

Métodos no contaminantes para controlar la formación de biopelículas sobre superficies metálicas de interés industrial^(*)

S.G. Gómez de Saravia^{*,**} y P.S. Guiamet^{*,***}

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue controlar la formación de películas bacterianas, constituidas por bacterias aeróbicas y anaeróbicas sobre superficies de interés industrial, tales como aceros inoxidable y acero al carbono. Se utilizó un biocida natural obtenido de un extracto acuoso de semillas de mostaza negra, *Brassica nigra*, y sustancias de origen biológico (mezcla de inmunoglobulinas: IgA, IgG e IgM). Para observar la adherencia bacteriana a las superficies metálicas se empleó el microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio de epifluorescencia. Se observó una marcada inhibición de la adherencia bacteriana en las diferentes condiciones experimentales ensayadas, utilizando la solución de inmunoglobulinas. Se advirtió una disminución importante en el número de microorganismos formadores de las biopelículas cuando se utilizó el biocida natural.

Palabras clave

Biopelículas. Microorganismos. Biocida natural. Inmunoglobulinas. Aceros.

No contaminant methods for the biofilms formation control on metallic surfaces of industrial interest

Abstract

The aim of this paper was the control of aerobic and anaerobic bacterial biofilms formation on metal surfaces of industrial interest such as stainless steel and mild steel. A natural biocide obtained of an aqueous extract of seeds of black mustard (*Brassica nigra*) and mixtures of immunoglobulins IgA, IgG, and IgM were used. Microscopic techniques like scanning electron microscopy (SEM) and epifluorescens microscopy were used for observing bacterial adhesion of the metal surfaces. A marked inhibition of bacterial adherence was observed when an immunoglobulin film was formed on the metal surface. When the natural biocide was used, an important decrease in the number of microorganisms in the biofilms was observed.

Keywords

Biofilms. Microorganisms. Natural biocide. Immunoglobulins. Steels.

1. INTRODUCCION

La adherencia de microorganismos a las superficies metálicas afecta una amplia variedad de sistemas industriales y operacionales, tales como sistemas de enfriamiento de agua, sistemas de agua de inyección, industria termoeléctrica, industria del petróleo, etc.

Los procesos de adherencia bacteriana comienzan inmediatamente después de la inmersión de una superficie metálica en un medio acuoso natural o industrial y conducen a la formación de biopelículas^[1].

Las biopelículas contienen, aproximadamente, 95 % de agua, en una matriz de sustancias exopolisacáridicas (SEP), en la cual las células y los detritus inorgánicos están suspendidos.

Los métodos más utilizados para prevenir y controlar la formación de biopelículas son: limpieza (manual y química), recubrimientos, pinturas antiincrustantes, protección catódica, empleo de biocidas (oxidantes y no oxidantes), etc.^[2].

Los biocidas son inherentemente tóxicos, muchos de ellos son difíciles de degradar y persistentes en el medio ambiente. El registro de

(*) Trabajo recibido el día 8 de noviembre de 2002 y aceptado en su forma final el día 11 de marzo de 2003.

(**) INIFTA. UNLP. C.C. 16, Suc. 4, 1900. La Plata. Argentina. E-mail: sgomez@inifta.unip.edu.ar; pguiamet@inifta.unip.edu.ar

(***) CIPBA

(****) CONICET

nuevos biocidas demanda el cumplimiento de estrictas reglamentaciones.

Las leyes que regulan la calidad ambiental son cada vez más exigentes y restrictivas. Las mismas, tienen por objeto garantizar la compatibilización de las necesidades del desarrollo socioeconómico con los requerimientos de la protección ambiental^[3].

En los últimos tiempos, se han producido cambios en la legislación sobre el uso de biocidas, apuntando a la utilización de sustancias más fácilmente biodegradables y no contaminantes para el medio ambiente, tales como, por ejemplo, compuestos producidos naturalmente (extractos de plantas) y sustancias de origen biológico.

Muchas plantas de la familia *Cruciferae* tienen propiedades biocidas. Esto, es debido a la presencia de isotiocianatos. Las semillas de mostaza negra contienen allyl isotiocianato que es rápidamente inactivado en el ambiente, representando de este modo un antimicrobiano potencialmente aceptable^[4].

Por otro lado, sustancias de origen biológico como, por ejemplo, el suero bovino, inhibió la adherencia bacteriana a superficies de titanio^[5].

