

Capítulo 5

Caracterización Microbiológica.

5.1 Microorganismo y medios de cultivo utilizados.

5.1.1. Cepa Bacteriana.

Entre las bacterias capaces de formar biofilms se encuentran tanto las Gram positivas como Gram negativas, patógenas y no patógenas. Entre las bacterias Gram negativas los biofilms de *Pseudomonas* tienen especial importancia ya que por su ubicuidad impactan en la medicina, industria y medio ambiente.

Las *Pseudomonas* son microorganismos móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares (1). Estos microorganismos presentan además, un interés particular debido a que son tomados como modelo en estudios de desplazamiento colectivo conocido como *swarming* (2-13), tal como se detallará en los Capítulos 7 y 8. Algunas especies sintetizan una capa de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas o biofilms, y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o complementos, aumentando así su patogenicidad. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque también pueden ser patógenos oportunistas en animales (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). Tienen un metabolismo aerobio, con el O₂ como aceptor de electrones pero algunas cepas tienen uno anaerobio, utilizando el NO₃⁻ como aceptor de electrones. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos, fácilmente solubles en agua (14). Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo. Presentan una amplia versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad para utilizar sustratos muy variados como fuente de carbono. Dicha versatilidad se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas las cuales permiten catabolizar los compuestos presentes en el medio. Debido a ello, las *Pseudomonas* son capaces de colonizar un amplio rango de nichos (15). En concordancia con otros biofilms bacterianos, las biopelículas de *Pseudomonas* son más resistentes a los antibióticos que las correspondientes células planctónicas (16).

Para el presente trabajo de Tesis, se eligió una cepa de *P. fluorescens* que fue cedida gentilmente por la Dra Christine Gaylarde del Departamento de Biología y Química de la UNIJUI en Brasil y fue identificada por pruebas estándares bacteriológicas utilizando medios selectivos y tests bioquímicos.

Las bacterias *P. fluorescens* son organismos aerobios quimioorganotróficos, es decir, que su metabolismo se basa en reacciones de óxido-reducción para obtener energía, utilizando sustancias oxidables a pH neutro o básico. Su diámetro varía entre 0,5 y 0,8 μm. Se reproducen a temperaturas mesófilas (entre 25 y 30°C) y como todo el género de *Pseudomonas* presentan una gran capacidad para utilizar diversidad de nutrientes, lo que explica su ubicuidad. Su versatilidad nutricional ligada a su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente

responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas.

P. fluorescens ha sido frecuentemente identificada como microorganismo contaminante de la piel humana y como agente causante de bacteremia (presencia de bacterias en sangre) e infecciones en pacientes hospitalizados (17-19). Esta especie de *Pseudomonas* también ha sido aislada de pacientes que presentaban infecciones complicadas del tracto urinario (11, 20). Asimismo cabe mencionar su presencia en biofilms desarrollados en diversos sistemas industriales, como así también su potencial riesgo para causar serios problemas en términos del proceso y la seguridad del producto final en la industria alimenticia. En los procesos industriales de alimentos percederos diarios, *P. fluorescens* es uno de los microorganismos psicotróficos más comúnmente aislados y además domina la microflora de la leche cruda o pasteurizada en el momento de su deterioro (21-22). Esta capacidad para el deterioro de este tipo de productos se debe a la producción de lipasas, proteasas y lecitinasas extracelulares altamente estables en ambientes de altas temperaturas y que, por ende, persisten durante las etapas térmicas llevadas a cabo durante el procesamiento de los productos (23-24). Recientemente, algunos estudios han demostrado que algunas cepas de *Pseudomonas*, entre ellas *P. fluorescens*, pueden incrementar la colonización de superficies por parte del microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes* (25) y/o proteger a esta bacteria de la acción de los desinfectantes. En base a lo reportado previamente, se consideró de gran interés utilizar a *P. fluorescens* en los ensayos realizados para el presente Trabajo de Tesis.

