dirección Colegio Mayor de Antioquia: Carrera 78 No. 65- 45 Medellín- Antioquia. Dirección residencia: Cra 86B No. 49ª 80 apartamento 502 Edificio Versalles.

ecología microbiana, debido a que de esta manera se puede tener conocimiento de lo que sucede al interior del reactor, de la mano de los parámetros fisicoquímicos. **Materiales y métodos:** Se empleo como reactor de prueba una cubeta plástica, se introdujo un disco rugoso en acrílico de 26cm de diámetro y 3mm de espesor para la fijación de biopelícula; se agregaron cuatro litros de agua residual doméstica proveniente de una quebrada ubicada en el municipio de Bello, Antioquia; el reactor se alimentados veces/semana con 10 ml leche entera como sustrato y se suministro aireación para mantener las condiciones aerobias del reactor. **Resultados:** Se evaluaron métodos como la adhesión a placas de poliestireno con las soluciones de cristal violeta y safranina evidenciando la capacidad de formación de biopelícula para varios microorganismos; para el caso del método de agar rojo Congo, se realizaron modificaciones y se evidenció el crecimiento característico con colonias negras y lustrosas. **Conclusiones:** Se determino la capacidad de formación de biopelícula para microorganismos de interés ambiental como *Staphylococcus* sp, *Bacillus cereus*, *Aeromonas* sp y *Pseudomonas aeruginosa* por los métodos evaluados.

Palabras clave: biopelícula, reactor, biodiscos, ecología microbiana, biodegradación.

USE OF METHODOLOGIES FOR THE ANALYSIS OF BIOFILMS IN BIODISCS REACTORS

Summary

Introduction: The microorganisms adhered to a biofilm play an important role in the degradation and conversion of pollutants in wastewater. For biofilm formation, they use different mechanisms such as production of exopolysaccharides which determine the structure, the presence of flagella and signaling molecules (quorum

sensing). In wastewater treatment, it is necessary to study microbial ecology, because in this way may have knowledge of what goes into the reactor, the hand of the physicochemical parameters. **Materials and methods:** Use as a test reactor a plastic bucket, we introduced a rugged acrylic disk 26 cm in diameter and 3 mm thick for fixing biofilm, were added four liters of domestic wastewater from a stream located in the municipality of Bello, Antioquia, the reactor was fed twice/ week with 10 ml whole milk was supplied as substrate and aeration to maintain aerobic conditions in the reactor. **Results:** We evaluated methods and adherence to polystyrene plates with solutions of crystal violet and safranin evidencing the ability to form biofilm to various microorganisms, in the case of Congo red agar method, modifications were made and showed the characteristic growth with black and shiny colonies. **Conclusions:** We determined the ability of biofilm formation for microorganisms of environmental interest such as *Staphylococcus sp*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas spp* by the methods evaluated.

Keywords: biofilm, reactor, Biodisc, microbial ecology, biodegradation.

Introducción: Existe una problemática ambiental generada a partir de las aguas residuales, éstas surgen principalmente de los desechos generados por actividades industriales, agrícolas y domésticas. A lo anterior se suma el progreso tecnológico, los actuales modelos de consumo y el aumento de la población. Se hace necesario entonces el tratamiento de aguas residuales con el fin de proteger la salud pública ya que más de la mitad de la población que ocupa los hospitales en países en desarrollo es a causa de enfermedades transmitidas por aguas y alimentos contaminados; lo anterior trae consecuencias económicas como el ausentismo laboral y escolar además del deterioro ambiental.

