

Capítulo 9

Efecto de los antibióticos sobre las bacterias adheridas a sustratos con diferente topografía.

9.1. Introducción.

Tal como se describió en el capítulo anterior numerosas enfermedades (otitis, endocarditis, caries, periodontitis y las infecciones crónicas del pulmón de pacientes con fibrosis quística) (1) así como un gran número de infecciones hospitalarias (ligadas a catéteres venosos centrales (2), catéteres urinarios (3), prótesis de válvulas cardíacas (4) y dispositivos ortopédicos (5)) están claramente asociadas a biofilms y son tratadas con antibióticos. Todas estas infecciones comparten características similares a pesar de la gran variedad de microorganismos y sitios huéspedes. Ello es debido a que una de las características más importante de un biofilm es que las bacterias que crecen en él son

capaces de evadir las defensas del huésped y resistir la terapia antimicrobiana con antibióticos.

La matriz de EPS del biofilm, que contiene polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos originados por los mismos microorganismos (6-7), cumple la función de proveer estabilidad estructural y protección al mismo contra condiciones ambientales adversas. Teniendo en cuenta que, el desarrollo de un biofilm se inicia mediante la adhesión irreversible de bacterias planctónicas que se acercan aisladamente a la superficie (8), el éxito de la profilaxis antibiótica durante el período quirúrgico, por ejemplo en las cirugías aloplásticas, ha permitido comprobar que en esta etapa preliminar las células son más susceptibles a los agentes antibióticos. Los siguientes pasos de desarrollo consisten, tal como se discutió en el Capítulo 1, en la adhesión irreversible a la superficie, la colonización superficial en monocapas de bacterias, incluyendo la multiplicación de las mismas, la producción de una matriz polimérica y la posterior formación de microcolonias (8). Posteriormente, el biofilm aumenta su espesor, observándose en los biofilms maduros estructuras tipo hongo o torre conectadas por canales por donde se produce el transporte de nutrientes (9). Durante esta etapa de madurez, la resistencia a los antibióticos es máxima.

Es importante recordar que el metabolismo y la velocidad de reproducción de los microorganismos varían de acuerdo a su posición en el biofilm y al ambiente donde se desarrolla, y que la estructura y composición del biofilm varían según el tipo de bacteria. Estas características tienen importantes consecuencias tanto diagnósticas como terapéuticas. Con respecto al diagnóstico, debe considerarse que en los biofilms infecciosos, las bacterias se encuentran densamente empaquetadas y cubiertas por una matriz polimérica. Este tipo de estructura dificulta el cultivo, la cuantificación e identificación de los microorganismos a través de las técnicas tradicionales de cultivo desarrolladas en el laboratorio (10). También trae como consecuencia la posibilidad de obtener resultados erróneos en la determinación de la susceptibilidad antibiótica, ya que la resistencia puede diferir notablemente si las células previamente se dispersan por ultrasonido o si se trabaja directamente con el biofilm. Estas células dispersas obtenidas en el laboratorio son en general más susceptibles a la terapia con antibióticos que las del biofilm real que se desarrolla en el paciente.

9.2. Mecanismos de resistencia de los biofilms a la acción de los antibióticos.

La resistencia de los biofilms a los antibióticos contribuye a la cronicidad de las infecciones (11). Debido a la complejidad de esta estructura biológica, los mecanismos de resistencia de los biofilms no se limitan a los ya conocidos mecanismos de transferencia de plásmidos, transposones y mutaciones que le confieren resistencia a las bacterias individuales (12). Existen cuatro formas básicas de defensa que podrían explicar el comportamiento más resistente del biofilm. La primera considera la baja penetración del biocida asociada tanto a la resistencia a la difusión como a la desactivación o adsorción del antibiótico por la matriz polimérica, que reducen la actividad e interacción del biocida con las células. Así por ejemplo, microorganismos como las cepas salvajes de *Klebsiella pneumoniae* logran desactivar al antibiótico sobre la superficie del biofilm retardando su penetración (13). La obstaculización de la difusión es probablemente efectiva contra pequeños péptidos antimicrobianos de numerosas defensinas (proteínas de cisteína ricas en iones y que funcionan como antibióticos naturales que se hallan en la superficie de la piel). También se ha reportado (14) que la barrera difusional generada en las biopelículas juega un rol importante en la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*, debido a la sobreproducción de enzimas β -lactamasas en la matriz del biofilm que hidroliza a los antibióticos β -lactámicos antes de alcanzar a las células bacterianas (15-16). Además se ha descrito que, de forma similar, se puede aumentar la producción de matriz polimérica en algunos estafilococos de coagulasa negativa (17-18). Se ha sugerido que las β -lactamasas dentro de los biofilms provienen de capas de bacterias lisadas debido a la exposición a antibióticos mediante la liberación de enzimas defensivas dentro del espacio extracelular. Por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglicosídeos, por presentar restricción de la permeabilidad durante toda la unión.

La segunda hipótesis se basa en la alteración de los microambientes (diferencias en concentración de nutrientes, oxígeno, etc.) que contribuyen a crear zonas metabólicamente inactivas, donde la velocidad de crecimiento es casi nula. Se sabe que ciertos antibióticos como la penicilina matan únicamente a las bacterias en crecimiento (19) y, por lo tanto, serían inefectivos contra células vivas pero no viables. De hecho, la penicilina y la ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y la tasa de ataque

es proporcional a la tasa de crecimiento. Algunos de los más avanzados lactámicos, como cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas pueden atacar células en fase estacionaria, sin embargo son más efectivos en el ataque rápido de células en división. Por otra parte, se han medido gradientes de oxígeno que indican concentraciones casi nulas en ciertos sitios interiores del biofilm y se ha reportado (20) que algunos biocidas son menos efectivos en ambientes anaeróbicos que en los aeróbicos. Así por ejemplo el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente la eficiencia de ciertos antibióticos.

La tercera hipótesis, considerada la más fuerte y genérica, se basa en la comprobación de que existe alteración fenotípica de algunas bacterias constituyendo formas altamente resistentes comparables a esporas. Se sabe de la persistencia de un 1% de bacterias como sobrevivientes, aún después de prolongados tratamientos con antibióticos. Ella explicaría por qué los agregados de bacterias recientemente formados muestran resistencia a los antibióticos de diferente composición, aún cuando no existan todavía barrera difusional y/o microambientes alterados.

El último factor recientemente considerado es la persistencia bacteriana, que se relaciona con la capacidad de un cierto número de células del biofilm de resistir frente a la presencia de ambientes agresivos (21). Estudios señalan que existe una cierta población microbiana dentro de la biopelícula que forma un único y altamente protegido estado fenotípico (22). Esta población recibe el nombre de células persistentes. La persistencia de una población de células puede deberse a:

- La dimensión bifásica de la biopelícula, en la cual gran parte de la población es atacada rápidamente pero una pequeña fracción de células del interior no es afectada aún con un prolongado tratamiento con antibióticos.
- Los genes que contribuyen a la persistencia codifican proteínas que actúan como circuitos reguladores que condicionan la entrada y el éxito de este estado como la buena y específica respuesta protectora.
- Los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento de microorganismos paradójicamente contribuyen a la persistencia y a la preservación de la biopelícula; la persistencia es dependiente de la dosis del agente bacteriostático y del tiempo de duración del ataque.

Se ha comprobado que la frecuencia de mutaciones en bacterias desarrollándose en biofilms es significativamente mayor que la correspondiente a las células planctónicas

(23), siendo también mayor la transmisión genética horizontal (24). Estas condiciones fisiológicas podrían explicar por qué las bacterias en biofilms se transforman más fácilmente en resistentes por medio de los mecanismos de resistencia tradicionales (betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas) observados en las bacterias planctónicas. Por otra parte, la elevada producción de especies endógenas oxígeno reactivas (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y un sistema antioxidante deficiente (25-26) generan un desbalance entre la carga oxidativa y las defensas antioxidativas dando lugar a estrés oxidativo en biofilms. Se considera que este estrés oxidativo causa mutabilidad elevada en las bacterias sésiles (23, 27) y que el estrés oxidativo endógeno promueve la resistencia antibiótica (28). Algunas investigaciones recientes también demuestran que la estructura de las microcolonias en los biofilms, debido al estrés oxidativo endógeno, son ambientes propicios para generar una adaptación genética elevada y cambio evolutivo (27).

La existencia de ciertos mecanismos de comunicación de las bacterias, mediante la síntesis y reacción de moléculas señalizadoras (29-31), también podría estar ligado a su mecanismo de resistencia a los biocidas (Capítulo 1, Sección 1.6). Se conoce como *quorum sensing* (QS) al mecanismo mediante el cual bacterias independientes perciben la presencia de otras y mediante la generación de señales extracelulares son capaces de desarrollar comportamientos sociales coordinados. La bacteria advierte la presencia de un número crítico de células en un espacio limitado y responde mediante la activación de ciertos genes que producen, por ejemplo, factores de virulencia como enzimas o toxinas. Para el caso de *P. aeruginosa*, QS regula la producción de factores de virulencia como enzimas extracelulares y lisinas celulares (por ejemplo, ramnolípidos), que son importantes en la patogenicidad de las infecciones en donde funcionan como agentes protectores frente a los fagocitos (32-33).

Teniendo en cuenta que las bacterias que se desprenden de los biofilms pierden paulatinamente sus propiedades resistivas, puede inferirse que los mecanismos previamente mencionados que interpreten las distintas formas de resistencia del biofilm a los tratamientos con biocidas deberían estar relacionados con la naturaleza multicelular del biofilm.

9.3. Nuevas terapias para la erradicación de biofilms.

Aunque aún no se conocen en profundidad todos los mecanismos involucrados en la resistencia de los biofilms frente a los antibióticos, se sabe, tal como se describe en la sección previa que existen múltiples mecanismos de resistencia que pueden actuar simultáneamente.

La heterogeneidad de estructuras, composiciones y estados fisiológicos microbianos dentro de los biofilms dificulta la acción biocida. De acuerdo a lo analizado anteriormente, es posible inferir que las células pueden estar expuestas a distintas concentraciones de antibióticos dependiendo de su ubicación espacial. Por otra parte, los gradientes de concentración de nutrientes y compuestos tóxicos existentes dentro del biofilm pueden alterar los ambientes locales generando diferentes velocidades de crecimiento de las células microbianas. Asimismo, una pequeña proporción de células dentro del biofilm pueden diferenciarse en un estado fenotípico altamente protector y coexistir con bacterias vecinas que son sensibles a los antibióticos. Como consecuencia, frecuentemente un antibiótico sólo es capaz de eliminar a algunas de las células dentro del biofilm, pero no a todas. Por este motivo, frecuentemente las terapias anti-biofilm deben impedir más de un mecanismo a la vez para que sean efectivas.

Debido a que la resistencia antibiótica del biofilm dependería de la agregación de las bacterias en comunidades multicelulares, puede especularse sobre estrategias alternativas donde se dificulte la agregación de las bacterias. Si se logra impedir la agrupación de los microorganismos la situación sería más ventajosa por dos motivos: por un lado, las defensas del huésped podrían resolver mejor la infección y por otro se mejoraría la eficacia de los antibióticos en esas condiciones.

Las estrategias de tratamiento más promisorias se enfocan en impedir el desarrollo de las estructuras multicelulares en vez de apuntar a las funciones esenciales de las células individuales. Entre las potenciales quimioterapias para impedir o destruir los agregados de bacterias se incluyen enzimas que disuelven la matriz polimérica extracelular (34), reacciones químicas que bloquean la síntesis de la matriz del biofilm (35) y análogos de las moléculas señalizadoras microbianas que interfieren con la comunicación célula-célula, indispensable para el desarrollo normal del biofilm (36). A medida que la base genética para el desarrollo del biofilm se conozca en profundidad, los productos de los genes que se

identifiquen como esenciales para la formación de colonias multicelulares se transformarán en el blanco ideal para potenciales quimioterapias.