Recientemente, se ha reportado que, la inmunoglobulina A (IgA) secretoria inhibe la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la cornea^[6]. La IgA está constituida por una cadena simple de péptidos, con un peso molecular de 60.000 y es una de las principales cinco inmunoglobulinas del cuerpo humano. Está presente, selectivamente, en las secreciones de las mucosas y su función es desarrollar la inhibición específica de la adherencia de microorganismos a la superficie de las células mucosas, previniendo la entrada de estos en los tejidos del cuerpo^[7].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el control e inhibición de la adherencia de películas bacterianas (constituidas por bacterias aeróbicas y anaeróbicas) a superficies metálicas de interés industrial, utilizando un biocida natural obtenido de un extracto acuoso de semillas de mostaza negra, *Brassica nigra*, y sustancias de origen biológico (mezcla de inmunoglobulinas: IgA, IgG e IgM).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Experiencias realizadas utilizando sustancias de origen biológico (mezcla de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM)

2.1.1. Cultivos bacterianos

Se utilizó un cultivo mixto de bacterias reductoras de sulfato (BRS) *Desulfovibrio vulgaris* (*D. vulgaris*)

y *Desulfovibrio desulfuricans* (*D. desulfuricans*) y un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*).

El inóculo de BRS se preparó a partir de 9 ml de un cultivo de BRS de 7 d, en un erlenmeyer conteniendo 150 ml de medio líquido de Postgate C y se incubó en una jarra de anaerobiosis por término de una semana. Después de este período, se colocaron los cupones metálicos para evaluar la formación de películas bacterianas.

El inóculo de *P. fluorescens* se obtuvo a partir de un repique en agar nutritivo, incubado a 28 °C durante 24 h y se colocó en un erlenmeyer conteniendo 150 ml de medio de Postgate C^[8]. Después de 1 h de agitación en un agitador magnético, se colocaron los cupones metálicos con la finalidad de evaluar la formación de películas bacterianas a las superficies metálicas.

2.1.2. Solución de inmunoglobulinas

Se utilizó una solución comercial de inmunoglobulinas (IgAbulin, Austria) en la que cada mililitro de la solución contenía 60 mg de IgA, 30 mg de IgG y 2 mg de IgM, proteínas totales: (100 mg) y glucosa (100 mg) en solución salina.

2.1.3. Control de formación de películas bacterianas

Se utilizaron cupones de acero al carbono SAE 1020 de 0,4 cm² de área y de acero inoxidable del tipo AISI 316 y AISI 304 de 0,2 cm² de área. Antes del uso, los cupones se colocaron en una resina, se pulieron con papel de esmeril de diferente granulometría (200, 400 y 500) y con pasta de alúmina de 1 µm de tamaño de grano. Finalmente los cupones se lavaron y desengrasaron con acetona, alcohol y agua destilada estéril.

Las muestras de los citados aceros se sumergieron en los cultivos de *Pseudomonas fluorescens* y BRS con los siguientes pretratamientos: a) sin la cubierta de inmunoglobulinas; b) con una cubierta de inmunoglobulinas sobre la superficie metálica.

Tras 24 h de formación de las biopelículas en el cultivo de *P. fluorescens* y 15 d en un cultivo de BRS, las biopelículas se removieron de la superficie metálica utilizando un bisturí estéril y se transfirieron en 10 ml de solución salina isotónica. El recuento de BRS se realizó por el método de dilución por extinción en medio líquido de Postgate B y se utilizó la técnica de recuento en placa para *P. fluorescens*.

Los cupones metálicos se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSMT 100). Con el objetivo de preservar las muestras biológicas, éstas, se fijaron en glutaraldehído al 2 % en solución buffer, durante 24 h. Luego, se deshidrataron por sucesivos pasajes en series de acetona hasta llegar al 100 % y, finalmente, se trataron con la técnica del punto crítico^[9].

2.2. Experiencias realizadas utilizando un antimicrobiano natural obtenido de un extracto acuoso de semillas de mostaza negra, *Brassica nigra*

2.2.1. Cultivos bacterianos

El inóculo de *Pseudomonas* sp. y los cultivos bacterianos se prepararon conforme se indicó en 2.1.1.

El inóculo de BRS se preparó de acuerdo a lo desarrollado en el apartado 2.1.1. El medio de cultivo utilizado fue Postgate B (8).

2.2.2. Preparación del extracto acuoso de semillas de mostaza negra

Se añadieron 25 gr de semilla a 100 ml de agua destilada. La mezcla se homogeneizó por 5 min y se incubó 2 d, a 30 °C. Luego, se realizó una dilución 1:10 en agua destilada y se filtró con papel de filtro Whatman N°1. El filtrado se esterilizó con filtro Millipore de 0,22 µm.

