

EVIDENCIAS DE MORFOLOGÍA CELULAR ELONGADA DE *PROTEUS MIRABILIS* ASOCIADA A SUPERVIVENCIA AMBIENTAL POR TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A. Bendayan^a, F. Sánchez^a, V. Salazar^b, Z. Duque^c, P. Suárez^d, M. Fernández-Delgado^{a*}

^a Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Miranda, Venezuela. ^b Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Miranda, Venezuela. ^c Fundación Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas, INZIT, Zulia, Venezuela. ^d Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia, E-mail: milagro.fernandez@gmail.com.

Received: 15-07-2024
Published: 27-03-2025

Accepted: 12-09-2024

RESUMEN

Proteus mirabilis es un patógeno oportunista resistente a múltiples antibióticos, conocido por causar infecciones urinarias y formar biopelículas en catéteres. Aunque se han estudiado los mecanismos de patogenicidad y formación de biopelículas en cepas clínicas, hay poca información sobre aislados ambientales que puedan ser potenciales patógenos y reservorios de genes de virulencia. Por primera vez, este trabajo evaluó la morfología celular elongada de *P. mirabilis* en cultivos de una cepa ambiental aislada de tejido de ostras, así como en biopelículas formadas *in vitro* sobre superficies de quitina, utilizando microscopía electrónica de transmisión y barrido ambiental, respectivamente. Asimismo, se realizó una evaluación similar en una cepa clínica de referencia empleada como control del estudio. A través de estas técnicas de microscopía, se muestran evidencias de elongación celular en *P. mirabilis* ambiental y la presencia de factores de virulencia como fimbrias, flagelos y pili. Estos hallazgos sugieren que la morfología elongada en esta especie bacteriana puede ser una estrategia de supervivencia y resistencia a condiciones adversas, así como un mecanismo de patogenicidad que permite a la bacteria colonizar las áreas superiores del tracto urinario con la formación de biopelículas. Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de los mecanismos de supervivencia, virulencia y patogenicidad de cepas clínicas y ambientales de *P. mirabilis*, cuya importancia está en constante crecimiento en el área de la salud pública.

Palabras clave: *P. mirabilis*, morfología elongada, biopelículas, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido ambiental.

EVIDENCES OF ELONGATED CELL MORPHOLOGY OF *PROTEUS MIRABILIS* ASSOCIATED WITH ENVIRONMENTAL SURVIVAL BY ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUES

ABSTRACT

Proteus mirabilis is an opportunistic pathogen resistant to multiple antibiotics, known to cause urinary tract infections and to form biofilms on catheters. Although pathogenicity and biofilm formation mechanisms in clinical strains have been studied, there is little information on environmental isolates that may be potential pathogens and reservoirs of virulence genes. For the first time, this work evaluated the elongated cell morphology of *P. mirabilis* in cultures of an environmental strain isolated from oyster tissue, as well as in biofilms formed *in vitro* on chitin surfaces, using transmission electron microscopy and environmental scanning electron microscopy, respectively. A similar evaluation was also performed on a clinical reference strain used as a control for the study. These microscopy techniques show cell elongation in environmental *P. mirabilis* and the presence of virulence factors such as fimbriae, flagella, and pili. These findings suggest that the elongated morphology in this bacterial species may be a strategy of survival and resistance to adverse conditions, as well as a mechanism of pathogenicity that allows the bacterium to colonize the upper areas of the urinary tract with the formation of biofilms. Our results contribute to the knowledge of the survival, virulence, and pathogenicity mechanisms of clinical and environmental strains of *P. mirabilis*, whose importance is constantly growing in public health.