Dentro de los tratamientos realizados a las aguas residuales se encuentran los métodos físicoquímicos y biológicos. El inconveniente con los primeros es que se agrega más contaminación al ambiente. Los tratamientos biológicos buscan principalmente reducir el contenido de materia orgánica y nutrientes presentes en las aguas residuales aprovechando la actividad de los microorganismos que para el caso de los sistemas de biodiscos, están presentes en el agua residual a

tratar formando biopelículas; estas se definen como comunidades de microorganismos envueltos en una matriz formada por factores biológicos y estructuras específicas. Los microorganismos en una biopelícula juegan un papel muy importante en el reciclaje de nutrientes de diversos ambientes y la biodegradación de contaminantes ambientales como el caso de las aguas residuales. Las biopelículas se crean cuando las bacterias libres flotantes perciben una superficie, se adhieren a ella y a continuación, elaboran señales químicas para coordinar diferenciación y formación de estructuras, incluyendo el desarrollo de una cubierta protectora que las hace resistentes a factores medioambientales como humedad, temperatura y pH, facilitando así la eliminación de desechos. Para su formación, los microorganismos emplean estructuras específicas y factores biológicos como: la movilidad mediada por flagelos que proporciona la adhesión inicial y formación de microcolonias, la producción de exopolisacáridos para la base estructural, moléculas señalizadoras (AHL) del quorum sensing, proteínas extracelulares, pili, mecanismos de quimiostasis y bacterias deslizantes.

Los reactores de biodiscos utilizan discos de materiales rugosos a los que se adhieren las biopelículas; cuando el disco está sumergido en el agua residual los microorganismos se alimentan de la materia orgánica presente en el agua residual a tratar

En el presente estudio se evaluó la capacidad de formación de biopelícula en un reactor de biodiscos a escala piloto tratando aguas residuales domésticas; para esto se implementaron técnicas microbiológicas con el fin de aislar e identificar microorganismos formadores de biopelícula. Se planteó entonces:

- Objetivo general: Implementar diferentes metodologías para el análisis microbiológico del potencial de formación de biopelícula y los microorganismos responsables, empleando reactores de biodiscos.

Objetivos específicos:

- Evaluar la capacidad de formación de biopelícula en los microorganismos presentes en aguas residuales domésticas con el fin de favorecer la biodegradación de la materia orgánica.

- Identificar los principales grupos de microorganismos (bacterias y protozoos) responsables de la formación de biopelículas empleando técnicas microbiológicas.
- Estandarizar a nivel de laboratorio métodos combinados para el análisis microbiológico de biopelículas aisladas en reactores de biodiscos.

Materiales y métodos: El experimento se realiza en el laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Se emplea como reactor de prueba una cubeta plástica de 30*45 cm aproximadamente (ver figura 1), a este se le introdujo un disco rugoso en acrílico de 26 cm de diámetro y 3mm de espesor para facilitar la fijación de la biopelícula (ver figura 1). Se agregaron 4 litros de agua residual doméstica proveniente de una quebrada ubicada en el municipio de Bello, Antioquia; se adiciono periódicamente (2 veces/semana, 10 ml) leche entera como sustrato y se suministró aireación para mantener las condiciones aerobias del reactor. Se adicionaron al reactor láminas portaobjetos las cuales se colocaron previamente en forma aleatoria; paralelamente se evaluó la adhesión de biopelículas empleando láminas portaobjetos sumergidas en el agua residual empleando frascos de 100 ml, se colocaron 2 láminas portaobjetos por frasco en posición oblicua y se incubaron a 37°.



Figura 1. Reactor de biodisco con biopelícula de 7 días de formación. Grupos Biociencias y Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

Luego del montaje del reactor se esperó de 7 a 10 días, tiempo en el cual se forma la biopelícula y se procedió a tomar la muestra.

Procedimiento para la toma de muestras: Se siguió la metodología reportada por Li Meng y colaboradores (2009): la muestra de biopelícula se tomó directamente del biodisco con la ayuda de un hisopo de algodón estéril, se enjuagó previamente con solución salina estéril para remover las células no adheridas; se pasaron a un erlenmeyer de 150 ml adicionando 50 ml de solución salina estéril. Se llevó a un shaker a 80 rpm durante 20 minutos con el fin de incrementar el número de bacterias presentes en la biopelícula; descartar el sobrenadante y proceder a la siembra de la muestra.

