

Efecto de las condiciones ambientales en la formación *in vitro* de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae*

J. Carlos Mendoza-Hernández*, M. Lilia Cedillo-Ramírez,
Andrés Muñoz-García y Francisco Silva-Andrade

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Edificio Complejo de Ciencias # 76, 3er piso/308, 14 Sur y Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, CP: 7257, Puebla, México

Enviado 19 Diciembre 2007, Revisado 24 Abril 2008, Aceptado 29 Abril 2008

Effects of environmental conditions on biofilm in vitro formation by Klebsiella pneumoniae

Abstract

The aim of this study was to determine the topographic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* biofilm, its kinetic and the effect of pH and temperature on biofilm formation. The biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* was observed in Luria Bertani broth in the lab-tek II plates, incubated at 35 °C during 4, 8, 12 or 24 h, for kinetic determinations; at 25°C and 44°C during 24 h for temperature variation; and at pH 6.4 and 7.4 during 24 h for pH variation. Biofilm was analyzed by means of atomic force microscope. Topographic analysis of the images of biofilm formation by means of atomic force microscopy showed the formation of a monolayer at 4 h, the segregation of extracellular polymeric substances at 8 h, and formation of mature biofilm, with the presence of water channels at 24 h. When comparing the volume, area and perimeter of the hills, as well as the water channels, a significant difference ($p < 0.05$) was found between 4 and 8 h mainly in the water channels areas. According to the pH and temperature parameters, the distribution was homogeneously observed at 25 and 44 °C and heterogeneously at 35 °C, while the biofilm at 6.4 and 7.4 pH parameters are totally heterogeneous; in both parameters, a different number of water channels was found, but no significant difference was observed.

Keywords: Atomic force microscope, water channels, hill, area of water channels, volume of water channels, perimeter of water channels.

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar las características topográficas de la cinética de formación de las biopelículas y la cinética de formación de las mismas por *Klebsiella pneumoniae* bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Para observar la formación de las biopelículas se utilizó caldo Luria-Bertani en las placas lab-Tek II, incubadas a 35°C durante 4, 8, 12 o 24 h para la cinética, a 25 y 44°C durante 24 h para las variaciones de temperatura, a pH 6.4 o 7.4 durante 24 h para la variación de pH. Posteriormente, se hizo el análisis de las biopelículas mediante el microscopio de fuerza atómica. El análisis topográfico de la formación de biopelículas muestra la formación de una monocapa a las 4 h, la segregación de una sustancia polimérica extracelular a las 8 h, y la formación de una biopelícula madura, con la presencia de canales de agua, a las 24 h. Cuando se comparó el volumen, área y perímetro de los valles y los canales de agua, se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre 4 y 8 h en las áreas de los canales de agua. Considerando los parámetros de pH y temperatura, se observó una distribución homogénea a los 25 °C y 44 °C, y heterogénea a 35 °C, mientras que a pH de 6.4 y 7.4 las biopelículas fueron totalmente heterogéneas. En ambos parámetros, se encontró un número diferente de canales de agua, pero sin que hubiera una diferencia significativa.

Palabras clave: Microscopio de fuerza atómica, canales de agua, alturas, área de canales de agua, volumen de canales de agua, perímetro de canales de agua.

* Autor para correspondencia:

E-mail: jcharlymh@yahoo.com Teléfono +52 222-2295500 ext. 7250

Introducción

Klebsiella pneumoniae es el agente causal más común de las infecciones nosocomiales del tracto respiratorio y el segundo de las infecciones del tracto urinario y bacteriemias causadas por bacterias Gram negativas. (Ki-SOO et al., 1997; Langstraat y Bohse, 2001). Las infecciones pulmonares debidas a *K. pneumoniae* frecuentemente se complican por abscesos pulmonares que involucran una elevada tasa de mortalidad (Caplenas et al., 1981; Tumbarello et al., 2006) El rápido progreso de infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* implica un tratamiento efectivo con antibióticos. Sin embargo, se ha incrementado la proporción de resistencia a los antibióticos normalmente usados en los servicios de cuidados intensivos. Así que nuevas alternativas en la profilaxis y tratamientos de las infecciones respiratorias son necesarias. (Gerding et al., 1979; Ki-SOO et al., 1997).

Muchas bacterias pueden atacar las superficies sólidas y formar biopelículas, las cuales son definidas como poblaciones microbianas en las que las bacterias se adhieren unas a otras encerradas en una matriz y a las superficies o interfases. La formación de biopelículas es un fenómeno común que algunos materiales presentan cuando entran en contacto con fluidos naturales, tales como la sangre, y son cubiertos rápidamente por bacterias. Lo anterior, tiene una gran importancia médica y económica, debido a que el entendimiento del proceso de colonización puede ayudar en el diseño de superficies capaces de prevenir la formación de biopelículas (Head y Yu, 2004; Kievit y Iglewski, 2000; Kristich et al., 2004; Lewis, 2001).

Las biopelículas representan una comunidad interdependiente y pueden estar conformadas por una sola especie o una comunidad derivada de múltiples especies, las cuales pueden adherirse sobre una gran variedad de superficies bióticas y abióticas (Kievit y Iglewski, 2000; Lewis, 2001). Los microorganismos también forman ensamblajes naturales en interfaces aire-agua y en suspensiones, tales como digestores anaerobios, en los cuales ellos preferentemente se agregan para formar flóculos o gránulos. Los estudios en biorreactores y cultivos enriquecidos han mostrado que las

biopelículas están involucradas en procesos de tratamiento de aguas residuales, de mantos acuíferos contaminados con productos de petróleo, y en procesos de nitrificación. Las biopelículas también se forman en ambientes extremos, tales como en drenajes, conteniendo ácidos minerales (pH 0), donde contribuyen al ciclo del azufre; además, pueden estar presentes en el desierto y en las capas de hielo de la Antártida. Las comunidades complejas, estructuradas en estos ambientes extremos, pueden realizar una variedad de procesos biológicos, tales como fotosíntesis, fijación de nitrógeno y fermentación. (Davey y O'Toole, 2000; Hentzer et al., 2002; Polonio et al., 2001; Sporing y Lewis, 2001).

