

DIFERENCIACIÓN BACTERIANA MEDIANTE MEDICIONES DE IMPEDANCIA SIN MARCA A BAJA FRECUENCIA Y UN ANÁLISIS MULTIPARAMÉTRICO

Galeano Yanina^a, Carballo Romina R.^{b,c}, Bonetto M. Celina^{a,b*}

^a Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

^b IQUIFIB-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

^c Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

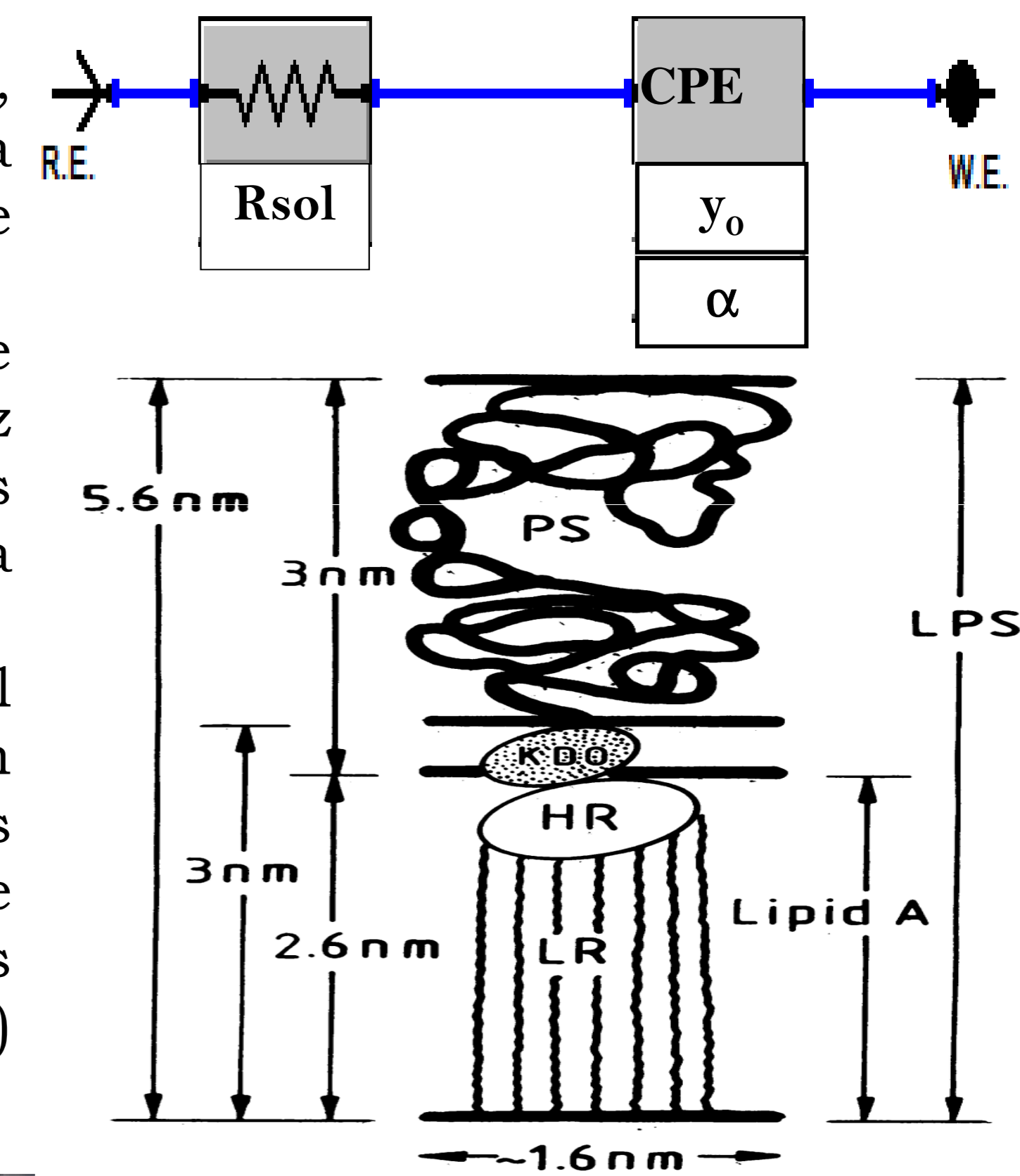
celinatt@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