Las potenciales estrategias que involucran cambios físicoquímicos se basan en el desarrollo de mejores materiales y métodos para el tratamiento de los biofilms (37). Por ejemplo, la estimulación eléctrica, ultrasónica, y fotodinámica puede perturbar a los biofilms y aumentar la eficacia de ciertos agentes antibióticos (38). Además, el cubrimiento de superficies con compuestos antimicrobianos ha demostrado cierta eficacia en la prevención de la formación de biofilms (39-43).

De acuerdo a lo analizado previamente, las estrategias para combatir biofilms evolucionan constantemente y existen variadas posibilidades que podrían favorecer la acción de ciertos antibióticos. En el presente capítulo se evaluará la acción combinada de un efecto físico, el efecto de la topografía, como coadyuvante a la acción biocida de los antibióticos. Teniendo en cuenta que la formación de agregados bacterianos durante las primeras etapas de la formación del biofilm está significativamente afectada por la microtopografía superficial (Capítulo 6), es posible especular que este tipo de estructuras superficiales podría mejorar la eficacia de los antibióticos. En este capítulo se analizará particularmente el efecto de topografías superficiales de tipo Au-MS1 que asisten a la terapia de dos antibióticos, penicilina y estreptomicina, sobre biofilms de *P. fluorescens*.

9.4. Características de los antibióticos utilizados.

9.4.1. Penicilina.

Las penicilinas pertenecen a una familia de compuestos químicos con una estructura química peculiar que le confiere una actividad característica contra un grupo determinado de bacterias (44). La mayoría de las penicilinas poseen como núcleo químico el anillo 6-aminopenicilánico (Figura 9.1) y difieren entre sí según la cadena lateral anclada a su grupo amino. Este núcleo 6-aminopenicilánico consta a su vez de un anillo tiazolidínico enlazado a un anillo betalactámico, éste último aparentemente esencial para la actividad antimicrobiana de este compuesto. Además del nitrógeno y del azufre del anillo tiazolidínico y betalactámico, la penicilina tiene un grupo carboxilo en la posición 2, un radical 2-metil en la posición 3 y un grupo amino en la posición 6, con distintos derivados

del grupo acilo como posibles sustituyentes, responsables de las diversas características de las diferentes penicilinas.

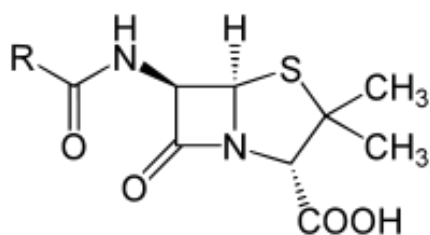


FIGURA 9.1. Estructura química de la penicilina

La penicilina, como el resto de los β -lactámicos, ejerce una acción bactericida mediante la alteración de la pared celular bacteriana, estructura que no existe en las células humanas. La pared bacteriana se encuentra por fuera de la membrana plasmática (44-45) y confiere a las bacterias la resistencia necesaria para soportar, sin romperse, la elevada presión osmótica que existe en su interior. Además de esto, la pared bacteriana es indispensable para la división celular, los procesos de transporte de sustancias, a los que limita por sus características de permeabilidad y la capacidad patógena y antigénica de las bacterias, ya que contiene endotoxinas bacterianas (45-46).

La acción de la penicilina, y en general de los β -lactámicos, se desarrolla principalmente en la última fase de la síntesis de peptidoglicano de la pared celular, al unirse a una enzima transpeptidasa llamada proteína fijadora de penicilina, responsable de producir una serie de enlaces cruzados entre las cadenas de los péptidos. La formación de estos enlaces o puentes es la que confiere la mayor rigidez a la pared bacteriana. Por lo tanto, los β -lactámicos como la penicilina, al inhibir la síntesis de peptidoglicano, interfieren en la formación de la pared celular bacteriana. Las bacterias sin su pared celular estallan o son más fácilmente fagocitadas por los granulocitos. Esta inhibición produce una acumulación de los precursores del peptidoglicano, los cuales producen una activación de enzimas como las hidrolasas y autolisinas que digieren el remanente de peptidoglicano en la bacteria (47). Por otra parte, la penicilina favorece la lisis osmótica de la bacteria durante el proceso de multiplicación.

9.4.1. Estreptomicina.

La estreptomicina es un antibiótico que pertenece a la familia de los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos constituyen una clase de antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica (48). A pesar de que existen diversos mecanismos de resistencia, continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos Gram-negativos aerobios. En la actualidad se utilizan fundamentalmente en combinación con β -lactámicos en infecciones graves. Su estructura química (Figura 9.2) se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos aminos (aminociclitol). Cuando el componente aminociclitol es la estreptidina, el antibiótico correspondiente es la estreptomicina (49).

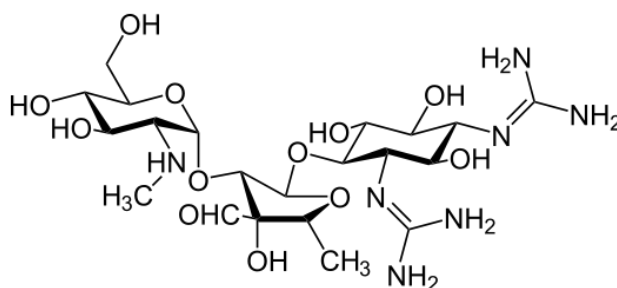


FIGURA 9.2. Estructura química de la estreptomicina

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (45) (50).

9.4.3. Combinación de antibióticos: Efecto sinérgico.

Para los ensayos realizados en el presente trabajo se utilizaron dos antibióticos: la penicilina y la estreptomicina debido al efecto sinérgico que presentan los mismos. La inhibición de la síntesis del peptidoglicano debido a la acción de la penicilina permite que los aminoglucósidos (estreptomicina) penetren la pared celular con mayor facilidad, modificando la síntesis de proteínas dentro de la célula bacteriana.

9.5. Estudio de la eficacia de los antibióticos en bacterias planctónicas.

Se sabe que la eficacia biocida de un antibiótico puede variar hasta mil veces cuando se compara su efecto sobre bacterias planctónicas y sésiles (51-52). Con el objetivo de evaluar la acción antimicrobiana de los compuestos utilizados (penicilina y estreptomicina) sobre *P. fluorescens* se realizaron, en primera instancia, ensayos con bacterias planctónicas con el propósito de comprobar su grado de sensibilidad a los antibióticos. Con ese fin, se colocó en varios tubos eppendorf 1 ml de cultivo de *P. fluorescens* (en fase exponencial, 1×10^7 UFC/ml). A la mitad de los tubos se les agregó además 5 μ l de una mezcla de antibióticos consistente en 50 unidades de penicilina/ml y 50 μ g de estreptomicina/ml. Después de un período de incubación de 2 h, se tomaron alícuotas de cultivos con y sin antibióticos. La determinación de la cantidad de células vivas y muertas anterior y posterior a la exposición a los biocidas se realizó mediante el uso del *kit Live/Dead BacLight*® (los detalles acerca del mecanismo de acción del colorante se informaron en el Capítulo 2) utilizando la metodología reportada en bibliografía (52). Cada alícuota (5 μ l) se colocó sobre un vidrio portaobjeto y se cubrió con un vidrio cubreobjeto para su posterior evaluación. Las imágenes tomadas a través de microscopía óptica de epifluorescencia permitieron obtener los resultados que se muestran en la Figura 9.3. Sobre diez imágenes ópticas obtenidas al azar (ensayo realizado por triplicado) y mediante el empleo del software IMAGE J, se cuantificó el porcentaje de área fluorescente obtenida con el filtro U-MWG2 que permite visualizar el total de bacterias. Posteriormente, se realizó el análisis del porcentaje de área fluorescente de las imágenes ópticas obtenidas con el filtro U-MWB2, con el cual sólo pueden observarse las células muertas (rojas). La diferencia entre estas dos áreas cubiertas representa la cantidad de células vivas.

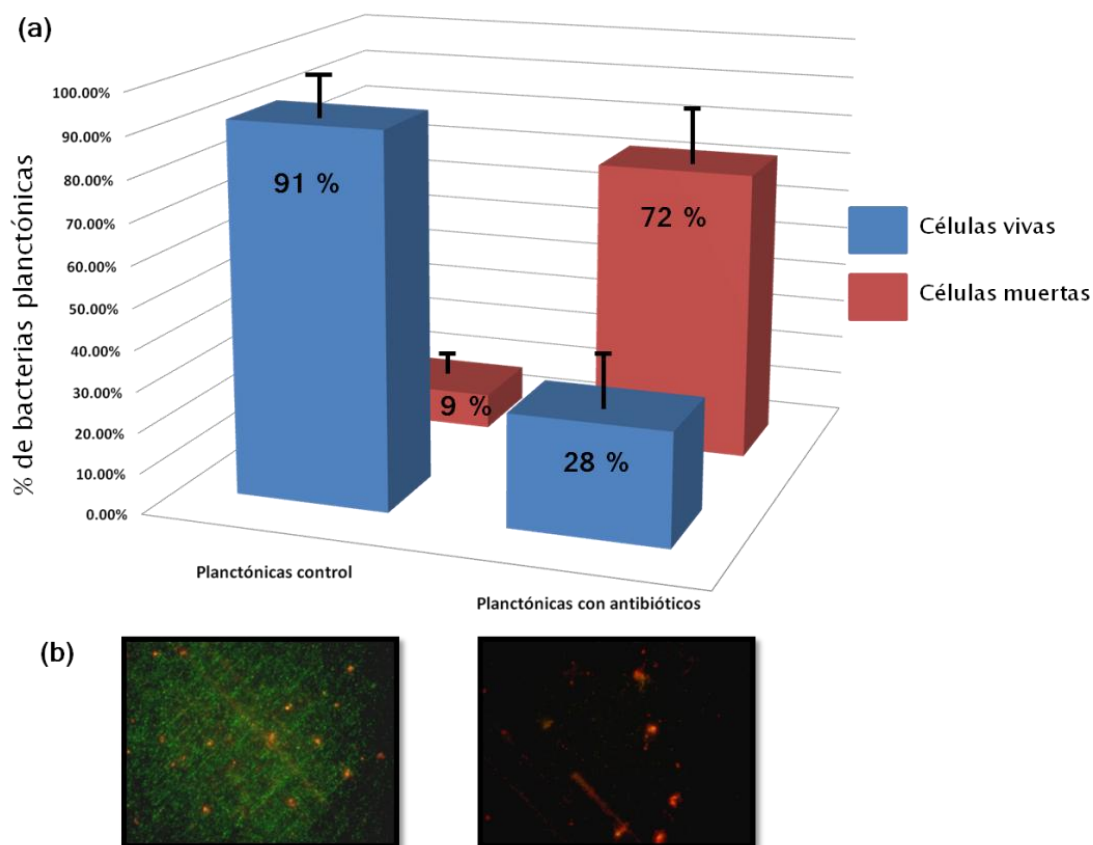


FIGURA 9.3. (a) Gráfico representando el porcentaje de bacterias planctónicas vivas (azul) y muertas (rojo) para un cultivo sin antibióticos (control) y para otro expuesto a antibióticos. (b) Imágenes de microscopía de epifluorescencia (*Kit Live/Dead BacLight*®) de un cultivo control, en donde se observa una mayoría de células verdes (izquierda), y de un cultivo con antibióticos, con bacterias fluorescentes principalmente de color rojo (derecha).

En la Figura 9.3 se grafica el porcentaje de bacterias planctónicas vivas (calculada en función del número de píxeles de coloración verde respecto del número total de píxeles). En la alícuota que no contenía antibióticos este valor fue de 91% mientras que el porcentaje luego de la exposición a los bactericidas durante 2 h fue de 28%. Mediante un análisis estadístico de Test t-Student ($p < 0.05$), pudo concluirse que las *P. fluorescens* planctónicas son sensibles a los antibióticos luego de un breve período de exposición a los mismos y que las cantidades de antibióticos empleadas son efectivas para eliminar un gran porcentaje de bacterias planctónicas.

