

# TECNOLOGÍAS INNOVADORAS PARA POTENCIAR LA ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LAS BACTERIAS ADHERIDAS A SUPERFICIES

Miñán Alejandro <sup>a</sup>; Díaz, Carolina<sup>a</sup>, Schilardi Patricia L<sup>a</sup>.; Fernández Lorenzo, Mónica A.<sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata – CCT La Plata, CONICET, Casilla de Correo 16, Sucursal 4, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: mmele@inifta.unlp.edu.ar

<sup>b</sup> Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentina.  
[fernandezlorenzom@hotmail.com](mailto:fernandezlorenzom@hotmail.com)

**Palabras clave:** *Biofilm, Superficies submicroestructuradas, Antibióticos, Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens*

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de falla de los dispositivos y materiales implantables (catéteres, válvulas cardíacas artificiales, sondas urinarias, lentes de contacto, prótesis ortopédicas) es la formación de biofilms sobre sus superficies. Dichos biofilms generan infecciones excepcionalmente difíciles de combatir mediante el empleo de antibióticos [Donlan, R. M., 2002]. Los biofilms también originan pérdidas en la industria ligadas a incremento de la corrosión, aumento de la energía necesaria para bombeo, disminución de la eficiencia en sistemas de enfriamiento, taponamientos de filtros, y son focos de propagación de infecciones en áreas hospitalarias.

Los biofilms bacterianos están constituidos por comunidades de bacterias unidas entre sí y adheridas irreversiblemente a un sustrato mediante una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellos mismos han producido, y exhiben comportamientos diferentes respecto a las bacterias en suspensión [Donlan, Rodney M. and Costerton, 2002]. La formación de biofilms proporciona a la bacteria una estrategia de sobrevivencia, protegiéndola de la acción de los agentes agresivos [Costerton *et al.*, 1999].

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio [Díaz, C. *et al.*, 2007; Díaz, C. *et al.*, 2009; Díaz, C. *et al.*, 2010] demostraron que en la etapa de adhesión al sustrato, los microorganismos responden de manera similar a la misma topografía de las superficies, aún cuando las mismas sean químicamente muy diferentes. En estos trabajos también se pudo comprobar que cuando la dimensión característica del patrón de la superficie coincide con el diámetro bacteriano, estos microorganismos quedan atrapados en dichos patrones y se acentúa su aislamiento. En el presente estudio se parte de la hipótesis de que la acción de los antibióticos sobre células sésiles puede intensificarse si se impide o dificulta la adhesión bacteriana y la formación de agregados bacterianos. Sobre la base de las observaciones anteriores puede especularse que la combinación adecuada de sustratos con patrones submicroestructurados y el tratamiento antibiótico podría actuar sinérgicamente como una estrategia eficaz para erradicar los biofilms tempranos de microorganismos de relevancia clínica. Para probar esta hipótesis, se emplearon como microorganismos modelos *Pseudomonas fluorescens* (Gram negativo, móvil mediante flagelos) y *Staphylococcus aureus* (Gram positivo, no móvil). Asimismo se evalúa el efecto del sustrato en la adhesión y colonización de superficies por bacterias con y sin movilidad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Sustratos

Como sustratos se utilizaron superficies de oro. Las superficies microestructuradas (SME) se prepararon a partir de la técnica de moldeo y replicación asistidos por monocapas

autoensambladas. El patrón superficial consiste en canales de 550 nm de ancho y 120 nm de profundidad separados por crestas de 750 nm de ancho [Díaz, C. *et al.*, 2007; Díaz, C. *et al.*, 2009; Díaz, C. *et al.*, 2010]. Como control, se utilizaron sustratos que presentan en su superficie granos orientados al azar de 50 - 100 nm (NE) (Arrandee®, Alemania).

### **Cultivos bacterianos y formación de biofilms**

En este trabajo se emplearon dos microorganismos uno de importancia clínica, una cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 y un aislado de regiones industriales *P. fluorescens*. Los microorganismos se cultivaron en caldo nutritivo (Merck, Darmstadt, Alemania) a 28 °C con agitación (250 rpm) durante 18 h. Los experimentos de adhesión bacteriana sobre sustratos SME y NE se realizaron utilizando el procedimiento descrito en la literatura [Díaz, C *et al.*, 2012]. Luego de la incubación, cada suspensión bacteriana se ajustó a  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en medio de cultivo fresco, y se utilizaron inmediatamente para la inoculación de los sustratos (NE, SME, 0,25 cm<sup>2</sup>). Para el ensayo de adhesión bacteriana, los sustratos se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos y se depositó sobre cada uno 20 µl de suspensión bacteriana, incubándose durante 2 ha 37 °C. A continuación, los sustratos con biofilms se lavaron suavemente con agua destilada estéril con el fin de eliminar aquellas células que no se encontraban fuertemente adheridas a la superficie.

