



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ACTIVIDAD DE PROMOTORES
INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN
DEL BIOFILM DE *Pseudomonas*
aeruginosa ATCC® 10145™ EN DOS
MODOS DE CRECIMIENTO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ANDERSON JAVIER CASTILLA SEDANO

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

Dr. Daniel Guerra
Giraldez

JURADO EVALUADOR

DR. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN

Presidente

DR. OSCAR ENRIQUE AGUINAGA VARGAS

Vocal

DR. DANIEL CLARK LEZA

Secretario

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia, por su esfuerzo y sacrificio permanente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Daniel Guerra por su asesoría durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Su mentoría, paciencia y experiencia compartidas me permitieron enfocar adecuadamente el proyecto y concluirlo.

A la Mg. Ruth Cristóbal, por habernos proporcionado la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™.

Al Bachiller Gensyn Tello Marin por su apoyo e ideas durante la etapa más importante del desarrollo de esta tesis.

A Samira Vera, por su apoyo emocional, siempre necesario.

A mi familia, por ser mi soporte no solo durante este proyecto, sino a lo largo de mi vida.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONCYTEC-Banco Mundial para el mejoramiento y ampliación del sistema nacional de ciencia, tecnología e innovación 8682-OE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [contrato número 85-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV].

ACTIVIDAD DE PROMOTORES INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145 TM EN DOS MODOS DE CRECIMIENTO

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

13%

PUBLICACIONES

12%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
2	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	1%
3	eprints.gla.ac.uk Fuente de Internet	1%
4	d-nb.info Fuente de Internet	1%
5	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	hal.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to University College London Trabajo del estudiante	<1%
8	Submitted to Central University of Rajasthan Trabajo del estudiante	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCION	1
II.	MARCO TEORICO	3
2.1	CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS BIOFILMS	3
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.3	EVENTOS QUE CONDUCEN A LA FORMACION DE BIOFILMS EN <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
a.	Mecanosensación.....	5
b.	Mecanotransducción	7
c.	Etapas posteriores.	8
2.4	TRATAMIENTOS ANTI-BIOFILM	11
2.5	USO DE SISTEMAS REPORTEROS	13
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	16
V.	OBJETIVOS	18
5.1	OBJETIVO GENERAL	18
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
VI.	MATERIALES USADOS	19
6.1	PLÁSMIDOS Y CEPAS	19
a.	Cepas.....	19
b.	Plásmidos.	19
6.2	REACTIVOS QUÍMICOS.....	21
6.3	MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPOS	21
a.	Material De Laboratorio.....	21
b.	Equipos.	22
VII.	METODOLOGÍA	23
7.1	DISEÑO DEL SISTEMA REPORTERO	23
a.	Promotores	23
b.	Genes Reporteros.....	23
c.	Constructos.....	24

7.2	TRANSFORMACION DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™ CON LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS.	24
a.	Procesamiento De Plásmidos.	24
b.	Preparación De Competentes	24
c.	Transformación.....	25
d.	Identificación De Transformantes	25
7.3	REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE <i>P. aeruginosa</i> TRANSFORMADA Y EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS.....	26
a.	Efecto de los plásmidos sobre el Crecimiento Bacteriano	26
b.	Emisión De Fluorescencia mKate2 Normalizada En Cultivo	27
c.	Emisión De Fluorescencia GFPmut3 Normalizada En Cultivo.....	27
7.4	EL MODELO DE BIOFILM EN PLACA PETRI.....	27
a.	Sembrado del Preinóculo	28
b.	Procesamiento del Preinóculo	28
c.	Preparación del Mix de Siembra y Sembrado.	29
d.	Incubación.....	29
e.	Procesamiento de Cultivos en Placa (Modo de Crecimiento Biofilm)	29
f.	Procesamiento de los Cultivos en Agitación (Modo Planctónico).	30
g.	Medición	30
7.5	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES	32
a.	Estimación de la Contribución Intrínseca a la Emisión a 520nm.	32
b.	Actividad de los Promotores	32
7.6	TRATAMIENTO DE DATOS.....	32
a.	Gráficas	32
b.	Análisis Estadístico.....	33
VIII.	RESULTADOS	34
8.1	DISEÑO DE SISTEMAS REPORTEROS	34
8.2	TRANSFORMACION DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™	34
8.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS DURANTE EL CRECIMIENTO BACTERIANO	37
a.	Efecto de Plásmidos Reporteros en el Crecimiento Bacteriano.....	37
b.	Emisión de la Fluorescencia GFPmut3 Normalizada	41
c.	Emisión de la Fluorescencia mKate2 Normalizada	42
8.4	EL MODELO DE BIOFILM EN MEDIO LB.....	44

a.	Comparación en la Emisión de Fluorescencia a 520 nm Normalizada en Medios LB y M9 1X.....	44
b.	Caracterización de Preinóculos: Actividad del Promotor RpoD y Promotores CdrA, LasR, PaQa, Pel, Flg y Fim.	45
c.	Descripción del Biofilm formado Placas Petri de Poliestireno tras los Tiempos de Incubación de 3, 24 y 48 horas de Incubación.....	48
8.5	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES	49
a.	Determinación de la contribución intrínseca a la fluorescencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145 TM transformada con el plásmido pUCP20.....	49
b.	Actividad de RpoD en modelo de placa en función al tiempo (0, 24 y 48 horas de crecimiento).....	50
c.	Actividad de los promotores en función al tiempo en el modelo de placa de biofilm	51
IX.	DISCUSION	58
9.1	EFEECTO DEL PLASMIDO EN EL CRECIMIENTO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145 TM	58
9.2	DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA DE mKate2	59
9.3	DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA de GFPmut3	59
9.4	EL MODELO DE BIOFILM EN PLACA PETRI	60
a.	Uso del medio LB para ensayos en placa.....	60
b.	Modos de Crecimiento	61
9.5	USO DE RpoD COMO PROMOTOR DE NORMALIZACIÓN Y mkate2 COMO GEN REPORTERO.....	63
9.6	CONTRIBUCIÓN INTRINSECA A LA FLUORESCENCIA.....	67
9.7	ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES.....	68
a.	Promotor CdrA.	68
b.	Promotor LasR.....	69
c.	Promotor Flg.....	70
d.	Promotor Fim.	71
e.	Promotor PaQa.	71
f.	Promotor Pel.....	72
X.	CONCLUSIONES	77
XI.	RECOMENDACIONES.....	78
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
XIII.	ANEXOS	

ABREVIATURAS

ATCC Collection	American Type Culture
CDS	Coding Sequence (Secuencia codificante)
GFP	Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde)
LB	Luria Bertani
OD Óptica)	Optical Density (Densidad
c-di-GMP	Cyclic-Diguanylate (Diguanilato ciclico)
RMP	Revoluciones Por Minuto
TIVP	Type IV Pili (Pili Tipo IV)
TM	Trade Mark

RESUMEN

Los biofilms son comunidades de bacterias fisiológicamente adaptadas a subsistir ante condiciones adversas. Representan un problema pues crecen sobre instrumental médico e infraestructuras, donde causan deterioro y suponen pérdidas económicas. Los modelos experimentales de biofilms permiten caracterizar cambios fenotípicos y expresión/represión de genes durante su desarrollo y son por lo tanto necesarios para evaluar el efecto de potenciales inhibidores. En este estudio, se monitoreó la actividad de seis promotores (del gen *LasR* y de los operones *CdrA*, *Flg*, *Fim*, *Pel* y *PaQa*) en función al tiempo (3, 24 y 48 horas) en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM en dos modos de crecimiento: *modo biofilm* (en un modelo de biofilm, cultivos estáticos en placa Petri de poliestireno) y un *modo planctónico* (en cultivos en agitación), utilizando sistemas reporteros de plásmidos con fusiones promotor-gen reportero fluorescente. Los plásmidos diseñados exhibieron estabilidad, señal fluorescente medible, y no afectaron el crecimiento celular. Dos promotores, *Flg* y *Fim*, evidenciaron actividad marcadamente diferencial entre ambos modos de crecimiento, mientras que *PaQa* y *Pel* muestran ligeras diferencias a las 3 horas. Así, dos de los sistemas reporteros evaluados aparecen como herramientas útiles para el cribado de estímulos potencialmente inhibidores del desarrollo de los biofilms.

PALABRAS CLAVE

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Plásmidos reporteros, GFP, promotor.

ABSTRACT

Biofilms are communities of bacteria that are physiologically adapted to survive under adverse conditions. Biofilms represent a problem because they grow on medical instruments and on infrastructures where they cause deterioration and entail economic losses. Experimental models of biofilms allow us to characterize both phenotypic changes and expression/repression of genes during their development and are, therefore, necessary to evaluate the effect of potential inhibitors. In this study, the activity of six promoters (of the *LasR* gene and the *CdrA*, *Flg*, *Fim*, *Pel*, and *PaQa* operons) was monitored as a function of time (3, 24, and 48 hours) in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ in two growth modes: *biofilm mode* (in a biofilm model, static cultures in a polystyrene Petri dish) and a *planktonic mode* (in shaken cultures), using plasmid reporter systems with promoter-fluorescent reporter gene fusions. The designed plasmids exhibited stability and measurable fluorescent signal and did not affect cell growth. Two promoters, *Flg* and *Fim*, evidenced markedly differential activity between these two modes; meanwhile, *PaQa* and *Pel* show slight differences at 3 hours. Thus, two of the reporter systems evaluated appear as useful tools for the screening of potentially inhibitory stimuli for the development of biofilms.

KEYWORDS

Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Reporter Plasmids, GFP, Promoter.

I. INTRODUCCION

Los biofilms son una forma de vida bacteriana cuya presencia representa un serio problema para las actividades humanas [1]. La corrosión inducida por microorganismos (MIC) es perjudicial para muchas industrias, incluyendo la marina, los sistemas de agua, los ductos de gas y petróleo, ya que se estima que entre el 20 y 30 % de todo deterioro por corrosión es inducido por microorganismos [2], con un costo directo estimado entre 30 y 50 mil millones de dólares por año [3]. Además, se estima que los grandes barcos aumentan en más del 35-50% su consumo de combustible debido a que el biofilm sobre sus corazas aumenta su coeficiente de arrastre con el agua [4]. A las pérdidas directas, se suma el alto costo del tratamiento superficies que se corroen o deben ser tratadas periódicamente para prevenir el crecimiento de biofilm, por ejemplo, con biocidas suponen un riesgo para la salud y el ambiente [5]. En el área de salud, los biofilms son fuente de infecciones al desarrollarse en implantes e instrumentos médicos. Los biofilms agravan los riesgos médicos debido a su alta resistencia a los antibióticos, desinfectantes y capacidad de evitar la vigilancia del sistema inmune [6]. Un ejemplo de esto son los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, responsables de la infección crónica pulmonar en pacientes con fibrosis quística [7].

Mucho de lo que se conoce respecto a la formación, estructura, desarrollo y mecanismos moleculares subyacentes de los biofilms provienen de ensayos en modelos de biofilm, ya sean *in vitro* o *in vivo* [8]. Estos modelos han puesto al descubierto los factores que activan las respuestas que conducen a la formación de biofilm [9], [10], así como las intrincadas y complejas vías de señalización que

involucra su formación (regulación a nivel de proteínas o de expresión de genes) [11]. La gran cantidad de información obtenida ha permitido idear estrategias (ya sea como estímulos químicos o físicos) para evitar o mitigar la formación de los biofilms. Algunas de estas estrategias apuntan a la interrupción de las vías de señalización, como la interrupción de las vías activadas por el *quorum sensing* [12]. La activación/desactivación de dichas vías puede ser monitoreada por diversos métodos, siendo la utilización de genes reporteros una herramienta sencilla y de gran utilidad al ser capaces de dar información de actividad de promotores o expresión de proteínas.

II. MARCO TEORICO

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS BIOFILMS

Los biofilms se definen como una ‘asociación de microorganismos embebidos en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polimeric Substances, EPS*)’ [13]. Constituyen un estilo de vida alternativo al ‘planctónico’ en el cual las células del microorganismo se encuentran nadando en el fluido que los contiene. De hecho, estimaciones recientes sugieren que los biofilms constituyen el estilo de vida predominante de las bacterias y arqueas en el planeta [14]. Los biofilms se forman sobre diferentes sustratos tales como rocas, sedimento, tejido vivo y objetos creados por el hombre [15]. En los entornos naturales, los biofilm participan en los ciclos biogeoquímicos en agua, suelo, sedimentos y subsuperficie [16]. Los biofilms también crecen en superficies mucosas del hombre, donde cumplen un papel importante en la salud [17].

La formación de los biofilms lleva a la aparición de propiedades emergentes, esto es, características de la comunidad bacteriana que no pueden ser predichas a partir de bacterias individuales. Algunas de estas propiedades son: una tasa de intercambio genético alta, gradientes internos que permiten una diversidad de hábitats y mayor tolerancia a los antibióticos [18]. Las sustancias poliméricas estructurales (EPS), están constituidas por polisacáridos, lípidos, proteínas y ADN extracelular (*extracellular DNA, eDNA*), contribuyen a las nuevas propiedades, y mantienen su integridad [18].

Las características y propiedades de los biofilms han sido ampliamente estudiados en *Pseudomonas aeruginosa*. Este ha sido adoptado como modelo gracias a su facilidad de cultivo, versatilidad metabólica y rápidas respuestas ante estímulos [19]. Además, es responsable de infecciones causante de muertes por ser un oportunista en pacientes con sistemas inmunitarios debilitados, así como afectados con fibrosis quística [20].

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gran-negativa con forma de bacilo (*rod-shaped*) que posee motilidad gracias a un único flagelo polar. Es un organismo generalista y de gran versatilidad metabólica pudiendo utilizar una gran variedad de fuentes de carbono, así como desarrollarse en entornos anaeróbicos utilizando como aceptor de electrones nitrato o arginina [21]. En el laboratorio, *P. aeruginosa* es una bacteria que tiene facilidad para adoptar dos formas de vida: una móvil, natatoria, con un flagelo activo y rápida reproducción, llamada forma planctónica, y otra, a modo de biofilm, adherida a una superficie, sin movilidad, segregando polímeros complejos, con una reproducción lenta y muy alta tolerancia a estreses físicos y tóxicos [22].

P. aeruginosa también es un patógeno oportunista que causa morbilidad en personas inmunosuprimidas, internos hospitalarios y personas que sufren de fibrosis quística [23]. Entre los factores de virulencia producidos encontramos apéndices (flagelos y fimbrias especializadas), enzimas (proteasas), moléculas (piocianina), sistemas de secreción, exotoxinas y macromoléculas estructurales lipo y exopolisacáridos [21].

P. aeruginosa, al igual que otras especies del género, también son reductoras de hierro y han sido detectadas como formadoras de biofilm en tuberías de gas, de petróleo [24], en la cubierta de barcos [25] y en hospitales [26]. Los biofilms de *Pseudomonas* sp. pueden asociarse a otros microorganismos y formar biofilms complejos con diversas actividades contaminantes y corrosivas.

Diversas cepas de interés son usadas en modelos de biofilm en laboratorio, siendo la principal PAO1 y PA14 [27]. Otra cepa de interés en el estudio de modelos de biofilms es *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM, comúnmente utilizada para pruebas antibióticas y que ha sido descrita como una moderada a fuerte formadora de biofilm [28], [29].

2.3 EVENTOS QUE CONDUCEN A LA FORMACION DE BIOFILMS EN

Pseudomonas aeruginosa

a. Mecanosensación

En los entornos naturales, los microorganismos están expuestos a distintas fuerzas (estímulos mecánicos) tales como la adhesión (que se generan al contacto de los apéndices con una superficie), fuerzas de los flujos del medio en el cual se encuentran, fuerzas de deformación y fuerzas ocasionadas el contacto con partículas en el medio [30]. Las bacterias son capaces de responder ante estos estímulos mecánicos y cuentan para ello con estructuras de naturaleza principalmente proteica que generan una señal bioquímica tras la percepción de dichos estímulos, actuando estas como sensores de fuerzas, fenómeno conocido como **mecanosensación** (o sensación de superficie) (Figura 1) [31], [32]. Los primeros experimentos sugerían que, de los apéndices bacterianos, el sensor que

detectaba el contacto con superficies era, en primera instancia, el Pili Tipo IV (*Type IV pili-T4P*). El modelo correspondiente sugiere que la retracción-estiramiento del pili modula la interacción de proteínas periplásmicas PilJ y PilA, y estas a su vez modula la interacción de proteínas periplásmicas PilJ y PilA, y estas a su vez modulan la actividad de la proteína ChpA. En última instancia, estas activan a CyaB, una adenilato ciclasa que incrementa las concentraciones del mensajero intracelular cAMP (adenosín monofosfato cíclico) [9].

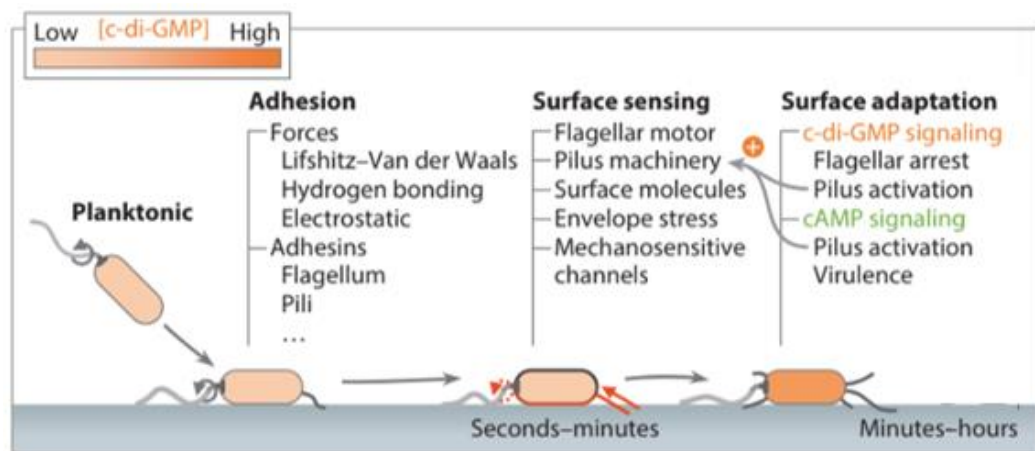


Figura 1. Esquema donde se presentan las principales etapas asociadas al desarrollo de biofilm (adaptado de [32]).

Otros estudios han puesto de manifiesto el papel del flagelo polar como primer sensor [10]. De acuerdo a este modelo, posterior a la sensibilización por el contacto del flagelo y debidos mecanismos aun desconocidos, la actividad de enzimas di-guanilato ciclasas (DGC) como SiaD, GcbA y PA3177 son moduladas y, en consecuencia, ocurre un incremento en las concentraciones de otro mensajero intracelular, el c-di-GMP (diguanilato monofosfato cíclico). La proteína de superficie PilY1 también ha sido propuesta como transductor mecánico [33].

b. Mecanotransducción

Tras la mecanosensación ocurre la **mecanotransducción** (o adaptación a superficie), que son las respuestas de la bacteria ante los estímulos [32]. Esta respuesta puede ser tan simple como una apertura de canales, o complejas vías de señalización que resultan en la expresión de genes. El incremento en la concentración de moléculas mensajeras intracelulares tiene efectos en las etapas posteriores de transmisión de la señal en el que participan diversas proteínas y genes. Siguiendo el segundo modelo planteado en la sección anterior, la mecanosensación debida al flagelo resulta en un incremento en la cantidad de c-di-GMP al interior de *Pseudomonas aeruginosa* y posterior interacción de este con una proteína “efectora”, FimW. Después de la interacción, FimW se distribuye en los polos de la célula. Así, se establece un gradiente de FimW dentro de dicha célula que, tras la división celular, generan dos tipos de células: la célula “madre” (que aun poseen el flagelo) y una célula “hija” (sin flagelo). Estas últimas, al carecer de flagelo, interaccionan de manera más prolongada con la superficie, estimulando la síntesis y ensamblaje del T4P [10].

El contacto con la superficie y la tensión que aparece tras la retracción los T4P formados estimula la actividad de la adenilato ciclasa CyaB, lo que a su vez conlleva a un incremento en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) [9]. Este segundo mensajero se une al factor de transcripción Vfr, modulador de genes de virulencia (Figura 2) [34], [35]. Esto resulta en una “retroalimentación” en expresión del apéndice T4P, que es ensamblado y aumenta en número en esta etapa. El mayor número de T4P estimula la actividad de la diguanilato ciclasa SadC, lo que eleva de manera “tardía” los niveles de c-di-GMP

[36]. Los procesos antes mencionados sugieren que existe una suerte de “memoria”: sucesivas etapas de adherencia mediadas por el Pili Tipo IV estimulan la producción de más cAMP, generando células mejor adaptadas para la unión irreversible [37].

c. Etapas posteriores.

El mensajero intracelular c-AMP mencionado, unido al regulador Vfr, estimulan la actividad de promotores de diversos genes y operones bacterianos, los cuales permiten a *Pseudomonas aeruginosa* adoptar un fenotipo “asociado a biofilm”.

De entre dichos genes/operones destacan los siguientes:

- ***Operón FimU-PilVWXYZWIW2***

El operón *FimU-PilVWXYZWIW2* contiene genes que codifican la síntesis de las pilinas menores, encargadas de iniciar la síntesis del T4P. Aunque se ha demostrado que la actividad del promotor depende de la proteína AlgR, también depende de la presencia de la proteína Vfr [35].

- ***LasR***

La proteína Vfr también regula la actividad del promotor del gen *lasR*, el cual contiene una secuencia de unión a dicha proteína [38]. La actividad de *lasR* regula la actividad de una serie de genes, principalmente genes componentes de sistemas de secreción, proteínas secretadas y exopolisacáridos [39].

- ***Operón PaQa***

El cAMP dirige la expresión de sistemas de secreción II y III, que le permiten a la bacteria la secreción de proteínas con funciones diversas, entre ellas la de

virulencia [35]. El operón *PaQa*, codifica componentes alternativos del sistema de secreción de tipo II, y se ha encontrado que la actividad de dicho promotor se eleva tras el contacto de *Pseudomonas aeruginosa* con superficies [9].

- **Operón *FlgBCDE***

La expresión de los genes del operón *FlgBCDE*, que codifican componentes del cuerpo basal del motor flagelar, están regulados por FleQ, el principal regulador de la biosíntesis flagelar (FleQ además se une a c-di-GMP) [40]. En un contexto de unión a superficie, Vfr (tras la unión con AMPc) reprime la expresión de FleQ evitando la síntesis de dicho aparato flagelar [41].

El c-di-GMP sintetizado de manera “tardía” también regula la actividad de una serie de promotores asociados a genes que participan en el cambio de fenotipo de *Pseudomonas aeruginosa* a biofilm. Para esto, interacciona con una serie de “efectores” (tales como FimW) y, gracias a un mecanismo de tipo alostérico, puede modificar la estructura y la función de estos [42]. Por este otro mecanismo destaca la regulación de:

- **Operón *PelABCDEFGF***

El polisacárido Pel es componente de la matriz extracelular [43]. Es sintetizado por los genes del operón *pel*. El factor transcripcional FleQ, uno de los efectores del c-di-GMP, actúa como represor de la expresión del operón *pel*. Tras la unión de FleQ con c-di-GMP, el represor se disocia del promotor permitiendo la expresión de dicho operón [44].

- **Operón *CdrAB***

Los componentes de este operón se encargan de codificar una adhesina extracelular (*CdrA*) que contribuye a la formación de la matriz extracelular del biofilm, y un transportador de membrana externa (*CdrB*). La expresión este operón es regulada por los niveles de c-di-GMP [45].

En adelante, se referirá a los operones *CdrAB*, *FlgBCDE*, *FimU-PilVXYZWIW2*, *PelABCDEFG* como *Cdr*, *Flg*, *Fim* y *Pel*, respectivamente.

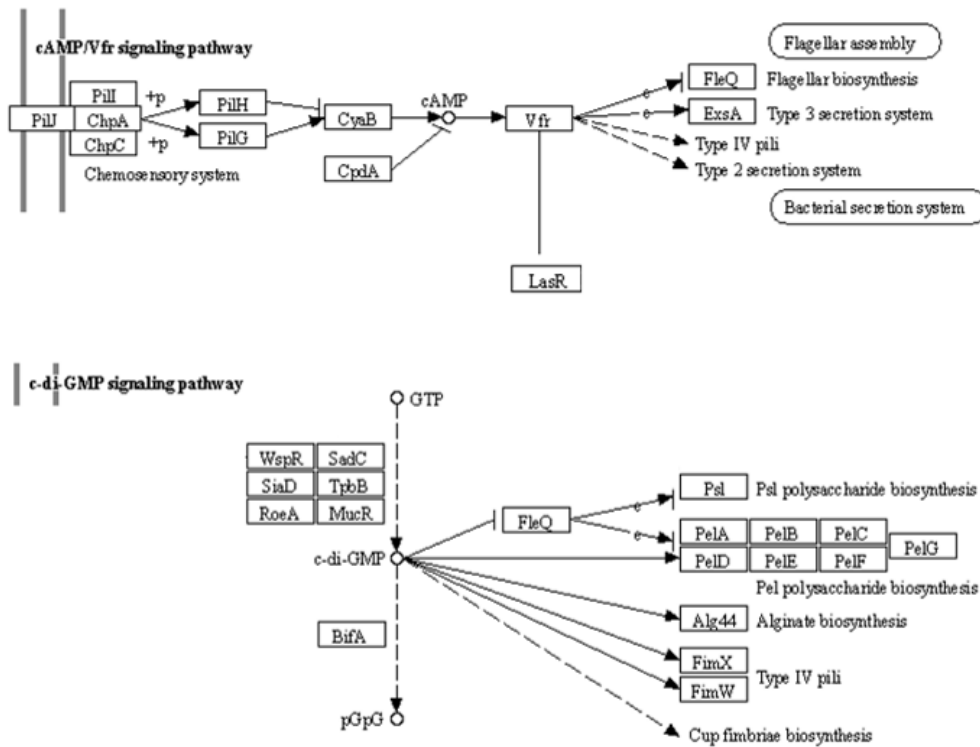


Figura 2. Vías de señalización mediadas por el mensajero intracelular cAMP (arriba) y c-di-GMP (abajo) (adaptado de [46]).

