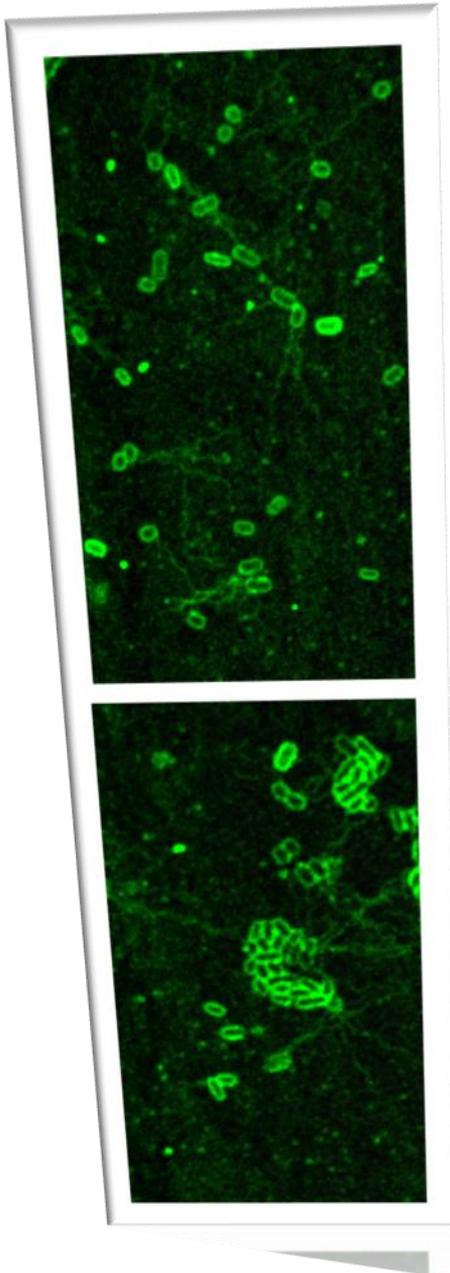




Facultad de Ciencias  
Universidad de la República



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



# **Evaluación de mutantes defectivas en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis***

**Tesina para optar por el grado de  
Licenciado en Ciencias Biológicas**

**Bach. Victoria Iribarnegaray**

**Tutora: Dra. Paola Scavone**

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente  
Estable. Departamento de Microbiología

**Febrero, 2014**

# Agradecimientos

A mi tutora de tesis Paola, por su dedicación y apoyo durante todo este tiempo.

A mis padres por su apoyo incondicional y por todo lo que me han enseñado.

A mi hermana, Florentina por estar siempre conmigo.

A todos los compañeros del laboratorio por su compañía y por brindarme su ayuda.

A mis amigas de siempre, Silv, Naty, Vane, Pame, Bea, Yuli, Vale, Flaca y Flo, por estar siempre apoyando en todo.

A mis amigas de facultad por todas esas horas de estudio y de charlas, sin ustedes no hubiese sido posible llegar.

Y a Maty, por acompañarme durante todo este tiempo, por ayudarme y alentarme todos los días.  
Gracias!

# Índice

ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
<b>Definición y estructura de los biofilms .....</b>	<b>7</b>
<b>Formación de biofilms .....</b>	<b>8</b>
Aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie .....	8
Adhesión irreversible y comienzo de la producción de exopolisacáridos .....	9
Formación de microcolonias .....	9
Maduración del biofilm .....	10
Dispersión celular .....	11
<b>Ventajas de la vida en biofilms .....</b>	<b>11</b>
<b>Relevancia clínica de los biofilms .....</b>	<b>12</b>
<b>Formación de biofilms e ITU .....</b>	<b>12</b>
Infecciones en el tracto urinario .....	12
Infecciones en el tracto urinario asociados a catéteres .....	13
<b><i>P. mirabilis</i> como patógeno urinario .....</b>	<b>14</b>
<b>Biofilms de <i>P. mirabilis</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>Herramientas empleadas para el estudio de biofilms .....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
Objetivo general .....	17
Objetivos específicos .....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....</b>	<b>17</b>
<b>1- Colección de cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> generadas mediante mutagénesis al azar .....</b>	<b>18</b>

<b>2- Formación de biofilms de los mutantes en placas de poliestireno.....</b>	<b>18</b>
i. Tinción con cristal violeta.....	18
<b>3- Caracterización genética de los mutantes e identificación de los genes relacionados con la formación del biofilms.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1- Análisis de los mutantes seleccionados mediante la técnica de Southern blot.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1- Construcción de las sondas.....</b>	<b>20</b>
i. Extracción de plásmidos.....	20
ii. Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos.....	20
iii. Electroforesis en gel de agarosa.....	22
<b>3.1.2- Biotinilación de las sondas.....</b>	<b>23</b>
i. Determinación del nivel de biotinilación de las sondas.....	23
<b>3.1.3- Detección y revelado de las membranas.....</b>	<b>23</b>
i. Detección de biotinilación y revelado de las membranas.....	23
<b>3.1.4- Southern blot para los mutantes obtenidos mediante el sistema de conjugación con el transposón mini-Tn5gusA- pgfp y p-BAM.....</b>	<b>26</b>
i. Extracción de ADN genómico.....	26
ii. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción.....	26
iii. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
iv. Transferencia.....	27
v. Pre- hibridación.....	28
vi. Hibridación.....	28
vii. Detección y revelado.....	29
<b>4- Identificación de la localización de la inserción del transposón mini-Tn5gusA- pgfp y p-BAM en los clones transconjugantes seleccionados.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1- Amplificación del ADN (PCR arbitrario).....</b>	<b>29</b>
i. Condiciones de PCR.....	30
ii. Ciclos empleados en la amplificación del ADN.....	31
iii. Electroforesis en gel de agarosa.....	32

<b>4.2- Secuenciación de los segmentos amplificados.....</b>	<b>32</b>
i. Análisis de secuencias.....	32
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1- Colección de clones transconjugantes.....</b>	<b>33</b>
<b>2- Selección de clones con capacidad alterada de formación de biofilms.....</b>	<b>33</b>
i. Sistema miniTn5 <i>gusA-pgfp</i> .....	33
ii. Sistema p-BAM.....	33
<b>3- Caracterización genética de los mutantes e identificación de los genes relacionados con la formación de biofilms.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1- Análisis de los clones seleccionados mediante la técnica Southern blot.....</b>	<b>35</b>
i. Construcción y biotilación de las sondas.....	35
ii. Clones obtenidos mediante el sistema p-BAM.....	35
<b>4- Identificación de la localización de la inserción del transposón p-BAM en los clones transconjugantes seleccionados.....</b>	<b>38</b>
i. Clones obtenidos mediante el sistema p-BAM.....	38
ii. Análisis de secuencias.....	39
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>53</b>

# Abreviaturas

Abs absorbancia

AFB alta formación de biofilm

Amp ampicilina

BFB baja formación de biofilm

CV cristal violeta

EPS exopolisacáridos

ITU infección del tracto urinario

ITU-C infección del tracto urinario asociada a catéteres

Km kanamicina

LB medio de cultivo Luria-Bertani

MLC Microscopía láser confocal

PBS solución tampón salina fosfatada

Tet tetraciclina

UV ultravioleta

QS quórum sensing

## Resumen

Las bacterias viven generalmente adheridas a distintas superficies más que en forma aislada (planctónica), formando frecuentemente comunidades sésiles conocidas como biofilms. Los biofilms se definen como comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes. Estas comunidades tienen una gran relevancia en el contexto clínico, ya que están asociadas a infecciones producidas en implantes médicos, como los catéteres urinarios. Los catéteres urinarios son implantes médicos comúnmente colonizados por bacterias que forman biofilms persistentes. Las infecciones urinarias asociadas a catéteres representan el tipo de infección nosocomial más común y son una causa de preocupación en la clínica dada las complicaciones asociadas y la frecuente recurrencia de estos procesos. *Proteus mirabilis* es uno de los principales agentes etiológicos involucrados en estas infecciones. La biogénesis de los biofilms de *P. mirabilis* uropatogénico se genera siguiendo un proceso coordinado donde las bacterias inicialmente se adhieren a la superficie, luego comienzan a producir polímeros extracelulares, posteriormente se produce la formación de microcolonias y maduración del biofilm, y finalmente tiene lugar la dispersión de células o acúmulos bacterianos.

Es claro que la capacidad de formar biofilms que posee *P. mirabilis* involucra la participación de varios genes. Por tanto, el objetivo de este trabajo consistió en dilucidar la participación de los genes involucrados en el proceso de desarrollo de los biofilms en *P. mirabilis*.

Para ello se emplearon herramientas moleculares para la generación de una biblioteca de mutantes mediante mutagénesis al azar por inserción de un transposón. Mediante la técnica clásica de tinción con cristal violeta se seleccionaron los mutantes con capacidad defectiva de formar biofilm. Luego se procedió a identificar los genes mutados así como la presencia de una única inserción del transposón.

Los resultados obtenidos nos permitieron determinar que la formación de biofilms involucra la participación de varios genes. Una vez analizadas las secuencias interrumpidas encontramos que éstas pertenecían a los genes que codifica para una proteína de eflujo y una proteína hipotética.

# Introducción

## Definición y estructura de los Biofilms

Los biofilms microbianos fueron descritos por primera vez por Van Leeuwenhoek a fines del siglo XVII quien examinó "animáculos" en su propia placa dental. Pero la teoría general de la predominancia de los biofilms fue expuesta por Costerton *et al.* recién en 1978, quienes estudiando microorganismos en ecosistemas acuáticos establecieron que la mayoría de las bacterias en estos ecosistemas crecían en forma de comunidades embebidas en una matriz de naturaleza polisacáridica y adheridas a superficies y que estas bacterias sésiles diferían profundamente de sus contrapartes "libres" o planctónicas (Costerton *et al.*, 1978).

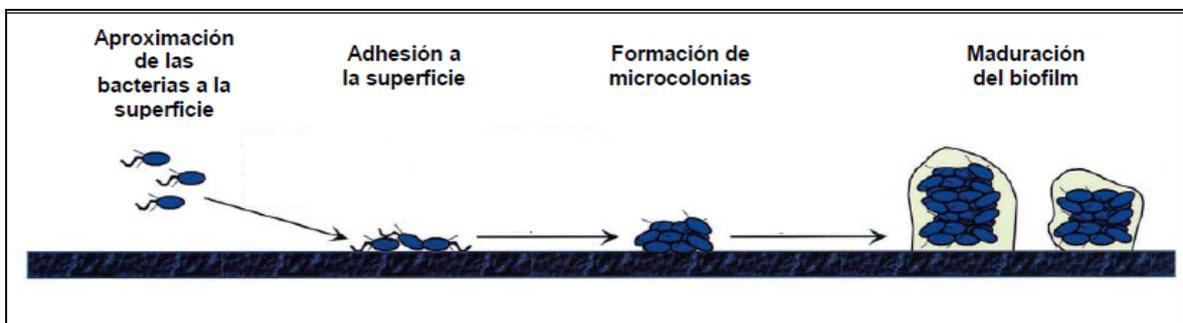
Actualmente se define a los biofilms como comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms pueden estar compuestos por una o múltiples especies bacterianas y son capaces de formarse sobre una amplia variedad de superficies bióticas y abióticas, así como en interfases aire-líquido (Adal & Farr, 1996; Archibald & Gaynes, 1997; Dickinson & Bisno, 1993). Los biofilms formados por múltiples especies son más comunes en la naturaleza, la importancia de estas interacciones interespecíficas se describió a fondo por primera vez en las bacterias que residen en la cavidad oral (Davey & Costerton, 2000). Posteriormente se realizaron estudios en biofilms de bacterias aisladas de varios entornos incluyendo el suelo, el agua de mar y hábitats artificiales tales como sistemas de distribución de agua potable, cascos de barcos y de los procesos de producción de leche (Burmølle *et al.*, 2006; Hangler *et al.*, 2009; Schwering *et al.*, 2013; Stewart, 2002). Pero aquellos biofilms formados por una única especie microbiana son de gran interés, debido a su importancia clínica. Estos pueden desarrollarse tanto en implantes médicos como en tejidos, contribuyendo de esta manera a una variedad de infecciones persistentes (Costerton, *et al.*, 1999).

## Formación de biofilms

Estudios genéticos en biofilms de *Vibrio cholerae*, han demostrado que éstos se forman en múltiples etapas (Watnick, & Kolter, 1999), requieren de señalización intercelular (Davies *et al.*, 1998), y presentan un perfil de transcripción de genes distinto de su contra parte planctónicas (Prigent-Combaret *et al.*, 1999).

El desarrollo de un biofilm bacteriano se ha definido como un proceso secuencial compuesto por varias etapas las cuales incluyen, (i) aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie, (ii) adhesión irreversible y comienzo de producción de exopolisacáridos (EPS) (iii) formación de microcolonias, (iv) maduración del biofilm; (v) dispersión celular (Costerton *et al.*, 2003; Davey & O'Toole, 2000) (Fig.1).



**Figura 1:** Etapas de formación de un biofilm (extraído de Schlapp, 2009; modificado desde Davey & O'Toole, 2000).

### (i) Aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie

La primer etapa en la formación de los biofilms comienza con la aproximación y censado por parte de las bacterias a la superficie y/o ambiente donde se van a establecer. Esta primera aproximación ha sido muy estudiada por diversos autores y han determinado que cada bacteria reconoce diferentes señales específicas para su establecimiento siendo de esta forma un proceso muy complejo que depende de muchas variables, como el tipo de sustrato y las propiedades de las células bacterianas (O' Toole *et al.*, 2000).

A partir de estudios de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* en donde, se han cultivado en medios con diversas condiciones, se observó que ésta forma biofilms en prácticamente cualquier medio de cultivo, mientras que *Escherichia coli* K-12 forma biofilms en medios mínimos solamente cuando éstos son suplementados con aminoácidos: *E. coli* O517:H7 forma biofilms sólo en medio que contienen escasos nutrientes (O'Toole *et al.*, 2000). A partir de dichos estudios se pudo determinar que la formación de los biofilms implica el

reconocimiento de diversas señales, las que son reconocidas por diferentes vías en los distintos microorganismos (O' Toole *et al.*, 2000).

En 1997 Palmer & White determinaron que el primer contacto entre las superficies y las bacterias incluía interacciones entre las células- superficie y célula-célula. Actualmente sabemos que la adhesión de las bacterias a las superficies esta mediada por factores no específicos como tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas (Darouiche, 2001), y factores específicos que incluyen varias estructuras de la superficie celular bacteriana como fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y EPS (Donlan & Costerton, 2002).

Este proceso de adhesión inicial suele ser reversible, permitiendo de esta forma que las células puedan desprenderse de la superficie en caso de que cambien las condiciones (Nadell *et al.*, 2008).

#### (ii) Adhesión irreversible y comienzo de la producción de exopolisacáridos (EPS)

Luego del primer contacto de las células a la superficie, algunas de ellas comienzan a adherirse de forma irreversible a la superficie.

Una de las características distintivas de los biofilms, es la producción de una matriz extracelular, la cual comienza a producirse a mayor escala en esta segunda etapa de adhesión. La función de la matriz es proporcionar adhesión entre células bacterianas, permitiendo así la formación de un biofilm de varias capas. A través de pruebas *in vitro* se ha observado que la matriz del biofilm está constituida de una multitud de componentes de diferentes naturalezas químicas, incluyendo exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN, y otros polímeros (Joo & Otto, 2012).

Los EPS están altamente hidratados ya que pueden incorporar moléculas de agua en su estructura por medio de puentes de hidrógeno, y pueden estar asociados a iones metálicos, cationes divalentes y macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos, constituyendo en conjunto la matriz extracelular del biofilm (Donlan, 2002). La producción de EPS confiere ciertas ventajas frente a compuestos antimicrobianos, células del sistema inmune, prevención a la desecación y brinda soporte estructural a los microorganismos (Dunne, 2002).

#### (iii) Formación de microcolonias

Una vez que las bacterias logran adherirse a la superficie comienza la colonización de la misma. Las bacterias se multiplican formando microcolonias las cuales son consideradas como la unidad básica organizacional de un biofilm. Al mismo tiempo ocurre el reclutamiento de otras células plánticas con el EPS, lo que finalmente forma al biofilm. La colonización primaria de

una bacteria a la superficie generalmente sirve como influencia para reclutar y atraer más bacterias para continuar colonizando esa misma superficie (Lindsay & Holy, 2006). A medida que aumentan en número, se incrementa la producción de EPS de tal modo que las bacterias unidas formando microcolonias representan el 10 % del volumen total mientras que el restante 90 % corresponde a la matriz de EPS (Stoodley, 2013).

