



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA



Evaluación Cuantitativa del Crecimiento de Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mediante el Uso de un Marcador Fluorescente Intrínseco y Análisis de Imágenes Asistido por Software

Castilla Sedano, Anderson Javier

Guerra Giraldez, Daniel

Padilla Huamantínco, Pierre

Valdivia del Águila, Erika

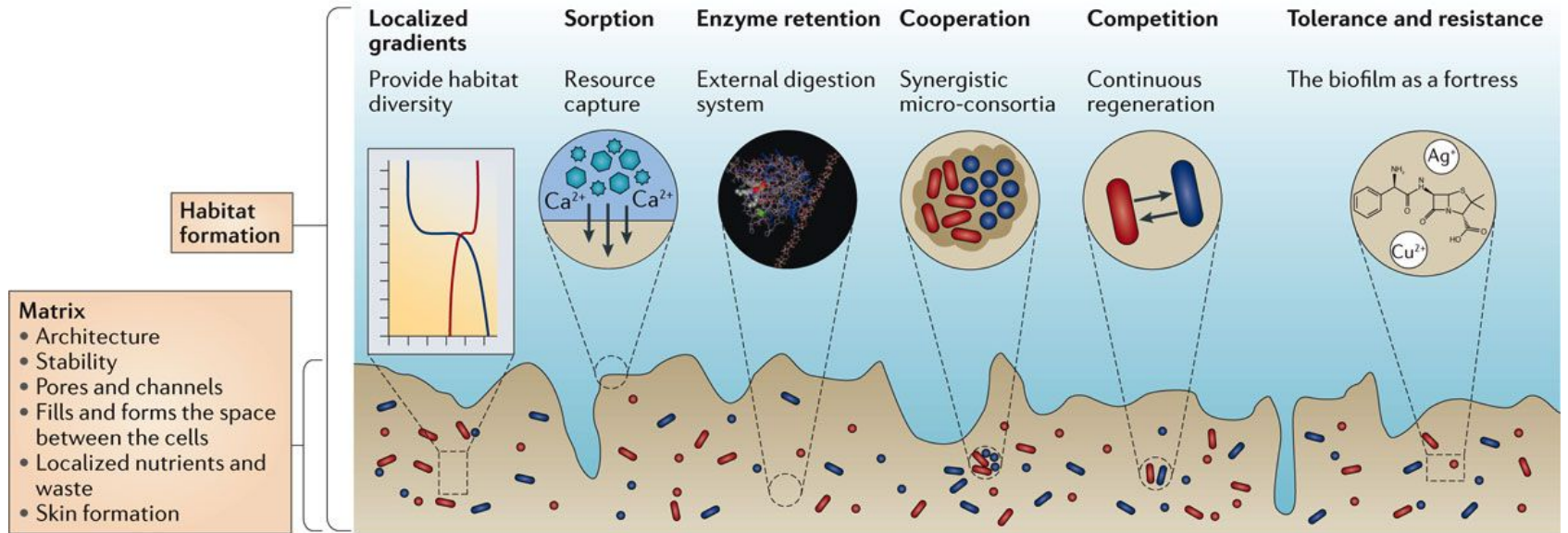
Zapana García, José

Laboratorio de Moléculas Individuales - LID

JORNADA CIENTÍFICA UPCH

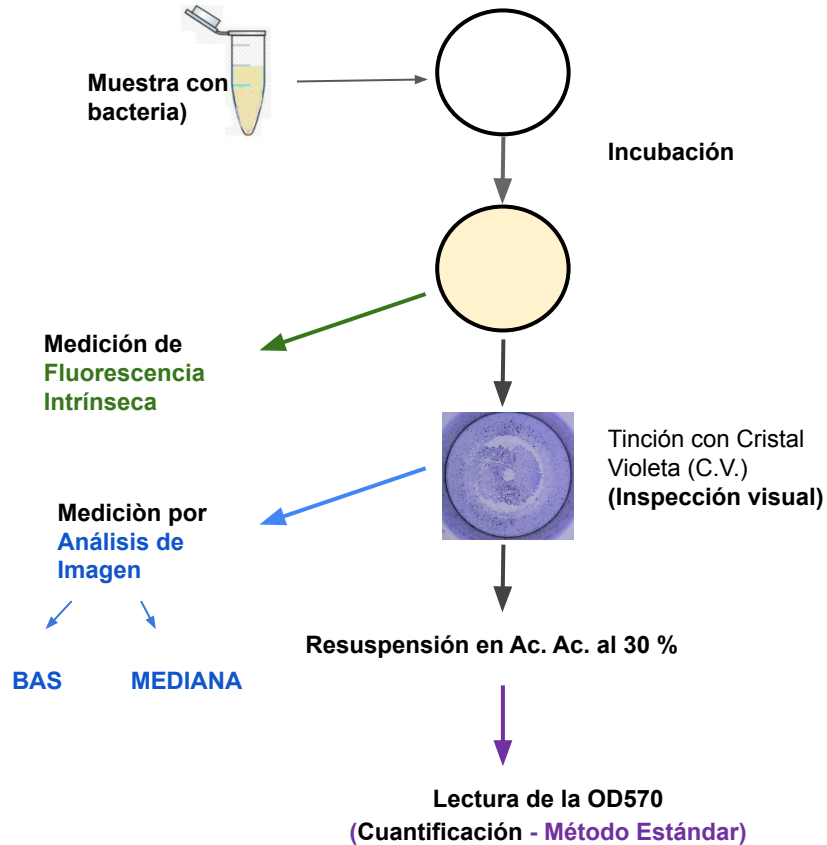
2021

Biofilms: 'Agregado de microorganismos que viven en una matriz autoproducida en sustancias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polimeric substances, EPS*)' (Vert et al., 2012)



Nature Reviews | Microbiology

Método estándar de Cuantificación de crecimiento de Biofilms: Cuantificación de Resuspensión de biofilm en Ácido acético al 30 %



Desventaja:

- Es susceptible a “contaminación” por partículas del cristal violeta, que inducen a lecturas erróneas de OD.
- Alta variabilidad.

Nuevas posibles estrategias de cuantificación:

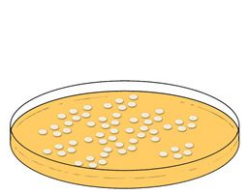
- 1) Medir la **fluorescencia intrínseca** de las bacterias formadoras de biofilm.
- 2) Medir el biofilm mediante **Análisis post-tinción de imagen** del pocillo con biofilm.

OBJETIVOS

- Medir la cantidad de **fluorescencia intrínseca** de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y comparar con el biofilm cuantificado por **método estándar**/ evaluado por **inspección visual**
- Medir el biofilm formado por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mediante **análisis de imágenes asistida de software**, y comparar con el biofilm cuantificado por **método estándar** / evaluado por **inspección visual**
-