2.4 TRATAMIENTOS ANTI-BIOFILM

La gran información que se tiene de la biología, el desarrollo, los mecanismos moleculares subyacentes y métodos de prevención/erradicación de los biofilms ha sido obtenida a partir de modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los modelos *in vitro* se suelen realizar sobre superficies de poliestireno de placas multipozo, o placas Petri o de vidrio, donde se hace crecer la suspensión bacteriana [8], aunque también pueden ser realizados sobre superficies experimentales con propiedades antiadherentes [47]. Para promover el crecimiento del biofilm, se usa tanto medios mínimos (M9 o M63) como medios “ricos” (LB o TSB) [48]. Al respecto, se ha caracterizado el biofilm formado por suspensiones de *Pseudomonas fluorescens* en medio TSB sobre superficies de poliestireno [49].

Los métodos/tratamientos dedicados a prevenir su crecimiento se pueden categorizar en físicos y químicos. Respecto al primer grupo tenemos a los limpiadores (*pigs*). Estos se aplican en ductos de gas, petróleo o agua, y la limpieza se efectúa mediante el ‘pigging’ que consiste en introducir en la tubería un dispositivo (Pipeline Inspection Gauge, ‘PIG’) que raspa las paredes internas mientras es impulsado por el flujo en una operación de limpieza [50]. Tratamientos físicos alternativos involucran el uso de ultrasonido de alta potencia, que produce cavitaciones, o pequeñas burbujas que colapsan ejerciendo cientos de atmósferas de presión [51]. Por otro lado, se ha demostrado que la luz ultravioleta con longitudes de onda de alrededor de 296 nm es capaz de erradicar el biofilm con mayor eficiencia que el tratamiento con antibióticos [52]. Respecto a los métodos químicos, podemos mencionar al método electroquímico de la protección catódica, que puede mitigar el crecimiento de una sucesión ecológica basada en el

intercambio rédox de la respiración bacteriana con el metal [53]. Algunos revestimientos costosos (brea, aluminio, zinc particulado, plomo, algunos plásticos especiales, resina epóxida) también pueden dificultar la adherencia de bacterias y con ello retrasar el crecimiento de biofilms [54]. Otro tipo de tratamiento es el uso de biocidas, tales como compuestos sulfurados, halógenos, ozono, peróxidos, etc. Además de sus variados costos, cada uno de ellos tiene un rango de acción limitado, lo que obliga a conocer el componente biológico que se ataca, y también riesgos asociados para los operarios y para el material tratado [50].

Una línea de desarrollo que emerge actualmente es la interferencia en la señalización inter e intracelular [55]. A diferencia de tratamientos biocidas (que matan a las bacterias del biofilm), esta interferencia podría utilizar compuestos que, por ser más específicos, resulten en una menor toxicidad para otros organismos. Además, los tratamientos no biocidas no someten a las bacterias a una presión de selección que las lleve a elevados niveles de tolerancia o resistencia, como sí ocurre con los tratamientos antibióticos [12]. Se ha demostrado que el ultrasonido de baja energía puede interferir con el crecimiento de *P. aeruginosa* en biofilm y con su susceptibilidad a antibióticos [56]. Aunque aún no se conoce el mecanismo por el cual el ultrasonido interfiere con la señalización intracelular, hay pruebas de que la expresión de los genes se ve alterada [57]. Recientemente, se ha verificado la influencia de la estimulación acústica no solo a nivel de la perturbación de la estructura del biofilm, sino de la producción de mensajeros intracelulares [58], implicando esto una posible regulación de actividad de enzimas o expresión de genes.

2.5 USO DE SISTEMAS REPORTEROS

Una estrategia para determinar la actividad de secuencias reguladoras de genes es el uso de sistemas reporteros. Un sistema reportero consiste en dos componentes: la secuencia reguladora (que puede ser un promotor o ‘enhancer’) y un gen “reportero”, cuyo producto (una proteína) puede ser detectado e incluso cuantificado, ya sea como actividad enzimática o propiedad óptica (fluorescencia, emisión de luz visible) (Figura 3) [59]. El promotor puede ser inducible o ser dependiente de factores endógenos de la célula en la que es introducido. Un sistema reportero con este tipo de promotores los hace útiles para estudiar la actividad de dicho promotor ante diferentes condiciones de crecimiento y contextos. Los sistemas reporteros han sido utilizados para la visualización de la estructura de los biofilms [60], así como la actividad de promotores de interés en diferentes etapas del crecimiento bacteriano [61]–[63]. Los sistemas reporteros también han permitido la detección de compuestos inhibidores del *Quorum sensing* (usando a *Escherichia coli* como cepa que contiene al reportero) [64]. Así, los sistemas reporteros aparecen como una alternativa interesante para el monitoreo de la actividad de los promotores que participan en las vías de señalización de biofilm, tanto en condiciones normales de crecimiento como expuestos a diferentes tipos de estímulo.

Los genes reporteros que codifican proteínas fluorescentes (proteínas fluorescentes) se caracteriza por su facilidad para ser cuantificados. Uno de los genes reporteros más utilizados es la Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein, GFP), de la cual se han generado variantes con fluorescencia mejorada y otros atributos [65]. Otra proteína fluorescente utilizada es *mkate2*,

que cuenta con una emisión cuyo pico se ubica en el rojo lejano [66]. La proteína mkate2 ya ha sido utilizado como proteína reportera en ensayos de actividad de promotores en *P. aeruginosa* [9].

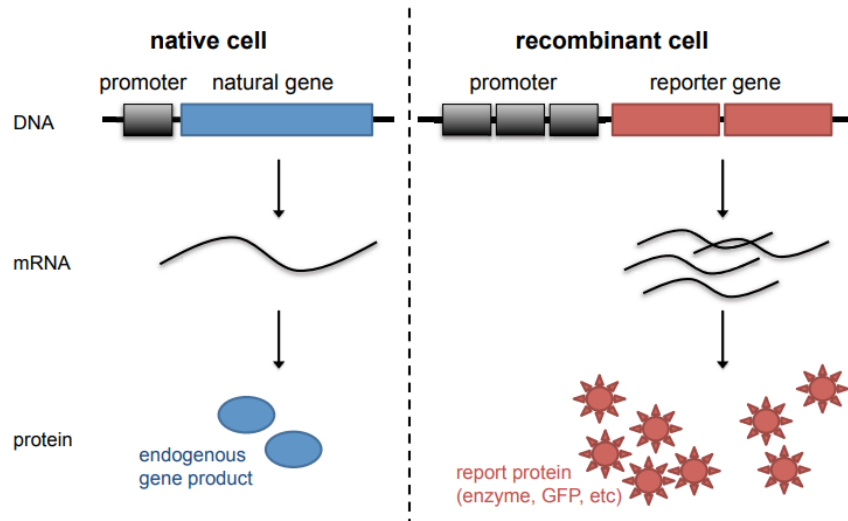


Figura 3. Esquema de organización de un sistema reportero. Izquierda: contexto natural de un promotor. Derecha: Fusión de dicha secuencia reguladora con un gen reportero cuyas capacidades pueden ser cuantificadas, como el GFP (Tomado de [67]).

En experimentos dedicados a evaluar la actividad de un promotor, es frecuente la inclusión de un segundo reportero fusionado con un promotor cuya actividad no varíe en las condiciones experimentales, de manera que es utilizado de promotor control [9]. Estos promotores permiten la normalización adecuada del promotor “problema”. El promotor del gen *rpoD*, gen que codifica la subunidad sigma 70 de la ARN polimerasa de *P. aeruginosa* [68]–[70], ha sido utilizado como promotor de normalización dado su carácter constitutivo en experimentos de expresión de genes de bacterias adheridas a superficie [9].

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los biofilms son difíciles de erradicar debido a que su matriz les provee una barrera física, y están fisiológicamente adaptados a subsistir ante condiciones extremas de inanición y toxicidad [18]. Su crecimiento sobre superficies artificiales con una función en las actividades humanas y su erradicación representan un problema tanto técnico como económico [4], [5], [71]. Se ha mencionado algunos de los enfoques más importantes en la remoción de biofilms, así como las limitaciones de estos [50]. Por ello, se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias destinadas a combatir el crecimiento de estas comunidades.

Respecto a los nuevos enfoques para la remoción de biofilms, se ha mencionado a la interferencia de las vías de señalización [12]. La interferencia puede lograrse mediante estímulos principalmente químicos. Sin embargo, hay evidencias de señales intracelulares originadas por estímulos mecánicos en la pared celular, que podrían influenciar el compromiso de la célula al cambio de forma planctónica a biofilm. Existen publicaciones que apoyan esta hipótesis [56], [57], con un modelo de catéter, o sobre placas de cultivo y que demuestran un cambio transcriptómico. Para evaluar el efecto que puedan tener los métodos señalados, se hacen necesarias herramientas sencillas que permitan realizar el monitoreo adecuado de dichas vías (constituidas por secuencias regulatorias como los promotores y proteínas-factores de transcripción o efectores). Ante ello, el diseño de sistemas reporteros que incluyan promotores que participen en estas vías de señalización y genes reporteros asociados aparece como una alternativa razonable que podría ser sencilla de monitorear.

El presente proyecto tiene por objetivo determinar la actividad de 6 promotores (del gen *LasR* y de los operones *CdrAB*, *FlgBCDE*, *FimU-PilWXYZW1W2*, *PelABCDEFG* y *PaQa*, todos involucrados en la formación del biofilm) de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM en un modelo de biofilm de placa Petri de poliestireno, utilizando un sistema reportero con proteínas fluorescentes, e identificar aquellos promotores que muestran patrones de actividad diferencial respecto de un modelo de crecimiento planctónico (ausencia de formación de biofilm).

IV. JUSTIFICACIÓN

Una vez identificados los promotores que muestren actividad diferencial en el desarrollo de biofilms en el modelo aquí presentado, podremos usar este "sistema" (modelo en placa-plasmidos reporteros) como herramienta de cribado, pues permitirá evaluar de manera sencilla el efecto de estímulos químicos (aditivos y/o antibióticos) en el desarrollo de biofilms en *Pseudomonas aeruginosa*. Las ventajas del uso de este sistema son su bajo costo y sencillez con la que se obtendrían los resultados (medición de fluorescencia). El sistema también podrá ser ubicado en distintos entornos (incubadoras, cabinas o exteriores) y montado en equipos capaces de generar estímulos físicos (ondas mecánicas). En este sentido, resaltamos el carácter aplicado del sistema desarrollado aquí. Esto contribuirá a idear nuevas estrategias para lidiar con la formación de los biofilms.

La ejecución de esta propuesta establecerá en nuestro laboratorio un modelo para el estudio de biofilms con capacidad de entregar información sobre su expresión genética, y con ello el afianzamiento de una línea de investigación iniciada el 2019. Así, esta temática podrá ser estudiada a mayor profundidad gracias al uso

de técnicas sistémicas como la transcriptómica o el uso de microscopía de fluorescencia.

Los biofilms representan un problema para la industria mundial en general y el Perú no está exento de ello. Nuestro país se beneficiará con el desarrollo de este tipo de tecnologías, pues abre un abanico de potenciales aplicaciones futuras.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer patrones de expresión de la actividad de seis promotores (del gen *LasR* y de los operones *Cdr*, *Flg*, *Fim*, *Pel* y *PaQa*) involucrados en la formación de biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* en dos modos de crecimiento (biofilm y planctónico), e identificar aquellos promotores que muestran patrones de actividad diferencial entre estos modos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar 6 genes involucrados en la formación de biofilms en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM y los promotores asociados a estos.
- Diseñar sistemas reporteros: plásmidos reporteros con unidades transcripcionales constituidas por los promotores seleccionados y proteínas fluorescentes reporteras.
- Evaluar la estabilidad, la emisión de señal y el efecto en el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM de los sistemas reporteros diseñados.
- Medir la actividad de los promotores en función al tiempo, en modo de crecimiento biofilm) y planctónico.
- Identificar aquellos promotores con patrones de expresión diferencial entre estos dos modos de crecimiento.

VI. MATERIALES USADOS

6.1 PLÁSMIDOS Y CEPAS

a. Cepas.

Las siguientes cepas fueron utilizadas:

- *Escherichia coli* NEB Stable® (adquirida de New England Biolabs) fue utilizada para propósitos de clonación de plásmidos reporteros.
- La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ fue donada amablemente por la Mg. Ruth Cristóbal y fue utilizada para los ensayos de actividad de los promotores.

b. Plásmidos.

- El plásmido pCdrA_GFPc fue adquirido de Addgene (MA, USA), y sirvió de base para la construcción del resto de plásmidos.
- El plásmido pUCP20 fue obtenido tras la digestión de pCdrA_GFPc con el enzima de restricción *NotI* y su posterior auto-ligación. Este fue utilizado como control (Figura 4).
- Los plásmidos “reporteros” fueron sintetizados por Genscript® (NJ, USA) tomando como base el pCdrA_GFPc en dos pasos (Figura 4):
 - inserción del fragmento *SapI* -*RpoD*-*mkate2*-*Terminador* – *HindIII* (1748 bp) entre los sitios *SapI* y *HindIII* de pCdrA_GFPc (dando como origen al primer plásmido reportero **pUCP20-pCdrA_GFPc-RpoD_mKate2**).

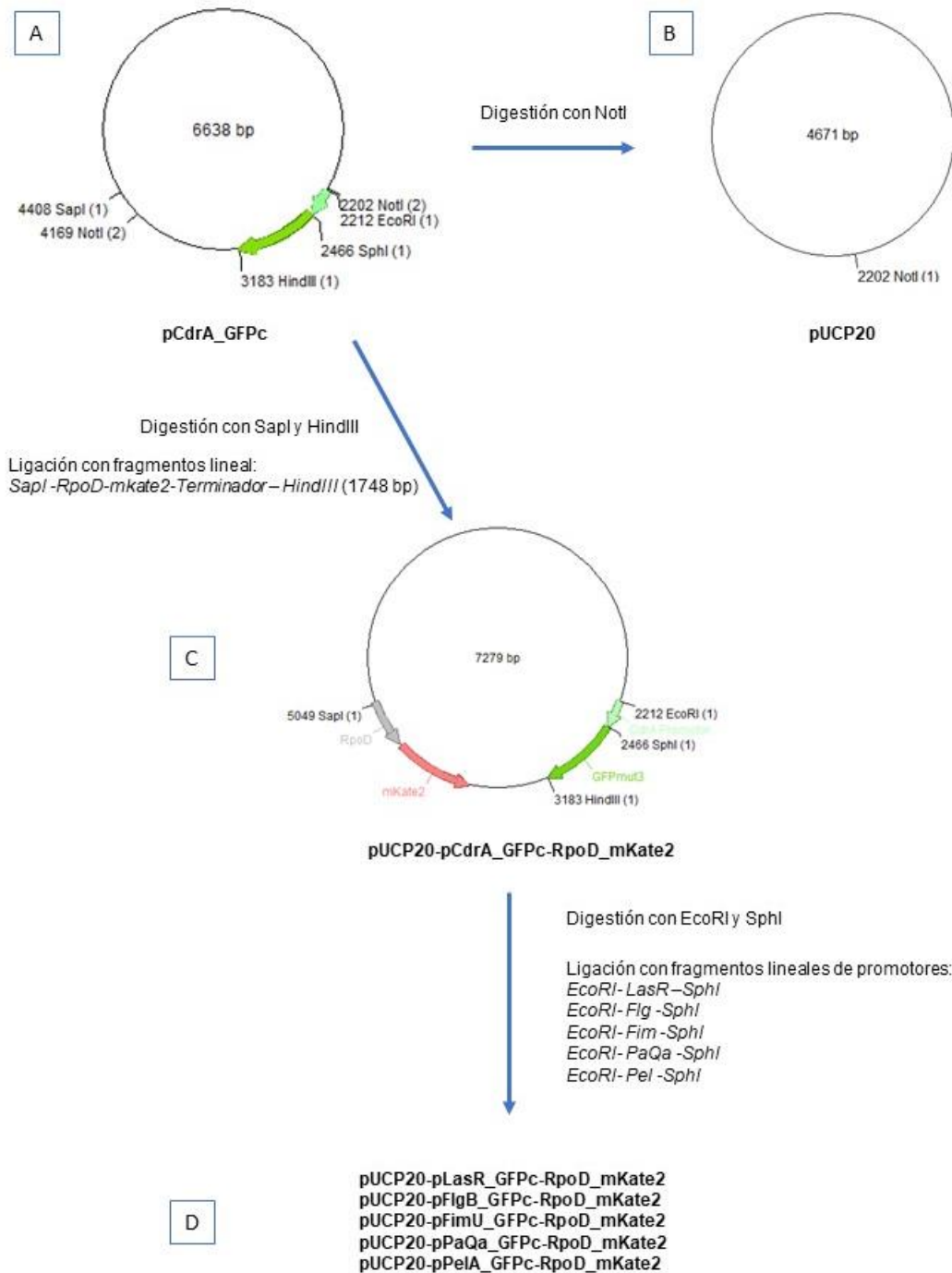


Figura 4. Obtención de plásmidos utilizados en este trabajo. A) pCdrA_GFPc, B) pUCP20, C) pUCP20-pCdrA_GFPc-RpoD_mKate2 y D) Resto de plásmidos reporteros.

- remplazo del fragmento correspondiente al promotor CdrA (flanqueado por los sitios de restricción *EcoRI* y *SphI*) por los fragmentos correspondientes a los promotores *Fim* (196 bp), *Flg* (250 bp), *Las* (322 bp), *PaQa* (498 bp) y *Pel* (479 bp). Esto dio origen a los otros 5 reporteros (Figura 4):
 - **pUCP20-pFimU_GFPc-RpoD_mKate2** (promotor del operón Fim),
 - **pUCP20-pFlgB_GFPc-RpoD_mKate2** (promotor del operón Flg),
 - **pUCP20-pLasR_GFPc-RpoD_mKate2** (promotor del gen LasR),
 - **pUCP20-pPaQa_GFPc-RpoD_mKate2** (promotor del operón PaQa),
 - **pUCP20-pPelA_GFPc-RpoD_mKate2** (promotor del operón Pel).

6.2 REACTIVOS QUÍMICOS

Se utilizó Loading Dye 6X (ThermoFisher), Marcador de Peso Molecular (Gene Ruler 1Kb DNA Ladder Plus), Agarosa (Cleaver Scientific Ltd), Bromuro de Etidio (ThermoFisher), Agua ultrapura, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher), Enzima de Restricción NotI (New England Biolabs). Medio LB, Miller (Luria-Bertani) (Difco), Medio M9 5X (Sigma), Glucosa (Merck), Cas-aminoácidos (Difco).

6.3 MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPOS

a. Material De Laboratorio.

Tubos de centrifuga de polipropileno de 15 y 50 mL, Placas Petri de poliestireno de 60 mm de diámetro, Placas Multipozo de poliestireno con base plana (SPL Lifesciences), Tubos de vidrio de 16x100 mL.

b. Equipos.

Incubadora MRC, Electroporador BTX ECM 399, Centrifuga Sorvall, Cabina de Flujo de Bioseguridad Baker, Lector de Placas Infinite® 200PRO (TECAN).

VII. METODOLOGÍA

7.1 DISEÑO DEL SISTEMA REPORTERO

a. Promotores

Se realizó una búsqueda de la literatura para identificar los promotores de genes u operones que controlen la generación de productos involucrados en ciertas etapas de biofilm. Se identificó un total de 5 promotores en *P. aeruginosa*: del gen *LasR* (regulador del quorum sensing) [38] y de los operones *PaQa* (operón de la secreción de tipo III) [9], *Pel* (operón del polisacárido Pel, constituyente de la matriz) [72], *Flg* (operón que expresa proteínas estructurales flagelares) y *Fim* (proteína estructural constituyente de las fimbrias). El promotor del gen *RpoD*, cuya actividad ha sido reportada como constitutiva, fue elegido para la normalización de la actividad de los otros promotores [9]. Finalmente, se realizó la búsqueda de las secuencias de los promotores identificados y seleccionados en la base de datos de genomas de *Pseudomonas* (Pseudomonas Genome Database) [73].

b. Genes Reporteros

GFPmut3 (también conocida como GFPc, Proteína Fluorescente Verde – variante mut3) y mKate2 (Proteína Fluorescente Roja) son proteínas fluorescentes con espectros de absorción y emisión conocidos. Para su elección, se tomó en cuenta la diferencia de espectros de emisión, así como su tiempo de maduración similar. Estos criterios permiten obtener estimaciones adecuadas de la determinación de la actividad de los promotores [74].

c. Constructos

Los mapas de los sistemas reporteros (plásmidos incluyendo los constructos promotor-gen reportero) fueron diseñados en SnapGene Viewer uniendo las secuencias de los promotores con la secuencia codificante (CDS) de la proteína GFPmut3. Estos mapas fueron enviados digitalmente a la empresa Genscript®. El plásmido pCdrAGFPc fue enviado en Genscript® dispensado en papel filtro Whatman® y recubierto con papel aluminio.

7.2 TRANSFORMACION DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ CON LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS.

a. Procesamiento De Plásmidos.

Los plásmidos sintetizados por Genscript® fueron enviados a nuestro laboratorio en estado liofilizado. Estos liofilizados fueron suspendidos en agua ultrapura y su concentración fue llevada a 10 µM. A partir de esta suspensión se preparó una nueva dilución en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Estas suspensiones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Luego, estos plásmidos fueron transformados en la cepa *E. coli* NEB Stable® a partir de la cual se prepararon los stocks en glicerol. Estos fueron almacenados a -80 °C.

b. Preparación De Competentes

La preparación de células competentes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ se realizó por el método rápido que involucra sucrosa y que ha demostrado alta eficiencia en *Pseudomonas aeruginosa* [75]. En breve, se picó una colonia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ a partir de una placa

con agar-LB y se sembró en 10 mL de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación constante de 200 RPM durante 16-18 horas. Posteriormente, se realizaron dos lavados con Sucrosa 300 mM. Finalmente, se resuspendió en 100 µL de la misma solución. En este estado, las células están listas para ser transformadas (estado de competencia). Todos los procedimientos fueron realizados en frío manteniendo los tubos en hielo.

c. Transformación

La transformación de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Choi [75]. En breve, se inició mezclando 50-100 ng de ADN plasmídico con 80 µL de células competentes. Se vertió esta mezcla a una cubeta de electroporación y se aplicó 1800 kV de pulso. Posteriormente, las células se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubó en agitación a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, 200 µL de esta suspensión se esparcieron en placas con medio sólido agar LB + Gentamicina 40 µg/mL y se incubó a 37 °C durante 16 horas.

d. Identificación De Transformantes

Una o más colonias de las placas transformantes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM se seleccionaron al azar y fueron cultivadas en medio LB a 37 °C durante 18-20 horas a 220 RPM de agitación. Tras esto, se tomaron alícuotas de 1 mL y se lavaron dos veces con medio M9 1X. Los *pellets* resultantes fueron fotografiados bajo luz azul (450-495 nm de longitud de onda aproximada) para tener un registro visual de la actividad de promotores en los reporteros. Tras la

documentación fotográfica, se realizó una suspensión final en medio M9 1X para cada cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros. Estas suspensiones fueron sometidas a un barrido de emisión luego de ser expuestas a luz de las siguientes longitudes de onda: 475 nm para GFPmut3 y 575nm para mKate2. Se incluyó un control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM sin transformar y otra transformada con el plásmido “control” pUCP20.

7.3 REGISTRO DEL CRECIMIENTO DE *P. aeruginosa* TRANSFORMADA Y EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS

Las siguientes características fueron determinadas a partir de datos de cultivos en medio mínimo M9 1X suplementado con glucosa al 1% en placa multipozo durante 24 horas a 37 °C, sin agitación (reposo). Fueron monitoreados tanto la absorbancia a OD 570 nm, emisión de la fluorescencia de GFPmut3 (Ex: 475 nm; Em: 520 nm) y emisión de la fluorescencia de mKate2 (Ex: 575 nm; Em: 635 nm) con ayuda del lector de microplacas Infinite® 200PRO (TECAN). Los datos fueron recolectados utilizando el software Magellan® (mediciones realizadas cada hora). Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

a. Efecto de los plásmidos sobre el Crecimiento Bacteriano

El efecto de los plásmidos reporteros en el crecimiento bacteriano fue determinado midiendo la absorbancia a 570 nm de cultivos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformados con los plásmidos

reporteros, plásmidos vacíos y sin transformar en función al tiempo (mediciones cada hora).

b. Emisión De Fluorescencia mKate2 Normalizada En Cultivo

La emisión de fluorescencia mKate2 normalizada fue determinada calculando la proporción entre la fluorescencia de mKate2 (actividad del promotor *RpoD*) y la absorbancia a 570 nm tanto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros, plásmidos vacíos y sin transformar en función al tiempo (mediciones cada hora). A los datos de fluorescencia mKate2 y absorbancia a 570 nm se les restó el de los controles (medio sin bacteria).

c. Emisión De Fluorescencia GFPmut3 Normalizada En Cultivo

La emisión de fluorescencia GFPmut3 normalizada fue determinada calculando la proporción entre la fluorescencia de GFPmut3 y la absorbancia a 570 nm, tanto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros, plásmidos vacíos y sin transformar en función al tiempo (mediciones cada hora). A los datos de fluorescencia GFPmut3 y absorbancia a 570 nm se les restó el de los controles (medio sin bacteria).

7.4 EL MODELO DE BIOFILM EN PLACA PETRI

La evaluación de la actividad de los promotores fue determinada a partir de cultivos de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM (transformadas con los 6 plásmidos) en medio LB. Dicha actividad fue determinada para dos **modos de crecimiento**.

Modo de crecimiento biofilm: Para establecer la formación del biofilm, se procedió de manera similar a lo reportado por Angarano *et al.* (con modificaciones, detallado en los apartados “c” y “d”) [49]. Denominamos biofilm a la formación de células adheridas en el fondo de un cultivo estático (sin agitación) en placa de poliestireno.

