

Formación y evolución de biopelículas de *Shewanella* sp. cepa USBA 344 sobre superficies nanoestructuradas

Felipe Bayona Borrero^a, Sandra Baena Garzón^b, Carolina Díaz^b, Edgar E. González Jiménez^a

^a Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ingeniería, Instituto Geofísico, Grupo de Nanociencia y Nanotecnología, Bogotá, Colombia

^b Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, Bogotá, Colombia.

Se reporta el crecimiento celular y la formación de biopelículas de la cepa de *Shewanella* sp. USBA 344 sobre superficies micro y nanoestructuradas de vidrio y materiales biodegradables y ecoamigables de diversa rugosidad decorados con diferentes nanopartículas. La cepa USBA 344 demostró formación y crecimiento de biopelículas en vidrio siguiendo un modelo exponencial con limitación de recursos basado en duplicación celular en microcolonias y migración de células hacia puntos de mayor concentración celular. La colonización de superficies rugosas como lijas, plásticos y en especial telas de algodón fue exitosa con y sin presencia de nanopartículas, a excepción de nanopartículas oro y platino, en las cuales no hubo crecimiento.

Palabras clave: *Shewanella* sp. USBA 344, nano-scaled surfaces, biofilm growth, conductive nanoparticles.

INTRODUCCIÓN

Una biopelícula es un conjunto de células bacterianas asociadas a un sustrato dentro de una matriz extracelular polisacárida (Costerton, 2004). Allí las bacterias viven y se comunican en asociación y cooperación mutua frente a las condiciones impuestas por el ambiente. La formación de la biopelícula, al igual que la conformación de colonias o fisión celular de las bacterias, requiere de unas condiciones favorables: temperatura, fuente de energía, fuente de carbono, aceptores finales de electrones, oligoelementos, entre otros, y adicionalmente, una superficie sobre la cual agruparse.

La superficie es fundamental: se ha observado que, de acuerdo a la composición y la geometría de la misma, el proceso de formación de la biopelícula se favorece o ralentiza (Talamantes et. al, 2014).

Según lo reportado por Hau y Gralnick (2007), el género *Shewanella* corresponde a γ -proteobacterias Gram negativas cuya morfología es la de bacilos de 1 a 3 μm de largo y 0,4 a 0,7 μm de diámetro, móviles con un solo flagelo polar y no esporoformadoras. Producen colonias circulares en agar nutritivo de 1.4 mm de diámetro, convexas y con bordes regulares y suaves. Presentan color rosa en agar Luria Bertani (LB).

Una de las características más llamativas del género *Shewanella* es ser uno de los géneros más diversos en materia de respiración ya que en condiciones anaerobias es capaz de utilizar más de 25 compuestos orgánicos e inorgánicos incluidos metales pesados insolubles y elementos tóxicos. No es un género fermentativo ni capaz de hacer glicólisis o crecer en carbonos complejos; lo hace en piruvato, lactato, formato y algunos aminoácidos. Además de oxígeno *Shewanella* respira nitratos, tiosulfatos, azufre elemental, óxido de hierro y de manganeso. Aunque la eficiencia energética es baja, reduce U(VI) soluble a U(IV) sólido, Cr(VI) soluble a Cr(III) sólido, selenito a SeO, arseniato a arsenito y AsO, Tc(VII) soluble a Tc(IV) sólido, y yodato a yoduro entre otros más de 25 aceptores finales de electrones.

Algunas cepas han demostrado también capacidades halo-respiratorias en ambientes anaerobios para la degradación de compuestos halogenados como tetraclorometano, bifenilos policlorinados, γ -hexaclorociclohexano, tricloroetano, y pentacloroetano. En estos casos se requiere la acción conjunta de consorcios bacterianos en los que participa *Shewanella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimentalmente, la investigación se desarrolló a través de dos procesos paralelos para la evaluación de la formación y evolución de las biopelículas de la cepa USBA 344. Estos dos procesos comparten el fin común de estudiar el crecimiento en fases iniciales de las biopelículas de una proteobacteria del género *Shewanella* y su respuesta a los cambios en la geometría de la superficie de adhesión en busca de un material ecoamigable, degradable y conductor que sirva a futuro como sustrato del cátodo de una celda de combustible microbiano.

El primer proceso experimental se centró en el seguimiento continuo al crecimiento in vivo

sobre vidrio de las biopelículas. Esto permitió estudiar la dinámica de crecimiento de la cepa, las formas de sus colonias, su duplicación celular y el desplazamiento de las células para agregarse a las biopelículas permitiendo deducir sus curvas de crecimiento y de cobertura de área respecto al tiempo.

El segundo proceso experimental se centró en la evaluación de la formación de biopelículas sobre materiales de diferente rugosidad y decorados con nanopartículas conductoras. Este cambio de geometría y composición permitió hallar un material que favorece la formación y crecimiento de las biopelículas con la mayor biomasa y cubrimiento de área sobre un material biodegradable o ecoamigable seleccionado.