Debido a la importancia de los microorganismos en el tratamiento secundario de aguas residuales, una gran cantidad de investigaciones y métodos se han mejorado para incrementar el entendimiento de la formación de biopelículas en los biodiscos de los procesos involucrados en la degradación de materiales orgánicos (Davey y O'Toole, 2000; Donlan et al., 2004).

En las biopelículas, el crecimiento celular sobre superficies sólidas es un estado fisiológico diferente del que presentan las células planctónicas. Estas características les brindan a las biopelículas una extremada resistencia al tratamiento con antibióticos y detergentes y una elevada tolerancia para prolongar los tratamientos en infecciones humanas. (Bagge et al., 2004; Chevalier et al., 2001; Gander et al., 2002; Jefferson et al., 2005; Sutherland, 2001).

Las bacterias presentan un cierto grado de protección y homeostasis cuando se encuentran dentro de las biopelículas y uno de los componentes principales del micronicho es la matriz extrapolimérica que la rodea. Esta matriz esta compuesta de una mezcla de componentes extracelulares, tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias. Los componentes más estudiados son los polisacáridos extracelulares. (Anderl et al., 2000; Wentland et al., 1996). Algunas especies bacterianas, tales como *Klebsiella aerogenes*, parecen estar limitadas en relación a los tipos de polímeros que pueden sintetizar; sin embargo, algunos miembros de la especie *Streptococcus pneumoniae* son capaces de

producirlos con diferentes componentes. (Davey y O'Toole, 2000; Donlan et al., 2004).

Las microcolonias que constituyen las biopelículas pueden estar compuestas por poblaciones de especies simples o comunidades bacterianas heterogéneas, dependiendo de los parámetros ambientales bajo los cuales fueron formadas. Numerosas condiciones, tales como la superficie y propiedades de la interfase, disponibilidad de nutrientes, la composición de la comunidad microbiana, e hidrodinámica, pueden afectar la estructura de las biopelículas. (Balaban et al., 2003; Gill et al., 2005; Lim et al., 2004; Stoodley et al., 2001).

Los espacios intersticiales o canales son una parte integral de la estructura de las biopelículas; éstos son, en esencia, la línea de vida de los sistemas que, proveen de un medio de circulación de nutrientes, así como también el intercambio de productos metabólicos con el fluido. (Davey y O'Toole, 2000)

La elevada permeabilidad de los canales de agua intercalados en las biopelículas de las áreas alrededor de las microcolonias se ha comparado a un sistema circulatorio primitivo. Los canales de agua proveen un medio efectivo de intercambio de nutrientes y metabolitos con la fase acuosa, amplifican la viabilidad de los nutrientes como también remueven los metabolitos tóxicos potenciales. En las biopelículas, las características metabólicas de las bacterias dentro de una comunidad son distintas de su contraparte planctónica. La arquitectura elaborada de las biopelículas provee la oportunidad para la cooperación metabólica, y los nichos están formados dentro de estos sistemas espacialmente bien organizados. Dentro de las biopelículas, las bacterias están expuestas a diferentes señales ambientales; las células que se encuentran en el centro de las biopelículas se exponen a más bajas tensiones de oxígeno, comparándolas con las de la periferia. (Henderson y Nataro, 2001; Miller y Bassler, 2001; Mok et al., 2003; Neu et al., 2001).

El objetivo del presente estudio fue determinar las características topográficas de la cinética de formación de las biopelículas y la cinética de formación de las mismas por *K. pneumoniae* bajo diferentes condiciones de pH y temperatura.

Material y métodos

Cinética de crecimiento, variaciones de pH y de temperatura. La bacteria *K. pneumoniae* (ATCC10031) se hizo crecer en caldo Luria Bertani, durante 12 h. Del crecimiento de 12 h, se realizó una dilución en buffer de fosfatos salinos (PBS) a pH 7.4, midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro para obtener una absorbancia de 0.2, a una longitud de onda de 600 nm, equivalente aproximadamente a 1×10^6 células/ml. Se colocaron 25 μ l de esta suspensión celular en cada uno de los pozos de las placas lab-tek II, con 450 μ l de medio Luria Bertani. Para realizar la cinética de crecimiento, se incubó a 35°C durante 4, 8, 12 o 24h.

En los diferentes valores de pH, el medio Luria Bertani, se ajustó con HCl o NaOH 1N. Se incubó a 35°C durante 24 h. Considerando las variaciones de temperatura, se incubaron a 25 y 44°C durante 24 h. La prueba se realizó por cuadruplicado para cada uno de los tratamientos. Después de este procedimiento, se retiró el medio de cultivo, y cada pozo se lavó 3 veces con PBS a pH 7.4. Para la fijación de las biopelículas a cada pozo, se agregó una solución de PBS a pH 7.4 formaldehído 4%, glutaraldehído 4% v/v y se dejó 12 h a 4°C. Posteriormente, se retiró la solución para su observación al microscopio.

Controles positivos y negativos de formación de biopelícula. Control positivo: Se utilizó la cepa *Escherichia coli* EAEC O142. Control negativo: Se utilizó la cepa *E. coli* EPEC E2348/69 O127:H6. Para la formación de biopelículas de cada uno de los controles se siguió el mismo procedimiento que para la cepa de *K. pneumoniae* en estudio.