Modo de crecimiento Planctónico: Para fines comparativos, establecimos el Modo de Crecimiento Planctónico, que corresponde a células creciendo en cultivos en agitación a 220 RPM (en tubos de 16x100 mm).

a. Sembrado del Preinóculo

Un grupo de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con el plásmido reportero correspondiente fue sembrado a partir de placas en 10 mL de medio LB e incubado a 37 °C en agitación constante de 200 RPM durante 16-18 horas.

b. Procesamiento del Preinóculo

Se tomó 1 mL del preinóculo crecido y se trasvasó a un tubo de microcentrífuga. Se centrifugó a una velocidad de 16000 g durante 90 segundos, tras lo cual se descartó el sobrenadante y los agregados extracelulares visibles. El *pellet* celular fue suspendido en 1 mL de medio mínimo M9 1X y nuevamente centrifugado a 16000 g durante 90 segundos, y se volvió a descartar el sobrenadante (este paso fue repetido una vez más). Finalmente, el sobrenadante fue suspendido en 1 mL de medio M9 1X, tras lo cual se realizó la medición de la turbidez (absorbancia a 570 nm), la fluorescencia verde (Ex: 475 nm; Em: 520 nm) y la fluorescencia roja (Ex: 575 nm; Em: 635 nm).

c. Preparación del Mix de Siembra y Sembrado.

Se diluyó la solución obtenida en el paso anterior en un tubo de polipropileno con medio LB hasta una absorbancia de 0.082 medidos a 570 nm (mix de siembra).

Luego, 5 mL de este mix de siembra fue sembrado por triplicado en:

a) placas Petri de poliestireno de 60 mm de diámetro (SPL Life Sciences) (para el **modo de crecimiento biofilm**)

b) tubos de centrifuga de poliestireno de 15 mL (para el **modo de crecimiento Planctónico**).

d. Incubación

Las placas Petri fueron incubadas a 37 °C en condiciones “estáticas” (sin agitación), mientras que los tubos de poliestireno de 15 mL fueron incubados también a 37 °C en agitación a 220 RPM (Figura 5). Los tiempos de incubación fueron 3, 24 y 48 horas. Luego de los tiempos de incubación correspondientes, se retiraron tanto las placas como los tubos de la incubación y se llevaron a la cabina de bioseguridad para su procesamiento.

e. Procesamiento de Cultivos en Placa (**Modo de Crecimiento Biofilm**)

Para los cultivos en placa, el sobrenadante (medio en la columna de líquido) fue descartado por inversión. La formación (**biofilm**) [49] de **células adheridas pre-enjuagadas** permanecen en el fondo de la placa (Figura 5).

- ENJUAGUE. Se agregó 5 mL de medio M9 1X a la placa, para diluir-remover restos del sobrenadante presentes en el biofilm del fondo de la placa. Luego se descartó el medio agregado por inversión. Llamamos a esto formación de **células**

adheridas- enjuagadas. En este punto, se tomaron las fotografías correspondientes para la documentación (Figura 5).

- REMOCIÓN DE **FORMACIÓN CÉLULAS ADHERIDAS - ENJUAGADAS (BIOFILM)**. La formación **células adheridas-enjuagadas** fue removida del fondo de la placa por pipeteo usando 1 mL de medio M9 1X. Luego, esta fue trasvasada a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se centrifugó a 16000 G durante 90 segundos. Finalmente se descartaron tanto el sobrenadante como los agregados extracelulares. Se realizó una suspensión final en M9 1X (Figura 5). Esta suspensión fue llevada a medición.

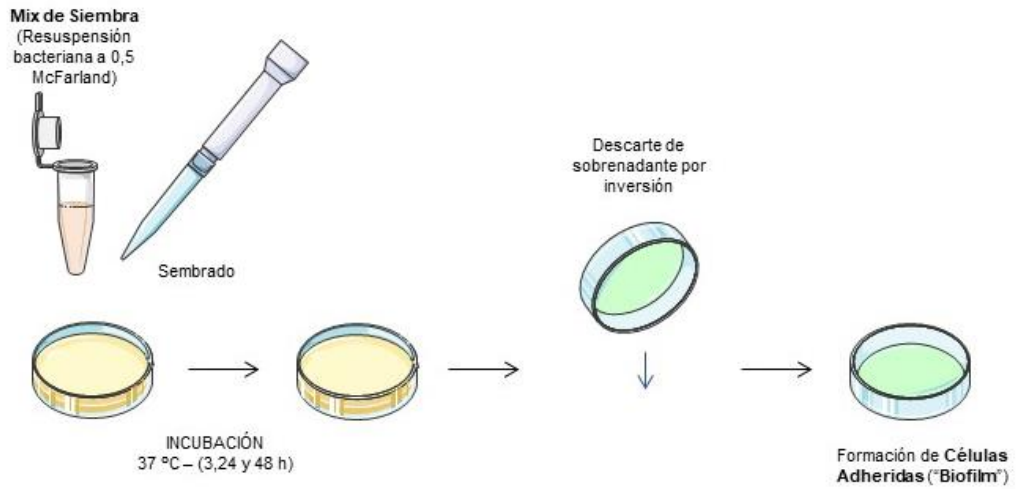
f. Procesamiento de los Cultivos en Agitación (**Modo Planctónico**).

Se tomaron volúmenes de 1 mL de los cultivos en tubos en los puntos de tiempo considerados (3, 24 y 48 horas) y fueron trasvasados a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se realizaron dos lavados con medio M9 1X y una suspensión final en el mismo medio. Esta suspensión fue llevada a medición.

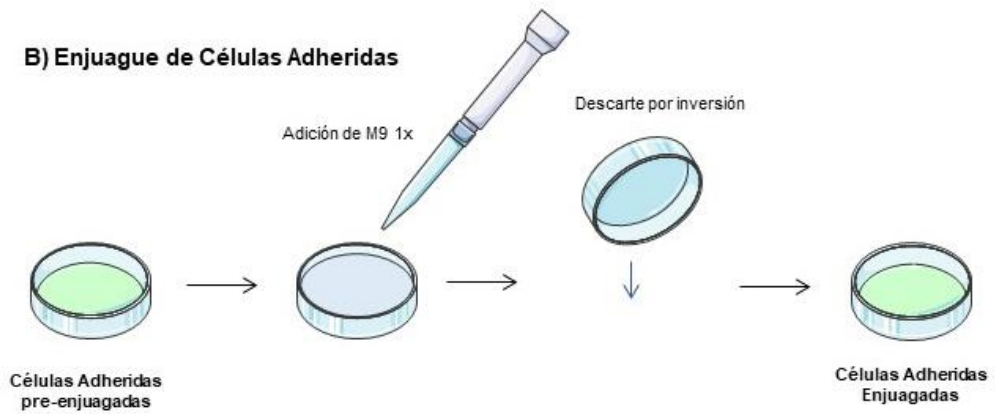
g. Medición

Las suspensiones resultantes fueron sometidas a medición de absorbancia a 570 nm, emisión de la fluorescencia de *GFPmut3* (Ex: 475 nm; Em: 520 nm) y emisión de la fluorescencia de *mkate2* (Ex: 575 nm; Em: 635 nm) con ayuda del lector de microplacas Infinite® 200PRO (TECAN). Los datos fueron recolectados utilizando el software I-Control® y exportados en formato Excel. Se incluyó un control (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con un plásmido pUCP20).

A) Sembrado inicial y formación de Células Adheridas



B) Enjuague de Células Adheridas



C) Remoción de Células Adheridas Enjuagadas y medición.

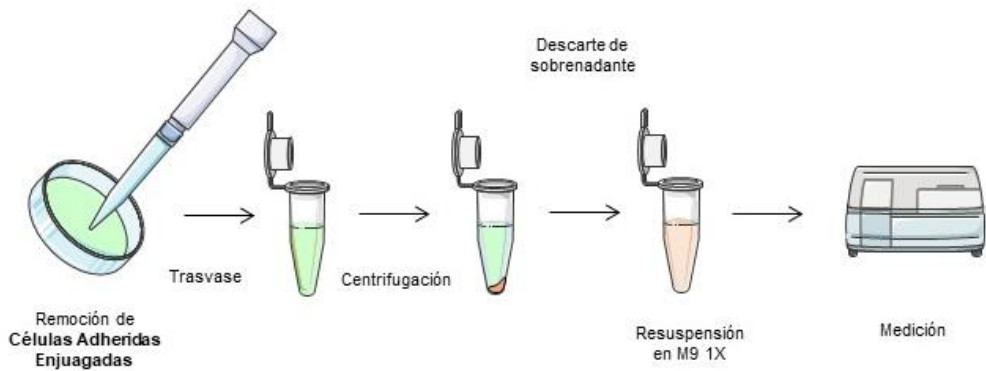


Figura 5. El modelo de biofilm en placa Petri. Se muestran los procesos de A) Sembrado inicial y formación de Células Adheridas, B) Enjuague de Células Adheridas y C) Remoción de Células Adheridas y medición de turbidez y fluorescencia de células adheridas (biofilm).

7.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES

a. Estimación de la Contribución Intrínseca a la Emisión a 520nm.

La contribución intrínseca a la emisión de fluorescencia a 520 nm fue calculada utilizando los valores de emisión a dicha longitud de onda de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con pUCP20. Se elaboró una curva de calibración entre la emisión a 520 nm y la absorbancia de la suspensión bacteriana (absorbancia a 570 nm). Esta curva de calibración fue realizada para cada punto de tiempo (3, 24 y 48 horas) y cada **modo de crecimiento (biofilm y planctónico)**.

b. Actividad de los Promotores

La actividad de los promotores CdrA, LasR, Flg, Fim, PaQa y Pel fue calculada como la proporción entre la emisión de fluorescencia a 520 nm (fluorescencia de *GFPmut3*) y la absorbancia de la suspensión bacteriana (absorbancia a 570 nm). Esto fue realizado para cada punto de tiempo (3, 24 y 48 horas) y cada **modo de crecimiento (biofilm y planctónico)**.

7.6 TRATAMIENTO DE DATOS

a. Gráficas

Las gráficas fueron realizadas usando la librería *Matplotlib* y ejecutados en el entorno *Spyder*.

b. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete STATA® 17.0 (StataCorp). Las pruebas estadísticas utilizadas fueron 1) Kruskal-Wallis, aplicada en la Figura 13, seguida de la prueba de Dunn para detectar diferencias respecto al control y 2) U de Mann-Whitney para las figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 33. El nivel de significación considerado es de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 DISEÑO DE SISTEMAS REPORTEROS

El esquema general del plásmido y la ubicación y dirección de tanto los promotores como los genes reporteros correspondientes se muestran en la figura 6. Los mapas de los plásmidos reporteros diseñados (6) se muestran en el ANEXO 1.

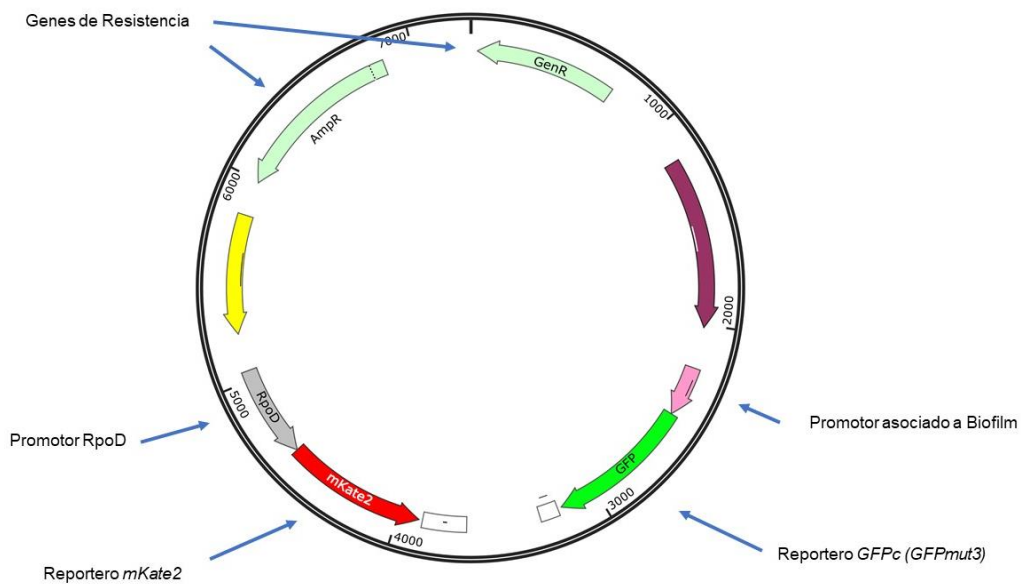


Figura 6. Esquema general del plásmido con el sistema reportero.

8.2 TRANSFORMACION DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™

Previo a la transformación con los plásmidos reporteros, se llevó a cabo la determinación de concentraciones inhibitorias del antibiótico gentamicina en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM creciendo en medio sólido. Se determinó que dicha concentración para gentamicina fue 40 µg/mL (luego de 24 horas de crecimiento, no se encontraron colonias). Esta concentración fue utilizada para la identificación de bacterias transformantes. Imágenes de placas con dichas bacterias se muestran en la Figura 30-ANEXO 9.2. Los resultados de detección de emisión de fluorescencia tanto de *GFPmut3* como de *mkate2* determinados a partir de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformados con los plásmidos reporteros se muestran en la Tabla 1. Imágenes de los *pellets* correspondientes se muestran en la Figura 7.

Tabla 1. Mediciones de fluorescencia GFP y de mKate2 de las *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformado con plásmido.

<i>ATCC10145 transformado con:</i>	<i>GFP</i>	<i>mKate2</i>
PUCP20	1080	27
PUCP20-pCdrA_GFP-RpoD_mKate2	11233	1833
PUCP20-pFimU_GFP-RpoD_mKate2	2575	852
PUCP20-pFlgBCDE_GFP-RpoD_mKate2	2342	637
PUCP20-pLasR_GFP-RpoD_mKate2	6433	1047
PUCP20-pPaQa_GFP-RpoD_mKate2	1491	408
PUCP20-pPelA_GFP-RpoD_mKate2	1873	1499

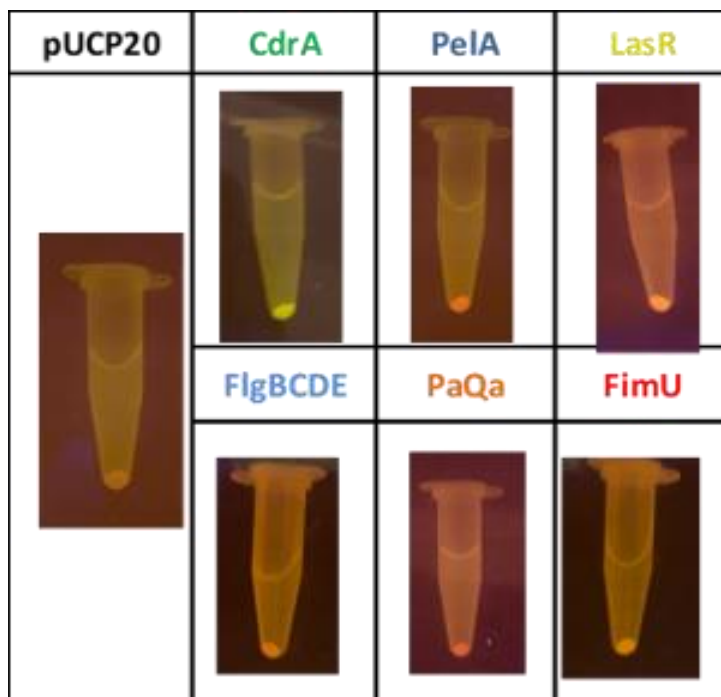


Figura 7. Visualización de *pellets* bacterianos de las *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 transformadas con los plásmido reporteros. Los *pellets* fueron iluminados con luz azul ($\lambda = 450-495$ nm). Se incluye control (pUCP20).

Los espectros de emisión de las muestras arriba consideradas se muestran en el ANEXO 9.3. Se observa claramente que los espectros de las muestras de emisión se asemejan a los de la proteína *GFPmut3* [65]. Es importante mencionar que existe una contribución “intrínseca” a la emisión de fluorescencia a 520 nm muy significativa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con el plásmido “vacío” (pUCP20), al compararla con las cepas transformadas con los plásmidos reporteros (ANEXO 9.3 Figura 31). Respecto a la identificación de la proteína *mkate2*, la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros generó espectros de emisión bastante similares a los reportados para la proteína *mkate2* [66]. En este caso, la muestra de bacteria transformada con el plásmido “vacío” (pUCP20) dio lecturas bajas comparada con las muestras de bacteria transformadas (ANEXO 9.3 Figura 32).

8.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS REPORTEROS DURANTE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

a. Efecto de Plásmidos Reporteros en el Crecimiento Bacteriano

El efecto del plásmido en el crecimiento bacteriano (medido como absorbancia a OD570nm) se muestra en la Figura 8. Se puede apreciar que las curvas de crecimiento de las bacterias transformadas son muy similares entre sí, comparadas con las bacterias sin transformar y la bacteria transformada con el plásmido pUCP20. Las curvas correspondientes a bacterias transformadas con reporteros de los promotores CdrA y LasR muestran un menor crecimiento en fase estacionaria. Esto es debido a que estos datos provienen de un ensayo realizado en 100 μ L de cultivo. A pesar de esto, observamos que presentan las etapas típicas de un cultivo bacteriano (etapas exponencial y estacionaria).

La emisión de fluorescencia a 520 nm (correspondiente a GFPmut3) fue monitoreada y los resultados se observan en la Figura 9. De manera llamativa, se observa que la emisión de tanto la *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM sin transformar como la transformada con el plásmido pUCP20 (controles) muestran una tendencia creciente en función al tiempo (Figura 8). Los promotores PaQa y Pel muestran valores de emisión muy similares a los controles, mientras que Flg y FimU muestran valores ligeramente mayores. LasR presenta una tendencia creciente, no significativamente diferente de los controles, mientras que el promotor CdrA sí muestra valores de emisión significativamente mayores a los controles.

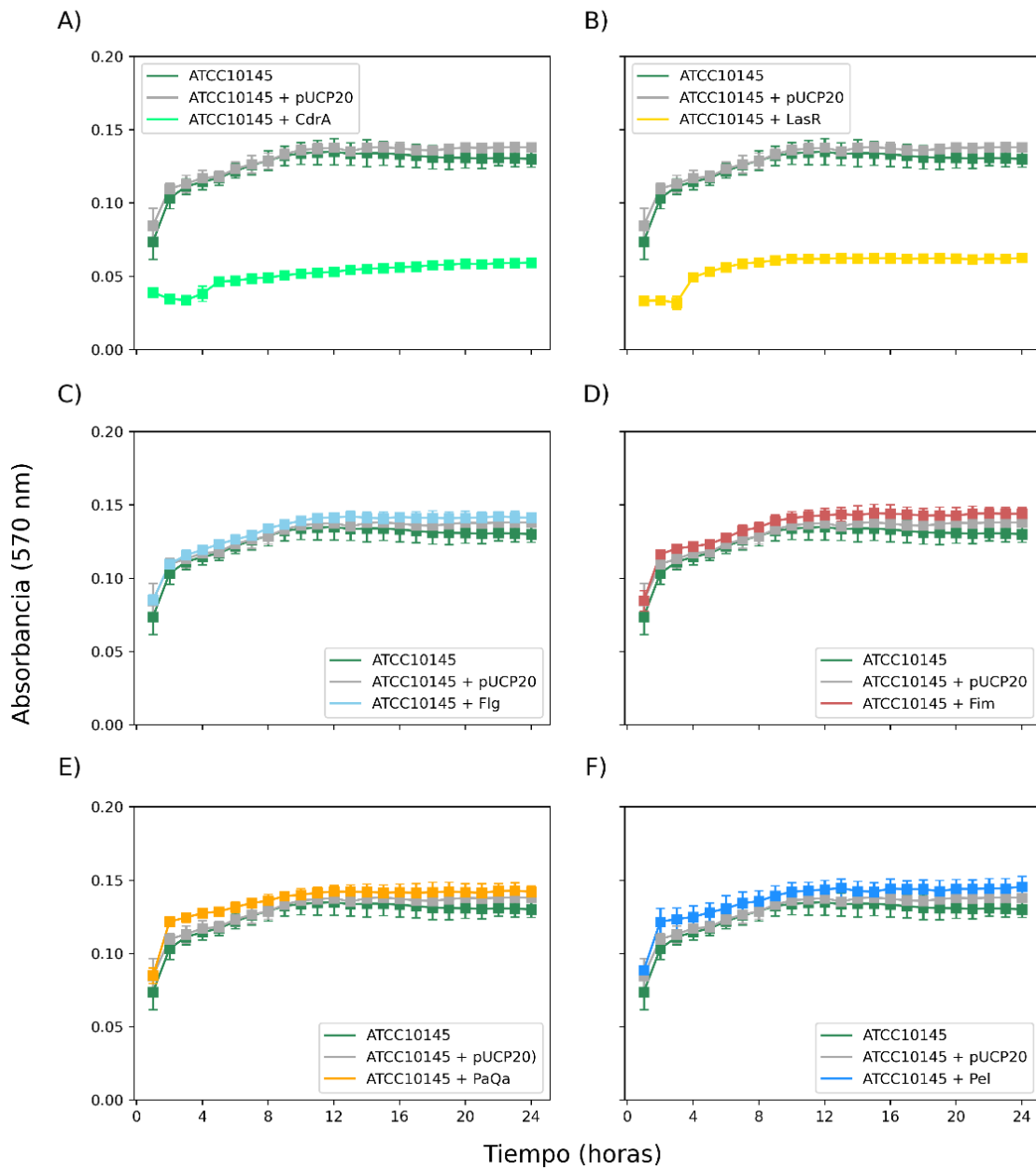


Figura 8. Efecto de los plásmidos reporteros en el crecimiento bacteriano (medido como Absorbancia a 570 nm) de bacterias transformadas. Los promotores correspondientes A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Cada gráfica incluye curvas de crecimiento de la bacteria sin transformar (ATCC10145) y transformada con el plásmido “control” (ATCC10145 + pUCP20). Nota: los cultivos con los reporteros CdrA y LasR fueron realizados en 100 μ L, mientras que con los otros 4 reporteros en 200 μ L.

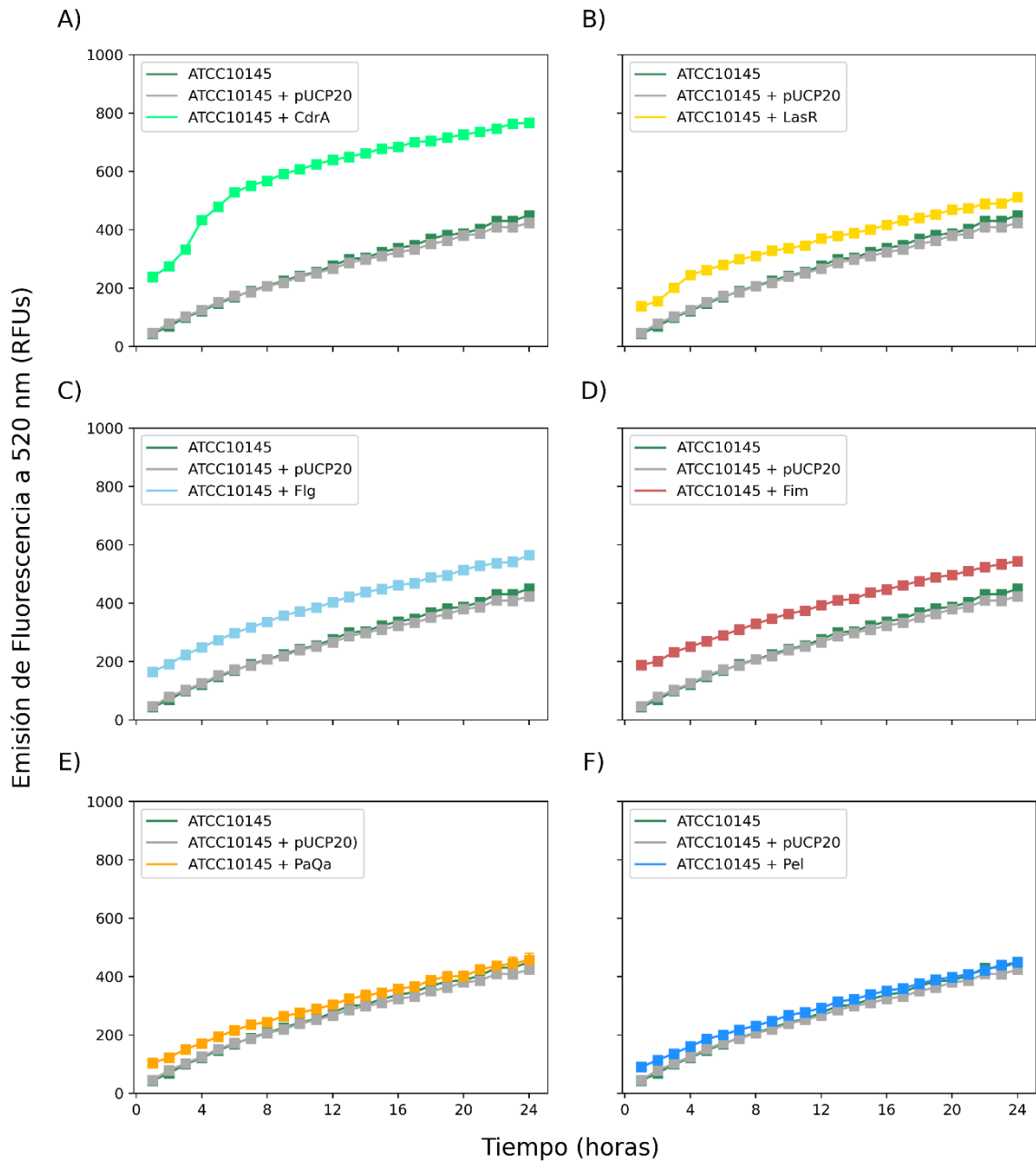


Figura 9. Emisión de Fluorescencia a 520 nm (correspondiente a *GFPmut3*) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo. Los promotores correspondientes A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Cada gráfica incluye curvas de crecimiento de la bacteria sin transformar (ATCC10145) y transformada con el plásmido “control” (ATCC10145 + pUCP20) Nota: los cultivos con los reporteros CdrA y LasR fueron realizados en 100 μ L, mientras que con los otros 4 reporteros en 200 μ L.