El número de bacterias adheridas a la superficie de los sustratos se determinó a través de su cuantificación por el método de dilución seriada como se describe a continuación. En primer lugar, los sustratos SME y NE se colocaron individualmente en tubos de vidrio que contenían 2 ml de solución buffer fosfato estéril (PBS) 10 mM, pH 7 y las bacterias irreversiblemente adheridas se separaron por acción de un baño ultrasónico durante 15 min. Posteriormente, se determinó el número de bacterias en la suspensión mediante dilución seriada y recuento en placa en agar nutritivo. En todos los casos se realizaron 3 ensayos independientes con su respectivo duplicado.

### **Tratamiento antibiótico**

Los ensayos de susceptibilidad a estreptomicina (STP) se realizaron primeramente en cultivos planctónicos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de STP para ambos microorganismos se determinó por el método de microtitulación según las directrices del CLSI [CLSI, 2009], pero reemplazando el caldo Müller-Hinton por caldo nutritivo. La concentración bactericida mínima (CBM) se determinó por el método de recuento en placa [French, 2006]. Para testear el efecto combinado del tratamiento antibiótico sobre bacterias adheridas a ambos sustratos (NE y SME), éstos se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos, después de añadirles 20 µL de cultivo, y se incubaron a 37 °C durante 2 h, tal como se ha descrito anteriormente. Los biofilms formados sobre los sustratos se lavaron suavemente dos veces con PBS y después se incubaron con 2 ml de caldo nutritivo conteniendo STP en concentraciones entre 1 a 4 mg/L. Después de 18 h de incubación a 37 °C, las soluciones con STP se retiraron y los biofilms se lavaron dos veces con solución de PBS estéril. A continuación, los sustratos con biofilms se colocaron individualmente en tubos de vidrio que contenían 2 ml de buffer PBS y se llevaron a lavador ultrasónico. Alícuotas de la solución resultante se sembraron, después de realizar diluciones apropiadas, sobre placas de agar nutritivo. Finalmente, se enumeran las colonias y se determinaron las UFC a las 24 h de crecimiento. El mismo procedimiento se empleó para obtener el número de células viables unidas a cada sustrato antes de la exposición a STP. Estos valores se utilizaron como valores de control a los que se refirieron los valores de células viables después del tratamiento con el agente antimicrobiano. Todos los ensayos descritos se realizaron por duplicado y a partir de al menos tres cultivos independientes.

## Ensayos de viabilidad

Con el fin de evaluar la colonización inicial y, al mismo tiempo, la proporción de microorganismos viables y muertos adheridos a los sustratos (antes y después del tratamiento con STP), se empleó el kit de viabilidad LIVE/DEAD® BacLight (Invitrogen). La solución LIVE/DEAD se preparó mezclando 30  $\mu$ l del componente A (SYTO 9) y 30  $\mu$ l del componente B (yoduro de propidio) y diluyendo la mezcla en una proporción 1/200 en agua destilada. A continuación 6  $\mu$ l del colorante se vertió sobre cada sustrato y se mantuvo en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, los sustratos se enjuagaron con solución estéril de NaCl (0,9% p/v). Las bacterias fluorescentes se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Olympus BX-5. Los filtros utilizados fueron U-MWG2 (excitación 510-550 nm y 590 nm de emisión) y U-MWB2 (excitación y emisión 460-490 520).

## Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los grupos. Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