5.1.1.1. Técnicas de conservación de la cepa bacteriana.

Debe tenerse en cuenta que es de suma importancia la conservación de la cepa de trabajo para mantener los cultivos viables a lo largo del tiempo, puros, sin contaminaciones y sin cambios en sus características, o sea, estables. La técnica de conservación utilizada durante los períodos de trabajo fue el subcultivo seriado. Esta técnica consiste en resembrar el microorganismo cada cierto tiempo en un medio adecuado. Para el caso de *P. fluorescens*, se realizó un cultivo sobre agar Cetrimide (DIFCO) inclinado y se mantuvo a 28°C para posibilitar el crecimiento óptimo del microorganismo. Posteriormente se transfirió a un compartimiento refrigerado a 4°C para lentificar el metabolismo de la bacteria. Cada 20 días se resembró el microorganismo en agar Cetrimide inclinado ya que

en medio sólido se detectan mejor los contaminantes que en medio líquido y al hacerlo inclinado se evita la desecación rápida del medio.

5.1.2 Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados durante la totalidad de los ensayos realizados en el presente trabajo de Tesis fueron:

- Líquido: Caldo nutritivo (MERCK)
- Sólido: Agar Cetrimide (DIFCO)

La composición del caldo nutritivo se indica en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Composición del Caldo Nutritivo

Composición Caldo Nutritivo	g/l
Peptona de carne	5
Extracto de carne	3

El pH del este medio de cultivo es $7,0 \pm 0,2$. El Caldo Nutritivo se utilizó como medio de cultivo no selectivo para llevar a cabo todos los ensayos en medios líquidos.

La composición del Agar Cetrimide se indica en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Composición de Agar Cetrimide

Composición Agar Cetrimide	g/l
Digestivo pancreático de gelatina	20
Cloruro de magnesio	1,4
Sulfato de potasio	10
Cetrimide (Bromuro de tetradeciltrimetil amonio)	0,3
Agar	13,6

El Agar Cetrimide se utilizó como medio sólido para mantener a la cepa de *P. fluorescens* debido a que es un medio selectivo para el género *Pseudomonas*. La cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibe el crecimiento de otras bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. Dicho medio promueve la producción de piocianina y fluoresceína que se observan con luz ultravioleta en los cultivos de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*.

5.2 Cultivo de *P. fluorescens* en medio líquido: Curva de calibración.

Para realizar ensayos microbiológicos bajo condiciones equivalentes es necesario trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. Una de las formas de medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento de la misma es utilizando un método que relacione dicha biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz. Para estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro, en el cual la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano. El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo (I_0) y la transmitida (I) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia (A) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre I_0 y la de la luz transmitida por la suspensión, $A = \log I_0/I$. A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (dicha intensidad se detecta como corriente en un galvanómetro). Esta reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células. Sin embargo, la absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de Absorbancia (medidas a 600 nm de longitud de onda).

El conteo en placa o de colonias es un método de medición de biomasa que permite el recuento de células viables y consiste en determinar el número de células capaces de reproducirse y generar colonias sobre un medio sólido (cada célula viable da origen a una colonia). Por lo tanto este método no es capaz de cuantificar células vivas pero incapaces de reproducirse.

Para realizar el conteo en placa, la muestra original se diluyó varias veces para disminuir suficientemente la población celular. Posteriormente, 100 μ l de cada dilución se derramaron y extendieron sobre placas de petri con agar nutritivo. Se dejaron incubar a 28°C en forma invertida. Luego del período de crecimiento, se examinaron las placas y se contaron aquellas que tienen entre 30 y 300 colonias por placa para realizar un adecuado análisis estadístico.

La Figura 3.1 muestra la curva de calibración realizada que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). La medición de absorbancia es un método sencillo y más rápido que el conteo en placa pero es menos

sensible y está limitado a cultivos celulares con concentraciones de 10^7 células/ml o mayores. Con el objetivo de la determinación de una curva de calibración representativa del sistema en estudio, los ensayos se realizaron por duplicado y cada ensayo fue repetido tres veces en forma independiente