La emisión de fluorescencia a 635 nm (correspondiente a *mkate2*) muestra una tendencia creciente aproximadamente hasta las 3 horas para los promotores PaQa,

PelA, LasR y FimU, mientras que esta tendencia es hasta las 5 horas para los promotores CdrA y LasR. A partir de estos puntos, la fluorescencia es aproximadamente constante (con una ligera caída hacia las 24 horas) (Figura 9).

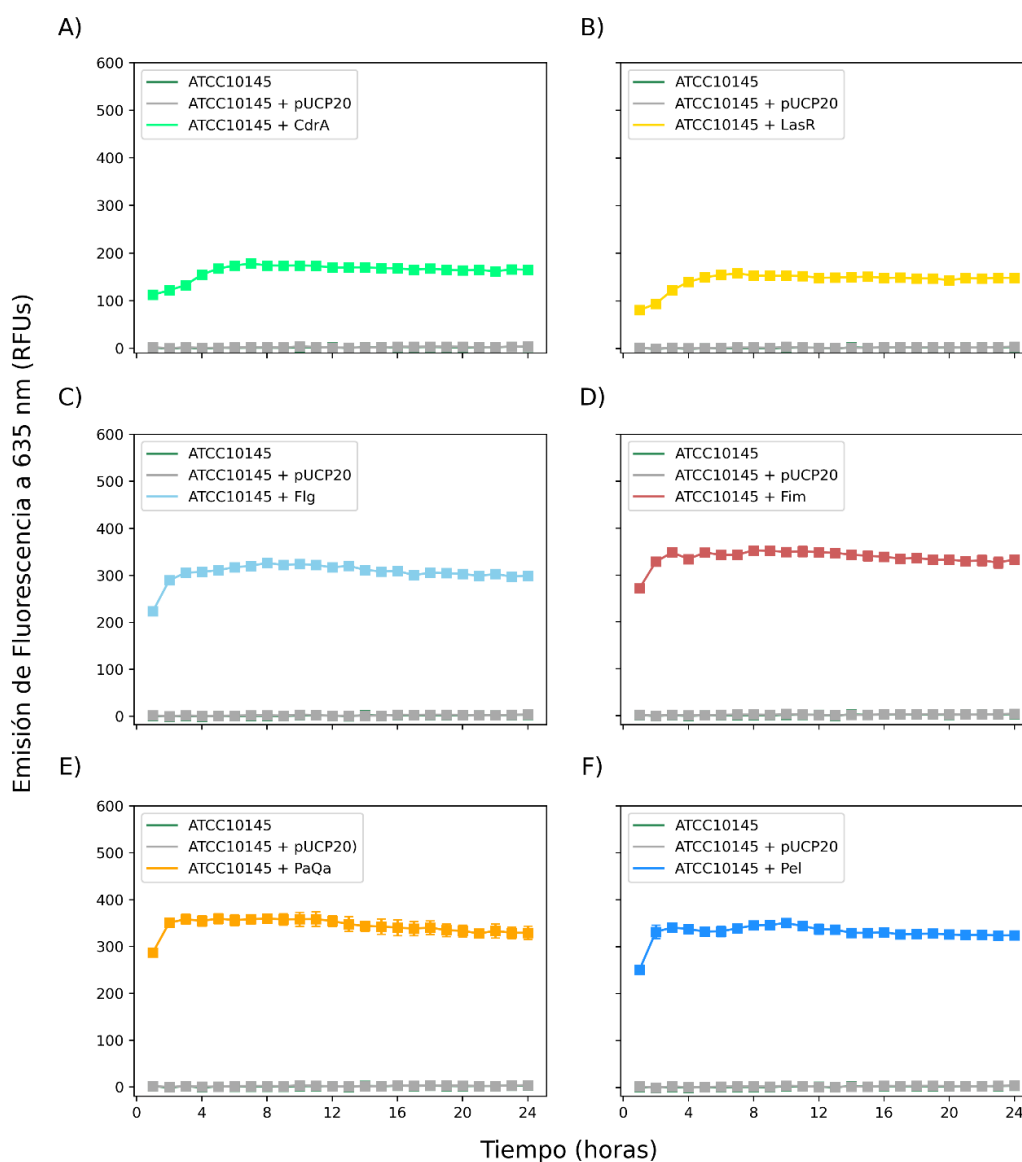


Figura 10. Emisión de Fluorescencia *mkate2* (a 635 nm) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo. Los promotores correspondientes A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Cada gráfica incluye curvas de crecimiento de la bacteria sin transformar (ATCC10145) y transformada con el plásmido “control” (ATCC10145 + pUCP20). Nota: los cultivos con los reporteros CdrA y LasR fueron realizados en 100 μ L, mientras que con los otros 4 reporteros en 200 μ L.

b. Emisión de la Fluorescencia GFPmut3 Normalizada

La emisión de la fluorescencia GFPmut3 respecto a la absorbancia a 570nm ($GFPmut3/OD570nm$) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo se muestra en las Figura 11.

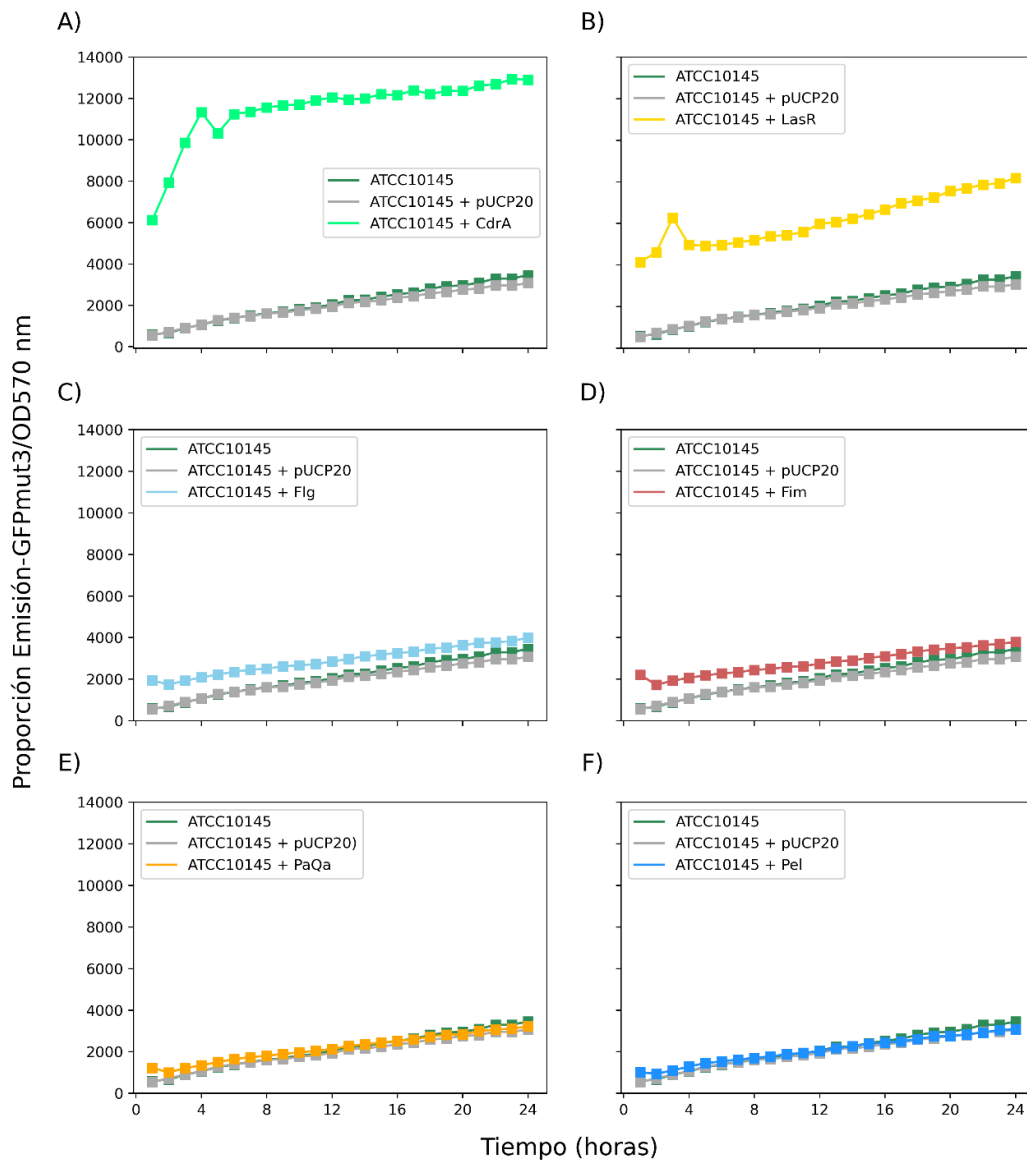


Figura 11. Proporción de Fluorescencia GFP/OD570nm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo. Los promotores correspondientes A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Cada gráfica incluye curvas de crecimiento de la bacteria sin transformar (ATCC10145) y transformada con el plásmido “control” (ATCC10145 + pUCP20). Nota: los cultivos con los reporteros CdrA y LasR fueron realizados en 100 μ L, mientras que con los otros 4 reporteros en 200 μ L.

Para los promotores PaQa, Pel, Fim y Flg existe una tendencia creciente en función al tiempo. De manera llamativa, la proporción $GFPmut3/OD570nm$ para el cultivo con bacteria transformada con pUCP20 y sin transformar da valores muy similares entre sí y similares a los otros promotores. Por otro lado, para CdrA y LasR, la proporción $GFPmut3/OD570nm$ es mayor comparada a la del resto de promotores y los controles.

c. Emisión de la Fluorescencia mKate2 Normalizada

La emisión de la fluorescencia de mKate2 respecto a la absorbancia a 570nm ($mKate2/OD570nm$) de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo se muestra en las Figura 12. Todos los promotores exhiben una proporción con tendencia decreciente en función al tiempo, aunque que para CdrA y LasR existe un pico en la proporción, alrededor de las 3 horas para LasR y de las 4 horas para CdrA. Posterior a esto la proporción $mKate2/OD570nm$ de LasR es aproximadamente la misma que para los otros promotores. Para CdrA, la tendencia decreciente es similar, aunque con valores de proporción ligeramente mayores que los de los otros promotores. Para los cultivos de *P. aeruginosa* sin transformar, así como transformados con pUCP20, la proporción $mKate2/OD570nm$ muestra valores similares prácticamente nulos.

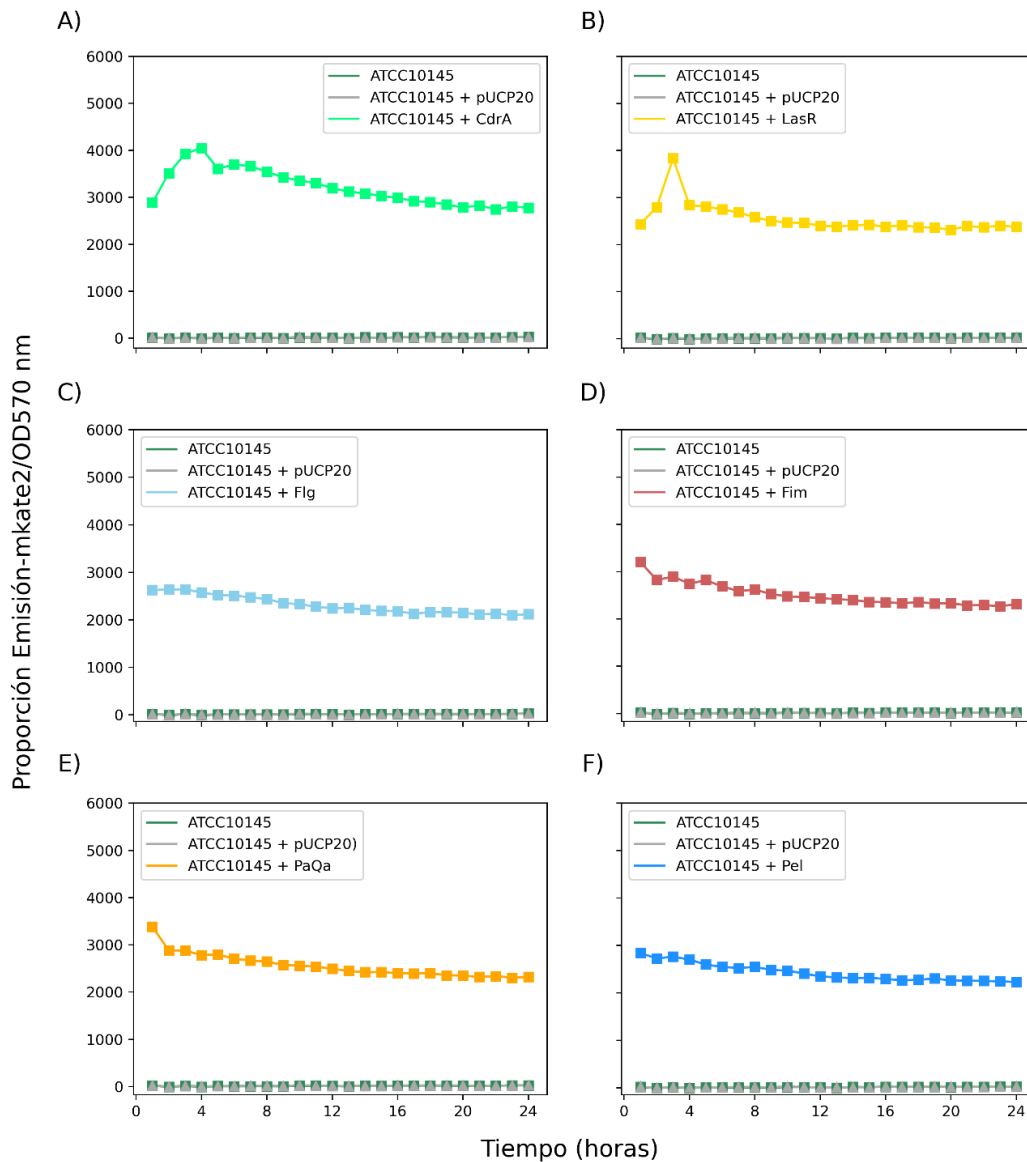


Figura 12. Proporción de Fluorescencia mKate2/OD570nm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros en función al tiempo. Los promotores correspondientes A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Cada gráfica incluye curvas de crecimiento de la bacteria sin transformar (ATCC10145) y transformada con el plásmido “control” (ATCC10145 + pUCP20). Nota: los cultivos con los reporteros CdrA y LasR fueron realizados en 100 μ L, mientras que con los otros 4 reporteros en 200 μ L.

8.4 EL MODELO DE BIOFILM EN MEDIO LB

a. Comparación en la Emisión de Fluorescencia a 520 nm Normalizada en Medios LB y M9 1X

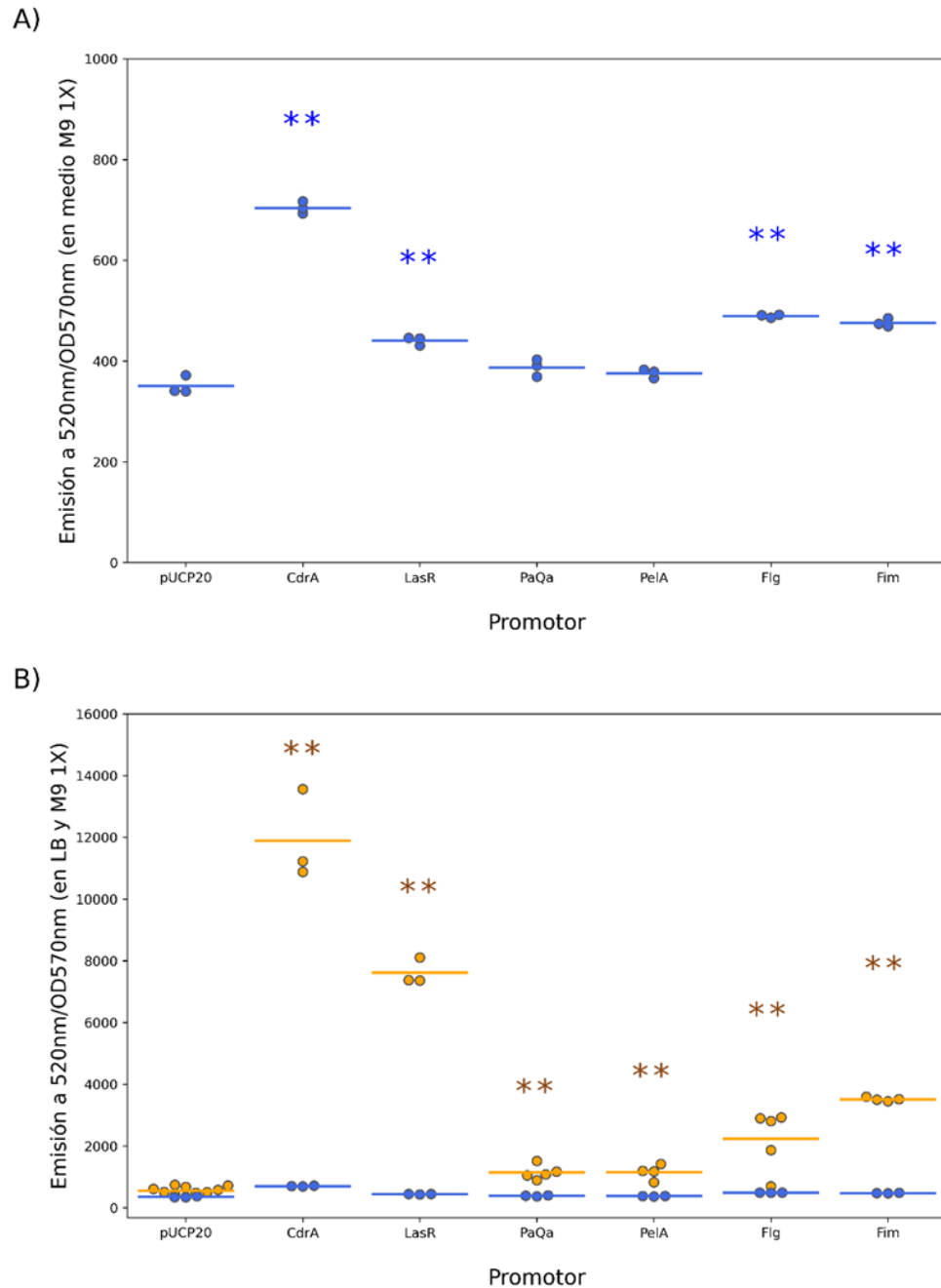


Figura 13. Comparación entre la emisión de fluorescencia a 520 nm normalizada respecto a la absorbancia a 570 nm (Proporción Emisión a 520 nm/OD570nm) de cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con los plásmidos reporteros y el plásmido vacío (pUCP20) en dos medios diferentes. A) Cultivos en M9 1X (puntos azules) B) Cultivos en medio LB (puntos amarillos). En este mismo panel se muestran las emisiones en M9 1X del panel superior para fines comparativos. Los símbolos “**” indican diferencias estadísticas significativas respecto al control (pUCP20) ($n \geq 3$, $**p < 0.05$).

La proporción de la emisión a 520nm/OD570nm en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con el plásmido vacío (pUCP20-control) y plásmidos reporteros en medios M9 1X se muestra en la Figura 13A. Una comparación con las emisiones normalizadas en el medio LB se observa en la Figura 13B.

- b. Caracterización de Preinóculos: Actividad del Promotor RpoD y Promotores CdrA, LasR, PaQa, Pel, Flg y Fim.

La actividad del promotor de *rpoD* de los preinóculos fue determinada como la proporción entre la emisión de fluorescencia a 635 nm sobre la absorbancia a 570 nm (OD570 nm). Estos valores fueron obtenidos para cada promotor y los resultados se muestran en la Figura 14. Se observa que las proporciones adoptan valores de alrededor de 1000 para todos los promotores. Sin embargo, se aprecian algunos valores atípicos, de 4000 y 5000 en el caso de las bacterias portando los promotores PaQa, Flg, y Fim. Para los ensayos, no se consideraron estos valores atípicos.

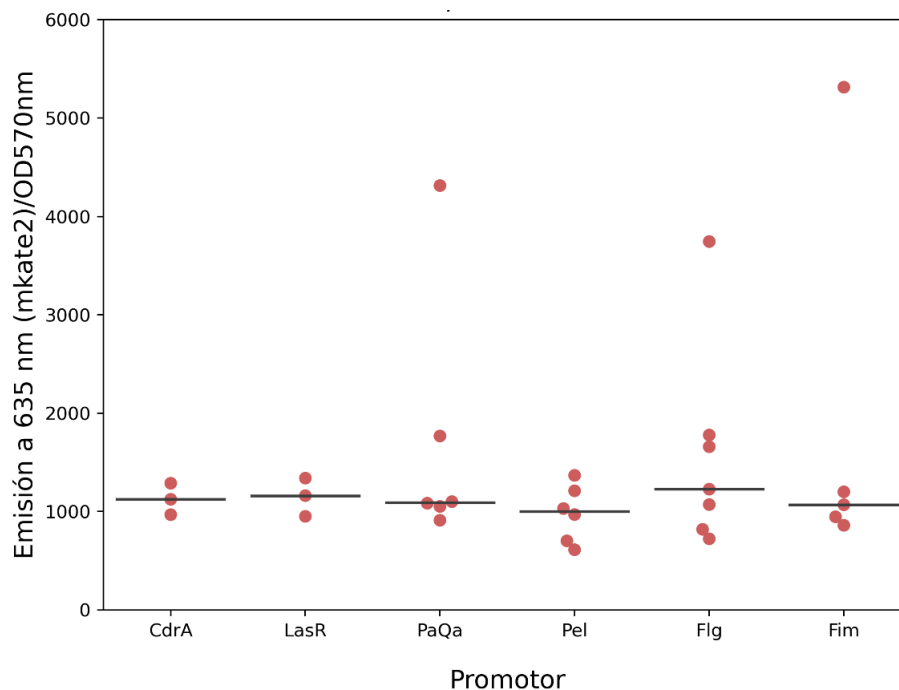


Figura 14. Proporción emisión de fluorescencia a 635 nm (mKate2)/OD570nm según promotores para cultivos de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM transformadas con los plásmidos reporteros. A los valores netos de fluorescencia mkate2 se le restó el valor del control (bacteria transformada con plásmido pUCP20 “vacío”). Las líneas horizontales corresponden a las medianas de los datos.

La actividad de los promotores CdrA, LasR, PaQa, Pel, Flg y Fim de los preinóculos correspondientes fueron determinados por la proporción entre la emisión a 520 nm (Emisión asociada a GFPmut3) normalizada respecto tanto a 1) la absorbancia a 570 nm (OD570 nm) de la suspensión como 2) respecto a la emisión de fluorescencia a 635 nm (mkate2). Ambos métodos de normalización muestran un patrón similar para cada promotor (Figura 15A), mostrando además una buena correlación entre si (Figura 15 B).

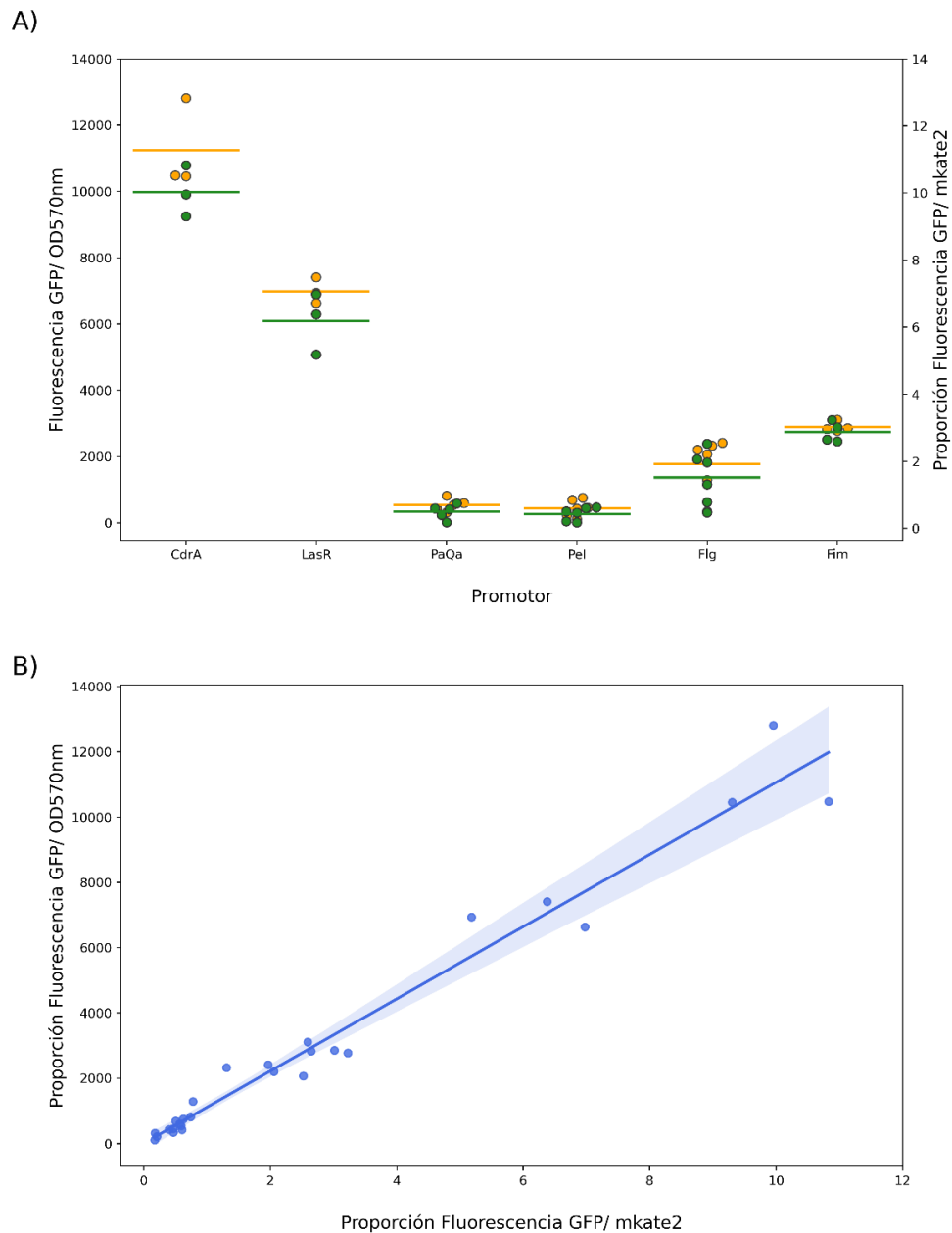





Figura 15. Comparación entre normalización de la actividad de los promotores (fluorescencia a 520 nm) respecto a la absorbancia a 570nm (OD570nm) y *mkate2*. A) Normalizaciones según promotor. Los puntos amarillos corresponden a normalizaciones respecto a OD570nm (unidades en eje vertical izquierdo). Los puntos verdes corresponden a normalizaciones respecto a *mkate2* (unidades en eje vertical izquierdo). Las líneas horizontales representan las medias aritméticas correspondientes. B) Correlación entre ambos tipos de normalización (GFP/OD570nm y GFP/*mkate2*). Se muestra la recta de regresión correspondiente.