Adicionalmente se evaluó el crecimiento de la cepa en presencia de iones de plata, típicamente inhibitorios del crecimiento celular []. Se obtuvo crecimiento de la cepa en presencia de nanopartículas de plata y su medio de suspensión.

***Shewanella* sp. Cepa USBA 344**

El desarrollo de la presente investigación giró en torno a la especie bacteriana *Shewanella* sp. Cepa USBA 344 aislada por la doctora Díaz-Cárdenas (2011) del manantial salado de Consotá en el municipio de Risaralda, Colombia, al sur-occidente de su capital Pereira a 1391 m.s.n.m. El microorganismo es una γ -proteobacteria de la familia de las Shewanellaceae, Gramnegativo, no esporoformador, móvil por un flagelo polar, anaerobio facultativo, que crece en un rango de NaCl de 0 a 6% (p/v). Su morfología corresponde a un bacilo recto de 1.5 a 3.0 μm de largo por 0.2 a 0.7 μm de diámetro. La cepa USBA 344 reduce Fe³⁺, NO₃⁻, S⁰ y S₂O₃²⁻.

La cepa 344 se encuentra almacenada en el cepario de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá

Reactivación de la cepa y formación de bancos de trabajo

Para realizar los bancos de trabajo, y con el fin de tener una buena condición celular y metabólica, la cepa USBA 344 fue reactivada 3 veces en tubos de cultivo con 5ml de medio LB fresco durante 4 horas.

Para el almacenamiento de la cepa en bancos de trabajo se prepararon viales de 2ml con 0.1 ml de glicerol para 0.90 ml de cultivo que fueron almacenados en refrigeración a -80°C . Estos bancos fueron realizados para reactivar la cepa a lo largo de los meses de trabajo y mantener una homogeneidad en las características de las células, características que suelen alterarse por mutación de la especie al realizar sucesivas réplicas del mismo inóculo inicial. La integridad de la cepa era evaluada periódicamente por medio de aislamiento en caja y tinción de Gram.

Estimación de curvas de crecimiento de la cepa USBA 344 y estimación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Para conocer las dinámicas de crecimiento de la cepa USBA 344 y estandarizar las condiciones de cultivo en todos los experimentos se realizaron curvas de crecimiento para conocer la tasa y tiempos de duplicación de la cepa, su temperatura óptima de crecimiento, y su densidad celular en el medio.

Para esto se realizaron mediciones triplicadas a temperatura ambiente de 17°C ., a 25° , 30° y 37°C ., en proporción 1:6 de inóculo bacteriano en $300\ \mu\text{l}$ de medio LB, cuya densidad óptica fue medida por BioScreen xxx® durante 8 horas, arrojando su curva de crecimiento para identificar tiempos de adaptación al medio, crecimiento exponencial, fase estacionaria, y degradación de la población.

Para conocer la densidad celular y estandarizar los inóculos, se realizaron siembras en caja con inóculo a $D=650$ en

diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} sobre agar LB para recuento de UFC.

Preparación de pozos de crecimiento de biopelículas

El seguimiento a la formación y evolución de biopelículas de la cepa 344 se realizó por microscopía de campo claro a siembras sobre vidrio. Para este seguimiento se diseñaron pozos de cultivo consistentes en una lámina de plexiglás de 3 mm de grosos sobre la que se cavaron pozos de 2 cm de arista x 2 mm de profundidad. Por los costados de los pozos a través de dos de sus aristas opuestas se taladraron conductos para la entrada y salida del medio inoculado con la cepa 344.

Dentro de estos pozos se colocaron láminas de vidrio de $1\ \text{cm}^2$, superficies sobre las que se forma la biopelícula de la cepa. Tras colocar la lámina de vidrio en el pozo, una laminilla cubre objetos fue colocada sobre la boca del pozo y sellada por todos sus lados con cinta pegante para evitar fugas.

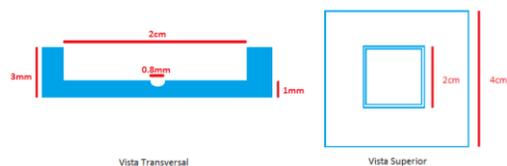


Fig. 1. Esquema de Pozos de cultivo de biopelículas

Para asegurar las mejores condiciones de esterilidad, el pozo y la lámina de vidrio eran suspendidas en una mezcla de alcohol e hipoclorito al 70% y 30% toda la noche antes y después de cada siembra, y posteriormente lavados con agua tipo I para eliminar toda traza tóxica para el cultivo.