Observaciones al microscopio óptico y de fuerza atómica. Para cada una de las condiciones de las biopelículas, se retiró el medio de fijación y se dejó secar a temperatura ambiente hasta su análisis al microscopio. A las placas se les retiraron las divisiones y se procedió a realizar las observaciones en el microscopio óptico (marca Zeiss modelo Stemi 2000-C), sacando fotos de las mismas e identificando los campos para su posterior observación en el microscopio de fuerza atómica (AFM, Quesant Modelo Q250). Para realizar la microscopia de fuerza atómica se colocó

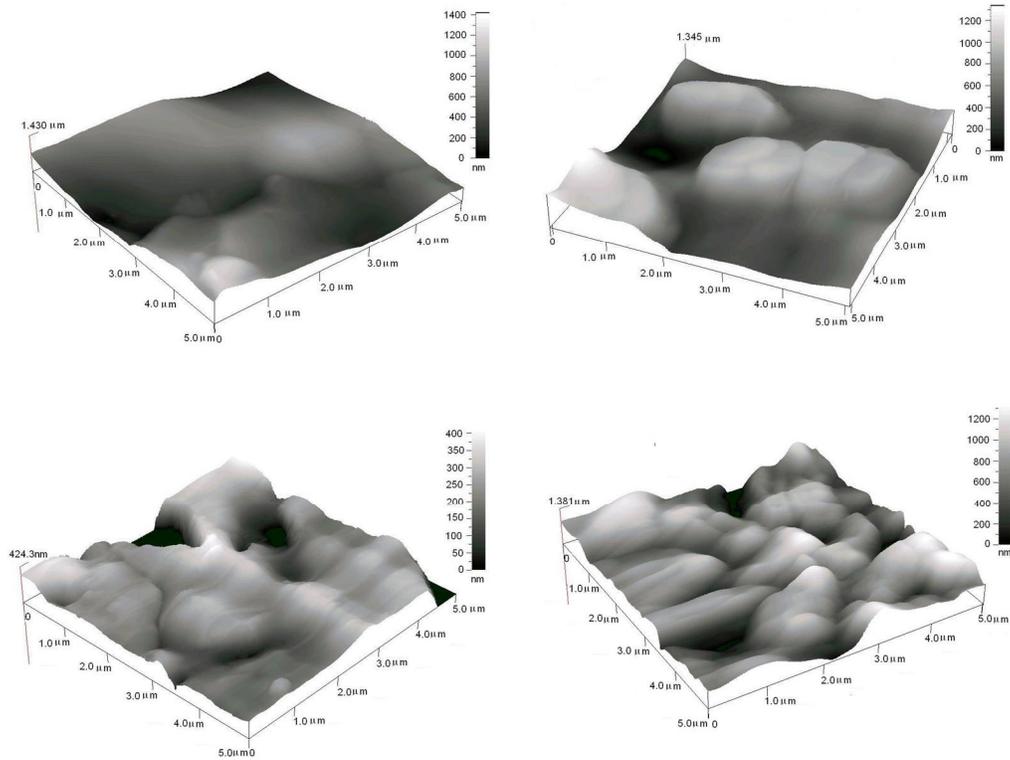


Figura 1. Microscopía de fuerza atómica de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* a 35 °C y pH 7.4. a) a 4 h de crecimiento, b) a 8 h de crecimiento, c) a 12 h de crecimiento y d) a 24 h de crecimiento.

el cantiléver en la posición identificada anteriormente y se procedió al barrido de esa zona. En caso de no observarse claramente, se procedió a revisar otra zona, hasta obtener una imagen clara. De las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica, se procedió al procesamiento de las mismas con el software del microscopio, eliminando el ruido, sacando las estadísticas correspondientes y obteniendo la imagen en tercera dimensión. Las estadísticas de área, superficie y volumen se procesaron mediante el programa de software wxsm 4.0 producido por nanotec electrónica.

Resultados

Al analizar las imágenes topográficas de la cinética de crecimiento a las 4, 8, 12 y 24 h (Fig. 1), obtenidas mediante AFM, se observó que a las 4 h

empieza la formación de una monocapa, hay una presencia de espacios vacíos donde no hay adherencia bacteriana y la altura máxima es de 1.449 μm ; a las 8 h sigue siendo una monocapa, hay una altura mayor, siendo de 1.517 μm ; además, se ve que hay uniones entre las colonias lo que indicaría una comunicación entre las mismas. A las 12 h, las bacterias parecen estar embebidas dentro de un material segregado por las bacterias, se presenta un cambio en las alturas, donde la máxima está establecida en los 533.7 nm, con la presencia de canales, en donde empieza la formación de la biopelícula. Mientras tanto, a las 24 h de crecimiento, se observa la presencia de más de una capa, de una mayor cantidad de canales de agua y la integración celular con un ordenamiento diferente al del inicio de la cinética, sugiriendo la formación de una biopelícula. La Figura 2 muestra las diferencias en las medidas estadísticas de la cinética de formación

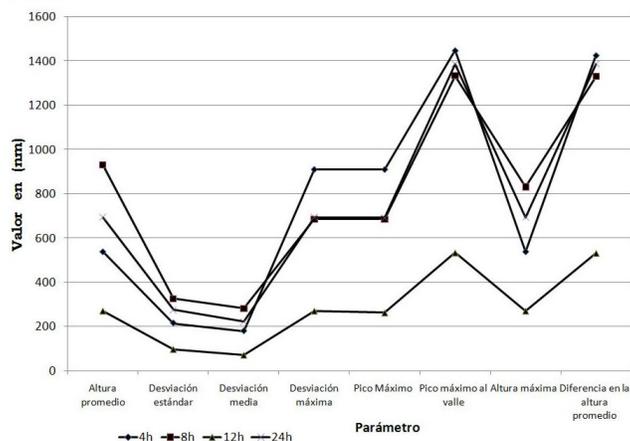


Figura 2. Comparación estadística de la cinética de formación de biopelículas.