Procedimiento

Nota: Todos los procedimientos fueron realizados a T° de laboratorio



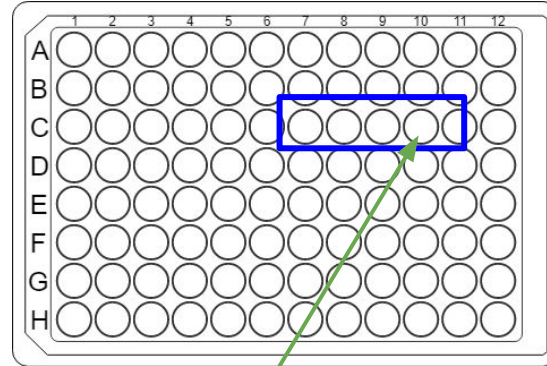
Placa con Pseudomonas



Sembrado de una colonia en 25 mL de LB
Incubado por 22 h a 37 °C



OD570 : 0.082
M9 1X
Glucosa 1 %



Sembrado de 100 uL
Condiciones: 37 °C
Tiempo de Crec: 24 horas



1) Medición de Fluorescencia intrínseca
Excitación: 410 nm
Emisión: 475 nm



2) Retiro del medio de cultivo del pocillo y tinción

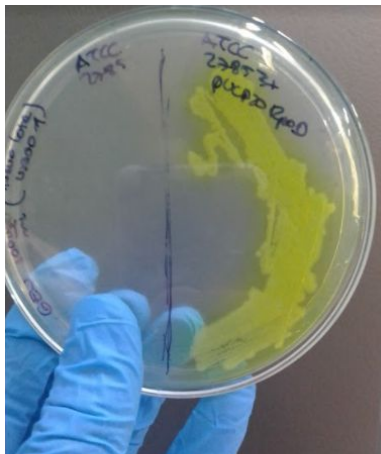


2) Toma de Imágenes y Análisis



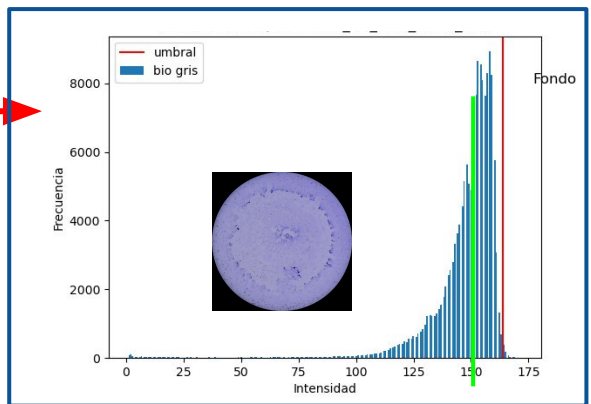
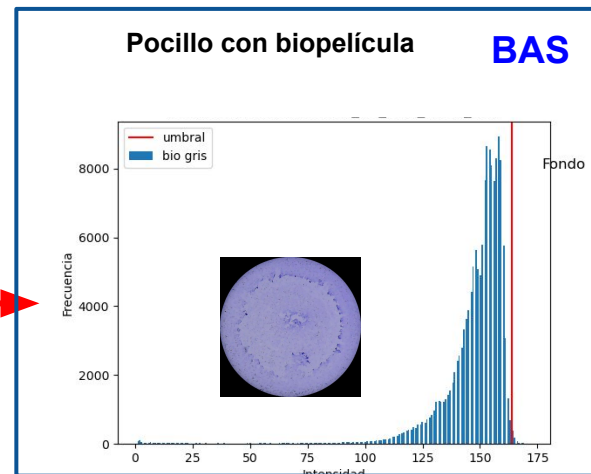
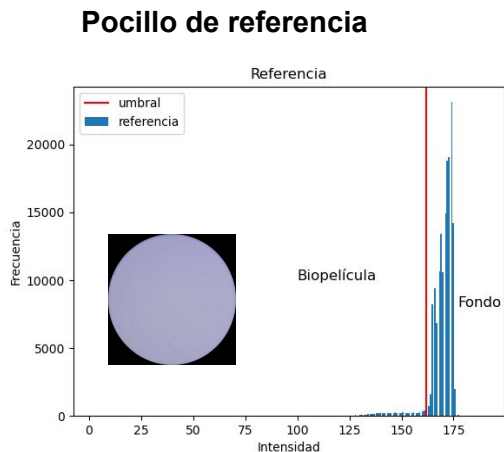
3) Resuspensión con Ácido acético al 30% y Cuantificación usando método estándar.

Medición de Fluorescencia intrínseca



- Se ha observado producción de compuestos fluorescentes en *Pseudomonas*.
- Excitación: 410 nm
- Emisión: 475 nm

Análisis de imágenes



CRITERIO DE MEDIANA

RESULTADOS: CUANTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE IMÁGENES

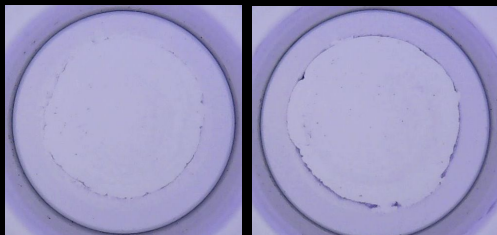
Tratamiento con Adenosin monofosfato cíclico - cAMP (0, 10 y 20 mM)

