

Carrera de Bioquímica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS
Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)
Código de la Materia: Carga horaria: 50 horas
Profesor –Investigador: Dra. María Amelia Cubitto Asistente de docencia: Dra. Lorena Brugnoni
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Aprobadas: Microbiología General y Bacteriología y Micología.
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto) Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos, 12 de octubre 991.
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: El desafío de los biofilms mixtos en la industria alimentaria: compuestos de origen microbiano como estrategias de biocontrol. Código Proyecto: PICT 2020 Serie A 00377. Director: Dra. Lorena Brugnoni
Resumen del Proyecto: La adhesión de los microorganismos a las superficies en contacto con alimentos y la subsecuente formación de biofilms es la causa principal de contaminación del producto final, comprometiendo la calidad microbiológica del alimento, la salud del consumidor y la vida comercial del mismo. Uno de los mayores riesgos para la industria alimentaria es la inclusión de bacterias patógenas en biofilms, siendo de especial importancia <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica y <i>Salmonella</i> . En particular, la asociación bacterias-levaduras que se establece naturalmente en plantas productoras de jugos de frutas y en cómo estas interacciones favorecen la persistencia de patógenos sobre las superficies de equipos y los protegen de los agentes antimicrobianos, no han sido estudiadas. Los procesos tradicionales de limpieza y desinfección utilizados para reducir o eliminar los microorganismos adheridos sobre las superficies de producción presentan conocidas desventajas, como la toxicidad de los agentes químicos utilizados y la promoción de resistencia y/o tolerancia microbiana a los mismos, por lo que la utilización de nuevas estrategias de biocontrol de biofilms basadas en sustancias naturales producidas por microorganismos, inhibidores producidos <i>in situ</i> y bioregulación representan alternativas promisorias. A tal fin, se propone en este proyecto evaluar la eficacia de compuestos producidos por bacterias (natamicina) y moléculas de <i>quorum sensing</i> como agentes de biocontrol, solos o combinados, para prevenir y/o erradicar biofilms multiespecie formados por levaduras y patógenos asociados a la industria productora de jugos de frutas.
Plan de trabajo (resumido) Se propone evaluar la eficacia de compuestos producidos por microorganismos (natamicina) y moléculas de <i>quorum sensing</i> (farnesol) como agentes de biocontrol, solos o combinados, para prevenir y/o erradicar biofilms multiespecie formados por levaduras y patógenos asociados a la industria productora de jugos de frutas, en condiciones de flujo continuo. Objetivos específicos: Analizar el efecto de farnesol y natamicina para inhibir la adhesión y colonización de levaduras en biofilms multiespecie formados en condiciones de flujo continuo y su consecuencia sobre la adhesión de bacterias patógenas, comparando estos resultados con los obtenidos previamente por el grupo en condiciones de no circulación de fluidos. Hipótesis de trabajo: La utilización de farnesol y natamicina inhibe la formación de biofilms de levaduras involucradas en el deterioro de jugos de fruta, limitando la asociación con bacterias patógenas y previniendo su adhesión. Los biofilms formados en condiciones de flujo continuo presentan mayor resistencia a los compuestos antimicrobianos que aquellos formados en condiciones estáticas, debido a una penetración reducida y/o expresión de fenotipos resistentes. Metodología: Las condiciones que se adoptarán para la formación de los biofilms multiespecie en los objetivos planteados reproducirán lo más cercanamente posible el contexto industrial de elaboración de jugos de fruta: - Se utilizarán 4 levaduras como representantes de la microbiota residente: <i>Candida tropicalis</i>, <i>C. krusei</i>, <i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , aisladas de accesorios de producción (superficies internas de equipos y sistema de UF) de industrias elaboradoras de jugo de manzana y pera y seleccionadas según trabajos previos por su alta capacidad de adhesión y colonización. - Las bacterias patógenas que se estudiarán pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos de la Universidad Nacional del Sur: <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad <i>Enteritidis</i> (<i>Salmonella enterica</i> a partir de ahora) y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (EDL 933). - Las superficies utilizadas como soportes para los ensayos de adhesión y formación de biofilms serán acero inoxidable (AI) de calidad alimentaria AISI 304-316 y membranas de UF (MUF) de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 100 kDa de cut-off.