El método convencional de determinación bacteriana (recuento en placa) es extremadamente preciso, pero lleva mucho tiempo, termina siendo costoso y requiere de personal clasificado. La tinción diferencial de Gram es un protocolo que permite la clasificación fenotípica de bacterias de manera rápida y relativamente sencilla, pero también requiere de gente entrenada y de muestras en buen estado, y aun así, muchas veces no es concluyente^{1,2}.

En el área de la microbiología, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se ha propuesto como método de determinación rápida (< 24 h) de presencia bacteriana mediante cambios en la impedancia (Z) tanto del medio como de la interfaz electrolito/electrodo. La impedancia de un sistema, condicionada por la resistencia de la solución (Rsol), es evidenciada a altas frecuencias (debido al metabolismo bacteriano), y/o por la capacitancia de la doble capa (Cdl) (interfaz electrolito/electrodo) a bajas frecuencias (afectada por la composición iónica en el entorno inmediato del electrodo o por adsorción molecular)^{1,2}.

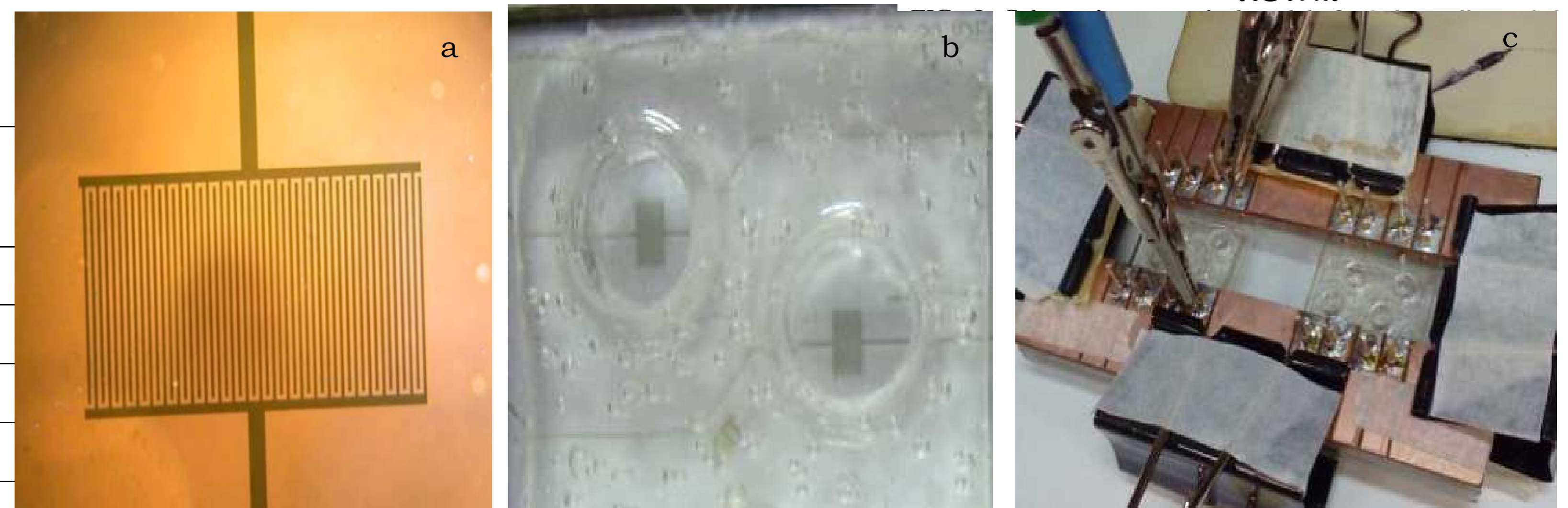
Presentamos el análisis preliminar de cambios de distintos parámetros electroquímicos como impedancia (Zrel), su parte real (Zre) y su parte imaginaria (Zim) relativas, a bajas y altas frecuencias (10 Hz y 100 kHz), así como los parámetros Rsol y un elemento constante de fase (CPE y0 y CPE α) calculados a partir del ajuste a un modelo de circuito eléctrico equivalente de los resultados (RsolCPE), obtenidos mediante EIS utilizando electrodos interdigitados de Au, durante la incubación (260 min) de muestras conteniendo 4 bacterias distintas (≈10⁸ UFC/mL) o medios de cultivo ricos, la posible correlación con características morfológicas bacterianas (tamaño, forma, presencia de lipopolisacáridos LPS y metabolismo) y un análisis multiparamétrico (PCA) básico, que podría permitir la clasificación de las muestras en clusters o grupos.