Tabla 1. Análisis estadístico de los canales de agua correspondientes a la cinética de formación de las biopelículas.

4 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 7.6 nm		
Áreas de los canales (μm)	Volumen de los canales (nm)	Perímetro de los canales (μm)
0.1916	119570.8946	1.8766
0.6493	45.1712.2687	2.2078
1.05391	797139.2977	2.4285
	1315279.84115	3.6428
* 8 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 10.642 nm		
Áreas de los canales (μm)	Volumen de los canales (nm)	Perímetro de los canales (μm)
3.9806	0.0181	6.3823
5.5504	0.0189	
* 12 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 22.541 nm		
Áreas de los canales (μm)	Volumen de los canales (nm)	Perímetro de los canales (μm)
0	0	0
0.0865	0.0002	0.1465
0.3026	0.0041	0.2930
1.2105	0.0153	0.4396
3.1128	0.0195	1.1722
	0.0215	1.4653
		3.8097
		10.8429
24 h Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 15.6 nm		
Áreas de los canales (μm)	Volumen de los canales (nm)	Perímetro de los canales (μm)
0	0	0
0.3955	0.0015	3.3443
1.4237	0.0103	4.5984
7.8302		41.3857

* Diferencia significativa ($p < 0.05$).

biopelículas correspondientes a la altura promedio, la desviación media, máxima y estándar, pico máximo (altura máxima), pico máximo al valle (suma total de los picos máximos), valle máximo y diferencias de la altura promedio. Los valores de la altura promedio, altura máxima, desviación estándar y desviación media en forma decreciente correspondieron a las 8 h, 24 h, 4 h, y 12 h, respectivamente; mientras que para la desviación máxima, pico máximo, pico máximo al valle y diferencia de las alturas promedio, los máximos valores fueron obtenidos a las 4 h, seguidos de las 24 y 8 h, respectivamente.

La Tabla 1 muestra la comparación estadística de las áreas, perímetros y volúmenes de los diferentes canales de agua formados durante la cinética de crecimiento. El área de los canales de agua muestra un incremento de las 4 a las 8 h; posteriormente, un decremento a las 12 h y finalmente, se vuelve a

incrementar a las 24 h. El volumen incrementa de acuerdo al tiempo, pero con un decremento a las 24 h. Los perímetros también se incrementan de acuerdo al tiempo, pero hay un considerable incremento de cuatro veces registrado entre las 12 y 24 h.

En la cinética de formación de las biopelículas, solamente se observó una diferencia significativa (kruskal-wallis) $p < 0.05$ entre las áreas de los canales de agua correspondiente al intervalo entre las 8 y 12 h.

Al realizar la comparación estadística de las áreas, perímetros y volúmenes de las alturas se encontró un incremento en el área entre las 4 y 8 h. Los volúmenes muestran un decremento de las 4-8 h; posteriormente, un incremento a las 12 h y finalmente, un decremento a las 24h. Los perímetros muestran un incremento de las 4 h a las 8 h, luego un decremento a las 12 h y otro mas a las

Tabla 2. Análisis estadístico de las alturas correspondientes a la cinética de formación de las biopelículas.

4 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 7.6 nm		
Área de Alturas de la biopelícula (μm)	Área de Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de perímetros de la biopelícula (μm)
4.2770	0.0166	
11.1426	0.0401	
8 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 10.642 nm		
Área de Alturas de la biopelícula (μm)	Área de Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0
15.4635		18.9741
12 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 22.541 nm		
Área de Alturas de la biopelícula (μm)	Área de Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0
0.1552	0.0009	1.3995
0.3105	0.0921	1.6794
		1.9593
24 h Condiciones: Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura Máxima 15.6 nm		
Área de Alturas de la biopelícula (μm)	Área de Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0
0.3558	0.0018	0.2908
0.4447	0.0136	0.5816
2.4906	0.0207	0.8724
2.8464		1.1632
		2.0356
		28.7896

24 h (Tabla 2).

Formación de biopelículas bajo diferentes temperaturas de crecimiento. En la formación de las biopelículas, la temperatura influyó en la orientación de la adherencia celular (Fig. 1d, Fig. 3). A los 25°C, las bacterias muestran una orientación paralela y una altura máxima de 736.6nm; a los 35°C, las bacterias tienen un ordenamiento irregular sin ningún patrón específico y con una altura máxima de 1.387 nm; a los 44°C, el patrón de adherencia bacteriana es paralelo y perpendicular y presentó una altura máxima de 586.7 nm.

La Figura 4 muestra las diferencias estadísticas de la altura promedio, la desviación media, máxima y estándar, pico máximo, pico máximo al valle, valle máximo, diferencias de la altura promedio con los diferentes parámetros de temperatura (25, 35 y 44 °C) para la formación de las biopelículas. En todos los parámetros, los valores más altos corresponden a los obtenidos a 35 °C, seguidos de los de 25 °C y, finalmente, los valores más bajos se presentaron a los 44 °C.