#### (iv) Maduración del biofilm

Luego que las bacterias están adheridas irreversiblemente a la superficie comienza el proceso de maduración. En esta etapa la complejidad del biofilms se incrementa, aumenta la replicación de las bacterias y también la muerte de las mismas. Por otra parte, el espacio colonizado aumenta. El crecimiento potencial de las bacterias en forma de biofilms es limitado por la disponibilidad de nutrientes. A su vez también existen factores que regulan la maduración del mismo como el pH interno, la disponibilidad de oxígeno, el carbono y la osmolaridad (Carpentier & Cerf, 1993; O'Toole & Kolter, 1998 A).

Los biofilms maduros no se presentan como monocapas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan & Costerton, 2002), sino que por el contrario presentan una arquitectura compleja, que comúnmente incluye microcolonias en forma de "hongo", rodeadas de matriz extracelular y separadas entre sí por canales que permiten la circulación de fluido (O'Toole *et al.*, 2000). La estructura de los biofilms maduros cambia constantemente debido a procesos internos y externos. A su vez presentan una relación de cooperación metabólica entre ellos. La vida en forma de biofilm en las comunidades bacterianas es considerada muy exitosa y competitiva en parte porque presenta una expresión diferencial de genes con respecto a su contraparte planctónica. Las células del biofilms son metabólicamente más eficientes, presentando protección y resistencia frente a una variedad de factores de estrés (Lazar, 2011).

Entre las células del biofilm de numerosas especies bacterianas existe un proceso de comunicación célula- célula y detección de la densidad celular, denominado *quórum sensing* (QS) (Fuqua *et al.*, 1994). Este proceso esta mediado por pequeñas moléculas producidas y secretadas por las propias células denominadas moléculas auto- inductoras. La síntesis de estas moléculas está regulada por la densidad celular. De esta forma, la concentración de estas moléculas señalizadoras representa una medida del número celular (densidad celular). También se observó que en ausencia de estas moléculas los biofilms eran más finos y uniformes (por ejemplo en mutantes de *lasI* de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*) (Lazar, 2011).

#### (v) Dispersión celular

Al tiempo que los biofilms maduran y crecen en tamaño, las células residentes del biofilm comienzan a tener poco acceso a los nutrientes y se acumulan desechos tóxicos. Su microambiente se hace cada vez más desfavorable (Karatan & Watnick, 2009). Dado estas condiciones se puede predecir que la dispersión de los biofilms es un proceso que debe estar altamente regulado.

Hoy en día hay gran conocimiento sobre el asentamiento de los biofilms de distintas especies, sin embargo no es del todo comprendido el proceso de dispersión. Si está claro que hay por lo menos tres elementos necesarios para una dispersión eficiente. El primero de ellos es la capacidad de las bacterias de poder censar la acumulación de señales de estrés en el biofilm y a su vez cambiar el perfil de expresión de sus genes para la dispersión. Segundo, la señal debe traspasar el medio ambiente limitado por la difusión. Por último el complejo extracelular de la matriz debe permitir el pasaje de las bacterias al ambiente (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

El conjunto de señales de censado como alta concentración celular así como una serie de mecanismos celulares de señalización (*quórum sensing*) estarían involucrados en la dispersión del biofilm.

#### **Ventajas de la vida en biofilms**

Los biofilms representan un modo de vida protegido que favorece la supervivencia microbiana, lo que resulta en una mayor adaptación al estrés ambiental, principalmente frente a la radiación UV, pH, desecación, etc. Además, presentan una elevada resistencia a bacteriófagos ambientales, amebas fagocíticas y agentes antimicrobianos como antibióticos, desinfectantes y germicidas (Donlan & Costerton, 2002). Los mecanismos subyacentes a la capacidad de resistir a los tratamientos de antibióticos y evadir la respuesta inmune del hospedero humano son poco conocidos (Costerton *et al.*, 1999). La resistencia a los antibióticos presenta una serie de mecanismos diferentes (Mah & O'Toole, 2001). En primer lugar, la matriz de los biofilms puede actuar como una barrera para los antibióticos. Este puede ser el caso de algunos, pero no de todos los antibióticos, y parece ser dependiente de sus características fisicoquímicas. En segundo lugar, las células del biofilm tienen un estado fisiológico con crecimiento activo diferente a las células planctónicas, lo que minimiza su sensibilidad a los antibióticos. En tercer lugar, la expresión de moléculas de protección específica puede ser más elevada en los biofilms y los antibióticos incluso, pueden promover directamente la expresión de mecanismos

protectores. Todos estos mecanismos ciertamente contribuyen a la resistencia a antibióticos *in vitro* en los biofilms, pero si alguno de ellos tiene más importancia *in vivo*, sigue siendo desconocido (Joo & Otto, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los biofilms protegen a los microorganismos de ciertas condiciones adversas del ambiente. Se han postulado varios mecanismos con el fin de comprender la resistencia en general que poseen los biofilms. Entre ellos se encuentran las propiedades de la matriz de exopolisacáridos. La matriz confiere estabilidad estructural a los biofilms y contribuye a la notable resistencia que presentan los mismos a los antibióticos y al sistema inmune del hospedero. La matriz embebida en EPS actúa principalmente para reactivos cargados (como los metales) o de gran tamaño (como las inmunoglobulinas), y los agentes antimicrobianos se ven eficientemente neutralizados por los EPS (Hall- Stoodley *et al.*, 2004).

### **Relevancia clínica de los biofilms**

Los mismos microorganismos que durante millones de años han sobrevivido en la naturaleza en forma de biofilms, se han adaptado a otros ambientes haciendo uso de esta estratégica forma de vida. En particular, los individuos que se encuentran en estado de salud comprometido son especialmente susceptibles a ser infectados por estos patógenos oportunistas (Donlan & Costerton, 2002). Algunas infecciones crónicas como otitis media, periodontitis, prostatitis bacteriana e infecciones pulmonares son producidas por microorganismos que crecen en forma de biofilms. Además, un amplio espectro de infecciones asociadas a implantes médicos como catéteres urinarios e intravenosos, válvulas cardíacas protéticas y dispositivos intrauterinos son producidas por microorganismos que crecen en forma de biofilms (Davey & O'Toole, 2000; Donlan & Costerton, 2002).

### **Formación de biofilms e ITU**

#### Infecciones en el tracto urinario (ITU)

Las infecciones bacterianas en el tracto urinario han sido descritas como la infección más común en seres humanos (Foxman, 2003). Las infecciones urinarias inferiores, tales como cistitis, se caracterizan normalmente por síntomas que incluyen la frecuencia, urgencia y disuria (Guay, 2008). Si no se tratan, estas infecciones pueden progresar a un ITU superior, conocida como pielonefritis aguda o infección en los riñones que puede estar asociado con síntomas

adicionales tales como fiebre, náuseas, vómitos y dolor. Estas infecciones también conllevan el riesgo de una posible progresión a la bacteriemia.

A lo largo de los años las ITU han constituido un problema sanitario, social y económico muy grave para la sociedad. Entre un 40 % y un 50 % de las mujeres y un 12 % de los hombres tienen al menos un episodio de ITU en su vida. Siendo un 30 % más frecuentes en mujeres que en hombres (Cassell, 1991; Nielubiwicz & Mobley, 2010). Los lactantes y los niños son también susceptibles a las infecciones en el tracto urinario. Infecciones urinarias febriles en los niños tienden a estar asociados con el reflujo vesicouretral y con la posibilidad de cicatrices renales.

Las ITU pueden ser además clasificadas como no complicadas o complicadas. Infecciones no complicadas se producen en los pacientes que se consideran por lo demás sanos. ITU complicadas, por el contrario, se producen en los pacientes que están comprometidos de alguna manera, por ejemplo, si tienen anomalías anatómicas o funcionales en el tracto urinario, sufren de otra enfermedad, inmuno-comprometidos o están sometidos a cateterismo a largo plazo. La gran mayoría de las infecciones del tracto urinario sin complicaciones son causadas por *Escherichia coli*. Por el contrario, las infecciones urinarias complicadas, especialmente las asociadas a cateterismo a largo plazo, pueden ser polimicrobianas (Hooton *et al.*, 2010; Nicolle, 2005). Estas infecciones son causadas principalmente por *P. mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, y *P. aeruginosa*, entre otros.

En Estados Unidos las consultas anuales por ITU conllevan un gasto promedio de 11 millones de dólares (Nielubiwicz & Mobley, 2010).

#### Infecciones en el tracto urinario asociados a catéteres (ITU-C)

Entre las infecciones nosocomiales, las ITU-C se caracterizan por tener una de las tasas de incidencia más altas.

Los catéteres están generalmente compuestos por, látex, silicona o dispositivos tubulares que se insertan a través de la uretra hasta la vejiga para medir la producción de orina, recoger la orina durante la cirugía, evitar la retención urinaria, o controlar la incontinencia urinaria (Kunin, 1987; Warren, *et al* 1989; Warren, 1997; Darouiche, 2001; Jacobsen *et al.*, 2008). El uso de catéteres por un periodo prolongado trae como consecuencia el desarrollo de infecciones urinarias, las cuales están asociadas a la formación de biofilms en la superficie de los catéteres (Trautner & Darouiche, 2004). Se ha determinado que del 10 al 50% de los pacientes que se encuentran cateterizados durante cortos períodos (hasta 7 días) desarrollan una infección del

tracto urinario (ITU) mientras que la incidencia en pacientes cateterizados por períodos prolongados (más de 28 días) es del 100% (Stickler, 1996). El riesgo de desarrollar una ITU aumenta en un 10% por cada día de catéter en uso (McLean *et al.*, 1997).

Algunos de los factores más frecuentemente asociados a las ITU por uso de catéter urinario son: el tiempo, ya que, el riesgo de contraer una ITU se incrementa a medida que aumenta el tiempo de cateterización (Maki & Tambyah, 2001); las complicaciones durante la colocación, el manejo del catéter; la susceptibilidad del huésped según su edad, género, enfermedades concomitantes, y ciertas condiciones como embarazo y alteración anatómico-funcional del tracto urinario (Galván *et al.*, 2011).

Dado que el uso de catéteres urinarios durante la hospitalización es por lo general frecuente y muchas veces innecesario (entre el 21 y 50% de los pacientes) (Jain *et al.*, 1995), muchas personas son puestas en riesgo de sufrir complicaciones asociadas al uso de estos dispositivos, siendo la más notable el desarrollo de ITU-C (Tambyah & Maki, 2000). Por esta razón se considera que las ITU-C son el tipo más común de infecciones nosocomiales (80%), superando el millón de casos anuales en Estados Unidos (Tambyah & Maki, 2000) y representando más del 40% del total de infecciones en hospitales y casas de salud (Warren, 1997; Stamm, 1991; Hartstein *et al.*, 1981).

Las bacteriurias asociadas al uso de catéteres son asintomáticas en la mayoría de los casos, pero una vez que se vuelven sintomáticas las consecuencias resultantes pueden variar entre moderadas (fiebre, uretritis, cistitis) a severas (pielonefritis aguda, daño renal, formación de cálculos, bacteriemia). Si no son tratadas, estas infecciones pueden llevar a urosepsis y muerte (Warren, 1997; Niel-Weise & van den Broek, 2005). Las ITU-C suelen ser recurrentes como consecuencia del desarrollo de biofilms cristalinos en los catéteres y resultan en morbilidad a largo plazo (Jacobsen *et al.*, 2008). El desarrollo de los biofilms provoca la incrustación y bloqueo de los catéteres, al mismo tiempo se observa un aumento en la resistencia a antibióticos así como también la resistencia de las bacterias a la respuesta inmune del hospedero (Stickler & Zimakoff, 1994).

### ***Proteus mirabilis* como patógeno urinario**

*P. mirabilis* es una bacteria perteneciente a la familia de las enterobacterias, gram negativa y móvil. Se asocia comúnmente a infecciones complicadas del tracto urinario siendo aislada con elevada frecuencia en pacientes cateterizados por periodos prolongados. Aparece como el tercer

agente más comúnmente asociado a ITU después de *E. coli* y *K. pneumoniae*. (Rozalski *et al.*, 1997) y, dentro de éstas, su incidencia en ITU-C es mayor al 44% (Mobley, 1996). También se ha observado que presenta una particular afinidad por el tracto urinario superior, donde puede provocar grave daño renal (Senior, 1979).

En la colonización e invasión de *P. mirabilis* en el tracto urinario están implicados diversos factores de virulencia tales como la producción de hemolisinas, ureasa, secreción de proteasas que clivan inmunoglobulinas de tipo A (IgA) y G (IgG), sistemas de captación de hierro, movilidad mediada por flagelos así como la expresión de distintos tipos de fimbrias (Nielubowicz & Mobley, 2010)

La producción de altos niveles de ureasa es característica de *P. mirabilis*. Esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar la urea presente en la orina generando amoníaco, lo cual hace que se eleve el pH de la orina a valores mayores de 7,2. Como consecuencia se precipitan iones polivalentes como el magnesio y el calcio, los cuales son normalmente solubles en la orina (Mobley, 1996). El resultado es la formación de cálculos los cuales pueden llegar a formar bloques de pH alcalino en el lumen del catéter, causando una aguda retención urinaria. Esto provoca el posible desarrollo de bacteriuria y otras infecciones ascendentes, lo que conduce a una pielonefritis, y hasta puede causar shock endotóxico (Kunin, 1997; Mobley, 1996). Además hay fuertes evidencias tanto experimentales como epidemiológicas que aseguran que *P. mirabilis* es una de las bacterias responsables de la incrustación de catéteres (Stickler *et al.*, 1993; Kunin, 1997; Morris & Stickler, 1998; Foxman, 2003).

Por otra parte *P. mirabilis* posee algunas características distintivas dentro de la familia de las enterobacterias. Una de ellas es el comportamiento durante la migración denominada *swarming*, la cual se observa en medios sólidos. La movilidad *swarming* en *P. mirabilis* fue originalmente descrita en 1885 por Gustav Hauser, quien denominó a este organismo como *Proteus* basado en la capacidad de cambiar de forma. Hoy en día hay mucho conocimiento de que este cambio de forma es el resultado de múltiples procesos de diferenciación que convierte a la célula vegetativa, con la morfología típica de las enterobacterias gram negativas, a una forma elongada multiflagelar denominada *swarmers* (Mobley & Belas, 1995; Rather, 2005).

### **Biofilms de *Proteus mirabilis***

La capacidad que posee *P. mirabilis* para formar biofilms en catéteres urinarios ha sido descrita por diversos autores (Stickler *et al.*, 1993; Donlan, 2002; Mobley & Belas, 1995). Una

vez que se logra la colonización inicial de la superficie del catéter durante una ITU-C, *P. mirabilis* forma característicos biofilms cristalinos. Estas estructuras favorecen la supervivencia de *P. mirabilis* en el tracto urinario permitiendo de esta forma la adhesión de los microorganismos a las superficies, protegiéndolos de la acción de antibióticos y de la respuesta inmune del hospedero (Hoyle *et al.*, 1992).

### **Herramientas empleadas para el estudio de biofilms**

Uno de los primeros métodos empleados para la cuantificación de los biofilms a lo largo del tiempo ha sido la tinción con cristal violeta (CV) (Christensen *et al.*, 1985; Stepanovic *et al.*, 2000). La técnica consiste en la tinción de las moléculas cargadas negativamente por el colorante básico cristal violeta (Li X *et al.*, 2003). El cristal violeta se une indiferentemente a bacterias cargadas negativamente y polisacáridos de los EPS. Luego de la tinción, el cristal violeta absorbido se eluye con un solvente (como el etanol). Luego se mide la absorbancia óptica a 540 nm, lo cual es directamente proporcional al tamaño del biofilms. Es un método muy utilizado el cual permite evaluar de forma rápida la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas.

Las herramientas moleculares y los avances tecnológicos nos permiten hoy en día llevar a cabo la reprogramación de los microorganismos para mejorar sus funciones ya existentes y/o llevar a cabo nuevas funciones. Además, nos permiten revelar las funciones de una red reguladora o incluso la de un solo gen. Estos esfuerzos se basan en la disponibilidad de herramientas genéticas para modificar correctamente el cromosoma de las bacterias estudiadas. Los aspectos clave a este fin incluyen la eliminación de segmentos en el genoma, ya sea mediante los sistemas para la producción de mutantes dirigidos y sustituciones alélicas, generación de bibliotecas de mutantes al azar, permitiéndonos de esta forma conocer nuevas funciones de los genes (Martínez García *et al.*, 2011).

# Hipótesis

Se propone que distintos genes tienen relevancia en el proceso de formación de biofilms por parte de *P. mirabilis*.