Preparación de la cepa para la observación microscópica

Para asegurar condiciones iniciales iguales a lo largo de todos los experimentos se estandarizaron las condiciones del inóculo de la cepa 344. Para esto, sobre la base de las curvas de crecimiento óptimas y una muestra

de la cepa reactivada de los bancos de trabajo en medio LB, se realizaron cultivos overnight de 12 horas para tener un cultivo activo. Tras estas 12 horas se inoculó 1 ml de cultivo en 5ml de medio fresco LB que se incubó a 37° durante 3 horas hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 630 a 580 nm, equivalente a un estado de crecimiento exponencial tardío.

En este punto se preparó el inóculo que ingresaría a los pozos de crecimiento de biopelículas que consiste en una combinación 1/20 de inóculo con medio fresco LB, es decir, 50 µl de inóculo en 0.95 ml de medio LB.

Tras llenar el pozo con la preparación descrita por medio de una jeringa, los canales de ingreso fueron sellado con cinta pegante para evitar fugas y deshidratación de la muestra en el pozo.

Seguimiento a la formación de biopelículas sobre vidrio en los pozos de crecimiento por microscopía de campo claro

La formación y evolución de las biopelículas de la cepa 344 sobre vidrio se evaluó por seguimiento fotográfico y en video en un microscopio de campo claro Amscope® a un aumento de 40x y 100x en aceite de inmersión Nikon®. La cámara Amscope MA1000® se conecta a un computador vía USB y el software AmScope MT® recoge la imagen en video en tiempo de exposición medio, saturación 0, gamma -13 y contraste -20 en formato .avi. Las imágenes se tomaron por captura automática de pantalla con el software de licencia gratuita AutoScreen Capture.

Tras la inundación del pozo y el inicio de la observación se toma el tiempo cero que se prolonga de 5 a 10 horas en video continuo. Para el seguimiento por imágenes se capturan fotogramas cada 3 minutos que se almacenan con fecha y hora de la captura. Así se obtiene un seguimiento completo a la formación y evolución de la biopelícula de la cepa 344 sobre un punto fijo de la superficie de vidrio.

Seguimiento a la formación de microcolonias adheridas al vidrio en los pozos de crecimiento

Para evaluar las etapas iniciales de formación de biopelículas por agregaciones iniciales de células pioneras, y definir si estas microcolonias cumplen el criterio de adhesión a una superficie, se realizó un montaje en paralelo de 5 pozos que fueron inundados en las mismas condiciones que los pozos observados al microscopio. Las láminas de vidrio de estos pozos fueron retiradas secuencialmente en tiempos de 10, 20, 30, 45 y 60 minutos y pasadas suavemente por solución buffer 10 mM (pH. 7,2) para eliminar las células no adheridas, y luego sumergidas en una solución 0.1% de cristal violeta en agua por 10 minutos (Chao Wu et al. 2013). Posteriormente se pasaron por agua tipo I para quitar los excedentes de colorante y se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser observadas al microscopio.

Preparación de superficies de crecimiento nanoestructuradas

Para la evaluación de formación y crecimiento de biopelículas sobre materiales de diversa rugosidad y decorados con nanopartículas conductoras se seleccionaron materiales de diversa rugosidad bajo el criterio de ser biodegradables o de fácil remoción en miras a un electrodo de celdas de combustible microbiano que sea sostenible y ecoamigable.

Los materiales seleccionados fueron:

- Vidrio (como superficie de control)
- Acetato liso
- Acetato rugoso
- Lija
- Papel calcante grueso
- Tela 100% de algodón sin blanquear
- Tela de algodón polyester al 80-20% sin blanquear

La geometría de estos materiales fue caracterizada por medio de microscopía de

campo claro, midiendo grosor de los hilos, y profundidad y área de las corrugaciones.

Las telas fueron un material de especial interés, ya que, de demostrarse adhesión bacteriana y crecimiento de las biopelículas, constituyen un material biodegradable y no tóxico con una amplia relación de volumen y superficie para el desarrollo de los consorcios bacterianos, además de brindar una excelente capacidad de absorción y porosidad para ser decorado con diferentes nanopartículas.

- Nanopartículas de óxido de hierro
- Nanotubos de carbono
- Nanohilos de plata
- Nanopartículas esféricas y cúbicas de oro
- Nanorods de oro
- Nanohexahedros de plata
- Nanohilos de platino
- Nanopartículas de plata
- Nanopartículas de óxido de cerio
- Nanopartículas de óxido de titanio

La síntesis de las nanopartículas se realizó siguiendo los métodos reportados en E. González, V. Puentes, y E. Casals [].

Funcionalización de telas con nanopartículas conductoras

Las telas de algodón y algodón-polyester fueron suministradas por un fabricante textil quien las entregó lavadas de acuerdo a su proceso industrial. Para el experimento fueron cortados trozos de alrededor de 10 mm x 5 mm los cuales fueron pasados por una solución de alcohol al 70% en agua para eliminar cualquier rastro de polvo o mugre remanente. Ya secos, cada trozo fue sumergido en 1 ml de cada solución nanoparticulada y puesta en agitación toda la noche para asegurar una buena absorción y adhesión de las nanopartículas a los hilos.

