



***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS***

***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS***

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

***Inactivación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mediante plasma frío  
a presión atmosférica***

---

***Tesista: Juliana Soler Arango***

***Directora: Prof. Dra. Graciela Brelles Mariño***

***Año: 2018***



El presente trabajo de tesis, para optar al grado Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas  
área Ciencias Biológicas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en  
Fermentaciones Industriales (CINDEFI – CONICET – CCT La Plata), Facultad de Ciencias  
Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Graciela  
Brelles Mariño



## *Agradecimientos*

A la **Universidad Nacional de Colombia**, por mi formación académica y personal.

A la **Universidad Nacional de La Plata** y a la **Facultad de Ciencias Exactas**, por mi formación de posgrado.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)** y a todos sus integrantes, por haberme abierto sus puertas y permitirme llevar a cabo este trabajo de tesis.

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**, por haberme otorgado la beca que me permitió dedicarme a este trabajo de tesis.

A la **Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP)**, por la beca de traslado para realizar mi pasantía y a la **Universidad de Córdoba**, España, por recibirme.

A la profe **Graciela**, por recibirme y darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis. Por enseñarme y guiarme. Por la confianza, el apoyo y la dedicación. Por la paciencia! Gracias por los momentos compartidos como grupo y equipo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A la **Dra María Gracia**, por recibirme en su laboratorio en España. Por su gran dedicación y esfuerzo para que las cosas nos salieran bien en tan poco tiempo. Por enseñarme con tanta paciencia.

A todas los Investigadores del CINDEFI que me ayudaron de alguna manera para que esta tesis fuera posible. A todos los laboratorios que siempre me abrieron sus puertas para asesorarme o prestarme algo, siempre con la mejor disposición. En especial a **Ceci Figoli**, por ayudarme tanto en el último tramo de mi trabajo y a **German** por ayudar a Giuli.

A mis compañeros de cátedra, por siempre estar ahí para alentarme. A **Aleja, Caro, Ceci, Gaby, Claudio, Yani y Tere!** Gracias por ser grandes compañero y maestros

A mis compañeros y amigos del CINDEFI. **Dani, Ine, Tere, Juan M, Juan P, Hugo, Bruno, Cande, Tuche, Gaby** y especialmente **Leo** que se ha convertido en un gran apoyo, amigo y compañero... Gracias por las risas, los mates, las salidas, las cervezas, las locuras, las comidas, por los intentos de formar una “banda” con las chicas y sobre todo gracias por el aguante... gracias por ese lindo grupo de amigos que creamos.

A **Catisita, las Cecis, Mari Sol, Marina, Julito, Vivi**, los chicos del taller... Gracias por toda la buena energía que siempre me dan! Por las charlas de pasillo y los mates compartidos

A mi **Familia L4**.... No me alcanzan las palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí! Gracias por hacerme sentir parte de esta gran familia! Gracias por que nunca me sentí sola! Gracias por tanto amor que me han dado! Son tantos momentos compartidos... Gracias por hacer del CINDEFI más que un lugar de trabajo!!

A **Yuyu**, mi hermana y amiga, gracias infinitas por tanto, no puedo decirte lo mucho que te quiero! Gracias por vivir conmigo el día a día y por acompañarme siempre en todas! Gracias por tu gran ternura, por tus infinitos detalles, tus innumerables sonrisas! Por compartir tus locuras y por celebrar las mías! Por hacerme reír sin sentido! Por escucharme y apoyarme! Aconsejarme!. Que construyamos puentes y nos encontremos en cualquier parte del mundo! Que andemos mil senderos más, subamos muchas colinas y compartamos vistas increíbles! Gracias por todas las experiencias que hemos compartido! Gracias por incluirme en tu vida y hacerme parte de tu familia! Gracias a tu papá y a Nuri por hacerme una más! Los quiero y adoro! Los llevo en mi corazón.

Gracias **Sol y Pame** por tantos momentos que me regalaron, por ser mis amigas, apoyarme, ayudarme y escucharme siempre. Por las chismoseadas, merendiadas, comidas, juntadas, más dulces y más tortas... que nunca se acabe “Gordolfo”... por seguir “triunfando” al

pasar el puente... por más locuras. Gracias **Emma** y **Fran** por hacerme parte de su locura! Por regalarnos tantas risas dentro y fuera del lab... que nunca se terminen las juntadas y las locuras!. Gracias **Santi** y **Mai** por tantos momentos y por toda la buena energía y buena onda y a **Gaby** (mi infiltrada favorita!!!... chamiga)... Gracias a todos por las risas y más risas! Que sean más frijoleadas, arepiadas, pizzadas, Rialtiadas, locuriadas!!! Los adoro mis parceritos del alma!!

Gracias **Galleguin** por ser nuestro papá, por aguantarnos, por tu paciencia, por enseñarnos y alegrarnos los días. Gracias **Mari** por escucharnos siempre, por tus consejos, tus risas y por llenar nuestro laboratorio de “glamour”. Gracias **Fla** por transmitirme siempre buenas energías, por tus locuras adorables, por estar siempre ahí para nosotros y por tu amistad.

A mis amigos de Colombia que siempre extraño! mis amigos del colegio, de la U, las bananas y de la vida! Gracias por estar en mi vida! Por haberme ensañado tanto! Porque aun estando lejos estamos siempre ahí!. En especial a Juano por apoyarme durante tanto años, por enseñarme tantas cosas y por amar a los niños. Gracias por todos los momentos vividos!

Gracias a mis amigos que conocí acá en Argentina. Vicky, AniLo, Facu, Ana, Julio, Caro, Raul, Juan, Cris, los de percu, mis alumnos, las chicas del gimnasio, y de la vida!!! Gracias por que todos hicieron que me sintiera como en casa! Gracias por tantos momentos compartidos!

Por último y más importante, agradezco a la vida por mi familia! Que los amo y los extraño con el alma cada día! Gracias por hacerme quien soy! Gracias por acompañarme siempre! Por ser mis amigos y confidentes! Por ser mi más grande inspiración. Gracias papi y gracias mami por darme tanto amor, por ser la luz de mi vida, por cada voz de aliento y por nunca nunca nunca dejarme caer! Gracias por enseñarme! Son mis ejemplos! Gracias por todo el esfuerzo que hacen por nosotros. Gracias a mis hermanitos por acompañarme y apoyarme siempre! por estar siempre ahí para las que sea y como sea!!! Gracias a mis tíos y primos! Que gran familia!!!!



## ABREVIATURAS

- AFM:** Microscopia de fuerza atómica. Sigla del inglés “Atomic Force Microscope”
- ATR-FTIR:** Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier con reflectancia total atenuada. Sigla del inglés “attenuated total reflectance Fourier transform infrared”
- AUIP:** Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado
- CCD:** Dispositivo de carga acoplada. Sigla del inglés “charge-coupled device”
- CIM:** Concentración inhibitoria mínima.
- CIM-b:** Concentración inhibitoria mínima en biofilms
- CLSM:** Microscopia láser confocal de barrido. Sigla del inglés “Confocal laser scanning microscopy”.
- DBD:** Descarga de barrera dieléctrica
- DO:** Densidad óptica
- eDNA:** ADN extracelular. Sigla del inglés “extracellular DNA”
- EPS:** Sustancias poliméricas extracelulares. Sigla del inglés “extracellular polymeric substances”
- FTIR:** Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier. Sigla del inglés “Fourier-transform infrared spectroscopy”
- INFIP:** Instituto de Física del Plasma
- IR:** Infrarrojo
- LPS:** Lipopolisacárido
- NIST:** Instituto Nacional de Estándares y Tecnología. Sigla del inglés “National Institute of Standards and Technology”
- NLC:** Transportadores lipídicos nanoestructurados. Sigla del inglés de “Nanostructured Lipid Carriers”
- OES:** Espectroscopía de Emisión Óptica. Sigla del inglés “Optical Emission Spectroscopy”
- PCS:** Espectroscopía de correlación de fotones. Sigla del inglés “Photon Correlation Spectroscopy”
- PI:** Yoduro de propidio. Sigla del inglés “propidium iodide”
- QT:** Prueba de calidad. Siglas del inglés “quality test”
- RNS:** Especies reactivas del nitrógeno. Sigla del inglés “reactive nitrogen species”

**RONs:** Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Siglas del inglés “reactive oxygen and nitrogen species”

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno. Sigla del inglés “reactive oxygen species”.

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido. Sigla del inglés “Scanning Electron Microscope”

**SR:** Respuesta estricta. Sigla del inglés “stringent response”

**Te:** Temperatura de los electrones

**Tg:** Temperatura del gas

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión. Sigla del inglés “Transmission electron microscopy”

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**VBNC:** Viable pero no cultivable. Sigla del inglés “Viable-But-Non-Culturable”

## ÍNDICE GENERAL

<b>MARCO TEORICO</b> .....	17
1. BIOFILMS .....	18
1.1. Proceso de formacion del biofilm.....	19
1.1.1. Pre-acondicionamiento de la superficie de adhesión .....	20
1.1.2. Adhesión.....	20
1.1.3. Maduración del biofilm.....	22
1.1.4. Desprendimiento y dispersión del biofilm .....	23
1.2. Estructura del biofilm .....	23
1.3. Matriz del biofilm .....	27
2. BIOFILM DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
3. RESISTENCIA DE LOS BIOFILMS A AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	34
3.1. Células persistentes.....	34
3.2. Heterogeneidad, baja concentración de oxígeno y crecimiento lento.....	35
3.3. Mutaciones.....	35
3.4. Componentes de la matriz del biofilm.....	36
3.5. Bombas de eflujo .....	37
3.6. Protección contra el estrés oxidativo .....	37
4. PROBLEMAS QUE CAUSA LA FORMACIÓN DE UN BIOFILM .....	38
5. ERRADICACIÓN Y CONTROL DE BIOFILMS .....	40
6. PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFERICA .....	44
6.1. Generación de plasmas fríos a presión atmosférica.....	46
6.2. DBD .....	46
7. INACTIVACIÓN MICROBIANA POR PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFERICA.....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50
<b>OBJETIVOS</b> .....	60
Hipótesis y objetivo general. ....	61
Objetivos específicos.....	61
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	63

<b>CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EN TRES SUPERFICIES ABIÓTICAS, DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DOS CONDICIONES DE CRECIMIENTO</b>	64
RESUMEN	64
1. INTRODUCCIÓN	65
2. MATERIALES Y METODOS	67
2.1 Microorganismo y medios de cultivo	67
2.2 Inoculación del reactor	68
2.3 Crecimiento del biofilm en batch y en sistema continuo	69
2.4 Capacidad de formación de biofilm	70
2.5 Análisis estadístico	71
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
3.1 Capacidad de formación de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en batch durante 24 o 72 hs	72
3.2 Capacidad de formación de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en sistema continuo	73
3.3 Comparación de la capacidad de formación de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en batch y cultivo continuo	74
4. CONCLUSIÓN	80
5. BIBLIOGRAFÍA	80
<b>CAPÍTULO 2</b>	83
<b>INACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MEDIANTE PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA</b>	84
RESUMEN	84
1. INTRODUCCIÓN	85
2. MATERIALES Y METODOS	88
2.1 Microorganismo, medio de cultivo y crecimiento del biofilm	88
2.2 Selección del dispositivo de generación de plasma	88
2.2.1 Dispositivo de plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD)	89
2.2.2 Dispositivo de plasma de descarga jet	89
2.3 Caracterización de la descarga	91
2.4 Tratamiento con plasma	91
2.5 Efecto de la radiación UV del plasma sobre el biofilm	93
2.6 Análisis estadístico	93