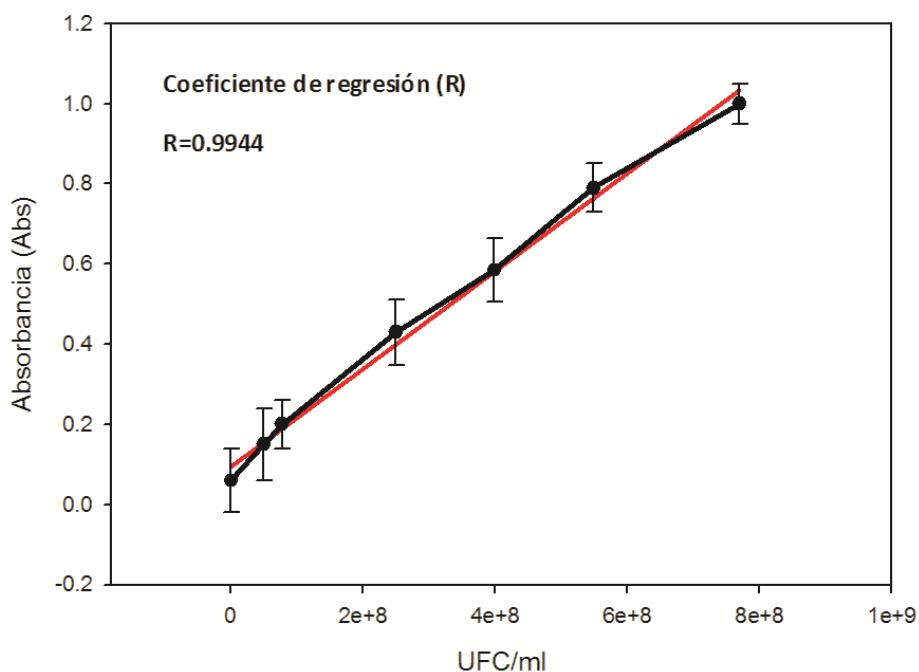


Figura 3.1. Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens*.

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{abs} = 1,218 \times 10^{-9} X_{ufc/ml} + 0,094_{abs}$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, el número de unidades formadoras de colonias. Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia de 0,5 le correspondería 3×10^8 UFC/ml.

5.3 Cultivo de *P. fluorescens* en medio líquido: Curva de crecimiento.

Para la realización de la curva de crecimiento de *P. fluorescens* se empleó un frasco erlenmeyer conteniendo 200 ml de caldo nutritivo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento con una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 600 nm corresponda a 0,10 ($4,9 \times 10^6$ UFC/ml).

Posteriormente, los frascos se sometieron a agitación durante 3 h (agitación a 120 ciclos por min) a una temperatura de 28°C. Seguidamente, se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestras de 2,5 ml de la suspensión de *P. fluorescens* a distintos tiempos y midiendo su densidad óptica con un Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800. Al finalizar la experiencia cinética, el cultivo de *P. fluorescens* fue inoculado sobre un medio sólido para asegurar la ausencia de contaminación. La curva de crecimiento obtenida es la que se muestra en la Figura 3.2 en escalas lineal y logarítmica. Los ensayos para la determinación de las curvas de crecimiento se realizaron por duplicado y tres veces en forma independiente. Con dichos datos se obtuvieron las desviaciones estándar para cada uno de los puntos de la curva de crecimiento.