# Objetivos

## Objetivo general

El objetivo de la presente propuesta es seleccionar cepas mutantes de *P. mirabilis* que exhiban alteraciones significativas en la formación de biofilms e identificar los genes mutados.

## Objetivos Específicos

- 1- Selección de cepas mutantes de *P. mirabilis* que exhiban alteraciones significativas en la formación de biofilms.
- 2- Caracterización genética de los mutantes seleccionados.
- 3- Identificación de los genes relacionados con la formación del biofilms.

# Materiales y métodos

## Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa de *Proteus mirabilis* Pr2921 obtenida de un aislamiento clínico de un paciente con ITU sintomática. La misma presenta resistencia a tetraciclina, eritromicina, polimixina y es sensible a ampicilina (Zunino *et al.*, 2000).

Por otra parte, se emplearon las cepas *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir conteniendo el plásmido pmTn5gusA-pgfp21 y la misma cepa conteniendo el plásmido p-BAM. Ambas presentan sensibilidad a tetraciclina y son kanamicina resistentes (Martínez-García *et al.*, 2011; Xi *et al.*, 1999).

Las cepas se cultivaron aeróbicamente con medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 6,8). El medio se suplementó con agar 1,5% cuando se requirió medio sólido

(LA), y con los antibióticos kanamicina (concentración final 40 µg/mL) y tetraciclina (concentración final 15 µg/mL). La temperatura de incubación empleada fue 37°C y el tiempo varió de acuerdo al ensayo, lo cual se especifica en cada caso.

Todas las cepas se conservaron a -80°C (concentración final: 20 %) con el fin de preservarlas a largo plazo.

## **1- Colección de cepas mutantes de *P. mirabilis* generadas mediante mutagénesis al azar**

Con el fin de identificar los genes involucrados en la formación de biofilm, se empleó una biblioteca de mutantes de *P. mirabilis* generada mediante mutagénesis al azar por inserción de un transposón. La biblioteca de mutantes fue generada por el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Se emplearon dos sistemas de conjugación con el fin de evaluar que método es más eficaz. En ambos casos se utilizó como cepa parental salvaje *P. mirabilis* (Pr2921). Resultados previos confirmaron la capacidad patogénica de esta cepa así como su habilidad para formar biofilms (Zunino *et al* 2001, Zunino *et al.*, 2003, Schlapp *et al* 2011). Como cepa donadora se utilizó *E. coli* S17-1 λpir conteniendo el plásmido pmTn5gusA-pgfp21 y *E. coli* S17-1 λpir con el plásmido p-BAM.

## **2- Formación de biofilms de los mutantes en placas de poliestireno**

La capacidad de formación de biofilms de los clones mutantes de *P. mirabilis* se determinó mediante un método semicuantitativo que se basa en la habilidad de las bacterias para formar biofilms en superficies abióticas y posterior tinción con cristal violeta (CV). Para realizar dicho ensayo se siguió el protocolo descrito por Pratt & Kolter, 1998 con algunas modificaciones. Este método nos permite estimar de manera indirecta el biofilm adherido a los pocillos de poliestireno ya que la medida de la absorbancia óptica a 540 nm es directamente proporcional al tamaño del biofilm (O'Toole & Kolter, 1998).

### **i. Tinción con cristal violeta**

Los clones previamente ordenados en medio sólido (47 clones por placa) se transfirieron a placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con 150 µl/pocillo de medio líquido (LB) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

Los cultivos fueron transferidos (20 µl/pocillo) a una nueva placa de 96 pocillos, conteniendo 180 µl/pocillo de medio líquido LB y se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación se removió el medio y se realizaron 3 lavados con PBS 1X (1,7 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8,2 g/l NaCl) con el fin de eliminar las células planctónicas. Las células adheridas se tiñeron con solución de CV al 1% durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se removió el exceso de colorante mediante lavados con PBS. Luego, el CV asociado a las células adheridas se solubilizó con etanol (95%) y se determinó la DO<sub>540</sub> empleando un espectrofotómetro de placas (Varioskan, Thermo Scientific). Además, se utilizaron dos blancos de absorbancia (control negativo) solo con medio de cultivo, y como control positivo se utilizaron cuatro pocillos con cultivos de *P. mirabilis* Pr2921. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Para cada ensayo se consideró como disminución en la formación de biofilm valores que no superaron 0,25 unidades de absorbancia (Villegas *et al.*, 2013). Mientras que, como control se empleó la cepa parental *P. mirabilis* Pr2921 formadora de biofilm, donde mediante la técnica con tinción CV su absorbancia es aproximadamente 0,9 unidades. Se consideró como altas productoras de biofilm cuando los valores fueron mayores a 1,2 (Villegas *et al.*, 2013). Los clones transconjugantes con capacidad disminuida o aumentada en la formación de biofilms con respecto a *P. mirabilis* Pr2921 fueron seleccionados y se conservaron en glicerol a -80 °C (concentración final de glicerol 20 %).

### **3- Caracterización genética de los mutantes e identificación de los genes relacionados con la formación del biofilm.**

#### **3.1- Análisis de los mutantes seleccionados mediante la técnica de Southern blot**

Los clones transconjugantes que presentaron formación de biofilm diferencial (menor o mayor formación de biofilm) respecto a la cepa parental Pr2921, se les evaluó la presencia de un solo inserto del transposón en el genoma. Para ello se puso a punto la técnica Southern blot, que permite detectar la presencia de una secuencia de ADN, en este caso la secuencia correspondiente a parte del transposón insertado en el genoma de los clones seleccionados.

El protocolo utilizado para esta técnica fue tomado de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Maniatis *et al.*, 1989), el mismo se empleó con ciertas modificaciones.

### 3.1.1- Construcción de las sondas

Para la realización del Southern blot, previamente se crearon las sondas, a continuación se detalla el protocolo empleado.

#### i. Extracción de plásmidos

A partir de las cepas de *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir conteniendo el plásmido pmTn5*gusA-pgfp21* o p-BAM se realizó la extracción de los respectivos plásmidos. Para la extracción se utilizó un kit comercial (Zyppy™ Plasmid Miniprep, Zymo Research Corporation), y se siguió las instrucciones del fabricante. El plásmido obtenido en el último paso de la extracción se conservó a -20 °C.

#### ii. Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos

Una vez extraídos los plásmidos los mismos fueron digeridos con enzimas de restricción para obtener un fragmento el cual fue utilizado para construir la sonda. Para la elección de las enzimas de restricción se utilizó el programa de acceso público A plasmid editor (ApE) (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>). El mismo permite realizar restricciones virtuales con distintas enzimas.

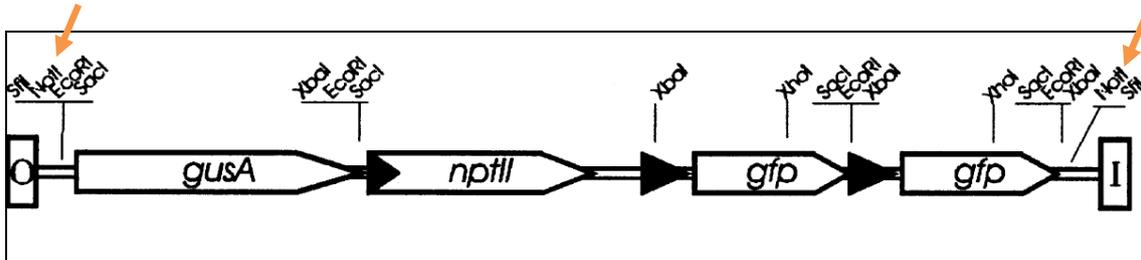
Para el plásmido pmTn5*gusA-pgfp21* se utilizó la enzima de restricción NotI (New England Biolabs), dado que esta enzima posee dos sitios de corte en el plásmido generando dos fragmentos. Mientras que para el plásmido p-BAM se emplearon las enzimas HindIII y ClaI (Promega), cada una de ellas posee un sitio de corte en el plásmido, por esta razón las utilizamos en conjunto con el fin de obtener dos fragmentos. Las digestiones se realizaron teniendo en cuenta el protocolo de los fabricantes (New England Biolabs y Promega), con algunas modificaciones (Tabla 1).

**Tabla 1:** Enzimas de restricción usadas para la digestión de los plásmidos.

Enzimas de restricción	Concentración	Volumen final
<b>NotI</b>	20 unidades/ $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>ClaI</b>	10 unidades/ $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>HindIII</b>	10 unidades/ $\mu$ l	50 $\mu$ l

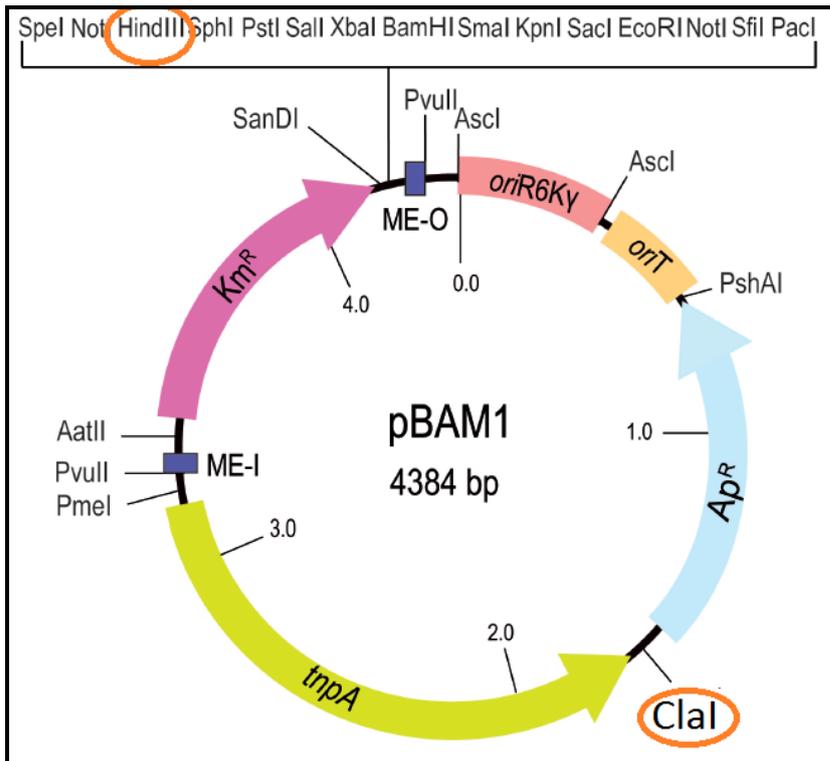
A partir de la digestión del plásmido pmTn5*gusA-pgfp21* se obtuvieron dos fragmentos, uno de 6,4 kb y otro de 5,0 kb aproximadamente. El fragmento de 6,4 kb corresponde a la región de los

dos genes que codifican para la proteína GFP, el gen *gus* y el gen de resistencia a kanamicina (Fig. 2). El resto del vector no fue utilizado para la construcción de la sonda y corresponde al fragmento de 5,0 kb. Cabe mencionar que no poseemos la secuencia completa para el transposón empleado, por ello las digestiones virtuales fueron realizadas con el plásmido mTn5 pFAJ1819 el cual se encuentra secuenciado.



**Figura 2:** Representación de la sonda generada para el transposón miniTn5*gusA-pgfp*, las fechas indican los sitios de corte de la enzima NotI. En el esquema se observan los genes codificantes para GFP, el gen *gusA*, los las letras O e I representan los aminoácidos amino-terminales de GFP y GusA. (Imagen tomada de Xi *et al.*, 1999).

El plásmido p-BAM fue digerido con las enzimas HindIII y ClaI y se obtuvieron dos fragmentos de 1,8 kb y 2,5 kb. El fragmento utilizado para la construcción de la sonda fue el de 2,5 kb, el mismo corresponde a los genes que codifican para la transposasa y el gen que codifica para la resistencia a kanamicina (Fig.3).



**Figura 3:** Mapa del plásmido p-BAM. Elementos funcionales del plásmido incluyendo los sitios de restricción para Hind III y ClaI (usadas para realizar la sonda), antibióticos (ampicilina Ap, kanamicina Km), transposasa (TnpA), origen de replicación (R6K), origen de la región de transferencia (OriT), elementos mosaicos (ME-O y ME-I). (Extraído y modificado de Martínez- García *et al.*, 2011).

### iii. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 0,8 % en solución TBE 0,5 X [54 g/l de tris, 27,5 g/l de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8]. Una vez realizada la solución de agarosa se le incorporó el colorante *SYBR Safe DNA* de Invitrogen, así una vez realizada la corrida electroforética poder visualizar las bandas. Se sembraron 45 µl de cada muestra con el fin de que se separen las bandas y de esta forma poder escindir el fragmento de interés, que luego será utilizado como sonda. Las muestras se mezclaron con solución de carga 5X (BioRad) antes de ser colocados en los carriles. La corrida electroforética se realizó empleando como solución de corrida TBE 1 X a 85 Volt durante 45 minutos aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, el gel es llevado al transiluminador (Biometra-T13) donde se recortaron las bandas de interés.

A partir de las bandas escindidas del gel de agarosa se realizó la purificación de las mismas, para ello se utilizó el kit comercial (Isolate PCR and Gel kit) de Bioline, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.1.2- Biotinilado de las sondas**

Una vez que obtuvimos los fragmentos de ADN se procedió a biotinarlos. Se partió de 100 ng de cada fragmento, al cual se le incorporaron (en hielo) 20  $\mu$ l de la solución de *Random Primers* 2,5X (125 mM Tris-HCL (pH 6,8), 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM 2-mercaptoethanol, 750  $\mu$ g/ml oligodeoxyribonucleotidos). Luego de incorporar la solución de *Random Primers* se desnaturalizó por calor (55 °C) durante 5 minutos. Transcurrido dicho tiempo se le agregó 5  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs 10X (1 mM biotina-14-dCTP, 1mM dCTP, 2mM dATP, 2mM dGTP, 2 mMdTTP en 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM Na<sub>2</sub> EDTA) y se lo llevó a un volumen final de 50  $\mu$ l, en hielo. Se le agregó 1  $\mu$ l del fragmento de *Klenow* (40 U/ $\mu$ l fragmento *klenow* en 50 mM de KPO<sub>4</sub> (pH 7,0), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 50 % de glicerol), se homogenizó la mezcla y se centrifugó durante 30 segundos. La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Por último se incorporó 5  $\mu$ l del buffer stop y se conservó a -20 °C.

Las sondas biotiniladas obtenidas se purifican utilizando el kit comercial (Isolate PCR and Gel) de Bioline.

#### **i. Determinación del nivel de biotinilación de las sondas**

Una vez obtenidas las sondas biotiniladas y purificadas se corroboró si las mismas emitían señal en distintas concentraciones. Tanto la cantidad de sonda marcada como la cantidad de biotina incorporada en la sonda deben ser adecuadas para la hibridación y la detección.

Para ello se realizaron seis diluciones seriadas de las sondas (1:10) en 0,1 N de hidróxido de sodio (NaOH), partiendo de 1  $\mu$ l de sonda. Se colocó sobre una membrana de nylon 1  $\mu$ l de cada dilución, luego se incubó aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de que las mismas se secaran. Se expuso la membrana en UV durante 1 minuto, permitiendo de esta forma la unión covalentemente del ADN a la membrana. Luego se procedió con la detección de la señal.

### **3.1.3- Detección y revelado de las membranas**

#### **i. Detección de biotinilación y revelado de las membranas**

Una vez que se expuso la membrana durante 1 minuto a luz UV, se colocó en un bolsa de hibridación para realizar la detección de los niveles de sonda biotiniladas (Fig. 4).

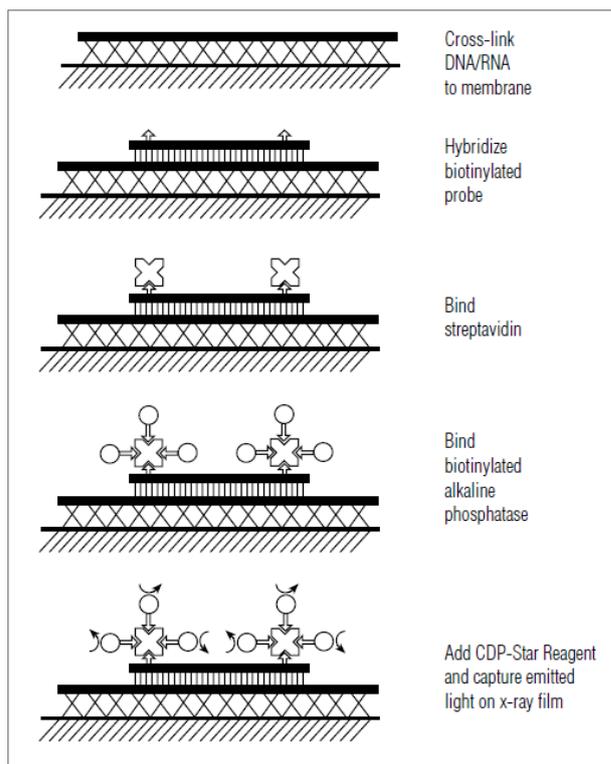
Para el revelado se utilizó el kit comercial Phototope Star Detection de New England, el protocolo se detalla a continuación (Fig. 4) y las soluciones empleadas en cada paso se muestran en Tabla 2.