Keywords: *P. mirabilis*, elongated morphology, biofilms, transmission electron microscopy, environmental scanning electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

Proteus mirabilis es una bacteria Gram-negativa en forma de bastón, reconocida por su producción de ureasa, la formación de biopelículas cristalinas y su capacidad única para diferenciarse en células alargadas, también conocidas como células de tipo ‘swarmer’ [1]. Esta bacteria juega un papel importante en la descomposición de la materia orgánica de origen animal en diversos entornos como fuentes de agua, estiércol y suelos. Forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, encontrándose además en bivalvos, mariscos, peces de aleta y crustáceos [2-3]. A pesar de su carácter comensal puede convertirse en un patógeno oportunista, también considerado como el segundo agente causal más común de infecciones del tracto urinario (ITU) después de *Escherichia coli*. Además de las ITU, se ha descrito como agente etiológico de infecciones del tracto respiratorio, heridas, quemaduras, piel, ojos, oídos, nariz y garganta, así como de gastroenteritis derivadas del consumo de alimentos contaminados [3].

En el entorno clínico, se conoce que la capacidad de *P. mirabilis* para causar infección está relacionada con dos mecanismos principales: la motilidad y la formación de biopelículas. Estos mecanismos están articulados por factores de virulencia que incluyen la elongación celular y la presencia de flagelos, pili, ureasa, hemolisina y metaloproteinasa, que pueden ayudar a la bacteria a colonizar, destruir tejidos y evadir la respuesta inmune [4]. Cuando esta bacteria entra en contacto con una superficie sólida, puede transformarse de una célula nadadora corta (tipo “swimmer”, 2 µm, [5]) a una célula nadadora elongada e hiperflagelada (tipo “swarmer”, 10-30 µm, [6]). Esto les permite realizar un movimiento grupal coordinado conocido como “Swarming”, desplazándose con más facilidad. Además, el contacto con una superficie sólida puede desencadenar mecanismos de regulación genética que conducen al desarrollo de biopelículas o comunidades de bacterias

que se adhieren a superficies y están envueltas en una matriz de polímeros extracelulares. Esto les confiere muchas ventajas de supervivencia, como la capacidad de adherirse a una amplia gama de superficies, adquirir nutrientes, mantener un ambiente fisicoquímico favorable y resistir a agentes antimicrobianos, al sistema inmune del hospedador, a la depredación y otros factores de estrés ambiental [7-8]. *P. mirabilis* puede formar biopelículas en una variedad de superficies, incluyendo dispositivos médicos como catéteres urinarios. Dichas biopelículas pueden tener una naturaleza cristalina debido a la actividad de la ureasa, una enzima producida por el patógeno que hidroliza la urea en la orina para producir amoníaco, lo que puede aumentar el pH de la orina y favorecer la formación de cristales [9]. Las bacterias incrustadas en las biopelículas cristalinas pueden ser altamente resistentes a los antimicrobianos convencionales, así como al sistema inmunológico. Las fimbrias y los flagelos son otras características importantes de *P. mirabilis*. Las fimbrias permiten a la bacteria adherirse a diversas superficies, facilitando la formación de biopelículas [10]. Por otro lado, los flagelos confieren a la bacteria motilidad y mayor capacidad para colonizar superficies [11].

P. mirabilis es objeto de estudio mediante diversas técnicas de microscopía. La microscopía electrónica de transmisión (MET) es clave para examinar sus estructuras internas y analizar la formación de biopelículas. La microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) son esenciales para investigar la morfología y estructura de las biopelículas, particularmente las de tipo cristalinas, siendo la ESEM muy útil para visualizarlas en su estado natural. Estas técnicas proporcionan una visión detallada de la morfología y los procesos celulares de *P. mirabilis*, lo que contribuye a nuestra comprensión de su comportamiento y patogenicidad [12].