2.2.3. Actividad antimicrobiana del extracto sobre la formación de películas bacterianas

Las biopelículas se formaron suspendiendo cupones de acero inoxidable del tipo AISI 304, por 24 h, en un cultivo de *Pseudomonas* sp. y 5 d, en un cultivo de BRS. Después de la incubación y formación de las biopelículas, los cupones se colocaron en un medio de buffer de fosfatos conteniendo 0,05 % o 0,25 % del equivalente del extracto acuoso de semillas de mostaza. Tras 1, 6 y 24 h, los cupones se examinaron en un microscopio de epifluorescencia^[10]. Los resultados se expresaron como media y mediana por campo del microscopio ($1,54 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-2}$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Experiencias realizadas con sustancias de origen biológico (mezcla de inmunoglobulinas)

En el caso de bacterias anaeróbicas (BRS) sobre acero inoxidable y acero al carbono, el número de células de la población sésil estuvo en el orden de

10^5 cells/cm^2 . Los metales previamente acondicionados con una cubierta de inmunoglobulinas revelaron un importante decrecimiento de células adheridas con una población sésil del orden de 10^2 cells/cm^2 . Estos resultados se corroboran con las observaciones realizadas en el MEB (Figs. 1 y 2).

Transcurridas 24 h de contacto con el cultivo bacteriano, los cupones metálicos ensayados presentaron una abundante adherencia de *P. fluorescens*.

El promedio obtenido de los conteos bacterianos de la población sésil fue del orden de 10^9 Unidades Formadoras de Colonias/cm² (UFC/cm²), para el acero inoxidable tipo AISI 316 y para el acero al carbono y, de 10^8 UFC/cm², para el acero inoxidable tipo AISI 304^[11].

Los cupones metálicos, previamente acondicionados con una cubierta de inmunoglobulinas, mostraron una disminución en la adherencia bacteriana^[11].

Los resultados parecen indicar que la habilidad de evitar la adherencia bacteriana a superficies metálicas estaría relacionada con la inmunoglobulina A. Esto, se fundamentaría en que la composición del producto utilizado, la IgA, se encuentra presente en concentraciones más elevadas que en la gammaglobulina. Cada mililitro de la solución de gammaglobulina (*Seroglobulin-T*, Gador) contiene 165 mg de globulinas séricas (con un rango de IgA: 210 mg/100 ml de suero, IgG: 710/1520 mg/100 ml de suero, IgM: 40-250 mg/100 ml de suero); esta solución, como se ha visto en un estudio anterior, favorece la formación de las

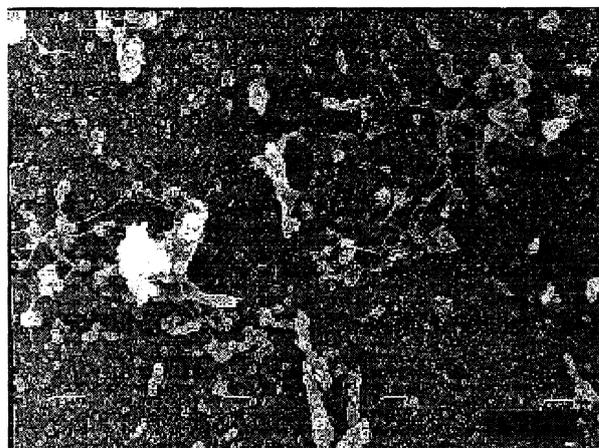


Figura 1. Microfotografía de MEB de la superficie del acero inoxidable del tipo AISI 316, tras un período de exposición de 15 d, en un cultivo de BRS (Aumento x 3.500).

Figure 1. SEM micrograph of an AISI type 316 stainless steel surface after an exposure of 15 d to a BRS culture (magnification x 3500).

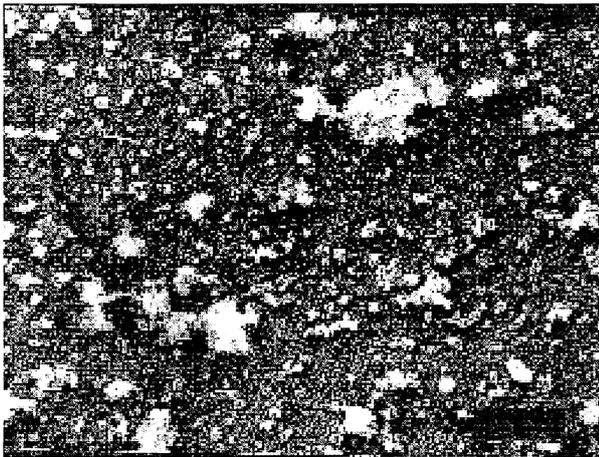


Figura 2. Microfotografía de MEB de la superficie del acero inoxidable del tipo AISI 316, con una cubierta de inmunoglobulinas adsorbida, después de un período de exposición de 15 d, en un cultivo de BRS (Aumento x 3.500).