**Tabla 2:** Soluciones empleadas para el revelado de las membranas luego de la transferencia. Se detalla la composición de cada solución, extraído del kit Phototope Star Detection de New England.

<b>Soluciones</b>	<b>Composición</b>
<b>Solución de detección A</b>	5 % SDS, 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 8 mM de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) y 125 mM de NaCl, pH 7,2
<b>Solución de detección B</b>	0,5 % de SDS, 2,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 8 mM de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), y 12 mM de NaCl
<b>Solución de detección C</b>	100 mM de Tris- HCl, 100 nM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5.

- 1- Lavado con solución de detección A. La solución se incorpora a la bolsa de hibridación donde se encuentra la membrana. Se utilizó 0,1 ml de solución de detección A por cada cm<sup>2</sup> de membrana. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego se retiró la solución y se continuó con el siguiente paso.
- 2- Exposición de la membrana con estreptavidina (Fig. 4). La estreptavidina es una proteína que se caracteriza por su extremada afinidad con la biotina. La exposición de la membrana con estreptavidina permite que ésta se una a la sonda previamente biotinilada. Para ello se utilizó 0,05 ml de estreptavidina (stock de estreptavidina (1 mg/ml) diluida 1:1000 con la solución de detección A) por cm<sup>2</sup> de membrana y se incubó durante 5 minutos en agitación.
- 3- Lavado con solución de detección B. Para ello se utilizó 0,5 ml de la solución por cm<sup>2</sup> de membrana. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró la solución.
- 4- Incubación con fosfatasa alcalina biotinilada (Fig. 4). El stock de fosfatasa alcalina biotinilada empleado fue de 0,5 mg/ml y se diluyó 1:1000 con la solución de detección A, empleando 0,05 ml por cm<sup>2</sup> de membrana. Se incubó 5 minutos con agitación, finalizada la misma se retiró la solución.

- 5- Lavado con solución de detección A (descrito en el paso 1).
- 6- Solución de detección C. Se realizaron dos lavados utilizando 0,5 ml por cm<sup>2</sup> de membrana, se incubó cada lavado durante 5 minutos con agitación. Se retiró la solución finalizada la incubación.
- 7- Detección del ADN (Fig. 4). Se utilizó el reactivo CDP-Star Reagent. La fosfatasa alcalina cataliza la eliminación del fosfato del CDP-Star Reagent (fenilfosfato sustituido 1,2 por dioxetano) para producir un intermediario estable el cual decae espontáneamente emitiendo luz a 461 nm. La luz emitida se detecta exponiendo la membrana a una película de rayos X. Para la detección se empleó el buffer CDP-Star Reagent 1X (25 mM) más CDP-Star Reagent, las condiciones varían según el nivel de sensibilidad esperado. En nuestro caso se diluyó 25 µl CDP-Star Reagent en 2,5 ml del buffer 1 X CDP-Star Reagent. Se incubó durante 5 minutos en agitación. Luego se retiró cuidadosamente la solución a fin de que la membrana quede sin restos de solución.



**Figura 4:** Proceso de detección quimio luminiscente. Dicho proceso es llevado a cabo mediante sucesivos pasos de incubación con estreptavidina, fosfatasa alcalina biotinilada, y CDP-Star Reagent. Luego del agregado del reactivo la membrana se expone en una placa de rayos X con el fin de capturar la imagen. Tomado del manual de instrucciones Phototope- Star reagent de New England.

Una vez culminados los pasos de detección de la membrana, se continuó con el revelado de la misma. Para ello se expuso la membrana en *cassette* de exposición con una película de rayos X (Kodak) durante 10 minutos. Una vez expuesto el film, se reveló la película autorradiográfica en un cuarto oscuro, incubando la película de rayos X en solución reveladora (Kodak) durante unos minutos, luego se pasó por agua y por último se fijó con solución fijadora (Kodak).

### **3.1.4- Southern blot para los mutantes obtenidos mediante el sistema de conjugación con el transposón miniTn5gusA-pgfp y p-BAM**

#### **i. Extracción de ADN genómico**

En primer lugar se realizó la extracción de los ADN genómicos de los mutantes seleccionados empleando el kit comercial *GenElute Bacterial Genomic DNA* de Sigma-Aldrich.

#### **ii. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción**

El ADN genómico de los mutantes fue digerido con enzimas de restricción. Las enzimas reconocen secuencias palindrómicas complementarias en el ADN genómico y realizan cortes en el mismo. La digestión de los ADN genómicos permite que la sonda pueda hibridarse con la secuencia complementaria, la cual corresponde al transposón insertado. Además, es necesario utilizar una enzima de restricción que no realice cortes en la sonda, para facilitar el entendimiento de los resultados. Ya que, si la enzima empleada reconoce secuencias complementarias en la sonda ésta es capaz de realizar cortes en la misma, obteniendo de esta forma más de un fragmento.

Las enzimas de restricción empleadas fueron determinadas mediante el programa ApE. Éste nos permitió determinar cuáles enzimas utilizar según el sistema de conjugación empleado, ya sea con el transposón miniTn5gusA-pgfp o p-BAM.

Para los clones transconjugantes generados con el miniTn5gusA-pgfp se realizó la digestión de 6 mutantes empleando la enzima de restricción PvuI (New England). La misma no posee sitios de corte en el plásmido pmTn5gusA-pgfp21.

Para los transconjugantes p-BAM se empleó la enzima de restricción NdeI (Fermentas) la cual no posee cortes en el plásmido p-BAM.

Para realizar las digestiones se siguieron las instrucciones del fabricante de las enzimas de restricción usadas, con algunas modificaciones. La digestión de los ADN genómicos de los clones mutantes y de Pr2921 (utilizado como control negativo) consistieron en: 3 µl de ADN genómico, 2 µl de buffer 10 X correspondiente a la enzima utilizada, 1,5 µl de enzima PvuI o NdeI y se le adicionó agua hasta llegar a 20 µl de volumen final. Para la digestión del ADN de los plásmidos se utilizó 5 µl de ADN de los plásmidos, 2 µl del buffer 10 X correspondiente a cada enzima más 1 µl de la enzima llevándolo a un volumen final de 20 µl.

Todas las digestiones se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

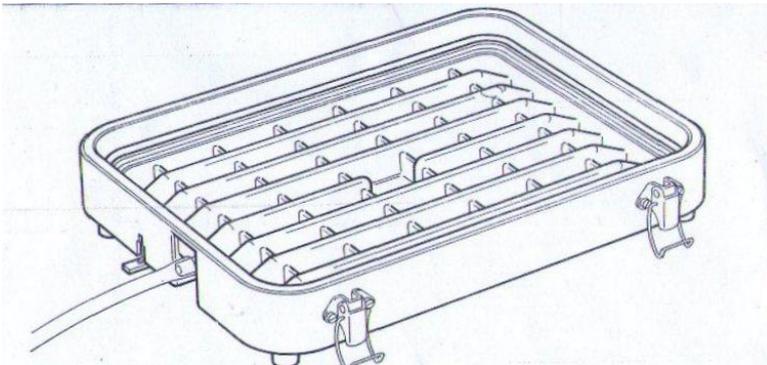
### **iii. Electroforesis en gel de agarosa**

Luego de la digestión de los ADN genómicos de los mutantes y de los respectivos controles se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 0,7 % en solución TBE. Se sembró 20 µl de las digestiones de los mutantes y los controles negativos, 2 µl de la digestión del plásmido, 6 µl del marcador de peso molecular (1 kb plus de Fermentas). Las muestras se mezclaron con solución de carga 5X (BioRad) antes de ser colocadas en los carriles. La corrida electroforética se realizó empleando como solución de corrida TBE 0,5X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos.

Finalizada la corrida electroforética, el gel no se tiñó, para que no haya interferencias en la transferencia. Se expuso el gel a UV durante 5 minutos para facilitar la transferencia.

### **iv. Transferencia**

Previo a la transferencia, se cortó una membrana de nylon de mayor tamaño que el gel, la misma se humedeció con agua desionizada y luego en buffer de transferencia, citrato de sodio salino (10 X SSC) por 5 minutos. Además, se humedeció la lámina porosa (capa absorbente ubicada sobre el equipo de transferencia, donde se coloca la membrana de nylon, Fig.5) con agua desionizada. Luego se colocó la membrana sobre la lámina porosa, se cubrió con una lámina de nylon dejando libre el espacio para transferir, donde fue colocado el gel.



**Figura 5:** Equipo de transferencia conectado a una bomba de vacío. Sobre este dispositivo se coloca una lámina porosa, luego la membrana de nylon seguido por el gel. A través del pasaje de distintas soluciones y aumento de la presión generando mayor vacío ocurre la transferencia.

Una vez colocado el gel sobre la membrana en el equipo de transferencia se realizó el vacío a baja presión (30 mbar) para hacer ingresar las soluciones que permiten la transferencia sobre la membrana de nylon. Primeramente se cubrió el gel con solución depurinizante de HCl (0,25 M HCl) durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo se retiró la solución depurinizante y se colocó la solución desnaturizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 7 minutos, esta solución se retiró y se incorporó la solución neutralizante (1,0 Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5) durante 7 minutos. Luego se transfirió por una hora con la solución de transferencia SSC 10 X a una presión de 50 mbar.

Finalizada la transferencia, se colocó la membrana entre dos papeles Wathman y se dejó secar en estufa 68 °C durante una hora. Luego se entrecruzó el ADN exponiendo la membrana a luz UV durante 1 minuto.

#### v. Pre- hibridación

La membrana se humedeció en solución 6 X SSC, luego se colocó en un frasco de hibridación. Se incubó en solución de pre-hibridación (6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µl/ml de ADN de espermatozoos de salmón desnaturizado y 50 X de buffer Denhardtts (1% Ficoll, 1%, polivinilpirrolidona y 1% seroalbúmina bovina)) durante 1 hora a 68 °C.

Se utilizó 0,1 ml de solución de pre-hibridación por cm<sup>2</sup> de membrana.

#### vi. Hibridación

La hibridación de la membrana se realizó incorporando 20 ng/µl de sonda desnaturizada

(previamente calentada a 100 °C durante 5 minutos y mantenida en hielo por 10 minutos) a la solución de pre- hibridación. Para lograr la hibridación se incubó durante toda la noche a 68 °C.

#### **vii. Detección y revelado**

La detección y revelado de las membranas se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la detección y revelado de sondas.

### **4- Identificación de la localización de la inserción del transposón miniTn5gusA-pgfp y p-BAM en los clones transconjugantes seleccionados**

Para la identificación de los genes mutados en las cepas seleccionadas se empleó la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de los productos obtenidos.

#### **4.1- Amplificación de ADN (PCR arbitraria)**

Mediante la técnica de amplificación de ADN se analizaron los sitios de inserción de los transposones utilizados.

Se realizaron dos rondas de PCR empleando cebadores diseñados de forma arbitraria (ARB6 y ARB2) los cuales hibridan con secuencias arbitrarias del genoma de los mutantes y cebadores para la región interna y externa del gen que codifica para la proteína GFP, en los mutantes obtenidos por el sistema miniTn5gusA-pgfp. Para los mutantes obtenidos por conjugación utilizando el transposón p-BAM se utilizaron cebadores arbitrarios (ARB6 y ARB2) y cebadores interno y externo (ME-I). El cebador ME-I se caracterizó por Zhou et al., 1998 donde ME son secuencias en mosaicos (repetidos invertidos) de 19 pb introducidas al plásmido p-BAM, la denominación ME-I la realizó Martínez-García *et al.*, 2011.

Los cebadores arbitrarios utilizados se obtuvieron de la bibliografía Martínez-García *et al.*, 2011, previamente descritos por Partt & Kolter en 1998; mientras que las cebadores para miniTn5gusA-pgfp y de p-BAM fueron proporcionados por el Dr. Raúl Platero del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. A continuación se detallan las secuencias de los cebadores empleados.

**Tabla 3:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para cada PCR.

Nombre	Secuencia	Uso	Referencia
<b>ARB6</b>	GGCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	1° ronda de PCR	Pratt LA & Kolter R, 1998
<b>ARB2</b>	GGCACGCGTCGACTAGTAC	2° ronda de PCR	Pratt LA & Kolter R, 1998
<b>ME-I-extR</b>	CTCGTTTCACGCTGAATATGGCTC	1° ronda de PCR	Martínez-García <i>et al.</i> , 2011
<b>ME-I-intR</b>	CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATA	2° ronda de PCR	Martínez-García <i>et al.</i> , 2011
<b>GFP-extR</b>	GGGTAAGTTTCCGTATGTTGCATC	1° ronda de PCR	Martínez-García <i>et al.</i> , 2011
<b>GFP-intR</b>	GCCCATTAACATCACCATCTAATTC	2° ronda de PCR	Martínez-García <i>et al.</i> , 2011

Para ambos sistemas la amplificación mediante PCR se realizó en base al protocolo descrito por Martínez-García *et al.*, 2011 con algunas modificaciones.

#### **i. Condiciones de PCR**

El análisis del sitio de inserción del transposón fue realizado mediante dos rondas de PCR. En ambas rondas se utilizaron las mismas condiciones, solo que el ADN molde utilizado en la segunda ronda corresponde al producto de amplificación de la primera ronda.

La mezcla de reactivos empleada para la amplificación en ambas rondas fue la siguiente: buffer 10X (con MgCl<sub>2</sub>), dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,2 µM, Dream Taq Polimerasa (Fermentas) 5 u/µl, ADN 1 µl (dilución 1:20 de los ADN genómicos empleados los cuales tenían una concentración inicial de 60 ng/µl) y agua ultrapura para completar un volumen final de 50 µl. Las concentraciones iniciales de los cebadores ARB6 y ARB2 fueron de 5 µM, para el cebador ME-I de 10 µM. El programa de ciclado se detalla en las tablas 4 y 5.

ii. Ciclos empleados en la amplificación del ADN

Primera ronda de PCR

**Tabla 4:** Ciclos de amplificación empleados en la primera ronda de PCR.

<b>6 CICLOS</b>		
	Temperatura	Duración
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 seg
<i>Anneal</i>	30°C	30 seg
<b>Extensión</b>	72°C	1 min y 30 seg
<b>30 CICLOS</b>		
	Temperatura	Duración
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 seg
<i>Anneal</i>	45°C	30 seg
<b>Extensión</b>	72°C	1 min y 30 seg
<b>Periodo de extensión extra: 4 min a 72°C</b>		

Los cebadores empleados para los mutantes miniTn5gusA- *pgfp* en la primera ronda fueron; ARB6 Y GFP-extR. En el caso de los mutantes p-BAM se utilizaron los cebadores ARB6 y ME-I-extR.

Segunda ronda de PCR

El ADN molde empleado para realizar la segunda ronda fue el producto de amplificación que obtuvimos en la primera ronda.

**Tabla 5:** Ciclos de amplificación empleados en la segunda ronda de PCR.

<b>1 min a 95°C</b>		
<b>30 CICLOS</b>		
	Temperatura	Duración
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 seg
<i>Anneal</i>	52°C	30 seg
<b>Extensión</b>	72°C	1 min y 30 seg
<b>Periodo de extensión extra: 4 min a 72°C.</b>		

Se utilizaron los cebadores ARB2 para los dos sistemas y GFP-intR para los clones miniTn5gusA-*pgfp*; en el caso de los clones p-BAM se utilizó el cebador ME-I-intR.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Labnet.

### **iii. Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos obtenidos en el segundo ciclo de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los gels de agarosa se prepararon al 0,8 %, en solución TBE. Previo a la siembra las muestras se mezclaron con solución de carga 5X (BioRad). Una vez sembradas las muestras se realizó la corrida empleando como solución de corrida TBE 0,5X a 90 Volt durante 30 minutos aproximadamente. Para visualizar el ADN se tiñó el gel durante 30 minutos con el colorante Gel Red, y se lo observó en el transiluminador (MacroVue Uvis- 20, Hoefer Inc).

## **4.2- Secuenciación de los segmentos amplificados**

Los fragmentos de interés se enviaron al servicio de Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciación. Así, las secuencias flanqueantes al sitio de inserción del transposón fueron comparadas con las de *P. mirabilis* HI4320, cepa cuyo genoma se ha secuenciado (Pearson *et al.*, 2008), de esta manera se identificaron los genes involucrados en la formación de biofilms.