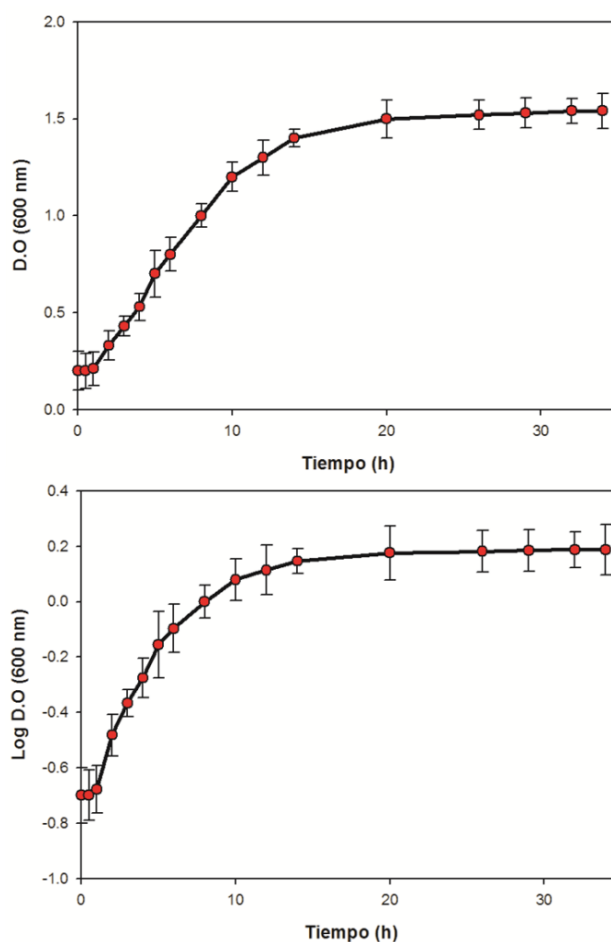


Figura 3.2. Curva de crecimiento en medio líquido de *P. fluorescens*. La curva superior muestra la relación entre la densidad óptica (DO) y el tiempo y la inferior log DO vs. tiempo.

A partir de esta curva de ordenadas logarítmicas pudo deducirse que la fase de latencia es de aproximadamente 1 h y que la fase exponencial tiene una duración cercana a 8 h. Luego de este tiempo, el cultivo entra en un estado estacionario (número de microorganismos aproximadamente constante).

5.4 Crecimiento de biopelículas sobre superficies.

5.4.1. Curva de crecimiento del biofilm.

Además de la curva de crecimiento de *P. fluorescens* en medio líquido, es necesario conocer la curva del crecimiento del microorganismo adherido a la superficie modelo en estudio. En este caso, el sustrato elegido es una superficie de Au (Au-NSa, que se describe detalladamente en el Capítulo 3). Se utilizó un cultivo de *P. fluorescens* tal cual se describió anteriormente para la curva de crecimiento en medio líquido. Posteriormente, sobre cada sustrato de Au, se colocaron microgotas de 25 μ l y se dejaron durante 30 min para que se adhieran las primeras bacterias. Los sustratos se enjuagaron con agua bidestilada estéril para retirar los microorganismos débilmente adheridos y luego, se mantuvieron inmersos en caldo nutritivo estéril para que las células adheridas crezcan sobre la superficie durante distintos tiempos para obtener una curva de crecimiento sobre el sustrato. La misma metodología fue utilizada para el estudio de la formación de biofilms sobre los distintos sustratos estudiados.

Para determinar la cantidad de microorganismos sobre la superficie se utilizó una mezcla de colorantes (*kit Live/Dead BacLight*®) que permite identificar las células vivas adheridas sobre la superficie (se describe el mecanismo de acción del colorante en el Capítulo 2). La técnica de epifluorescencia permitió la determinación del área del sustrato cubierta por los microorganismos. Cada ensayo fue realizado por duplicado y se repitió en forma independiente tres veces.

En la Figura 3.3, se observa la curva de crecimiento sobre la superficie de Au-NSa de *P. fluorescens*. Se observa que durante las primeras 12 h el área cubierta por el biofilm crece y llega a un máximo para luego disminuir.

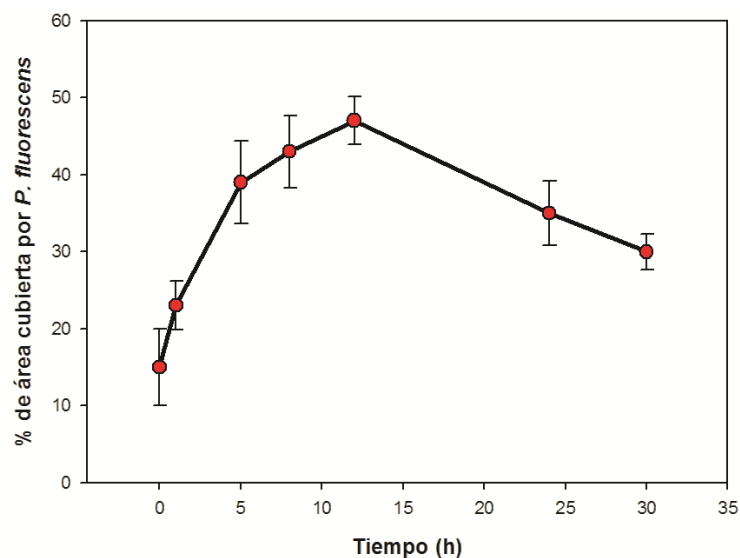


Figura 3.3. Curva de crecimiento de *P. fluorescens* adheridas sobre una superficie de Au. El crecimiento se mide como porcentaje de área cubierta por el biofilm.