- c. Descripción del Biofilm formado Placas Petri de Poliestireno tras los Tiempos de Incubación de 3, 24 y 48 horas de Incubación.

Tabla 2. Imágenes del biofilm formado por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ en placas Petri de poliestireno.

Tiempo de Incubación	Imagen de referencia	Descripción de la formación encontrada
0 horas.		<ul style="list-style-type: none"> - No se observan formaciones
3 horas.		<ul style="list-style-type: none"> - Formación laminar de apariencia blaquescina. - Consistencia: resistente a la fragmentación por pipeteo.
24 y 48 horas.		<ul style="list-style-type: none"> - Formación laminar de apariencia transparente. - Consistencia: Poca resistencia a la fragmentación por pipeteo.

8.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES

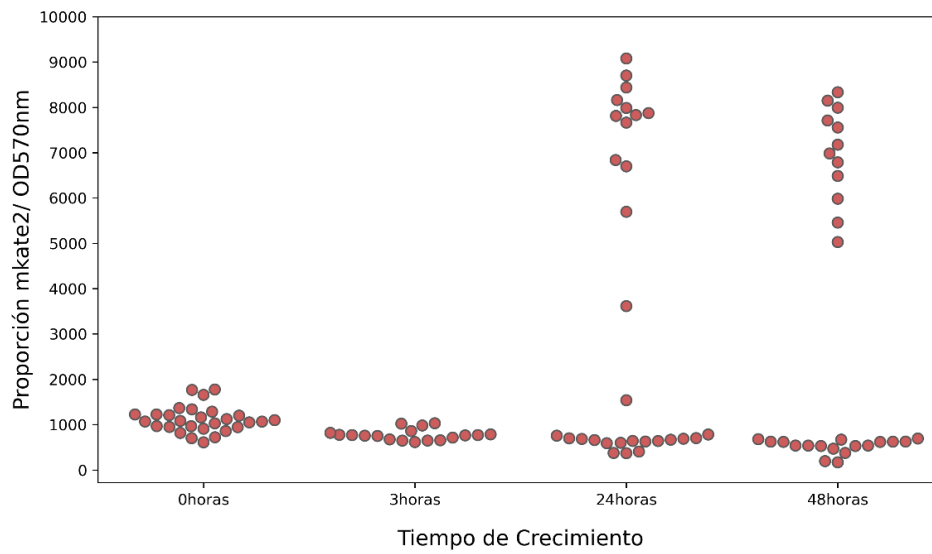
- a. Determinación de la contribución intrínseca a la fluorescencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con el plásmido pUCP20.

Durante la evaluación del barrido de fluorescencia de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con el plásmido pUCP20, se encontró que su patrón de emisión a 520 nm muestra un máximo a la misma longitud de onda que la proteína GFPmut3 (Figura 31 – ANEXO 13.3). Para conocer la magnitud de esta contribución “intrínseca” a la fluorescencia a 520 nm en el modelo de biofilm, se realizó una curva de calibración entre esta “emisión de fluorescencia intrínseca” de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM+ pUCP20 en función a la absorbancia 570 nm (OD_{570nm}). Esto fue realizado para los puntos de tiempo considerados en nuestros ensayos (3, 24 y 48 horas) y en ambos **modos de crecimiento (biofilm y planctónico)**. Los resultados se muestran en el Figura 34 (ANEXO 13.6). Se observa que, para cada punto de tiempo, las pendientes de las rectas de regresión son diferentes tanto en las bacterias creciendo en modo planctónico como en biofilm. En el modo de crecimiento planctónico, hay una tendencia creciente de la pendiente (Figura 34A ANEXO 13.6) mientras que en el modo de crecimiento de biofilm existe un incremento en el valor de la pendiente a las 24 horas, y una caída a las 48 horas (Figura 34B ANEXO 13.7).

- b. Actividad de RpoD en modelo de placa en función al tiempo (0, 24 y 48 horas de crecimiento).

La actividad del promotor *rpoD*, medido como la proporción de la fluorescencia de mKate2 respecto a la absorbancia a 570 nm (OD 570nm), fue calculada para bacterias en **modo de crecimiento planctónico** (proveniente de cultivos en agitación) y para bacterias en **modo de crecimiento biofilm** (de cultivos en placa). Las muestras fueron procesadas como se indica en la Figura 5C. Los puntos de tiempo considerados fueron 0 (los datos para este tiempo son los ya presentados en la Figura 14), 3, 24 y 48 horas. Se observa que la actividad del promotor *rpoD* a las 3 horas en las bacterias con **modo de crecimiento planctónico** converge en alrededor de 1000. Sin embargo, a las 24 horas las proporciones tienden a agruparse en torno a dos valores: 8000 y 800, y esta tendencia se mantiene a las 48 horas (Figura 16A). Para las bacterias con **modo de crecimiento biofilm**, la tendencia observada es la siguiente: a las 3 horas, en torno a 2500; a las 24 horas, en torno a 4500; y a las 48 horas, en torno a 6000. Es importante destacar que, en este último punto de tiempo, aparecen dos valores en torno a 700 (similar a su contraparte en agitación) (Figura 16B). Es interesante comentar que, para los cultivos en **modo planctónico** se puede apreciar una tendencia decreciente en función al tiempo de la proporción mKate2/OD570nm si solo consideramos los valores cercanos a 1000, lo que recuerda la tendencia de esta misma proporción obtenida en medio mínimo (Figura 12).

A) Crecimiento Planctónico



B) Crecimiento en Biofilm

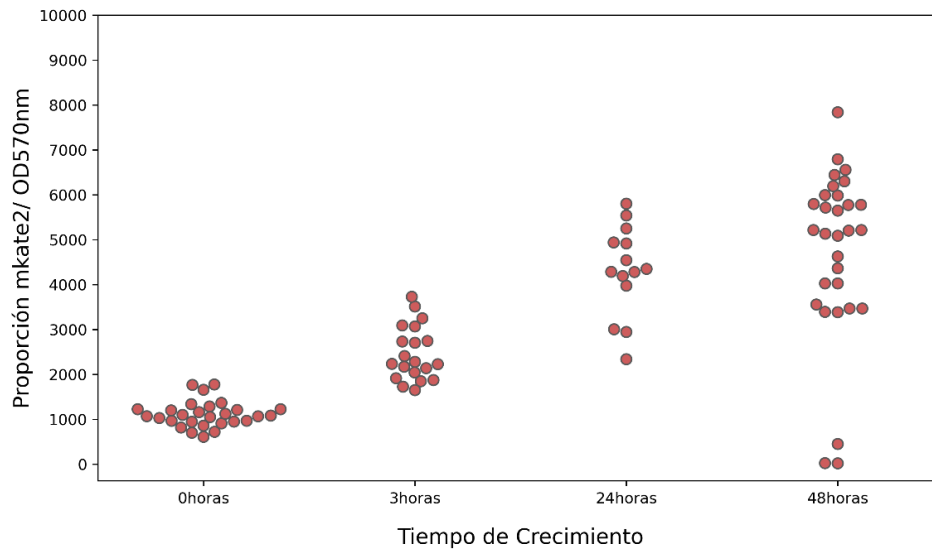


Figura 16. Proporción mKate2/OD570nm en modelo de placa en función al tiempo (0, 3, 24 y 48 horas de crecimiento) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformadas con los plásmidos reporteros A) Bacterias en modo de crecimiento planctónico, B) Bacterias en modo de crecimiento biofilm.

c. Actividad de los promotores en función al tiempo en el modelo de placa de biofilm

Dada la variabilidad presente en la fluorescencia de *mkate2*, la actividad de los promotores CdrA, LasR, PaQa, Pel, Flg y Fim fue normalizada respecto a la absorbancia a 570 nm (OD570nm).

- CdrA.** Para este promotor, la actividad evoluciona en el tiempo de manera similar para las bacterias en modo planctónico hasta las 24 horas (aunque la diferencia de actividades es significativa a las 3 horas). A las 48 horas, se aprecia una caída en la proporción fluorescencia GFP/OD570nm para el modo biofilm, comparado con el modo planctónico (diferencia significativa) (Figura 17).

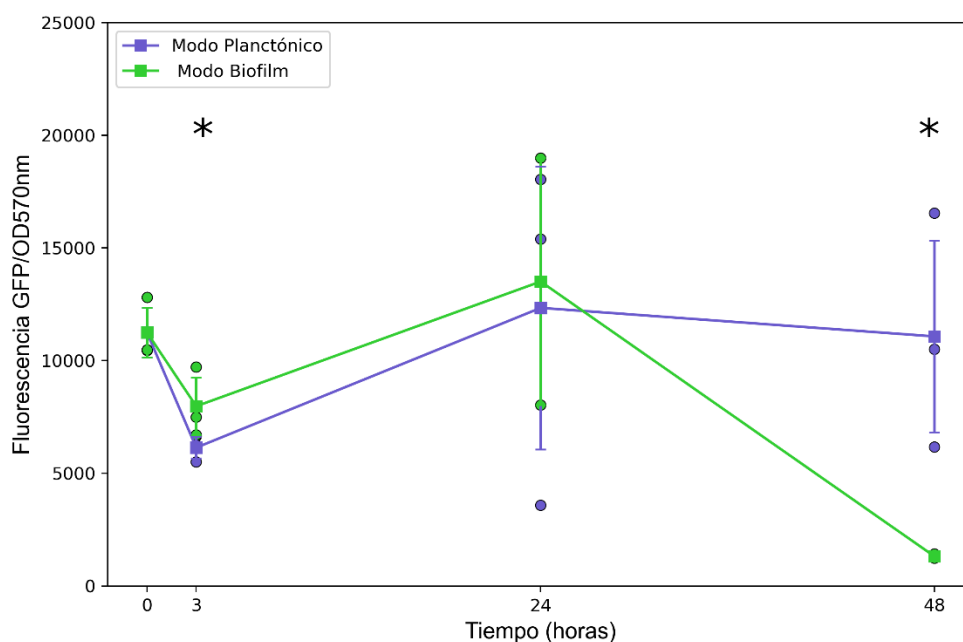


Figura 17. Actividad del promotor CdrA (normalizado respecto a la turbidez) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo ‘*’ indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

- LasR.** Las tendencias de la actividad de los promotores de las bacterias creciendo en modo planctónico y biofilm son similares durante los puntos de

tiempo considerados (sin diferencias estadísticas significativas) (Figura 18). Existe una disminución en la proporción GFP/OD570nm a partir de las 0 horas y hasta las 24 horas, mientras que se aprecia un leve incremento en la proporción a las 48 horas.

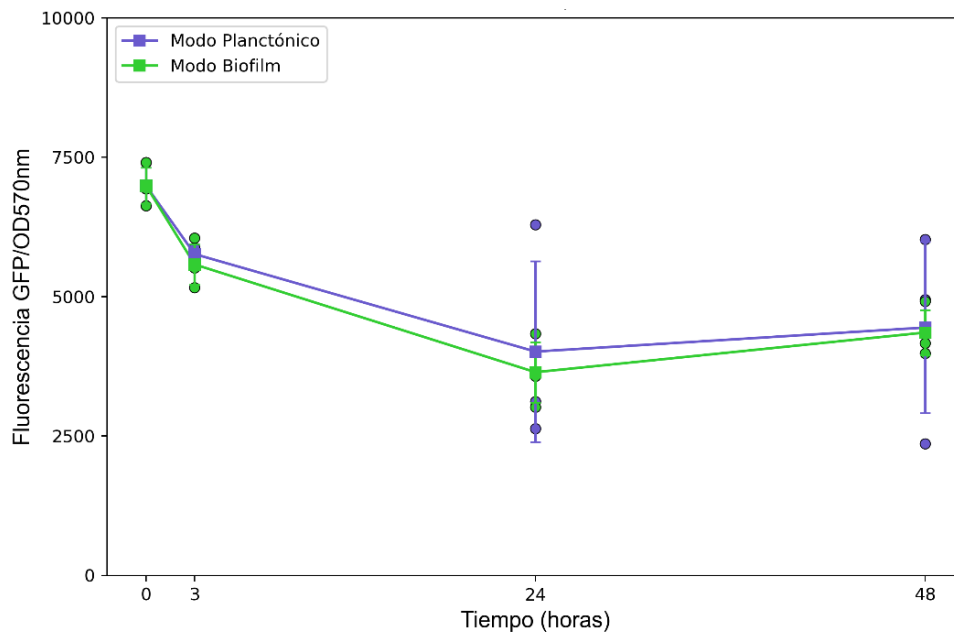


Figura 18. Actividad del promotor LasR (normalizado respecto a la OD570 nm) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo “*” indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

- **Fig.** La actividad de este promotor es mayor para el modo biofilm a las 3 horas y mayor para el modo planctónico a las 24 horas (diferencias significativas). A las 48 horas de crecimiento, hay un dramático incremento en la actividad del promotor de bacterias en modo planctónico respecto a la actividad de bacterias en modo biofilm, que se incrementa levemente (Figura 19).

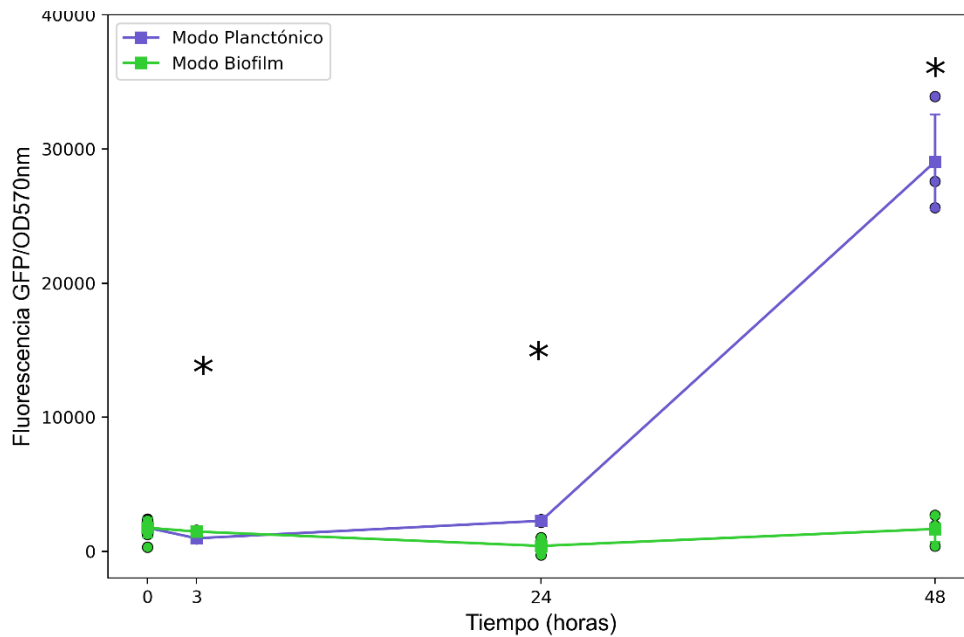


Figura 19. Actividad del promotor Flg (normalizado respecto a la OD570 nm) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo “*” indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

- Fim.** La actividad de este promotor es similar tanto para bacterias creciendo en modo planctónico como biofilm a las 3 horas de crecimiento, evidenciándose una leve caída en ambos, comparado con las 0 horas. A las 24 horas existe un incremento en la actividad del promotor Fim de bacterias de modo biofilm comparado con bacterias planctónicas, mientras que a las 48 horas la actividad del promotor Fim de bacterias de modo biofilm es significativamente mayor que las del modo planctónico (Figura 20).

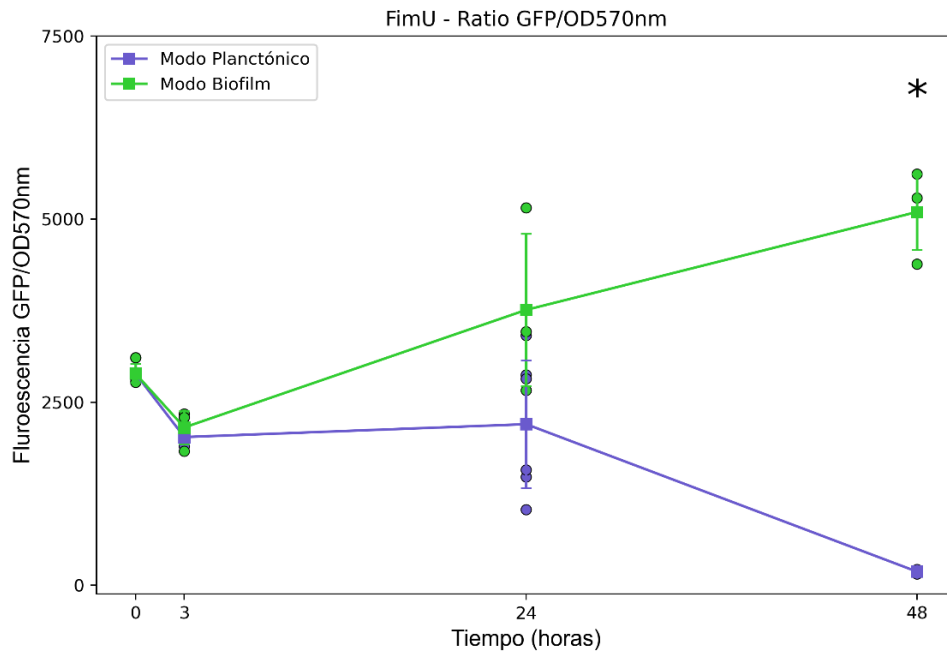


Figura 20. Actividad del promotor FimU (normalizado respecto a la OD570 nm) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo ‘*’ indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

- **PaQa.** La actividad de este promotor solo muestra diferencias significativas a las 3 horas (actividad en biofilm mayor que en crecimiento planctónico), mientras que a las 24 y 48 horas no existen diferencias entre ambos modos de crecimiento (planctónico y biofilm) (Figura 21).

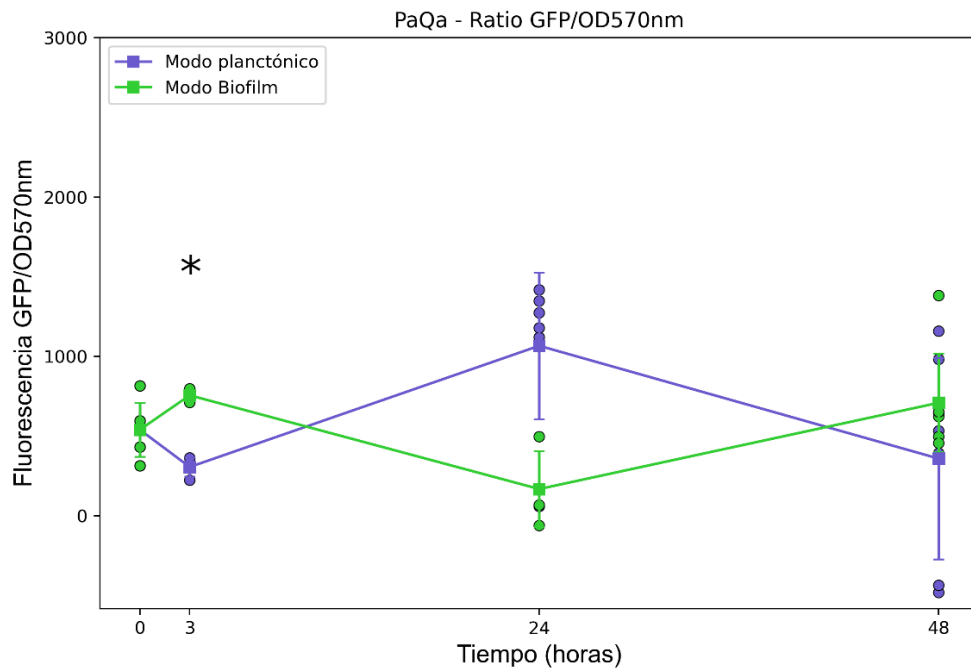


Figura 21. Actividad del promotor PaQa (normalizado respecto a la OD570 nm) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo “*” indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

- PelA.** La actividad de este promotor muestra un incremento en bacterias en modo biofilm a las 3 horas, respecto al modo planctónico (diferencias significativas). A las 24 horas, no se aprecian diferencias significativas. A las 48 horas, hay una actividad ligeramente mayor en bacterias creciendo en modo biofilm respecto al modo planctónico (diferencias significativas) (Figura 22).

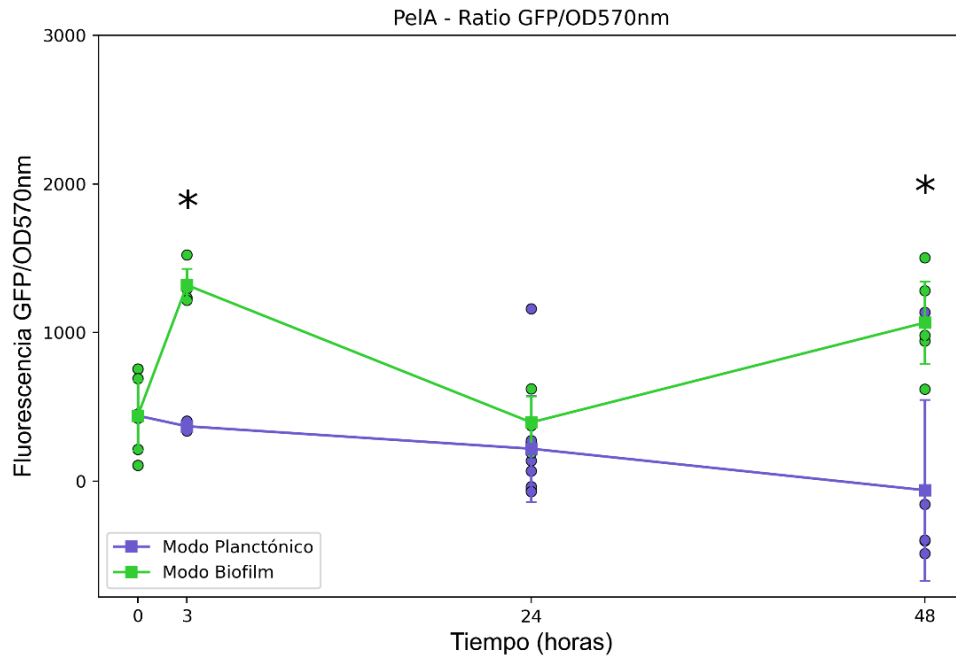


Figura 22. Actividad del promotor Pel (normalizado respecto OD570 nm) en función al tiempo para bacterias en modo de crecimiento planctónico y biofilm. Las barras de error equivalen a una desviación estándar. El símbolo ‘*’ indica diferencia estadística significativa en la actividad de ambos modos de crecimiento (para un mismo tiempo) ($n \geq 3$, $*p < 0.05$).

IX. DISCUSION

9.1 EFECTO DEL PLASMIDO EN EL CRECIMIENTO DE *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC® 10145TM

La producción de proteínas heterólogas puede tener un efecto perjudicial para el crecimiento bacteriano debido a los costos innecesarios que supone. Teniendo en cuenta que los plásmidos reporteros implican la síntesis de proteínas reporteras, existe la posibilidad de que tengan un efecto perjudicial en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM. El efecto de la presencia de los plásmidos reporteros en el crecimiento se muestra en la Figura 8. Se aprecia que las absorbancias alcanzadas por los cultivos correspondientes a los reporteros Flg, Fim, PaQa, Pel y los controles (bacterias transformadas con pUCP20 y sin transformar) son similares entre sí y mayores que los cultivos de CdrA y LasR.

Es importante comentar que para los cultivos correspondientes a los reporteros CdrA y LasR, se emplearon 100 µL de volumen mientras que para los otros 4 reporteros se emplearon 200. Debido a esto, no consideramos que cultivos de diferentes volúmenes sean directamente comparables. En su lugar, al comparar la proporción entre la emisión de mKate2 (actividad del promotor RpoD) sobre el OD570nm, encontramos que todos los cultivos presentan tendencias similares (Figura 12), lo que confirmaría que no hay perjuicios causados por los plásmidos (o la síntesis de sus productos) en el crecimiento de las bacterias.

9.2 DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA DE mKate2

La emisión de fluorescencia a 535 nm (correspondiente al reportero mKate2) fue casi nula tanto para bacterias *P. aeruginosa* sin transformar como transformada con pUCP20 (controles) de cultivos en medio mínimo M9 1X (Figuras 10 y 12), mientras que se detectó emisión en los cultivos de bacterias transformadas con los plásmidos reporteros. Además, dicha emisión se mantiene constante durante las 24 horas y con el mismo patrón para los 6 reporteros utilizados. Estas observaciones sugieren que a) mKate2 es una proteína adecuada para ser usada como reportera y b) la expresión de mKate2 bajo el control del promotor rpoD puede, en principio, ser utilizada como normalizador de expresión.

9.3 DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA de GFPmut3

Muchos modelos de estudio de biofilms usan el medio mínimo suplementado para el cultivo de las bacterias. Dada la composición conocida de los medios mínimos, se pueden evitar compuestos que contribuyan a una fluorescencia “de fondo” que resultaría en una sobreestimación en la medición de fluorescencia de los fluoróforos de interés (en este caso, de los genes reporteros). En este trabajo, los cultivos en medio mínimo M9 1X suplementado con glucosa al 1 % de tanto *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM sin transformar como transformada con el plásmido “vacío” (pUCP20) (en principio considerados como “controles”) emiten fluorescencia a 520 nm (al ser excitado con luz de 475 nm de longitud de onda), siendo dicha emisión creciente en función al tiempo (Figura 9 y Figura 11).