### **i. Análisis de las secuencias**

Una vez obtenidos los resultados de las secuencias se procedió con el análisis de las mismas. Para ello se utilizaron las siguientes herramientas, Biological sequence alignment editor (BioEdit) y la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), disponibles en la web con el fin de identificar los genes involucrados en la formación del biofilm.

# RESULTADOS

## 1- Colección de clones transconjugantes

Para realizar el siguiente estudio se empleó la colección de 1700 clones generados a partir del sistema miniTn5*gusA-pgfp* y 315 clones del sistema p-BAM obtenidos en el Departamento de Microbiología del IIBCE.

## 2- Selección de clones con capacidad alterada en la formación de biofilms

Los clones fueron evaluados respecto a su capacidad de formar biofilm mediante la tinción con cristal violeta. La tinción con CV permitió seleccionar aquellos clones que tuvieran formación de biofilm diferencial respecto a la cepa parental Pr2921. Se consideró formación de biofilm disminuida cuando el valor de absorbancia 540 nm fue  $\leq 0,25$  unidades y formación de biofilm incrementada cuando superó 1,2 unidades de absorbancia (Villegas *et al.*, 2013). La cepa parental salvaje *P. mirabilis* Pr2921 fue usada en todos los ensayos como control siendo su Abs<sub>540</sub> de 0,9 unidades de absorbancia. Como blanco se empleó medio LB sin bacterias.

### i. Sistema miniTn5*gusA-pgfp*

De los 1700 clones se obtuvieron 38 clones que exhibieron una capacidad para formar biofilms alterada, tanto de forma disminuida como incrementada. De los 38 clones, 19 presentaron baja formación de biofilm, y 19 alta formación de biofilms. Los ensayos realizados con el sistema miniTn5*gusA-pgfp* no mostraron resultados concluyentes, por lo tanto los mismos no se detallan a continuación (ver Anexo).

### ii. Sistema p-BAM

Se analizaron 315 clones, mediante la técnica de CV con el fin de determinar cuáles poseían capacidad alterada en la formación de biofilms. A continuación se detallan los resultados de Abs<sub>540</sub> de los clones que presentaron formación de biofilm alterada (Tabla 6 y 7).

**Tabla 6:** Valores de Abs<sub>540</sub> promedio de los clones que presentaron baja formación de biofilm.

N° de clon	Abs <sub>540</sub> Promedio
1.10	0,177
1.13	0,082
1.17	0,042
1.21	0,242
1.23	0,133
1.36	0,038
1.38	0,205
5.18	0,090
5.21	0,099
97.33	0,149
88.24	0,186
82.1	0,134

**Tabla 7:** Valores de Abs<sub>540</sub> promedio de los clones que presentaron alta formación de biofilm.

N° de clon	Abs <sub>540</sub> Promedio
1.26	1,64
1.29	1,211
3.3	1,217
3.5	1,926
3.39	1,209
3.40	1,266
96.41	1,234
93.41	1,226
123.22	1,283

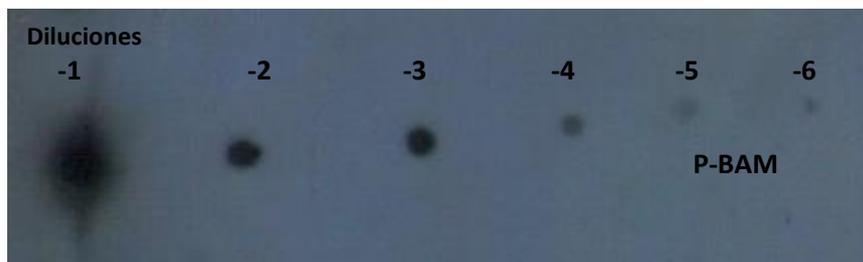
En total se obtuvo un 3, 8 % de clones con baja formación de biofilm y un 2,5 % de clones con formación de biofilm alta.

### 3- Caracterización genética de los mutantes e identificación de los genes relacionados con la formación del biofilms.

#### 3.1- Análisis de los clones seleccionados mediante la técnica Southern blot

##### i. Construcción y biotilación de las sondas

A partir de la sonda construida como se detalló anteriormente se determinó el nivel de biotilación realizando diluciones seriadas de la misma. Como se puede apreciar en la Fig. 6 la sonda está biotilada y generó una señal en todas las diluciones.



**Figura 6:** Southern Blot de la sonda biotilada. La figura corresponde a la película de rayos X obtenida luego de la detección y revelado de la membrana la cual contiene las diluciones (1:10) de la sondas construida a partir del plásmido p-BAM.

##### ii. Clones obtenidos mediante el sistema p-BAM

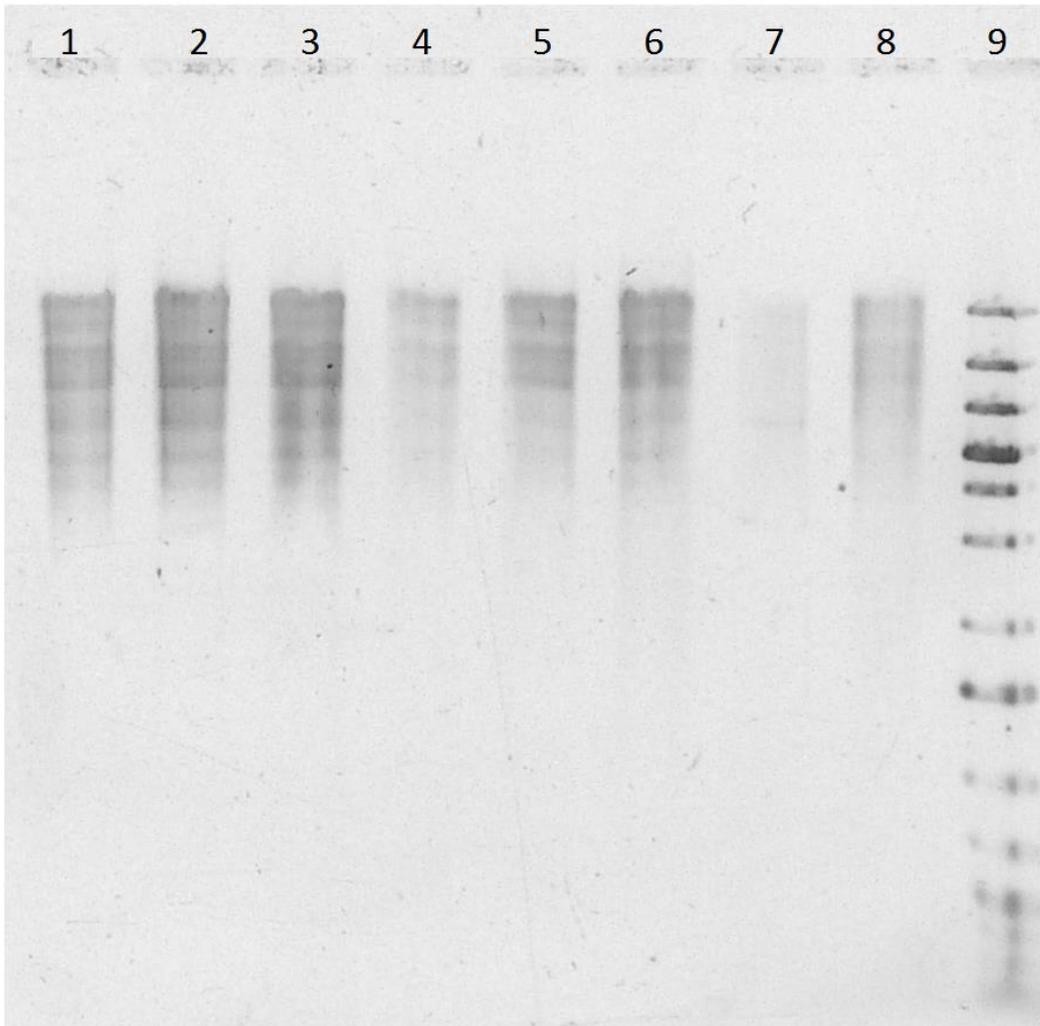
Se emplearon 6 clones transconjugantes del sistema de conjugación con el plásmido p-BAM (Tabla 8).

**Tabla 8:** Clones seleccionados mediante el sistema p-BAM, empleados para el análisis mediante Southern blot y PCR.

N° de clon	Clones seleccionados	Abs <sub>540</sub> promedio
38	93.41	1,226
39	96.41	1,234
40	97.33	0,149
41	88.24	0,186
42	82.1	0,134
43	123.22	1,283

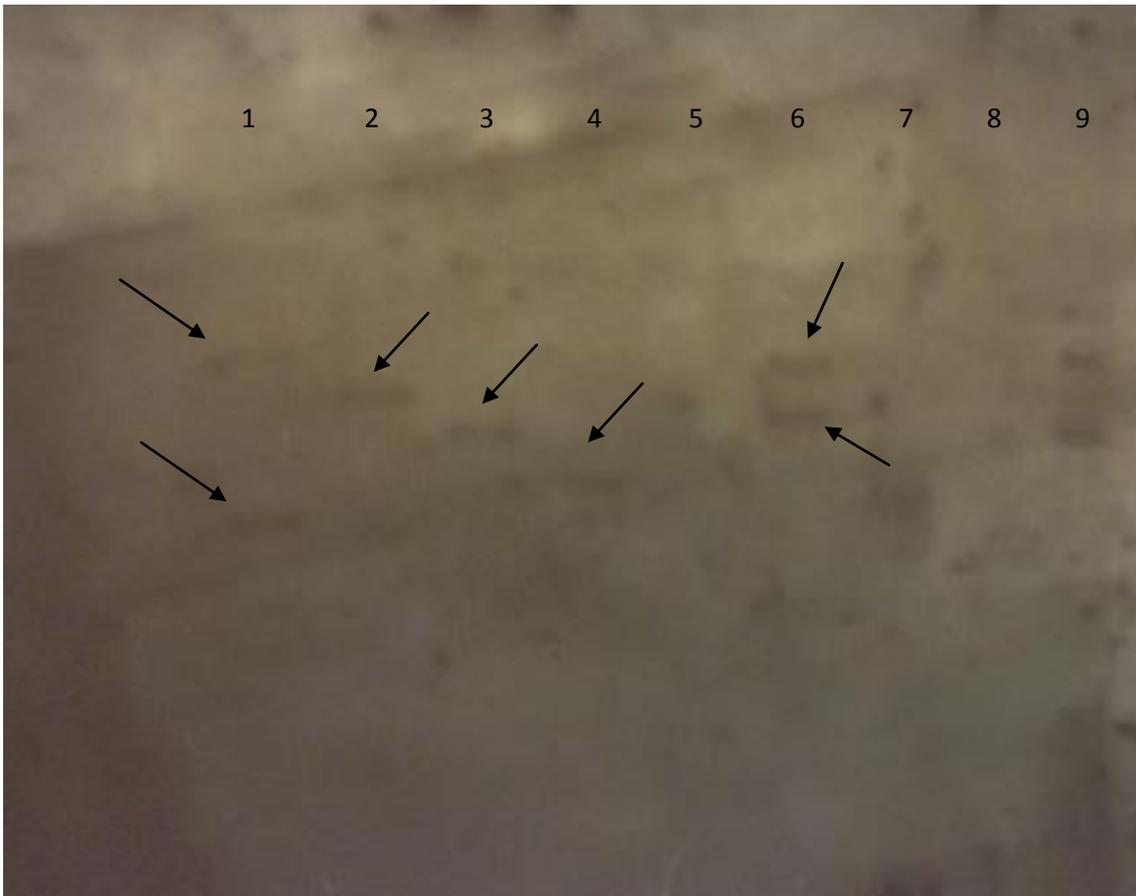
Se evaluó la presencia de una única inserción del transposón mediante la técnica Southern blot. Para ello se digirieron los ADN genómicos de los clones con la enzima NdeI la cual no posee sitios de corte en el plásmido y por lo tanto tampoco en la sonda. Como controles se emplearon el ADN genómico de *P. mirabilis* Pr2921 y el ADN del plásmido p-BAM que también fueron digeridos con la misma enzima.

Una vez finalizada la transferencia del gel sobre la membrana se tomó una foto del gel para corroborar que ocurrió la transferencia de forma exitosa (como se observa en la Fig. 7).



**Figura 7:** Gel de agarosa 0,7 % luego de la transferencia. Carriles 1-6 se observan los ADN genómicos digeridos con NdeI de los clones obtenidos mediante el sistema p-BAM. Carril 7 ADN del plásmido p-BAM, carril 8 ADN genómico de Pr2921. Carril 9 marcador de peso molecular (1 kb plus de Fermentas).

En la Fig. 8 se muestra el resultado del southern blot de los clones seleccionados, obtenidos mediante el sistema p-BAM, donde se observó la presencia de una única banda en los clones 39, 40 y 41 ubicados en los carriles 2, 3 y 4, presencia de dos bandas en los clones 38 y 43 ubicados en los carriles 1 y 6 y ausencia de bandas en el clon 42 en el carril 5.



**Figura 8:** Southern blot de clones obtenido mediante el sistema p-BAM. Película de rayos X obtenida luego de la detección y revelado de la membrana. El orden de cada carril corresponde al descrito en figura 7.

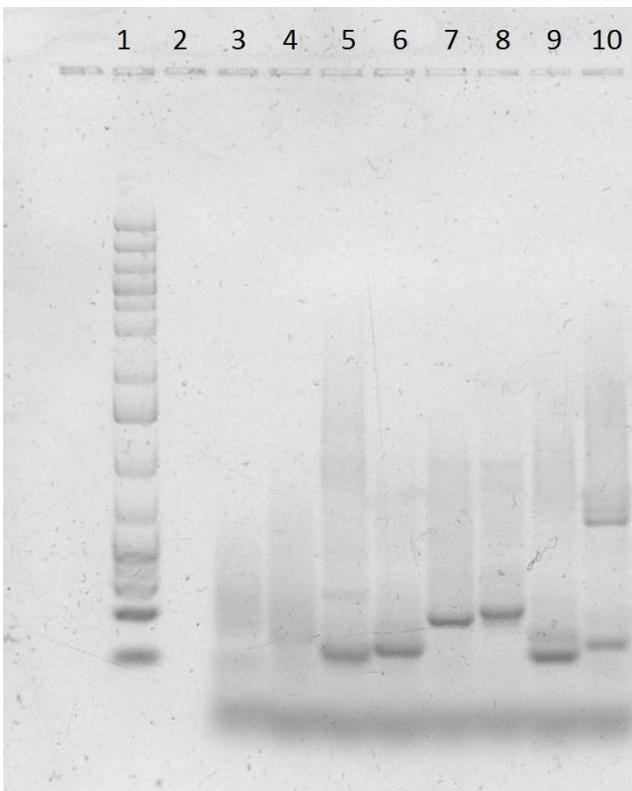
Por lo tanto los clones 39, 40 y 41, presentaron una única banda por lo que poseen una única inserción del transposon en su ADN genómico. Los clones 38 y 43, los cuales presentan dos bandas, poseen más de una inserción del transposón, presentado por lo tanto más de un gen interrumpido. El clon 42 no estaría interrumpido por el transposón ya que no observamos bandas en el southern blot.

#### 4- Identificación de la localización de la inserción del transposón p-BAM en los clones transconjugantes seleccionados

##### i. Clones obtenidos mediante el sistema p-BAM

Se realizó la amplificación del ADN de las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón, de los 6 clones transconjugantes previamente analizados obtenidos por el sistema p-BAM (Tabla 8).

En la Fig. 14 se muestran los resultados de los productos de PCR de la segunda ronda de amplificación (Fig. 9; carriles 5- 10).



**Figura 9:** Gel de agarosa 0,8 % donde se observan los productos de la segunda ronda de amplificación de ADN de los clones 38-43. Carril 1 marcador de peso molecular (1 kb plus de Fermentas). Carril 3 y 4 controles negativos. Carril 5-10 amplificación de los clones 38-43 con los cebadores ME-I.

