

---

ISSN 0372-4565 (de)

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO - UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

---

**Publicación Técnica y Didáctica**  
**n° 43**

**EDITOR:**

Comisión de Publicaciones y Junta Editora

**EDITOR RESPONSABLE:**

H. Echeveste

**JUNTA EDITORA:**

M. Azpelicueta, M. Canafoglia, C. Claps, C. De Villalobos, J. Giménez,  
C. Lavallo, C. Paleo, C. Roller, T. Simanauskas, J. Williams

**PARA CONSULTAS DIRIGIRSE A:**

Lic. H. Echeveste

Museo de La Plata, Paseo del Bosque s/n  
1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [hecheveste@museo.fcnym.unlp.edu.ar](mailto:hecheveste@museo.fcnym.unlp.edu.ar)

---

La Plata, República Argentina

2003

---

ISSN 0372-4565 (de)

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO - UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**Publicación Técnica y Didáctica n° 43**

---

**Inhibición de la adherencia bacteriana a superficies metálicas  
por cubiertas de origen biológico**

**Patricia S. Guamet y Sandra G. Gómez de Saravia**

---

La Plata, República Argentina

2003

## Inhibición de la adherencia bacteriana a superficies metálicas por cubiertas de origen biológico

Patricia S. Guiamet (\*) y Sandra G. Gómez de Saravia (\*\*)

(\*) INIFTA. CONICET. UNLP. C.C. 16, Suc. 4, 1900 La Plata, Argentina

E-mail: pguiamet@inifta.unlp.edu.ar Tel: 425-7430, Fax: 425-4642

(\*\*) INIFTA. CICPBA. UNLP. C.C. 16, Suc. 4, 1900 La Plata, Argentina

E-mail sgomez@inifta.unlp.edu.ar Tel: 425-7430, Fax: 425-4642

**RESUMEN.** El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de una solución de inmunoglobulinas sobre la adherencia de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) a superficies metálicas de interés industrial tales como aceros inoxidable y acero al carbono. Se utilizaron para ello mezclas de inmunoglobulinas: IgA, IgG e IgM y gamaglobulina sérica. Para observar la adherencia bacteriana a las superficies metálicas se empleó el microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA). En las diferentes condiciones experimentales ensayadas con la solución de inmunoglobulinas, se observó una marcada inhibición de la adherencia bacteriana. Contrariamente cuando se utilizó la solución de gamaglobulina la adherencia bacteriana se vio incrementada.

**Palabras clave.** Inhibición de la adherencia, inmunoglobulinas, gamaglobulina, aceros, *Pseudomonas fluorescens*.

**ABSTRACT.** The aim adhesion of this paper was to study the effect of immunoglobulins solutions on *Pseudomonas fluorescens* on metal surfaces of in industrial interest such us stainless steel and mild surfaces. Mixtures of immunoglobulins IgA, IgG, and IgM as well as serum gamaglobulin were employed. Scanning electron microscopy (SEM) and environmental scanning electron microscopy (ESEM) observations of the metal surfaces were made. A marked inhibition of the bacterial adherence was observed when the mixture of immunoglobulins was used. The contrary, bacterial adherence increased when the gamaglobulin solution was employed.

**Key words.** Inhibition adhesion, immunoglobulins, gamaglobulin, steels, *Pseudomonas fluorescens*.

### Introducción

El inicio de la corrosión inducida microbiológicamente (CIM) está generalmente precedido por la adherencia bacteriana (Characklis, 1981; Videla & Characklis, 1992). Los procesos de

adherencia comienzan inmediatamente después de la inmersión de una superficie metálica en un medio acuoso natural o industrial y conducen a la formación de biopelículas.

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. La presencia de éstas biopelículas explicaría las alteraciones físicas, químicas y biológicas que ocurren en la interfase metal/solución anteriores al inicio del ataque localizado o inhibición de la corrosión (Videla 1996).