- Los ensayos se desarrollarán en **condiciones de flujo laminar**, en celdas de flujo diseñadas para tal fin.
-En todos los ensayos, el recuento celular discriminado de los microorganismos viables en los biofilms multiespecie se evaluará en cada etapa mediante recuento en placa en medios selectivos. La caracterización mediante imágenes se realizará por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de láser confocal (CLSM) y microscopía de epifluorescencia (EFM).

Análisis del efecto de farnesol y natamicina para inhibir la adhesión y colonización de levaduras en biofilms multiespecie y su consecuencia sobre la adhesión de bacterias patógenas.

Con el fin de dilucidar posibles efectos de biocontrol, se analizará la combinación de farnesol y natamicina para inhibir las distintas etapas de formación de biofilms de levaduras, lo cual limitaría la asociación con bacterias patógenas en biofilms multiespecie, previniendo su adhesión.

Para la preparación del inóculo, las 4 especies de levaduras se cultivarán a 25 °C durante 24 hs en caldo YGC. Las células se colectarán por centrifugación a 1200 x g por 5 min, se lavarán con buffer fosfato salino (PBS) y se resuspenderán en jugo de manzana clarificado estéril de 12 °Brix, hasta una concentración final de 10⁷ UFC/ml. Los ensayos se realizarán con combinaciones 1:1:1:1 de las 4 levaduras. Las bacterias se cultivarán a 37 °C durante 18-24 hs, se colectarán por centrifugación a 1200 x g por 5 min, se lavarán con PBS y se resuspenderán en jugo de manzana clarificado estéril de 12 °Brix, hasta una concentración final de 10⁵ UFC/ml.

Los ensayos en condiciones de flujo laminar se realizarán en la celda de flujo donde se colocarán superficies de de Al o MUF y se agregará la mezcla de levaduras + cada bacteria patógena, obteniéndose las siguientes combinaciones: microbiota residente+*L. monocytogenes*, microbiota residente+ *E. coli* O157:H7, microbiota residente+*Salmonella enterica*.

Efecto sobre la etapa de adhesión (2 hs) y en la fase intermedia (24 hs) y final de formación de un biofilm maduro (48 hs): La suspensión de levaduras y bacterias (10⁷ y 10⁵ cél/ml, respectivamente) se agregará sobre las superficies junto con farnesol (0,06 mmol/l) y natamicina (0,01 mmol/l), según datos previos durante 2 hs. Transcurrido el tiempo, se retirarán 3 superficies que se enjuagarán con PBS y las restantes se trasladarán a nuevos pocillos con la matriz alimentaria+farnesol (0,06 mmol/l)+ natamicina (0,01 mmol/l) hasta completar las 24 hs y 48 hs. Se incluirán muestras controles reemplazando los tratamientos por volúmenes similares de solución fisiológica. El número de microorganismos en cada etapa se evaluará mediante recuento en placa, y la estructura y organización de los biofilms mediante microscopía.

Descripción de las Actividades a realizar:

El alumno participará en la realización de las tareas básicas de un laboratorio de microbiología: esterilización por calor (autoclave) de material y medios de cultivo, preparación de soluciones y buffers mediante esterilización por filtración.

Recibirá entrenamiento en técnica aséptica y preparación de muestras para microscopía electrónica (SEM) y de láser confocal.

Realizará búsqueda y organización de artículos científicos, e interpretación de algunos de ellos.

Participará en el montaje, operación y control de los experimentos, así como en las determinaciones microbiológicas asociadas a los mismos: técnica de recuento en placa en medios comunes, selectivos, diferenciales.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 1

Carga horaria semanal: 5 horas

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: Se realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)