Figure 2. SEM micrograph of an AISI type 316 stainless steel surface with coverage of adsorbed immunoglobulins after an exposure of 15 d to a BRS culture (magnification x 3500).

biopelículas a las superficies metálicas^[11]. Esto, se sostiene por diversos estudios realizados en el área de los materiales implantables^[6 y 12] y por el conocimiento del efecto específico de la IgA sobre la adherencia bacteriana a otro tipo de superficies.

En la figura 3, se esquematiza el posible mecanismo de inhibición de la adherencia bacteriana a través del bloqueo de áreas receptoras de la superficie metálica evitando la adherencia y, en consecuencia, la formación de las biopelículas. En este

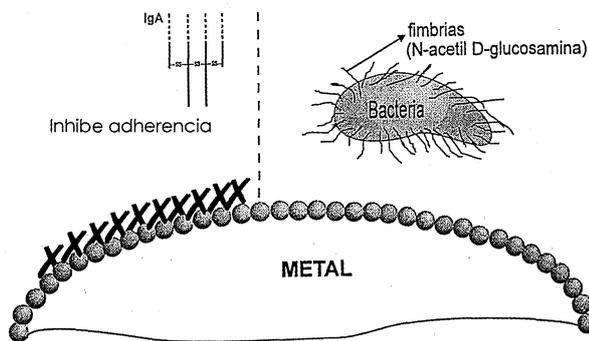


Figura 3. Esquema de la posible inhibición de la adherencia bacteriana por adsorción de las inmunoglobulinas a la superficie metálica. X Moléculas de Inmunoglobulinas (IgA) adsorbidas a la superficie metálica que previenen la adherencia bacteriana. ● Estructura de la superficie metálica.

Figure 3. Scheme of possible inhibition of bacterial adherence by immunoglobulins adsorption on metallic surface. X Immunoglobulins (IgA) molecules adsorbed to metallic surface preventing bacterial adherence. ● Metallic surface structure.

caso, la IgA se encuentra en una concentración marcadamente mayor (Tabla I) que los otros componentes de la mezcla.

3.2. Experiencias realizadas con un extracto de semillas de mostaza negra

El ingrediente microbiocida de la mostaza negra es el allyl isotiocianato, que reacciona con las aminas y otros grupos activos de las proteínas^[13], pudiendo inactivar enzimas o actuar a nivel de la membrana celular provocando inhibición metabólica, inhibición de la adherencia y eventual muerte celular.

Las tablas II y III muestran la actividad del extracto sobre las biopelículas. Se observaron reducciones estadísticas significativas en el número de células de *Pseudomonas sp.* en todos los tiempos y concentraciones ensayadas (Tabla II, $p < 0,05$). Se encontró una reducción de, aproximadamente,

Tabla I. Concentraciones de IgA, IgG, e IgM en los productos ensayados

Table I. IgA, IgG and IgM concentrations in the assayed products

Concentración	IgAbulin, Austria
IgA	60 mg/ml
IgG	30 mg/ml
IgM	2 mg/ml

Tabla II. Actividad del extracto acuoso de Brassica negra sobre biopelículas de *Pseudomonas sp.*, sobre acero inoxidable del tipo AISI 304

Table II. Activity of aqueous extract of Brassica negra on *Pseudomonas sp.* biofilms on AISI type 304 stainless steel surface

Tiempo de contacto (h)	Concentración de semilla (%)	Nº células por campo del microscopio	
		Media	Mediana
0	0	179,3 ± 128,8	139,0
1	0	146,1 ± 62,9	129,0
1	0,05	24,0 ± 10,8	24,5
1	0,25	22,9 ± 9,5	24,0
6	0	119,0 ± 51,3	105,0
6	0,05	48,5 ± 23,3	40,5
6	0,25	35,0 ± 11,9	29,0
24	0	115,9 ± 32,7	108,5
24	0,05	33,4 ± 18,1	29,0
24	0,25	16,5 ± 11,6	15,5

Tabla III. Actividad del extracto acuoso de *Brassica negra* sobre biopelículas de BRS sobre acero inoxidable del tipo AISI 304

Table III. Activity of aqueous extract of *Brassica negra* on BRS biofilms on AISI type 304 stainless steel surface

Tiempo de contacto (h)	Concentración de semilla (%)	Nº células por campo del microscopio	
		Media	Mediana
0	0	188,8 ± 105,4	180
1	0	156,2 ± 53,9	150
1	0,05	129,6 ± 73,7	97
1	0,25	88,2 ± 37,1	67
24	0	104,4 ± 27,2	92
24	0,05	94,0 ± 48,1	78
24	0,25	77,6 ± 34,5	75

89 % de los valores iniciales, después de 24 h de contacto con 0,25 % del extracto.