Aunque se han estudiado y caracterizado los mecanismos de patogenicidad y formación de biopelículas en cepas

clínicas de *P. mirabilis* [13], se conoce muy poco sobre estos mecanismos en aislados ambientales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la morfología celular elongada de *P. mirabilis* en cultivos de una cepa ambiental aislada de tejido de ostras, así como en biopelículas formadas *in vitro* sobre superficies de quitina, utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido ambiental (ESEM), respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

La cepa clínica de *P. mirabilis* utilizada en este estudio fue obtenida del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCMM 620, Caracas, Venezuela), un aislado de un catéter urinario permanente. La cepa ambiental de *P. mirabilis* fue aislada de muestras de ostras (*Isognomon alatus*) en el estado Falcón e identificada utilizando técnicas bioquímicas y de biología molecular [2]. Ambas cepas se cultivaron en MacConkey (Difco, Detroit, MI, USA) a 37 °C durante un período de 24-48 h y se conservaron a -80 °C en caldo nutritivo (Difco, Detroit, MI, USA) suplementado con glicerol al 15% hasta su uso en el estudio.

Observación de morfología celular de cultivos de *P. mirabilis* mediante MET

Ambas cepas de *P. mirabilis* fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani a 37 °C hasta fase logarítmica, centrifugadas a 327 g por 10 min, resuspendidas en tampón Tris-HCl (10 $\mu\text{mol l}^{-1}$, pH 7,4) y teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Las muestras fueron examinadas en un microscopio modelo FEI CM10 a 80 kV.

Para el análisis de la longitud celular de *P. mirabilis*, se empleó un conjunto de micrografías obtenidas por MET. Este conjunto incluyó nueve imágenes correspondientes a cepas clínicas y 19 imágenes de cepas ambientales de *P.*

mirabilis. La medición de la longitud celular se realizó utilizando el software ImageJ 1.54d.

Estudio *in vitro* de biopelículas de *P. mirabilis* por ESEM

Se prepararon cupones de 1 cm^2 a partir de exoesqueleto de camarón (fuente de quitina) como superficie de adhesión. Estos se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se calentaron durante 24 h a 60 °C, se colocaron en viales que contenían 4,5 ml de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón, HIMEDIA) y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Se inocularon alícuotas de 0,5 ml de cultivos en fase logarítmica de las cepas ambiental y clínica de *P. mirabilis* en los viales que contenían caldo BHI y los cupones de quitina. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 96 h por triplicado. Se incluyeron como controles del ensayo viales con medio BHI y cupones de quitina sin inóculo bacteriano. Después del tiempo de incubación, se retiraron los cupones de cada cultivo de *P. mirabilis*, se lavaron tres veces con tampón de cacodilato sódico (0,1 mol l^{-1} , pH 7,4), se sumergieron inmediatamente en glutaraldehído al 2,5% y se conservaron a 4 °C hasta el análisis de ESEM.

Se eligieron aleatoriamente 10-15 posiciones diferentes de observación en la superficie de cada muestra para obtener imágenes representativas de la formación de biopelículas, utilizando un ESEM Quanta 200FEG (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos) operado a un voltaje de aceleración de 4-6 kV y una presión de 130-190 Pa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se realizó un análisis comparativo de la morfología celular de dos cepas de *P. mirabilis*: una de origen ambiental y otra de origen clínico. A través de la observación por MET y ESEM, se examinaron aspectos específicos como la longitud celular y la presencia de estructuras tales como flagelos, fimbrias y pili. Mediante MET, se observó que el promedio de la longitud celular

fue de $2,4\pm1,5$ y $2,3\pm0,5$ μm para las cepas ambiental y clínica de *P. mirabilis*, respectivamente. Siguiendo los criterios establecidos por Mobley y Belas [14], en este estudio se clasificó como células cortas aquellas menores a 4 μm y como células elongadas aquellas iguales o superiores a 4 μm . Los recuentos de células cortas y elongadas en las cepas ambientales y clínicas de *P. mirabilis* se presentan en la Tabla 1 y los resultados de su longitud promedio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Recuento de células cortas y elongadas en cepa ambiental y clínica de *P. mirabilis*.