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
3.1 Selección del dispositivo de plasma.....	93
3.2 Caracterización de la descarga .....	94
3.3 Curvas de supervivencia y cinética de inactivación.....	96
4. CONCLUSION .....	106
5. REFERENCIAS .....	106
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>111</b>
<b>EFFECTOS DEL PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA SOBRE LA FISIOLÓGÍA CELULAR DE BIOFILMS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>112</b>
RESUMEN .....	112
1. INTRODUCCIÓN.....	113
2. MATERIALES Y METODOS.....	115
2.7 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento del biofilm	115
2.8 Tratamiento con plasma .....	115
2.9 Determinación de la viabilidad celular del biofilm.....	115
2.10 Degradación enzimática del ADN extracelular del biofilm.....	116
2.11 Determinación de la viabilidad celular del biofilm tratado con plasma y degradación enzimática del ADN .....	116
2.1 Determinación de la virulencia del biofilm.....	117
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
3.1 Efectos del plasma sobre la viabilidad celular del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> ..	118
3.2 Efectos del plasma sobre la virulencia de las células del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	123
4. CONCLUSIÓN .....	124
5. BIBLIOGRAFÍA.....	125
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>128</b>
<b>EFFECTOS DEL PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA SOBRE LA MATRIZ DEL BIOFILM DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>129</b>
RESUMEN.....	129
1. INTRODUCCIÓN.....	130
2. MATERIALES Y METODOS.....	133
2.1. Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento del biofilm	133
2.2. Tratamiento con plasma .....	133

2.3.	Efecto del plasma sobre los polisacáridos de la matriz del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	133
2.3.1.	Tinción del polisacárido con Calcofluor White.....	133
2.3.2.	Tinción simultánea del biofilm con Calcofluor White y SYTO 9.....	134
2.3.3.	Relación de áreas entre las imágenes de la matriz y las células del biofilm	134
2.4.	Microscopia electrónica de barrido de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> expuestos a plasma.....	135
2.5.	Degradación enzimática de eDNA de la matriz del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> previo al tratamiento con plasma .....	136
2.6.	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> expuesto a plasma.....	136
2.6.1.	Análisis jerárquico de cluster .....	138
2.7.	Análisis estadístico.....	138
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
3.1.	Efecto del plasma sobre los polisacáridos de la matriz y la estructura del biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	139
3.2.	Implicancia del eDNA en la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma.....	146
3.3.	Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del biofilm <i>de P. aeruginosa</i> expuesto a plasma.....	151
4.	CONCLUSIÓN .....	162
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	162
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>		<b>168</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DE UNA FUENTE DBD COAXIAL DE PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA OPERADA EN AIRE .....</b>		<b>169</b>
RESUMEN.....		169
1.	INTRODUCCIÓN.....	170
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	173
2.1.	Dispositivo de generación de plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD) ..	173
2.2.	Dispositivo experimental para la diagnosis OES .....	174
2.3.	Determinación de la temperatura en el gas efluente del plasma por infrarrojo	175
2.4.	Determinación de oxidantes totales en el gas efluente del plasma .....	176
2.5.	Medición semi-cuantitativa de peróxido de hidrógeno, nitrato y nitrito generados en el gas efluente del plasma.....	178

2.6.	Análisis estadístico.....	179
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	179
3.1.	Especies excitadas en el plasma dependiendo del gas de alimentación.....	179
3.1.1.	Plasmas generados en aire .....	179
3.1.2.	Plasmas generados en argón.....	186
3.1.3.	Plasmas generados en mezclas argón/aire seco.....	190
3.3.	Especies excitadas en el plasma dependiendo del voltaje aplicado a la descarga.. .....	196
3.4.	Temperatura en el plasma .....	197
3.4.1.	Temperatura del gas en el plasma.....	197
3.4.2.	Temperatura del gas efluente del plasma .....	199
3.5.	Oxidantes totales generado en el gas efluente del plasma operado en aire humidificado.....	199
3.6.	Medición semi-cuantitativa de peróxido de hidrógeno, nitrato y nitrito generados en el plasma.....	201
4.	CONCLUSIONES.....	205
5.	REFERENCIAS .....	206
<b>CAPÍTULO 6.....</b>		<b>209</b>
<b>INCREMENTO DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TRATADOS CON ANTIMICROBIANOS LIBRES O NANOVEHICULIZADOS Y/O PLASMA DE DESCARGA DE GASES.....</b>		<b>210</b>
RESUMEN .....		210
1.	INTRODUCCIÓN.....	211
2.	MATERIALES Y METODOS.....	213
2.1.	Microorganismo, medio de cultivo y crecimiento del biofilm.....	213
2.2.	Transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) .....	213
2.3.	Síntesis de NLC <sup>-</sup> .....	213
2.4.	Síntesis de NLC <sup>+</sup> .....	214
2.5.	Síntesis y marcación de NLC <sup>-</sup> y NLC <sup>+</sup> con colorante fluorescente .....	214
2.6.	Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y determinación del tamaño de partícula.....	214
2.7.	Determinación del porcentaje de encapsulación de las formulaciones .....	215
2.8.	Cinética de liberación de ciprofloxacina de una solución de nanopartículas ..	215
2.9.	Fuente de plasma de descarga de barrera dieléctrica .....	216

2.10.	Determinación de la CIM de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en cultivos de células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> .....	216
2.11.	Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	217
2.12.	Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilm de <i>P. aeruginosa</i> luego del tratamiento con plasma frío a presión atmosférica .....	217
2.13.	Estudio cualitativo de penetrabilidad de antibiótico mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	218
2.14.	Análisis estadístico .....	219
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	219
3.1.	Transportadores lipídicos nanoestructurados .....	219
3.1.1.	Determinación del porcentaje de encapsulación de antibiótico en las nanopartículas.....	219
3.1.2.	Cinética de liberación de ciprofloxacina desde soluciones de nanopartículas ... ..	220
3.1.3.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	222
3.2.	Determinación de la CIM de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en cultivos de células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> .....	222
3.3.	Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	224
3.4.	Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y ciprofloxacina nanoparticulada en biofilm de <i>P. aeruginosa</i> luego de tratamiento con plasma frío a presión atmosférica .....	226
3.5.	Estudio cualitativo de biofilms tratados con nanopartículas mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido .....	228
4.	CONCLUSIONES.....	232
5.	BIBLIOGRAFÍA .....	232
	<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	234
	<b>MODELO PROPUESTO PARA LA ERRADICACIÓN DE BIOFILM DE <i>P. aeruginosa</i> MEDIADO POR PLASMA</b> .....	235

# **MARCO TEORICO**

## 1. BIOFILMS

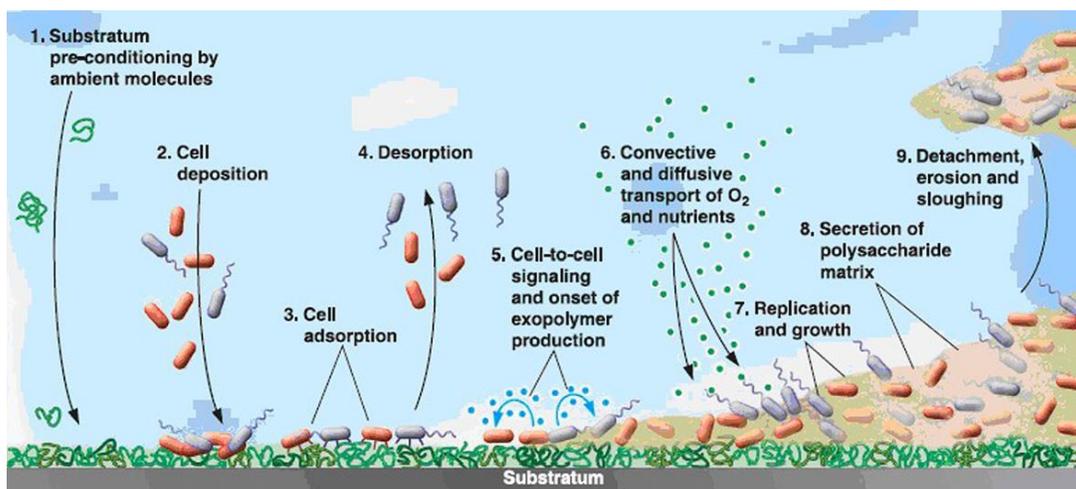
En la mayor parte de la historia de la microbiología, se han estudiado y caracterizado microorganismos plantónicos o células en vida libre; pero los avances en microbiología que han tenido lugar en los últimos 50 años, han mostrado que el crecimiento y desarrollo microbiano ocurre en gran medida en superficies. Un biofilm es una comunidad estructurada de células microbianas inmersas en una matriz polimérica, que se asocian o adhieren de forma irreversible a una superficie o interfase, incluyendo agregados y flóculos microbianos (Carpentier y Cerf, 1993; Costerton *et al.*, 1995; Elder *et al.*, 1995; Donlan, 2002). Se pueden formar en una amplia variedad de superficies, como tejidos vivos, dispositivos médicos, tuberías del sistema de agua potable o industrial o sistemas acuáticos naturales, entre otros.

En estas comunidades microbianas, los microorganismos exhiben un fenotipo y un genotipo diferente en cuanto a transcripción genética y velocidad de crecimiento (Donlan, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Durante el proceso de adhesión, las células bacterianas alteran sus fenotipos en respuesta a la proximidad de una superficie (Costerton *et al.*, 1995; Fletcher, 1991). Tanto los estudios genéticos como microscópicos de biofilms de una sola especie han demostrado que se forman en múltiples etapas, que requieren de señalización intercelular y tienen un perfil de transcripción génico distinto al de las células en vida libre. Sin embargo, en ambientes naturales, los biofilms en su mayoría son comunidades microbianas mixtas, que albergan bacterias que comparten su material genético y que ocupan diferentes nichos (Watnick y Kolter, 2000). Debido a su alto nivel de organización, cada microorganismo dentro del biofilm se beneficia de su posición y de la cooperación fisiológica, constituyendo una comunidad funcional coordinada mucho más eficiente que las poblaciones mixtas de organismos planctónicos (Costerton *et al.*, 1995).

## 1.1. PROCESO DE FORMACION DEL BIOFILM

La formación de un biofilm es un proceso complejo que involucra varios pasos (**Figura 1**) (Bryers y Ratner, 2004; Simões *et al.*, 2010):

1. Pre-acondicionamiento de la superficie de adhesión, ya sea por macromoléculas presentes en el medioambiente o superficies modificadas intencionalmente.
2. Transporte de las células planctónicas desde medio líquido hasta la superficie.
3. Adsorción o adhesión reversible de las células en la superficie.
4. Desorción de células adsorbidas reversiblemente.
5. Adhesión irreversible de las células bacterianas a la superficie, comienzo de la comunicación, señalización celular y producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, sigla del inglés “extracellular polymeric substances”).
6. Transporte convectivo y difusivo de oxígeno y nutrientes dentro del biofilm.
7. Crecimiento y replicación celular.
8. Producción de EPS, metabolismo de sustratos y transporte de productos fuera del biofilm.
9. Desprendimiento y dispersión del biofilm.