MATERIALES Y MÉTODOS

Características morfológicas relevantes de las cepas bacterianas utilizadas

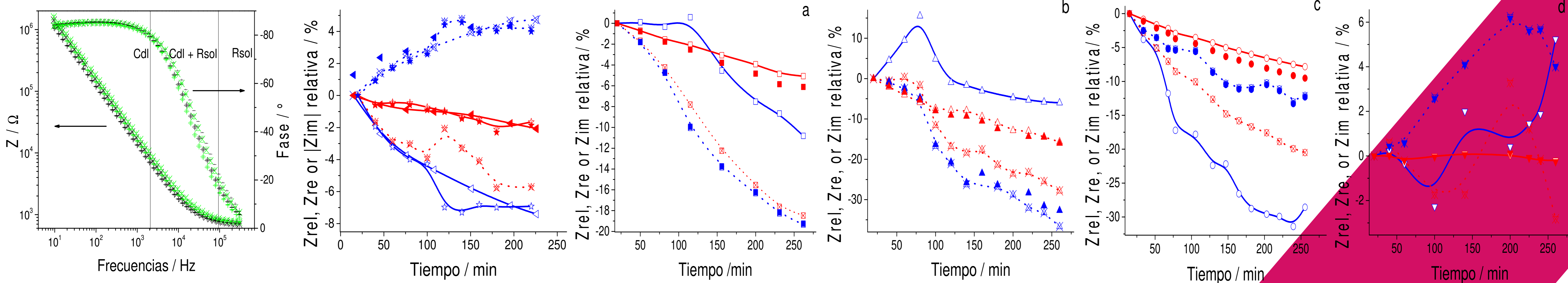
Cepa bacteriana (morfoloía celular)	Categoría Gram	Longitud, μm	Diámetro, μm	Volumen celular, μm ³ /CFU
<i>S. oneidensis</i> (bacilo)	Gram negativa (G-)	2-3	0.4-0.7	0.59
<i>P. putida</i> (bacilo)	G-	1.4-1.7	0.5-0.6	1.57
<i>B. subtilis</i> (bacilo)	Gram positiva (G+)	4-10	0.25-1	2.15
<i>M. luteus</i> (coco)	G+	---	0.35	0.18



Imágen de microscopía de campo claro de un μIDES (40x), la escala blanca representa 500 μm (a). 2 pocillos realizados con polidimetilsiloxano (PDMS) de 80 μL de capacidad (b). Set up utilizado para montar y conectar eléctricamente los μIDES con los cocodrilos del potencióstato (c).