La adherencia de microorganismos a las superficies 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. Por otra parte, la adherencia de microorganismos a metales resistentes a la corrosión como son los biomateriales usados en medicina puede promover a la coagulación y a riesgos de infección. Las cubiertas de albúmina sobre superficies de biomateriales pueden disminuir la coagulación y la adherencia bacteriana. En experiencias realizadas con superficies de titanio cubiertas con suero bovino, pudo observarse que el grado de inhibición de la adherencia bacteriana fue alto y permaneció constante a lo largo de toda la experiencia (Ann et al., 1996).

Los factores que afectan la adherencia de las células bacterianas a la superficie de los biomateriales, incluyen la química superficial de la célula y del material, así como también la composición de la capa de proteína adsorbida al material expuesto a fluidos orgánicos (Nagel et al., 1996).

La IgA está constituida por una cadena simple de péptidos con un peso molecular de 60000 y es una una de las 5 principales 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 (Roitt, 1988).

Recientemente se ha reportado, que la inmunoglobulina A secretoria inhibe la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la cornea (Masinick et. Al, 1997) . Se ha determinado que la acción inhibitoria de la IgA sobre la adherencia bacteriana es dependiente de la concentración. Además se considera que la IgA monoclonal previene la adherencia de *Salmonella* sp. a células epiteliales en ausencia de otros mecanismos inmunes o no inmunes (Michetti et. al, 1994).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la habilidad que presentó una solución de inmunoglobulinas en diferentes concentraciones y de gamaglobulina sérica para impedir la adherencia de *Pseudomonas fluorescens* (un microorganismo frecuente en la formación de biopelículas en sistemas industriales acuosos) a superficies de acero al carbono y de aceros inoxidable de diferentes tipos.

## Metodos

Las experiencias se realizaron utilizando un microorganismo aislado de emulsiones de corte: *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). Esta fue mantenida en agar nutritivo y su pureza chequeada periódicamente con coloraciones de Gram, test de oxidasa y otras pruebas bioquímicas (Koneman et. al., 1997).

El inóculo de *P. fluorescens* se obtuvo a partir de un repique en agar nutritivo incubado a 28 °C durante 24 hs. y se colocó en un erlenmeyer con 150 ml de medio de Postgate C (Postgate, 1984) . Luego de una hora de agitación en un agitador magnético, se colocaron los cupones metálicos con la finalidad de evaluar la adherencia bacteriana a las superficies metálicas.

Se utilizaron cupones de acero al carbono SAE 1020 de 0.4 cm<sup>2</sup> de área y de acero inoxidable del tipo AISI 316 y AISI 304 de 0.2 cm<sup>2</sup> de área. Antes del uso los cupones fueron embebidos en una resina, pulidos 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.

Se utilizaron dos soluciones comerciales de: i) 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 y ii) Gamaglobulina (Seroglobulin-T, Gador) en la que cada mililitro de solución contenía 165 mg de globulinas séricas (con un rango de IgA: 90-310 mg/100 ml de suero; IgG 710-1520 mg/100 ml de suero; IgM 40-250 mg/100 ml de suero). También se utilizaron diluciones de la solución de inmunoglobulinas de 1/100 y 1/1000.

Se analizaron los siguientes cupones metálicos con los siguientes pretratamientos: a) inmersión en el cultivo bacteriano sin la cubierta de inmunoglobulinas; b) inmersión en el cultivo bacteriano luego de la formación de una cubierta de inmunoglobulinas sobre la superficie metálica durante tiempos de contacto de 1 min, 5 min, 10 min, y 3 hs y c) inmersión en el cultivo bacteriano luego de la formación de una cubierta de gamaglobulina durante un tiempo de contacto de 3 hs.

Los cupones se retiraron luego de permanecer en el cultivo 24 hs, y las biopelículas fueron removidas de la superficie metálica utilizando un bisturí estéril. Posteriormente se depositaron en 10 ml de solución salina isotónica para proceder con la técnica de recuento bacteriano en placa. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se obtuvo luego de un período de incubación de 48 h a 28 °C.

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 fueron deshidratadas por sucesivos pasajes en series de acetona hasta llegar al 100 % y finalmente tratadas con la técnica del punto crítico (Gómez de Saravia et. al., 1993).