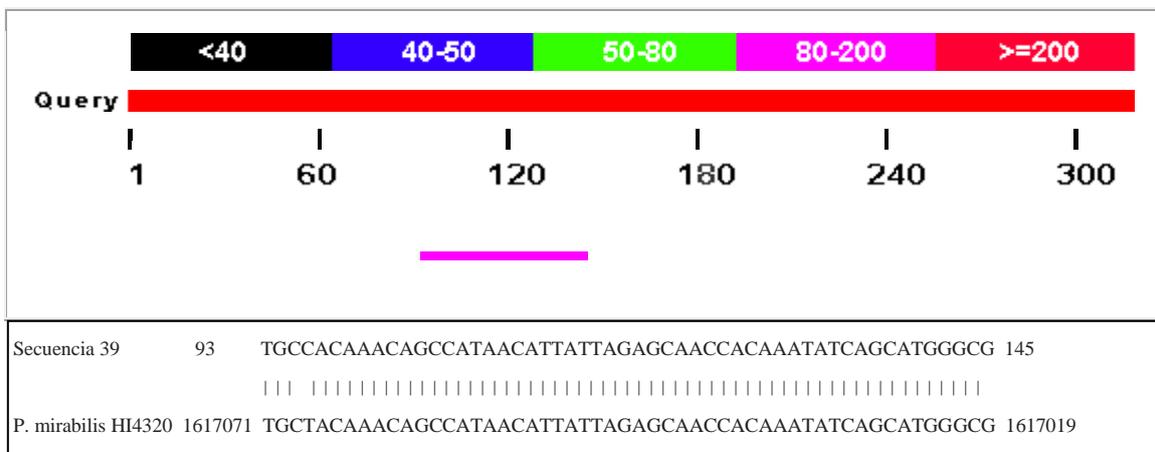
Los productos amplificados se enviaron a secuenciar a fin de conocer la identidad de los genes mutados y por tanto involucrados en la formación de biofilm.

**ii. Análisis de secuencias**

Las secuencias de los clones 39 y 40 fueron analizadas empleando la herramienta blastn. Se comparó cada secuencia obtenida con el genoma de *P. mirabilis* HI4320 el cual se encuentra disponible en las base de datos GenBank.

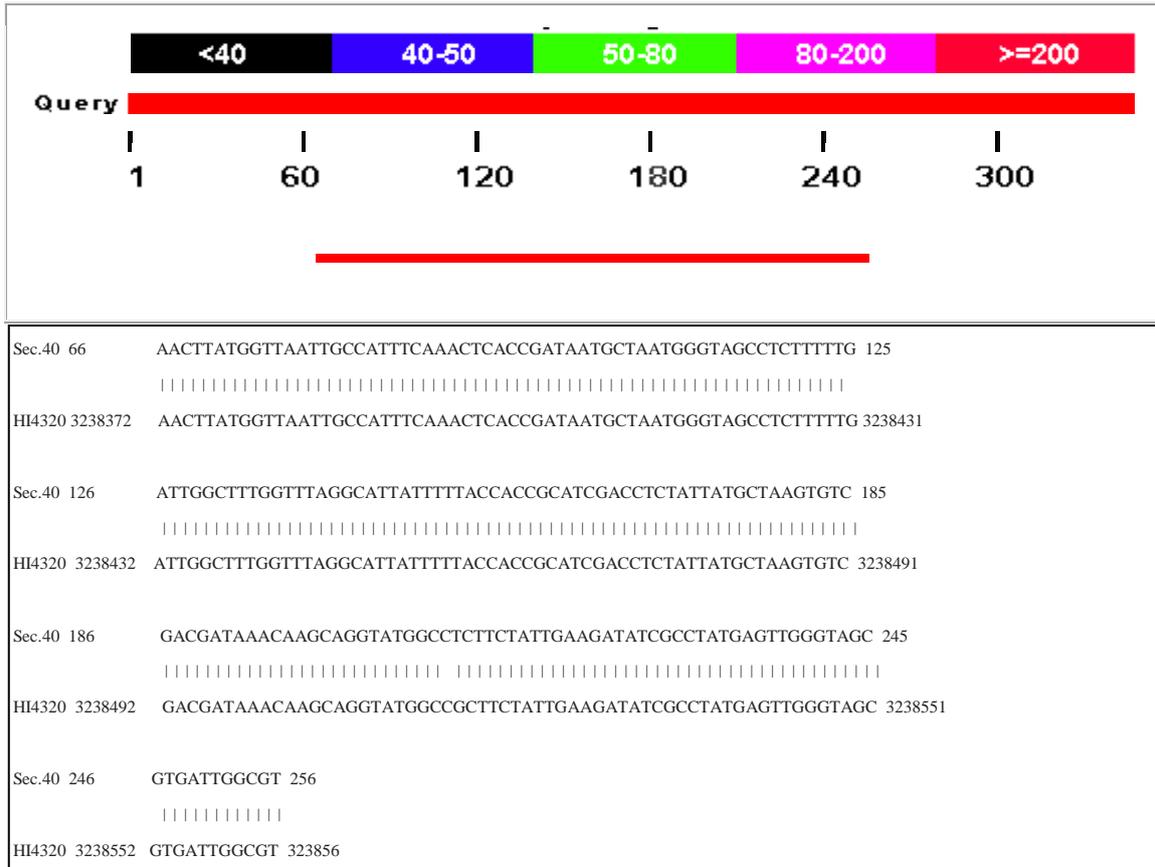
El producto de amplificación obtenido mediante la PCR del clon 39 fue de aproximadamente 200 pb, mientras que el del clon 40 fue de 300 pb. La elección de estos clones se realizó en base a que el clon 39 presentó baja formación de biofilm y el clon 40 presentó alta formación de biofilms, además ambos presentaron solo una banda en el Southern blot. Estos resultados nos indican que el transposón se insertó una sola vez en sus genomas, interrumpiendo por tanto la función de un gen (Tabla 9).

La secuencia perteneciente al clon 39 presentó un 98 % de identidad con el gen que codifica una proteína hipotética en aproximadamente 52 pb, localizado en el locus PMI1452 de *P. mirabilis* HI4320 (Fig.10). A su vez, esta proteína hipotética está relacionada con una proteína hipotética de *Bacillus subtilis* miembro de la superfamilia de las riboquinasas, presentando conservado el sitio de unión del ATP, el sitio de unión del sustrato y el sitio de unión a Mg<sup>2+</sup>.



**Figura 10:** Representación gráfica de la homología entre la secuencia 39 y el genoma de *P. mirabilis* HI4320. En la parte superior se muestra un esquema de la alineación y en la parte inferior las bases que presentan homología. Alineamiento realizado en la base de datos GenBank.

En cuanto a la secuencia perteneciente al clon 40, la misma presenta un 99 % de identidad con el gen que codifica una proteína de bomba eflujo en 190 pb aproximadamente, ubicada en el locus PMI2962 de *P. mirabilis* HI4320 (Fig. 11).



**Figura 11:** Representación gráfica de la homología entre la secuencia 40 y el genoma de *P. mirabilis* HI4320. En la parte superior se muestra un esquema de la alineación y en la parte inferior las bases que presentan homología. Alineamiento realizado en la base de datos GenBank.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo pudimos identificar dos genes, los cuales estarían involucrados en la formación de biofilms de *P. mirabilis*. El clon 39 presentó alta formación de biofilm cuando fue evaluada su capacidad de formación de biofilm en placa de poliestireno. A su vez evaluamos la presencia de un único inserto en el genoma del clon mediante la técnica Southern blot, donde corroboramos que efectivamente este presentaba un único inserto dado que observamos una única banda. El producto obtenido mediante la amplificación de la región contigua al transposón fue una secuencia la cual correspondía a una proteína hipotética.

El clon 40 fue analizado de la misma forma, donde los resultados nos mostraron que este presentaba baja formación de biofilm, presencia de un único inserto en su genoma y el producto obtenido mediante la amplificación por PCR fue de una proteína de eflujo.

**Tabla 9:** Resultados generales de los clones seleccionados para el estudio de los genes vinculados a la formación de biofilms en la cepa Pr2921 *P. mirabilis*.

<b>Mutantes</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Southern blot</b>	<b>Supuesta función/ producto de los genes interrumpidos</b>	<b>% de identidad</b>	<b><i>P. mirabilis</i> HI4320 locus</b>
<b>39</b>	AFB	1 banda	Proteína hipotética	98 %	PMI1452
<b>40</b>	BFB	1 banda	Proteína de eflujo	99 %	PMI2962

## Discusión

Los biofilms son comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (Donlan & Costerton, 2002). Los biofilms son relevantes en diversos contextos, en particular en el ámbito médico y clínico donde se asocian a algunos tipos de infecciones crónicas y a aquéllas causadas por implantes médicos (Costerton *et al.*, 1999).

Entre los implantes médicos más comúnmente usados se ubican los catéteres urinarios (Darouiche, 2001). La relevancia clínica del uso de catéteres se manifiesta en el desarrollo de infecciones urinarias, que afectan muy frecuentemente a pacientes que se encuentran bajo cateterización prolongada. Estas infecciones están asociadas a la formación de biofilms en la superficie de los catéteres (Trautner & Darouiche, 2004). La formación de un biofilm se ha descrito como un proceso secuencial altamente regulado compuesto por varias etapas diferenciadas en las cuales están implicados diversos factores bacterianos, incluyendo flagelos, adhesinas fimbriales y no fimbriales, exopolisacáridos y otros (Davey & O'Toole, 2000; Costerton *et al.*, 2003).

El agente etiológico más comúnmente aislado en las infecciones urinarias asociadas a catéteres es *P. mirabilis* (Mobley, 1996), el cual da lugar a biofilms cristalinos que pueden obstruir el lumen del catéter y generar serias complicaciones como pielonefritis y bacteriemia (Stickler, 2008). La generación de biofilms cristalinos favorecen la supervivencia de *P. mirabilis* en el tracto urinario, permitiendo de esta forma la adhesión de los microorganismos a las superficies y protegiéndolos de la acción de antibióticos y la respuesta inmune del hospedero (Hoyle *et al.*, 1992).

El objetivo de este estudio fue seleccionar cepas mutantes de *P. mirabilis* que exhibieran alteraciones significativas en la formación de biofilms e identificar los genes mutados.

Para cumplir los objetivos propuestos se partió de una colección de mutantes generada en nuestro laboratorio (Departamento de Microbiología del IIBCE). A los cuales se les evaluó la capacidad de formar biofilms en una superficie abiótica (placas de poliestireno) mediante el método de *screening* de tinción con cristal violeta. La tinción con CV es un método el cual nos permite evaluar de forma rápida la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas. Esta técnica presenta limitaciones, una de ellas es que la reproducibilidad es baja ya que las condiciones de crecimiento del biofilms, la naturaleza y concentración del solvente y el tiempo

de elución son etapas cruciales a la hora de utilizar dicha técnica. A su vez debemos tener en cuenta que tanto las células vivas como muertas y la matriz de EPS se tiñen con CV, este método no nos proporciona información real sobre el número de bacterias vivas y por lo tanto es poco adecuado para evaluar la eficacia del biofilms contra sustancias antimicrobianas (Pantanella *et al.*, 2013). De todas maneras es un método muy empleado hasta el día de hoy, tal es el caso de estudios recientes como el de Holling *et al.*, 2014, quienes evaluaron mutantes con alteraciones en la formación de biofilms mediante esta técnica.

### **Cepas mutantes con alteraciones significativas en la formación de biofilms**

En el estudio de biofilms, el uso de cepas bacterianas mutantes ha sido crucial para determinar aquellos factores que están implicados en su formación. La generación de mutantes se ha conseguido gracias al desarrollo de herramientas genéticas, las cuales nos permiten conocer las funciones de uno o varios genes como también de las rutas metabólicas implicadas en un proceso dado. Por otra parte, el empleo de placas de microtitulación de poliestireno como sustrato para la formación de biofilms y su posterior tinción con cristal violeta, ha permitido el aislamiento de un gran número de mutantes incapaces de formar biofilms (Jansen *et al.*, 2004; Kanamaru *et al.*, 2006; Klausen *et al.*, 2003A; Pratt & Kolter, 1999; Watnick & Kolter, 1999).

En nuestro trabajo empleamos este ensayo usando placas de microtitulación de poliestireno, LB como medio de cultivo y condiciones estáticas de incubación (48 hs) con el fin de seleccionar aquellos mutantes que presentaban formación de biofilms alterada con respecto a la cepa parental Pr2921. Evaluamos dos sistemas de conjugación que diferían en el plásmido que portaba la cepa donadora (*E. coli* S17 $\lambda$ pir). Por un lado estudiamos aquellos mutantes generados a partir de la inserción en su genoma del transposón miniTn5*gusA-pgfp* y por otra parte los mutantes generados con el plásmido p-BAM. A partir del sistema miniTn5*gusA-pgfp* se obtuvo un 2,23 % de mutantes defectivos, mientras que con el sistema p-BAM se obtuvieron 6,3 %.

Consideramos que el sistema que portaba el plásmido p-BAM fue más exitoso, dado que obtuvimos más clones ampicilina sensible, el patrón de bandas en el Southern blot fue más claro sugiriendo que algunos de los clones estudiados presentaban un solo inserto y fue posible obtener amplificación de las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón. Mientras que con el empleo del sistema miniTn5*gusA-pgfp* obtuvimos menos mutantes y a su vez los resultados del Southern blot no fueron concluyentes. Sin embargo, el grupo de Holling *et al.*,

2014 presentó los resultados del estudio de las bases genéticas en la formación de biofilms de *P. mirabilis*, donde para la generación de mutantes utilizaron el transposón miniTn5km, obteniendo un 15 % de mutantes de *P. mirabilis* defectivos en la formación de biofilms. El porcentaje que ellos generaron fue mayor al nuestro, hay que destacar que se trata de un miniTn5 diferente al usado en este estudio. Además, debemos tener en cuenta que la capacidad de mutagénesis de *P. mirabilis* es baja. Estudios pioneros realizados por Belas *et al.*, 1991, quienes estudiaron la mutagénesis por transposición en *P. mirabilis*, determinaron que no todos los sistemas de transposición eran efectivos para *P. mirabilis*. Dichos autores observaron que transposones como mini-Mu y mini-Tn10 no eran exitosos en la mutagénesis generando menos mutantes. Mientras que el transposón Tn5 presenta una alta frecuencia de transposición. Este resultado concuerda con De Lorenzo *et al.*, 1990 quienes construyeron una serie de derivados del Tn5 donde, observaron que el miniTn5 presentaba una elevada frecuencia de transposición en bacterias gram negativas.

Como conclusión de lo planteado anteriormente podemos inferir que el sistema miniTn5*gusA-pgfp* no sería adecuado para la generación de mutantes dado su baja efectividad empleando la cepa *P. mirabilis* Pr2921 de origen clínico. Sin embargo, el sistema p-BAM presenta varias ventajas, en primer lugar presenta una alta efectividad en la generación de mutantes, a su vez el transposón se inserta una única vez en el genoma de las mutantes, siendo esto corroborado por la técnica de Southern blot.

### **Caracterización genética de los mutantes e identificación de los genes relacionados con la formación del biofilms**

El Southern blot es una técnica de análisis de ADN que ha encontrado una amplia aplicación en la biología molecular. Se ha utilizado para el descubrimiento y mapeo de genes y tiene aplicaciones de diagnóstico y forenses, incluyendo la detección de mutaciones en muestras de pacientes y huellas de ADN en investigaciones criminales (Croning *et al.*, 2010). El Southern blot ha sido empleado como el método definitivo para la detección de la integración de secuencias en el genoma. La técnica emplea una sonda de ADN marcada para detectar una secuencia de ADN específica en una muestra de ADN, el cual previamente se debe separar por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel. Este paso es crítico para la técnica, ya que la sonda debe ser única para el locus diana a fin de no estropear la hibridación con otro ADN endógeno en la muestra (Belas *et al.*, 1998).

En nuestro caso, buscamos mediante la técnica de Southern blot la secuencia correspondiente a parte del transposón insertado en el genoma de los clones. Mediante el empleo de la misma pudimos seleccionar aquellos clones que solo presentaban una única inserción en el genoma. Y por tanto seleccionar aquellos clones que tenían interrumpido solamente un gen.

Para el sistema miniTn5*gusA-pgfp*, los Southern blot realizados a los distintos clones presentaron varios patrones de bandas. Por tanto, no pudimos concluir que estos presentaran una única inserción del transposón en su genoma, lo cual no nos permitió avanzar con el estudio de los mismos. Sin embargo, los clones obtenidos mediante el sistema p-BAM mostraron resultados concluyentes, donde pudimos seleccionar aquellos clones los que presentaron un único inserto en su genoma y de esta forma continuar con su análisis.