Tras este proceso, cada trozo fue secado a 30° C. hasta eliminar toda la humedad de la muestra y puesto en un frasco de 5 ml con tapón de caucho. Antes de grafar los frascos

se añadieron 10 µl de agua tipo I para favorecer la eliminación de posibles esporas durante el proceso de autoclavado. Los frascos con todas las telas nanoparticuladas, las superficies rugosas y controles de vidrio y telas prístinas fueron autoclavados a 121° C. en dos sesiones de 15 minutos para asegurar su completa esterilidad.

En cada frasco, sobre el trozo de material, fueron inoculados 50 µl de cepa en medio LB con DO650 aprox., durante 1 hora para permitir la adhesión celular al sustrato. Posteriormente fue agregado 1 ml de medio LB fresco y los frascos fueron puestos en incubación a 30°C., primero sin agitación, y tras corroborarse formación de biopelículas, su duplicado fue puesto en agitación a 110 rpm para asegurar oxigenación del medio, difusión de nutrientes y remoción de células inviables de las biopelículas. Cada 24 horas se retiraba completamente el sobrenadante y se agregaba 1 ml de medio LB fresco para mantener condiciones de disposición de nutrientes para las biopelículas. Este procedimiento se prolongó durante 15 días.

Seguimiento a la formación de biopelículas sobre superficies nanoestructuradas por microscopía electrónica de barrido

Tras el período de crecimiento de 15 días, las telas y los materiales porosos fueron sacados de los frascos para el procedimiento de fijado y secado de las biopelículas para su observación por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Primero, los trozos fueron sumergidos en una solución 2,5% (v/v) de glutaraldehído durante 6 horas y posteriormente pasados por soluciones de etanol al 70, 95 y 100% durante 5 minutos. Todos los materiales fueron suspendidos en etanol al 100% hasta ser llevados al proceso de secado de punto crítico con CO₂ a 1600 psi y metalizados con grafito.

La observación SEM se realizó con un microscopio ZEISS® a 30mil voltios entre 20 mil y 60 mil aumentos.

Conteo celular por medio de MatLab y definición del modelo de crecimiento de biopelículas

Para la determinación de las curvas de crecimiento de las biopelículas de USBA 344 sobre vidrio para formular su modelo de formación y evolución, se realizaron conteos de células sobre fotogramas seleccionados de los videos de seguimiento tanto a 100X como a 40X. Estos fotogramas fueron espaciados homogéneamente en el tiempo cada 30 minutos para tener puntos representativos que permitan observar una tendencia fiable del fenómeno de evolución de la biopelícula

Cada uno de los fotogramas fue procesado en MatLab R2016a® por medio de algoritmos implementados en el paquete de procesamiento de imágenes. Primero, cada imagen fue pasada a escala de grises y se le eliminó el ruido de fondo para resaltar las células en la imagen. Utilizando el método de Otsu, se refinó cada imagen para definir los límites de cada célula y realizar operaciones morfológicas que permitan al software reconocer el perímetro de cada célula y diferenciarla de objetos de diferente tamaño que no deban ser tenidos en cuenta. Una vez definidos los perímetros, es posible que las células estén agrupadas, por lo que se utilizó el algoritmo de Watershed para diferenciar cada célula por medio del gradiente de grises de los píxeles, donde el centro de una célula representa el grupo de píxeles más cercanos al blanco, y el fondo de la imagen (el vidrio) es el grupo de píxeles más cercanos al negro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estimación de unidades formadoras de colonias para la cepa USBA 344 arrojó una cantidad de 1.7×10^6 UFC por mililitro en dilución 1:20 (v/v) en medio LB. Las curvas de crecimiento mostraron una entrada a fase

exponencial alrededor del minuto 60 con crecimiento acelerado hasta el minuto 120 pasando de $DO = 0.43$ a $DO = 0.58$, para iniciar fase logarítmica que se extiende hasta el minuto 810 llegando al pico de crecimiento en $DO = 1.185$ antes de entrar fase de degradación.

La definición del modelo de crecimiento de las biopelículas sobre vidrio sobre la base de los conteos automatizados de células, mostró que el comportamiento de la cepa USBA 344 al formar biopelículas sigue un crecimiento exponencial que inicia con la conformación de microcolonias agrupadas inicialmente en números aproximados de 5 células, que inician un proceso de duplicación celular y desacoplamiento con migración a zonas de mayor concentración de biopelícula. Esto corresponde a un modelo de crecimiento exponencial y desagregación.