9.6. Evaluación de la eficacia de los antibióticos sobre biofilms de *P. fluorescens* sobre superficies nano y microestructuradas.

Los ensayos experimentales que se describirán a continuación tienen como objetivo evaluar la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias sésiles adheridas sobre dos superficies con características topográficas diferentes (Au-NSa y Au-MS1). En el presente capítulo, se evaluará si la susceptibilidad a la acción de agentes antimicrobianos de los microorganismos sésiles se ve afectada por la distribución y densidad superficial de bacterias sobre dichos sustratos.

Los biofilms se formaron a partir de un cultivo de *P. fluorescens* preparado a base de un inóculo inicial de 2 ml, como ya se ha detallado anteriormente (Capítulo 5). En un ambiente estéril se colocaron los sustratos empleados para la formación de los biofilms (Au-NSa y Au-MS1) sobre una placa de Petri también estéril. Con el fin de ensayar los antibióticos sobre biofilms crecidos en condiciones similares se depositó una microgota de cultivo bacteriano (25 μ l) sobre cada sustrato durante 1 h con el objetivo de formar un biofilm primitivo (53). Transcurrido este período de tiempo, las muestras se enjuagaron con agua bidestilada estéril para remover de la superficie aquellos microorganismos que no se encontraban irreversiblemente adheridos al sustrato. Algunas de las muestras se secaron y fueron teñidas con el *kit Live/Dead BacLight*®. Las mismas fueron utilizadas como controles de la formación de biofilm. Por otro lado, se ubicó al resto de las muestras en una placa de Petri con medio de cultivo estéril al que se adicionaron penicilina y estreptomicina. Las concentraciones finales de los antibióticos fueron, al igual que en el caso de las bacterias planctónicas, de 50 unidades/ml y 50 μ g/ml de penicilina y estreptomicina, respectivamente. Los sustratos se retiraron de la solución conteniendo caldo nutritivo y antibióticos luego de diferentes tiempos de exposición: 1 h, 2 h y 24 h. Se repitió el procedimiento de secado y coloración de las muestras y se evaluó el desarrollo del biofilm sobre las diferentes superficies en presencia de antibióticos.

El efecto de diversos biocidas sobre el desarrollo de un biofilm bacteriano se ha estudiado con muchos y variados métodos, como por ejemplo mediante la remoción de la capa de biofilm de la superficie para luego determinar el número de células viables mediante el conteo de unidades formadoras de colonias. Este método tiene varios

inconvenientes, entre los que se puede mencionar: la incompleta remoción de bacterias de la superficie, la falta de disgregación de algunos agregados de células que conducen al menor número de unidades formadoras de colonias, la ruptura de algunos microorganismos al someterlos a ultrasonido para su separación y la posibilidad de que existan células vivas pero no viables que no se detectarían en los conteos de colonias. Estos inconvenientes traerían como consecuencia inexactitud en el proceso de conteo de las células. Para evitar estos inconvenientes, en este trabajo se realizó la determinación de bacterias vivas sin la necesidad remover el biofilm formado sobre la superficie. La utilización de la mezcla de colorantes (ioduro de propidio y Syto-9 del *kit Live/Dead BacLight*®) permite la detección por epifluorescencia de las células vivas y muertas dentro del biofilm intacto. Este tipo de ensayo ha sido utilizado exitosamente en varios trabajos para evaluar el efecto de agentes antimicrobianos sobre una gran variedad de microorganismos (54-56).

Primeramente se realizó el análisis del biofilm sobre aquellas superficies que no fueron expuestas a antibióticos (biofilm control). Esto permitió conocer el estado inicial de la formación de biofilms sobre las diferentes superficies.

En la Figura 9.4 se pueden observar imágenes de epifluorescencia tomadas con un microscopio óptico. La imagen de la Figura 9.4a muestra una superficie de Au-NSa mucho más cubierta de bacterias y con una densidad de células significativamente mayor que la correspondiente a la superficie de Au-MS1 (Figura 9.4b).

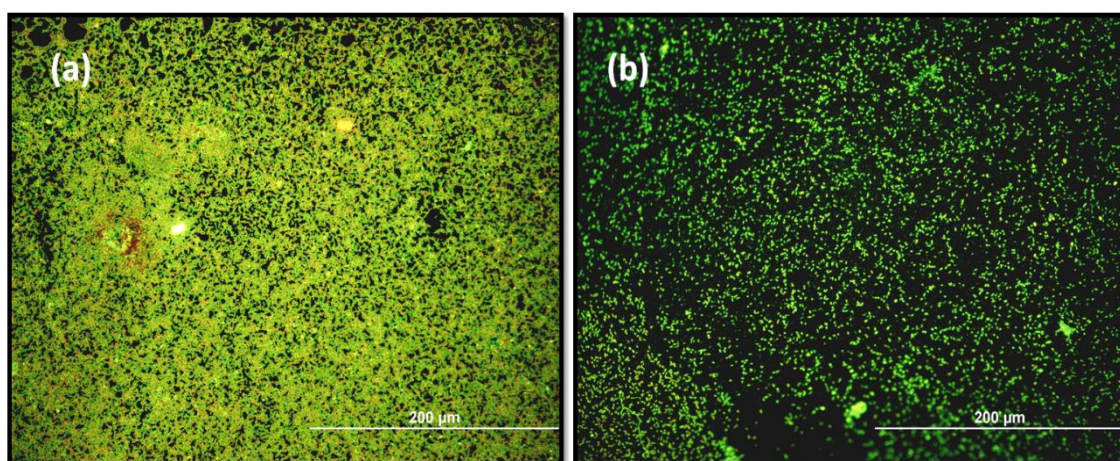


Figura 9.4. Imágenes de epifluorescencia de biofilms formados inicialmente sin la presencia de antibióticos (muestras control). (a) Bacterias adheridas a sustrato de Au-NSa. (b) Bacterias adheridas a sustrato de Au-MS1.

Tal como se describió anteriormente, la formación de agregados bidimensionales de bacterias sobre una superficie constituye una etapa fundamental durante el proceso de desarrollo de un biofilm. Sobre la superficie nanoestructurada, sin patrón topográfico

ordenado, las células pueden agruparse formando agregados ordenados y organizados y fundamentalmente permitiendo el contacto lateral entre ellas hasta formar una capa bidimensional de bacterias. Por el contrario, sobre la superficie microestructurada (MS1) no fue evidente la formación, en los estadios iniciales, de una capa bidimensional densa y poblada de bacterias en contacto entre sí. La Figura 9.5 corresponde a imágenes AFM en modo contacto de las primeras etapas de adhesión bacteriana (período de exposición: 1h) sobre las dos superficies de Au con diferente topografía en donde nuevamente pueden observarse claramente las diferencias en el número de bacterias sésiles durante estas primeras etapas en ambos sustratos.

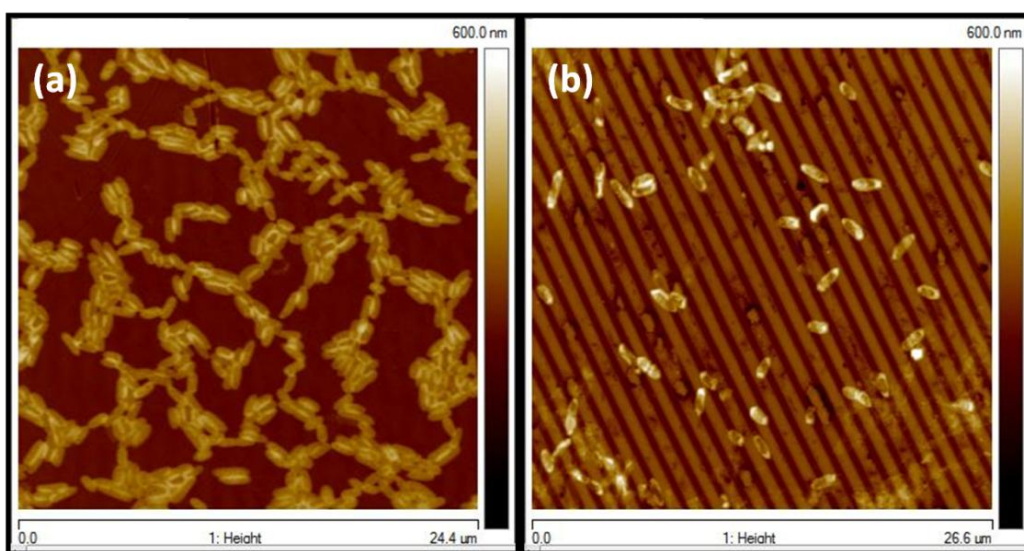


Figura 9.5. Imágenes de AFM en modo contacto ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$). (a) *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (b) *P. fluorescens* sobre Au-MS1, formados inicialmente sin la presencia de antibióticos (muestras control).

Mediante el empleo del programa de análisis de imágenes IMAGE J y las imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia se calculó el porcentaje de área del sustrato cubierta por bacterias a través de la cuantificación de la fluorescencia sobre las muestras. Se realizaron medidas sobre 10 áreas diferentes. El porcentaje de área cubierto por bacterias sobre la muestra de Au-NSa fue $38,01 \pm 7,30 \%$, mientras que el correspondiente a la superficie de Au-MS1 fue $10,03 \pm 6,20 \%$ (Tabla 9.1).

Tabla 9.1. Porcentaje de área cubierta con bacterias antes del tratamiento con antibióticos

% Área cubierta por <i>P. fluorescens</i>	
Au-NSa	38,01 ± 7,30
Au-MS1	10,03 ± 6,20

Luego del análisis de los biofilms formados sobre las diferentes superficies en un medio nutritivo sin la presencia de antibióticos, se procedió a evaluar el desarrollo del biofilm sobre los distintos sustratos en un medio nutritivo con 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina.

La evaluación del porcentaje de bacterias viables sobre los diferentes sustratos también se realizó utilizando el kit *Live/Dead BacLight*®. En la Figura 9.6 se pueden observar imágenes de epifluorescencia de bacterias adheridas a los sustratos de Au NSa (Figuras 9.6a y 9.6b) y Au MS1 (Figuras 9.6c y 9.6d) luego de estar en contacto durante 1 h con el medio nutritivo suplementado con antibióticos. Debe tenerse en cuenta que la comparación de los resultados porcentuales del área fluorescente obtenidos a partir de las experiencias con bacterias planctónicas y sésiles no es directa, ya que las primeras corresponden a una alícuota de medio de cultivo líquido, mientras que las sésiles corresponden a las adheridas a la superficie metálica.