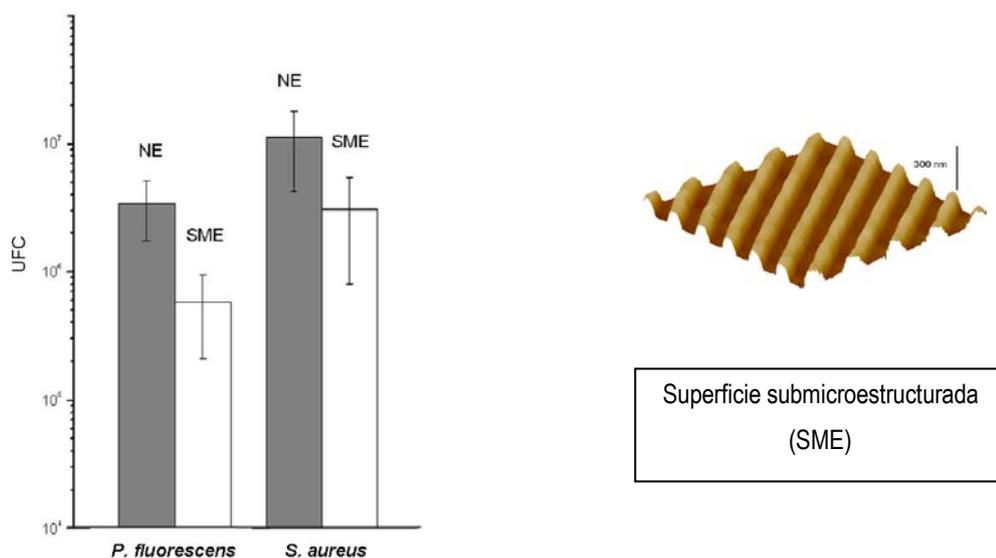
Numerosos estudios sobre biofilms microbianos han reportado que la densa estructura de los agregados bacterianos presentes en los biofilms es una de las principales causas de la resistencia a la terapia antibiótica [Butler *et al.*, 2010]. Por esta razón, en el presente trabajo se propuso una estrategia dirigida a impedir la agregación bacteriana empleando sustratos SME con el objeto de aumentar la susceptibilidad de células sésiles al tratamiento antimicrobiano. Para ello, en primer lugar se compararon y estudiaron las características de biofilms tempranos de bacterias no móviles (*S. aureus*) y móviles (*P. fluorescens*) formados sobre sustratos SME y NE. Posteriormente, se evaluó el efecto de las superficies SME y el tratamiento con STP como factores individuales sobre biofilms de *S. aureus* y *P. fluorescens*, así como el tratamiento combinado (SME + STP) con el fin de encontrar un posible efecto aditivo/sinérgico que permita la reducción y/o erradicación bacteriana.

### Efecto de la submicroestructura (SME) en la adhesión como único factor

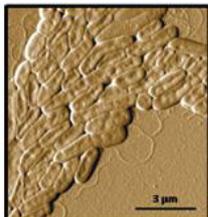
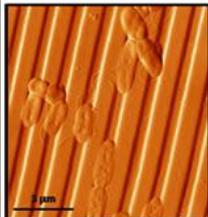
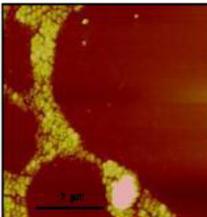
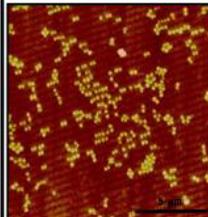
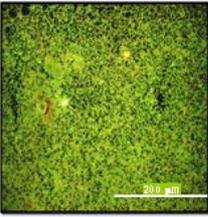
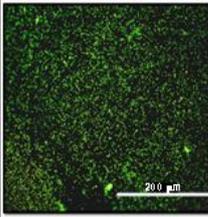
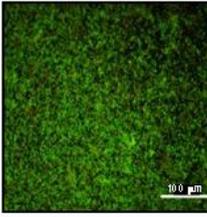
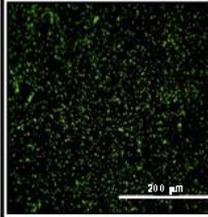
Las superficies de oro SME que presenta un arreglo ordenado de canales en el rango de nano/micro escala afectan la formación de agregados de *P. fluorescens*, alterando su adhesión y movilidad [Diaz, C. *et al.*, 2007]. Por esta razón, el primer paso del presente estudio consistió en evaluar el efecto de la SME submicroestructura de oro en las etapas iniciales de la organización de *S. aureus*, comparando los resultados con los obtenidos para la superficie nanoestructurada (Fig. 1). A través del análisis cuantitativo se encontró que el número de bacterias de *S. aureus* adheridas al sustrato SME después de 2 h de colonización se redujo significativamente (más de 4 veces) en comparación con el sustrato NS ( $p < 0,05$ ). Este resultado es coincidente con los hallados en biofilms tempranos de *P. fluorescens* cuya densidad celular decreció en la superficie SME al menos 6 veces. Con el fin de caracterizar la organización celular en ambos sustratos, se tomaron imágenes mediante microscopía de epifluorescencia y AFM (Tabla 1). Empleando el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight® se pudo confirmar que la densidad de las bacterias de *S. aureus* y *P. fluorescens* era mayor en la superficie NE. Asimismo, el análisis de las imágenes de AFM reveló que la mayor parte de las bacterias adheridas a dicho sustrato forman patrones abiertos y ramificados. En cambio en el sustrato SME, en ambos microorganismos, se pudo apreciar una menor densidad de células, las cuales se encontraban principalmente aisladas y distribuidas al azar (efecto SME).