Procedimiento para la siembra de la muestra: A partir de la biopelícula lavada en el paso anterior, se realizan diluciones seriadas de la muestra desde 10^{-1} hasta 10^{-9} (esto depende de la cantidad y concentración de la muestra), posteriormente sembrar las diluciones en agar Luria Bertani (100 μ l: microlitros de muestra, dos cajas por dilución y 4 diluciones por muestra). Incubar a 37°C por 48- horas y realizar el recuento de bacterias en biopelícula; para esto se emplea el método de recuento estándar en placa por siembra en superficie y se reporta en unidades formadoras de colonias (UFC).

Caracterización de las colonias: Se procede al estudio de las colonias que crecieron en el paso anterior iniciando el esquema de identificación así:

- Observación de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias.

- Coloración de Gram para determinar morfología y agrupación; se realiza paralelo a la coloración, el control de calidad de la misma empleando una solución de KOH al 3% (Ver figura 2).

- Prueba de oxidasa y catalasa.

De acuerdo a los resultados de los pasos anteriores, las colonias se siembran en medios de cultivo selectivos (Bair Parker, Eosina azul de metileno: EMB o Mc Conkey, Mossel, Tripticasa de soya, agar Cetrimide, entre otros).

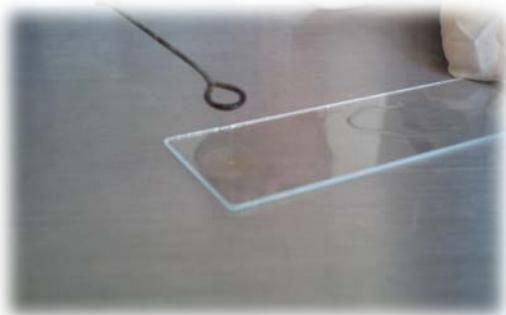


Figura 2. Control de calidad de la coloración de Gram con KOH al 3%. Grupos Biociencias y Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

Identificación bioquímica: Se montan a la par pruebas bioquímicas en medios como: TSI (Triple azúcar hierro), LIA (Lisina- hierro agar), MR- VP(Caldo rojo de metilo- VogesProskauer), agar úrea, agar citrato Simons, agar bilis esculina, caldo nitrato, agar SIM(sulfuro- indol- movilidad), entre otros. Se inoculan en estos medios las colonias aisladas y se incuban durante 48 horas a 37°C, luego se realiza la lectura de los medios.

Para evaluar metabolismo bacteriano y su relación con el oxígeno, se emplea el medio OF glucosa (oxidación- fermentación); a la par, se siembran las colonias en estudio en agar sangre empleando una atmósfera aerobia y en anaerobiosis (se emplea una jarra de anaerobiosis, sobres generadores e indicadores de

anaerobiosis y agar sangre prereducido). Se incuban estas últimas durante 5 días y las bacterias aerobias durante 48 horas.

Observación en fresco y técnicas de tinción: Cuando la biopelícula está formada, se limpia un lado de la biopelícula formada en el portaobjetos y al otro lado se agregan dos gotas de solución salina para la observación en fresco, a otro portaobjetos se le adiciona 2 gotas de lugol parasitológico con el fin de observar protozoos, nematodos, bacterias filamentosas y algas; finalmente, colorear un tercer portaobjetos con Gram para observar morfología y agrupación bacteriana.

Fase de ensayo de formación de biopelículas: Las colonias identificadas en los pasos anteriores, se analizan para determinar la capacidad de formación de biopelículas con el siguiente procedimiento:

1. Adhesión a placas de poliestireno empleando una solución de cristal violeta para determinar la presencia de biopelícula. Las colonias aisladas en cultivos puros se siembran en caldo Luria Bertani, se incuban durante 48 horas a 37°C. Se inocula por duplicado 100 µl de la muestra de cada colonia en microplacas de poliestireno de 96 pozos, se incuban a 37°C durante toda la noche; luego de la incubación, se decanta el medio y se añade a cada pozo 125 µl de una solución de cristal violeta preparado al 0,1% en etanol al 0.25%, se deja actuar por 5 minutos y se enjuaga con agua de grifo. Las colonias positivas, dejan en la placa un halo azul violeta y este se informa por cruces desde – (negativo) hasta +++ cuando es muy positivo (ver figura 3).