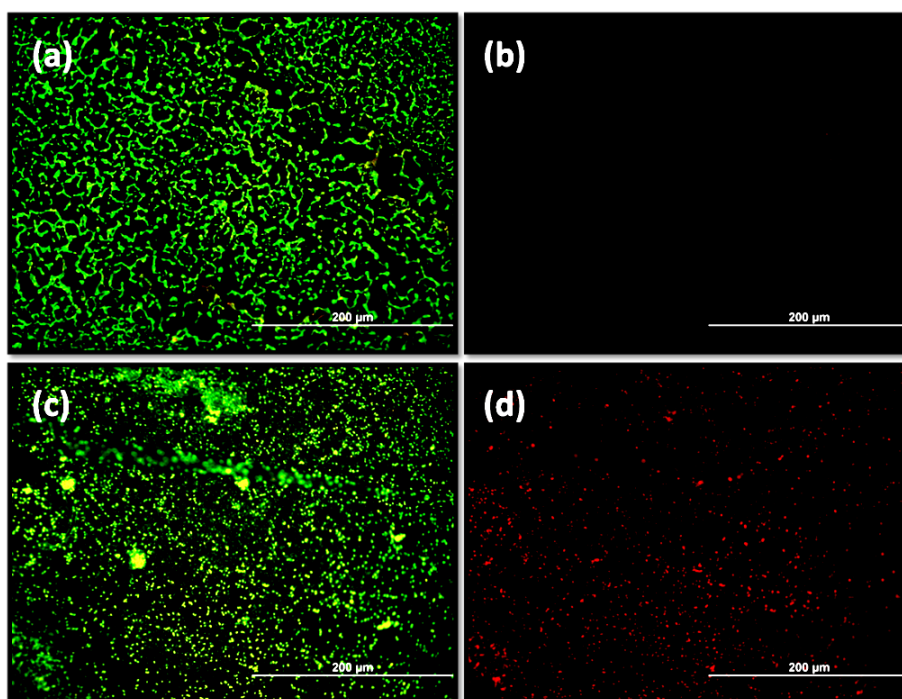


Figura 9.6. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa ((a) y (b)) y sobre sustratos de Au-MS1 ((c) y (d)) después de 1 h de tratamiento con los antibióticos. En las imágenes (a) y (c) puede observarse el total de las bacterias (vivas + muertas) mientras que en las imágenes (b) y (d) sólo se observan las bacterias muertas (rojas).

Las imágenes (a) y (c) de la Figura 9.6 fueron tomadas utilizando el filtro U-MWG2 que permite visualizar el total de los microorganismos adheridos a la superficie del metal. Mientras que las imágenes (b) y (d) corresponden al filtro U-MWB2 que permite observar únicamente la fluorescencia de las células muertas (fluorescencia roja). Puede notarse que, la cantidad de células muertas fue mayor en el caso del sustrato Au-MS1 que en el caso de Au-NSa, a pesar de que la cantidad de bacterias totales adheridas al sustrato nanoestructurado es mayor.

El mismo tipo de análisis se llevó a cabo para las muestras que fueron retiradas 2 h después de haber estado en contacto con los antibióticos. La Figura 9.7 representa imágenes de microscopía óptica correspondiente a estas muestras, distinguiéndose las células vivas como verdes (Figuras 9.7(a) y 9.7(c)) y las muertas como rojas (Figuras 9.7(b) y 9.7(d)). En la misma puede observarse la disminución del área cubierta por microorganismos, indicando, ya sea el desprendimiento de muchos de ellos o la lisis total de las células que impide la acción del colorante.

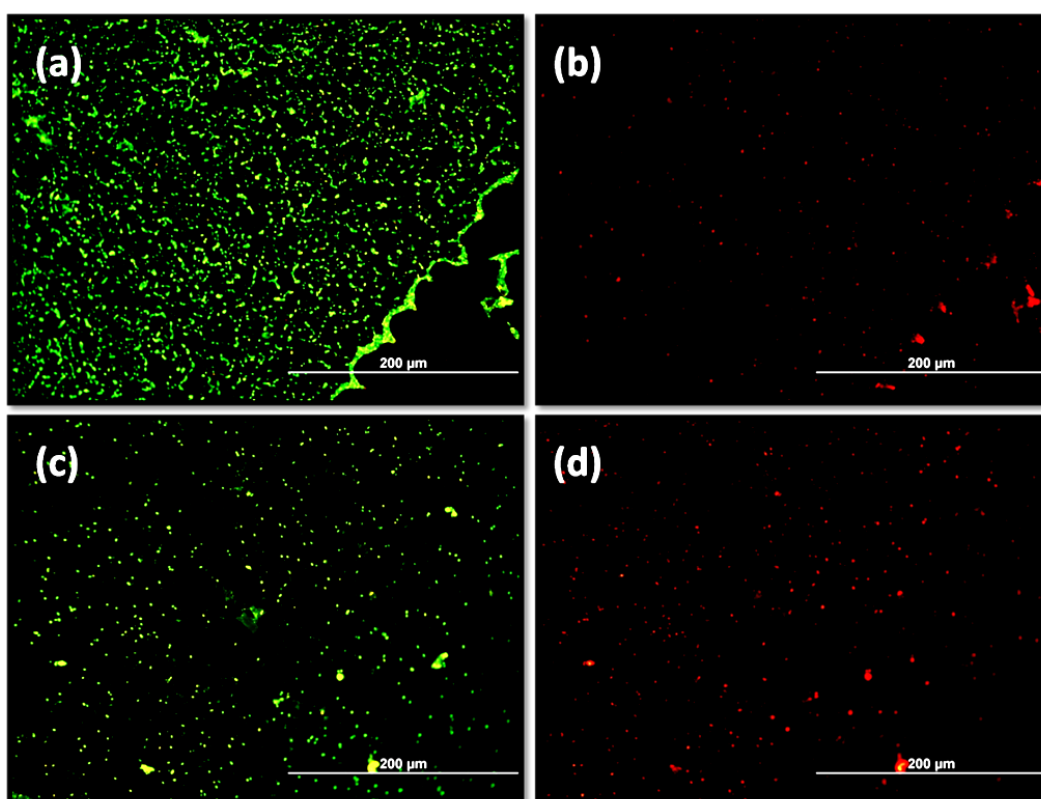


Figura 9.7. Imágenes de epifluorescencia (*Kit Live/Dead BacLight*®) de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a y b) y sobre sustratos de Au-MS1 (c y d) después de 2 h de tratamiento con los antibióticos. Las imágenes a y c permiten visualizar el total de las bacterias (vivas más muertas) mientras que las imágenes b y d corresponden a las bacterias muertas (rojas).

Sobre el sustrato Au-MS1, luego de 2 h de exposición al antibiótico, hay un gran porcentaje de células muertas (Figura 9.7d). Con respecto a la superficie de Au-NSa, recién a partir de las 2 h de inmersión en un medio nutritivo con antibióticos, comienza a ser notoria la presencia de algunas células muertas (Figura 9.7b) dando cuenta de la dificultad de acción del antibiótico sobre los biofilms más densos formados sobre estas superficies.

Para evaluar el efecto de un tiempo de exposición del biofilm al medio que contiene antibióticos marcadamente mayor se realizaron ensayos en los que las muestras con biofilms permanecieron durante 24 h en contacto con el medio nutritivo estéril suplementado con los compuestos bactericidas. La Figura 9.8 corresponde a imágenes ópticas de epifluorescencia representativas de dichas muestras.

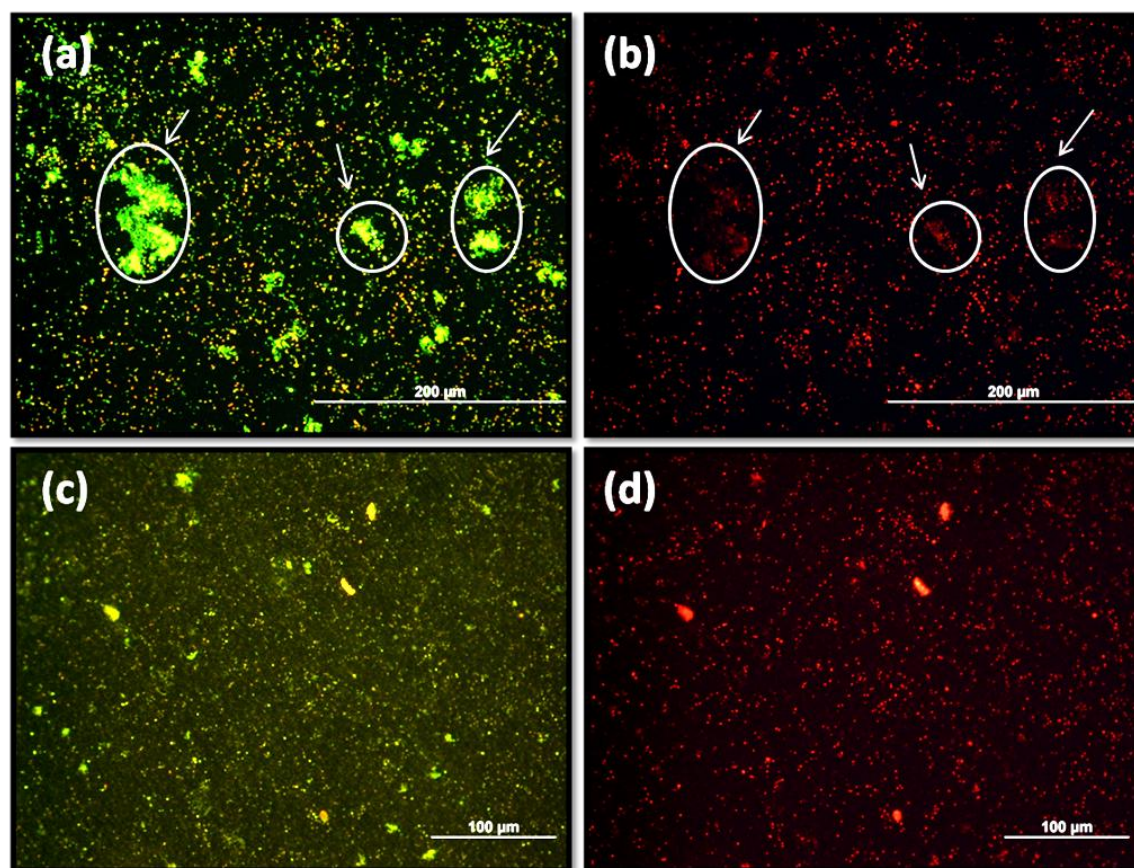


Figura 9.8. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a y b) y sobre sustratos de Au-MS1 (c y d) después de 24 h de tratamiento con los antibióticos. Las imágenes a y c fueron tomadas con el filtro U-MWG2 mientras que las imágenes b y d se obtuvieron con el filtro U-MWB2. Los círculos blancos en la figura (a) indican la presencia de microcolonias de *P. fluorescens* formadas, en su mayoría, por bacterias vivas, mientras que los de la figura (b) muestran que en dichas zonas han muerto pocas bacterias de las microcolonias.

En la Figura 9.8 se muestran efectos muy interesantes detectados en relación con la actividad bactericida. Por un lado, se observó que la cantidad de células muertas siguió

siendo mayor sobre la superficie de Au-MS1 que sobre el sustrato de Au-NSa. Por lo tanto, las bacterias adheridas al sustrato microestructurado han mostrado mayor sensibilidad a los antibióticos que aquellas células adheridas al sustrato nanoestructurado. Es decir, los sustratos de Au-MS1 no sólo inhiben la adherencia inicial de bacterias sino que también inducen una distribución espacial de microorganismos más abierta que favorece la acción bactericida del antibiótico.

Por otra parte, también puede advertirse la formación de varias microcolonias de *P. fluorescens* sobre la superficie NSa (círculos blancos en la Figura 9.8a). Las bacterias que forman parte de dichas microcolonias muestran una intensa fluorescencia verde y muy débil fluorescencia roja, sugiriendo que las mismas son más resistentes a los efectos de la penicilina y la estreptomicina. Cabe destacar que la aparición de este tipo de cúmulos o microcolonias bacterianas sobre la superficie de Au microestructurada es mucho menos frecuente, estando las bacterias mayoritariamente aisladas, y siendo por lo tanto más sensibles a los antibióticos.

Con el objetivo de cuantificar los resultados obtenidos en los ensayos presentados se ha realizado el análisis estadístico de los datos correspondientes a las áreas fluorescentes de todas las muestras. Para cada una de ellas se analizaron 10 imágenes, correspondientes a 10 regiones tomadas al azar. El mismo procedimiento se realizó por triplicado. La significación estadística de los resultados fue evaluada a través del test t-de Student con una probabilidad del 95%.