Tratamiento con cAMP

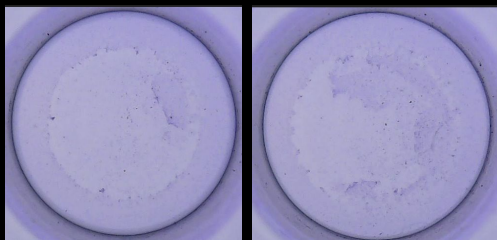
Col: 9

Col: 10

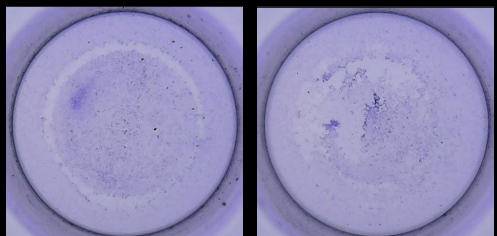
0 mM



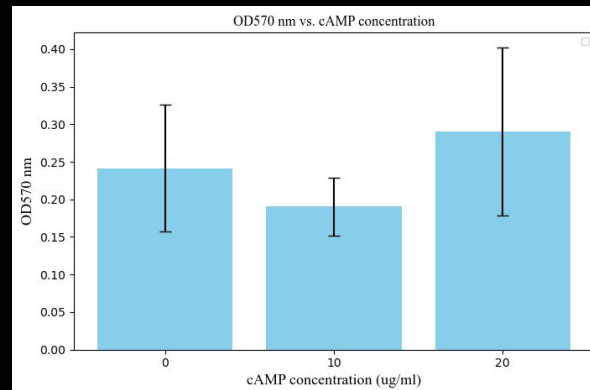
10 mM



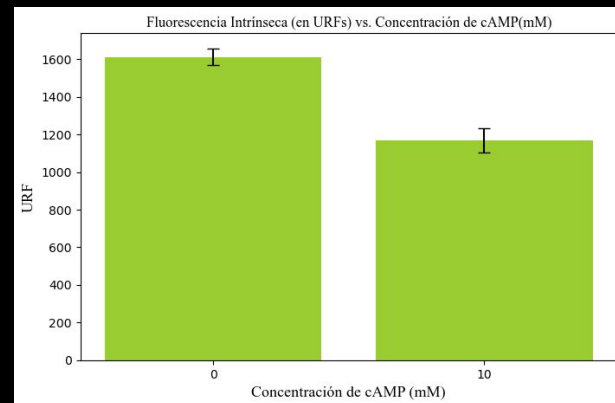
20 mM



Cuantificación por resuspensión con Ácido acético 30% (Estándar)



Medición de fluorescencia intrínseca



RESULTADOS: CUANTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE IMÁGENES

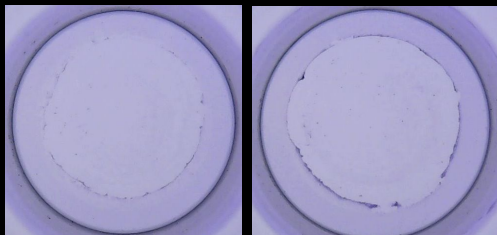
Tratamiento con Adenosin monofosfato cíclico - cAMP (0, 10 y 20 mM)