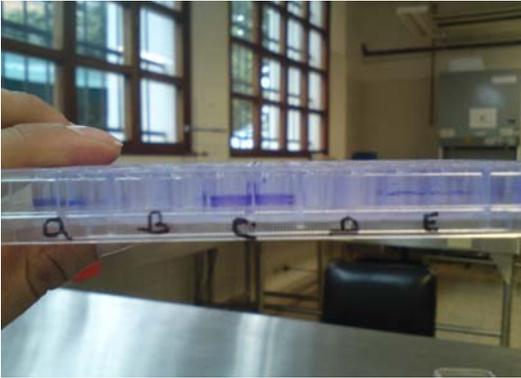


Figura 3. Placa de poliestireno teñida con cristal violeta al 0,25%. Grupos Biociencias y Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

2. Adhesión a placas de poliestireno empleando una solución de una solución de safranina. Las colonias aisladas en cultivos puros se siembran en caldo Luria Bertani, se incuban durante 48 horas a 37°C. Se inocula por duplicado 100 µl de la muestra de cada colonia en microplacas de poliestireno de 96 pozos, se incuban a 37°C durante toda la noche; luego de la incubación, se decanta el medio y se añade a cada pozo 125 µl de una solución de safranina preparada al 0,5% en agua destilada, se deja actuar y se deja actuar por espacio de 1 minuto y se enjuaga con agua de grifo. Las colonias positivas, dejan en la placa un halo rosa-rojo y este se informa por cruces desde – (negativo) hasta +++ cuando es muy positivo (ver figura 4).

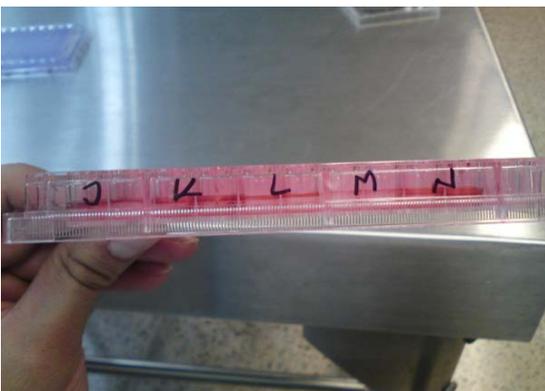


Figura 4. Placa de poliestireno teñida con safranina al 0,5%. Grupos Biociencias y Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia).

Crecimiento en agar Rojo Congo: Las colonias en estudio se siembran en este agar y se incuban a 37°C por 48 horas. La prueba es positiva para la formación de biopelículas por el desarrollo de colonias negras y lustrosas a diferencia de las colonias que no forman biopelícula las cuales se presentan de color rosado o rojo (ver figura 5).



Figura 5. Colonias negras positivas en Agar rojo congo. Grupos Biociencias y Ambiente, Hábitat y Sostenibilidad de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia).

Resultados: De acuerdo a las observaciones microscópicas se encontraron los siguientes microorganismos consignados en la tabla 1:

Tabla 1. Microorganismos observados por microscopía

Técnica	Protozoos y algas	Bacterias
Preparación en fresco	<i>Trichostrongylus</i> , amebas tecadadas: <i>Archella</i> , Ciliados: (Tetrahymena), nemátodos	Bacilos y cocobacilos, bacterias filamentosas

	de vida libre, algas, larvas y quistes de protozoos	
Tinción con Lugol	Larvas y protozoos de vida libre, amebas tecadas y algas	Bacilos y cocobacilos
Coloración de Gram	N/A	Cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos, algunos esporulados, bacilos Gram negativos, cocobacilos Gram negativos

N/A: No aplica

Se evidenció mediante microscopía, observación en fresco y coloraciones una sucesión de microorganismos a medida que madura el biorreactory se forma la biopelícula.