La cuantificación del total de bacterias adheridas a los diferentes sustratos (Au-NSa y Au-MS1) se llevó a cabo en las muestras sin tratamiento con antibióticos (Figura 9.9a) y en aquellas que estuvieron expuestas al tratamiento con antibióticos (Figura 9.9b). Este cálculo se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes IMAGE J, teniendo en cuenta el área ocupada por las bacterias (áreas fluorescentes) en las imágenes de epifluorescencia (Figura 9.9).

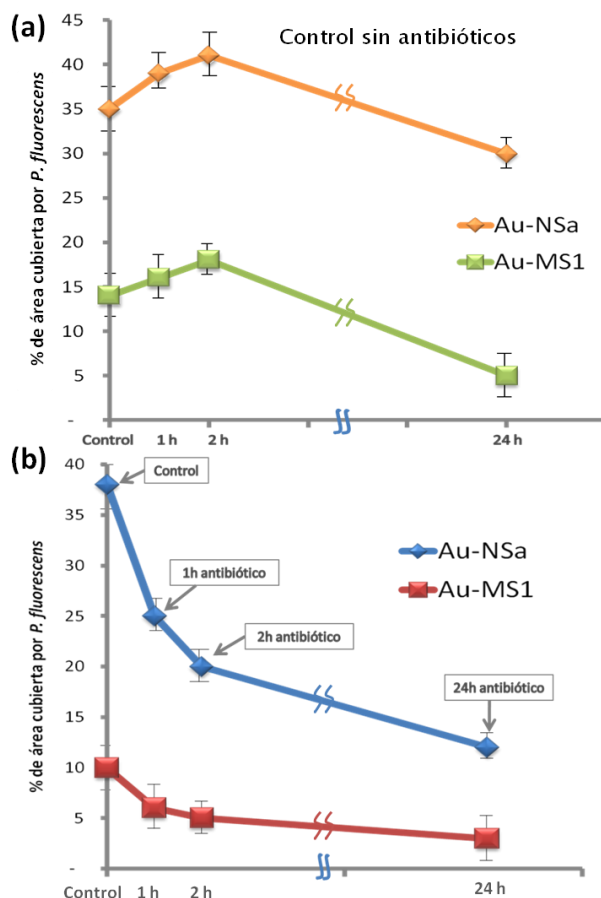


Figura 9.9. (a) Gráfico representando % de área de los sustratos Au-NSa y Au-MS1 cubierto por bacterias para muestras sin exposición a compuestos antibióticos. **(b)** Gráfico representando % de área de los sustratos Au-NSa y Au-MS1 cubierto por bacterias para la muestra inicial sin antibióticos (control), y para las muestras expuestas a antibióticos durante 1 h, 2 h y 24 h.

Se puede observar (Figura 9.9a) que durante las primeras horas, el área del sustrato cubierto por microorganismos aumenta, pero decrece a tiempos más prolongados. Sin embargo, en el caso de los sustratos expuestos a antibióticos (Fig 9.9b), el área cubierta disminuye con el tiempo de exposición durante todo el período evaluado. La Figura 9.9b, muestra que antes de la exposición al antibiótico (tiempo=0) el porcentaje de área cubierta relacionada con las bacterias adheridas al sustrato Au-NSa es mucho mayor (38 %) que para el sustrato Au-MS1 (10 %). Luego de 1 h de contacto con los antibióticos, el área ocupada por bacterias sobre el sustrato Au-NSa disminuye hasta el 25%. Esta disminución puede deberse a diferentes factores: desprendimiento de microorganismos inducido por la ausencia de células planctónicas en el medio, lisis total de las células que impediría la combinación del colorante con el ADN (que ya no se encuentra dentro de la célula) o la agrupación de células en microcolonias. Para formar dichas microcolonias los microorganismos se desplazan sobre la superficie y se apilan para formar colonias 3D (tal

como pudo observarse en la muestras después de 24 h) y por lo tanto el área ocupada por las bacterias sería menor. Cabe destacar que el porcentaje de bacterias disminuye a tiempos más prolongados (24 h), aún en ausencia de antibióticos, probablemente debido al desprendimiento de bacterias ocasionado por la falta de bacterias planctónicas en el medio líquido, tal como se sugirió anteriormente.

Es interesante notar que, en el caso de las muestras que no estuvieron en contacto con el antibiótico, el área cubierta inicialmente aumenta con el tiempo debido a la duplicación de las mismas, mientras en aquellas expuestas a los biocidas disminuye. Podría concluirse que las bacterias son sensibles a los agentes biocidas y que una parte de las células se desprenden de la superficie, ya que no se detectan ni como vivas, ni como muertas. Por otra parte el menor número de bacterias adheridas (vivas + muertas) a los sustratos Au-MS1 y el mayor aislamiento de las células parecería favorecer la mayor efectividad de los antibióticos en esta superficie. Para comprobar la eficacia del biocida se evaluó el porcentaje de células muertas en cada uno de los casos anteriores. La Figura 9.10 representa el porcentaje de células muertas sobre Au-NSa (barras en color verde) y sobre Au-MS1 (barras en color naranja) para las muestras control (sin antibióticos) y para las muestras expuestas durante 1 h, 2 h y 24 h a penicilina y estreptomycin. Puede observarse que a medida que aumenta el tiempo de exposición a los antibióticos, la cantidad de microorganismos muertos aumenta en cada una de las superficies alcanzando, después de 24 h, un valor de 59% del total de células adheridas en el caso del sustrato de Au-NSa y 82% sobre la superficie de Au-MS1

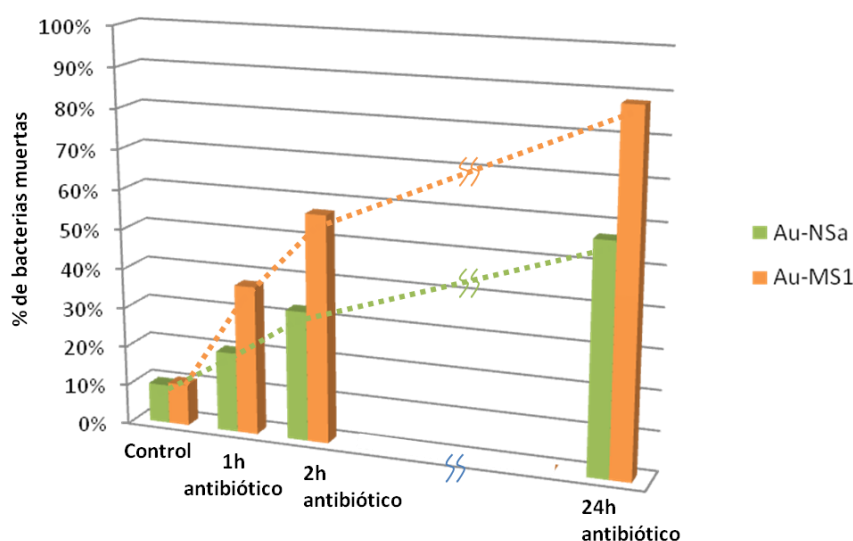


Figura 9.10. Gráfico del % de células muertas respecto del número total de células adheridas sobre sustratos de Au-NSa (barras verdes) y Au-MS1 (barras naranjas) luego de diferentes tiempos de exposición a los antibióticos.

Se puede definir un parámetro de eficacia biocida (EFB) de la mezcla de antibióticos para cada una de las superficies estudiadas como:

$$EFB \% = \left(1 - \frac{N^{\circ} \text{ Bacterias Vivas Adheridas después del Tratamiento}}{N^{\circ} \text{ Bacterias Vivas Adheridas antes del Tratamiento}} \right) \times 100$$

Mediante el empleo de los datos obtenidos anteriormente, se calculó el porcentaje de EFB-NSa y EFB-MS1, es decir, la eficacia del antibiótico sobre bacterias adheridas a Au-NSa y a Au-MS1, respectivamente, después de 24 h de tratamiento.

También fue posible evaluar el porcentaje de bacterias muertas después de cada tratamiento (% BM), respecto de la cantidad de bacterias vivas iniciales. De la Tabla 9.2 puede inferirse que EFB-NSa (54 % ± 11 %) es significativamente menor que el EFB-MS1 (87 % ± 14 %). y que el porcentaje de bacterias muertas respecto de las bacterias vivas iniciales es también inferior (63% vs. 89%, respectivamente).

Tabla. 9.2. Porcentaje de eficacia biocida (%EFB) y porcentaje bacterias muertas/ bacterias vivas adheridas inicialmente (%BM).

Sustrato	%EFB	%BM
Au-NSa	54 ± 11	63 ± 12
Au-MS1	87 ± 14	89 ± 10

Por todo lo analizado anteriormente, se puede concluir que la utilización de superficies microestructuradas permite no sólo disminuir el número de bacterias adheridas y la velocidad de colonización inicial sino también aumentar la eficacia de los antibióticos sobre el biofilm. Por otra parte, se confirma que la estructura multicelular del biofilm le confiere comparativamente una mayor resistencia a los agentes agresivos que la que presentan las células aisladas o en grupos pequeños.

9.7. Efecto de los antibióticos sobre la estructura de la membrana bacteriana.

Con el fin de analizar el efecto de los antibióticos sobre las membranas de las bacterias adheridas a los sustratos de Au-NSa y Au-MS1 se realizaron observaciones mediante AFM.

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de la penicilina consiste en la ruptura de la membrana de la bacteria (44-45), se observó mediante AFM la membrana celular, antes y después del tratamiento con el antibiótico, con el objeto de identificar posibles cambios en la misma. Las imágenes de la Figura 9.11 revelan que las membranas de las bacterias pertenecientes a los agregados formados sobre la superficie de Au-NSa no exhiben diferencias significativas en la estructura de la membrana celular (Figura 9.11a y 9.11b) a pesar de haber estado en contacto con los antibióticos durante 24 h. Sin embargo, las bacterias adheridas al sustrato de Au microestructurado (Au-MS1), más aisladas, presentan membranas altamente rugosas y fragmentadas luego de 24 h de exposición a la mezcla de penicilina y estreptomycin. A la izquierda de las imágenes magnificadas de las bacterias, puede observarse la disposición espacial de las células sobre los dos tipos de sustratos. Sobre el Au-NSa las bacterias forman redes de agregados celulares muy densos (Figura 9.11, izquierda superior) mientras que sobre la superficie de Au-MS1 las células se encuentran aisladas.

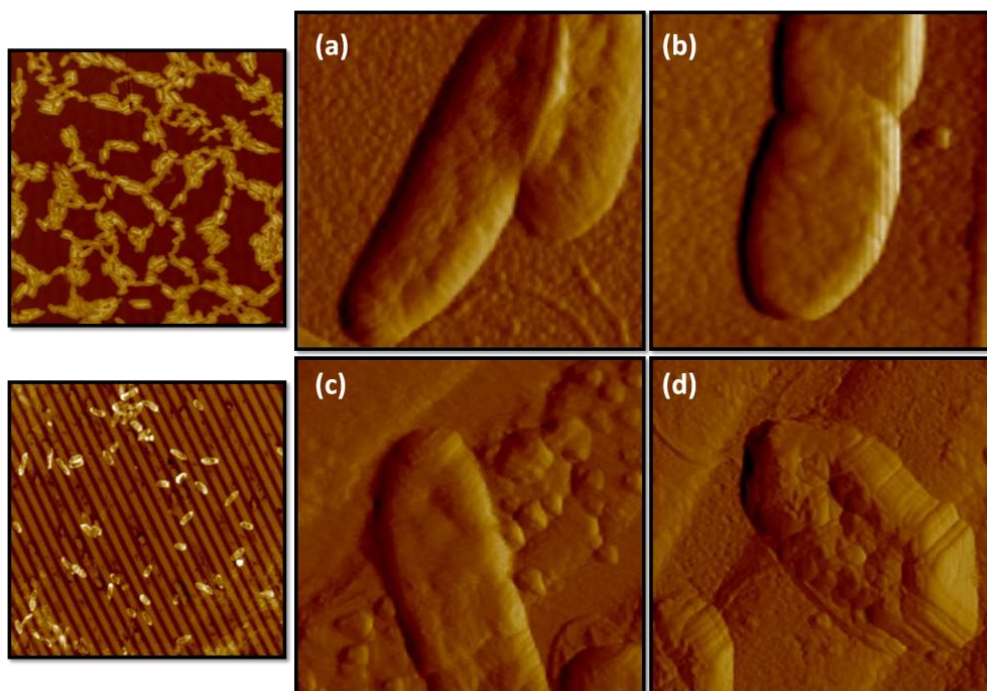


Figura 9.11. Imágenes de AFM en modo contacto ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$, imágenes de deflexión) de *P. fluorescens* sobre diferentes sustratos con y sin antibióticos. (a) Au-NSa después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. (b) Au-NSa después de 24 h con antibióticos. (c) Au-MS1 después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. (d) Au-MS1 después de 24 h de crecimiento con antibióticos. Las imágenes AFM que se encuentran a la izquierda corresponden a *P. fluorescens* sobre Au-NSa (arriba) y Au-MS1 (abajo) respectivamente, indicando la diferente organización espacial microbiana.