Tratamiento con cAMP

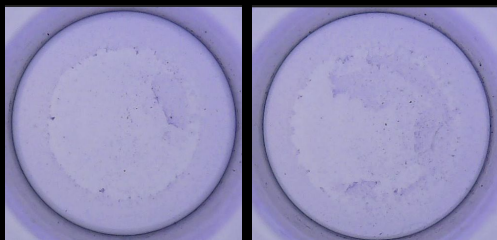
Col: 9

Col: 10

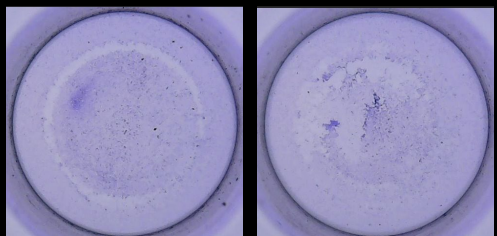
0 mM



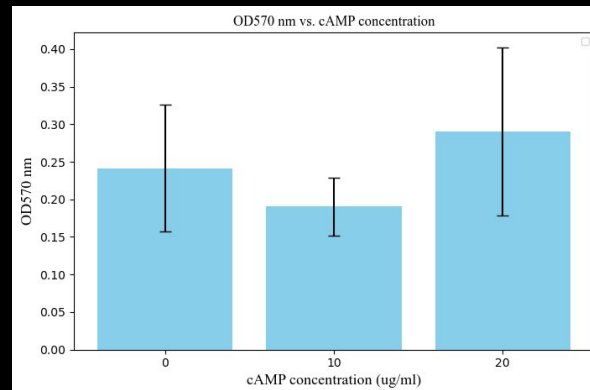
10 mM



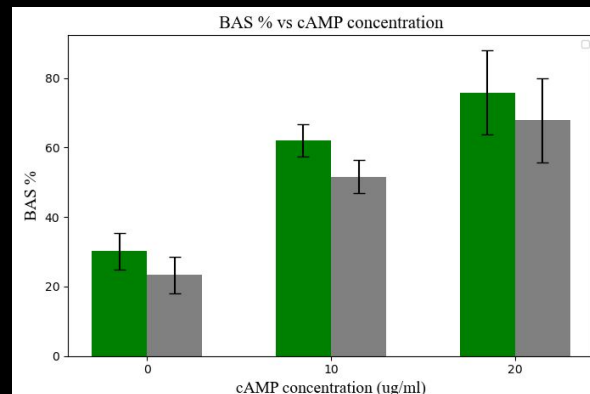
20 mM



Cuantificación por resuspensión con Ácido acético 30% (Estándar)