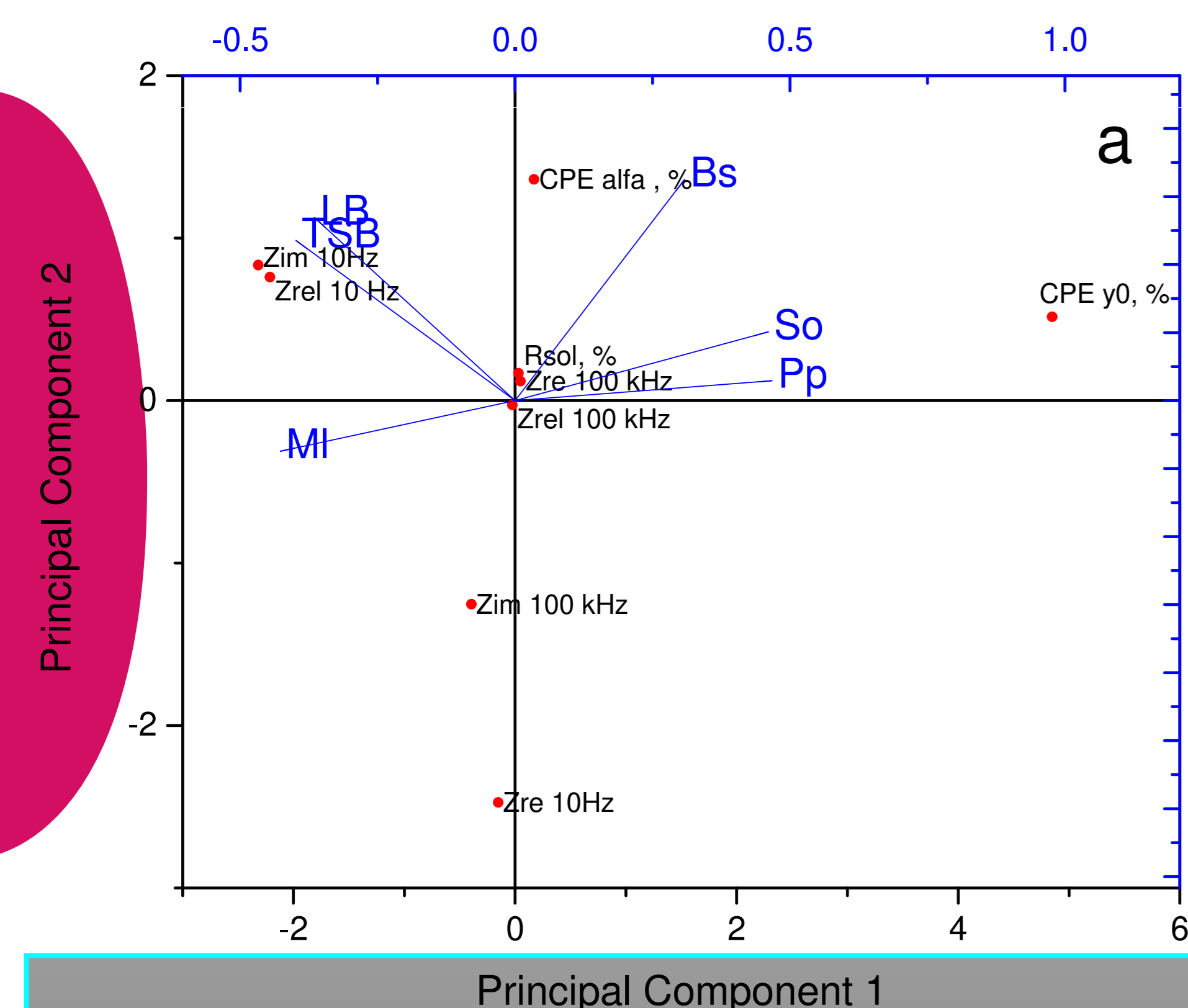
RESULTADOS

Los resultados de EIS revelan que los cambios, durante la incubación, de parámetros como Z, Zim, o Zre relativas presentan un comportamiento distintivo: en los medios de cultivo, Z y Zim relativas a 10 Hz (parámetros asociados a la Cdl) aumentan 4-5 % durante la incubación, mientras las bacterias G-, clasificación bacteriana según su pared celular, presentan una gran disminución (<19%) de estos parámetros. *Bacillus subtilis* (una de las bacterias G+), presenta menor disminución de Z y Zim relativas a 10 Hz (10-12%), pero una gran disminución de Zre (asociado a la difusión de iones en las inmediaciones de la doble capa, DL) del 26-28%.