Observando los espectros de emisión de estos “controles”, se encuentra que efectivamente existe un máximo de emisión muy cercano al de la proteína reportera GFPmut3 utilizada (Figura 31 – ANEXO 13.3) (siendo que en teoría estos controles no producen GFPmut3). Una explicación para esta observación es que *P. aeruginosa* produce moléculas fluorescentes como pioverdinas, que posee espectros de emisión similares al de GFPmut3 [76]. El tratamiento de esta “contribución intrínseca” a la fluorescencia será detallada más adelante.

9.4 EL MODELO DE BIOFILM EN PLACA PETRI

a. Uso del medio LB para ensayos en placa

En Medio M9 1X y tras 18 horas de incubación a 37 °C (en reposo, sin agitación), los reporteros con los promotores CdrA, LasR, Flg y Fim presentaron emisión de fluorescencia (normalizada con la absorbancia a 570 nm) significativamente mayor a la del control (pUCP20), mientras que esto no ocurre para los reporteros de los promotores PaQa y Pel (Figura 13A). En cultivos en medio LB sometidos a agitación (18 horas de incubación a 37 °C), la emisión de fluorescencia a 520 nm normalizada de los reporteros fue significativamente mayor que la del control (pUCP20) en todos los casos (Figura 13B). Al comparar los niveles de expresión de los reporteros en ambas condiciones respecto al control, se encuentra que en medio LB las proporciones para todos los reporteros son mayores que en medio M9 1X (Tabla 3 – ANEXO 13.4). Es posible que las densidades mayores alcanzadas gracias al medio LB y la agitación permitan obtener suficiente señal fluorescente como para ser detectada por el lector de placas. Esto es respaldado

por el hecho de que las absorbancias a 570nm fueron mayores en LB comparados a los obtenidos en M9 1X (Figura 33 – ANEXO 13.5). Dado que en el medio LB las diferencias en emisión de fluorescencia entre los promotores y controles son mejor apreciadas (mayor resolución), se decidió utilizar el medio LB para los experimentos posteriores. Es relevante aclarar que el efecto aislado de la agitación en medio mínimo M9 1X no fue estudiado en este proyecto.

Respecto a las diferencias entre actividad de los promotores, la alta emisión del reportero CdrA en ambos medios (LB y M9 1X) puede explicarse debido a que la secuencia del RBS (Ribosome Binding Site - Sitio de unión al ribosoma) del reportero CdrA fue optimizado (por los autores de dicho constructo) para hacer más eficiente la traducción del gen reportero [77]. En contraste, los otros reporteros (de los promotores LasR, Pel, PaQa, Flg y Fim) fueron construidos con promotores y regiones 5' UTR nativas. Esto puede explicar la menor actividad de estos promotores comparada con la de CdrA (Figura 13, Figura 15).

b. Modos de Crecimiento

Los modelos de estudio de biofilm *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* se clasifican en sistemas cerrados (placas multipozo) y abiertos (sistemas con flujo y salida de medio de cultivo estéril) [8]. En este trabajo se realizaron ensayos preliminares de detección de fluorescencia asociada a GPFmut3 en modelos de biofilm empleando placas multipozo, aunque el tipo de medio escogido (LB) y el procesamiento previo dificultaban la medición en el biofilm formado. Por esta razón, se decidió emplear un sistema cerrado de placas Petri de poliestireno de 6

mm de diámetro. La lógica es el sembrado de una suspensión bacteriana en medio LB y permitir la formación de biofilm en el fondo (Figura 5).

En nuestro modelo, tras el retiro del medio de cultivo y un posterior enjuague con medio mínimo, hemos detectado una formación laminar blanquecina (“evaluación visual”) en el fondo de las placas tras 3, 24 y 48 horas de incubación, aunque de características diferentes según el tiempo de incubación (Tabla 2). A las 3 horas, la formación tiene una apariencia blanquecina y resistente a la fragmentación con medio M9 1X (“evaluación mecánica”- pipeteo). Esta formación es similar en apariencia a la película formada en el interfase aire-líquido en un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* en medio TSB (Soya-Triptona) sobre una placa de poliestireno [49]. Dicha formación aparece desde las 7 o 15 horas luego del sembrado (dependiendo de la concentración bacteriana inicial de siembra) y se caracteriza su evolución durante algunas horas posteriores a su formación, donde se observa que pasan por una etapa de “disrupción-fragmentación” (el seguimiento no excedió las 24 horas desde el inicio del experimento). En el mencionado trabajo, dicha formación es reconocida como biofilm, presumiblemente por adecuarse a la definición establecida (no se dan mas detalles al respecto) [13]. En el presente trabajo, la formación ocurre justo encima de la superficie de poliestireno y dado que a) se demuestra que emite fluorescencia asociada a mKate2, atribuida a las bacterias en él (desmotrado más adelante), y b) estar embebidas en la formación blanquecina (presumiblemente una matriz extracelular, no caracterizada de momento) que ha sido formado tras el inicio del cultivo de *Pseudomonas*, también consideramos a la formación obtenida como **biofilm**, y a las células dentro de la formación, bacterias en **modo de crecimiento biofilm**.

A las 24 y 48 horas, la formación tiene apariencia translúcida y más propensa a fragmentación mediante pipeteo, aunque aún sobre la superficie de poliestireno (Tabla 2). Es probable que en estos puntos de tiempo, el llamado biofilm se encuentre en una etapa conocida como dispersión [78], que, activado por diversos estímulos, permite a las células del biofilm abandonar la estructura para colonizar otros espacios. Con fines comparativos, se decidió incluir cultivos en medio LB en agitación y consideramos a las bacterias de este cultivo como bacterias en **modo de crecimiento planctónico**.

Aunque para los propósitos de este trabajo (detección de la actividad de los promotores considerados, discutido más adelante) no se hizo necesaria una caracterización más profunda de las formaciones denominadas como biofilm, sí se considera necesario detallar dichos atributos con mayor detalle (la densidad de células presentes en dicho biofilm, conocer la composición química de la matriz extracelular, etc.).

9.5 USO DE RpoD COMO PROMOTOR DE NORMALIZACIÓN Y mkate2 COMO GEN REPORTERO

El promotor del gen *RpoD* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ha sido clonado y caracterizado [68]. Experimentos de mapeo por digestión con nucleasa S1 han demostrado que en esta cepa, el gen *RpoD* alcanzaba una mayor expresión durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que otras de las subunidades sigma, RpoS, era la predominante en la fase estacionaria [79]. En otras especies como *Pseudomonas putida*, estudios de transcriptómica encontraron que no existieron

diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero del gen *RpoD* entre cultivos bacterianos en medio sólido comparados con bacterias creciendo en agitación (ambos en medio mínimo) así como en los distintos puntos de tiempo considerados (6, 24 y 48 horas) [80]. Recientemente, se ha encontrado que su expresión es relativamente constante tanto a altas como bajas densidades celulares, siendo considerado como un gen ‘housekeeping’. Esto justificaría su uso como promotor de normalización (control) [62].

El promotor del gen *RpoD* ya ha sido utilizado como promotor de normalización o control para o comparar la actividad de otros promotores como PaQa [9], donde la actividad del promotor *RpoD* fue estimada midiendo la emisión de la fluorescencia de *mkate2*. La actividad de dicho promotor es ligeramente mayor para bacterias creciendo en agitación (modo planctónico) comparado con bacterias creciendo sobre medio sólido, luego de 3 horas de crecimiento. En el presente trabajo, se utilizó la misma secuencia de este constructo (*RpoD-mkate2*) para la normalización de los promotores evaluados. Los ensayos de crecimiento continuo de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM transformada con plásmidos reporteros en placa multipozo (en medio mínimo M9 1X) demuestran que la proporción *mKate2*/ OD570nm es variable durante las primeras horas (con un incremento para los reporteros de CdrA y LasR), para después mostrar una ligera tendencia descendente hacia las 24 horas (Figura 12). La comparación entre diferentes reporteros muestra que podemos utilizar la expresión de *mKate2* para la normalización de las actividades a las 24 horas. Es importante comentar que este crecimiento en placa multipozo toma en cuenta tanto la fluorescencia de las bacterias en el medio y las bacterias en el fondo del pocillo (bacterias planctónicas

como en biofilm). Sin embargo, nos sugiere que la actividad del promotor (en estas condiciones) permanece constante.

La otra condición en la cual se evaluó la emisión fluorescencia del reportero *mKate2* fue en cultivos en medio LB y en agitación: los preinóculos, que sirvieron para la siembra de los cultivos en placa-modo de crecimiento biofilm, y agitación-modo de crecimiento planctónico. Luego de 18 horas de crecimiento, se observó que, para todos los casos, la proporción *mkate2*/OD570 nm fue prácticamente constante (alrededor de 1000). Sin embargo, se observaron algunas muestras en las cuales la actividad del promotor fue significativamente mayor (Figura 14). Se desconoce la razón de esta ocurrencia. Sin embargo, para los experimentos de biofilm en placa (modos de crecimiento), solo se consideraron los preinóculos con proporciones de alrededor de 1000.

Al evaluar la proporción *mkate2*/OD570 en el **modo de crecimiento planctónico** (cultivos en agitación) y el **modo de crecimiento biofilm** (cultivos en placa), se encontró un patrón llamativo. Para las bacterias en modo planctónico (Figura 16A), a las 3 horas de crecimiento, los valores *mkate2*/OD570nm se agruparon en torno a 1000, mientras que a las 24 horas la proporción *mkate2*/OD570nm se distribuyó en torno a dos grupos: uno de 8000, y un segundo grupo con un ratio de alrededor de 900. Lo mismo se aprecia a las 48 horas (grupo en torno a 7000 y otro a 800). La tendencia ligeramente decreciente de los grupos de 1000, 900 y 800 es bastante similar a lo observado en medio mínimo tras 24 horas de crecimiento (Figura 12). La recurrencia de este patrón en ambos medios sugiere que esta dinámica es “estándar” para la actividad del promotor RpoD. Para las bacterias del modo biofilm, observamos una variabilidad similar. La evolución es creciente, partiendo de proporción *mKate2*/OD570nm que se agrupa en torno a

3000 a las 3 horas, con una tendencia creciente a las 24 y 48 horas (Figura 16B). Este incremento en la proporción se debe a una mayor emisión de fluorescencia *mkate2* de bacterias en modo biofilm. Esta fluorescencia no se debe a alguna sustancia extracelular secretada por el biofilm de *Pseudomonas*, dado que las bacterias transformadas con el plásmido pUCP20 muestran una fluorescencia *mkate2* residual. Una posible explicación para estos resultados radica en un cambio considerable en el metabolismo de las bacterias creciendo en el denominado modo biofilm. Es relevante señalar que estudios de transcriptómica de biofilms de *Pseudomonas* que incluyen observaciones a las 24 y/o 48 horas de crecimiento, no reportan a RpoD como un gen cuya expresión se ve alterada, ya sea que el biofilm se esté desarrollando en medio mínimo [80], [81] o en medio LB [82]. Se podrá realizar una comparación más completa de los resultados obtenidos en este trabajo con lo reportado para distintos modelos de biofilm luego de una mejor caracterización de las formaciones encontradas.

Al comparar las proporciones $mKate2/OD570$ de ambos modos de crecimiento, se observa que las proporciones altas que aparecen a las 24 y 48 horas para las bacterias del modo planctónico (Figura 16A) son similares a las obtenidas para el modo biofilm (Figura 16B). La formación de agregados o *flocs* en cultivos en agitación, que son equivalentes a las biopelículas aunque en suspensión, explicaría estos valores encontrados en cultivos con el modo planctónico [83].

Dada la variabilidad inesperada de la fluorescencia *mKate2* en cultivos en medio LB (y que amerita estudios adicionales), se optó por normalizar la actividad de los promotores en cuestión (expresión de GFP) en función a la turbidez de la suspensión (medido como absorbancia a 570 nm). Este tipo de normalización se ha realizado en otros trabajos con genes reporteros [77], [84]. Los resultados

analizados de esta manera se presentan en la sección 8.5 y se discuten en la sección 9.7. No deja de ser llamativo que en condiciones de cultivo en medio LB y agitación, la normalización de la emisión a 520 nm (asociada con GFP) respecto a mKate2 y respecto a OD570nm muestra una excelente correlación (Figura 15B).

9.6 CONTRIBUCIÓN INTRÍNSECA A LA FLUORESCENCIA

La “contribución intrínseca” de emisión de fluorescencia a 520 nm de la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM sin transformar y transformada con el plásmido vacío pUCP20 (controles) también fue observada en los cultivos en medio LB (datos no mostrados). Para determinar la contribución “intrínseca” a la fluorescencia de las bacterias transformadas con los plásmidos reporteros, se decidió realizar una curva de correlación entre la emisión de fluorescencia a 520 nm versus la turbidez (medido como absorbancia 570 nm), tanto para bacterias de cultivos en agitación como para bacterias de cultivos en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformados con el plásmido “vacío” pUCP20. Esta curva fue realizada para cada punto de tiempo considerado en nuestros ensayos (3, 24 y 48 horas) (Figura 34 - ANEXO 13.6). Es interesante observar que las pendientes de las curvas varían: en los cultivos en agitación (Figura 34A), existe una tendencia creciente a la fluorescencia intrínseca, mientras que en las bacterias en biofilms (Figura 34B) hay un aparente crecimiento (de 3 a 24 horas) y un posterior decaimiento (a las 48 horas). Esto reflejaría una respuesta de la bacteria ante las condiciones del medio (pioverdina es un sideróforo), aunque una discusión profunda escapa de los objetivos de esta tesis.

9.7 ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES

a. Promotor CdrA.

Los reporteros presentados en este artículo están basados en un plásmido pCdrA-GFPc, que expresa la Proteína Fluorescente Verde variante mut3 (GFPmut3) en función a los niveles de c-di-GMP presentes en el interior de *P. aeruginosa* PAO1 [77]. Este mensajero intracelular es parte importante de la cascada de señalización que conduce a la expresión de genes relacionados con el estilo de vida biofilm [42]. La concentración intracelular de c-di-GMP es mayor en las bacterias provenientes de biofilms que bacterias planctónicas [85]. Dado que el c-di-GMP es encargado de coordinar la expresión de una serie de genes importantes en el desarrollo de los biofilms [86], se utilizó el reportero **pCdrA_GFP-RpoD_mKate2** para evaluar los niveles de c-di-GMP tanto en bacterias en modo planctónico (cultivos en agitación) como en bacterias de Biofilm (cultivos en placa).

Los resultados (Figura 17) muestran niveles de actividad de promotor CdrA (y por tanto niveles de c-di-GMP) que son ligeramente mayores para el modo de crecimiento biofilm a las 3 horas y similar para ambos modos a las 24 horas, aunque siguen una tendencia similar (una caída a las 3 horas y un incremento a las 24 horas). A las 24 horas, dado que los cultivos en agitación se llevan a cabo en medio LB, no se puede descartar que los altos niveles de c-di-GMP presentes en estos se deban a que las bacterias se encuentran formando agregados (flocs) en la columna de líquido durante la agitación, que se ha demostrado se encuentran

presentes en cultivos tanto en etapas exponenciales como en fase estacionaria de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en medio LB [83]. Estos agregados muestran patrones fenotípicos similares a las bacterias dentro del biofilm asociados a superficies [87], por lo que es posible que los niveles de este segundo mensajero c-di-GMP se encuentren elevados.

A las 48 horas, encontramos una caída dramática en la cantidad de fluorescencia GFP de las bacterias provenientes de biofilm respecto a las que se encuentran en agitación. Esta caída no se debe a una pérdida del plásmido debido a que la señal de *mkate2* sigue alta en estos cultivos. Una posible explicación es que, dada la edad el cultivo, el biofilm se encuentre en etapa de dispersión, que podría estar siendo inducida por las condiciones nutricionales en el medio (recordemos que es un cultivo de tipo *batch*, sin recambio de medio y con acumulación de metabolitos presentes) [78].

b. Promotor LasR.

Nuestros resultados muestran que hay actividad similar del promotor de LasR en cultivos en agitación y en biofilm en placa para cada punto de tiempo considerado (Figura 18). Se aprecia una tendencia descendente, con una mayor actividad a las 0 horas, seguida de una caída a las 3 horas, con valores más o menos constante a las 24 y 48 horas. Al respecto, la literatura documenta resultados de diversa índole. Un primer reporte muestra que la actividad de dicho promotor es constante a lo largo del crecimiento (en medio LB y en agitación) y durante la fase estacionaria en la cepa PAO1, en la cual se utilizó una fusión transcripcional de un fragmento conteniendo al promotor de LasR con el reportero beta-galactosidasa [63]. Este

reporte entra en conflicto con lo mostrado años después para la actividad de este mismo promotor, en donde usando un constructo similar (ubicado en un plásmido), se encuentra que la actividad de dicho promotor se incrementa a partir de la segunda mitad de la fase exponencial y a lo largo de toda la fase estacionaria (cultivos creciendo en medio PTSB) [38], [88], mientras que para fusiones transcripcionales ubicados en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* (no en plásmido y en medio LB) también se observa dicho patrón [62]. Nuestros resultados en la cepa ATCC® 10145TM para bacterias en modo planctónico muestran una tendencia similar a la del primer reporte de la actividad el promotor LasR, que coincidentemente fue llevado a cabo en medio LB. Respecto a la expresión de dicho gen en modelos de biofilm, los artículos revisados no reportan a LasR como uno de los genes cuya actividad se ve regulada tanto en modelos de *Pseudomonas aeruginosa* [81], [82], [89] como *Pseudomonas putida* [80], lo que se asemeja a lo encontrado nuestro modelo en placa para las 24 y 48 horas.

c. Promotor Flg.

Los resultados para este promotor evidencian que la actividad del promotor del operón FlgBCDE es ligeramente mayor en el modo biofilm a las 3 horas. Esto va acorde con la importancia del aparato flagelar en los primeros estadios de biofilm. Posterior a esto, la actividad en cultivos en agitación (modo planctónico) se incrementa en función al tiempo respecto al modo biofilm, primero levemente a las 24 horas, y dramáticamente a las 48 horas (Figura 19). Esto tiene sentido debido a que el aparato flagelar es especialmente importante para la forma de vida planctónica. Aunque se ha demostrado la importancia del flagelo en los primeros

estadios del desarrollo del biofilm, los resultados indican que la expresión de genes del operón FlgBCDE estaría reducida en biofilms maduros. Por ejemplo, el ARNm de dos de los genes estructurales del operón (*flgD* y *flgE*) se encuentran sub-regulados en biofilms de estadio tardío [89], lo que estaría en concordancia con los resultados encontrados.

d. Promotor Fim.

El operón FimU-PilVXYZW1W2 codifica las pilinas “menores”, importantes para dirigir el ensamblaje del T4P [90]. Dentro de la multitud de funciones que cumple, también participa como transductor mecánico tras la asociación con superficies [9]. Dado esto, es de esperar que la actividad de este promotor se encuentre elevada en las bacterias del modo de crecimiento biofilm. Los resultados de actividad del promotor Fim (Figura 20) muestran que su actividad es significativamente mayor en bacterias en modo de crecimiento biofilm comparado con bacterias en agitación (modo planctónico) a las 48 horas. Estos resultados están en concordancia con uno de los primeros estudios de transcriptómica (enfoque de microchip) en modelos de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, en el cual tras 8 horas de crecimiento se encuentra que el ARN mensajero de PilY2 (uno de los genes estructurales del operón FimUPilVXYZW1W2) se encuentra sobre expresado en comparación con cultivos en agitación [82].

e. Promotor PaQa.

El operón PaQa codifica componentes del sistema de secreción de tipo III. Se ha encontrado que la actividad del promotor PaQa incrementa su expresión unas 3 veces en bacterias que crecen en medio sólido comparado con bacterias que crecen en agitación luego de tres horas de crecimiento [9]. Los resultados obtenidos luego de tres horas muestran que la actividad del promotor es ligeramente mayor en el modo de crecimiento biofilm (diferencias significativas), lo que estaría en concordancia con lo antes comentado (Figura 21). Posterior a esto, la actividad de PaQa muestra un patrón oscilante de la actividad el promotor en función al tiempo, sin diferencias notorias a las 24 y 48 horas. Es posible que estas diferencias no se aprecien debido a la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas en los biofilms, donde puede haber grupos de bacterias mostrando distintos patrones de actividad del promotor.

f. Promotor Pel.

Nuestros resultados muestran que la actividad del promotor Pel de bacterias en modo biofilm y modo planctónico tiene un patrón oscilante. Aunque existen algunas diferencias a las 3 y 48 horas (donde es mayor la actividad de las bacterias en modo biofilm), la desviación de algunos puntos respecto a la media es amplia y no permiten establecer diferencias significativas en los puntos mencionados (Figura 22). Se ha reportado previamente que la actividad del promotor del operón *Pel* (determinada con el gen reportero de la beta galactosidasa) se incrementa en un modelo de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 creciendo en medio sólido hasta 4 días después de la incubación [91]. Nuestros resultados también son coherentes con los obtenidos en experimentos de transcriptómica en la cual se ha

encontrado que el ARN mensajero de *PelA* y *PelB* se encuentran sobre expresados en biofilms de la misma cepa (PA14) comparado con cultivos en agitación (24 y 48 horas) [81].

9.8 COMENTARIOS ADICIONALES

En el presente trabajo también se han realizado experimentos de formación de biofilm de *P. aeruginosa* en placas Petri utilizando medio M9 1X suplementado con glucosa. En la literatura, el biofilm formado en estos medios está generalmente bien caracterizado a nivel microscópico [92]. Tras 24 horas de crecimiento, el biofilm formado en dicho medio en placas Petri de poliestireno apareció como una estructura laminar delgada incolora (evaluación visual) y muy poco consistente (evaluación mecánica-pipeteo) en comparación con el obtenido en medio LB (datos no mostrados). Dada estas características, se hizo complicado el procesamiento de biofilms en M9 1X.

Se han reportado variaciones en la actividad de promotores relacionados al metabolismo de c-di-GMP (contenidos en plásmidos reporteros) al comparar crecimiento de *P. aeruginosa* en M9 1X y medio LB [84]. Esto nos induce a especular que se podrían encontrar diferencias si se determinara la actividad de promotores en biofilms formados en el medio mínimo. Sin embargo, no se han podido recoger tales datos debido a la dificultad de estudios de estos biofilms, según lo expresado en el párrafo anterior.

Los reporteros aquí presentados muestran diferencias en la actividad de los promotores respecto al tiempo para ambos modos de crecimiento, al menos en algún punto, excepto para el promotor LasR. Por lo tanto, podemos concluir que

los promotores ubicados en los reporteros correspondientes están experimentando eventos de regulación asociados de acuerdo a si crecen en biofilm o en modo planctónico. El hecho de no haberse encontrado diferencias para LasR (Figura 17), podría implicar que la regulación de ese promotor no es activa en el plásmido utilizado (aunque puede seguir funcionando bien en el cromosoma). Al respecto, se han documentado comportamientos no esperados de constructos en diversos modelos biológicos, siendo una de las explicaciones que el constructo artificial (promotor-gen reportero) está ubicado en un contexto “no natural” (secuencias de nucleótidos del plásmido) que suponen, por ejemplo, interacciones indeseadas de secuencias del constructo con proteínas o secuencias de la bacteria, causando alteración en la regulación de dicho promotor [93].

Se podría explorar la posibilidad de reemplazar los RBS nativos de los promotores aquí utilizados por otro “optimizado” (como el caso del reportero CdrA), puntualmente en los promotores ya caracterizados (Pel y Las) pues se conocen detalles como el sitio de inicio de transcripción y las secuencias reguladoras [38], [72]. En primera instancia sería necesario evaluar a) los niveles de expresión y b) los patrones de expresión y compararlos con los obtenidos en este trabajo para los RBS nativos. En caso de descartar efectos en los patrones de expresión, el reportero podría ser utilizado para ensayos en medios menos “ricos” que el LB, y que permitan una evaluación directa (sin procesamiento de descarte del medio LB, que interfiere en las mediciones de fluorescencia de GFPmut3). Es importante aclarar que estos experimentos suponen una pregunta científica diferente, con implicancias que van mas allá de los objetivos de este proyecto.

La técnica de medición de actividad de promotores presentada aquí no toma en cuenta la heterogeneidad inherente en las poblaciones bacterianas tanto en el

cultivo en agitación como las bacterias provenientes del biofilm [94]. Dentro del biofilm, puede existir una heterogeneidad considerable en los patrones de expresión de genes incluso a distancia de micras o a nivel de células individuales [95], por lo que podemos considerar los resultados de emisión de fluorescencia obtenidos como un “promedio”. El estudio de esta diversidad solo es posible utilizando técnicas más sensibles a nivel microscópico. Por otro lado, en nuestro procedimiento también existe la posibilidad de “contaminación” de bacterias del sobrenadante, situación que se buscó disminuir realizando enjuagues previos al procesamiento de la muestra adherida al biofilm (Figura 5B). El empleo de técnicas de mejor resolución como la microscopia de fluorescencia con suficiente resolución ayudaría a evaluar la fluorescencia por célula y obtener no solo un valor promedio sino también una distribución de frecuencias de la actividad de los promotores en una población heterogénea de bacterias.

A pesar de estas limitaciones, el modelo experimental aquí ensayado permitirá evaluar el efecto de diversos estímulos y vincularlo rápidamente a la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, el estímulo mecánico con vibraciones ya ha sido evaluado en un modelo de biofilm con placas Petri de 3 mm de diámetro [96], confirmándose un efecto a nivel de biomasa, aunque su efecto en la actividad de los promotores como una función del tiempo (continuo) no ha sido documentada.

Los plásmidos reporteros también pueden ser utilizados para entender mecanismos moleculares en distintas etapas del desarrollo del biofilm. Esto es posible debido a que la fluorescencia emitida y sus cambios pueden ser monitoreados en tiempo real. Ejemplos de este uso son el uso de reporteros con fusiones transcripcionales entre el promotor PaQa unido al reportero YFP, cuya fluorescencia sirvió como “indicador” del contacto de *Pseudomonas aeruginosa*

con superficies y cuyas respuestas a diversas variables (mutación en genes reguladores en porciones anteriores de la vía de señalización), sirvieron para plantear un modelo de mecanosensación y mecanotransducción de formación de biofilm [9]. Recientemente, se ha reportado la generación de una biblioteca de al menos 40 reporteros con fusiones entre promotores (de genes asociados al metabolismo de c-di-GMP) y GFP, y que permitirán el estudio de la regulación de los genes correspondientes [84]. De manera similar, los plásmidos reporteros construidos en este trabajo suman al repertorio de herramientas para elucidar los mecanismos moleculares de la formación de los biofilms.