5.4.1. Formación de biofilms sobre distintos sustratos.

Para el estudio de la adhesión, comportamiento y distribución de las bacterias *P. fluorescens* sobre los distintos sustratos, se realizaron ensayos a partir de un inóculo preparado a partir de un pico de flauta de *P. fluorescens* en agar cetrimide resuspendido en 2 ml de caldo nutritivo estéril. Luego, este inóculo fue vertido en un erlenmeyer con 300 ml de caldo nutritivo estéril y se mantuvo en agitación durante 3 h a 28 °C. Luego de 24 h, los sustratos en estudio se colocaron dentro del cultivo bacteriano durante diferentes tiempos, para que los microorganismos se adhieran a la superficie de los mismos y se inicie el proceso de desarrollo del biofilm. Posteriormente al período de inmersión, las muestras fueron retiradas, se realizaron varios enjuagues con agua bidestilada estéril para retirar aquellos microorganismos débilmente adheridos y por último fueron secados al aire (70% de humedad relativa).

5.5 Estudio de los factores que influyen sobre la adherencia bacteriana a superficies.

De acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1, el proceso de adhesión es sumamente complejo y está afectado por diversos factores entre ellos: (1) características del microorganismo, (2) naturaleza química y física de la superficie en estudio, (3)

características del ambiente en el que crecen las células (propiedades físicoquímicas del medio, la presencia de carbohidratos, proteínas o sustancias bactericidas, etc.). Por lo tanto, es de sumo interés, tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado, estudiar detalladamente cómo influirían factores como la hidrofiliidad de la membrana sobre las primeras etapas de formación del biofilm. (26).

5.6 Determinación de la hidrofobicidad de la membrana celular.

Las investigaciones que se han realizado sobre los mecanismos fundamentales que rigen el proceso de adhesión bacteriana han demostrado que tanto las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals como la interacciones ácido-base de Lewis, que impactan sobre la hidrofobicidad, están involucradas en el proceso de adhesión.

La hidrofobicidad bacteriana puede determinarse por varios métodos: (1) método del ángulo de contacto (27-28); (2) evaluación de la habilidad de la bacteria para adherirse a hexadecano, hidrocarburos o poliestireno (29-33); (3) partición del microorganismo en un sistema de dos fases acuosas (34-36); (4) el test del agregado de sal (29, 37-38); (5) cromatografía de interacción hidrofóbica (29, 38-39); (6) test de aglutinación de partículas de latex (29, 40); o (7) la dirección de desplazamiento (41).

En el presente trabajo la afinidad de la membrana bacteriana por solventes y la capacidad donora y aceptora de electrones (propiedades ácido-base de Lewis) de la superficie celular de *P. fluorescens* se determinaron a través de medidas indirectas utilizando dos técnicas: (1) Adhesión Microbiana a Solventes (Microbial Adhesion To Solvents, MATS) y la medida de ángulo de contacto (Contact Angle Meter testing, CAM).

5.6.1. Método de Adhesión Microbiana a Solventes (MATS).

El método MATS se basa en la comparación entre la afinidad celular por un solvente monopolar y un solvente apolar (42). El solvente monopolar puede ser de naturaleza ácida (aceptor de electrones) o básica (donor de electrones), pero ambos solventes deben tener componentes de tensión superficial Lifshitz van der Waals similares. Teniendo en cuenta estos requisitos, los solventes elegidos fueron: cloroformo, un solvente ácido (aceptor de electrones) y hexadecano, un solvente apolar.

Se prepararon suspensiones bacterianas de densidad óptica (A_0) entre 0,8 y 0,9 en una solución tampón conocida como PUM buffer, que está compuesta por 19.7 g K_2HPO_4 , 7.26 g KH_2PO_4 , 1.8 g H_2NCONH_2 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua bidestilada hasta llegar a un volumen de 1000 ml. Esta solución amortiguadora de alta fuerza iónica (aproximadamente 150 mM), promueve la adhesión bacteriana y minimiza los efectos electrostáticos, acentuando así la importancia de las interacciones hidrofóbicas. Posteriormente, se mezclaron 3,5 ml de la suspensión bacteriana en dicho solvente con 0,8 ml del solvente bajo estudio y esta mezcla fue sometida a agitación vigorosa en vortex durante 1 min. Esta suspensión se dejó reposar durante 15 min para asegurar la completa separación de las fases. Seguidamente, se retiró cuidadosamente un volumen de 2 ml correspondiente a la fase acuosa y se midió la densidad óptica de la misma (A) a una longitud de onda de 550 nm con un Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800.