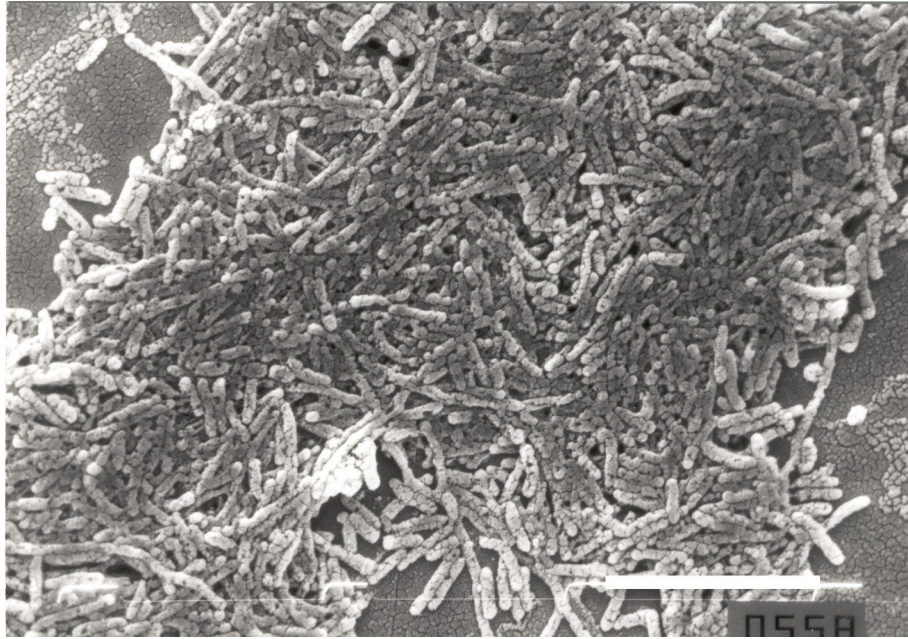
Con el fin de eliminar las interferencias que podrían presentar las muestras con pretratamiento para su observación en el MEB, también se realizaron observaciones en un microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) Philips ElectroScan 2010. El film de inmunoglobulinas adsorbido a la superficie del metal también fue estudiado usando una microsonda electrónica (CAMECA SX 50).

## Resultados y discusión

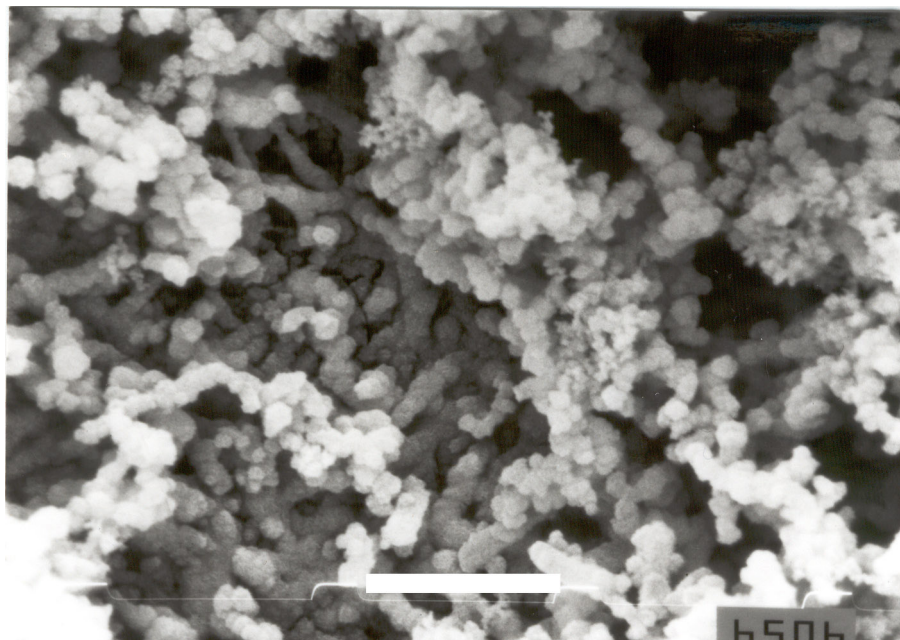
En todos los casos luego de 24 hs de contacto con el cultivo bacteriano los cupones metálicos testeados presentaron una abundante adherencia de *P. fluorescens* que fue observada en el MEB y en el MEBA. Las biopelículas fueron más fácilmente observadas sobre el acero inoxidable (Fig. 1) que sobre el acero al carbono (Fig. 2) pues sobre estas muestras, se observaron abundantes productos de corrosión. El promedio obtenido de los conteos bacterianos de la población sésil fue del orden de  $10^9$  UFC/cm<sup>2</sup> para el acero inoxidable tipo AISI 316 y para el acero al carbono y de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> para el acero inoxidable tipo AISI 304 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Evaluación estadística del desarrollo de *P. fluorescens* sobre las superficies metálicas con y sin la solución de inmunoglobulinas adsorbidas.