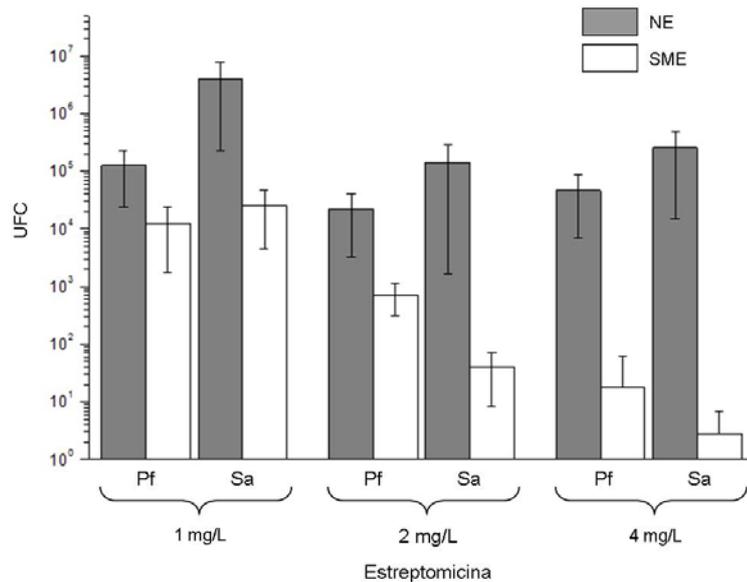
### Efecto del tratamiento antibiótico (STP)

Primeramente se determinó el efecto de STP sobre células planctónicas. Los valores de CIM y CBM encontrados para *S. aureus* fueron 2 y 4 mg/L y en *P. fluorescens* 4 y 8 mg/L respectivamente. En función de los resultados de CIM se estableció el rango de concentraciones de antibiótico a ensayar (1 a 4 mg/L) sobre cultivos sésiles de *S. aureus* y *P. fluorescens*. A continuación, se analizó la actividad antimicrobiana de STP en la población sésil (biofilms de 2 h) formada en los sustratos SME y NE para ambos microorganismos. La Fig. 2. muestra el efecto bactericida de STP sobre biofilms (2 h) de *S. aureus* y *P. fluorescens* sobre el sustrato NE (efecto STP).



**Fig. 1.** Número de bacterias adheridas a las superficies NE y SME (área: 0.25 cm<sup>2</sup>) luego de 2 h de colonización. UFC: unidades formadoras de colonias. A la derecha se muestra la imagen AFM de la superficie SME

<b>Tabla 1.</b> Biofilms bacterianos sobre sustratos NE y SME				
	<i>P. fluorescens</i>		<i>S. aureus</i>	
Sustrato	NE	SME	NE	SME
AFM				
LIVE/DEAD				



**Fig. 2.** Número de bacterias viables posterior al tratamiento antibiótico sobre los sustratos NE y SME. Pf: *P. fluorescens*; Sa: *S. aureus*. UFC: unidades formadoras de colonias.