Se evaluó la rugosidad (RMS) de la pared de las bacterias adheridas a los diferentes sustratos en distintas áreas de las células luego de la exposición al medio de cultivo sin y con antibióticos tal como se describió en el Capítulo 2. En la Tabla 9.3 se encuentran los datos de las rugosidades de las membranas celulares de *P. fluorescens*. Se puede observar que las membranas de las células adheridas al sustrato de Au-MS1 tienen más altos valores de rugosidad (Au-NSa= $7,19 \pm 0,67$ y Au-MS1= $18,97 \pm 1,76$) y se encuentran altamente fragmentadas, indicando ruptura parcial o total de la membrana bacteriana.

TABLA 9.3. Rugosidad de la membrana de las bacterias *P. fluorescens* adheridas a superficies Au-NSa y Au-MS1 antes y después del tratamiento con antibióticos.

Sustrato	Rugosidad de la membrana de <i>P. fluorescens</i> (nm)
Au-NSa sin antibiótico	$7,19 \pm 0,67$
Au-NSa con antibiótico	$7,35 \pm 2,43$
Au-MS1 sin antibiótico	$9,41 \pm 1,37$
Au-MS1 con antibiótico	$18,97 \pm 1,76$

Las evaluaciones realizadas permiten inferir que la actividad de los antibióticos afecta más a las membranas de las bacterias aisladas, adheridas a los sustratos Au-MS1, que a las de las bacterias que forman parte de grupos sobre los sustratos Au-NSa.

9.8. Efecto de los antibióticos sobre la formación de microcolonias.

En esta sección se estudiará el efecto de la presencia de antibióticos luego de tiempos de exposición de 24 h, que implican una redistribución de las bacterias dando lugar a la formación de microcolonias. Asimismo, se evaluará cómo influye la presencia de antibióticos sobre el tamaño y la forma de los agregados microbianos y de las bacterias.

En la Figura 9.12 se muestran imágenes de microscopía óptica (técnica de tinción con naranja de acridina) de las microcolonias formadas sobre los diferentes sustratos después de 24 h de exposición al medio de cultivo sin antibiótico sobre las superficies Au-NSa (Figura 9.12a) y Au-MS1 (Figuras 9.12b). Las tres imágenes que se encuentran a la derecha de las figuras a y b corresponden a zonas magnificadas de las mismas: (1) Centro de la microcolonia; (2) Borde de la microcolonia; (3) Zona alejada de la microcolonia. Las mismas muestran menos densidad de bacterias a medida que la distancia al centro de la colonia es mayor.

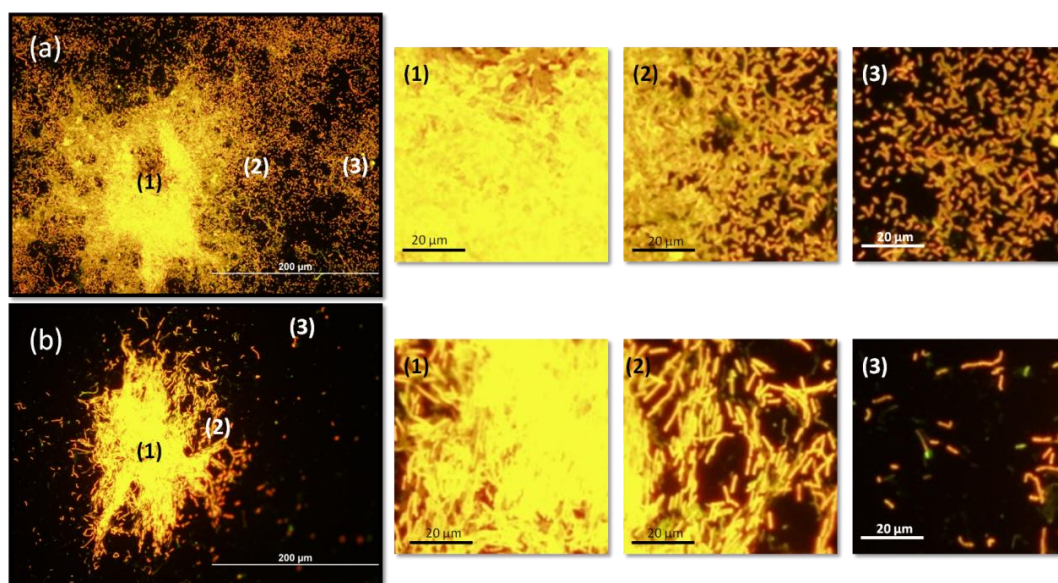


Figura 9.12. Imágenes de epifluorescencia (naranja de acridina) de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a) y sobre sustratos de Au-MS1 (b) después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. Las imágenes magnificadas corresponden a: (1) Centro de la microcolonia, (2) Borde la microcolonia y (c) Zona alejada de la microcolonia.

Las imágenes de la Figura 9.12 permiten distinguir la diferencia en la estructura de las microcolonias formadas sobre los diferentes sustratos. Sobre el sustrato Au-NSa las bacterias son capaces de formar agregados celulares grandes y densamente poblados. Además se puede observar una gran cantidad de microorganismos alrededor de las estas microcolonias. Por el contrario, las microcolonias que se desarrollan sobre el sustrato microestructurado son más pequeñas y abiertas con pocas bacterias alrededor.

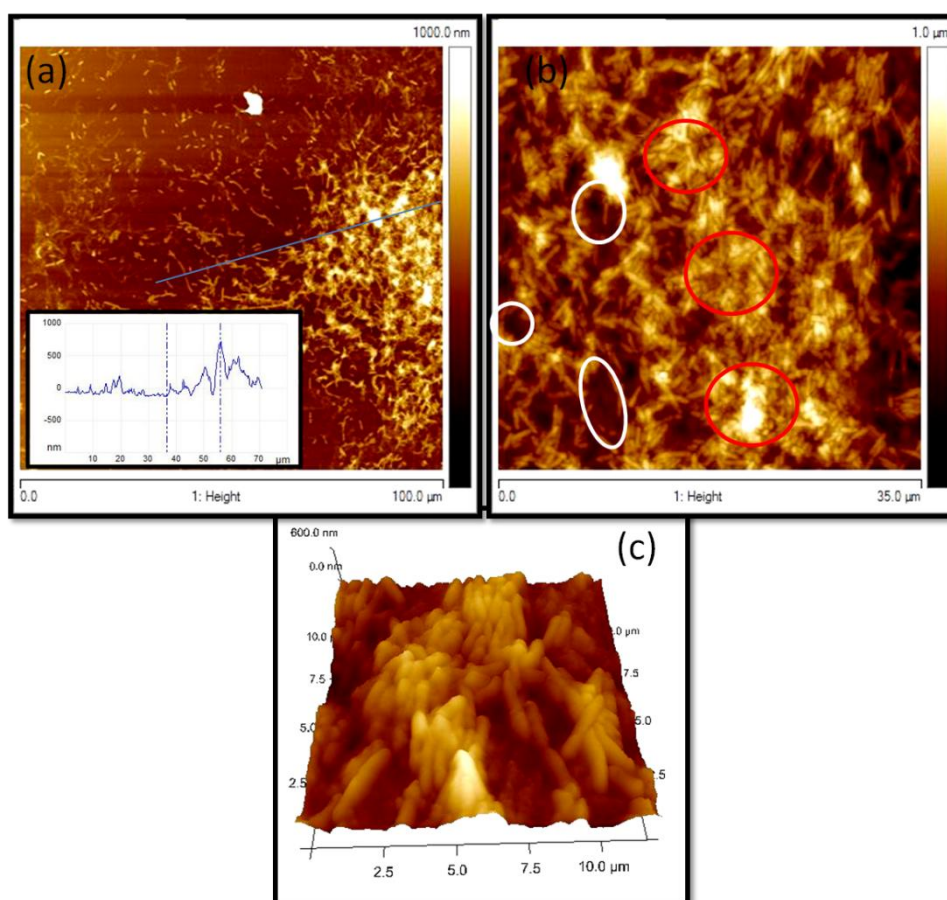


Figura 9.13. (a) Imagen AFM en modo contacto de una microcolonia de *P. fluorescens* sobre Au-NSa (24 h de crecimiento sin antibióticos). Gráfico insertado: sección transversal tomada a lo largo de la línea azul. (b) Imagen AFM de una zona dentro de la microcolonia. Los círculos rojos indican zonas densas de la colonia mientras que los círculos blancos indican huecos o poros dentro del cúmulo. (c) Imagen AFM tridimensional de parte de la microcolonia sobre Au-NSa.

En la Figura 9.13 se muestran imágenes AFM de una microcolonia densa formada sobre un sustrato de Au-NSa. El gráfico insertado muestra la sección transversal del agregado celular. En la imagen AFM correspondiente a la Figura 9.13b se observa que la estructura de la microcolonia consiste en un agregado denso de microorganismos (marcados con círculos rojos) con algunos huecos o canales en su interior (marcados con

círculos blancos). Esta estructura con poros y canales coincide con la descrita anteriormente para biofilms de *Pseudomonas* sobre sustratos lisos (51). La Figura 9.13c es una representación en tres dimensiones de una zona interior de la microcolonia en donde se evidencia claramente cómo se empaquetan las células en este tipo de cúmulo.

La imagen AFM de la Figura 9.14 es de mayor magnificación y corresponde también al sustrato Au-NSa. El gráfico de la sección transversal (1) corresponde a la zona densa del cúmulo bacteriano, mientras que el corte transversal (2) a un poro o hueco dentro de la microcolonia, con un desnivel negativo.