Metal	Biopelículas UFC/cm <sup>2</sup>	Solución de inmunoglobulinas UFC/cm <sup>2</sup>	Solución de inmunoglobulinas (1:100 dil.)UFC/cm <sup>2</sup>	Solución de inmunoglobulinas (1:1000 dil.)UFC/cm <sup>2</sup>
AISI 316	$\bar{X}$ : 4.2 . 10 <sup>9</sup> SD: 3.2. 10 <sup>9</sup>	$\bar{X}$ : 1.1. 10 <sup>5</sup> SD: 1.1. 10 <sup>5</sup>	$\bar{X}$ : 1.0. 10 <sup>6</sup> SD: 3.6. 10 <sup>5</sup>	$\bar{X}$ : 7.5. 10 <sup>5</sup> SD: 1.0. 10 <sup>6</sup>
AISI 304	$\bar{X}$ : 4.0. 10 <sup>8</sup> SD: 7.7. 10 <sup>7</sup>	$\bar{X}$ : 5. 10 <sup>4</sup> SD: 1.3. 10 <sup>4</sup>	$\bar{X}$ : 4.6. 10 <sup>4</sup> SD: 5.4. 10 <sup>3</sup>	$\bar{X}$ : 8.4. 10 <sup>5</sup> SD: 8.7. 10 <sup>4</sup>
SAE 1020	$\bar{X}$ : 2.35. 10 <sup>9</sup> SD: 2.28. 10 <sup>9</sup>	$\bar{X}$ : 4.4. 10 <sup>4</sup> SD: 1.6. 10 <sup>4</sup>	$\bar{X}$ : 5.44. 10 <sup>4</sup> SD: 6.5. 10 <sup>4</sup>	$\bar{X}$ : 1.8. 10 <sup>5</sup> SD: 1.0. 10 <sup>5</sup>



**Figura 1.** Microfotografía de MEB de la superficie del acero inoxidable AISI 304 luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  3500). Barra=10 $\mu$



**Figura 2.** Microfotografía de MEB de la superficie del acero al carbono SAE 1020 luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  3500). Barra= 10 $\mu$



**Tabla 2.** Concentraciones de IgA, IgG, e IgM en los productos ensayados.

Concentración	IgAulin, Austria	Seroglobulin-T, Gador
IgA	60 mg/ml	0,9-3 mg/ml
IgG	30 mg/ml	7.1-15.2 mg/ml
IgM	2 mg/ml	0.4-2.5 mg/ml

Los cupones metálicos previamente acondicionados con una cubierta de inmunoglobulinas, mostraron una disminución en la adherencia bacteriana (Figuras 3 y 4). Esto se corroboró con los conteos bacterianos (Tabla 1).

Luego de 72 hs de exposición en los cultivos bacterianos, las muestras metálicas cubiertas con las distintas diluciones de la solución de inmunoglobulinas no mostraron diferentes resultados siendo similares a las observadas luego de 24 hs de exposición.

Las observaciones realizadas en el MEBA con muestras hidratadas corroboraron las observaciones realizadas en el MEB (Figura 5).

Los cupones de acero inoxidable expuestos en soluciones de gamaglobulina bajo las mismas condiciones experimentales que para la solución de inmunoglobulinas, mostraron una marcada diferencia en los resultados. En este caso las biopelículas fueron más abundantes que en los cupones inmersos en cultivos sin cubierta de gamaglobulina (Figura 6).