El porcentaje de las células adheridas al solvente bajo análisis se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Adherencia} = (1 - A/A_0) \times 100$$

donde A_0 es la densidad óptica medida a 550 nm de la suspensión bacteriana antes de la mezcla con el solvente y A es la absorbancia después del mezclado.

Las medidas se realizaron por triplicado empleando tres alícuotas de una misma suspensión microbiana para cada test de MATS, realizándose 3 ensayos independientes.

5.6.1.1. Resultados obtenidos a través de MATS.

Los resultados obtenidos a partir de medidas de MATS se muestran en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3. Porcentaje de afinidad de *P. fluorescens* a distintos solventes.

	% de afinidad a hexadecano	% de afinidad a cloroformo
<i>P. Fluorescens</i>	34,80 ± 5,77	76,00 ± 4,30

Considerando los resultados obtenidos con los diferentes solventes bajo estudio (Cloroformo/Hexadecano), se puede asumir que la mayor afinidad de *P. fluorescens* por el cloroformo, un solvente ácido, se debe a que las bacterias bajo estudio presentan propiedades básicas o donoras de electrones. El carácter donador de electrones puede atribuirse a la presencia de grupos básicos en la superficie celular (42-43), como por

ejemplo, grupos carboxílicos (COO^-), fosfatos (PO_4^{2-}) y grupos aminos (NH_2). Estos resultados están de acuerdo con los datos disponibles en literatura (44-45).

5.6.2. Medida del ángulo de contacto (CAM).

Con el objetivo de corroborar la hidrofiliidad de *P. fluorescens* se utilizó el método de la gota yacente para obtener la medida del ángulo de contacto entre una capa de bacterias y una gota de agua bidestilada. Una descripción detallada de medidas de ángulo de contacto se realizó en el Capítulo 4.

Para obtener las medidas del ángulo de contacto de *P. fluorescens*, se filtró una solución de células previamente enjuagadas con agua bidestilada estéril a través de un filtro de acetato de celulosa, mediante presión negativa, hasta la deposición de una capa de bacterias sobre el filtro. Posteriormente, los filtros fueron secados al aire durante aproximadamente 1 h. Luego, se obtuvieron los resultados de ángulos de contacto mediante la técnica de la gota yacente con agua bidestilada estéril como solvente (esquema de la medida en Figura 5.4). Las medidas de los ángulos de contacto de equilibrio se realizaron con un goniómetro Ramé-Hart Modelo 500 (Ramé-Hart Instruments Co.). Cada valor de ángulo de contacto (θ) obtenido proviene del promedio de 10 medidas tanto en el lado derecho como en el lado izquierdo de la gota de agua sobre la capa de bacterias.

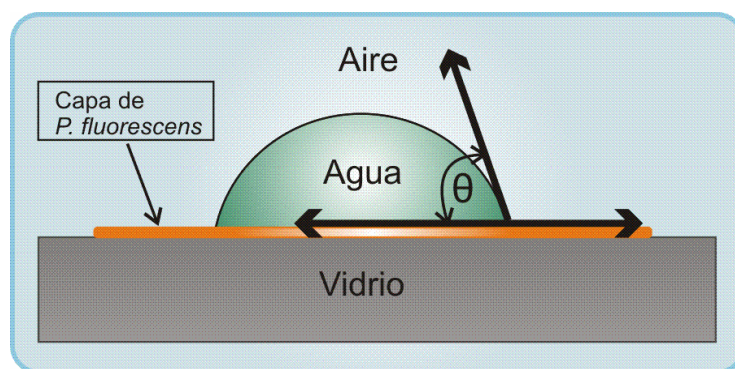


Figura 5.4. Esquema representando la medida del ángulo de contacto

5.6.2.1. Resultados obtenidos mediante medidas de CAM.

El resultado que se obtuvo para el ángulo de contacto es de $32^\circ \pm 0,1$, resultado que está de acuerdo con varios reportes anteriores (36, 45). Las *P. fluorescens* pueden considerarse hidrofílicas ya que se consideran así las que presentan ángulos de contacto de agua cercanos a 30° o menores. El carácter hidrofílico también está confirmado por la experiencia de MATS (Adhesión Microbiana a Solventes), en donde el máximo valor de retención de las bacterias en hexadecano fue, aproximadamente, 35%.