**Figura 1.** Etapas del proceso de formación de un biofilm (Bryers y Ratner, 2004).

### **1.1.1. Pre-acondicionamiento de la superficie de adhesión**

El pre-acondicionamiento es el proceso por el cual una superficie sumergida en un medio acuoso es recubierta y cambia rápidamente por la adsorción de moléculas, iones o polímeros. La carga, la tensión y el potencial superficial pueden ser alterados y facilitar la accesibilidad y la fijación de las bacterias a la superficie (Bryers, 1987; Donlan, 2002; Garrett *et al.*, 2008). Se ha reportado que hay mejor fijación en presencia de iones y de moléculas orgánicas (Bryers, 1987; McEldowney y Fletcher, 1987; Chmielewski y Frank, 2003; Garrett *et al.*, 2008). La secuencia de unión de los microorganismos, también influye en la composición microbiana final del biofilm, ya que la población inicial que se adhiere puede cambiar la superficie para las siguientes especies que se unan (Mc Eldowney y Fletcher, 1987)

### **1.1.2. Adhesión**

La adhesión depende de que la bacteria se encuentre con la superficie y se acerque lo suficiente para que ocurra la unión y de que la superficie externa bacteriana se adhiera al sustrato. La probabilidad de que el microorganismo encuentre un sustrato potencial se ve afectada por una serie de factores, como la concentración celular del cultivo y la movilidad bacteriana; mientras que la fijación depende de las interacciones físicoquímicas entre el sustrato y la superficie bacteriana (Fletcher y Loeb, 1979).

Entre los factores que pueden influir en la unión de los microorganismos a las superficies están: rugosidad, hidrofobicidad y película de acondicionamiento de la superficie; velocidad, temperatura y pH del flujo; concentración de nutrientes y iones del medio. Además, también son importantes las propiedades de la superficie celular como la presencia de fimbrias, flagelos, polisacáridos y proteínas, ya que podrían proporcionar una ventaja competitiva para un organismo en una comunidad mixta (Pringle y Fletcher, 1983; Bendinger *et al.*, 1993; Donlan, 2002).

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie ejercen una fuerte influencia en la velocidad y el grado de unión. Por ejemplo, a medida que aumenta la rugosidad superficial, aumenta la colonización microbiana, probablemente debido a que las fuerzas de cizallamiento se ven disminuidas y a que el área superficial es mayor. También, se ha encontrado que los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas y no polares que a materiales hidrófilos (Bendinger *et al.*, 1993; Donlan, 2002; Fletcher y Loeb, 1979; Pringle y Fletcher, 1983), aunque los resultados de estos estudios han sido contradictorios. La hidrofobicidad de la superficie celular también es importante en la adhesión. La mayoría de las bacterias tienen carga negativa, pero siguen conteniendo componentes hidrofóbicos en la superficie, como las fimbrias, que contienen una alta proporción de residuos de aminoácidos hidrófobos y ayudan a superar la repulsión electrostática inicial que existe entre la célula y la superficie (Donlan, 2002).

Algunos mecanismos de interacción superficie-bacteria permiten tanto la adhesión como la locomoción. Los pili tipo IV son estructuras de la superficie celular que rápidamente se polimerizan y despolimerizan y que las células usan para moverse sobre las superficies. Este movimiento es denominado “twitching” y consiste en una sucesiva extensión, adhesión y retracción del pilus. *Pseudomonas aeruginosa* y numerosas bacterias utilizan esta movilidad para explorar las superficies antes de formar el biofilm (Persat *et al.*, 2015).

La adhesión ocurre en dos etapas, una reversible seguida por una irreversible:

#### *Adhesión reversible*

La adhesión primaria constituye el encuentro entre un microorganismo planctónico y una superficie acondicionada. Esta etapa es reversible y se da por una serie de variables fisicoquímicas que definen la interacción entre la superficie celular y la superficie de interés. En primer lugar, la bacteria debe acercarse a la superficie, propulsada aleatoriamente por una corriente de flujo o de manera dirigida a través de la quimiotaxis y movilidad. Una vez que el microorganismo alcanza la proximidad crítica a la superficie, la adhesión depende de la suma neta de las fuerzas atractivas y repulsivas generadas entre las dos superficies. Estas fuerzas incluyen interacciones electrostáticas e hidrófobas,

impedimento estérico, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrodinámicas. Finalmente, una fracción de las células se adhiere de forma reversible. Si las fuerzas repulsivas son mayores a las atractivas o si se aplican fuerzas de corte suaves, las células podrían desprenderse de la superficie (Chmielewski y Frank, 2003; Dunne, 2002; Garrett *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 1971).

### *Adhesión irreversible*

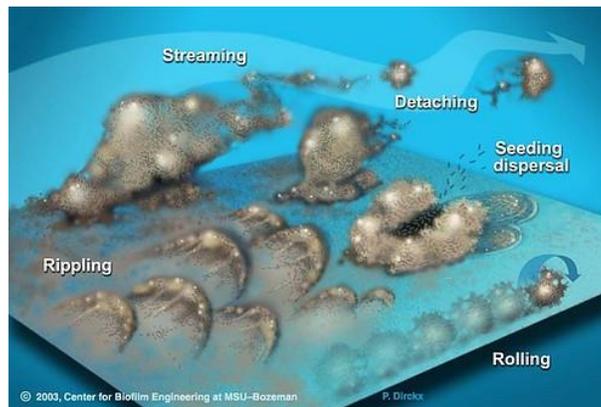
En esta etapa, algunas de las células adsorbidas reversiblemente permanecen inmovilizadas y se fijan irreversiblemente. El proceso de adhesión se consolida por medio de la producción de exopolisacáridos y por la unión entre los apéndices bacterianos y el sustrato. Esta unión implica fuerzas de corto alcance como interacción dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, covalentes y iónicos (Chmielewski y Frank, 2003). La eliminación de las células fijadas de forma irreversible es difícil y requiere de la aplicación de una fuerte fuerza de cizallamiento (frotamiento o raspado) o ruptura química mediante la aplicación de enzimas, detergentes, tensioactivos, desinfectantes o calor (Chmielewski y Frank, 2003; Dunne, 2002). Durante esta etapa de adhesión, los microorganismos planctónicos pueden adherirse entre sí o con otras especies, formando agregados en el sustrato.

### **1.1.3. Maduración del biofilm**

Una vez que las bacterias se han unido irreversiblemente a la superficie, comienza el proceso de maduración del biofilm. Este proceso implica la formación de microcolonias y el desarrollo de una estructura organizada. Las microcolonias son el resultado de la agregación y el crecimiento de los microorganismos acompañado por la producción de EPS. Esta agregación implica el reclutamiento de células planctónicas del medio circundante y la replicación de las células ya adheridas (Chmielewski y Frank, 2003). La maduración del biofilm y el potencial de crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes y la difusión de éstos, de la eliminación de desechos, del pH interno, de la difusión del oxígeno, de la fuente de carbono y de la osmolaridad (Dunne, 2002; Chmielewski y Frank, 2003).

#### 1.1.4. Desprendimiento y dispersión del biofilm

En algún momento, el biofilm alcanza una masa crítica y un equilibrio dinámico en el que la capa más externa de crecimiento comienza a generar organismos planctónicos. Estos organismos son liberados del biofilm y pueden colonizar otras superficies (Dunne, 2002). El desprendimiento del biofilm también puede ocurrir cuando hay un desequilibrio o fluctuación de los nutrientes, una disminución del pH y oxígeno y una acumulación de subproductos metabólicos tóxicos. Este desequilibrio causa que la estructura del biofilm se debilite y se desprendan capas de polímero de la superficie de soporte (Bryers, 1987; Dunne, 2002; Chmielewski y Frank, 2003). Las bacterias del biofilm pueden dispersarse de muchas maneras, pueden migrar por ondulación, rodando a través de la superficie, por el desprendimiento de agregados o por la liberación de células individuales (dispersión por siembra) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Tipos de migración y dispersión de un biofilm (Montana State University, Center for Biofilm Engineering: <http://www.biofilm.montana.edu/multimedia/images/index.html>).

#### 1.2. ESTRUCTURA DEL BIOFILM

Los biofilms han sido visualizados por una variedad de medios, incluyendo microscopía óptica, electrónica de transmisión y electrónica de barrido (SEM, sigla del inglés “Scanning Electron Microscope”). Sin embargo, cada uno de estos métodos tiene limitaciones, ya sea por problemas de resolución, deshidratación o procesamiento de la muestra. Alternativamente, la microscopía láser confocal de barrido (CLSM, sigla del inglés

“Confocal laser scanning microscopy”) proporcionó una manera no invasiva para la reconstrucción tridimensional computarizada de biofilms sin distorsión de la arquitectura, permitiendo la visualización de muestras completamente hidratadas (Costerton *et al.*, 1978; Kinner *et al.*, 1983; Davey y O’Toole, 2000; Dunne, 2002). Recientemente, la microscopia de fuerza atómica (AFM, sigla en inglés “Atomic Force Microscope”) ha surgido como una técnica prometedora que permite el análisis de algunas propiedades estructurales y la cuantificación de la adhesividad, cohesividad y elasticidad de un biofilm (Mosier *et al.*, 2012; Safari *et al.*, 2014; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014).

Numerosas condiciones, como la superficie, las propiedades de la interfaz, la disponibilidad de nutrientes, el sustrato, la concentración de oxígeno, la composición de la comunidad microbiana y la hidrodinámica, pueden afectar los patrones de crecimiento, la estructura y la complejidad del biofilm (Costerton *et al.*, 1995; Stoodley *et al.*, 1998; Davey y O’toole, 2000; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Por ejemplo, dependiendo de las condiciones, *P. aeruginosa* puede formar biofilms con distintas estructuras. Pueden ser planos o presentar estructuras multicelulares en forma de hongos, dependiendo de la fuente de carbono y de las condiciones de flujo (Klausen *et al.*, 2003). La formación de estructuras en forma de hongos en estos biofilms, es un proceso secuencial que implica una subpoblación bacteriana no móvil que forma las microcolonias iniciales y una móvil que migra y forma monocapas que posteriormente se convierten en los tallos y las cabezas de las estructuras (Davies *et al.*, 1998; Klausen *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 1993).