Se encontraron resultados positivos por el método del agar Rojo Congo para varios de los microorganismos evaluados; estos se combinaron con la técnica de adhesión en placa y se confirmaron a nivel de género mediante pruebas bioquímicas. Los mismos han sido reportados por otros autores.

Tabla 2. Microorganismos identificados por métodos combinados.

Microorganismo	Técnica empleada	Referencia
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.,	Combinados	González et al

Staphylococcuscoagulasa
negativo, Aeromonassp,
protozoos de vida libre,
algas y bacterias
filamentosas

Discusión: Se evidenció la capacidad de formación de biopelícula para algunos microorganismos por los métodos evaluados; se identificaron además, microorganismos de interés ambiental los cuales son responsables de la degradación de la materia orgánica presente en el agua residual. Con estos aislamientos se está montando un banco de cepas con el fin de ser empleadas en procesos biotecnológicos.

Con el número de repeticiones (5) del montaje del bioreactor, logramos estandarizar metodologías a nivel de laboratorio para el análisis de microorganismos con capacidad de formación de biopelícula en el reactor.

Los microorganismos adheridos a una biopelícula juegan un papel importante en la degradación de contaminantes presentes en aguas residuales, haciendo necesario el estudio de la ecología microbiana y de esta manera tener conocimiento de lo que sucede al interior del reactor de la mano de parámetros fisicoquímicos.

Se pretende llegar hasta la identificación molecular de los microorganismos más representativos del proceso previa utilización de los métodos simples para ser aplicados en la solución de problemas ambientales.

Debido a la composición de las aguas residuales y a la ecología microbiana de estas, se recomienda estandarizar cada método reportado en la bibliografía

acorde a las necesidades de cada laboratorio, a los recursos disponibles y la experiencia de los investigadores ya que se pueden combinar varios métodos para lograr así, mejores resultados.

Es necesario mirar el funcionamiento de un reactor como un todo teniendo en cuenta las variables fisicoquímicas y microbiológicas y de esta manera optimizar su funcionamiento.

Los métodos microbiológicos para la evaluación de biopelículas pueden ser empleados en otros campos donde las biopelículas causan problemas como es el caso de la salud y en la industria de alimentos.

Agradecimientos: El grupo de trabajo del proyecto biodiscos agradece a la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia por el acompañamiento en la realización y difusión del presente trabajo.

Bibliografía

1. A. Zornoza, E. Reina, R. F. López. Control Microbiológico operacional en el tratamiento de aguas de la Industria Fenol-Acetona y síntesis de aminos. V Jornadas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. (2008)
2. I. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva. Biofilms bacterianos e infección. Análisis de sistemas sanitarios (2005) Vol. 28, Nº 2 163-175.

3. D.J Freeman, F.R Falkiner, C.T Keane. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J ClinPathol* (1989); 872-874
4. A.I. Dadawala*, Chauhan H.C., et al. Assessment of *Escherichia coli* isolates for In vitro biofilm production. *Veterinary World* (2010); Vol.3(8): 364-366
5. N. S. Mariana, S. A. Salman, V. Neela and S. Zamberi. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin–resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* (2009). Vol. 3(6) pp. 330-338
6. S. Mattar, et al. Estudio microbiológico de los *Staphylococcus* coagulasa negativos productores de biocapamucoide ("slime"). *INFECTIO*, Asociación Colombiana de Infectología, (2007)
7. T. Mathur, S. Singhal, S. Khan, D.J Upadhyay, T. Fatma, A. Rattan. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, (2006) 24 (1):25-9
8. L.I Meng-Ying, et al. Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. *Pedosphere* (2009)19(5): 554–561
9. I. L. Uzcudun. Biofilms bacterianos. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. (2004)
10. G.D. Christensen, et al. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology*, (1985), p. 996-1006.