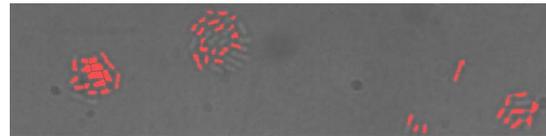


Fig. 2. Microcolonias de USBA 344 adheridas a vidrio en etapa de duplicación inicial a 1 hora y 15 minutos observadas a 100X

Se verificó experimentalmente en un lapso inicial de tiempo $t < 305$ minutos un crecimiento exponencial (fig. 3) que en condiciones lejos de la saturación se expresa por medio de la ecuación diferencial (1):

$$\frac{dN(t)}{dx} = \mu N(t), \quad (1)$$

con μ como la tasa de replicación de la especie. Al integrar (1) resulta:

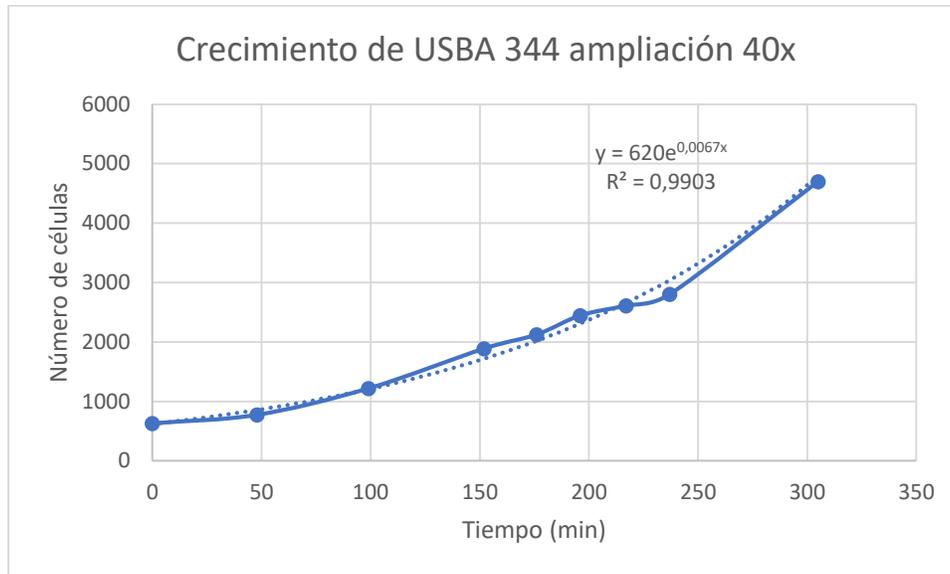


Fig. 3. Crecimiento exponencial de biopelículas monocapa de *Shewanella* sp. cepa USBA 344 sobre vidrio hasta cobertura total del campo de imagen a 40X de ampliación en microscopio de campo claro.

$$N(t) = N_0 e^{\mu t}, \quad (2)$$

donde N_0 corresponde al valor inicial de la población y μ depende la especie y la concentración inicial de nutrientes

De la curva experimental y su línea de tendencia (fig. 3) se obtiene un valor de $\mu = 0.0067$ para una población inicial de 620 células, por lo tanto:

$$N(t) = 620 e^{0.0037t}. \quad (3)$$

Esta primera aproximación, se valida bajo las siguientes hipótesis:

1. No se asume velocidad de flujo.
2. Temperatura constante
3. Distribución homogénea del sustrato
4. No se asume más de una capa de células en la biopelícula.
5. La concentración de nutrientes se asume constante.

De este modo, con las condiciones que validan el modelo en la configuración de sistemas con biopelículas, se garantiza una respuesta en tiempo exponencial de la formación de la biopelícula.

Ya que el medio de formación y evolución de las biopelículas es un sistema de recursos (nutrientes) limitados, una aproximación menos ideal al modelo de crecimiento es un modelo de crecimiento con saturación k , donde

$$\lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = k, \quad (4)$$

siguiendo la ecuación logística de Verhulst, donde la población máxima será igual a la capacidad máxima de carga k del sistema. En este contexto la hipótesis 5 no se cumple, por lo que el modelo se torna de la forma:

$$\frac{dN(t)}{dx} = \mu N(t) \left(1 - \frac{N(t)}{K}\right), \quad (5)$$

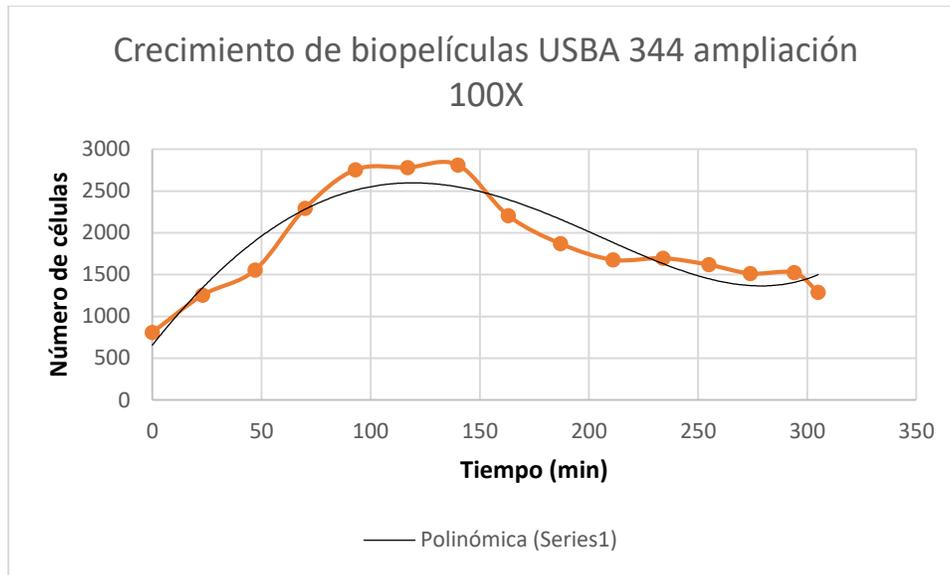


Fig. 4. Modelo de duplicación celular en microcolonias y desacoplamiento de células planctónicas para agruparse a colonias más pobladas de *Shewanella* sp. cepa USBA 344 sobre vidrio con ampliación 100X en microscopía de campo claro

integrado en (6) como:

$$N(t) = \frac{KN_0 e^{\mu t}}{K + N_0(e^{\mu t} - 1)} \quad (6)$$

En condiciones con fuente de nutrientes se observó reiteradamente que la ecuación 5 refleja el modelo de comportamiento de crecimiento de microcolonias y desacoplamiento celular para la migración de individuos a zonas de mayor concentración de biopelícula. Esto ocurre seguramente por una mayor concentración de autoinductores reguladores del quorum sensing, lo que muestra un crecimiento exponencial (duplicación celular) seguido de una fase logarítmica que decrece (migración de células desacopladas, fig. 4), para crecer nuevamente de forma exponencial de forma cíclica hasta saturar la superficie completamente con una monocapa de biopelícula antes de iniciar un crecimiento en 3 dimensiones.

El proceso de formación de biopelículas sobre vidrio, se da entonces con un agrupamiento inicial de células, llamadas microcolonias o células pioneras (fig. 5), que inician un proceso de duplicación celular. Cuando algunas de éstas colonias alcanzan una masa crítica de modo que pueden influenciar el entorno, seguramente por liberación de autoinductores para quorum sensing, algunas células de colonias más pequeñas, se desacoplan del grupo adquiriendo nuevamente un estado de vida libre, y migran hacia las colonias de mayor concentración celular para integrarse nuevamente allí a una biopelícula. Este proceso se itera hasta que el área de todo el conjunto de las biopelículas choca con otra, fundiéndose así en una sola biopelícula de mayor tamaño e influencia en el quórum, hasta lograr una cobertura casi total de área antes de iniciar un crecimiento tridimensional.



Fig. 5. Tinción con cristal violeta en vidrio para las pruebas de adherencia celular en los primeros minutos. Aquí se ven biopelículas pioneras o microcolonias adheridas tras 15 minutos de siembra.

La evaluación de crecimiento sobre las superficies micro y nanoestructuradas arrojó un crecimiento abundante (Tabla 1) de biopelículas en la mayoría de los materiales probados, a excepción de las nanopartículas de plata sintetizadas por método verde y método químico, los nanotubos de platino y los nanorods de oro, que mostraron toxicidad celular el estar adheridas a la tela y liberarse en el medio LB.

Material		Crecimiento		Abundancia		
		Si	No	Baja	Media	Alta
Telas de algodón 100% y algodón - polyester	Tela limpia	x				x
	Nanopartículas de óxido de hierro	x			x	
	Nanotubos de carbono	x			x	
	Nanohilos de plata	x				x
	Nanopartículas esféricas y cúbicas de oro	x			x	
	Nanorods de oro		x			
	Nanohexahedros de plata	x			x	
	Nanohilos de platino		x			
	Nanopartículas de plata	x		x		
	Nanopartículas de óxido de cerio	x				x
Nanopartículas de óxido de titanio	x				x	
Vidrio (control)		x				x
Plástico	Liso	x			x	
	Rugoso	x			x	
Lija		x			x	
Papel Calcante		x				x

Tabla 1. Formación de biopelículas de *Shewanella* sp. cepa USBA 344 sobre superficies nanoestructuradas

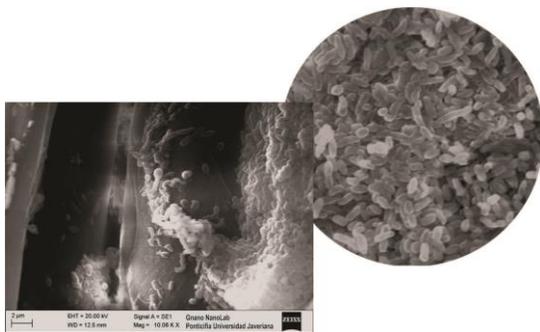


Fig. 6. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre hilos de algodón.