Estos resultados coinciden con otros publicados recientemente utilizando otros microorganismos y sustratos (Cook, et. al., 1993) que reportan un incremento en el número de bacterias adheridas de aproximadamente un 45 % cuando las proteínas adsorbidas (fibrinógeno, mucina) estuvieron en contacto con hidrogeles.

Nuestros 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 gamaglobulina (Tabla 2). Esto es sostenido por diversos estudios realizados en el área de los materiales implantables (Masinick et.al., 1997; Michetti et. al., 1994) y por el conocimiento del efecto específico de la IgA sobre la adherencia bacteriana a otro tipo de superficies.

### Conclusiones

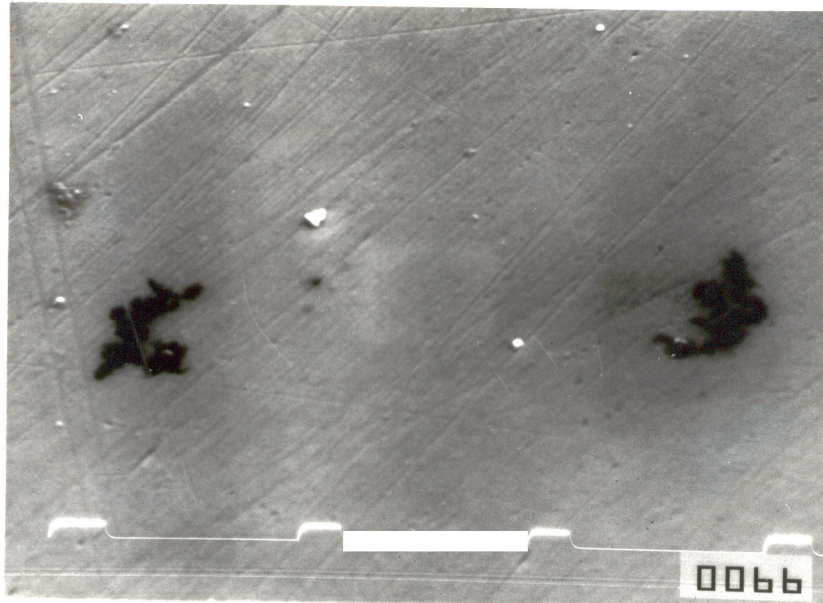
i. La cubierta de inmunoglobulinas fue efectiva para prevenir la adherencia bacteriana de *P. fluorescens* a superficies de acero inoxidable y acero al carbono bajo las diferentes condiciones experimentales ensayadas.

ii. La inhibición de la adherencia bacteriana estaría específicamente ligada a la IgA aún cuando la solución de inmunoglobulinas presentaba también en menor cantidades IgG e IgM. Por el contrario la gamaglobulina incrementó el número de bacterias adheridas a las superficies.

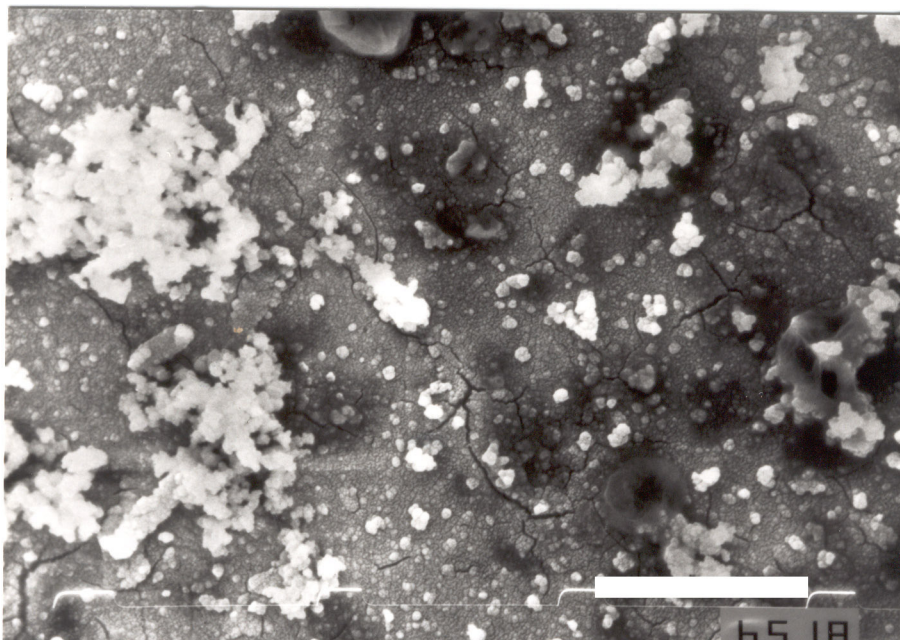
iii. Los resultados obtenidos indican que la solución de inmunoglobulinas podría ser potencialmente usada para evitar la adherencia bacteriana a superficies metálicas de uso industrial como aceros inoxidables y acero al carbono disminuyendo el efecto negativo de las biopelículas bacterianas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Inmuno Argentina S.A. por la donación de la solución de inmunoglobulinas, y al CONICET, UNLP y CICPBA por el financiamiento del trabajo.