Longitud celular (μm)	Recuento celular	
	Cepa ambiental	Cepa clínica
< 4	117	39
≥ 4	10	NO
Total	127	39
% Cortas (< 4)	92,1	100
% Elongadas (≥ 4)	7,9	NO

NO: no observado

Tabla 2. Longitud promedio de células cortas y elongadas de cepa ambiental y clínica de *P. mirabilis*.

Morfología celular	Longitud celular (μm)	
	Cepa ambiental	Cepa clínica
Cortas	$2,2 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,5$
Elongadas	$5,2 \pm 4,1$	NO

NO: no observado

Se observó que la cepa ambiental mostró predominantemente células cortas (92,1%) y en menor proporción células elongadas (7,9 %), mientras que en la cepa clínica el 100% de las células fueron cortas. Así mismo, las imágenes obtenidas por MET mostraron la presencia de bacilos elongados de 4-17 μm en la cepa ambiental (Fig. 1a), los cuales estuvieron ausentes en la cepa clínica (Fig. 1c). En la Fig. 1a se destacan cadenas de células alargadas y estrechas de la cepa ambiental, incluyendo una de aproximadamente 17 μm de longitud (indicada con una flecha). Estos resultados sugieren que un pequeño porcentaje de células de la cepa ambiental puede tener la capacidad de cambiar su morfología de bacilos cortos a células elongadas en respuesta a ciertos estímulos o condiciones ambientales [15]. Estudios previos han sugerido que puede existir heterogeneidad celular en las poblaciones de una misma especie bacteriana. Epstein (2009) definió esta heterogeneidad celular como un porcentaje de células que son diferentes del resto de la población debido a que carecen de las restricciones típicas de crecimiento de la mayoría, denominando a estas células como “scouts” [16].

Adicionalmente, las imágenes de MET muestran en ambos casos células bacilares con abundantes fimbrias (Figs. 1c-1f), pero con escasos pili (Figs. 1b, 1c y 1f). Los flagelos sólo fueron observados en la cepa clínica (Fig. 1e). Las fimbrias se han descrito como uno de los factores de virulencia más importantes asociados con la adhesión de este patógeno a las células uroepiteliales y colonización de tejidos o superficies en la formación de biopelículas. Similarmente, los pili son estructuras ligeramente más largas que además participan en la conjugación bacteriana y transferencia de material genético. Por su parte, los flagelos son responsables de la motilidad y están implicados en el desarrollo temprano de las biopelículas [13].

La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas por ESEM. A través de esta técnica se confirmó la morfología