El mayor número de canales de agua fue producido a 44 °C y el más bajo a 35 °C. Las áreas más grandes de los canales de agua fueron producidas a

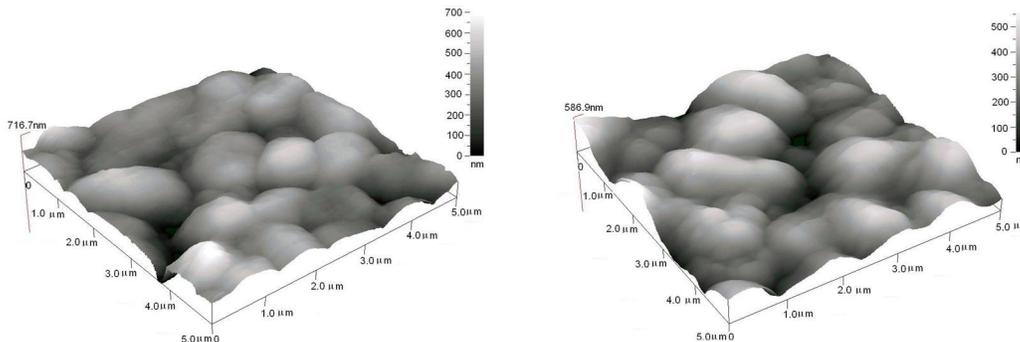


Figura 3. Microscopía de fuerza atómica de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* a las 24 horas de crecimiento y bajo pH de 7.4. Izquierda: a 25° C; derecha: a 44° C.

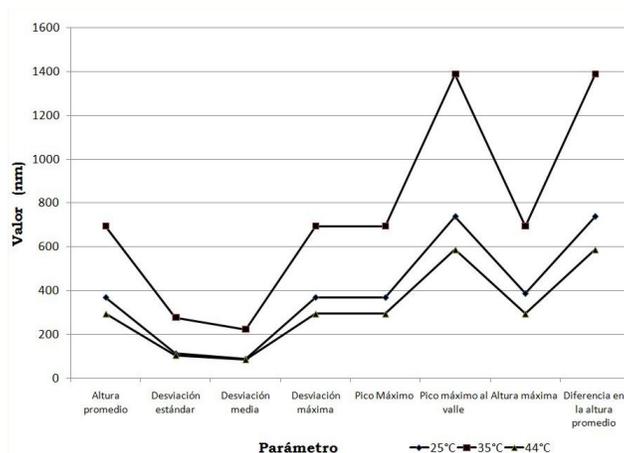


Figura 4. Comparación estadística de la formación de biopelículas con los diferentes parámetros de temperatura.

Tabla 3. Análisis estadístico de los canales de agua de las biopelículas con diferentes parámetros de temperatura.

25 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 9.1509 nm		
Áreas de los diferentes canales de agua (μm)	Volumen de los diferentes canales de agua (μm)	Perímetro de los diferentes canales de agua (μm)
0	0	0
0.068642	0.000470	0.633667
0.274566	0.000941	0.950500
0.343208	0.001881	1.267333
0.960982	0.015518	2.851500
		5.703000
		31.366503
35 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura Máxima 15.6 nm		
Áreas de los diferentes canales de agua (μm)	Volumen de los diferentes canales de agua (μm)	Perímetro de los diferentes canales de agua (μm)
0	0	0
0.395464	0.001468	3.344296
1.423671	0.010274	4.598407
7.830193		41.385664
44 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 31.631 nm		
Áreas de los diferentes canales de agua (μm)	Volumen de los diferentes canales de agua (μm)	Perímetro de los diferentes canales de agua (μm)
0	0	0
0.062393	0.000684	0.134333
0.093589	0.001026	0.671664
0.155981	0.001368	0.805997
0.280766	0.003079	1.477661
0.499140	0.010946	2.283658
0.592729		2.552324
1.528617		3.761319
2.152542		3.895652
		5.104647
		5.373313
		13.298949

los 35 °C, y las más pequeñas a 25 °C, mientras que los volúmenes no presentan variaciones con respecto a la temperatura y los perímetros a los 35°C fueron tres veces mayor con respecto a los 44 °C y ligeramente más altos que a los 25°C (Tabla 3).

Las variaciones del área, volumen y perímetro de las alturas de la biopelícula, mostraron que el área y el perímetro se incrementan conforme aumenta la temperatura, mientras que el volumen disminuye (Tabla 4).

Formación de biopelículas bajo diferentes pH. El análisis de las biopelículas formadas con pH 6.4 y 7.4 mediante AFM (Fig. 1d y 5) muestran una

biopelícula heterogénea sin ningún orden específico. A pH 6.4, se formaron una mayor cantidad de canales de agua con una altura máxima de la biopelícula de 785.5nm, mientras que los canales producidos a pH 7.4 muestran un perímetro mayor y la altura máxima de la biopelícula fue de 1.384 nm.

Las diferencias estadísticas de la altura promedio, la desviación media, máxima y estándar, pico máximo, pico máximo al valle, valle máximo y diferencias de la altura promedio, con los diferentes parámetros de pH (6.4 y 7.4), fueron mayores a pH 7.4 (Fig. 6).

Tabla 4. Análisis estadístico de las alturas de las biopelículas con diferentes parámetros de temperatura.