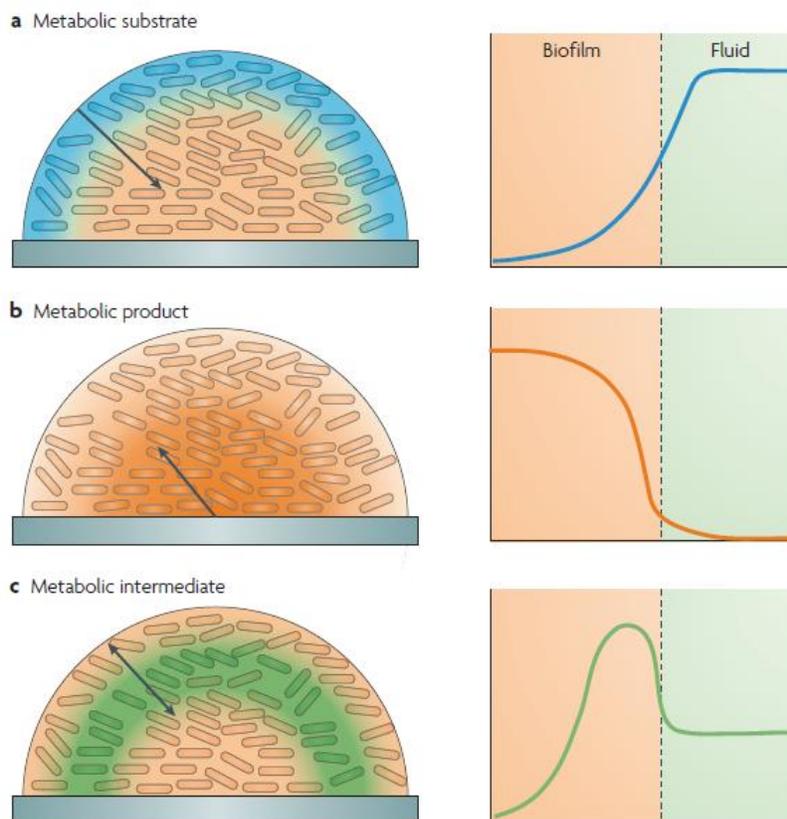
Hay un continuo debate sobre la contribución de la genética (respuesta activa) y de las condiciones ambientales (respuesta pasiva) sobre la estructura del biofilm y de cómo ambas interactúan (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Se han identificado numerosos genes o factores que son esenciales o requeridos para la formación del biofilm, como los genes que regulan o expresan proteínas de adhesión a la superficie, flagelos, pili y EPS (Costerton *et al.*, 1995). Los mecanismos moleculares que regulan la formación del biofilm varían mucho entre las diferentes especies, e incluso varían entre cepas de la misma especie. Sin embargo, algunas características se reconocen como atributos generales en la formación de un biofilm, como la producción de la matriz extracelular (Monds y O’Toole, 2009). Aunque

existen genes y señales específicas, cuando una condición ambiental afecta a la estructura del biofilm, no es claro si las células respondieron a una señal ambiental a través de una vía reguladora específica o si el cambio en la estructura fue una consecuencia indirecta de los cambios en el metabolismo celular y la dinámica de crecimiento como resultado de este nuevo entorno (Monds y O'Toole, 2009). La cooperación fisiológica juega un papel importante en la capacidad de adoptar diferentes estructuras en respuesta a las condiciones ambientales y brinda la flexibilidad para adaptarse más rápidamente a los cambios (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que la mayoría de los biofilms exhiben cierto nivel de heterogeneidad. Las zonas de agregados celulares varían en densidad y se intercalan a lo largo de la matriz, creando áreas abiertas donde se forman canales de líquido que representan un primitivo sistema circulatorio y que permiten el transporte de nutrientes y de desechos en el biofilm (Costerton *et al.*, 1995; Tolker-Nielsen y Molin, 2000; Davey y O'toole, 2000; Monds y O'Toole, 2009).

La matriz y la alta densidad celular, hacen que la difusión a través del biofilm sea lenta en comparación con el metabolismo celular. Por ejemplo, un soluto del tamaño del oxígeno se difunde a través de la matriz a una velocidad que es aproximadamente el 60% de la tasa de difusión en agua pura (Stewart, 2003; Stewart y Franklin, 2008). Dado que las bacterias usan múltiples sustratos y liberan numerosos productos extracelulares, la limitación en la difusión puede producir complejos gradientes químicos verticales y transversales, particularmente cuando las secreciones de algunas células son consumidas por otras (Stewart y Franklin, 2008). Estos gradientes, generan numerosos micronichos dentro del biofilm que pueden inducir una gran heterogeneidad fisiológica, donde las bacterias alteran su comportamiento de acuerdo con las condiciones locales. Un sustrato en el medio circundante primero es consumido por las células de la capa externa, de tal manera que su concentración disminuye con el aumento de la profundidad dentro del biofilm. Un producto secretado por las células se acumulará en el interior, mientras que un intermediario metabólico que se consume y produce dentro del biofilm puede presentar perfiles de concentraciones máximas locales (**Figura 3**).

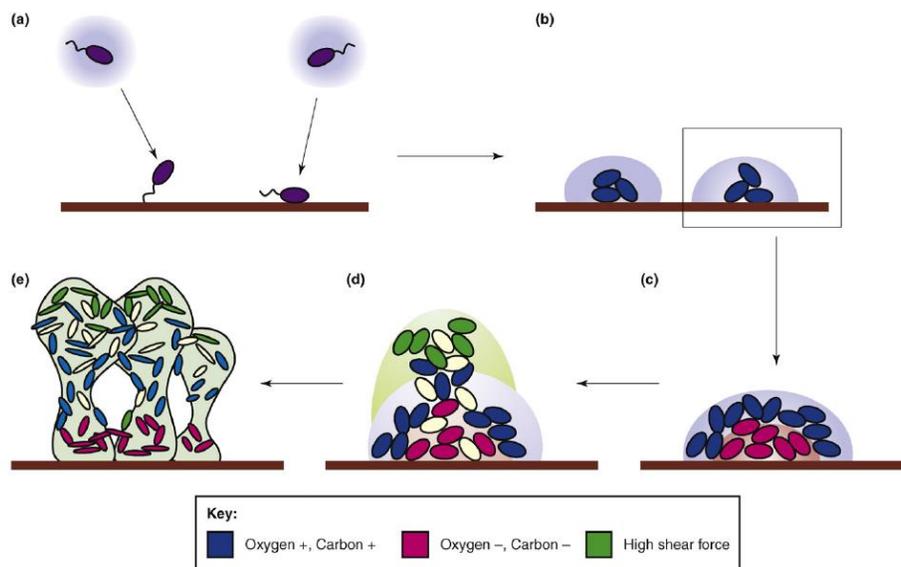
El oxígeno es el ejemplo mejor estudiado de la heterogeneidad fisiológica. Los gradientes de oxígeno variarán dependiendo del tipo de biofilm y su distribución no es homogénea. Hay una mayor concentración en la interfase entre el biofilm y el medio circundante y en las células cercanas a los canales, mientras que en el centro de las microcolonias hay muy poco oxígeno (Costerton *et al.*, 1995; Stewart y Franklin, 2008). Como resultado, las células cercanas a la superficie del biofilm utilizan el metabolismo aeróbico, mientras que las que se encuentran dentro deben cambiar al metabolismo microaerobio, anaerobio o dejar de crecer (Kühl *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Diagrama de la heterogeneidad química en los biofilms: **A.** Difusión de un sustrato metabólico (azul), **B.** un producto metabólico (naranja) y **C.** un intermediario metabólico (verde) (Stewart y Franklin 2008).

Monds y O'Toole (2009) propusieron un esquema de la formación de un biofilm basado en la adaptación ecológica local de los individuos: la unión de dos células bacterianas se da en respuesta a las señales apropiadas (zona púrpura) (**Figura 4A**). Cada célula tiene acceso a

niveles suficientes de oxígeno y carbono (zona azul) y comienzan a dividirse en la superficie (**Figura 4B**). A medida que las células crecen unas sobre otras se forman las microcolonias y el metabolismo de las células cercanas al medio restringe la difusión de oxígeno y carbono a las células en el fondo de la microcolonia (zona roja). Las células en la parte interior se adaptan a este cambio (células rojas) y se crea una heterogeneidad fenotípica dentro de la microcolonia (**Figura 4C**). Algunas células comienzan a expresar niveles más altos de EPS (células amarillas), lo que promueve el crecimiento vertical y el establecimiento de macrocolonias. A medida que las células crecen, se someten a mayores fuerzas de cizallamiento (zona verde) y se adaptan a este nuevo entorno local (células verdes), generando aún más heterogeneidad dentro del biofilm (**Figura 4D**). Finalmente, las macrocolonias se unen para formar el biofilm maduro (**Figura 4E**).



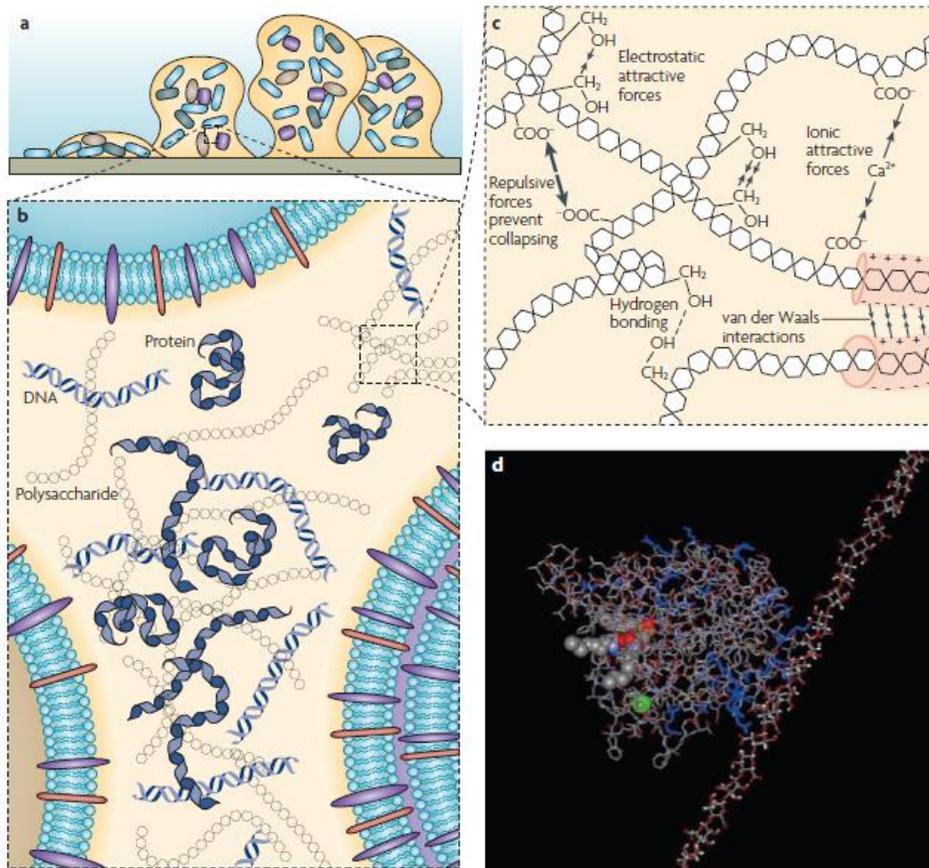
**Figura 4.** Simulación teórica de la formación del biofilm basada en la adaptación ecológica local de los individuos (Monds y O’Toole, 2009).

### 1.3. MATRIZ DEL BIOFILM

En la mayoría de los biofilms, los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca, mientras que la matriz puede representar más del 90%. La matriz es el material extracelular en el que están inmersas las células del biofilm, casi siempre producida por los

propios microorganismos. Consiste en un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros, conocidos como EPS, que forman la base de la arquitectura tridimensional del biofilm y es responsable de la adhesión a las superficies y de la cohesión (Flemming y Wingender, 2010).

El componente principal de la matriz del biofilm es agua y sus propiedades físicas, como la viscosidad y solubilidad, son determinadas por los solutos disueltos en ella. La matriz puede ser hidrofóbica o hidrofílica (Donlan, 2002). Además del agua y las células microbianas, la matriz del biofilm es un complejo de polímeros secretados, nutrientes, metabolitos, productos de la lisis celular y material particulado del entorno. Por lo tanto, además de peptidoglicanos, lípidos, fosfolípidos y otros componentes celulares, contiene todas las clases principales de macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ADN y ARN (Singh *et al.*, 2006; Sutherland, 2001a). Por lo general, el rango de la composición de la matriz es de alrededor del 97% agua, 2-5% células microbianas, 1-2% polisacáridos, 1-2% proteínas y 1-2% ADN y ARN (Donlan, 2002; Sutherland, 2001a). Todos estos componentes se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo, generando numerosos microambientes que pueden variar espacialmente y temporalmente (**Figura 5**) (Flemming y Wingender, 2010).