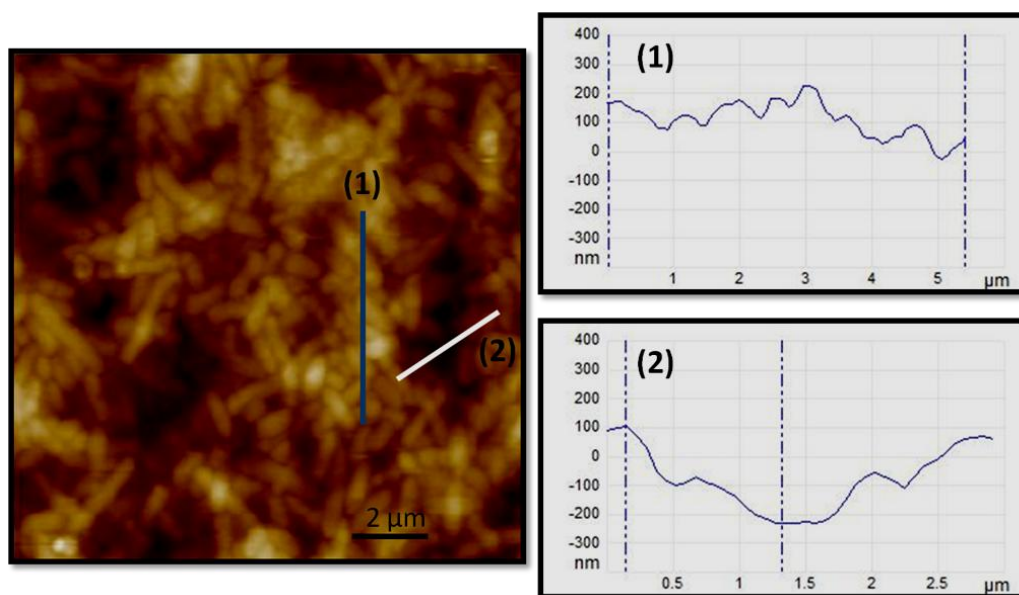


Figura 9.14. Imagen AFM en modo contacto de una zona de una microcolonia formada sobre Au-NSa. (1) Corte transversal realizado sobre una zona celular densa. (2) Corte transversal realizado sobre un poro de la colonia.

En la Figura 9.15 se observan imágenes AFM de una microcolonia de *P. fluorescens* formada sobre una superficie de Au-MS1. La estructura de los cúmulos microbianos formados sobre este sustrato difiere significativamente de aquéllos que se desarrollan sobre un sustrato de Au-NSa (Figura 9.13 y 9.14). En la Figura 9.15a puede evidenciarse que la estructura de la colonia es abierta, poco densa y ramificada.

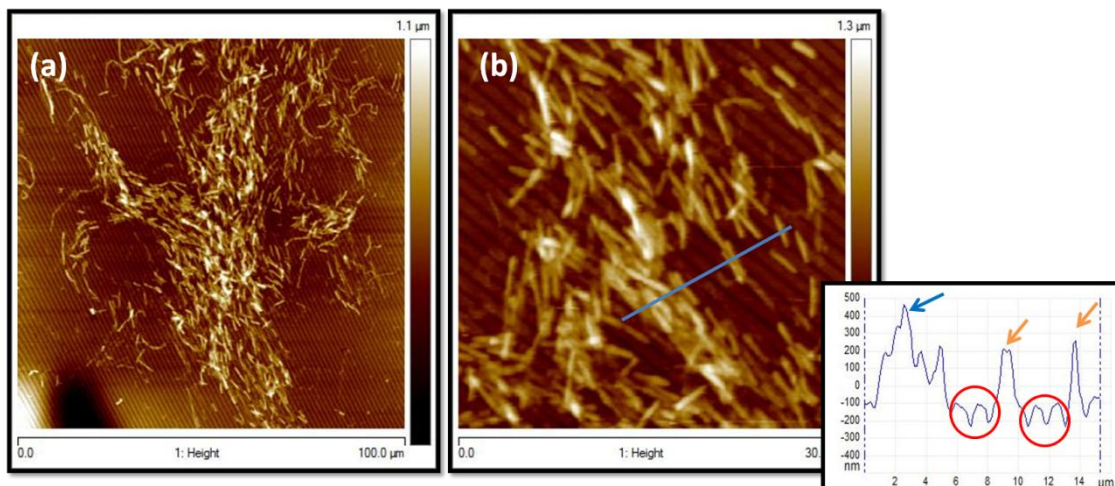


Figura 9.15. (a) Imagen AFM de una microcolonia formada sobre un sustrato de Au-MS1. (b) Imagen AFM de una zona de la microcolonia formada sobre Au-MS1. El corte transversal muestra la altura de la microcolonia (flecha azul), la altura de bacterias individuales (flechas naranjas) y zonas en donde es posible observar la presencia del sustrato microestructurado (círculos rojos).

En el gráfico del corte transversal correspondiente a la Figura 9.15b, se puede también verificar la baja densidad de bacterias en las colonias formadas sobre este sustrato. Este tipo de microcolonia, debido a su estructura más abierta, ha demostrado ser más sensible frente a la acción de antibióticos. El análisis de las microcolonias desarrolladas sobre los diferentes sustratos expuestos durante 24 h a un medio nutritivo suplementado con la mezcla de penicilina y estreptomicina se muestran en las Figuras 9.16, 9.17 y 9.18.

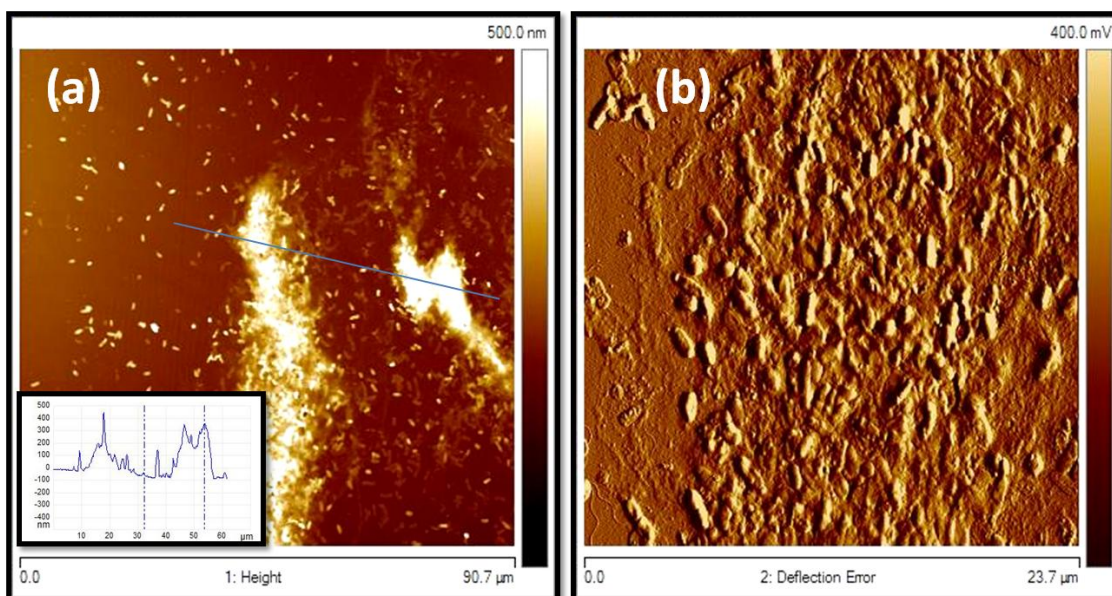


Figura 9.16. Imágenes AFM en modo contacto de microcolonias formadas sobre un sustrato de Au-NSa después de 24 h de tratamiento con la mezcla de antibióticos. (a) Imagen topográfica. El gráfico del recuadro blanco muestra la sección transversal tomada a lo largo de la línea azul. (b) Imagen de deflexión.

En la Figura 9.16 se observan imágenes AFM de algunas microcolonias formadas sobre un sustrato de Au-NSa. Estas microcolonias están densamente pobladas pero son más pequeñas que las correspondientes a las muestras sin antibióticos. Mediante el análisis de la rugosidad en los cortes transversales realizados sobre la imagen, pudieron obtenerse las alturas características más importantes. En el gráfico insertado en la Figura 9.16 se muestra la sección transversal del cúmulo de células. Las alturas de estos agregados son inferiores a los correspondientes de las colonias sin tratamiento de antibióticos (comparar las Figuras 9.13a y 9.16a).

Cabe mencionar, además, que se observó la presencia de mayor cantidad de material polimérico exudado por los microorganismos (Figura 9.17) luego del tratamiento con antibióticos. Asimismo pudo notarse que hubo una significativa cantidad de células que se desprendieron de la superficie dejando huellas que indican sus posiciones anteriores al desprendimiento o bien restos de sus membranas (círculos verdes, Figura 9.17).

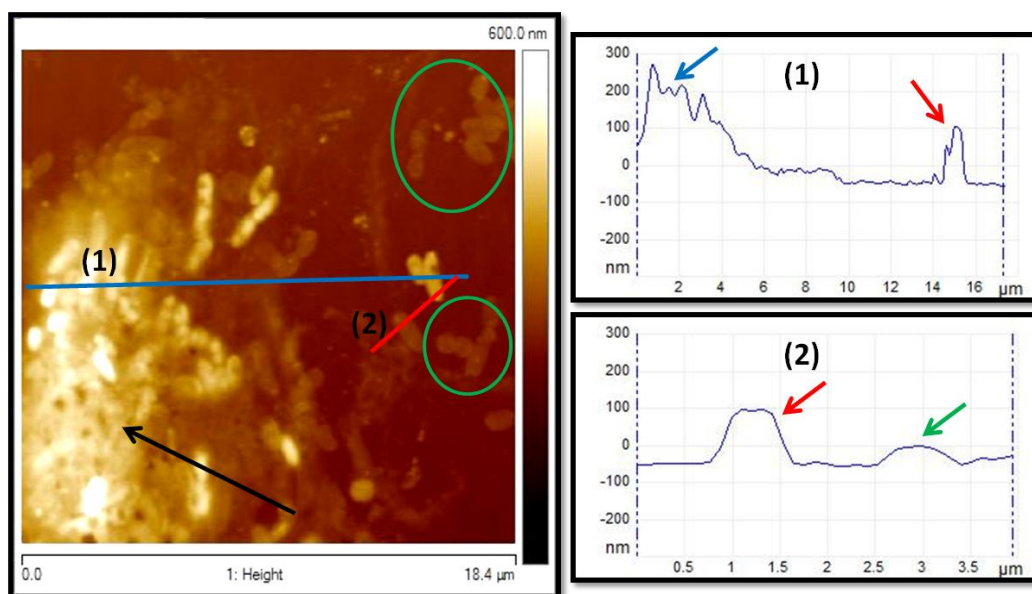


Figura 9.17. Imagen AFM de una zona de la microcolonia sobre Au-NSa luego de 24 h con antibióticos. La flecha negra indica la presencia de gran cantidad de EPS. Los círculos verdes indican “huellas” de EPS que dejaron células que se desprendieron de la superficie. Los cortes transversales (1) y (2) permiten determinar las alturas del cúmulo bacteriano (flecha azul), las células aisladas (flecha roja) y las “huellas”, probablemente de material polimérico (flecha verde).

Sobre los sustratos de Au-MS1 luego del tratamiento con antibióticos (Figura 9.18) no pudo evidenciarse la presencia de las microcolonias similares a las encontradas sobre la superficie sin tratamiento con antibióticos (Figura 9.12b). Puede concluirse entonces que hubo inhibición de la agregación y desprendimiento de células o colonias debido al tratamiento.

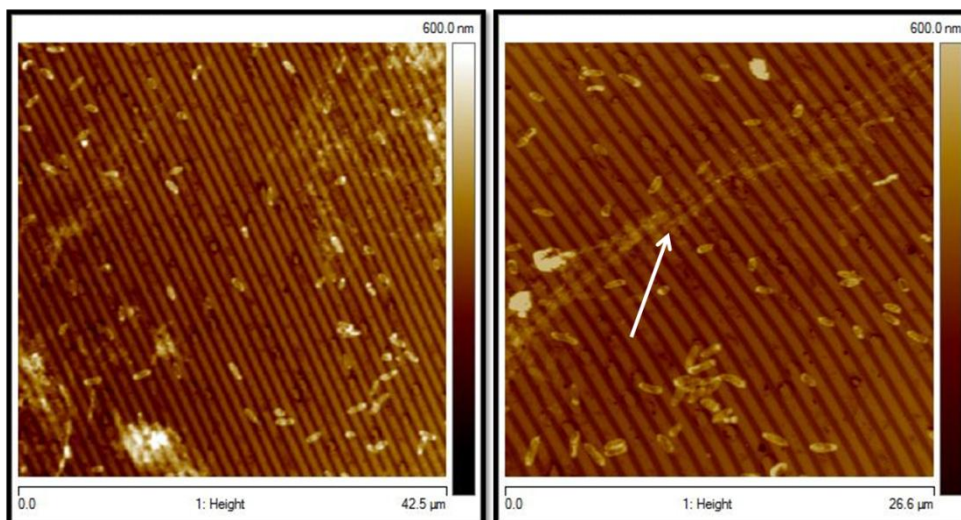


Figura 9.18. Imagen AFM de *P. fluorescens* sobre un sustrato de Au-MS1 luego del tratamiento con antibióticos. La flecha blanca indica EPS sobre la superficie.