25 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 9.1509 nm		
Área de las diferentes Alturas de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0
0.113128	0.000234	0.635810
0.226255	0.004914	1.271619
1.470659	0.014040	1.907429
	0.023166	4.450667
		6.781968
		20.981714
35 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 15.6 nm		
Área de las diferentes Alturas de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0
0.355800	0.001773	0.290804
0.444750	0.013591	0.581608
2.490598	0.020682	0.872412
2.846398		1.163216
		2.035628
		28.789594
44 °C Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 31.631 nm		
Área de las diferentes Alturas de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes perímetros de la biopelícula (μm)
0	0	0.303559
0.163804	0.002131	0.910676
0.327609	0.008525	1.214234
16.216628		2.124910
		3.035585
		30.052292

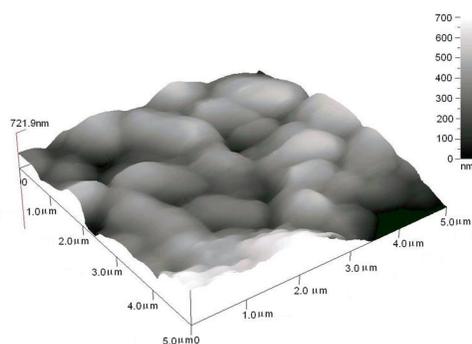


Figura 5. Microscopía de fuerza atómica de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* a las 24 horas de crecimiento y pH 6.4.

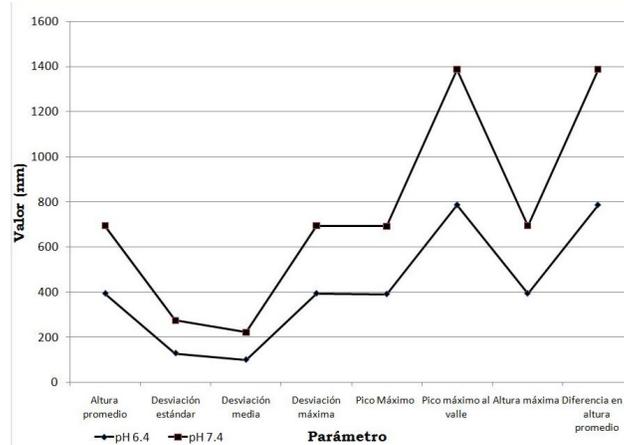


Figura 6. Comparación estadística de la formación de biopelículas bajo diferentes pH.

Tabla 5. Análisis estadístico de los canales de agua de las biopelículas con diferentes pH.

pH 6.4 Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 34.003 nm		
Áreas de los diferentes canales de agua (μm)	Volumen de los diferentes canales de agua (μm)	Perímetro de los diferentes canales de agua (μm)
0	0	0.107938
0.061319	0.001319	0.215877
0.204398	0.002638	0.323815
0.265717	0.003429	1.187321
0.490554	0.010287	1.295259
1.635181	0.015563	1.727012
1.716940	0.026113	3.669901
		5.288975
		7.015987
pH 7.4 Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 15.6 nm		
Áreas de los diferentes canales de agua (μm)	Volumen de los diferentes canales de agua (μm)	Perímetro de los diferentes canales de agua (μm)
0	0	0
0.395464	0.001468	3.344296
1.423671	0.010274	4.598407
7.830193		41.385664

El área y perímetro de los canales de agua de las biopelículas se incrementan cuando aumenta el pH, siendo el perímetro hasta cinco veces mayor a el pH 7.4 con respecto al de 6.4, mientras que el volumen decrece cuando se incrementa el pH (Tabla 5).

El área de las alturas de las biopelículas se incrementa con el pH, mientras que el perímetro y el volumen presentan un decremento conforme aumenta el pH (Tabla 6).

Controles. Debido a que no todas las bacterias forman biopelículas, se usó un control positivo

Tabla 6. Análisis estadístico de las alturas de las biopelículas con diferentes pH.

pH 6.4 Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 34.003 nm		
Área de las diferentes Alturas de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes perímetros de la biopelícula (μm)
0 20.048826	0	0 0.651196
pH 7.4 Condiciones : Tamaño mínimo 0.0003 μm^2 ; Altura máxima 15.6 nm		
Área de las diferentes Alturas de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes Volúmenes de la biopelícula (μm)	Área de los diferentes perímetros de la biopelícula (μm)
0 0.355800 0.444750 2.490598 2.846398	0 0.001773 0.013591 0.020682	0 0.290804 0.581608 0.872412 1.163216 2.035628 28.789594 1.302392

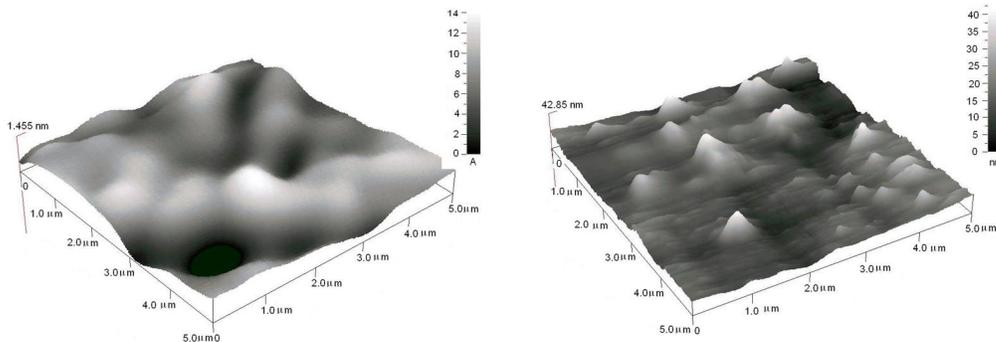


Figura 7. Microscopía de fuerza atómica de la biopelícula de *Escherichia coli* a las 24 horas de crecimiento, 35 °C y pH 7.4 Izquierda: EAEC O142 (control positivo); derecha: EPEC E2348/69 O127:H6 (Control negativo).

(Fig. 7 izquierda) que se conoce forma biopelículas y un control negativo (Fig. 7 derecha) que no forma biopelículas bajo ninguna circunstancia, lo cual nos permite garantizar que *K. pneumoniae*, usada para este estudio, forma biopelículas bajo las condiciones establecidas.