X. CONCLUSIONES

- *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM pudo ser transformada con los plásmidos reporteros aquí diseñados y fue posible detectar la expresión de las proteínas reporteras GFPmut3 y mKate2 a partir de sus espectros de emisión.
- Los plásmidos reporteros aquí diseñados no afectan la viabilidad de un cultivo de *P. aeruginosa* ATCC® 10145TM.
- La expresión de las proteínas reporteras (GFPmut3 y mKate2) a lo largo de 24 horas registradas como Emisión de Fluorescencia/OD570nm demuestra que los plásmidos reporteros son estables en los cultivos ensayados.
- Dos de los promotores evaluados (Flg y Fim), presentan actividad marcadamente diferencial entre ambos modos de crecimiento. Estos patrones se ajustan a lo esperado para cada modo de crecimiento (Flg: creciente en modo planctónico y bajo-constante en modo biofilm, viceversa para Fim) y son coherentes con la expresión de los genes correspondientes a los operones reportados en la literatura.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización mas detallada de las formaciones (aquí nominadas como biofilm) obtenidas en placa luego de los tiempo de incubación considerados (3, 24 y 48 horas) Esta información permitiría evaluar la representatividad de los resultados aquí obtenidos como propios de un modelo de biofilm .
- Validar los resultados obtenidos para la actividad de los promotores aquí evaluados utilizando otros métodos de detección de fluorescencia a nivel de células individuales, como la microscopia de fluorescencia.
- Otra posibilidad es usar un gen reportero fluorescente que, a diferencia de GFPmut3, posea espectros de emisión y excitación más alejados del del medio LB y del de la “fluorescencia intrínseca” emitida por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™.
- Adaptar el protocolo para ensayos en placas multipozo en medio mínimo (de la misma naturaleza, poliestireno), considerando incubaciones más largas que permitan detectar la emisión de fluorescencia. La ventaja de usar placas multipozo es la mayor cantidad de replicas (y promotores) que se podrían procesar de manera simultánea.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] H. Kanematsu, D. M. Barry, H. Kanematsu, and D. M. Barry, “Biofilm Problems and Environments,” in *Formation and Control of Biofilm in Various Environments*, Springer Singapore, 2020, pp. 173–200. doi: 10.1007/978-981-15-2240-6_8.
- [2] T. L. Skovhus, D. L. Enning, and J. S., *Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry*. Taylor & Francis, 2017. doi: 10.1201/9781315157818.
- [3] E. Heitz, H.-C. Flemming, and W. Sand, *Microbially Influenced Corrosion of Materials Scientific and Engineering Aspects*. Springer Berlin, 2013.
- [4] M. P. Schultz, J. A. Bendick, E. R. Holm, and W. M. Hertel, “Economic impact of biofouling on a naval surface ship,” *Biofouling*, vol. 27, no. 1, pp. 87–98, Jan. 2011, doi: 10.1080/08927014.2010.542809.
- [5] J. A. Fernandes *et al.*, “Costs and benefits to European shipping of ballast-water and hull-fouling treatment: Impacts of native and non-indigenous species,” *Mar. Policy*, vol. 64, pp. 148–155, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.marpol.2015.11.015.
- [6] N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, and O. Ciofu, “Antibiotic resistance of bacterial biofilms,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 35, no. 4, pp. 322–332, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.12.011.
- [7] S. Moreau-Marquis, B. A. Stanton, and G. A. O’Toole, “Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway,” *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 21, no. 4. NIH Public Access, pp. 595–

- 599, Aug. 2008. doi: 10.1016/j.pupt.2007.12.001.
- [8] T. Coenye and H. J. Nelis, “In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 83, no. 2, pp. 89–105, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.MIMET.2010.08.018.
- [9] A. Persat, Y. F. Inclan, J. N. Engel, H. A. Stone, and Z. Gitai, “Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 24, pp. 7563–7568, Jun. 2015, doi: 10.1073/pnas.1502025112.
- [10] B. J. Laventie *et al.*, “A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*,” *Cell Host Microbe*, vol. 25, no. 1, pp. 140-152.e6, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.chom.2018.11.008.
- [11] C. Y. Chang, “Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. JAN, p. 2671, Jan. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.02671.
- [12] T. H. Jakobsen, T. Tolker-Nielsen, and M. Givskov, “Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 9. MDPI AG, Sep. 2017. doi: 10.3390/ijms18091970.
- [13] M. Vert *et al.*, “Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*,” *Pure Appl. Chem*, vol. 84, no. 2, pp. 377–410, 2012, doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- [14] H. C. Flemming and S. Wuertz, “Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms,” *Nat. Rev. Microbiol.* 2019 174, vol. 17, no. 4, pp. 247–260, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0158-9.

- [15] R. M. Donlan, "Biofilms: Microbial life on surfaces," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), pp. 881–890, 2002. doi: 10.3201/eid0809.020063.
- [16] A. K. Hawley *et al.*, "Diverse Marinimicrobia bacteria may mediate coupled biogeochemical cycles along eco-thermodynamic gradients," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01376-9.
- [17] A. Hussain, A. Z. Ansari, and R. Ahmad, "Microbial biofilms: Human mucosa and intestinal microbiota," *New Futur. Dev. Microb. Biotechnol. Bioeng. Microb. Biofilms Curr. Res. Futur. Trends Microb. Biofilms*, pp. 47–60, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-444-64279-0.00004-9.
- [18] H. C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, and S. Kjelleberg, "Biofilms: An emergent form of bacterial life," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 563–575, Sep. 2016. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- [19] D. McDougald *et al.*, "Pseudomonas aeruginosa: A Model for Biofilm Formation," in *Pseudomonas*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 215–253. doi: 10.1002/9783527622009.ch9.
- [20] L. R. Mulcahy, V. M. Isabella, and K. Lewis, "Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease," *Microb. Ecol.*, vol. 68, no. 1, p. 1, 2014, doi: 10.1007/S00248-013-0297-X.
- [21] B. H. A. Rehm, *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. John Wiley and Sons, 2008. doi: 10.1002/9783527622009.
- [22] E. Bester, G. Wolfaardt, L. Joubert, K. Garny, and S. Saftic, "Planktonic-cell

- yield of a pseudomonad biofilm,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 12, pp. 7792–7798, Dec. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.12.7792-7798.2005.
- [23] A. Y. Bhagirath, Y. Li, D. Somayajula, M. Dadashi, S. Badr, and K. Duan, “Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection,” *BMC Pulm. Med.*, vol. 16, no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12890-016-0339-5.
- [24] V. Bonifay *et al.*, “Metabolomic and metagenomic analysis of two crude oil production pipelines experiencing differential rates of corrosion,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. JAN, Jan. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00099.
- [25] D. H. Leary *et al.*, “Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of marine biofilm communities,” *Biofouling*, vol. 30, no. 10, pp. 1211–1223, Nov. 2014, doi: 10.1080/08927014.2014.977267.
- [26] F. Baghal Asghari, M. Nikaeen, and H. Mirhendi, “Rapid monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: a key priority in prevention of nosocomial infection,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 343, no. 1, pp. 77–81, Jun. 2013, doi: 10.1111/1574-6968.12132.
- [27] A. Grace, R. Sahu, D. R. Owen, and V. A. Dennis, “*Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review,” *Front. Microbiol.*, vol. 13, p. 4122, Oct. 2022, doi: 10.3389/FMICB.2022.1023523/BIBTEX.
- [28] P. Sharifian, S. Yaslianifard, P. Fallah, S. Aynesazi, M. Bakhtiyari, and M. Mohammadzadeh, “Investigating the Effect of Nano-Curcumin on the Expression of Biofilm Regulatory Genes of *Pseudomonas aeruginosa*,” *Infect. Drug Resist.*, vol. 13, pp. 2477–2484, 2020, doi: 10.2147/IDR.S263387.

- [29] E. J. Jeyaraj, S. Nathan, Y. Y. Lim, and W. S. Choo, “Antibiofilm properties of *Clitoria ternatea* flower anthocyanin-rich fraction towards *Pseudomonas aeruginosa*,” *Access Microbiol.*, vol. 4, no. 4, p. 343, Apr. 2022, doi: 10.1099/ACMI.0.000343.
- [30] A. Persat *et al.*, “The mechanical world of bacteria,” *Cell*, vol. 161, no. 5. Cell Press, pp. 988–997, May 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.005.
- [31] Y. F. Dufrêne and A. Persat, “Mechanobiology: how bacteria sense and respond to forces,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18, no. 4. Nature Research, pp. 227–240, Apr. 2020. doi: 10.1038/s41579-019-0314-2.
- [32] B. J. Laventie and U. Jenal, “Surface Sensing and Adaptation in Bacteria,” <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-012120-063427>, vol. 74, pp. 735–760, Sep. 2020, doi: 10.1146/ANNUREV-MICRO-012120-063427.
- [33] A. Siryaporn, S. L. Kuchma, G. A. O’Toole, Z. Gitai, and F. M. Ausubel, “Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 47, pp. 16860–16865, Nov. 2014, doi: 10.1073/pnas.1415712111.
- [34] S. A. Beatson, C. B. Whitchurch, J. L. Sargent, R. C. Levesque, and J. S. Mattick, “Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 13, pp. 3605–3613, 2002, doi: 10.1128/JB.184.13.3605-3613.2002.
- [35] M. C. Wolfgang, V. T. Lee, M. E. Gilmore, and S. Lory, “Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway,” *Dev. Cell*, vol. 4, no. 2, pp. 253–263, Feb. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00019-4.

- [36] C. A. Rodesney *et al.*, “Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 23, pp. 5906–5911, Jun. 2017, doi: 10.1073/pnas.1703255114.
- [37] C. K. Lee *et al.*, “Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 17, pp. 4471–4476, Apr. 2018, doi: 10.1073/pnas.1720071115.
- [38] A. M. Albus, E. C. Pesci, L. J. Runyen-Janecky, S. E. H. West, and B. H. Iglewski, “Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 12, pp. 3928–3935, 1997, doi: 10.1128/jb.179.12.3928-3935.1997.
- [39] K. B. Gilbert, T. H. Kim, R. Gupta, E. P. Greenberg, and M. Schuster, “Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR,” *Mol. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1072–1085, Sep. 2009, doi: 10.1111/J.1365-2958.2009.06832.X.
- [40] N. Dasgupta *et al.*, “A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 809–824, Nov. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2958.2003.03740.X.
- [41] N. Dasgupta, E. P. Ferrell, K. J. Kanack, S. E. H. West, and R. Ramphal, “fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ_{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 19, pp. 5240–5250, Oct. 2002, doi: 10.1128/JB.184.19.5240-5250.2002.
- [42] R. Hengge, “Principles of c-di-GMP signalling in bacteria,” *Nature Reviews*

- Microbiology*, vol. 7, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 263–273, 2009. doi: 10.1038/nrmicro2109.
- [43] K. M. Colvin *et al.*, “The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 1, Jan. 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1001264.
- [44] J. W. Hickman and C. S. Harwood, “Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor,” *Mol. Microbiol.*, vol. 69, no. 2, p. 376, 2008, doi: 10.1111/J.1365-2958.2008.06281.X.
- [45] B. R. Borlee, A. D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D. J. Wozniak, and M. R. Parsek, “*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix,” *Mol. Microbiol.*, vol. 75, no. 4, pp. 827–842, Feb. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2958.2009.06991.X.
- [46] “KEGG PATHWAY: map02025.”
<https://www.genome.jp/entry/pathway+map02025> (accessed Nov. 23, 2022).
- [47] G.-A. Junter, P. Thébault, and L. Lebrun, “Polysaccharide-based antibiofilm surfaces,” *Acta Biomater.*, vol. 30, pp. 13–25, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2015.11.010.
- [48] B. M. Coffey and G. G. Anderson, “Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate,” in *Pseudomonas Methods and Protocols*, vol. 1149, A. Filloux and J. L. Ramos, Eds. New York, NY: Springer, 2014, pp. 633–640. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0.
- [49] V. Angarano *et al.*, “A Reproducible Method for Growing Biofilms on Polystyrene Surfaces: Biomass and Bacterial Viability Evolution of

- Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus epidermidis*,” *Appl. Sci.* 2020, Vol. 10, Page 4544, vol. 10, no. 13, p. 4544, Jun. 2020, doi: 10.3390/APP10134544.
- [50] R. Javaherdashti, C. Nwaoha, and H. Tan, *Corrosion and Materials in the Oil and Gas Industries*, 1st ed. CRC Press, 2013.
- [51] J. C. Carmen *et al.*, “Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics,” *Am. J. Infect. Control*, vol. 33, no. 2, pp. 78–82, 2005, doi: 10.1016/j.ajic.2004.08.002.
- [52] A. Argyraki *et al.*, “UV light assisted antibiotics for eradication of in vitro biofilms,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34340-8.
- [53] S. T. Sultana, J. T. Babauta, and H. Beyenal, “Electrochemical biofilm control: A review,” *Biofouling*, vol. 31, no. 9, pp. 745–758, 2015, doi: 10.1080/08927014.2015.1105222.
- [54] K. Bruellhoff, J. Fiedler, M. Möller, J. Groll, and R. E. Brenner, “Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces,” *International Journal of Artificial Organs*, vol. 33, no. 9. SAGE PublicationsSage UK: London, England, pp. 646–653, Sep. 2010. doi: 10.1177/039139881003300910.
- [55] A. Ghosh, N. Jayaraman, and D. Chatterji, “Small-Molecule Inhibition of Bacterial Biofilm,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 7, pp. 3108–3115, Feb. 2020, doi: 10.1021/ACSOMEGA.9B03695/ASSET/IMAGES/LARGE/AO9B03695_0008.JPEG.
- [56] Z. Kazan *et al.*, “Effective prevention of microbial biofilm formation on medical devices by low-energy surface acoustic waves,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 12, pp. 4144–4152, Dec. 2006, doi: 10.1128/AAC.00418-06.

- [57] M. Kopel, E. Degtyar, and E. Banin, “Surface acoustic waves increase the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antibiotic treatment,” *Biofouling*, vol. 27, no. 7, pp. 701–711, 2011, doi: 10.1080/08927014.2011.597051.
- [58] L. D. Bharatula, E. Marsili, S. A. Rice, and J. J. Kwan, “Influence of High Intensity Focused Ultrasound on the Microstructure and c-di-GMP Signaling of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 3198, Dec. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.599407.
- [59] I. Serganova and R. G. Blasberg, “Molecular Imaging with Reporter Genes: Has Its Promise Been Delivered?,” *J. Nucl. Med.*, vol. 60, no. 12, pp. 1665–1681, Dec. 2019, doi: 10.2967/JNUMED.118.220004.
- [60] T. Rasamiravaka, Q. Labtani, P. Duez, and M. El Jaziri, “The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/759348.
- [61] H. de Jong and J. Geiselmann, “Fluorescent reporter genes and the analysis of bacterial regulatory networks,” in *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 2015, vol. 7699, pp. 27–50. doi: 10.1007/978-3-319-27656-4_2.
- [62] P. Jayakumar, S. A. Thomas, S. P. Brown, and R. Kümmerli, “*Pseudomonas aeruginosa* reaches collective decisions via transient segregation of quorum sensing activities across cells,” *bioRxiv*, p. 2021.03.22.436499, Mar. 2021, doi: 10.1101/2021.03.22.436499.
- [63] A. Latifi, M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski, “A hierarchical

- quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS,” *Mol. Microbiol.*, vol. 21, no. 6, pp. 1137–1146, Sep. 1996, doi: 10.1046/J.1365-2958.1996.00063.X.
- [64] N. Weiland-Bräuer, N. Pinnow, and R. A. Schmitz, “Novel reporter for identification of interference with Acyl homoserine lactone and autoinducer-2 quorum sensing,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 4, pp. 1477–1489, Dec. 2015, doi: 10.1128/AEM.03290-14/SUPPL_FILE/ZAM999116038SO1.PDF.
- [65] J. B. Andersen, C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjørn, M. Givskov, and S. Molin, “New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 6, p. 2240, 1998, doi: 10.1128/AEM.64.6.2240-2246.1998.
- [66] D. Shcherbo *et al.*, “Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues,” *Biochem. J.*, vol. 418, no. 3, pp. 567–574, Mar. 2009, doi: 10.1042/BJ20081949.
- [67] A. H. Poulsen *et al.*, “Development of bio-analytical techniques to assess the potential human health impacts of recycled water. Part A: Literature review of in vitro bioassays for assessing adverse effects of trace organic pollutants in water,” no. January, pp. 12–14, 2013.
- [68] M. Fujita, K. Tanaka, H. Takahashi, and A. Amemura, “Organization and transcription of the principal sigma gene (*rpoDA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: involvement of a sigma 32-like RNA polymerase in *rpoDA* gene expression,” *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 4, pp. 1069–1074, 1993, doi: 10.1128/JB.175.4.1069-1074.1993.

- [69] H. Savli, A. Karadenizli, F. Kolayli, S. Gundes, U. Ozbek, and H. Vahaboglu, “Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 403–408, May 2003, doi: 10.1099/JMM.0.05132-0/CITE/REFWORKS.
- [70] H. Aramaki and M. Fujita, “In vitro transcription analysis of rpoD in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 180, no. 2, pp. 311–316, Nov. 1999, doi: 10.1111/J.1574-6968.1999.TB08811.X.
- [71] A. Vigneron, E. B. Alsop, B. Chambers, B. P. Lomans, I. M. Head, and N. Tsesmetzis, “Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 8, pp. 2545–2554, Apr. 2016, doi: 10.1128/AEM.03842-15.
- [72] C. Baraquet, K. Murakami, M. R. Parsek, and C. S. Harwood, “The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 15, pp. 7207–7218, 2012, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>.
- [73] G. L. Winsor, E. J. Griffiths, R. Lo, B. K. Dhillon, J. A. Shay, and F. S. L. Brinkman, “Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D646–D653, 2016, doi: 10.1093/nar/gkv1227.
- [74] T. J. Rudge *et al.*, “Characterization of Intrinsic Properties of Promoters,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 89–98, Jan. 2016, doi: 10.1021/acssynbio.5b00116.
- [75] K. H. Choi, A. Kumar, and H. P. Schweizer, “A 10-min method for preparation

- of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 64, no. 3, pp. 391–397, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.001.
- [76] I. Albesa, L. I. Barberis, M. C. Pajaro, and A. J. Eraso, “Pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* in synthetic media with various sources of nitrogen,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 131, no. 12, pp. 3251–3254, Dec. 1985, doi: 10.1099/00221287-131-12-3251/CITE/REFWORKS.
- [77] M. T. Rybtke *et al.*, “Fluorescence-based reporter for gauging cyclic Di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 15, pp. 5060–5069, Aug. 2012, doi: 10.1128/AEM.00414-12.
- [78] S. K. Kim and J. H. Lee, “Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Microbiol. 2016 542*, vol. 54, no. 2, pp. 71–85, Feb. 2016, doi: 10.1007/S12275-016-5528-7.
- [79] M. Fujita, K. Tanaka, H. Takahashi, and A. Amemural, “Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase,” *Mol. Microbiol.*, vol. 13, no. 6, pp. 1071–1077, Sep. 1994, doi: 10.1111/J.1365-2958.1994.TB00498.X.
- [80] Á. Hueso-Gil, B. Calles, G. A. O’Toole, and V. de Lorenzo, “Gross transcriptomic analysis of *Pseudomonas putida* for diagnosing environmental shifts,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 263–273, Jan. 2020, doi: 10.1111/1751-7915.13404.
- [81] A. Dötsch *et al.*, “The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2,

- p. e31092, Feb. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0031092.
- [82] R. D. Waite, A. Papakonstantinou, E. Littler, and M. A. Curtis, “Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: Comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms,” *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 18, pp. 6571–6576, Sep. 2005, doi: 10.1128/JB.187.18.6571-6576.2005/SUPPL_FILE/PA_BIOFILM_NOTE___SUPPLEMENTARY_TABLES.PDF.
- [83] G. Melaugh *et al.*, “Distinct types of multicellular aggregates in *Pseudomonas aeruginosa* liquid cultures,” *bioRxiv*, p. 2022.05.18.492589, May 2022, doi: 10.1101/2022.05.18.492589.
- [84] D. Liu, D. Wang, Q. Wei, Y. Zhang, H. Yu, and L. Z. Ma, “A Library of Promoter-gfp Fusion Reporters for Studying Systematic Expression Pattern of Cyclic-di-GMP Metabolism-Related Genes in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 89, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1128/AEM.01891-22.
- [85] A. Basu Roy and K. Sauer, “Diguanylate cyclase NicD-based signalling mechanism of nutrient-induced dispersion by *Pseudomonas aeruginosa*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 94, no. 4, pp. 771–793, Nov. 2014, doi: 10.1111/MMI.12802/SUPPINFO.
- [86] U. Römling, M. Y. Galperin, and M. Gomelsky, “Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–52, Mar. 2013, doi: 10.1128/MMBR.00043-12/ASSET/C8F4F76D-3A67-424B-8B40-F84A57C6E435/ASSETS/GRAPHIC/ZMR9990923190014.JPEG.

- [87] M. Alhede *et al.*, “Phenotypes of Non-Attached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates Resemble Surface Attached Biofilm,” *PLoS One*, vol. 6, no. 11, p. 27943, Nov. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0027943.
- [88] E. C. Pesci, J. P. Pearson, P. C. Seed, and B. H. Iglewski, “Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 10, pp. 3127–3132, 1997, doi: 10.1128/JB.179.10.3127-3132.1997.
- [89] M. Whiteley *et al.*, “Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms,” *Nat. 2001 4136858*, vol. 413, no. 6858, pp. 860–864, Oct. 2001, doi: 10.1038/35101627.
- [90] Y. Nguyen *et al.*, “*Pseudomonas aeruginosa* Minor Pilins Prime Type IVa Pilus Assembly and Promote Surface Display of the PilY1 Adhesin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, p. 601, Jan. 2015, doi: 10.1074/JBC.M114.616904.
- [91] Y. Sakuragi and R. Kolter, “Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 14, pp. 5383–5386, Jul. 2007, doi: 10.1128/JB.00137-07/ASSET/43810652-7339-45B9-A75F-6A6BC663C9DC/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0140769430003.JPEG.
- [92] J. D. Shrouf, D. L. Chopp, C. L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, and M. R. Parsek, “The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional,” *Mol. Microbiol.*, vol. 62, no. 5, pp. 1264–1277, Dec. 2006, doi: 10.1111/J.1365-2958.2006.05421.X.
- [93] S. Cardinale and A. P. Arkin, “Contextualizing context for synthetic biology – identifying causes of failure of synthetic biological systems,” *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 7, pp. 856–866, Jul. 2012, doi: 10.1002/BIOT.201200085.

- [94] Y. Heacock-Kang *et al.*, “Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture,” *Mol. Microbiol.*, vol. 106, no. 6, pp. 976–985, Dec. 2017, doi: 10.1111/MMI.13863.
- [95] D. Dar, N. Dar, L. Cai, and D. K. Newman, “Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution,” *Science*, vol. 373, no. 6556, Aug. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABI4882.
- [96] M. F. Murphy, T. Edwards, G. Hobbs, J. Shepherd, and F. Bezombes, “Acoustic vibration can enhance bacterial biofilm formation,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 122, no. 6, pp. 765–770, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.JBIOOSC.2016.05.010.

XIII. ANEXOS

13.1 Plásmidos reporteros



Figura 23. El plásmido pCdrA-GFPc, base para la construcción de los 6 plásmidos reporteros.

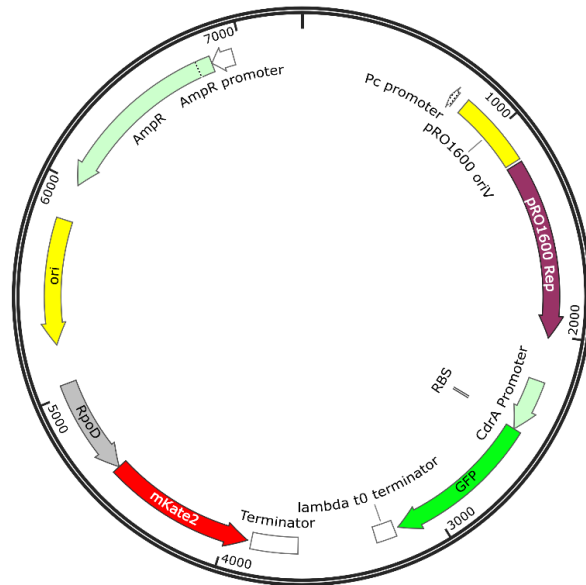


Figura 24. pUCP20-pCdrA_GFP-RpoD_mKate2 (7279 pb).

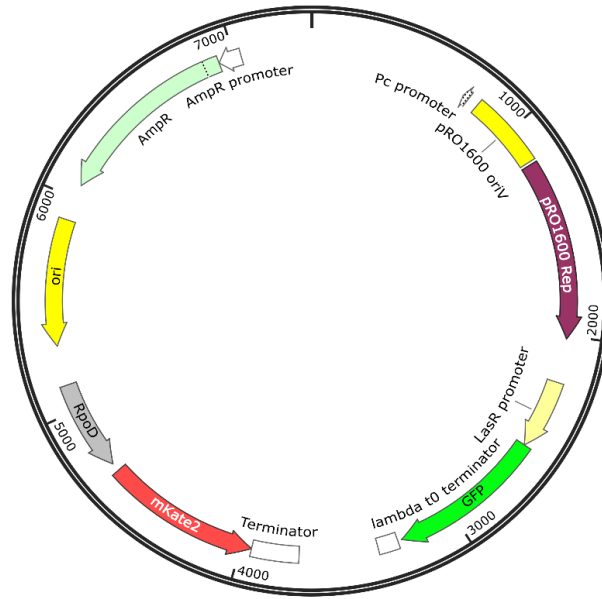


Figura 25. PUCP20-pLasR_GFP-RpoD_mKate2 (7353).