Para la identificación de los genes mutados en los clones seleccionados se empleó la técnica de PCR, la cual nos permitió amplificar los sitios de inserción del transposón y posterior secuenciación de los productos obtenidos. Los resultados nos mostraron que como suponíamos la formación de biofilms involucra la participación de varios genes. En el presente trabajo obtuvimos las secuencias correspondientes a los genes de una proteína hipotética y una proteína de eflujo. Observando que las secuencias correspondientes a la proteína hipotética y la proteína de eflujo estarían involucrados en la formación de biofilms. Además, el clon el cual el gen interrumpido correspondía a una proteína hipotética presentó incrementada la formación de biofilm mientras que el clon donde identificamos la proteína de eflujo presentó capacidad de formar biofilm disminuida respecto a la cepa parental salvaje Pr2921. De esta forma identificamos dos genes los cuales al estar interrumpidos alteraban el fenotipo formador de biofilms de *P. mirabilis* Pr2921 y por tanto estarían involucrados en el proceso de formación de biofilm.

Más aún, en el trabajo realizado por Holling y colaboradores en el presente año identificaron genes involucrados en la formación de biofilms. Uno de los genes identificados corresponde al sistema proteico de eflujo, donde el gen identificado es *bcr*, gen de resistencia a la biciclomicina (proteína de resistencia a la sulfonamida, familia de transportadores MFS) el cual se encuentra en el locus PMI0829 de *P. mirabilis* H14320. El gen identificado corresponde a un clon el cual presenta incrementada su formación de biofilm con respecto a la cepa *P. mirabilis* B4. La secuencia obtenida por Holling *et al.*, 2014 fue comparada con nuestra secuencia codificante para la proteína de eflujo, las cuales no tenían similitud entre ellas. De esta forma observamos que se trataría de dos genes distintos.

Haciendo un estudio de los sistemas de eflujo de *P. mirabilis* H14320 observamos que se han identificado 24 genes correspondientes a dichos sistemas. A su vez cabe destacar que el rol de las bombas de eflujo en la formación de biofilms bacteriana no ha sido totalmente dilucidado. A través del presente trabajo y de lo observado por Holling *et al.*, 2014 podemos inferir que estas cumplen un papel importante en la formación de biofilms.

## Conclusiones y perspectivas

El análisis de los resultados de este estudio nos permite inferir que la formación de biofilms es un proceso complejo en el cual participan diversos genes. Dado que los biofilms de *P. mirabilis* se generan siguiendo un proceso coordinado que conduce a la formación de un patrón estructural específico, probablemente distintos genes se expresen en las diferentes etapas.

La importancia de los biofilms en la clínica así como en la industria o incluso en el ambiente, hace que la dilucidación de los aspectos moleculares vinculados a su formación y a las características de su bioarquitectura sea de particular interés. En el contexto médico y clínico, los biofilms son inequívocamente relevantes porque causan infecciones agudas y crónicas vinculadas a implantes médicos, asociadas a elevados índices de morbilidad y mortalidad.

Se continuará con los estudios de los distintos mutantes generados con el fin de identificar, en primer lugar, el gen afectado. También se determinará si la mutación afecta la expresión de genes contiguos a la inserción. Se evaluarán los mutantes a nivel fenotípico, determinando la influencia de los genes mutados en la agregación celular, movilidad *swarming* y la arquitectura del biofilm. También pretendemos estudiar la capacidad de las cepas mutantes de migrar sobre secciones de catéteres de uso clínico de distintos materiales. Además, sería de gran interés evaluar a los distintos mutantes a través de un modelo de infección experimental clásico en ratón.

# Referencias

- Adal** KA & Farr BM. (1996). Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition*. 12: 208-213.
- Archibald** LK & Gaynes RP. (1997). Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Infect Dis Clin North Am*. 11: 245-255.
- Belas** R, Erskine R, Flaherty D. (1991). Transposon Mutagenesis in *Proteus mirabilis*. *J.Bacteriol*. 173: 6289-6293.
- Belas** R, Schneider R, Melch M. (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: Identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior. *J.Bacteriol*.180: 6126–6139.
- Burmølle** M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S.(2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 72: 3916-3923.
- Burmølle** M, Ren D, Bjarnsholt T, Sørensen SJ. (2014). Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiol*. 3:1038–8.
- Carpentier** B & O. Cerf. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol*.75:499–511.
- Christensen** GD, Simpson WA, Younger JJ. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 2: 996-1006
- Cassell** EJ. (1991). The importance of understanding suffering for clinical ethics. *J Clin Ethics*. 2: 81-82.
- Costerton** JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978) How bacteria stick. *Sci Am*. 238:86-95
- Costerton**, JW. (1999 A). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*.11: 237-239.
- Costerton** JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999 B) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.
- Costerton** JW, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest*. 112:1466-1477.
- Croning** M, Fricker D, Komiyama N, Gran S. (2010). Automated design of genomic Southern blot probes. *BMC Genomics*. 11-74.
- Daruiche** RO. (2001). Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin. Infect. Dis*. 33:1567-72.
- Davies** DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280:295-8.

- Davey ME & O'Toole G.** (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:847-67.
- Davey ME, & Costerton, J W.** (2000). Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol.* 42: 13–26.
- De Lorenzo, M, Herrero, U, Jakubzik, Timmis KN.** (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.
- Dickinson GM & Bisno AL.** (1993). Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int. J. Artif. Organs.* 16:749-754
- Donlan RM & Costerton JW.** (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-93
- Dunne WM.** (2002). Bacterial Adhesion : Seen Any Good Biofilms Lately ?. *Clin Microbiol Rev.* 15: 155–166.
- Fuqua CW, Winans SC, Grennberg EP.** (1994). MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst. *J Bacteriol.* 176: 269–275.
- Foxman B.** (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon.* 49: 53–70
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 34–40
- Galván AL, Martínez LA, López CC, Villasuso MR, Saldaña MA.** (2011). “Permanencia de la sonda Foley asociada a infección urinaria y fármacorresistencia”. *Enf Inf Microbiol.* 31: 121-126.
- Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z.** (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science.* 18: 1049–1056.
- Guay DR.** (2008). Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs.* 68:1169–1205.
- Hall- Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2: 95–108.
- Hangler M, Burmølle M, Schneider I, Allermann K, Jensen B.** (2009) The serine protease Esperase HPF inhibits the formation of multispecies biofilm. *Biofouling.* 25: 667–674.
- Hartstein AI, Garber SB, Ward TT, Jones SR, Morthland VH.** (1981). Nosocomial urinary tract infection: a prospective evaluation of 108 catheterized patients. *Infect. Control.* 2:380-386
- Holling D, Lednor S, Tsang A, Bissell L, Campbell J, Nzakizwanayo C, Dedi JA, Hawthorne G, Hanlon LA, Ogilvie JP, Salvage BA, Patel LM, Barnes, Jones BV.** (2014). Elucidating the genetic basis of crystalline biofilm formation in *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* (published ahead of print).
- Hoyle BD, Alcantara J, Costerton JW.** (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2054-56

- Hooton** TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R., Geerlings SE, Rice JC, Nicolle LE. (2010). Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 50: 625–663.
- Jacobsen** SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME. (2008) Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 21:26-59.
- Jain** P, Parada JP, David A, Smith LG. (1995). Overuse of the indwelling urinary tract catheter in hospitalized medical patients. *Arch Inter Med.* 155:1425–29
- Jansen** AM, Lockatell V, Johnson DE, Mobley HLT. (2004). Mannose-Resistant *Proteus* -Like Fimbriae Are Produced by Most *Proteus mirabilis* Strains Infecting the Urinary Tract, dictate the In Vivo Localization of Bacteria , and Contribute to Biofilm Formation. *Infect Immun.* 72: 7294–7305.
- Joo** HS & Otto M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.*19: 1503–13.
- Karatan** E & Watnick P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73: 310–47.
- Kanamaru** S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, Ogawa O, Yamamoto (2006). Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 28S:S21-S25.
- Klausen** M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 48:1511-1524.
- Kolter** R. (2005). Surfacing views of biofilm biology. *Trends Microbiol.*13: 1–2.
- Kolter** R, Branda S, Vik S, Friedman L. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiol.* 13:20–6.
- Kunin** CM. (1987). Detection, prevention and management of urinary tract infections. Lea & Febiger, Philadelphia. 4: 245-88.
- Kunin** CM. (1997). *En Urinary Tract Infections; Detection, Prevention and Management.* Baltimore: Williams & Wilkins. 5:226-278
- Lazar** V. (2011). Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe.* 17: 280–285.
- Lindsay** D & von Holy A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect.* 64: 313–25.
- Li** X, Yan Z, Xu J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol.* 149: 353-362.
- Mah** TF, O’Toole G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiol.* 9:34- 39.
- Mah** T F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O’Toole GA. (2003).A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 426: 306–310.

- Martínez-García E**, Calles B, Arévalo-Rodríguez M, de Lorenzo V. (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*. 11-38.
- Maki DG & Tambyah PA.** (2001). Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg. Infect. Dis.* 7:342-347.
- McLean RJ**, Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua WC. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 154:259-263.
- Mobley HL & Belas R.** (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends in Microbiol.* 37: 280–4.
- Mobley HL.** (1996). Virulence of *Proteus mirabilis*. En Mobley HL, Warren J. (eds) *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington DC: 245-269.
- Morris NS & Stickler DJ.** (1998). Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. *J Hosp Infect.* 39: 227–234.
- Nadell CD**, Xavier JB, Foster KR.(2008). Sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol.* 33: 206-224.
- Neu TR**, Manz B, Volke F, Dynes JJ , Hitchcock AP, Lawrence JR. (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol.* 72: 1–21.
- Nicolle LE.** (2005). Complicated urinary tract infection in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*16: 349–360.
- Niël-Weise & van der Broek PJ.** (2005). Urinary catheter policies for long term bladder drainage. *Cochrane Database Syst Rev.* 25: CD004201.
- Nielubowicz GR, & Mobley HLT.** (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Rev Urology.* 78: 430–441
- O'Toole GA & Kolter R.** (1998 A). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent, signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449–461
- O'Toole GA & Kolter R.** (1998 B). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 30:295–304
- O'Toole GA**, Kaplan HB, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- Palmer RJ & White, D. C.** (1997). Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiol.* 5: 435–440.
- Pantanello F**, Valenti P, Natalizi T, Passeri D. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces : pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig.* 25:31-42.
- Pearson MM**, Sebahia M, Churcher C, Quail M, Seshasayee A S, Luscombe N, Mobley HLT. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J of Bacteriol.* 190: 4027–37.

- Pratt LA & Kolter, R.** (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30, 285–93.
- Pratt LA & Kolter, R.** (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 598–603
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P.** (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J of Bacteriology*. 181: 5993–6002.
- Rather PN.** (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* 7:1065-73.
- Renslow R, Donovan C, Shim M, Babauta J, Nannapaneni S, Schenk J, Beyenal H.** ( 2011). Oxygen reduction kinetics on graphite cathodes in sediment microbial fuel cells. *Phys Chem Chem Phys*. 13:21573–21584.
- Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K.** (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Mol. Biol Rev.* 61:65-89.
- Schlapp G, Scavone P, Zunino P, Härtel S.** (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *J Microbiol Methods*.. 87: 234–40.
- Schwering M, Song J, Louie M, Turner RJ, Ceri H.** (2013). Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*. 29: 917-28.
- Senior BW.** (1979) The special affinity of particular types of *Proteus mirabilis* for the urinary tract. *J Med Microbiol.* 12:1-8.
- Shank EA & Kolter R.** (2009). New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiol.* 12: 205–14.
- Stamm WE.** (1991). Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. *Am. J. Med.* 91:65-71.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M.** (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 40: 175 9.
- Stewart PS.** (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med. Microbiol.* 292: 107–113.
- Stickler DJ, King JB, Winters C, Morris SL.** (1993) Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *J Infect.* 27:133-135.
- Stickler DJ & Zimakoff, J.** (1994). Complications of urinary tract infections associated with devices used for long term bladder management. *J. Hosp. Infect.* 28:177-94.
- Stickler DJ.** (1996). Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*. 94:293-305.
- Stickler DJ, Morris NS, Moreno M, Sabbuba N.**( 1998). Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17:649-652.
- Stickler DJ.** (1999). Biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2: 270–5.
- Stickler DJ, Lear JC, Morris NS, Macleod SM., Downer A, Cadd DH, Feast WJ.** (2006). Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. *J Appl Microbiol.* 100: 1028–33.

- Stickler** DJ & Morgan SD. (2006). Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *J Med Microbiol.* 55: 489–94.
- Stickler** DJ & Morgan SD. (2008). Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. *J Hosp Infect.* 69, 350–60.
- Stoodley** P, Hall-Stoodley L, Costerton B, DeMeo P, Shirtliff M, Gawalt E, Kathju S. (2013). Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. *App Med and Medical Devices.* 77–102.
- Tambyah** PA & Maki DG. (2000). Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: a prospective study of 1,497 catheterized patients. *Arch Intern Med.* 160:678-682.
- Trautner** BW & Darouiche RO. (2004) Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* 32:177-183.
- O'Toole** GO, Kaplan HB, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- O'Toole** GA & Kolter R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 30:295–304.
- Villegas** N, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Becerra M, Padola N, Paraje M. (2013). Relevance of Biofilms in the Pathogenesis of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection. *The ScientificWorld Journal.*
- Xie** H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. (2000). Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol.* 182:7067- 7069.
- Warren** JW, Steinberg L, Hebel JR, Tenney JH. (1989). The prevalence of urethral catheterization in Maryland nursing homes. *Arch Intern Med.* 149:1535-7.
- Warren** JW. (1997). Catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 11:609-22.
- Watnick** PI & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol.* 34:586-595.
- Xi** C, Lambrecht M, Vanderleyden J, Michiels J. (1999). Bi-functional gfp-and gusA-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J Microbiol Met.* 35: 85–92
- Zhou** M, Bhasin A, Reznikoff WS. (1998). Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interaction with a mutant Tn5 transposase. *J Mol Biol.* 276:913-925.
- Zunino** P, Geymonat L, Allen AG, Legnani-Fajardo C, Maskell DJ. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 29:137-43.
- Zunino** P, Geymonat, L., Allen, a G., Preston, a, Sosa, V., & Maskell, D. J. (2001). New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 3:113–120.
- Zunino** P. (2003). *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiol.* 149: 3231-3237.

# ANEXO

## Resultados de clones obtenidos mediante el sistema miniTn5gusA-pgfp

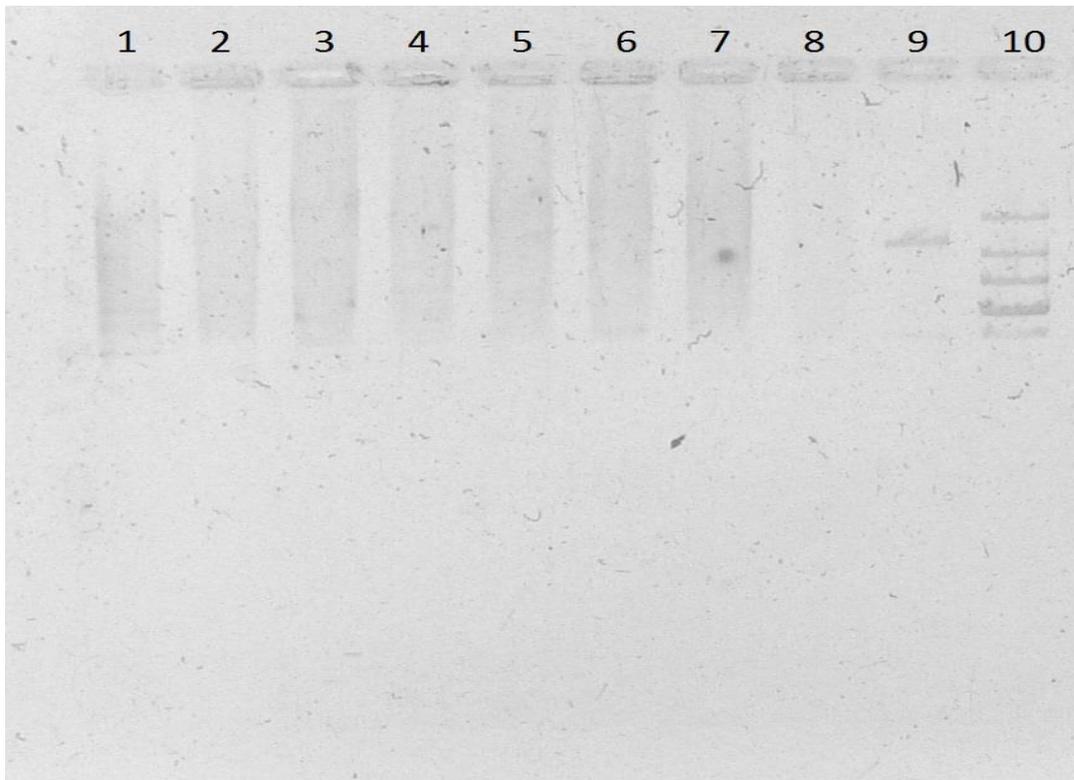
Se analizaron 6 clones mediante la técnica Southern blot para identificar la presencia de un único inserto en el genoma (Tabla 1).