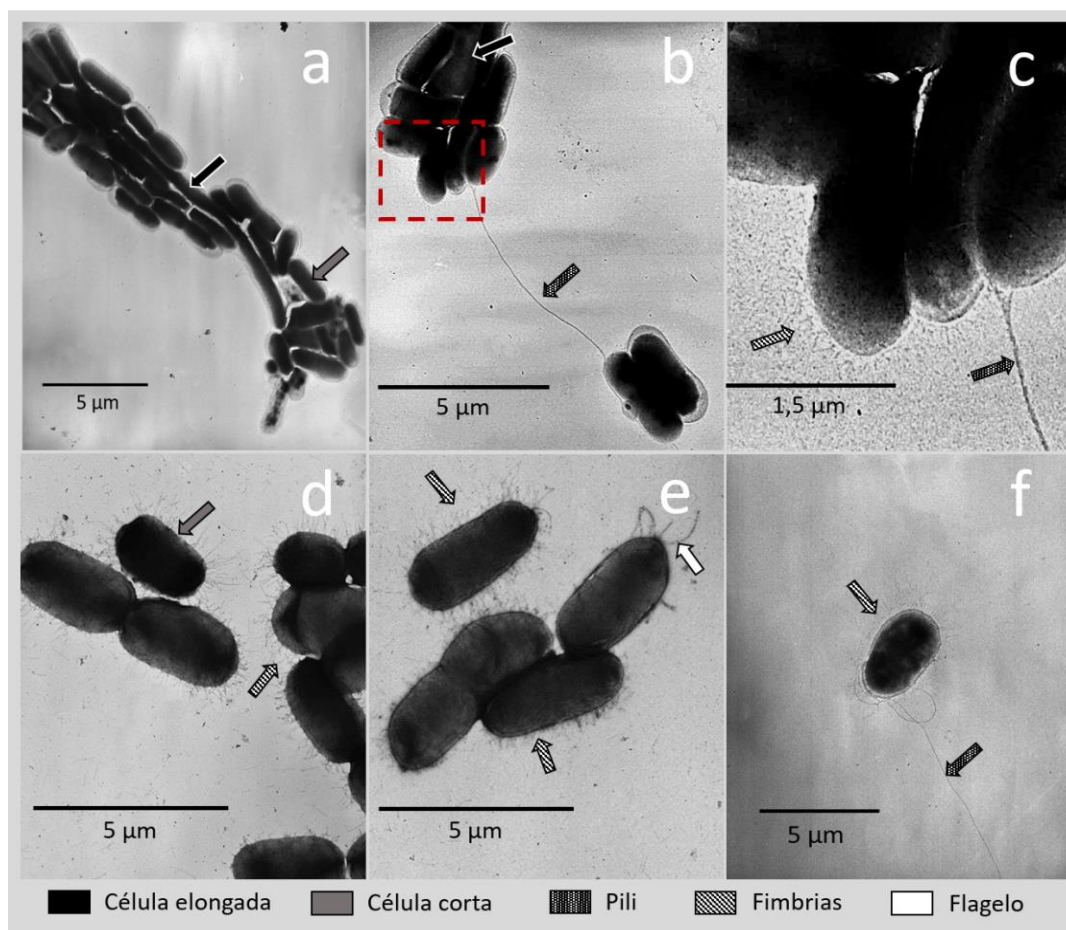


Fig. 1. Micrografías representativas de MET que evidencian en cepa ambiental de *P. mirabilis* células elongadas (a y b) y estructuras celulares asociadas a adherencia y mecanismos de patogenicidad: fimbrias y pili (b y c a mayor aumento). Adicionalmente, se presentan bacilos cortos y ausencia de formas elongadas en una cepa clínica de referencia de esta bacteria, cuyas células expresaron fimbrias, pili y flagelos (d y e).

elongada de *P. mirabilis* ambiental y clínico en biopelículas, identificándose aglomerados de células alargadas de 4-20 µm, entrelazadas, en diferentes orientaciones e inmersas en matriz polimérica (Fig. 2). Estos resultados presentan evidencias de bacilos elongados de *P. mirabilis* de origen ambiental y la capacidad de estas células diferenciadas de conformar biopelículas. A pesar de no observarse por MET células elongadas en la cepa clínica, éstas fueron identificadas por ESEM en las biopelículas. Es posible que las condiciones experimentales no hayan favorecido la formación de células elongadas o que su presencia haya sido muy escasa. Trabajos previos han propuesto a dicha

morfología como una estrategia de supervivencia y resistencia a condiciones adversas, así como un mecanismo de patogenicidad que le permite a la bacteria colonizar las áreas más superiores del tracto urinario con la formación de biopelículas [13, 17-18]. En otras especies bacterianas como *Vibrio cholerae* se ha descrito similarmente esta morfología elongada en cultivos y biopelículas bacterianas como una posible estrategia de supervivencia ambiental [19].

