

# Caracterización y curva de crecimiento de *Escherichia coli* para su posterior aplicación en ensayos con agua activada con plasma no térmico

## Characterization and growth curve of *Escherichia coli* for application in non-thermal plasma-activated water assays

21/08/2024

### **Melisa Romina Baumann**

Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Facultad Regional de Villa María. Av. Universidad 450 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

melisabaumann4@gmail.com

### **Aldana Berenice Cativa Sonzini**

Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Facultad Regional de Villa María. Av. Universidad 450 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

abcativasonzini@gmail.com

### **Romina Andrea Bachetti**

Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB-CONICET). Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas (IAPCByA), Universidad Nacional de Villa María (UNVM). Av. Arturo Jauretche 1555 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

### **Fernanda Gabriela Biolé**

Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB-CONICET). Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas (IAPCByA), Universidad Nacional de Villa María (UNVM). Av. Arturo Jauretche 1555 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Facultad Regional de Villa María. Av. Universidad 450 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

ferbiole@gmail.com

### **Andrea Gómez Sánchez**

Centro de Investigaciones y Transferencia Villa María (CIT-CONICET). Universidad Nacional de Villa María (UNVM). Av. Arturo Jauretche 1555 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Facultad Regional de Villa María. Av. Universidad 450 (CP 5900), Villa María, Córdoba, Argentina.

aaguar@gmail.com

## **Resumen**

Este estudio inicia con un relevamiento de información sobre bacterias patógenas formadoras de *biofilms*, con especial énfasis en *Escherichia coli*. El objetivo de este trabajo es caracterizar y realizar la curva de

crecimiento de *E. coli* para conocer la cinética de dicho microorganismo y posteriormente realizar ensayos en laboratorio con agua activada con plasma no térmico (PAW) a fin de inactivar los mismos en agua de establecimientos rurales. Se efectuó la caracterización morfológica macroscópica, microscópica y bioquímica de una cepa pura de *E. coli*. Se evaluó el crecimiento mediante turbidimetría y recuento en placa en superficie. Se construyó la curva de crecimiento en condiciones óptimas y se determinaron los principales parámetros de la cinética de crecimiento, tiempo generacional de  $g = 27$  min y constante de velocidad instantánea de crecimiento de  $\mu = 0,783 \text{ h}^{-1}$ .

Los resultados presentados son el punto de partida y permitirán evaluar el efecto biocida del PAW sobre estos microorganismos.

**Palabras clave:** Plasma no térmico, bacterias patógenas, *E. coli*, cinética de crecimiento

## Abstract

This study begins with a survey of information on pathogenic biofilm-forming bacteria, with special emphasis on *Escherichia coli*. The characterization and growth curve of *E. coli* was carried out to know the kinetics of said microorganism and subsequently carry out laboratory tests with water activated with non-thermal plasma (PAW) with the objective of inactivating them in water from rural establishments. The macroscopic, microscopic and biochemical morphological characterization of a pure strain of *E. coli* was carried out. Growth was evaluated by turbidimetry and surface plate counting. The growth curve was constructed under optimal conditions and the main parameters of growth kinetics were determined, generation time of  $g = 27$  min and instantaneous growth rate constant of  $\mu = 0.783 \text{ h}^{-1}$ .

The results presented are the starting point and will allow evaluating the biocidal effect of PAW on these microorganisms.

**Keywords:** Non-thermal plasma, pathogenic bacteria, *E. coli*, growth kinetics

## Introducción

El agua subterránea es la principal fuente de abastecimiento en numerosas regiones, especialmente en zonas rurales que carecen de suministro de agua potable o de red. En Argentina, más de 1,2 millones de personas dependen de esta fuente para consumo humano, riego, producción de alimentos y limpieza de instalaciones. La región pampeana es una de las zonas agrícolas-ganaderas más importantes del mundo, el 75% de la agricultura y el 90% de la producción lechera se concentra en ella (Bettera et al., 2011).