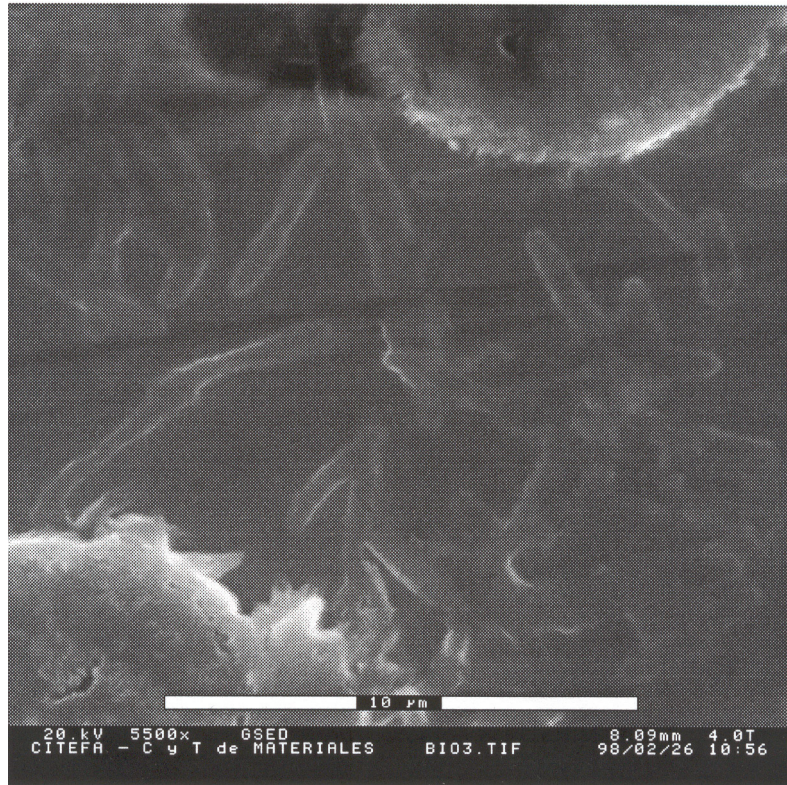


**Figura 3:** Microfotografía de MEB de la superficie del acero inoxidable AISI 304 con la cubierta de la solución de inmunoglobulinas luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  3500). Barra= 10 $\mu$