Se conoce que las células individuales de *P. mirabilis* pueden alargarse hasta 40 veces en superficies y volverse hiperflageladas, adoptando la morfología “swarmer”. Esta morfología permite un patrón de movimiento

colectivo denominado enjambre, que aumenta su potencial de colonización e infección [20]. En este estudio, por primera vez se demostró la morfología celular elongada en un aislado ambiental de *P. mirabilis*,

molecular son necesarios para caracterizar la acción de fármacos y/o nanocompuestos en la inhibición de moléculas y estructuras implicadas en las biopelículas, como estrategias de control y tratamiento de infecciones

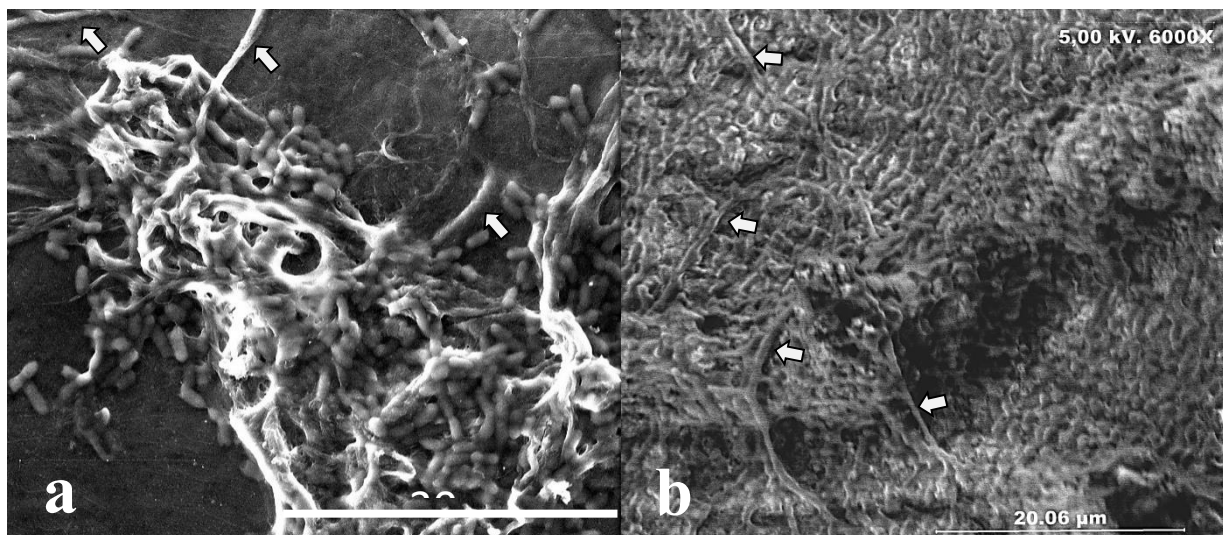


Figura 2. Micrografías representativas de ESEM que muestran células elongadas (señaladas con flechas) de cepas ambiental (a) y clínica (b) de *P. mirabilis* en biopelículas formadas sobre quitina. Barra: 20 μ m.

lo que sugiere la necesidad de investigar más a fondo este fenómeno en cepas ambientales. Aunque la mayoría de los aislados de *P. mirabilis* proceden de muestras clínicas, hay informes limitados de su obtención a partir de invertebrados marinos, especialmente bivalvos y crustáceos [2-3]. Esto resalta la necesidad de entender mejor su distribución y adaptabilidad en diferentes entornos, incluyendo medios acuáticos.

CONCLUSIONES

Este estudio representa la primera investigación que reporta la morfología elongada en una cepa de *P. mirabilis* de origen ambiental, específicamente aislada de tejido de ostras. Además, sus resultados contribuyen al conocimiento de los factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad de cepas clínicas y ambientales de *P. mirabilis*, cuya importancia es cada vez mayor en salud pública. Posteriores estudios que empleen estas técnicas de microscopía y otras herramientas de biología

causadas por este patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas y el Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas por los financiamientos otorgados a este estudio y las facilidades para el uso de los equipos de MET y ESEM, respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] Armbruster, C.E., Mobley, H.L., Pearson M.M. (2018) "Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection" *EcoSal Plus* 8:10.1128.
- [2] Fernández-Delgado, M., Contreras, M., García-Amado, M.A., Gueneau, P., Suárez, P. (2007) "Occurrence of *Proteus mirabilis* associated with two species of Venezuelan oysters" *Revista*