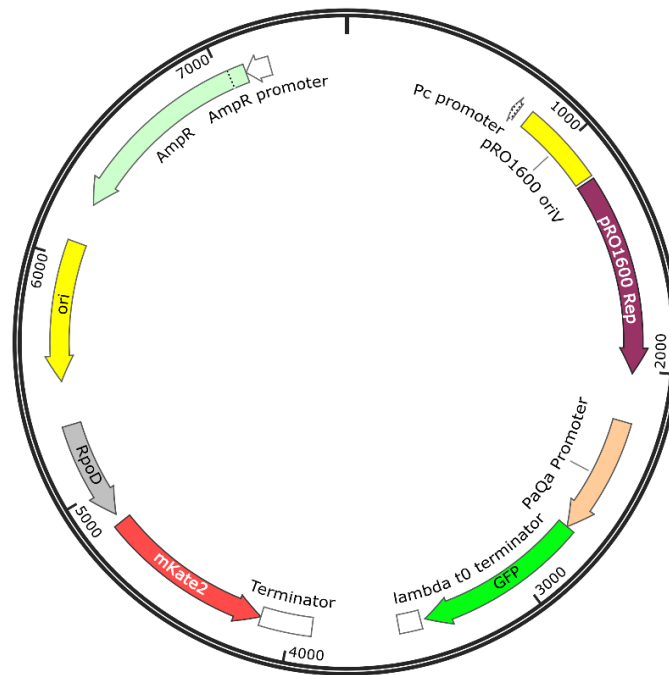


Figura 26. PUCP20-pPaQa_GFP-RpoD_mKate2 (7529 pb).

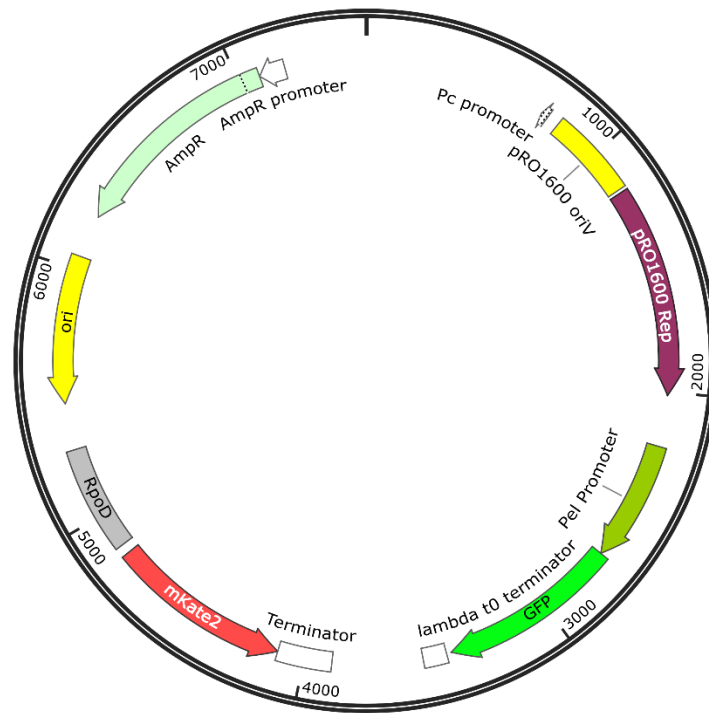


Figura 27. PUCP20-pPelA_GFP-RpoD_mKate2 (7510 pb).

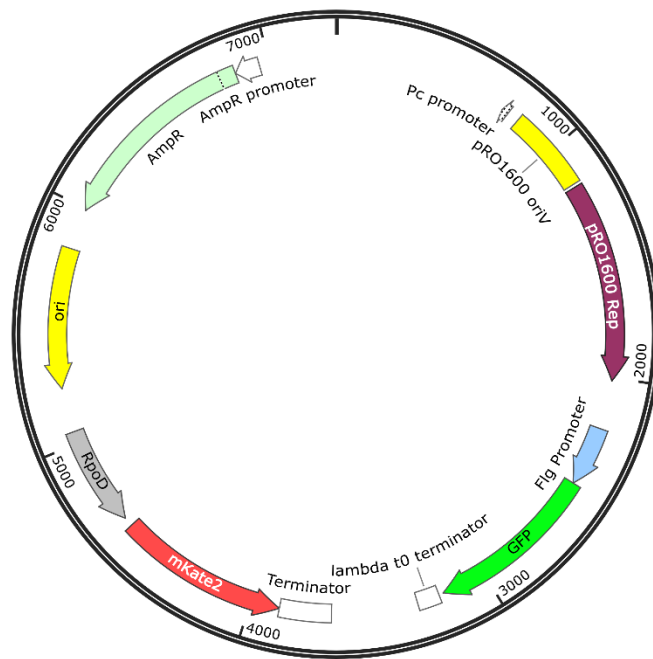


Figura 28. PUCP20-pFlgBCDE_GFP-RpoD_mKate2 (7281 pb).

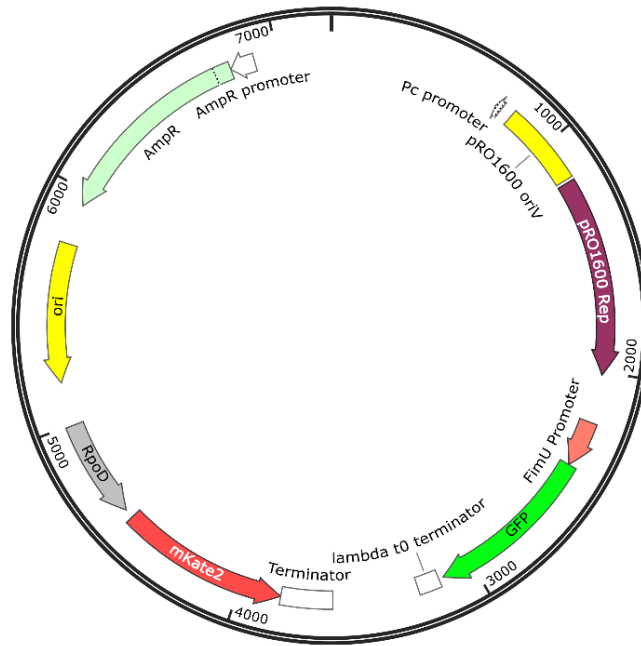


Figura 29. Plásmido PUCP20-pFimU_GFP-RpoD_mKate2 (7227).

13.2 Imágenes de las placas con bacterias transformantes.

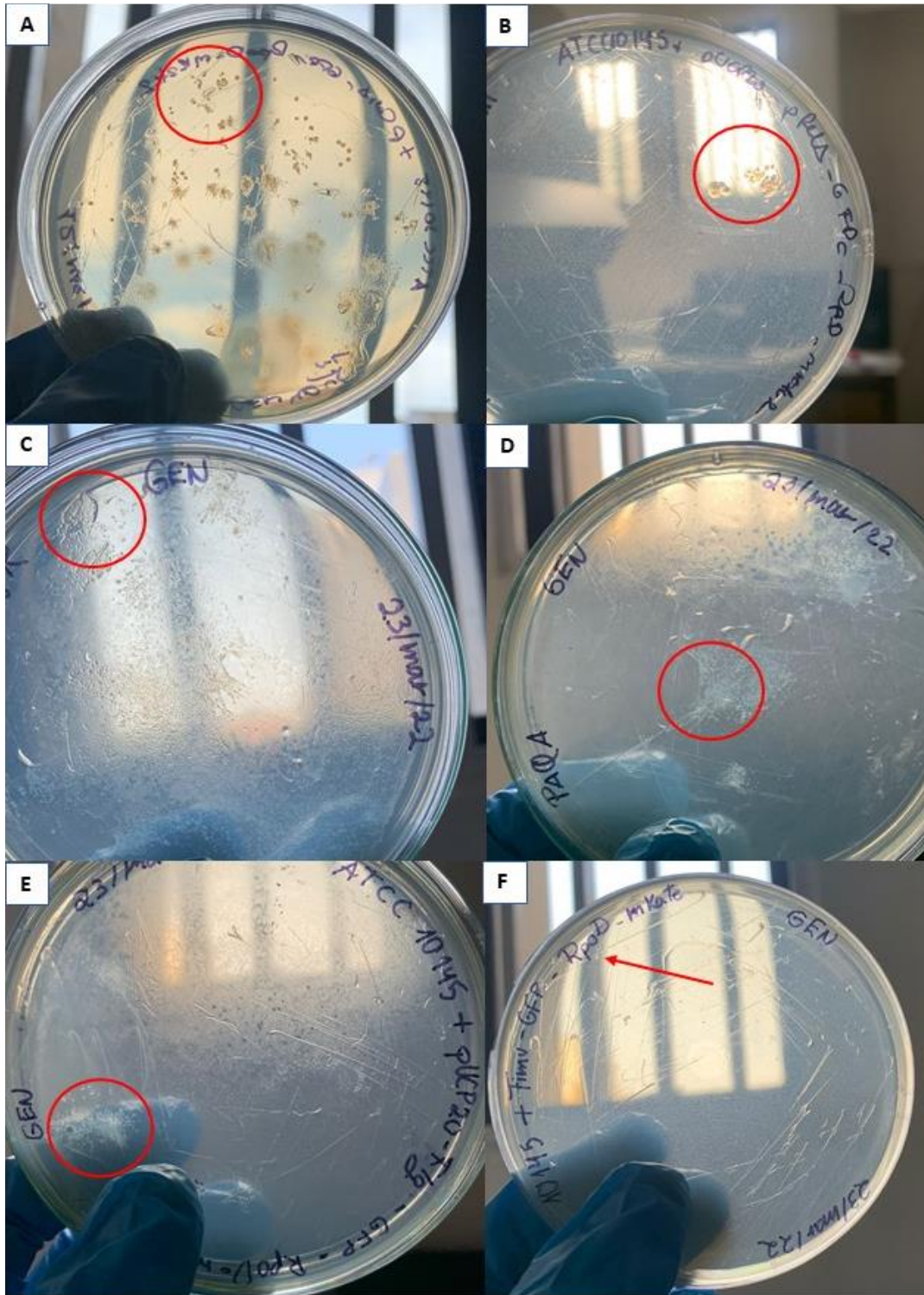


Figura 30. Placas con colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con los plásmidos reporteros de los promotores: A) CdrA, B) PelA, C) LasR, D) PaQa, E) Flg y F) Fim. Las colonias están señaladas tanto con círculos rojos como flechas.

13.3 Espectros de emisión de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™

transformada y comparación con la no-transformada.

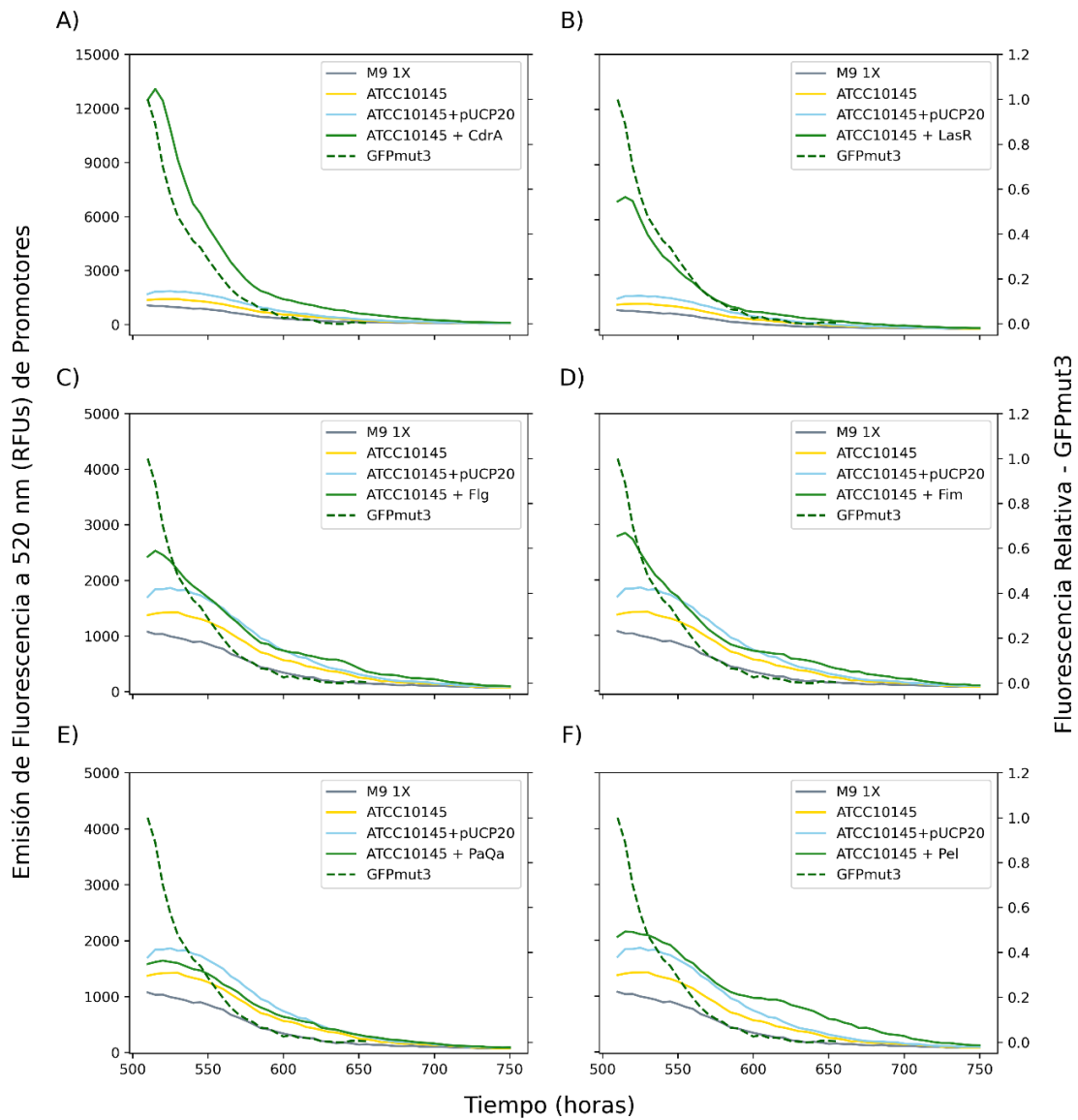


Figura 31. Identificación de expresión de GFP mut3 mediante espectros de emisión. Se muestran espectros de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformadas con los plásmidos conteniendo los promotores A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Se muestra también el espectro de emisión de la proteína GFPmut3 tomado de FPdatabase.

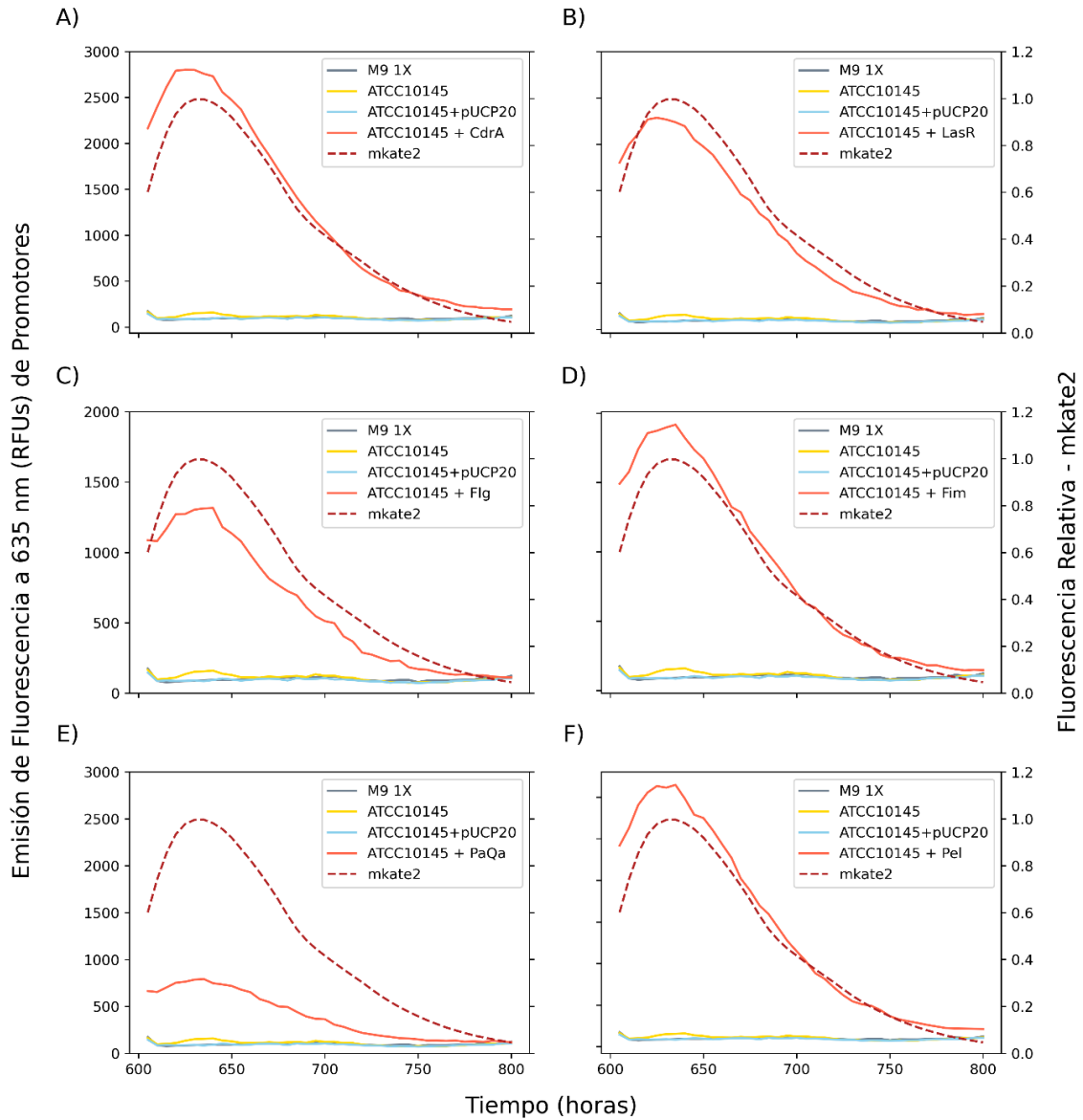


Figura 32. Identificación de expresión de mKate2 mediante espectros de emisión. Se muestran espectros de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM transformadas con los plásmidos conteniendo los promotores A) CdrA, B) LasR, C) Flg, D) Fim, E) PaQa y F) Pel. Se muestra también el espectro de emisión de la proteína mkate2 tomado de FPdatabase.

13.4 Cuadro comparativo entre las proporciones entre emisión a 520 nm DE ATCC 10145TM + Reportero/ ATCC10145TM +pUCP20 en medios M9 1X suplementado con Glucosa 1% y medio LB.

Tabla 3. Proporciones entre Emisión a 520 nm de ATCC10145TM + Reportero/ ATCC10145TM +pUCP20 en medios M9 1X suplementado con Glucosa 1% y medio LB.

	Proporción Emisión a 520 nm ATCC10145 TM + Reportero/ ATCC10145 TM +pUCP20						
Medio	pUCP20	CdrA	LasR	PaQa	Pel	Flg	Fim
M9	1	2.01	1.26	1.10	1.07	1.40	1.36
LB	1	21.17	13.56	2.03	2.05	3.99	6.26

13.5 Comparación entre las absorbancias a 570 nm (OD570 nm) tras 18 horas de incubación a 37 °C entre cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM en medio LB (en agitación) y M9 1X.

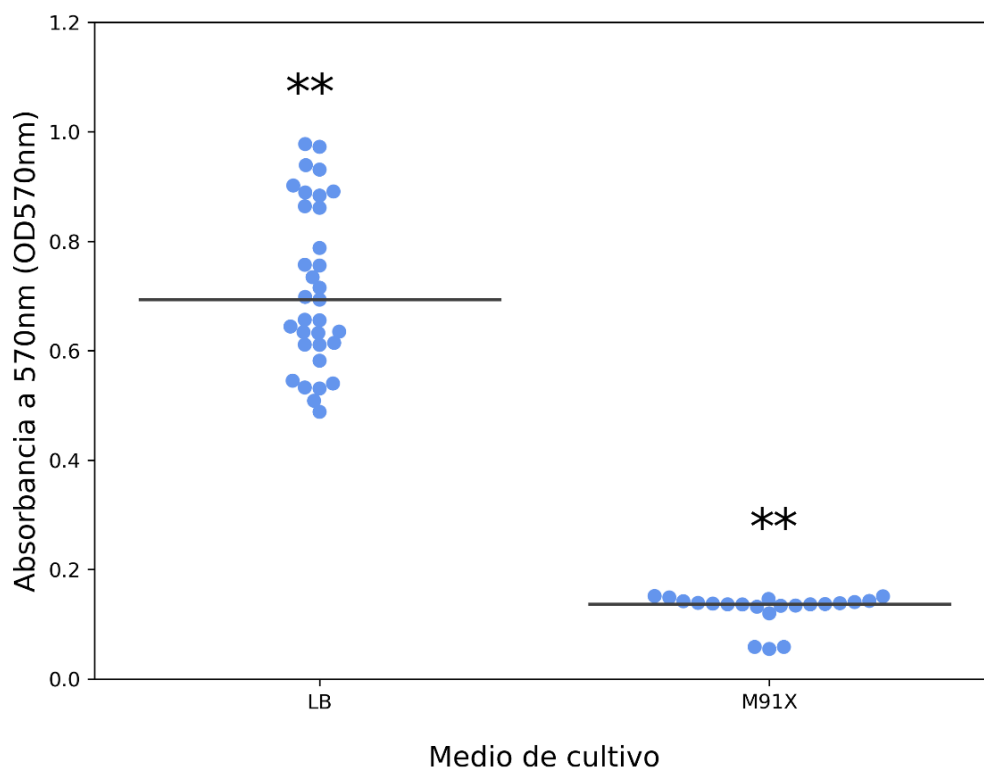
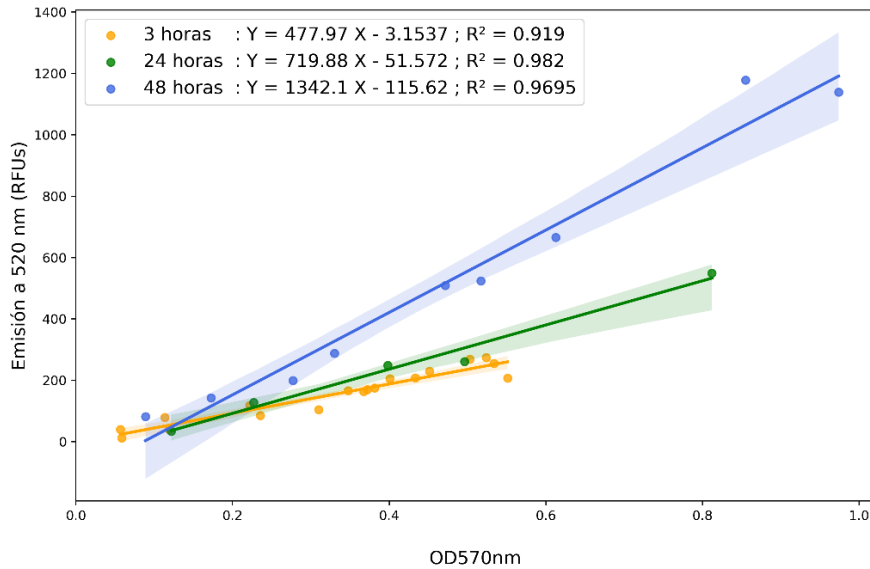


Figura 33. Comparación entre las absorbancias a 570 nm (OD570 nm) tras 18 horas de incubación a 37 °C entre cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145TM en medio LB (en agitación) y M9 1X. Los símbolos '**' indican diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos ($n \geq 3$, $**p < 0.05$).

13.6 Curva de calibración para la estimación de la contribución intrínseca a la fluorescencia de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformada con pUCP20, para los dos modos de crecimiento planctónico.

A) Crecimiento Planctónico



B) Crecimiento en Biofilm

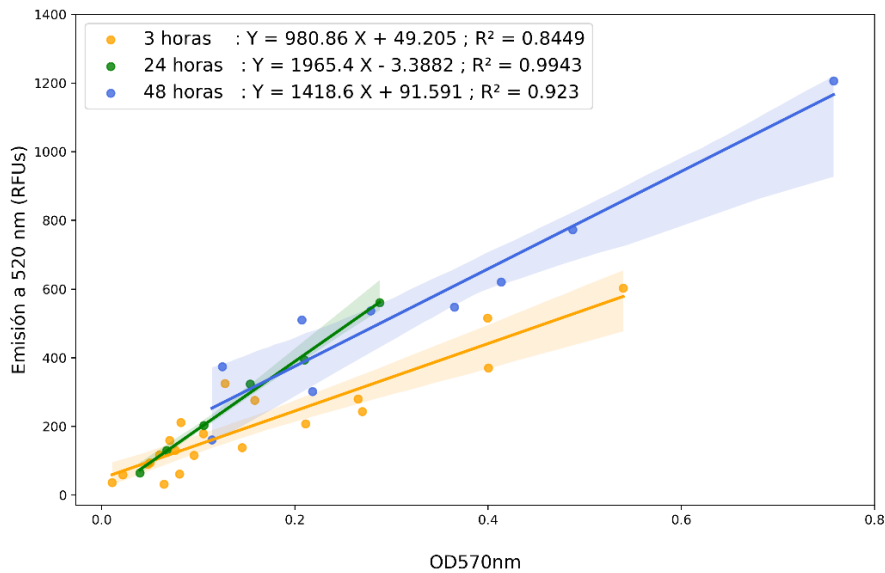


Figura 34. Correlación entre la emisión a 520 nm (Excitación: 475nm) según la turbidez de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 10145™ transformadas con pUCP20. A) Bacteria en crecimiento planctónico B) Bacteria creciendo en Biofilm. Cada punto de un mismo color representa los datos medidos de una suspensión de bacterias de *P.aeruginosa* transformada con pUCP20, obtenidas de un cultivo en placas (crec. biofilm - Panel B) o de un cultivo en tubos-agitación (crec. planctónico - Panel A), para un tiempo de crecimiento dado (por ejemplo, 48 horas = azul). Estos puntos fueron obtenidos de experimentos realizados en diferentes días.