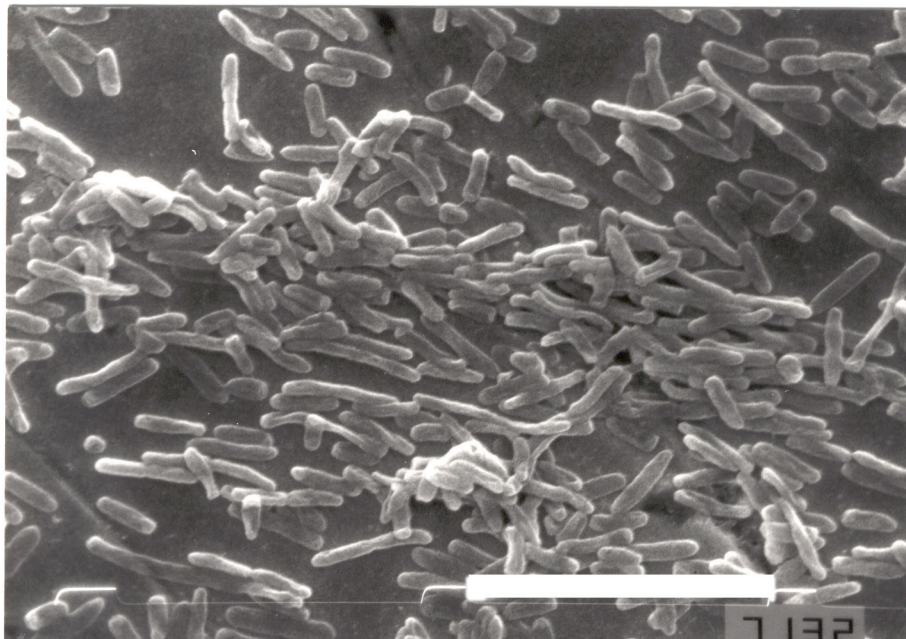


**Figura 4:** Microfotografía de MEB de la superficie del acero al carbono SAE 1020 con la cubierta de la solución de inmunoglobulinas luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  3500). Barra= 10 $\mu$





**Figura 5:** Microfotografía de MEBA de la superficie del acero inoxidable AISI 316 luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  5500). Barra= 10 $\mu$



**Figura 6:** Microfotografía de MEB de la superficie del acero inoxidable AISI 316 con la cubierta de la solución de gamaglobulina luego de exponerse a un cultivo de *P. fluorescens* durante 24 h. (Aumento  $\bar{x}$  3500). Barra= 10 $\mu$

### Bibliografía

- AN, Y.N., STUART, G.W., MCDOWELL, S., MCDANIEL, S.E., KANG Q., FRIEDMAN R.J (1996). Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *J. of Orth. Res.*, 14: 846-849.
- CHARACKLIS, W.G. (1981). Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotech. Bioeng.*, 23: 1923-1960.
- COOK, A.D., SAGERS, R.D. PITT, W.G. (1993). Bacterial adhesion to protein-coated hydrogels. *J. Biomater. Appl.*, 8: 72-89.
- GÓMEZ DE SARAVIA S.G., GUIAMET P.S., VIDELA H.A. (1993). Uso de técnicas microscópicas para el estudio de adherencia microbiana sobre diversas superficies metálicas. *Anales del CIDEPIINT*, 299-307.
- KONEMAN, W.E., STEPHEN, D.A., DOWELL, V., JANDA, W.M., SOMMERS, H.M. WINN, W.C. (1997). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 909 Págs.
- MASINICK, S.A., MONTGOMERY, C.P., MONTGOMERY, P.C. HAZLETT, L.D. (1997). Secretory IgA inhibits *Pseudomonas aeruginosa* binding to cornea and protects against keratitis *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 910-918.
- MICHETTI, P., PORTA, N., MAHAN, M.J., SLAUCH, J.M., MEKALANOS, J.J., BLUM A.L., KRAEHENBUHL, J. P., NEUTRA, M.R. (1994). Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella typhimurium* *Gastroenterology*, 107: 915-923.
- NAGEL, J.A., DICKINSON, R.B., COOPER, S.L. (1996). Bacterial adhesion to polyurethane surfaces in the presence of pre-adsorbed high molecular weight kininogen. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 7: 769-780.
- POSTGATE, JR. (1984). The Sulphate-Reducing Bacteria. Cambridge University Press, 122 Págs.
- ROITT, I.M. (1988). Essential Immunology. Scientific Publications, Oxford, UK. 286 Págs.
- VIDELA, H.A., CHARACKLIS W.G. (1992). Biofouling and microbiologically influenced corrosion. *Inter. Biodeterior. Biodegrad.*, 29: 195-201.
- VIDELA H.A. (1996). Corrosion inhibition in the presence of microbial corrosion En: Raman A., Labine, P. (Ed.): Reviews Inhibitors on Corrosion Inhibitor Science and Technology., Vol. 2, IX, p.1-11. NACE International, Houston, TX.

**Recibido:** 13/ 06 / 02  
**Aceptado:** 06/ 03 / 03s