Cuantificación mediante análisis de imágenes

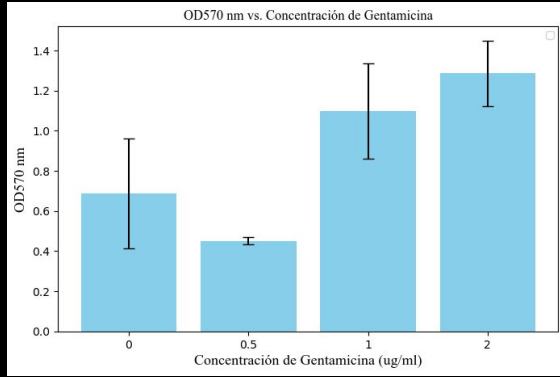


(BAS)

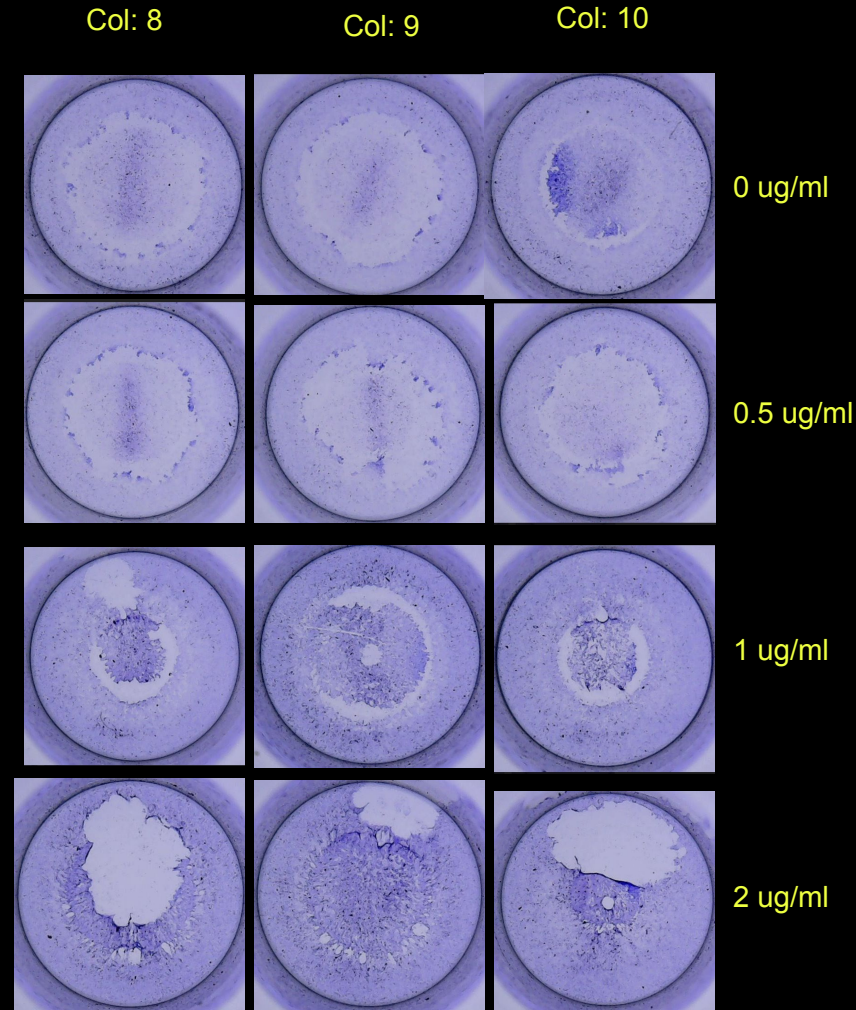
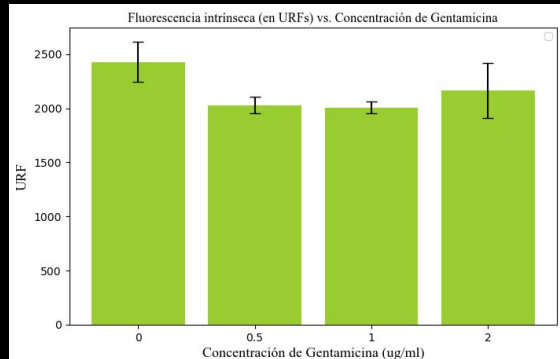
RESULTADOS: MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA

Tratamiento con Gentamicina(0, 0.5, 1 y 2 ug/ml)

Cuantificación con Ácido acético 30%

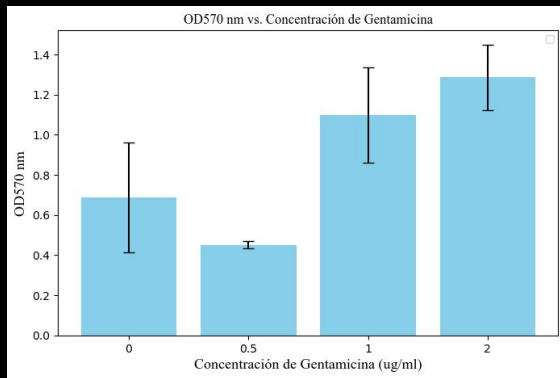


Medición de fluorescencia intrínseca

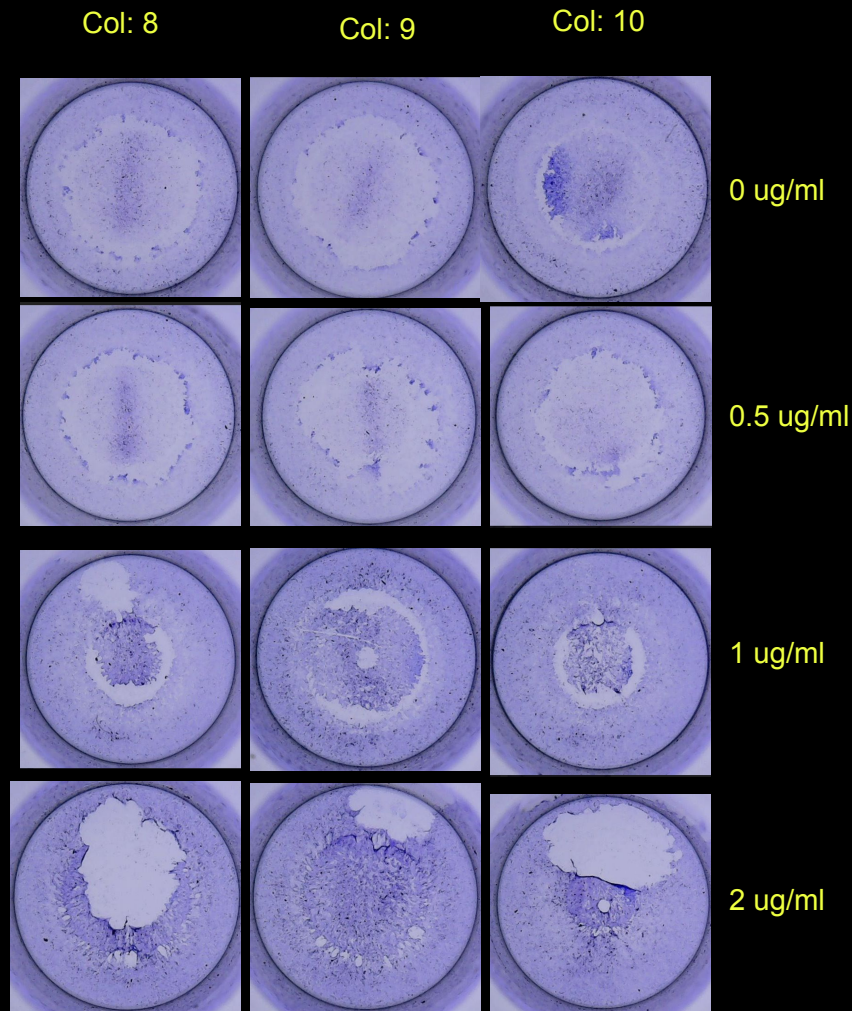
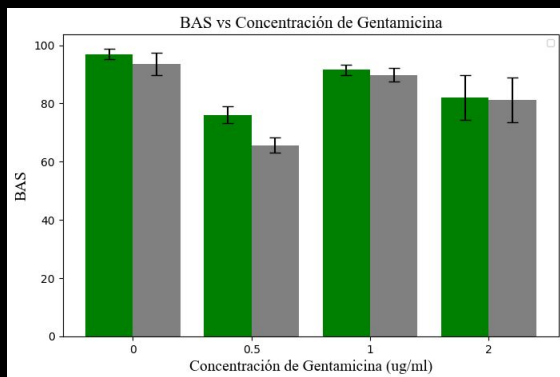


RESULTADOS: CUANTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE IMÁGENES (BAS) Tratamiento con Gentamicina (0, 0.5, 1 y 2 ug/ml)

Cuantificación con Ácido acético 30%

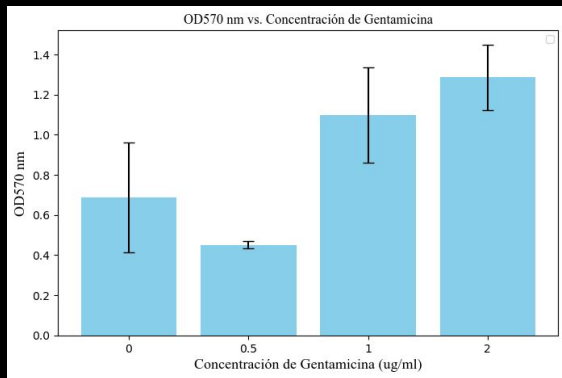


Cuantificación mediante análisis de imágenes (BAS)