Para estos últimos materiales, no se reportó crecimiento alguno después de 2 semanas en telas impregnadas con nanotubos de platino

ni nanorods de oro en diferentes concentraciones. Para las nanopartículas de plata, se registró un inicio de crecimiento a los 5 días para las nanopartículas de síntesis verde y 6 días para las de síntesis química. En los demás materiales el crecimiento fue abundante, con biopelículas que superan los $30 \mu\text{m}^3$ de volumen enrollados a los microhilos de las telas, y biopelículas de más de $20 \mu\text{m}^2$ de superficie sobre materiales rugosos planos. Las biopelículas muestran abundante concentración de material exopolisacárido, sobre todo en los materiales planos.

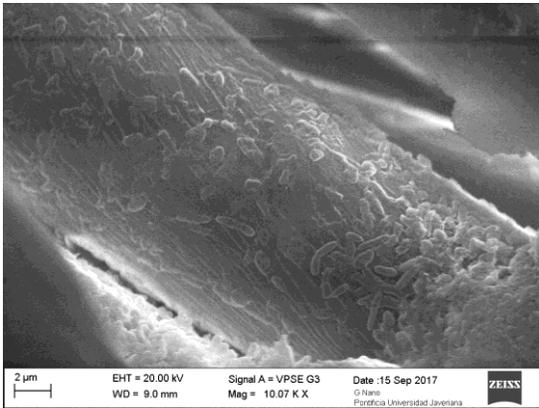


Fig. 7. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre hilos de algodón funcionalizados con nanopartículas cúbicas de oro de 30 nm.

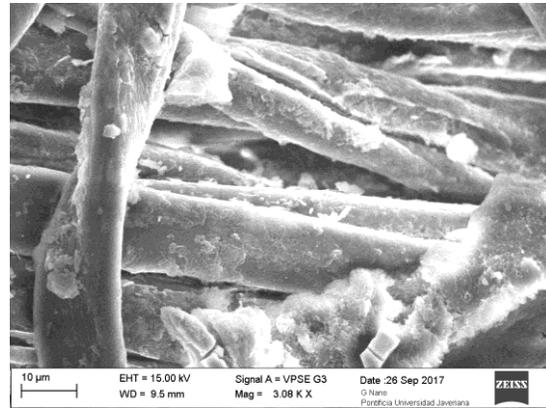


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre hilos de algodón funcionalizados con nanotubos de carbono.

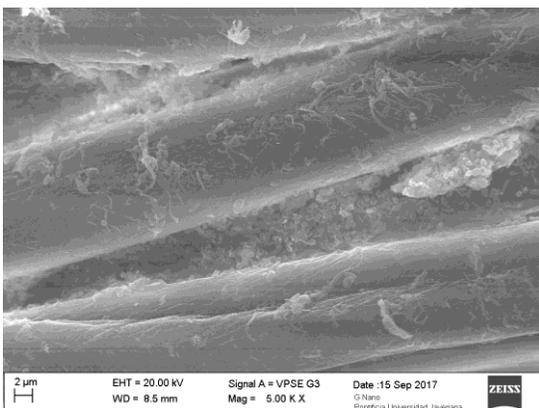


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre hilos de algodón funcionalizados con nanopartículas de óxido de hierro

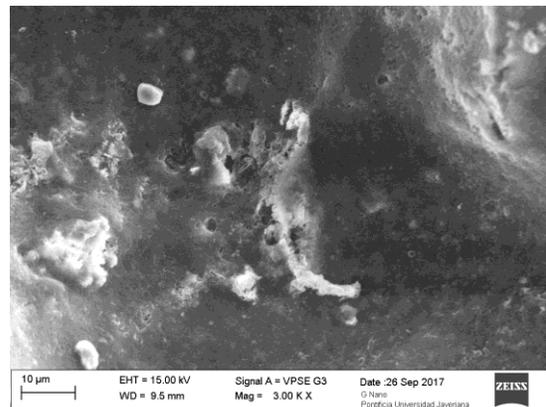


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre papel de lija.

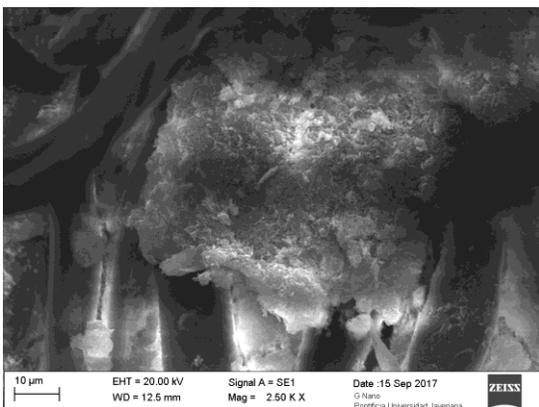


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre hilos de algodón funcionalizados con nanohilos de plata.