El agua contaminada puede ser la fuente de grandes epidemias de enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud, casi mil millones de personas carecen de acceso a agua potable y se estima que 500 millones mueren cada año por enfermedades asociadas con fuentes contaminadas (Cheng et al., 2022). El peligro más común y difundido relativo al agua potable es el riesgo de contaminación biológica por los patógenos presentes en las heces de animales. Estos pueden infiltrarse en los cuerpos de agua, lo cual se evidencia por la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal como *E. coli* (Urseler et al., 2019). Resultados obtenidos afirman que una alta proporción de establecimientos agropecuarios disponen de agua no apta microbiológicamente para los diferentes usos a la que se la destina (Bettera et al., 2011).

Como estrategia de supervivencia, estas bacterias patógenas tienen la capacidad de formar *biofilms* (Xia et al., 2023). Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias de control contra los *biofilms*, una de ellas es el agua activada con plasma no térmico (PAW) (Mai-Prochnow et al., 2021). Como producto de desinfección verde, PAW es una alternativa prometedora en relación a los desinfectantes tradicionales aplicados en el agua, la agricultura y la industria alimentaria (Shen et al., 2016).

Cuando el plasma está en contacto con el agua, las especies generadas por la descarga pueden transferirse hacia el líquido, a través de la interfaz gas-líquido, induciendo la generación de nuevas especies reactivas que juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana del PAW, tales como  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en medio ácido (Cheng et al., 2022). La interacción del plasma con el agua afecta las propiedades fisicoquímicas del líquido, reduciendo el pH y aumentando el potencial de óxido-reducción (ORP) y la conductividad eléctrica. Estas características del PAW actúan de forma sinérgica con las especies oxidantes que lo componen, se ha demostrado no solo su efectividad en la inactivación de la microbiota natural en agua y alimentos, sino también

sobre la capacidad de los microorganismos de formar *biofilms* (Xia et al., 2023). PAW inactiva una importante variedad de bacterias, como *Escherichia coli* (O157H7), *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylo coccus aureus* y *Shewanella putrefaciens*, entre otras (Shen et al., 2016).

## Desarrollo

*E. coli* es un microorganismo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo Gram negativo recto, no esporulado, usualmente móvil (mediante flagelos peritricos), que crece óptimamente a 37°C y a pH neutro (Sussman, 1997). Es anaerobia facultativa, con un tipo de metabolismo que puede ser tanto fermentativo como respiratorio (Conway, 1995). Representa uno de los modelos biológicos más estudiados desde el punto de vista genético, bioquímico y funcional (Santos et al., 2005). Tanto su frecuente estilo de vida comunitario como la disponibilidad de una amplia gama de herramientas genéticas contribuyeron a establecer a *E. coli* como un organismo modelo relevante para el estudio de la colonización de la superficie. Varios factores clave, incluidos diferentes apéndices extracelulares, están implicados en la colonización de la superficie por *E. coli* y su expresión y actividad están finamente reguladas, tanto en el espacio como en el tiempo, para asegurar eventos productivos que conducen a la formación de biopelículas maduras (Beloin et al., 2008). Este modo de crecimiento maximiza la obtención de nutrientes favoreciendo la colonización, permite la cooperación entre las cepas por medio del crecimiento en comunidad y propicia la protección frente a los mecanismos de defensa del hospedador o a sustancias antimicrobianas (Faleiro Neves, 2010).

El conocimiento de cómo una población microbiana puede multiplicarse rápidamente, resulta útil para el diseño de métodos de control de crecimiento microbiano. Su habilidad para colonizar un ambiente requiere la capacidad para alternar períodos de rápida división celular y de crecimiento nulo (Madigan et al., 1999). Las poblaciones microbianas en medios de cultivos pueden presentar distintos comportamientos de crecimiento, esto es representado mediante una curva de crecimiento en la que se distinguen cuatro fases: de latencia (hay aumento de volumen, pero las bacterias no se dividen), logarítmica o exponencial (las células empiezan a duplicarse a un ritmo constante), estacionaria (el número de células no cambia) y de declinación o muerte (el número de células muertas supera a las vivas, hay decrecimiento en la población) (Santos et al., 2005).