### Efecto combinado: Adhesión sobre SME y tratamiento con antibiótico

Es interesante notar que, en ambos microorganismos, el número de células viables adheridas al sustrato NE no difiere significativamente ( $p > 0,05$ ) en todo el rango de concentraciones del antibiótico testeado. Asimismo el número de células viables adheridas al sustrato NE, tanto en *S. aureus* como en *P. fluorescens*, disminuyó un máximo de 2 órdenes respecto al control (biofilm formado sobre NE y sin tratamiento con STP). A diferencia de los resultados obtenidos luego del tratamiento antibiótico sobre el sustrato NE (efecto STP), los biofilms de *S. aureus* y *P. fluorescens* formados sobre la superficie SME mostraron una reducción significativa en el número de células sésiles luego del tratamiento antimicrobiano (SME+STP) (Fig. 2). Estos resultados confirman que la estrategia propuesta (SME+STP) fue eficaz para potenciar la actividad bactericida de STP en ambos microorganismos. Observaciones por microscopía AFM y epifluorescencia concuerdan con los resultados de cuantificación de células viables. Cuando las células sésiles fueron expuestas a STP, las imágenes de epifluorescencia mostraron una mayor densidad bacteriana sobre el sustrato NE (efecto STP) comparada con la encontrada en el SME (SME+STP), el cual presentó un mayor número de células muertas. Es importante mencionar que en el sustrato NE se observaron microcolonias compactas de *P. fluorescens* y grandes agregados ramificados de *S. aureus*, con gran número de células viables. Sin embargo, en ambos microorganismos, este tipo de cúmulos o estructuras no fueron frecuentes sobre el sustrato SME, sobre el cual se exhibió el mayor efecto bactericida para el tratamiento combinado (SME+STP, 4 mg/L) contra ambas especies adheridas a la superficie SME (Fig. 2). Los resultados de la Fig. 2 muestran un efecto bactericida sinérgico cuando se combina adhesión sobre SME con agregado de antibióticos.

### Rol de los agregados bacterianos en la resistencia bacteriana a los antibióticos

Una posible justificación a la acción bactericida sinérgica sobre células sésiles adheridas a las superficies SME, podría asociarse a la topografía de esta superficie

submicroestructurada. En el caso de microorganismos móviles (*P. fluorescens*) los canales presentes en el sustrato SME dificultan la movilidad conjunta de los mismos, conocida como *swarming*, ya que las bacterias quedan "atrapadas" en los canales y el proceso de colonización de la superficie se ve dificultado [Diaz, C. *et al.*, 2009]. Tanto en el caso de microorganismos móviles como no móviles (*S. aureus*), la disposición en canales incrementa la separación de las células que quedan "encerradas" en los canales. Como consecuencia de ese aislamiento se dificulta la comunicación química entre ellas, así como la formación de agregados. De esta manera la resistencia asociada a la menor superficie celular expuesta al antibiótico y a la protección de la matriz polimérica extracelular propias de una colonia no llegan a lograrse. Como consecuencia, las bacterias adheridas a la superficie SME son más susceptibles al tratamiento antibiótico, aumentando así la efectividad biocida del mismo. En este sentido, este trabajo es único en estudiar y comparar el efecto bactericida de STP contra células sésiles de *S. aureus* y *P. fluorescens* cuando las bacterias crecen en forma aislada o formando agregados sobre superficies de oro que no se encuentran químicamente modificadas.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que desde las primeras etapas de la formación del biofilm, la agregación bacteriana se convierte en un factor importante que conduce al aumento de la resistencia a los antibióticos. Asimismo, estos resultados destacan las prometedoras propiedades de las superficies SME que son capaces de inhibir la formación de biofilms estructurados y exacerbar la actividad antimicrobiana de antibióticos y biocidas. Este enfoque podría ayudar a mejorar la efectividad del tratamiento bactericida en entornos relacionados con la salud pública (paredes y camas de hospitales y lugares sanitarios, instrumentos quirúrgicos, sistemas de agua potable, etc.) e industriales (tuberías, filtros, tubos, válvulas, tanques de almacenamiento, plantas de desalinización, torres de enfriamiento, cascos de barcos, etc.). Asimismo desde el punto de vista fundamental se demostró el importante rol de los agregados 2D de *S. aureus* y *P. fluorescens* en el incremento de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

#### AGRADECIMENTOS

Los autores agradecen a la UNLP (proyectos I163 y X531), al CONICET, ANPCyT (PICT 2010-1779 y PPL 2011 0003).

#### REFERENCIAS

- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science* 284(5418): 1318-1322.
- Diaz, C., P. L. Schilardi, et al. (2007). "Nano/microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces." *Langmuir* 23(22): 11206-11210.
- Diaz, C., P. L. Schilardi, et al. (2009). "Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces." *ACS Appl Mater Interfaces* 1(1): 136-143.
- Diaz, C., R. C. Salvarezza, et al. (2010). "Organization of *Pseudomonas fluorescens* on chemically different nano/microstructured surfaces." *ACS Appl Mater Interfaces* 2(9): 2530-2539.
- Diaz, C., A. Miñán, et al. (2012). "Synergistic antimicrobial effect against early biofilm formation: micropatterned surface plus antibiotic treatment." *Int J Antimicrob Agents*, in press.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." *Emerg Infect Dis* 8(9): 881-890.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167-193.