**Tabla 1:** Clones seleccionados para el análisis mediante Southern blot, obtenidos mediante el sistema miniTn5gusA-pgfp.

Nº de clon	Clones seleccionados sistema mTn5	Abs <sub>540</sub> promedio
1	11.39	1,234
2	15.7	0,204
3	18.24	0,205
4	21.40	1,245
5	26.31	0,175
6	5.19	0,219

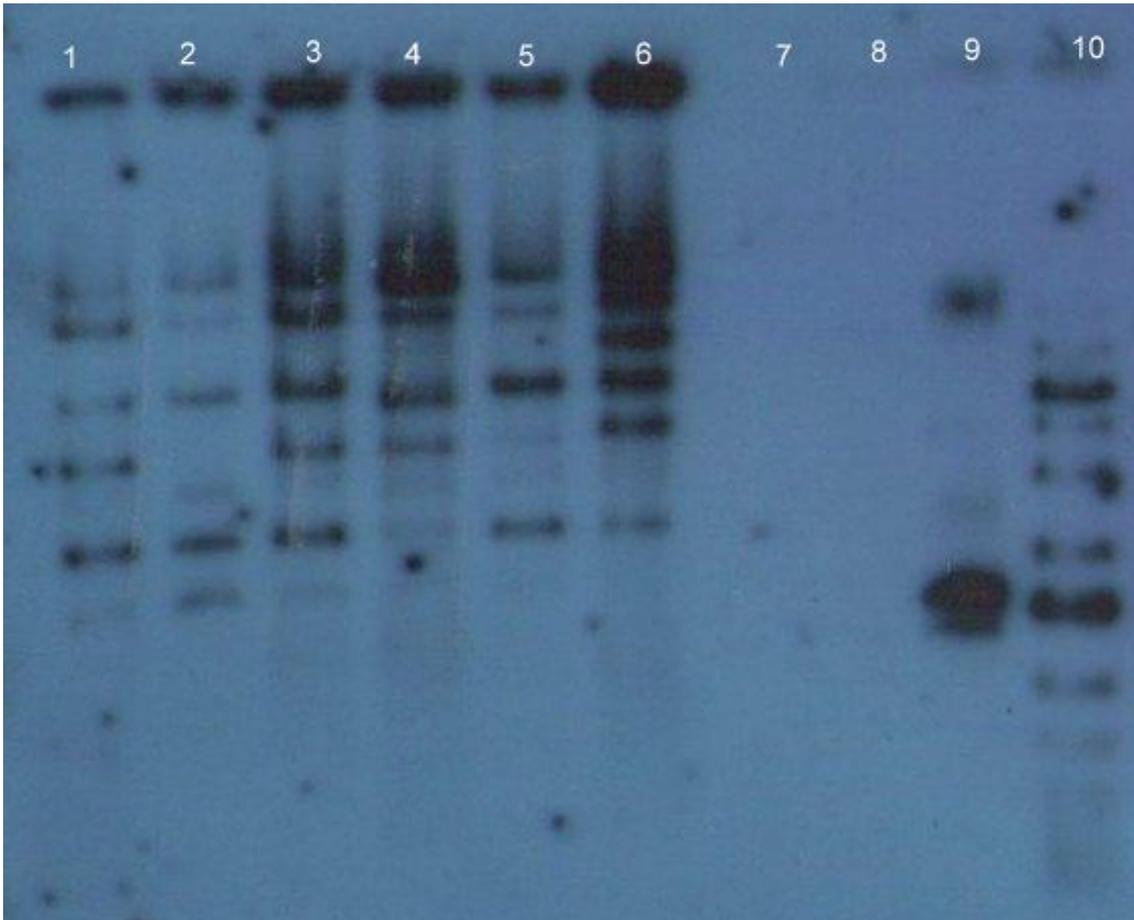
Para realizar la transferencia primero se digirió el ADN genómico de cada mutante con la enzima de restricción PvuI. Se realizó la digestión del plásmido y ADN genómico de Pr2921y S17  $\lambda$ pir como controles. Una vez realizada la transferencia se tomó una foto del gel transferido con el fin de corroborar que la transferencia se dio de forma correcta (Fig. 1).

En la Fig. 1 se puede observar que la transferencia ocurrió satisfactoriamente ya que vemos solo presencia de ADN genómico en la parte superior del gel. Esto es correcto ya que primero se transfiere lo de bajo peso molecular, dejando lo de mayor peso molecular sin transferir totalmente. Una vez corroborada la transferencia se procedió con la detección y revelado de la membrana.



**Figura 1:** Gel de agarosa luego de la transferencia. En los carriles 1- 6 ADN genómico de los mutantes digeridos con la enzima PvuI, carril 7 ADN genómico de Pr2921; carril 8 ADN genómico S17  $\lambda$ pir; carril 9 ADN del plásmido mTn5; carril 10 marcador de peso molecular (1 kb plus de Fermentas).

Como se puede apreciar en la Fig. 2 los clones evaluados presentaron varias bandas (carriles 1-6), lo cual no era de esperar. Se utilizó la enzima de restricción PvuI ya que de acuerdo al análisis realizado mediante el programa ApE el plásmido no presenta sitios de corte en la región correspondiente a la sonda. Cabe destacar que los controles negativos empleados, (ADN genómico de Pr2921 y S17  $\lambda$ pir digerido con PvuI) funcionaron correctamente, ya que no se detectaron bandas (Fig.2 carril 7 y 8).

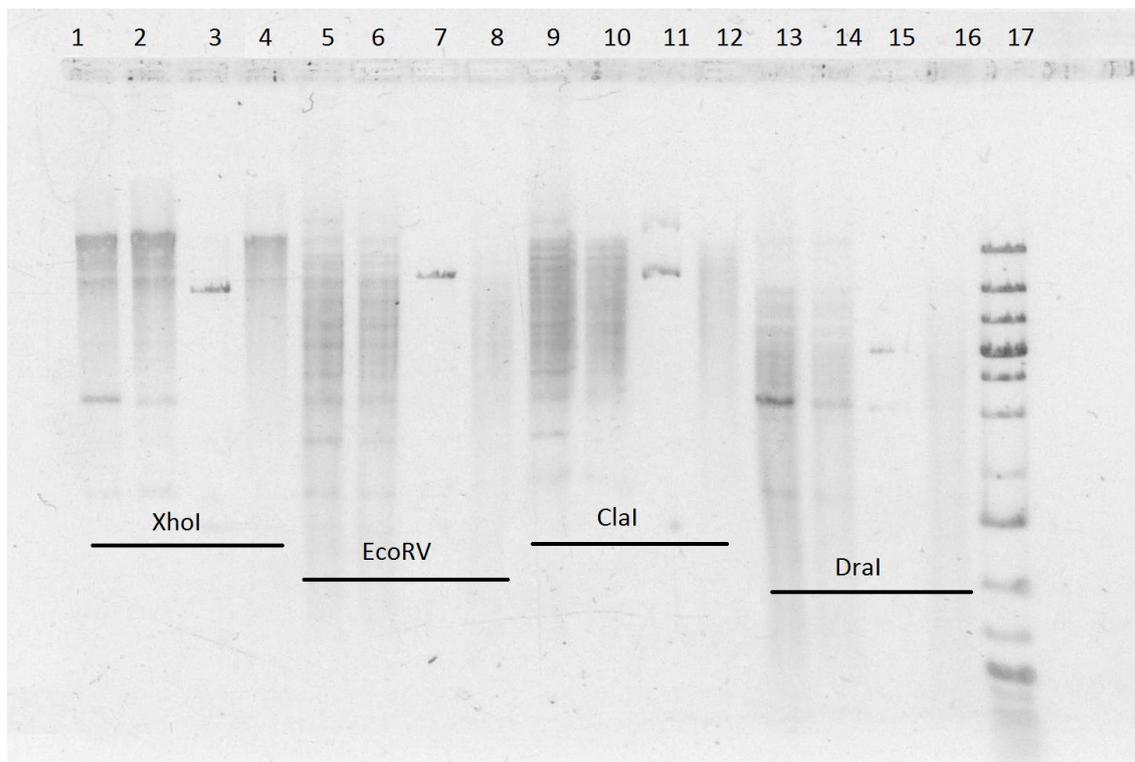


**Figura 2:** Southern blot de clones obtenidos mediante el sistema miniTn5*gusA-pgfp*. Película de rayos X obtenida luego de la detección y revelado de la membrana. El orden de los carriles corresponde al descrito en la Fig. 1.

Debido a estos resultados, se procedió a emplear 4 enzimas de restricción diferentes en forma independiente con el fin de obtener resultados más claros. Para ello se utilizó el programa ApE, donde evaluamos los sitios de cortes de las enzimas. XhoI, EcoRV y DraI las cuales poseen dos sitios de cortes en la sonda, generando en todos los casos un fragmento constante de aproximadamente 1100 pb. ClaI no posee sitios de cortes en la sonda, por lo tanto esperamos ver solo una banda en caso de que haya una única inserción.

El ADN genómico de 2 mutantes (mutantes 1 y 2), el ADN del plásmido y el ADN de Pr2921, fueron digerido con Xho I, EcoRV, ClaI y DraI. Las condiciones de digestión fueron iguales a las descritas en materiales y métodos.

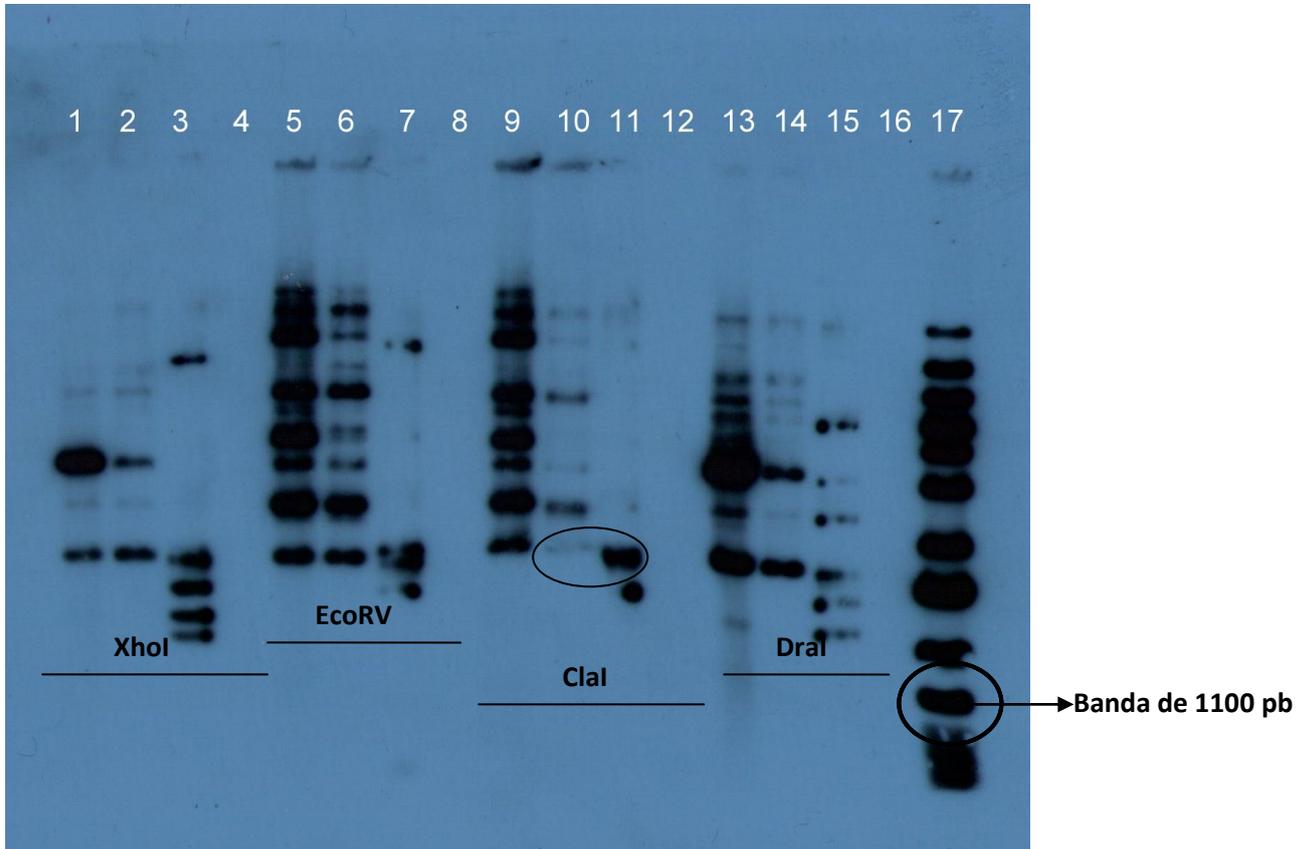
A continuación se muestran los resultados de la transferencia de dos clones con diferentes enzimas.



**Figura 3:** Gel de agarosa 0,7 % luego de la transferencia. Carril 1- 4 digestión con XhoI; carril 1- 2 ADN genómico de clones 1 y 2, carril 3 ADN plásmido miniTn5*gusA-pgfp*, carril 4 Pr2921. Carril 5- 8 digestión con EcoRV; carril 5 y 6 ADN genómico de los clones 1 y 2, carril 7 ADN plásmido miniTn5*gusA-pgfp*, carril 8 Pr2921. Carril 9 – 12 digestión con ClaI; carril 9 y 10 ADN genómico de clones 1 y 2, carril 11 ADN plásmido miniTn5*gusA-pgfp*, carril 12 Pr2921. Carril 13-16 digestión con DraI; carril 13 y 14 ADN genómicos de clones 1 y 2, carril 15 ADN plásmido miniTn5*gusA-pgfp*, carril 16 Pr2921. Carril 17: marcador de peso molecular (1 kb plus de Fermentas).

Utilizando las enzimas XhoI, EcoRV y DraI para digerir el ADN genómico de los clones 1 y 2 se observan varios patrones de bandas (Fig. 4), donde se esperaba al menos la presencia de 3 bandas, donde una de ellas debería ser constante, de aproximadamente 1100 pb. No fue posible detectar la banda de 1100 pb y las enzimas XhoI, EcoRV y DraI produjeron diversos patrones de bandas. El control empleado ADN genómico de la cepa parental Pr2921 digerido con las enzimas correspondientes, presentó ausencia de bandas en todos los casos (carril 4, 8 y 16). Mientras que, el ADN del plásmido miniTn5*gusA-pgfp* digerido con las distintas enzimas (carril 3, 7 y 15) presentó varios patrones de bandas. El mismo debió presentar al menos 3 bandas, donde una de ellas debió ser un fragmento constante de 1100 pb lo cual no se observó. Estos resultados pueden deberse a que la secuencia del miniTn5*gusA-pgfp* no corresponde totalmente con el transposón que utilizamos virtualmente (miniTn5 pFAJ1819) para evaluar los sitios de cortes. De esta manera podemos inferir que el transposón miniTn5*gusA-pgfp* podría

presentar sitios de restricción para las enzimas empleadas, mientras que el transposón miniTn5 pFAJ1819 posee solo dos sitios de restricción para éstas.



**Figura 4:** Southern blot de clones obtenidos mediante el sistema miniTn5*gusA-pgfp*. Película de rayos X obtenida luego de la incubación y revelado de la membrana. El orden de cada carril corresponde al descrito en figura 10. Se muestra la banda correspondiente a 1100 pb.

Al emplear la enzima ClaI, la cual no posee sitios de cortes en el ADN del plásmido miniTn5*gusA-pgfp* (utilizado como control) se observó la presencia de dos bandas (carril 11), lo cual nos estaría indicando que la enzima ClaI reconoce sitios de restricción en el plásmido, lo que se contradice con los resultados de la digestión teórica realizada con el programa ApE. A su vez, produjo varios patrones de bandas en los ADN genómico de los clones 1 y 2 (carriles 9 y 10), lo cual no era un resultado esperado. El segundo control empleado ADN genómico de Pr2921 digerido con ClaI (carril 12) no presenta patrones de bandas tal como era de esperar.

Teniendo en cuenta los resultados del control, el clon 2 (carril 10) podría presentar un inserto en su genoma si consideramos sólo las bandas de mayor intensidad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este grupo de clones el transposón se habría insertado más de una vez en el ADN genómico de los mutantes. Siendo este un resultado no esperado, ya que lo que se busca es que ocurra una única inserción del transposón; interrumpiendo la función de un único gen. Por lo tanto, los clones obtenidos mediante el sistema miniTn5*gusA-pgfp* no fueron utilizados para continuar con la identificación de los genes.