Estas curvas se utilizan para calcular la cinética de crecimiento de los microorganismos. Cuando el crecimiento es exponencial, se define matemáticamente como una reacción de primer orden, donde el incremento del número de bacterias respecto al tiempo es proporcional al número de células presentes en aquel momento, con lo cual se obtienen ciertos parámetros de estudio, como el de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), y el tiempo de generación ( $g$ ), que es el tiempo requerido para que una bacteria duplique el número de células de un cultivo (si este está en crecimiento exponencial). El tiempo de generación, se utiliza para ensayar el efecto positivo o negativo de algún tratamiento sobre cultivos bacterianos (Madigan et al., 1999).

Para aplicar estas ecuaciones, es necesario conocer las concentraciones de las bacterias en distintos intervalos de tiempo, pudiéndose obtener por diferentes métodos, tales como: determinación de la masa celular por turbidimetría y recuento de células viables (Madigan et al., 1999).

### Desarrollo Experimental:

Tabla 1. Materiales y equipos utilizados para caracterizar y realizar la curva de crecimiento de *E. coli*

Materiales		Equipos	
Portaobjeto	Tubos Eppendorf	Estufa de cultivo	Balanza
Placas Petri	Erlenmeyer	Microscopio óptico	Pipetas automáticas
Ansa	Mechero	Espectrofotómetro	Cabina flujo laminar
Tubos estériles		Agitador orbital termotatizado	

### Caracterización de *E. coli*:

Se partió de cultivos puros de una cepa de *E. coli* ATCC 25922, para el aislamiento y diferenciación se sembró la bacteria en medio selectivo diferencial Eosin Methylene Blue Agar (EMB-Levine) y se incubó a 37 °C  $\pm$  1 °C durante 24 h. Este medio es adecuado para el crecimiento de enterobacterias, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y permite la diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

Para la caracterización celular se realizó la tinción de Gram con el kit (Britania) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomó una colonia con ansa y se fijó el preparado. Se realizó la coloración con

Violeta para Gram (20"), se lavó con agua corriente, se cubrió con lugol (30"), se lavó con Decolorante para Gram (10"), se coloreó con safranina para Gram (20") y se lavó con agua corriente. Finalmente, los preparados se secaron y fueron observados a microscopio óptico Primo Star 3 (Carl Zeiss) y fotografiados con una cámara digital Axiocam 208 Color (Carl Zeiss).

Además, mediante pruebas bioquímicas se caracterizó metabólicamente la cepa. Se empleó un sistema comercial multiprueba Enterotest Individual Base mediante los pasos descritos en el Manual de Instrucción A07070 - A07071. Se realizaron las pruebas a partir de una misma colonia, se sembraron con ansa en cuatro tubos: tubo del medio Glu-Lac-SH2Gas, tubo del medio Indol-Movilidad, tubo del medio Urea y tubo del medio Citrato. Luego, se incubaron en aerobiosis a 35-37 °C durante 24 h.

Por último, se realizó la prueba de la oxidasa que permite determinar la presencia de enzimas oxidasas debido a la existencia de un sistema citocromo oxidasas presentes en organismos aerobios y algunos anaerobios facultativos. Se humedeció el disco de Oxidasa (Britania) con una gota de agua, se colocó una colonia de *E. coli* y luego de 1 minuto a temperatura ambiente se observó la reacción (Positivo: color rosa; Negativo: incoloro).

#### Curva de crecimiento de *E. coli*:

Se utilizó una cepa pura de *E. coli* conservada en freezer a -80 °C. Se descongeló y repicó en placas con agar Luria-Bertani (LB). Se preparó un cultivo "overnight" (ON) de la bacteria en 5 ml de caldo LB y se incubó en agitación (150 rpm) a 30 °C durante 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria (DO<sub>600</sub> nm 0,746). Se preparó una batería de 3 erlenmeyers de 50 ml con 30 ml de medio LB que se inocularon con 300 µl de cultivo (1% v/v).

