

ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE AFM DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE BACTERIAS PSEUDOMONAS AUREGINOSA FORMANDO BIOFILMS

J. Otero¹, R. Baños², I. Meta¹, E. Llop¹, D. Muro¹, A. Juárez², M. Puig¹

¹*Dept. de Electrónica, Uni. de Barcelona, Martí i Franqués 1, Barcelona, España*

²*Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC), Josep Samitier 1-5, Barcelona, España*
jotero@el.ub.es

Resumen

Los agentes infecciosos son una de las principales causas de la mortalidad humana: 14.9 millones de muertes en 2002 comparada con los problemas cardiovasculares (16.9 millones de muertes) y el cáncer (7.1 millones de muertes) según el informe de la OMS (Organización Mundial de la Salud) del 2004. En determinadas ocasiones, las bacterias forman biofilms, que son comunidades de bacterias adheridas a superficies abióticas. Después de la adhesión, las bacterias producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que contribuyen al comportamiento mecánico y funcional de dichas bacterias. Dicho EPS se compone, mayoritariamente, de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, y en cierto modo forma una matriz protectora que hace que las bacterias sean mucho más resistentes a condiciones extremas (privación de nutrientes, presencia de antibióticos...). Así, si las bacterias forman biofilm en un dispositivo médico o un implante, se incrementa la dificultad de combatir la infección. El mecanismo que subyace a esta resistencia incrementada no es completamente conocido hasta la fecha. Las últimas hipótesis parecen indicar que la heterogeneidad de la matriz dificulta enormemente la penetración de antibióticos debido a la interacción con los exopolisacáridos [2]. Así pues, cuando un biofilm coloniza un implante, el único tratamiento efectivo es quitar el implante, tratar la infección fuera del paciente y reimplantar posteriormente [3]. Este procedimiento es altamente costoso e invasivo para el paciente, por lo que un mejor conocimiento del comportamiento de estos biofilms es de suma importancia para tratar las infecciones sin necesidad de realizar cirugía.

El cultivo escogido para el estudio es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, pues puede ser en ciertas condiciones un importante agente infeccioso, y en enfermos de fibrosis quística puede causar infecciones graves. Las bacterias se cultivan sobre sustrato de oro evaporado sobre mica, al ser un material que es a la vez de interés en biomedicina y que por el proceso de fabricación presenta la planaridad necesaria para realizar estudios de AFM (se descartan materiales de interés biomédico como el plástico o el vidrio por la dificultad de trabajar con ellos en el estudio así como materiales clásicos en AFM como la mica o el grafito por su bajo interés en implantología). Se comprueba por el método de tinción y mediante microscopía óptica (figura 1) que las bacterias han formado biofilm.

Se utiliza el microscopio de AFM Cervantes de Nanotec Electrónica y el software WSxM[4] para realizar imágenes del biofilm en ambiente de nitrógeno. Se utiliza un cantilever Olympus Biolever de $K=0.7\text{N/m}$ que permite obtener buenas imágenes en modo dinámico (modo utilizado para tratar de minimizar la interacción entre la punta y la muestra durante el proceso de adquisición de la imagen) a la vez que presenta suficiente resolución en fuerza como para realizar los estudios mecánicos. Una vez obtenida la imagen (Figura 2) se realizan diversas curvas de fuerza para comparar el comportamiento de la membrana de la bacteria y el de la unión entre bacterias (Figura 3).

Analizando las curvas de fuerza medias resultantes, vemos como el comportamiento mecánico de la unión extracelular es diferente al de la membrana, con lo que se puede concluir que está formado por un material de más bajo módulo elástico (como es de esperar en un material formado por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos en comparación con la bicapa lipídica que encontramos en la membrana) y un comportamiento viscoelástico mucho más acusado. Es su característica de material compuesto (bacterias+EPS), pues, la que propicia que el comportamiento de las bacterias formando biofilm sea muy diferente a cuando se encuentran aisladas.