Diagramas de Bode de muestras conteniendo *B. subtilis* (x); o *S. oneidensis* (+) al inicio (negro) y final (verde) de la incubación. Las flechas indican el eje al que corresponde cada gráfico.

Valores calculados de Zrel (símbolos llenos, sin línea), Zre relativa (símbolos vacíos y líneas continuas), y Zim relativa (símbolos tachados y líneas punteadas) medidas a 10 Hz (azul) a) o 100 kHz (rojo) b) en todas las muestras: medio de cultivo LB1:5 (triángulo izquierdo), TSB (estrella), *S. oneidensis* (cuadrado, a), *P. putida* (triángulo hacia arriba, b), *B. subtilis* (círculos, c), o *M. luteus* (triángulo hacia abajo, d).



Cambios relativos a través del tiempo (valores de los parámetros a 260 min de incubación, relativos a los primeros 20 min de incubación, en %) de todos los parámetros medidos y calculados ajustando al modelo RsolCPE en todas las muestras analizadas a 10 Hz o 100 kHz.

	10Hz, %			100 kHz, %			Rsol, %	CPE y0, %	CPE α, %
	Zrel	Zim	Zre	Zrel	Zim	Zre			
LB	4.8	5.2	-8.0	-1.9	-2.4	-1.9	-1.6	-7.6	0.905
TSB	4.0	4.2	-6.9	-1.9	-5.7	-1.7	-2.0	-11.0	1.375
S.o	-19.2	-19.3	-10.8	-6.1	-18.5	-5.1	-5.3	22.6	-0.095
P.p	-32.5	-36.6	-6.0	-15.8	-27.8	-15.7	-19.5	62.5	-2.110
B.s	-12.3	-12.0	-26.3	-9.5	-20.5	-7.7	-7.0	8.8	1.119
M.l	4.0	4.0	5.2	-0.2	-2.8	-0.2	-0.5	-10.2	0.502

El comportamiento distintivo de las cepas se evaluó hasta el momento, mediante un análisis multiparamétrico básico de componentes principales (PCA). Se observó que la combinación de los cambios a través del tiempo de los parámetros Zrel, Zre, Zim a 10 Hz y 100kHz y Rsol, CPE y0 y CPE α, obtenidos en las distintas muestras permite distinguir 4 clusters o grupos de resultados correspondientes a medios de cultivo, bacterias G-, y dos grupos para cada una de las bacterias G+. Se puede observar que el PC1 está relacionado con Zrel y Zim a 10 Hz y CPE y0 (parámetros relacionados a cambios en la Cdl). El PC2 se ve relacionado a los parámetros Zre a 10 Hz y Zim a 100 kHz y CPE α, todos relacionados a la difusión iónica en las cercanías de la DL.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de EIS libre de marca y PCA podría realizarse una clasificación de distintas bacterias: *S. oneidensis* y *P. putida*, *B. subtilis*, y *M. luteus*, que se correspondería con la diferenciación clásica de G+ y G-. Los resultados obtenidos con *M. luteus*, que no parecen diferenciarse mucho del medio de cultivo LB 1:5, pero que tampoco se encontrarían dentro del cluster de medios en el análisis de PCA, podrían estar relacionados con su tamaño reducido, tendencia a formar tétradas o grupos irregulares, y su metabolismo estrictamente aeróbico, características que harían que esta bacteria esté en mínimo contacto con los electrodos. A su vez, el método permitió distinguir muestras con bacterias de aquellas sin bacterias (medios de cultivo). Debido a una distinción bastante clara entre G+ y G-, al menos para estas cuatro bacterias, la presencia de LPS (del orden de los 16 a 56 Å) podría ser el componente que afecte a la Cdl.

Referencias