Se cuantificó la población de bacterias por dos métodos: 1) Determinación de la masa celular por turbidimetría. Se midió la DO<sub>600</sub> de los cultivos de *E. coli*. cada 1 h (primeras 2 h), cada 1/2 h (hasta las 4 y 1/2 h) y cada 1 h (hasta las 12 h). 2) Determinación del número de células viables por recuento en placa en superficie. Se tomaron alícuotas de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas decimales, hasta llegar a la dilución 10<sup>-6</sup>. Una vez preparadas las diluciones seriadas se sembraron las últimas 3 diluciones en placas con agar LB, en condiciones de esterilidad, mediante la técnica de microgota (entre tres o cuatro gotas de 10 µl), y se incubaron las placas a 30 °C durante 12 h. Luego, se seleccionó la dilución que presentó entre 3 a 30 (UFC/ml). Se realizó el recuento en placa en superficie y se calculó el promedio del número de células viables/ml de cultivo (UFC/ml). Finalmente, se determinó g y µ a partir de las ecuaciones 1 y 2.

$$g = t/n \tag{1}$$

$$\mu = 2.303 \cdot (\log N2 - \log N1) / (t2 - t1) \tag{2}$$

Dónde; t: tiempo de crecimiento exponencial, n: número de generaciones.

## Resultados y discusión

Con respecto a la caracterización, en primer lugar, se observaron macroscópicamente las colonias aisladas en agar EMB, y se lograron diferenciar colonias fermentadoras de lactosa ya que presentaron color azuladonegro con el característico brillo metálico (Figura 1.a).

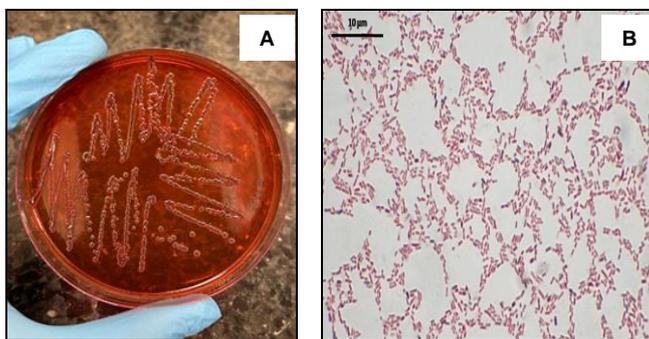


Figura 1. a) *E. coli* en medio EMB. b) Colonia de *E. coli* en microscopio.

En segundo lugar, luego de la realización de la tinción de Gram se pudo constatar que las bacterias son Gram negativas ya que la coloración observada es rosa-rojiza (Figura 1.b) y que la morfología corresponde a un

bacilo. Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se detallan en la Tabla 2. La prueba de la oxidasa arrojó un resultado negativo.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa pura de *E. coli*.

Prueba	Resultado
Fermentación de la glucosa	+
Fermentación de la lactosa	+
Producción de gas	+
Hidrolización de la urea	-
Producción de SH <sub>2</sub>	-
Utilización del citrato	-
Movilidad	+
Producción de indol	+

En base a lo observado en las colonias macroscópicamente, a la tinción de Gram, al microscopio y a los resultados del Enterotest, se confirmó que la bacteria en estudio es *E. coli*, y se logró caracterizarla. Es capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares, tiene movilidad, es fermentadora de glucosa y lactosa con producción de gas y aldehído, es oxidasa negativa, no forma esporas y produce indol a partir de triptófano. La prueba bioquímica de rojo de metilo dio positiva, al no producir acetilmetilcarbinol y al no utilizar citrato como fuente de carbono.

Se construyó la curva de crecimiento de *E. coli* mediante determinación de crecimiento bacteriano por turbidimetría (DO) y por recuento en placa en superficie (UFC/ml) (Figura 2). Para ambas determinaciones se observó la misma tendencia. Entre las 0 y 2,30 h (0 y 150 min) el crecimiento fue casi nulo, siendo esta la fase de latencia dónde las células están sintetizando nuevos componentes e incrementan la expresión de los genes importantes para el crecimiento. Pasadas las 2,30 h se observó un crecimiento exponencial, el cual corresponde a la fase del mismo nombre, siendo esta dónde las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente (Santos et al., 2005). A las 6 h se observó un cambio en la pendiente de la curva correspondiente con la fase estacionaria cómo consecuencia de la disminución de la velocidad de síntesis de macromoléculas, dicha fase inicia cuando disminuyen los nutrientes (Almaguer, 2017).

Se obtuvo un  $g = 27 \text{ min}$  y una  $\mu = 0,783 \text{ h}^{-1}$ .