Discusión

Durante años recientes, se ha incrementado el uso de la AFM en las ciencias biológicas. Teóricamente, éstas combinan los aspectos más importantes de estudio de la relación estructural-

función de especímenes biológicos (Vadillo-Rodríguez et al., 2004). La AFM puede ser usada para definir el contorno de la superficie bacteriana (Philippsen et al., 2002) y las fuerzas de interacción entre las bacterias y la superficie de un sustrato, incluyendo la contribución de los polisacáridos de las bacterias para las interacciones entre superficie-bacteria (Vadillo-Rodríguez et al., 2004). Mediante la AFM, en este trabajo se pretende entender la arquitectura de las biopelículas realizando un análisis cualitativo y cuantitativo, que es importante para evaluar las influencias ambientales sobre el desarrollo de las biopelículas y para interpretar los

procesos de las biopelículas que son influenciados por la estructura de las mismas. Debido a lo anterior, la cuantificación de la heterogeneidad en la estructura de las biopelículas es requerida en el contexto de su importancia en la dinámica de formación de las biopelículas, la medida del grosor, la rugosidad, la cobertura del sustrato y el promedio del volumen unido a la superficie bajo diferentes condiciones ambientales.

En los resultados de la cinética de formación de las biopelículas obtenidos en este estudio, se observan tres fases definidas: la primera es el proceso de adhesión que se lleva a cabo en un lapso de tiempo entre 4 y 8 h, formándose las microcolonias que son la unidad estructural básica, presentando tamaños altamente variables como en *Sphingomonas sp.* que varía de células simples esenciales a colonias hasta de $1.3 \mu\text{m}^2$, coinciden con lo expresado por Davey y O'Toole, (2000) y por Venugopalan et al., (2005). Después de estos eventos iniciales, se observó en nuestro estudio una segunda fase, de las 8 a las 12 h, donde se generan cambios conformacionales en la superficie, la producción de sustancias poliméricas extracelulares que se encuentran en configuraciones ordenadas y que se pueden visualizar en las imágenes topográficas como filamentos en la superficie de la bacteria y formando una red compleja alrededor de la célula; estas sustancias no son requeridas durante la adherencia, fase inicial del desarrollo de las biopelículas, pero son parte fundamental de la arquitectura. Resultados similares han sido obtenidos por Jones et. al., (2003). Finalmente, la formación de una biopelícula a las 24 h, con canales de agua que muestran un mayor perímetro y una alta desviación estándar de los datos estadísticos a las 24 h, indican probablemente una mayor heterogeneidad de la biopelícula y una variabilidad espacial inherente con respecto a su estructura, dichos canales le ayudan a las bacterias a tener una mayor resistencia a las diferentes condiciones adversas a las que son sometidas. En el análisis del volumen, perímetro y área de los canales de las biopelículas se destaca el aumento del perímetro de cuatro veces de las 12 a las 24 h, mientras que en las áreas de los canales de agua de las biopelículas se encontró una diferencia significativa entre las 8 y 12 h, los cuales son

importantes para el transporte de nutrientes y que pueden amplificar la cinética de transferencia de masa a través del transporte convencional. Los canales de agua también ayudan a la penetración de los biocidas hacia el interior de las biopelículas, y a establecer la cinética de muerte de las bacterias dentro de las biopelículas. Además, el significado de los canales de agua, en la heterogeneidad del mantenimiento químico (pH, redox), juega un papel importante en la corrosión inducida por las biopelículas, resultados que coinciden con lo expresado por Venugopalan et al., (2005).

Al comparar las imágenes de AFM a las temperaturas 25, 35 y 44 °C (Fig. 1d, 3a y 3b) se observa que hay diferencias estructurales en la formación de las biopelículas bajo estas condiciones ambientales. El ordenamiento a los 25 y 44 °C es paralelo y homogéneo, mientras que hay mayor heterogeneidad a los 35 °C, con una desviación estándar del doble con respecto a los otros dos parámetros; los canales de agua presentan el mayor perímetro y área, estableciéndose que posiblemente la mejor temperatura para la formación de las biopelículas sea la de 35 °C.

A 44 °C, la biopelícula se ve más afectada, a esta temperatura el perímetro de los canales de agua es menos de la mitad comparado con los otros dos parámetros de temperatura, estas diferencias estructurales de la formación de la biopelícula establecen que, probablemente, son únicas, dependiendo del ambiente en el cual se desarrolla, viéndose afectada por las diferencias de temperatura, químicas y nutricionales. Las biopelículas se caracterizan por ser estructuras heterogéneas, penetradas por agua, con elevada densidad, favoreciendo a las bacterias para resistir las diferentes condiciones ambientales, resultados similares a esto fueron reportados por Sutherland, (2001).

La biopelícula a un pH de 6.4 es más homogénea, la desviación estándar es de la mitad, y el área y perímetro de los canales de agua son de aproximadamente una sexta parte con respecto de los valores obtenidos a pH 7.4.

Nuestro estudio sugiere que los diferentes parámetros ambientales, como la temperatura y el pH, afectan la formación de las biopelículas, dando por resultado una arquitectura compleja de las

biopelículas. Estos efectos surgen durante la fase de formación de la biopelícula, la cual se ve favorecida por el incremento de canales de agua, así como por las variaciones de los perímetros y volúmenes de las mismas. Se observan variaciones en la interacción con el sustrato afectando la adherencia al mismo. Hubo diferencias en la heterogeneidad de las biopelículas y existe un retardo en el crecimiento modificando la formación de la biopelícula, por lo que estos factores, aunque modifican las características estructurales de las biopelículas, no impiden la formación de las mismas, las cuales resisten diversos factores ambientales. Se sugiere realizar estudios a futuro usando una combinación del flujo celular, microscopía confocal, microscopía de fuerza atómica, análisis de imagen digital, con diferentes regímenes de flujo, para comprender la complejidad y el desarrollo estructural en las biopelículas bajo las diferentes condiciones ambientales.