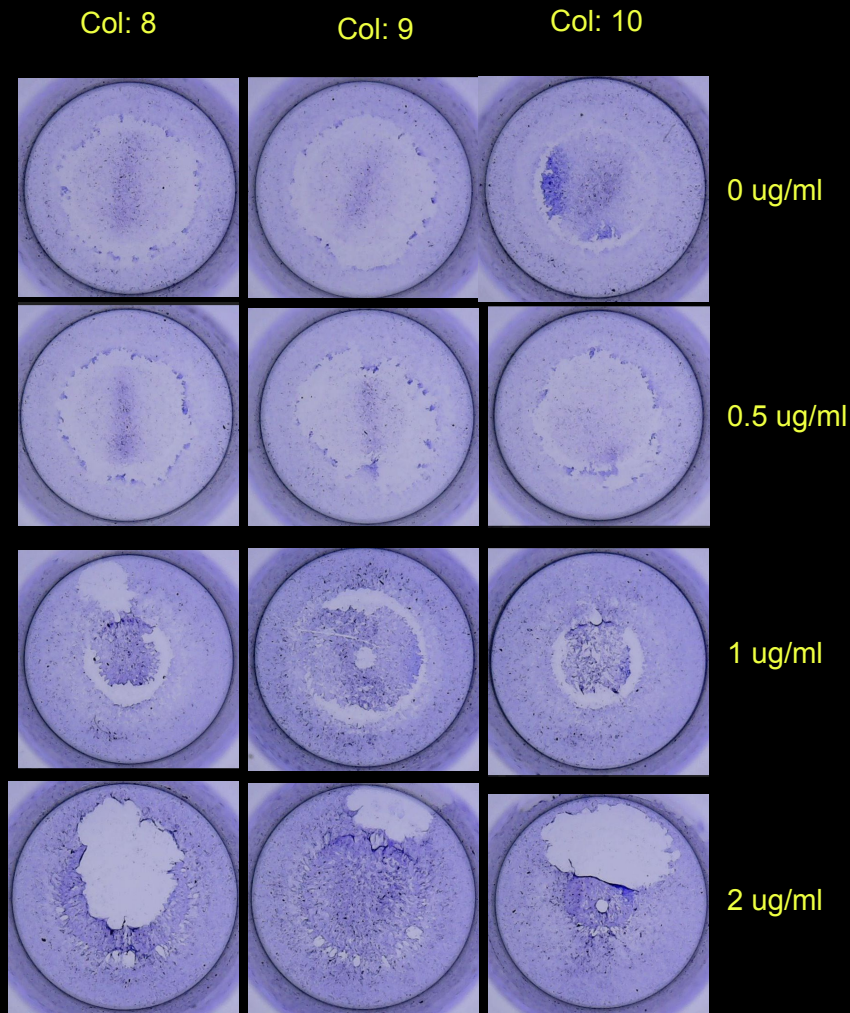
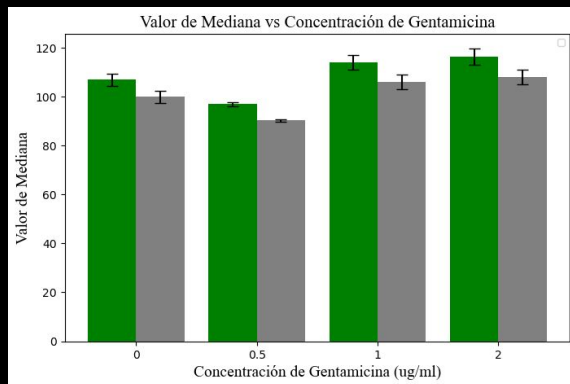


RESULTADOS: CUANTIFICACIÓN POR ANÁLISIS DE IMÁGENES (Mediana) Tratamiento con Gentamicina (0, 0.5, 1 y 2 ug/ml)

Cuantificación con Ácido acético 30%



Cuantificación mediante análisis de imágenes (uso de la Mediana)



Discusión

- Fluorescencia intrínseca:

Se observa que la cantidad de **fluorescencia intrínseca** medida no se correlaciona bien con la cantidad de **biofilm observado (inspección visual)** (caso gentamicina).

- Análisis de imágenes:

Caso ampicilina: La cantidad de biofilm determinada por **BAS** se correlaciona con la tendencia de la cantidad del biofilm según **inspección visual**, pero no con la cuantificación por **método estándar**.

Caso Gentamicina: Se observa desprendimiento de biopelícula a altas concentraciones de gentamicina. La cantidad de biofilm determinada por **BAS** no se correlaciona con la cantidad de biofilm según **inspección visual** ni con la cuantificación por **método estándar**, sin embargo, la **MEDIANA** sí muestra una tendencia que se correlaciona con la cantidad de biofilm según **inspección visual** y con la cuantificación por **método estándar**.

Conclusiones

- La **fluorescencia intrínseca** no es un buen indicador de la cantidad de biofilm observado de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- El **análisis de imágenes asistido por software** permite obtener un valor numérico que se relaciona con la cantidad de biopelícula observada por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, **incluso de mejor manera** que la cuantificación por **método estándar**.
- En el caso de desprendimiento de biofilms del fondo del pocillo, la **MEDIANA** representa una mejor medida de la cantidad de biofilm observada.