Referencias:

- [1] F. Ahimou, M. Semmens, P. Novak, G. Haugstad., Appl. Environ. Microbiol. **73** (2007): 2897-2904
- [2] R. Donlan, ASAIO Jour. **46:6** (2000): S47-S52
- [3] J. Costerton, P. Stewart, Sci. Amer. **285** (2001): 74-81
- [4] I. Horcas et al., Rev. Sci. Instrum. **78** (2007), 013705

Figuras:

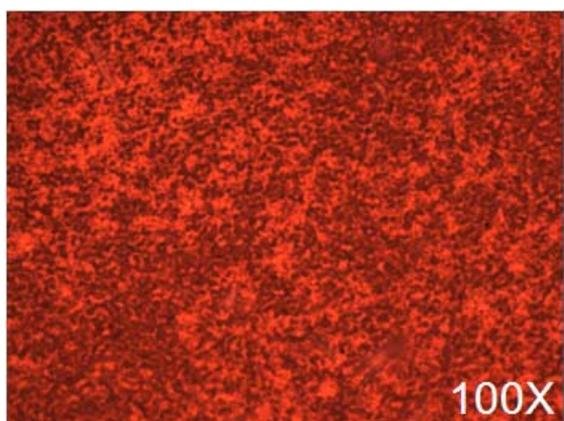


Figura 1: Biofilm visto con el microscopio óptico

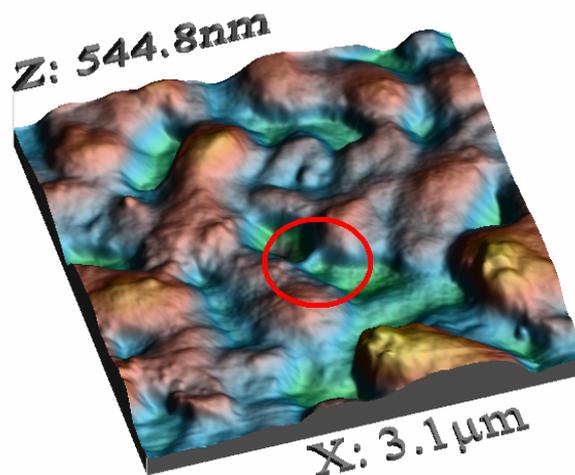


Figura 2: Imagen AFM del biofilm y selección del enlace

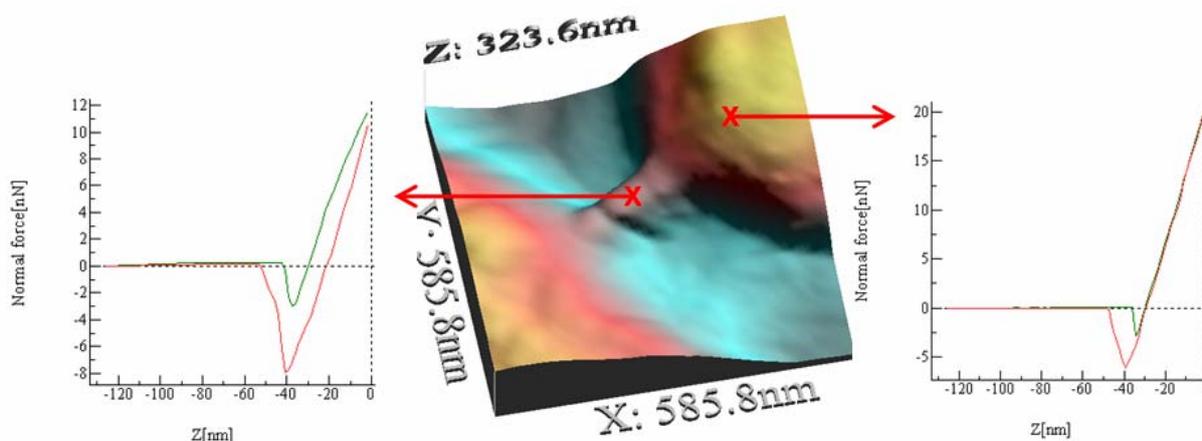


Figura 3: Curvas de fuerza (media de 50 experimentos) sobre el enlace y sobre la membrana seleccionados