Las BRS fueron los microorganismos más resistentes (Tabla III). En las concentraciones más altas, después de 1 h, las células adheridas fueron del 56 % ($p < 0,05$) del valor del control. Tras 24 h, no hubo una diferencia significativa con los valores del control (test = 74 % del control).

4. CONCLUSIONES

- La cubierta de inmunoglobulinas fue efectiva para prevenir la adherencia bacteriana de BRS y *P. fluorescens* a superficies metálicas de interés industrial. La inhibición de la adherencia bacteriana estaría específicamente ligada a la IgA, aún cuando la solución de inmunoglobulinas presenta, también, en menores cantidades, IgG e IgM.
- Los resultados obtenidos indican que la solución de inmunoglobulinas podría usarse, potencialmente, para evitar la adherencia bacteriana a superficies metálicas de uso industrial, como aceros inoxidables y acero al carbono, disminuyendo el efecto negativo de las biopelículas bacterianas.
- La habilidad que presentó el extracto acuoso de semillas de mostaza negra para disminuir el número de microorganismos que forman las bio-

películas implica que tendría un uso potencial en el control de la contaminación microbiana, la biocorrosión y la formación de biopelículas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Inmuno Argentina S.A. por la donación de la solución de inmunoglobulinas y al CONICET, SECYT, UNLP y CICPBA por el financiamiento del trabajo. S.G. Gómez de Saravia agradece a la Dra. C.C. Gaylarde la dirección en las investigaciones realizadas con el extracto acuoso de semillas de mostaza negra.

REFERENCIAS

- [1] H.A. VIDELA y W.G. CHARACKLIS, *Int. Biodet. Biodeg.* 29 (1992) 195-212.
- [2] C. BOSCAN DE GONZÁLEZ y H.A. VIDELA, *Manual práctico de biocorrosión y biofouling para la industria*, M. D. Ferrari, M.F.L. de Mele y H.A. Videla (eds.), CYTED, La Plata, Bs. As, Argentina, 1995, pp. 54-64.
- [3] G. HERNÁNDEZ DUQUE y M.F.L. DE MELE, *Manual práctico de biocorrosión y biofouling para la industria*, M. D. Ferrari, M.F.L. de Mele, H.A. Videla (eds.), CYTED, La Plata, Bs. As., Argentina, 1995, pp. 62-72.
- [4] K. GILLIVER y E.M. Osborn, *Antibiotic* 1 (1949) 576-628.
- [5] Y.H. AN, G.W. STUART, S.J. MCDOWELL, S.E. MCDANIEL, Q. KANG y R.J. FRIEDMAN, *J. Orth. Res.* 14 (1996) 846-849.
- [6] S.A. MASINICK, C.P. MONTGOMERY, P.C. MONTGOMERY y L.D. HAZLETT, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (1997) 910-918.
- [7] M. ROITT, *Essential Immunology*, Blackwell Scientific Publications, 6th ed, Oxford, UK, 1988, pp. 31-54.
- [8] R. POSTGATE, *The Sulphate-Reducing Bacteria*, Cambridge University Press, 1984.
- [9] S.G. GÓMEZ DE SARAVIA, P.S. GUIAMET y H.A. Videla, 1993. *Anales del CIDEPIINT*, 1993, pp. 299-307.
- [10] T.M. MENEZES, D.E. BAND y C.C. GAYLARDE, *Biodet. Biodeg.* 9 (1995) 144-149.
- [11] P.S. GUIAMET, S.G. GÓMEZ DE SARAVIA y H.A. VIDELA, *Int. Biodet. Biodeg.* 43 (1999) 31-35.
- [12] P. MICHETTI, N. PORTA, M.J. MAHAN, J.M. SLAUCH, J.J. MEKALANOS, A. BLUM, J.P. KRAEHNBUHL y M.R. NEUTRA, *Gastroenterology* 107 (1994) 915-923.
- [13] J. KROLL, H. NOACK, R. RAWELL, R. KROECK y J. PROLL, *J. Sci. Food Agric.* 65 (1994) 337-345.