5.7 Determinación del tamaño de *P. fluorescens* planctónicas mediante microscopía de fuerza atómica.

La determinación de la longitud de las bacterias de *P. fluorescens* en estado planctónico se realizó mediante el análisis de imágenes de AFM de las correspondientes bacterias adsorbidas sobre una superficie de vidrio.

Para evitar el mecanismo biológico de adhesión de las bacterias viables a la superficie del vidrio, se debe recurrir a un calentamiento durante 2 h a 70°C del cultivo bacteriano de 24 h. Mediante este procedimiento, los microorganismos pierden viabilidad sin cambios morfológicos de las células. De esta manera, las bacterias presentes en el cultivo luego del calentamiento, presentan la morfología de las células en estado planctónico pero no son viables, con lo cual se evitarán los procesos biológicos activos de adhesión a la superficie de vidrio que podrían ocasionar cambios en el tamaño de las bacterias. Posteriormente, se colocó una gota de este cultivo sobre la superficie de vidrio limpia para que las células se adsorban sobre el sustrato. Luego de 30 min, se limpió el vidrio mediante enjuagues con agua bidestilada estéril. Después del secado del sustrato, se utilizó el AFM para determinar la longitud de las bacterias planctónicas. Este ensayo se realizó por triplicado y por cada muestra se analizaron las medidas longitudinales de 100 bacterias.

De esta manera, se determinó que la longitud promedio de las bacterias de *P. fluorescens* planctónicas es $1,86 \pm 0,60 \mu\text{m}$. Este valor concuerda con el reportado en literatura (46).

Referencias Bibliográficas.

1. Hendricks Bergey D., H. J. G., Krieg N.R., (Ed.) (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
2. Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms, *Mol Microbiol* 59, 1114-1128.
3. Doyle, T. B., Hawkins, A. C., y McCarter, L. L. (2004) The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 186, 6341-6350.
4. Hsueh, P. R., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Sun, C. C., Ho, S. W., y Luh, K. T. (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients, *J Clin Microbiol* 36, 2914-2917.
5. Kirisits, M. J., y Parsek, M. R. (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities?, *Cell Microbiol* 8, 1841-1849.
6. Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Mol Microbiol* 50, 61-68.
7. Kocoglu, M. E., Bayram, A., y Balci, I. (2005) Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system, *J Microbiol* 43, 257-259.
8. Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., y Pechere, J.-C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili, *J. Bacteriol.* 182, 5990-5996.
9. Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K., y Parsek, M. R. (2006) Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance, *Mol Microbiol* 59, 142-151.
10. Lequette, Y., y Greenberg, E. P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *J Bacteriol* 187, 37-44.
11. Osawa, K., Nakajima, M., Kataoka, N., Arakawa, S., y Kamidono, S. (2002) Evaluation of antibacterial efficacy of drugs for urinary tract infections by