**Figura 5.** Diferentes dimensiones de las EPS: **A.** Modelo de un biofilm bacteriano unido a una superficie sólida. **B.** Componentes principales de la matriz. **C.** Interacciones físico-químicas débiles y entrelazado de biopolímeros que estabilizan la matriz. **D.** Modelo molecular de la interacción entre el exopolisacárido alginato (derecha) y la enzima extracelular lipasa (izquierda) de *P. aeruginosa* (Flemming y Wingender, 2010).

Las EPS inmovilizan las células del biofilm y las mantienen próximas entre sí, lo que permite una mayor interacción y comunicación entre ellas y la formación de microconsorcios sinérgicos. La matriz puede retener enzimas extracelulares, generando una especie de “sistema digestivo” externo que retiene nutrientes del medio, que pueden ser utilizados como fuentes de carbono y energía. También puede retener los componentes de células lisadas, como ADN, que puede representar un reservorio de genes para la transferencia horizontal. Puede servir como sustrato en condiciones bajas de nutrientes. Sirve como protección contra la desecación, los biocidas oxidantes o cargados, algunos antibióticos y cationes metálicos, la radiación ultravioleta, algunos protozoos y las defensas

inmunes del huésped. Además, ecológicamente, la competencia y cooperación en el espacio confinado de la matriz conduce a una adaptación constante de la población (Zhang y Bishop, 2003; Flemming y Wingender, 2010).

### *Exopolisacáridos*

Los polisacáridos son una fracción importante de la matriz. La mayoría son moléculas largas, lineales o ramificadas, con una masa molecular de  $0.5-2 \times 10^6$  daltons. Varios polisacáridos han sido visualizados por SEM como finas hebras que se unen a la superficie celular y forman redes complejas. Las técnicas de microscopía junto con tinciones específicas de carbohidratos han demostrado la ubicuidad de los polisacáridos, no sólo en biofilms ambientales marinos, de agua dulce y de suelo, sino también en los asociados con infecciones crónicas en seres humanos y en cultivos puros en laboratorio (Flemming y Wingender, 2010). La cantidad de exopolisacáridos sintetizados dependerá en gran medida del sustrato, de la fuente de carbono y otros nutrientes limitantes. El exceso de carbono disponible y la limitación de nutrientes como el nitrógeno, potasio o fosfato, pueden promover su síntesis (Brelles-Mariño y Boiardi, 1996; Sutherland, 2001b). Además, la misma matriz del biofilm puede desempeñar un papel activo en la estimulación de su propia síntesis (Irie *et al.*, 2012).

En bacterias gram negativas, algunos de estos polisacáridos son neutros o polianiónicos, incluyendo el alginato y el xantano. La presencia de ácido urónico o piruvato, le confiere propiedades aniónicas importantes para la asociación con cationes divalentes como el calcio y el magnesio, los cuales proporcionan mayor fuerza vinculante durante el desarrollo del biofilm. Para algunas bacterias gram positivas, la composición de la matriz puede ser muy diferente y principalmente catiónica (Donlan, 2002). Usualmente, los grupos cargados están en el exterior de las cadenas, por lo tanto, pueden interactuar fácilmente con iones y moléculas cargadas. Varios exopolisacáridos son homopolisacáridos, incluyendo glucanos y fructanos derivados de la sacarosa y la celulosa, pero la mayoría son heteropolisacáridos consistentes en una mezcla de azúcares neutros y cargados. Muchos exopolisacáridos poseen

secuencias de residuos de hexosas, por lo que, tienden a ser mucho más rígidos en estructura, menos deformables y poco solubles o insolubles (Sutherland, 2001b).

En muchas bacterias, los exopolisacáridos son indispensables para la formación del biofilm. Los mutantes que no pueden sintetizar exopolisacáridos son incapaces de formar biofilms maduros, aunque las bacterias todavía puedan adherirse a las superficies y formar microcolonias. Sin embargo, en los biofilms de especies mixtas, la presencia de una especie que produce exopolisacáridos puede conducir a la integración de otras especies que no los sintetizan (Sutherland, 2001a; Ma *et al.*, 2009; Flemming y Wingender, 2010).

### *Proteínas*

La matriz del biofilm puede contener cantidades considerables de proteínas que, en algunos casos, pueden sobrepasar el contenido de polisacáridos (Frølund *et al.*, 1996). Las proteínas estructurales, como las asociadas a la superficie de la célula y las que se unen a los carbohidratos (lectinas), están implicadas en la formación y estabilización de la matriz y constituyen un enlace entre la superficie bacteriana y las EPS (Sutherland, 2001b; Sutherland, 2001a; Flemming y Wingender, 2010). Dependiendo del estado fisiológico de las células, la síntesis y expresión de proteínas puede variar espacial y temporalmente dentro del biofilm (Rani *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2004).

Se han detectado muchas enzimas extracelulares en los biofilms, muchas de las cuales están implicadas en la degradación de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y compuestos insolubles como celulosa, quitina y lípidos, lo que permite el crecimiento del biofilm en una amplia variedad de sustratos. Estas enzimas, también ayudan a la descomposición de los biopolímeros de las EPS para ser utilizados como fuentes de carbono y energía en condiciones de escasos nutrientes. Algunas enzimas pueden estar involucradas en la degradación de las EPS estructurales para promover el desprendimiento y dispersión del biofilm (Jahn *et al.*, 1999; Sutherland, 2001a; Zhang y Bishop, 2003; Flemming y Wingender, 2010).

## *ADN extracelular*

Otro componente importante y abundante en la matriz son los ácidos nucleicos, específicamente el ADN extracelular (eDNA, sigla del inglés “extracellular DNA”). Aunque inicialmente el eDNA fue visto como material residual de células lisadas, se ha hecho cada vez más claro que es una parte integral de la matriz y del modo de vida del biofilm. Se ha documentado su importancia para la adhesión a la superficie y el desarrollo del biofilm (Whitchurch *et al.*, 2002), como fuente de material genético en la transferencia horizontal de genes (Molin y Tolker-Nielsen, 2003), como fuente de carbono y energía en condiciones de escasos nutrientes (Finkel y Kolter, 2001), como un conector intercelular (Whitchurch *et al.*, 2002; Allesen-Holm, *et al.* 2006; Yang *et al.*, 2007; Mann y Wozniak, 2012) y para la señalización por quórum sensing (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Spoering y Gilmore, 2006).

## **2. BIOFILM DE *Pseudomonas aeruginosa***

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que está dentro del orden *Pseudomonadales*. *Pseudomonas* spp. es un bacilo gram negativo aerobio estricto que no forma parte de la familia de las enterobacterias. Se encuentra de forma ubicua en suelos, agua, vegetales y animales. La ubicuidad de este microorganismo en el medio ambiente se debe a varios factores, como su capacidad para formar biofilms, colonizar múltiples nichos y utilizar una amplia variedad de compuestos como fuentes de energía (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* es un bacilo móvil que crece en un rango de temperatura entre 10 y 42°C y secreta una variedad de pigmentos como pioverdina, piocianina, fluoresceína y piorrubina. Tiene una membrana externa además de la membrana citoplasmática interna y la capa de peptidoglicano intermedio. Una cápsula de polisacárido rodea el exterior de las bacterias y protege la membrana externa de la acción del sistema inmune e inhibe la unión de células fagocíticas a las bacterias (Wilson y Dowling, 1998; Davis *et al.*, 2013).

Los biofilms monoespecies formados por *P. aeruginosa* se han convertido en un modelo para el estudio de este aspecto de la biología microbiana (Davey *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa una amplia variedad de infecciones agudas y persistentes en pacientes inmunocomprometidos. Este microorganismo se ha vuelto cada vez más importante debido su prevalencia, patogenicidad, resistencia a antimicrobianos, morbilidad y mortalidad y a su capacidad de formar biofilms. De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos, es el tercer patógeno más común asociado con las infecciones hospitalarias (Moreau-Marquis *et al.*, 2008). Afecta a pacientes con VIH, causa bacteriemia en las víctimas de quemaduras graves colonizando el tejido quemado, infección pulmonar crónica en pacientes con fibrosis quística, queratitis ulcerosa aguda en usuarios de lentes de contacto y es el principal patógeno en infecciones del tracto urinario y de heridas quirúrgicas e inflamatorias, entre otras (Lyczak *et al.*, 2000; Jamasbi y Taylor, 2010; Sydnor y Perl, 2011). La patogenicidad y gravedad de las infecciones por *P. aeruginosa* se evidencia por el número de muertes atribuidas a este organismo. Por ejemplo, se le atribuyen aproximadamente el 30% de las muertes causadas por neumonía y bacteriemia en pacientes con cáncer (Jamasbi y Taylor, 2010). En pacientes con fibrosis quística, es la principal causa de mortalidad, coloniza los epitelios anormales de las vías respiratorias y causa fallas respiratorias. Alrededor del 80% de estos pacientes están crónicamente infectados (Moreau-Marquis *et al.*, 2008; Stover *et al.*, 2000).

En clínicas y hospitales, las fuentes comunes de infección de *P. aeruginosa* son los catéteres, respiradores, prótesis, implantes, equipos médicos, humidificadores, el agua de los grifos, la comida, el personal del establecimiento y la propia flora endógena del paciente. La formación de biofilm de este microorganismo en los pacientes se da principalmente en el tracto respiratorio (21%), tracto urinario (22%), quemaduras y epitelios inflamados (4%) y en el torrente sanguíneo (4%) (Wilson y Dowling, 1998; Jamasbi y Taylor, 2010; Sydnor y Perl, 2011)

### **3. RESISTENCIA DE LOS BIOFILMS A AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Los microorganismos en biofilms son más resistentes a los agentes antimicrobianos que las correspondientes células en vida libre. Por ejemplo, la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antibiótico puede ser de 100 a 1000 veces superior para un microorganismo en biofilm en comparación con su forma plantónica (Høiby *et al.*, 2010; Patel, 2005). Los mecanismos asociados a esta resistencia antimicrobiana parecen ser multifactoriales y pueden variar de un organismo a otro. Estos mecanismos incluyen barreras de difusión físicas o químicas a la penetración del antimicrobiano, crecimiento lento del biofilm debido a limitación de nutrientes y oxígeno, activación de respuestas al estrés y aparición de “persistores” y fenotipos específicos, entre otros (Lewis, 2005; Mah y O’Toole, 2001; Patel, 2005; Stewart, 2002). A continuación, se detallan algunos de estos mecanismos:

#### **3.1. CÉLULAS PERSISTENTES**

La resistencia es la capacidad heredada o adquirida de los microorganismos para crecer en altas concentraciones de un antibiótico, independientemente de la duración del tratamiento, y se cuantifica por la CIM; mientras que la tolerancia es la capacidad, heredada o no, de los microorganismos para sobrevivir transitoriamente a altas concentraciones de un antibiótico sin un cambio en la CIM. En comparación con la resistencia y la tolerancia, que son atributos de toda la población bacteriana, la persistencia es la capacidad no heredable de una subpoblación (generalmente menos del 1%) para sobrevivir a la exposición a altas concentraciones de un antibiótico. La persistencia se observa típicamente cuando la mayoría de la población bacteriana muere rápidamente mientras que una subpoblación sobrevive, a pesar de que la población sea clonal. La curva de supervivencia en el tiempo presentará doble pendiente debido a la respuesta heterogénea de las subpoblaciones persistente y no persistente. Estas células “persistoras” entran espontáneamente en un estado de dormancia, donde no crecen ni mueren en presencia de agentes bactericidas, exhibiendo tolerancia a múltiples fármacos (Brauner *et al.*, 2016; Lewis, 2005).