- do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 49:355-359.
- [3] Apines-Amar, M.J.S., Caipang, C.M.A., Lopez, J.D.M., Murillo, M.N.A., Amar, E.C., Piñosa, L.A.G., Pedroso, F.L. (2022) “*Proteus mirabilis* (MJA 2.6S) from saline-tolerant tilapia exhibits potent antagonistic activity against *Vibrio* spp., enhances immunity, controls NH₃ levels and improves growth and survival in juvenile giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*” *Aquaculture Research* 53:5510-5520.
- [4] Coker, C., Poore, C.A., Li, X., Mobley, H.L. (2000) “Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection” *Microbes and infection* 2:1497-1505.
- [5] Jones, S.M., Yerly, J., Hu, Y., Ceri, H., Martinuzzi, R. (2007) “Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media” *FEMS Microbiology Letters* 268:16-21.
- [6] Rather P.N. (2005) “Swarming cell differentiation in *Proteus mirabilis*” *Environmental Microbiology* 7:1065–1073.
- [7] Davey, M.E., O’toole, G.A. (2000) “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:847-867.
- [8] Huq, A., Whitehouse, C.A., Grim, C.J., Alam, M., Colwell, R.R. (2008) “Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission” *Current Opinion in Biotechnology* 19:244-247.
- [9] Wasfi, R., Hamed, S.M., Amer, M.A., Fahmy, L.I. (2020) “*Proteus mirabilis* biofilm: development and therapeutic strategies” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:546552.
- [10] Li, Y., Yin, M., Fang, C., Fu, Y., Dai, X., Zeng, W., Zhang, L. (2023) “Genetic analysis of resistance and virulence characteristics of clinical multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13:1229194
- [11] Scavone, P., Iribarnegaray, V., González, M.J., Navarro, N., Caneles-Huerta, N., Jara-Wilde, J., Härtel, S., Zunino, P. (2023) “Role of *Proteus mirabilis* flagella in biofilm formation” *Revista Argentina de Microbiología* 55:226-234.
- [12] Fernández-Delgado, M., Duque, Z., Rojas, H., Suárez, P., Contreras, M., García-Amado, M.A., Alciaturi, C. (2015) “Environmental scanning electron microscopy analysis of *Proteus mirabilis* biofilms grown on chitin and stainless steel” *Annals of Microbiology* 65:1401-1409.
- [13] Schaffer J.N., Pearson M.M. (2017) “*Proteus mirabilis* and urinary tract infections”. En: *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 2da ed. Washington DC, ASM Press, pp. 383–433.
- [14] Mobley, H.L., Belas, R. (1995) “Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract” *Trends in Microbiology* 3:280-284.
- [15] Drzewiecka, D. (2016) “Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments” *Microbial Ecology* 72:741-758.
- [16] Epstein, S.S. (2009) “General model of microbial uncultivability”. En: *Uncultivated Microorganisms* Berlin, Springer Verlag, pp. 131-159.
- [17] Wilks, S.A., Fader, M.J., Keevil, C.W. (2015) “Novel insights into the *Proteus mirabilis* crystalline biofilm using real-time imaging” *PloS one* 10:e0141711.
- [18] Belas, R., Suvanasuthi, R. (2005) “The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves

FliL, a flagellar basal body protein” *Journal of Bacteriology* 187:6789-6803.

- [19] Fernández-Delgado, M., Rojas, H., Duque, Z., Suárez, P., Contreras, M., García-Amado, M.A. (2016) “Biofilm formation of *Vibrio cholerae* on stainless steel used in food processing” *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58:47.
- [20] Little, K., Tipping, M.J., Gibbs, K.A. (2018) “Swarm cell development of the bacterium *Proteus mirabilis* requires the conserved enterobacterial common antigen biosynthesis gene rffG” *Journal of Bacteriology* 200:10-1128.