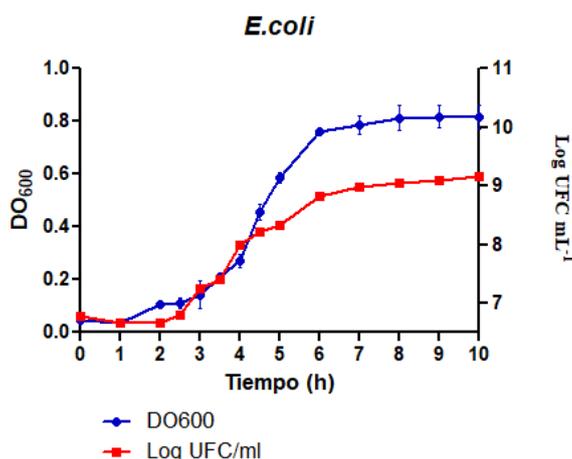


Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli*.

## Conclusiones

- Los resultados obtenidos mediante la tinción Gram, pruebas bioquímicas y prueba de oxidasa confirman que la cepa utilizada en este trabajo corresponde a *Escherichia coli*.
- La curva de crecimiento se corresponde a la obtenida por otros autores y presentó una velocidad de crecimiento óptima.
- Tanto la caracterización de *E. coli*, como el estudio de su crecimiento resultan imprescindibles y permitirán evaluar el efecto del agua activada por plasma no térmico sobre dichos microorganismos patógenos.

## Referencias

- Almaguer, S. (2017). Estudio del efecto de las interacciones no específicas en la división de la *Escherichia coli*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterre. Apodaca. Nuevo León. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3259>
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, M. (2008). *Escherichia coli* Biofilms. Bacterial Biofilms, Vol. 322. ISBN: 978-3-540-75417-6
- Bettera, S., Dieser, S., Vissio, C., Geuna, G., Díaz, C., Larriestra, A., Odierno, L., Frigerio, C. (2011). Calidad microbiológica del agua utilizada en establecimientos lecheros de la zona de Villa María (Córdoba). Rev. Argent. Microbiol. vol.43 N°2. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412011000200008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412011000200008)
- Cheng, H., Luo, J., Song, K., Zhao, F., Liu, D., Nie, L., Lu, X. (2022). On the dose of plasma medicine: Plasma-activated medium (PAM) and its effect on cell viability. Phys. Plasmas 29, 063506 doi:10.1063/5.0089357
- Conway PL. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. En: Gibson GR, Macfarlane GT (eds). Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition Physiology and Pathology. CRC Press, Florida. pp 1-24.
- Faleiro Naves, P. (2010). Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados. Madrid. ISBN: 978-84-692-8575-6
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (1999). Brock. Biología de los microorganismos. 8<sup>va</sup> Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- Mai-Prochnow, A., Zhou, R., Zhang, T., Ostrikov, K., Mugunthan, S., Rice, S. (2021). Interactions of plasma-activated water with *biofilms*: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. doi: 10.1038/s41522-020-00180-6
- Santos, J.M., Contreras Ferrat. G., Gómez Eichelmann, M.C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Rev. Latinoamericana de Microb. Vol. 47, No. 3-4. pp. 92 - 101. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2019.35.04.06/46903>
- Shen, J., Tian, Y., Li, Y., Ruonan, M., Zhang, Q., Zhang, J., Jing, C. (2016). Bactericidal Effects against *S. aureus* and Physico chemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. SciRep 6, 28505. doi: 10.1038/srep28505
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge. University Press. pp. 643.
- Urseler, N., Bachetti, R., Damilano, G., Morgante, V., Ingaramo, R., Saino, y otros. (2019). Calidad microbiológica del agua subterránea en establecimientos agropecuarios del centro-sur de Córdoba, Argentina: aptitudes y usos. doi: 10.20937/RICA.2019.35.04.06
- Xia, B., Kumari Nilesh Vyas, H., Zhou, R., Zhang, T., Hong, J., Rothwell, J., y otros. (2023). The importance of superoxide anion for *Escherichia coli* *biofilm* removal using plasma-activated water. doi: 10.1016/j.jece.2023.109977