### **3.2. HETEROGENEIDAD, BAJA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y CRECIMIENTO LENTO**

Los diversos microambientes dentro del biofilm pueden afectar la acción de los antimicrobianos. Por ejemplo, la acumulación local de productos ácidos da lugar a gradientes de pH que podrían antagonizar directamente la acción de un antibiótico. Los gradientes en la concentración de oxígeno crean regiones anaerobias donde, por ejemplo, un antibiótico aminoglucósido es menos eficaz. El agotamiento de un sustrato o la acumulación de un producto inhibitor, podrían hacer que algunas bacterias entren en un estado de latencia sobre el que algunos antibióticos no pueden actuar. La baja velocidad de crecimiento de las bacterias en los biofilms maduros reduce la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos. Además, el ambiente osmótico dentro del biofilm puede ser alterado, cambiando las proporciones relativas de poros y reduciendo la permeabilidad de los antibióticos. Debido a esta diversidad de microambientes, la respuesta a los agentes antimicrobianos puede variar dependiendo de la ubicación de una célula particular dentro del biofilm (Høiby *et al.*, 2010; Mah y O'Toole, 2001; Stewart, 2002).

### **3.3. MUTACIONES**

Se ha reportado una mayor frecuencia de mutaciones en las bacterias que crecen en biofilm en comparación con las que crecen en estado planctónico. Se ha encontrado que la transferencia horizontal de genes y la transformación del ADN ocurren con mayor frecuencia y eficacia en los biofilms, tanto en ambientes naturales como en laboratorio. Se ha observado una fuerte relación entre la resistencia a los antibióticos y la hipermutabilidad. La alta tasa de mutación podría permitir a las bacterias dentro del biofilm expresar mecanismos de resistencia contra los antimicrobianos, como la producción de enzimas que degraden el antibiótico o la sobreexpresión de bombas de eflujo (Driffield *et al.*, 2008; Høiby *et al.*, 2010; Molin y Tolker-Nielsen, 2003).

### 3.4. COMPONENTES DE LA MATRIZ DEL BIOFILM

Se ha sugerido que la matriz impide o limita el acceso de los antimicrobianos a las células bacterianas dentro del biofilm, ya que los compuestos pueden reaccionar con los componentes de la matriz y además, difundir con dificultad (Mah y O'Toole, 2001). La velocidad del transporte de los agentes antimicrobianos dentro del biofilm es importante. Si la velocidad de penetración del antibiótico a través del biofilm disminuye con relación a la velocidad de transporte a través de un líquido, los microorganismos estarían expuestos inicialmente a una baja concentración del antibiótico, que aumentaría gradualmente con el tiempo, lo que les daría tiempo para generar una respuesta adaptativa. Se ha encontrado que esta disminución en la difusión del antimicrobiano podía ser específica de la interacción agente-biofilm (Van Acker *et al.*, 2014).

Se ha estudiado extensamente el papel de los polisacáridos de la matriz en la limitación a la penetración de antibióticos en biofilms formados por cepas mucoides de *P. aeruginosa*. En estos biofilms, la penetración de aminoglucósidos como gentamicina y tobramicina es considerablemente más lenta que la de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que los aminoglucósidos se unen al alginato (Gordon *et al.*, 1988; Nichols *et al.*, 1989; Van Acker *et al.*, 2014). Recientemente se encontró que los componentes de la matriz extracelular de biofilms de cepas no mucoides de *P. aeruginosa* también desempeñan un papel importante en la protección de las células contra los antibióticos. La tobramicina cargada positivamente, fue secuestrada en la periferia del biofilm, mientras que la ciprofloxacina con carga neutra, penetró fácilmente (Tseng *et al.*, 2013). En estas cepas no mucoides, se ha identificado que el exopolisacárido de carga neutra Psl puede secuestrar varios antibióticos, posiblemente debido a las interacciones electroestáticas. Billings y colaboradores (2013) encontraron que una mutación en la producción de Psl en estas cepas, aumentó la sensibilidad a los antibióticos cargados positivamente como la colistina, tobramicina y polimixina. El exopolisacárido Pel, también está involucrado en la protección contra los aminoglucósidos. Colvin y colaboradores (2012), reportaron que una mutación en la expresión de Pel en la cepa PA14, hizo al biofilm más susceptible a la tobramicina y gentamicina, sin afectar la susceptibilidad a la ciprofloxacina; mientras que la

sobreexpresión de Pel en las cepas PAO1 y PA14 condujo a una tolerancia elevada a la tobramicina y gentamicina.

### **3.5. BOMBAS DE EFLUJO**

Se ha estudiado el papel de las bombas de eflujo en la resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram negativas y su importancia en la supervivencia de subpoblaciones particulares en biofilms. Se ha reportado un aumento en la expresión de bombas de eflujo en biofilms. *P. aeruginosa* contiene al menos 12 operones que codifican para bombas que están involucradas en el eflujo de una amplia gama de sustratos, como aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, cloramfenicol, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Høiby *et al.*, 2010; Mah y O'Toole, 2001; Van Acker *et al.*, 2014).

### **3.6. PROTECCIÓN CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO**

Muchos de los antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, inducen la formación de radicales hidroxilo y crean un ambiente intracelular que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, sigla del inglés “reactive oxygen species”) altamente deletéreas para la célula. En los biofilms, son necesarias concentraciones más altas de antibióticos para inducir la producción de ROS y muchas veces no se forman en áreas con baja actividad metabólica o con condiciones anaeróbicas (Battán *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2014; Van Acker *et al.*, 2014). En *P. aeruginosa* y *E. coli*, la respuesta estricta (SR sigla del inglés “stringent response”) es un mecanismo regulador que coordina las adaptaciones fisiológicas a la falta de nutrientes y otros estreses. Algunos estudios han explorado el vínculo entre la SR y el control de las vías de estrés oxidativo y encontraron que la SR mantiene bajos los niveles de ROS, manteniendo niveles adecuados de catalasa y superóxido dismutasa (Khakimova *et al.*, 2013; Van Acker *et al.*, 2014).

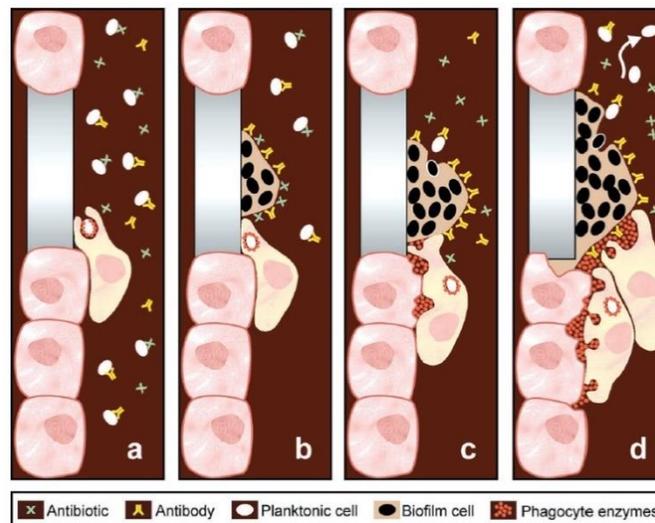
#### **4. PROBLEMAS QUE CAUSA LA FORMACIÓN DE UN BIOFILM**

Cualquier superficie biótica o abiótica animal, mineral o vegetal, tiene potencial para la colonización bacteriana y la formación de biofilm, incluyendo cascos de barcos, oleoductos, rocas en arroyos, lentes de contacto, implantes biomédicos y dispositivos transcutáneos, entre otros (Dunne, 2002).

Los biofilms son de gran interés en el área de la medicina. Se desarrollan sobre superficies inertes o sobre tejido vivo o muerto, y ocurren comúnmente en dispositivos médicos como catéteres, prótesis e implantes. Prácticamente todos los fluidos corporales proporcionan nutrientes para el crecimiento microbiano, por lo que en la mayoría de los dispositivos médicos, plásticos y metálicos, se podrían formar estas comunidades (Costerton *et al.*, 1995; Davey y O'toole, 2000). Por ejemplo, la formación de biofilm sobre las válvulas cardíacas es la principal causa de endocarditis en los pacientes que han sido sometidos a sustitución de válvula (Hyde *et al.*, 1998). Hasta ahora, los instrumentos médicos han sido esterilizados por autoclavado o con agentes gaseosos como el óxido de etileno y el dióxido de cloro. Sin embargo, la corrosión y la adhesión y crecimiento microbianos se producen dentro del cuerpo humano, dificultando los tratamientos de las superficies de los dispositivos para prevenir o destruir la adhesión celular. Los revestimientos con protectores catódicos y la aplicación de un campo eléctrico han sido utilizados para prevenir la corrosión y la formación de biofilms en superficies metálicas y catéteres (de Carvalho, 2007).

Además, los biofilms son responsables de diversas enfermedades como la otitis media y juegan un rol importante en la fibrosis quística, en la enfermedad del legionario y la formación de placa dental, entre otras. La formación de estas comunidades sésiles y su resistencia a los agentes antimicrobianos son la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas. Alrededor del 90% de las infecciones en humanos y el 65% de las infecciones nosocomiales son debidas a biofilms de acuerdo a los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos. Los antibióticos estándar son más efectivos contra las células planctónicas, dejando que las

formas sésiles se propaguen y se difundan nuevamente al terminar el tratamiento, dando como resultado la reaparición de los síntomas. Generalmente, el sistema inmunológico no puede controlar las infecciones causadas por biofilms. Las células bacterianas sésiles liberan antígenos y estimulan la producción de anticuerpos, pero éstos no son eficaces contra las bacterias dentro del biofilm y pueden causar daño a los tejidos circundantes (**Figura 6**) (Costerton *et al.*, 1999; Davey y O’toole, 2000).



**Figura 6.** Diagrama de un biofilm en un implante. **A.** Las bacterias planctónicas pueden ser eliminadas por anticuerpos y fagocitos y son susceptibles a antibióticos. **B.** Los biofilm formados sobre una superficie son resistente a anticuerpos, fagocitos y antibióticos. **C.** Los fagocitos son atraídos por el biofilm; no pueden fagocitar las bacterias, pero liberan enzimas fagocíticas. **D.** Las enzimas liberadas dañan el tejido circundante. Finalmente, se liberan células planctónicas del biofilm, lo que causa diseminación e infección en tejidos vecinos.

En la industria, además de causar problemas en la higiene, los biofilms pueden causar pérdidas de energía, corrosión y bloqueos en los condensadores, refrigerantes, circuitos de agua y tubos de intercambio de calor, entre otros. En la industria alimentaria, reducen la vida útil del alimento y aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades. Afectan industrias como las cerveceras, lácticas y cárnicas, entre otras. Actualmente, las estrategias de control microbiano no son lo suficientemente eficaces para proporcionar una

erradicación completa de los biofilms sin afectar las cualidades del producto (Chmielewski y Frank, 2003; Tiina y Gun, 1992).