- genotyping based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *J Infect Chemother* 8, 353-357.
12. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
 13. Ramsey, M. M., y Whiteley, M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments, *Mol Microbiol* 53, 1075-1087.
 14. Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., y Palleroni, N. J. (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *pseudomonads*, *Appl Environ Microbiol* 68, 2745-2753.
 15. Madigan M., M. J., (Ed.) (2005) *Brock Biology of Microorganisms*.
 16. Hoyle, B. D., y Costerton, J. W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog Drug Res* 37, 91-105.
 17. Lazarus, H. M., Magalhaes-Silverman, M., Fox, R. M., Creger, R. J., y Jacobs, M. (1991) Contamination during in vitro processing of bone marrow for transplantation: clinical significance, *Bone Marrow Transplant* 7, 241-246.
 18. Murray, A. E., Bartzokas, C. A., Shepherd, A. J., y Roberts, F. M. (1987) Blood transfusion-associated *Pseudomonas fluorescens* septicaemia: is this an increasing problem?, *J Hosp Infect* 9, 243-248.
 19. Scott, J., Boulton, F. E., Govan, J. R., Miles, R. S., McClelland, D. B., y Prowse, C. V. (1988) A fatal transfusion reaction associated with blood contaminated with *Pseudomonas fluorescens*, *Vox Sang* 54, 201-204.
 20. Carpenter, E. M., y Dicks, D. (1982) Isolation of *Pseudomonas fluorescens* after suprapubic catheterisation, *J Clin Pathol* 35, 581.
 21. Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., y Delacroix-Buchet, A. (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis, *Appl Environ Microbiol* 68, 3691-3701.
 22. Ternstrom, A., Lindberg, A. M., y Molin, G. (1993) Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*, *J Appl Bacteriol* 75, 25-34.
 23. Dogan, B., y Boor, K. J. (2003) Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants, *Appl Environ Microbiol* 69, 130-138.

24. Sørhaug, T., y Stepaniak, L. (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects, *Trends in Food Science & Technology* 8, 35-41.
25. Carpentier, B., y Chassaing, D. (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises, *Int J Food Microbiol* 97, 111-122.
26. An Y.H, F. R. J., (Ed.) (2000) *Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of bacterial adhesion. Principles, mechanisms and applications.* , Springer, New York.
27. Absolom, D. R. (1986) Measurement of surface properties of phagocytes, bacteria, and other particles, *Methods Enzymol* 132, 16-95.
28. Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., van Pelt, A. W., de Jong, H. P., y Arends, J. (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion, *Appl Environ Microbiol* 48, 980-983.
29. Dillon, J. K., Fuerst, J. A., Hayward, A. C., y Davis, G. H. G. (1986) A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity, *Journal of Microbiological Methods* 6, 13-19.
30. Pascual, A., Fler, A., Westerdaal, N. A., y Verhoef, J. (1986) Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro, *Eur J Clin Microbiol* 5, 518-522.
31. Rosenberg, M. (1981) Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 42, 375-377.
32. Rosenberg, M., Gutnick, D., y Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.
33. Verheyen, C. C., Dhert, W. J., de Blicck-Hogervorst, J. M., van der Reijden, T. J., Petit, P. L., y de Groot, K. (1993) Adherence to a metal, polymer and composite by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Biomaterials* 14, 383-391.
34. Gerson, D. F., y Scheer, D. (1980) Cell surface energy, contact angles and phase partition. III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces, *Biochim Biophys Acta* 602, 506-510.
35. van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., y Zehnder, A. J. (1987) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion, *Appl Environ Microbiol* 53, 1898-1901.

36. van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., y Zehnder, A. J. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion, *Appl Environ Microbiol* 53, 1893-1897.
37. Lindahl, M., Faris, A., Wadstrom, T., y Hjerten, S. (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells, *Biochim Biophys Acta* 677, 471-476.
38. Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., y Savoie, L. (1991) Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces, *Appl Environ Microbiol* 57, 1969-1973.
39. Mozes, N., y Rouxhet, P. G. (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods* 6, 99-112.
40. Lachica, R. V., y Zink, D. L. (1984) Determination of plasmid-associated hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* by a latex particle agglutination test, *J Clin Microbiol* 19, 660-663.
41. Sar, N. (1987) Direction of spreading (DOS): a simple method for measuring the hydrophobicity of bacterial lawns, *Journal of Microbiological Methods* 6, 211-219.
42. Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J., y van Oss, C. J. (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47-53.
43. Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., y Bellon-Fontaine, M. N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor: characteristics under different environmental growth conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5328-5333.
44. Smets, B. F., Grasso, D., Engwall, M. A., y Machinist, B. J. (1999) Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 121-139.
45. Valcarce, M. B., Busalmen, J. P., y de Sánchez, S. R. (2002) The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass, *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 61-66.

46. Ito, T., Miyaji, T., Nakagawa, T., y Tomizuka, N. (2007) Degradation of dimethyl disulfide by *Pseudomonas fluorescens* strain 76, *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 366-370.