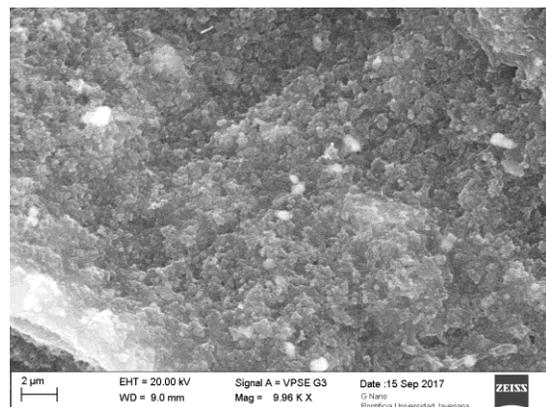


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre papel calcante.

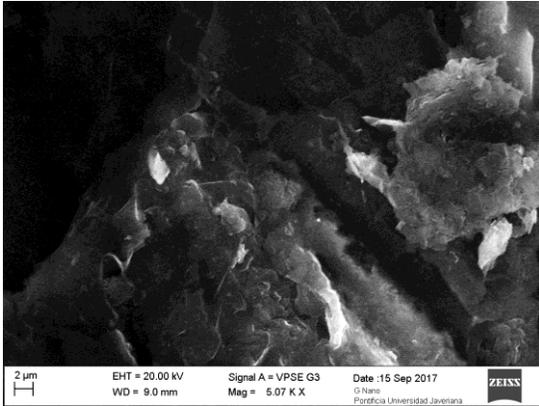


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre plástico liso.

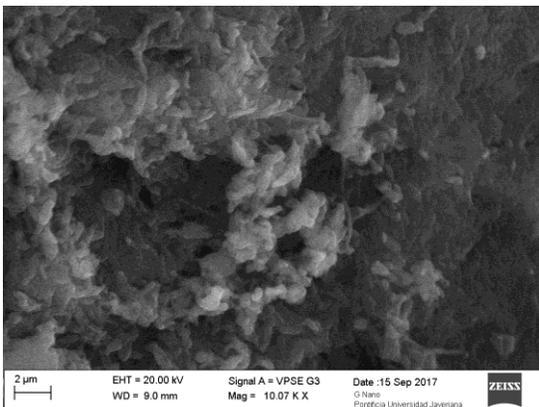


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre plástico rugoso.

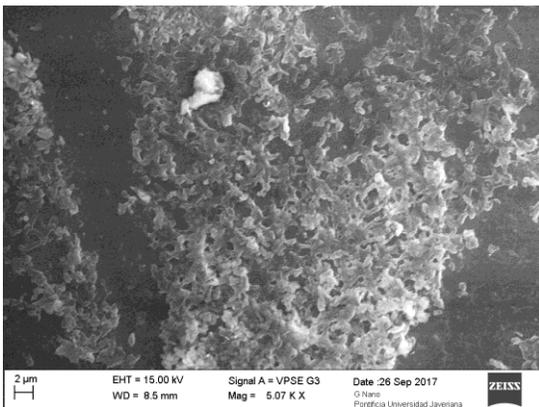


Fig. 8. Fotografía SEM de la cepa USBA 344 sobre vidrio.

CONCLUSIÓN

La formación de biopelículas monocapa de *Shewanella* sp. cepa USBA 344 sobre superficies nanoestructuradas en presencia abundante de nutrientes sigue un crecimiento homogéneo y exponencial, adaptándose a las diferentes geometrías y condiciones químicas impuestas por sustratos orgánicos y metálicos, convirtiendo a la tela de algodón funcionalizada con nanopartículas en un material candidato para la fabricación de electrodos colonizables por la cepa USBA 344 en celdas de combustible microbiano para la remediación de metales pesados en aguas.

CONFLICTOS DE INTERES

El autor declara que su interés en los resultados aquí reportados es estrictamente científico, y que estos han sido resultado del trabajo de su autoría.

REFERENCIAS

- Costerton J. William (2004)
Chapter 1: A short history of the development of the biofilm concept. *Microbial Biofilms*. ASM Press.
- Talamantes Nadia (2014)
Formación y evolución de biopelículas sobre superficies nanoestructuradas. Facultad de ingeniería. Universidad autónoma de Querétaro.
- Hau Heidi H. and Gralnick Jeffrey A. (2007)
Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *The annual review of microbiology*. 61:237-57.
Doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093257.
- Díaz Cárdenas Carolina. (2011)
Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales

salinos ubicados en los departamentos de
Risaralda y Boyacá. Facultad de Ciencias.
Pontificia Universidad Javeriana

Chao Wu, et al. (2013)

Oxygen promotes biofilm formation of
Shewanella putrefaciens CN32 through a
diguanylate cyclase and an adhesin.
Scientific reports. 3: 1945. Doi:
10.1038/srep01945

González E., Puentes V., y Casals E. (2015)

Nanomateriales. Fundación Instituto
Geofísico. Universidad Javeriana.