Conclusiones

La heterogeneidad, que es una característica importante de las bacterias en las biopelículas, es mayor en las condiciones de 35°C y pH 7.4, siendo éstas las mejores condiciones para su formación. El análisis de la cinética de formación de las biopelículas, mediante AFM, establece que existe una diferencia significativa entre las áreas de los canales entre las 8 y 12 h ($p < 0.05$). La distribución de las bacterias en las biopelículas es heterogénea, tanto en la cinética de formación de las mismas, como en las diferentes condiciones ambientales exploradas. Los valores de temperatura de 44 °C y pH 7.4 afectan las biopelículas disminuyendo la cantidad de superficie cubierta por las bacterias, resistiendo de esta manera a los diferentes factores ambientales a las que se someten las bacterias. No se encontró diferencia significativa entre los valores de áreas, perímetro y volumen de los canales y altura de las biopelículas al probar diferentes condiciones de temperatura y pH, lo cual indica que la formación de las biopelículas sólo es afectada parcialmente por las diferentes condiciones ambientales.

Bibliografía

- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1818-1824.
- Bagge, N., Morten, H., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., Hoiby, N., 2004. Dynamics and spatial distribution of β -Lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1168-1174.
- Balaban, N., Giacometti, A., Cirioni, O., Yel, G., Ghiselli, R., Mucchegiani, F., Viticchi, C., Del Prete, M.S., Saba, V., Scalise, G., Dell'Acqua, G., 2003. Use of quorum sensing inhibitor RNAIII-Inhibiting peptide to prevent biofilms formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 187: 625-630.
- Caplenas, N.R., Kanarek, M.S., Dufour, A.P., 1981. Source and extent of *Klebsiella pneumoniae* in the paper industry. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 779-785.
- Chevalier, J., Atifi, S., Eyraud, A., Mahamoud, A., Barbe, J., Pages, J.M., 2001. New pyridoquinoline efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* Strains. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 4023-4026.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867.
- Donlan, R.M., Priede, J.A., Heyes, C.D., Sanil, L., Murgan, R., Edmonds, P., El-Sayed, I., El-Sayed, M.A., 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4980-4988.
- Gander, S., Hayward, K., Finch, R., 2002. An investigation of the antimicrobial effects of linezolid on bacterial biofilms utilizing an in vitro pharmacokinetic Model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 301-308.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., DeBody, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Oin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E., Fraser C.M., 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, 187: 2426-2438.
- Gerding, D.N., Buxton, A.E., Hughes, R.A., Cleary, D.P., Arbaczawski, J., Stamm, W.E., 1979. Nosocomial multiply resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology of an outbreak of apparent index case origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15: 608-615.
- Henderson, I.R., y Nataro, J.P., 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*, 69: 1231-1243.
- Head, N.E., Yu, H., 2004. Cross-Sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome Diversity.

- Infection and Immunity, 72:133-144.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148: 87-102.
- Jefferson, K.K., Goldmann, D.A., Pier, G.B., 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2467-2473.
- Jones, J.F., Feick, J.D., Daniel, I., Nkiru, C., Vigeant, M., Velegol, D., 2003. Oriented adhesion of *Escherichia coli* to polystyrene particles. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6515-6519.
- Kievit, T.R., Iglewski, B.H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68: 4839-4849.
- Ki-SOO, K., Daroviche, R.O., Hull, R.A., Mansouri, M.D., Musher, D.M., 1997. Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2370-2374.
- Kristich, C.J., Yung-Hua, L., Cvitkoviitch, D.G., Dunny, G.M., 2004. Esp-Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 186: 154-163.
- Langstraat, J., Bohse, M., Clegg, S., 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infection and Immunity*, 69: 5805-5812.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 999-1007.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T., Lee, C.Y., 2004. Control of Glucose-and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186: 722-729.
- Miller, M.B., y Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199.
- Mok, K.C., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., 2003. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 22: 870-881
- Neu, T.R., Swerhone, D.W., Lawrence, J., 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology*, 147: 299-313.
- Philippson, A., Wonpil, I., Andreas, E., Tilman, S., Benoit, R., Müller D.J., 2002. Imaging the electrostatic potential of transmembrane channels: atomic probe microscopy of OmpF porin. *Biophysical Journal*, 82: 1667-1676.
- Polonio, R.E., Mermel, L.A., Paquette, G.E., Sperry, J.F., 2001. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 3262-3266.
- Spoering, A.L., Lewis, K., 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183: 6746-6751.
- Stoodley, P.S., Wilson, R.C., Piscitelli, C., Rupp, C.J., 2001. Detachment and other dynamic processes in bacterial biofilms. *Surfaces in Biomaterials Foundation*. 189-191.
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3-9.
- Tumbarello, M., Spanu, T., Sanguinetti, M., Citton, R., Montour, E., Leone, F., Fadad, G., Cauda, R., 2006. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-β-Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology and clinical outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 498-504.
- Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., Willem, N., Joop, V., Dijkstra, R.J., Stokroos, I., Van der Mei, H.C., 2004. Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5441-5446.
- Venugopalan, V.P., Kuehn, M., Hausner, M., Springael, D., Wilderer, P.A., y Wuertz, S., 2005. Architecture of a nascent *Sphingomonas* sp. biofilm under varied hydrodynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2677-2686
- Wentland, E. J., Stewart, P.S., Huang, C.T., McFeters, G.A., 1996. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnology Progress* 12: 316-321.