9.9. Efecto de los antibióticos sobre el tamaño y la morfología bacteriana.

Con respecto al tamaño y morfología bacterianos, mediciones realizadas sobre bacterias sésiles permitieron detectar una mayor longitud en aquellas que no habían sido expuestas a antibióticos tanto en los sustratos Au-NSa como en las superficies Au-MS1. (Figura 9.19 y Tabla 9.4).

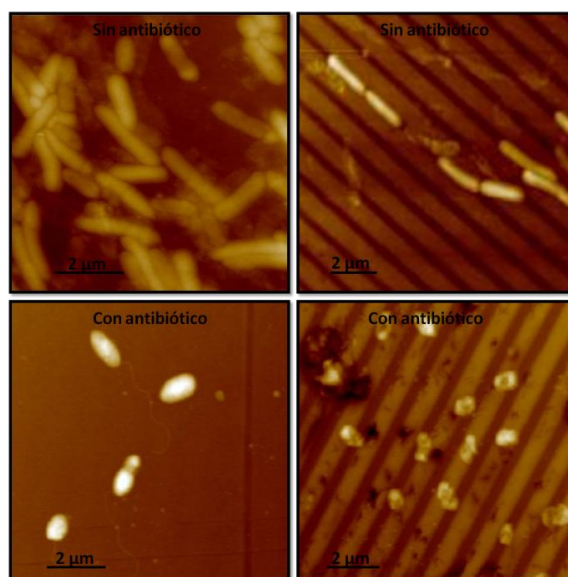


Figura 9.19. Imágenes AFM de bacterias sobre sustratos de Au-NSa (izquierda) y Au-MS1 (derecha) con y sin antibióticos dando cuenta de la diferencia de tamaños después de 24 h de crecimiento.

En la Tabla 9.4, se presentan las longitudes promedio de las bacterias adheridas a los diferentes sustratos con y sin exposición a agentes antimicrobianos. Pudo comprobarse que la longitud de los microorganismos adheridos a las superficies Au-NSa y Au-MS1 se reduce al 62% y 48% respectivamente, luego de la exposición a los agentes bactericidas dando cuenta de una respuesta de defensa del microorganismo ante un ambiente agresivo.

TABLA 9.4. Longitud de las bacterias adheridas sobre los sustratos Au-NSa y Au-MS1 con y sin tratamiento con antibióticos.

Sustrato	Largo de <i>P. fluorescens</i> (µm)
Au-NSa sin antibiótico	2,12 ± 0,68
Au-NSa con antibiótico	1,33 ± 0,25
Au-MS1 sin antibiótico	2,21 ± 0,43
Au-MS1 con antibiótico	1,06 ± 0,15

9.10. Conclusiones del presente capítulo.

Los resultados del presente capítulo permiten llegar a conclusiones interesantes con respecto al efecto de los antibióticos sobre las bacterias adheridas a dos superficies con diferente topografía superficial.

La presencia de antibióticos induce la formación de microcolonias y agregados celulares más densos luego de 24 h de exposición.

Se han observado diferencias en el tamaño y en la morfología de las bacterias adheridas luego de la exposición a los antibióticos como una respuesta de las mismas a la presencia de agentes agresivos. Las células adheridas a los sustratos de Au reducen su longitud hasta un 48 % en el caso de los adheridos a las superficies Au-MS1 y 62 % en el caso de los adheridos al Au-NSa.

Los microorganismos aislados adheridos a las superficies Au-MS1 son más susceptibles a la acción de los antibióticos que los correspondientes a las superficies Au-NSa que forman grupos densos de bacterias. La mayor susceptibilidad de las bacterias adheridas a las superficies Au-MS1 a la mezcla de penicilina y estreptomicina se ve reflejada en el mayor número de microorganismos muertos y en la estructura altamente rugosa y fragmentada de las membranas de dichas bacterias luego del tratamiento.

La estructura menos densa de las microcolonias formadas a tiempos de exposición de 24 h sobre las superficies Au-MS1 parece favorecer la acción de los antibióticos aumentando su eficacia respecto a las más compactas, formadas sobre superficies Au-NSa.

Las diferencias observadas entre el comportamiento de los microorganismos aislados y los que conforman agregados de distinto tipo están de acuerdo con las teorías que consideran que, los efectos físicos y químicos derivados de la estructura multicelular del biofilm son responsables de su mayor resistencia al ataque por biocidas.

En los patrones superficiales tipo MS1 la erradicación de infecciones por biofilms se vería facilitada por la acción más eficaz tanto del antibiótico como de las defensas del huésped.

Referencias Bibliográficas.

1. Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., y Greenberg, E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms, *Nature* 407, 762-764.
2. Passerini, L., Lam, K., Costerton, J. W., y King, E. G. (1992) Biofilms on indwelling vascular catheters, *Crit Care Med* 20, 665-673.
3. Morris, N. S., Stickler, D. J., y McLean, R. J. (1999) The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters, *World J Urol* 17, 345-350.
4. Hyde, J. A., Darouiche, R. O., y Costerton, J. W. (1998) Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article, *J Heart Valve Dis* 7, 316-326.
5. Gristina, A. G., Shibata, Y., Giridhar, G., Kreger, A., y Myrvik, Q. N. (1994) The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection, *Semin Arthroplasty* 5, 160-170.
6. Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., y Flemming, H. C. (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*, *Methods Enzymol* 336, 302-314.
7. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., y Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science* 295, 1487.
8. Marshall, K. C., y Characklis, W. G. (1990) *Biofilms*, Wiley.
9. Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., y Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 185, 4585-4592.
10. Kobayashi, N., Bauer, T. W., Tuohy, M. J., Fujishiro, T., y Procop, G. W. (2007) Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant, *Clin Orthop Relat Res* 457, 210-213.
11. Darveau, R. P., Tanner, A., y Page, R. C. (1997) The microbial challenge in periodontitis, *Periodontol* 2000 14, 12-32.
12. O'Toole, G., Kaplan, H. B., y Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.

13. Anderl, J. N., Franklin, M. J., y Stewart, P. S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824.
14. de Beer, D., Stoodley, P., y Lewandowski, Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy, *Biotechnol Bioeng* 53, 151-158.
15. Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., y Hoiby, N. (2000) Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 45, 9-13.
16. Dibdin, G. H., Assinder, S. J., Nichols, W. W., y Lambert, P. A. (1996) Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases, *J Antimicrob Chemother* 38, 757-769.
17. Dunne, W. M., Jr. (1990) Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother* 34, 390-393.
18. Permin, H., Koch, C., Hoiby, N., Christensen, H. O., Moller, A. F., y Moller, S. (1983) Ceftazidime treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection in cystic fibrosis, *J Antimicrob Chemother* 12 Suppl A, 313-323.
19. Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., y Tomasz, A. (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth, *J Gen Microbiol* 132, 1297-1304.
20. Tack, K. J., y Sabath, L. D. (1985) Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin, *Chemotherapy* 31, 204-210.
21. Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease, *Nat Rev Microbiol* 5, 48-56.
22. Dhar, N., y McKinney, J. D. (2007) Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance, *Curr Opin Microbiol* 10, 30-38.
23. Driffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O'Neill, A. J., y Chopra, I. (2008) Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, *J Antimicrob Chemother* 61, 1053-1056.

24. Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Curr Opin Biotechnol* 14, 255-261.
25. Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., Huang, C. T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., y Iglewski, B. H. (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide, *Mol Microbiol* 34, 1082-1093.
26. Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J. S., Sanchez-Amat, A., y Kjelleberg, S. (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria, *J Bacteriol* 190, 5493-5501.
27. Conibear, T. C., Collins, S. L., y Webb, J. S. (2009) Role of mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *PLoS One* 4, e6289.
28. Boles, B. R., y Singh, P. K. (2008) Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12503-12508.
29. Bjarnsholt, T., y Givskov, M. (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*, *Anal Bioanal Chem* 387, 409-414.
30. Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., y Givskov, M. (1998) N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1, *J Bacteriol* 180, 6384-6388.
31. Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., y Salmond, G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.
32. Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Phipps, R. K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L. D., van Gennip, M., Parsek, M., Hoiby, N., Rasmussen, T. B., y Givskov, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes, *Microbiology* 155, 3500-3508.

33. Jensen, P. O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., y Hoiby, N. (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 153, 1329-1338.
34. Nemoto, K., Hirota, K., Ono, T., Murakami, K., Nagao, D., y Miyake, Y. (2000) Effect of Varidase (streptokinase) on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*, *Chemotherapy* 46, 111-115.
35. Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H., y Yokota, T. (1993) Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin, *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1749-1755.
36. Parsek, M. R., y Greenberg, E. P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8789-8793.
37. Smith, A. W. (2005) Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?, *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1539-1550.
38. Pitt, W. G., McBride, M. O., Lunceford, J. K., Roper, R. J., y Sagers, R. D. (1994) Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2577-2582.
39. Gottenbos, B., van der Mei, H. C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P., y Busscher, H. J. (2002) In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber, *Biomaterials* 23, 1417-1423.
40. Ewald, A., Gluckermann, S. K., Thull, R., y Gbureck, U. (2006) Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium, *Biomed Eng Online* 5, 22.
41. Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L., y Evans, S. M. (2003) Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 102-106.
42. Nepal, D., Balasubramanian, S., Simonian, A. L., y Davis, V. A. (2008) Strong antimicrobial coatings: single-walled carbon nanotubes armored with biopolymers, *Nano Lett* 8, 1896-1901.

43. de Saravia, S. G. G., de Mele, M. F. L., Videla, H. A., y Edyvean, R. G. J. (1997) Bacterial biofilms on cathodically protected stainless steel, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 11, 1 - 17.
44. Bud, R. (2007) *Penicillin : triumph and tragedy*, Oxford University Press, Oxford.
45. Lorian, V. (2005) *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th ed. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
46. White, D. G. P. D., Alekshun, M. N., McDermott, P. F., y Levy, S. B. (2005) *Frontiers in antimicrobial resistance : a tribute to Stuart B. Levy*, ASM Press ; Oxford : Blackwell [distributor], Washington, D.C.
47. Walsh, C. (2003) *Antibiotics : actions, origins, resistance*, ASM Press; [Oxford : Enfield, distributor], Washington, D.C.
48. Scott, G. M., y Kyi, M. S. (2001) *Handbook of essential antibiotics*, Harwood Academic, Australia ; [Great Britain].
49. Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., y Tulkens, P. M. (1999) Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 43, 727-737.
50. Franklin, T. J., Snow, G. A., y Franklin, T. J. B. o. a. a. (2005) *Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action*, 6th ed. ed., Springer, New York.
51. Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284, 1318-1322.
52. Smith, K., y Hunter, I. S. (2008) Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates, *J Med Microbiol* 57, 966-973.
53. Krsko, P., Kaplan, J. B., y Libera, M. (2009) Spatially controlled bacterial adhesion using surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels, *Acta Biomater* 5, 589-596.
54. Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K. K., Pier, G. B., Oliveira, R., y Azeredo, J. (2005) Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry, *J Antimicrob Chemother* 56, 331-336.
55. Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B. L., y Lopez-Ribot, J. L. (2001) Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2475-2479.

56. Tunney, M. M., Ramage, G., Field, T. R., Moriarty, T. F., y Storey, D. G. (2004) Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1879-1881.