## **5. ERRADICACIÓN Y CONTROL DE BIOFILMS**

Se han realizado muchos estudios para la erradicación y control de los biofilms. Lo primero y más importante es prevenir la formación de éstos mediante la limpieza y desinfección periódica, la limitación de nutrientes, el control de la temperatura, el diseño de equipos, la selección de materiales superficiales que no favorezcan la adhesión y la incorporación de productos antimicrobianos o modificación de las propiedades fisicoquímicas de las superficies (de Carvalho, 2007; Chmielewski y Frank, 2003; Srey *et al.*, 2013). La remoción y erradicación de biofilms ya establecidos requiere de tratamientos más severos, entre los que se encuentra el uso de biocidas altamente oxidantes y aplicación de fuerzas mecánicas, pero la mayoría de las veces no es posible eliminarlos. Los métodos convencionales de control de bacterias en vida libre por medios químicos, físicos o biológicos son a menudo ineficaces para biofilms, ya que las células sésiles muestran propiedades diferentes a las planctónicas y son resistentes a casi todas las formas de esterilización. Si un biofilm se enfrenta a altas concentraciones de un producto antimicrobiano, las células susceptibles serán erradicadas, pero algunas células pueden ser resistentes, lo que permitiría que el biofilm sobreviva y se desarrolle nuevamente (Stewart y Costerton, 2001).

Muchos productos químicos diferentes pueden usarse en la limpieza y desinfección, incluyendo agentes tensioactivos o productos alcalinos. La eficacia de los desinfectantes está limitada por la presencia de material orgánico como grasas, carbohidratos y materiales a base de proteínas. Además, el pH, la temperatura, la dureza del agua, los inhibidores químicos, la concentración y el tiempo de contacto son factores importantes que influyen en la eficacia de la desinfección (Srey *et al.*, 2013).

Para erradicar un biofilm ya establecido, el biocida o desinfectante debe penetrar o disolver las EPS y tener acceso a las células microbianas. Hay muchos tipos de desinfectantes incluyendo cloro, peróxido de hidrógeno, yodo, ozono, ácido peracético, entre otros (Chmielewski y Frank, 2003; Simões *et al.*, 2006; Srey *et al.*, 2013). El hipoclorito de sodio es un compuesto químico que se ha utilizado para desinfectar superficies. Toté y colaboradores (2010), reportaron su actividad sobre la reducción de la matriz y las células de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El peróxido de hidrógeno, es uno de los desinfectantes más utilizado por su alta capacidad oxidante y la producción de radicales libres. Se ha reportado su uso como desinfectante contra algunos biofilms (de Carvalho, 2007; Srey *et al.*, 2013; Toté *et al.*, 2010). El ozono, es un agente antimicrobiano con propiedades oxidantes que puede romper la membrana celular (Khadre *et al.*, 2001). La inactivación bacteriana por el ozono es un proceso complejo debido a que éste ataca numerosos constituyentes celulares incluyendo proteínas, lípidos de la membrana celular, peptidoglicanos, enzimas y ácidos nucleicos (Ishizaki *et al.*, 1981; Khadre *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 1995). Se han informado reducciones significativas de algunos biofilms tratados con ozono (Dosti *et al.*, 2005; Srey *et al.*, 2013). El ácido peracético es un agente antimicrobiano altamente oxidante que no puede ser desactivado por catalasa y peroxidasas. Pero, a pesar de sus propiedades como agente antimicrobiano, se ha reportado que éste es ineficaz contra los biofilms (Królasik *et al.*, 2010; Toté *et al.*, 2010). Muchos de estos desinfectantes no logran disolver completamente la matriz y penetrar hasta las células, por lo que no erradican el biofilm. Además, la mayoría de estos productos químicos no son adecuados para muchas aplicaciones y pueden generar productos tóxicos o mutagénicos, por lo que representan un peligro para el medio ambiente y la salud humana (Brelles-Mariño, 2012; Simões *et al.*, 2010).

Otra técnica utilizada para el control de biofilm es la ultrasonificación. Esta técnica genera ciclos de ondas de alta y baja presión en el líquido sonicado que pueden romper las paredes celulares. Además, Peterson y Pitt (2000), reportaron que el ultrasonido aumentó la eficacia de los antibióticos contra biofilms de *E. coli*. Propusieron que el ultrasonido mejora la difusión del oxígeno en la matriz del biofilm, lo que permite mayor actividad celular dentro del biofilm y facilita la acción de los antibióticos. La desventaja de esta técnica es que es

difícil de aplicar en la industria y en muchos dispositivos médicos, debido a sus costos, a la limitación en el tamaño de la muestra a sonicar y además, no todos los dispositivos pueden ser sonicados.

Se han utilizado detergentes a base de enzimas para el control de biofilms. Debido a la heterogeneidad de las EPS, es necesaria una mezcla de enzimas para su degradación. Generalmente, se han utilizado proteasas y enzimas hidrolizantes de polisacáridos. Además, se ha reportado la combinación de enzimas con surfactantes, tensioactivos y antimicrobianos para mejorar su eficacia contra los biofilm. Sin embargo, el uso de enzimas es limitado debido a los altos costos de estas (de Carvalho, 2007; Meyer, 2003; Simões *et al.*, 2010).

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y pueden proporcionar un enfoque altamente específico, no tóxico y factible para controlar y erradicar biofilms; pero es una tecnología que aún está siendo desarrollada y son necesarios más estudios (Sillankorva *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 2004). La infección de las células del biofilm por los fagos está condicionada por su composición química y factores ambientales como temperatura, etapa de crecimiento, medio de cultivo y concentración de fagos. Sillankorva y colaboradores (2004), encontraron que los fagos eliminaron hasta un 80% de las células de un biofilm de *P. fluorescens*.

La existencia de interacciones entre especies y la producción de metabolitos pueden ayudar a prevenir la formación de biofilms y podrían proporcionar una nueva línea de estrategias eficaces para su control, pero son necesarios más estudios para su aplicación. Por ejemplo, los sideróforos son un factor de virulencia en muchos microorganismos y puede actuar como molécula de biocontrol. Gram (1993), encontró que los sobrenadantes de un cultivo de *Pseudomonas* spp. inhibieron el crecimiento de *Shewanella putrefaciens*. Otro ejemplo es la producción de moléculas de señalización celular. Una buena comprensión del fenómeno de quórum sensing y la identificación de productos que puedan inhibirlo se podrían utilizar para el control de biofilms (Simões *et al.*, 2010).

El uso de calor húmedo y presión en autoclaves es un método barato para muchas aplicaciones. Sin embargo, no puede aplicarse a todas las situaciones o a todos los materiales, como es el caso de algunos dispositivos médicos, prótesis y materiales termosensibles o de tejidos vivos como quemaduras. Los productos químicos, como el óxido de etileno, permiten la desinfección a baja temperatura, pero suelen ser mutagénicos y carcinogénicos (Brelles-Mariño, 2012).

Otra tecnología que se ha utilizado es la radiación gamma. Este método puede aplicarse en algunos casos, pero no en todos. Requiere equipos e instalaciones especiales y personal altamente capacitado, lo cual lo hace costoso; además de dañar en cierta medida la superficie de los objetos y afectar las propiedades de los polímeros. Por otro lado, la radiación UV no alcanza a penetrar a través del biofilm, ya que la profundidad de acción de los fotones UV se limita a una capa de 1  $\mu\text{m}$  (Moisan *et al.*, 2001).

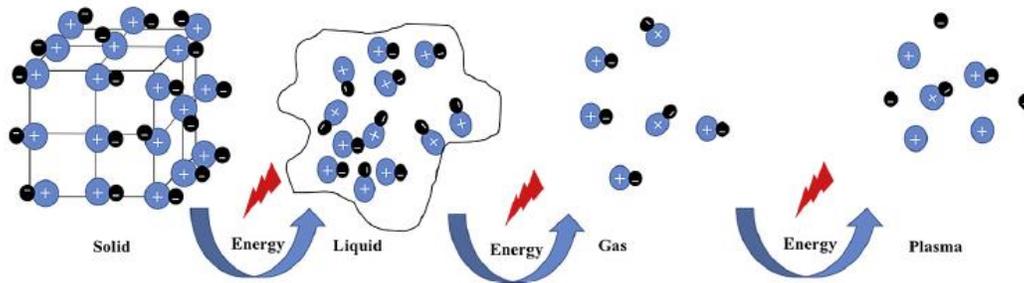
En casi todos los campos afectados por los biofilms se buscan enfoques para su prevención, remoción y eliminación, ya que ninguna estrategia es efectiva en todos los casos. La mayor resistencia de los biofilm a los tratamientos convencionales aumenta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control. Una técnica alternativa para la inactivación de biofilms es el uso de plasmas no térmicos de descarga de gases, también llamado plasma frío a presión atmosférica. El plasma, ofrece una buena alternativa a los métodos convencionales de esterilización, ya que contiene una mezcla de agentes reactivos como radicales libres, partículas cargadas y fotones UV, entre otros; conocidos por su potencial de descontaminación frente a microorganismos (Becker *et al.*, 2005; Abramzon *et al.*, 2006; Akishev *et al.*, 2008, 2009). Además, podría ser una técnica apropiada para la esterilización de material termosensible ya que trabaja a temperaturas relativamente bajas ( $\leq 50$  °C), y es segura tanto para el operador como para el paciente (Moisan *et al.*, 2001).

## 6. PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFERICA

El plasma fue descubierto por primera vez en 1897 por William Crookes (Crookes, 1878) y en 1929 este término fue introducido en la física (Tonks y Langmuir, 1929). Es considerado como el cuarto estado de la materia, donde con el aumento del nivel de energía, el estado de la materia pasa de sólido a líquido, a gaseoso y finalmente a plasma (**Figura 7**) (Liao *et al.*, 2017). El plasma es un gas ionizado (total o parcialmente) que posee átomos, iones, electrones, fotones y átomos en sus estados fundamentales o excitados. Según la temperatura de los electrones ( $T_e$ ), se pueden agrupar en plasmas de baja temperatura ( $T_e$  entre  $10^4$  y  $10^5$  K) y de alta temperatura ( $T_e$  entre  $10^6$  y  $10^8$  K) (Bogaerts *et al.*, 2002; Fridman *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2017). El plasma de alta temperatura se encuentra en equilibrio térmico (los electrones están a casi la misma temperatura que las partículas pesadas como iones, moléculas neutras y átomos) y su temperatura alcanza valores de varios miles de grados Kelvin. En contraste, en el plasma de baja temperatura también llamado plasma frío, la mayor parte de la energía se transmite a los electrones y sólo la  $T_e$  alcanza valores altos. En este caso, las partículas neutras y los iones tienen una energía insignificante y permanecen fríos, dando como resultado una temperatura del gas baja ( $T_g \leq 50$  °C). Además, la presión en el plasma juega un papel importante en el equilibrio térmico: altas presiones en el gas implican muchas colisiones en el plasma y un alto intercambio de energía entre las especies, mientras que bajas presiones implican pocas colisiones, un bajo intercambio de energía y consecuentemente diferentes temperaturas entre la especies del plasma (Bogaerts *et al.*, 2002).

Los plasmas fríos generados a presión atmosférica consisten en varios agentes activos, como fotones UV, átomos y moléculas neutras o excitadas, iones negativos y positivos, radicales y electrones libres. Los agentes activos producidos dependen de los parámetros de generación de la descarga, como la composición del gas, caudal del flujo, humedad, temperatura y propiedades de excitación. Entre las especies reactivas se encuentran formas activas de moléculas y átomos de oxígeno (ROS), como oxígeno atómico (O), anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y ozono ( $O_3$ ); especies reactivas del nitrógeno (RNS, sigla del inglés “reactive nitrogen species”) como nitrógeno atómico (N), moléculas de nitrógeno excitado

(N<sub>2</sub>) y óxido nítrico (NO); y si hay humedad se puede generar H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>, ion o radical hidroxilo (OH<sup>-</sup> o OH•, respectivamente) y peróxidos (O<sub>2</sub><sup>-2</sup> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Scholtz *et al.*, 2015). Recientemente, estos plasmas han recibido mayor atención debido a su uso potencial en varias aplicaciones como fuentes de luz, modificación de superficies y descontaminación química y biológica (Ehlbeck *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2017; Scholtz *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Esquema de los estados de la materia. Al aumentar el nivel de energía las moléculas del sólido se liberan de su estructura cristalina y forman el estado líquido, que luego se dispersan en el espacio y pasan al estado gaseoso, y finalmente, con suficiente energía, el gas es ionizado y pasa al estado de plasma (Liao *et al.*, 2017).

En los últimos años, se han desarrollado varias tecnologías de esterilización no térmica, tales como el tratamiento a altas presiones, radiación gamma y ultravioleta, ultrasonido, campo eléctrico pulsado, agua electrolizada y plasmas fríos. Entre las técnicas de esterilización, estos plasmas son una nueva tecnología de esterilización con un enorme potencial debido a su alta eficiencia, mínimos efectos secundarios y a la mezcla de agentes activos con capacidad antimicrobiana. La baja temperatura de trabajo es la característica principal de los plasmas fríos, lo que permite el tratamiento de material termosensible y su uso sobre tejidos vivos. Además, no generan productos tóxicos, producen daños mínimos o nulos a los productos, son seguros tanto para el operador como para el paciente y son de bajo costo de operación (Laroussi, 2002; Liao *et al.*, 2017; Scholtz *et al.*, 2015). En medicina, han surgido como alternativa para tratar heridas crónicas e infecciones y regeneración de la piel, acelerar la coagulación de la sangre, tratamiento para el cáncer, aplicaciones odontológicas y desarrollo de nuevos fármacos (Fridman *et al.*, 2007, 2008; Keidar *et al.*, 2013; Sladek *et al.*, 2004; Stoffels, 2006).

## **6.1. GENERACIÓN DE PLASMAS FRÍOS A PRESIÓN ATMOSFÉRICA**

El plasma puede ser generado por diferentes métodos, incluyendo descarga de gases, fotoionización, radiación térmica y radiofrecuencias, entre otros. Entre estos métodos, la descarga de gases es la forma más común para generar los plasmas fríos. En la descarga de gases se da la ruptura de un gas neutro en presencia de un campo eléctrico externo. La energía del campo eléctrico es acumulada por los electrones a través de colisiones y solo una fracción de la energía es transferida a otras partículas, resultando en un estado no térmico del plasma. Las descargas se clasifican según el comportamiento temporal del campo eléctrico como descargas de corriente continua, alterna o pulsadas (Conrads y Schmidt, 2000; Liao *et al.*, 2017; Scholtz *et al.*, 2015).

Los dispositivos comunes para generar los plasmas fríos incluyen descarga de barrera dieléctrica (DBD), descarga de barrera resistiva (RBD), descarga corona, descarga lumínica, descarga de radiofrecuencia (RFD) y jet a presión atmosférica (APPJ). Actualmente, la DBD y el APPJ son los dispositivos más utilizados y estudiados, debido principalmente a su diseño simple y a la posibilidad de adaptarse a múltiples objetivos y requerimientos. La DBD, también llamada descarga silenciosa, tiene las ventajas de producir plasmas estables y uniformes y trabajar a una temperatura relativamente baja y a presión atmosférica. Mientras que el APPJ requiere un flujo de gas auxiliar para empujar las partículas activas generadas fuera del área del electrodo (Bourke *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2017; Scholtz *et al.*, 2015).

## **6.2. DBD**

Las DBD se conocen desde hace más de un siglo. Los primeros reportes fueron hechos en 1857 (Siemens, 1857) y la DBD fue investigada inicialmente por su producción de ozono. En la DBD se aplica una tensión alterna o pulsada entre dos electrodos separados por un espacio estrecho y donde al menos uno de los electrodos está cubierto por un material dieléctrico como vidrio o plástico. Existen muchas configuraciones de electrodos, pero las más comunes son planas o cilíndricas. Para generar esta descarga, es necesario un voltaje

de 1-100 kV y una frecuencia de 50 Hz a 1 MHz. Cuando el campo eléctrico en el espacio de la descarga es lo suficientemente alto, induce la rotura del gas y se generan un gran número de canales o filamentos de descarga individuales entre los electrodos. La descarga puede ser producida en aire ambiental o en un gas que fluye a través de los electrodos y puede aplicarse directa o indirectamente sobre la muestra (Conrads y Schmidt, 2000; Gaunt *et al.*, 2006; Kogelschatz, 2003; Laroussi, 2002; Ziuzina *et al.*, 2014).

En una DBD operada en aire, las condiciones de la descarga tienen que ser optimizadas para excitar y disociar las moléculas de oxígeno y nitrógeno. Inicialmente, la energía ganada por los electrones en el campo eléctrico se utiliza para generar estados atómicos y moleculares excitados. Luego, las reacciones químicas se inician principalmente por el impacto de los electrones con el oxígeno y nitrógeno. Las especies reactivas más comunes en este tipo de descarga son el ozono, el oxígeno atómico, el radical hidroxilo y diversas especies de óxidos de nitrógeno (NO, N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) entre otros ( Gaun, *et al.*, 2006; Kogelschatz, 2003).

## **7. INACTIVACIÓN MICROBIANA POR PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFERICA**

Los plasmas fríos a presión atmosférica han evolucionado rápidamente como tecnología para la descontaminación microbiana en superficies, dispositivos médicos, materiales termosensibles, aguas residuales y superficies de alimentos frescos y procesados (Afshari y Hosseini, 2013; Alkawareek *et al.*, 2012a; Bourke *et al.*, 2017; Rowan *et al.*, 2007). Desde el primer reporte de su aplicación como agente antimicrobiano (Menashi, 1968), se han investigado los procesos físicos, químicos y biológicos responsables de la esterilización (Ehlbeck *et al.*, 2011; Laroussi, 2002; Laroussi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Moisan *et al.*, 2001). La composición química de los plasmas fríos es compleja y los múltiples agentes reactivos juegan un papel, independientemente o en sinergia, en la inactivación microbiana (Bourke *et al.* 2017). La mayoría de los trabajos que estudian el efecto del plasma sobre las células bacterianas se han realizado con microorganismos planctónicos o esporas. Aunque

el rol de cada agente antimicrobiano y el proceso de inactivación aún no están claros y siguen en estudio (Graves, 2012; Moisan *et al.*, 2001, 2009; Yousfi *et al.*, 2014), se han propuesto algunos mecanismos de inactivación de células plantónicas por plasmas fríos a presión atmosférica, que pueden ser tanto biológicos como físicos.

Entre los mecanismos biológicos se encuentran el daño al ADN por la radiación UV, el daño oxidativo de la membrana y los componentes intracelulares como ADN, proteínas y carbohidratos; y más recientemente se ha planteado un mecanismo similar a la muerte celular programada. Se ha planteado que la degradación del material genético por radiación UV podría ser uno de los mecanismos de acción del plasma sobre los microorganismos. La luz UV, especialmente a alrededor de los 260 nm, puede resultar en la formación de dímeros de pirimidinas (timina-timina, timina-citosina o citosina-citosina); y dañar gravemente la capacidad de reparación y replicación del ADN. Los fotones de alta energía de la luz UV producen fuertes efectos bactericidas ya que su longitud de onda corresponde al máximo de absorción del ADN (Liao *et al.*, 2017; Moisan *et al.*, 2001, 2002). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la radiación UV no es el mecanismo principal y que muchas veces no tiene efecto sobre la erradicación microbiana, posiblemente debido a que la profundidad de acción de los fotones UV se limita a una capa de un micrómetro. Por lo cual, se ha propuesto que la luz UV tiene un efecto sinérgico con las demás especies activas del plasma (Dobrynin *et al.*, 2009; Laroussi y Leipold, 2004; Machala *et al.*, 2010; Pavlovich *et al.*, 2013; Scholtz *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo puede provocar daños en los lípidos, ADN, proteínas y carbohidratos. Un daño excesivo de estas macromoléculas puede llevar a que la célula no pueda repararse y consecuentemente representar la muerte celular (Cabiscol *et al.*, 2000; Gaunt *et al.*, 2006). De los componentes celulares, los lípidos de membrana, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, son los más vulnerables debido a su ubicación cerca de la superficie celular y su sensibilidad a las ROS. La peroxidación lipídica genera productos que son más cortos que los ácidos grasos insaturados iniciales, comprometiendo la integridad estructural de la membrana celular y creando un desequilibrio osmótico, que finalmente conlleva a la lisis celular (Gaunt *et al.*, 2006; Farr y Kogoma, 1991). El estrés oxidativo también induce

la modificación estructural de las proteínas, produciendo cambios funcionales que pueden alterar el metabolismo celular. Digel y colaboradores (2005), revelaron que la modificación química y la degradación de las proteínas de membrana causadas por la exposición al plasma, podrían ser causadas por los radicales hidroxilo generados. Además, durante la peroxidación lipídica se forman aldehídos que son muy reactivos y pueden causar daños en las proteínas. Además, las ROS puede causar numerosos tipos de lesiones en el ADN, a través de reacciones con las bases y azúcares (Berlett y Stadtman, 1997). Recientemente, se ha propuesto que uno de los mecanismos de inactivación microbiana puede ser la inducción de la muerte celular programada bacteriana, debida a la producción intracelular de ROS inducida por el plasma (Bayles, 2014; Li *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2017).

Entre los mecanismos físicos de erradicación microbiana por plasma frío, se encuentran la alteración electrostática y la electroporación. Se ha propuesto que las fuerzas electrostáticas producidas por la acumulación de partículas cargadas generadas a partir del plasma causan la disrupción de la membrana celular y consecuentemente la muerte de la célula. Cuando la fuerza electrostática aumenta y supera la resistencia a la tracción, la pared celular se desestabiliza y se agrieta fácilmente. Luego, las estructuras rígidas de la pared bacteriana se destruyen electrostáticamente debido a la repulsión mutua de los iones retenidos en la superficie celular (Lunov *et al.*, 2015; Mendiset *al.*, 2000). Además, el campo eléctrico al que se someten los microorganismos durante el tratamiento con plasma, genera un fenómeno llamado electroporación, donde se forman poros en la membrana celular, que conduce a la filtración del contenido y a la muerte del microorganismo (Laroussi, 2002; Lunov *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017).

Los mecanismos mencionados anteriormente se refieren a investigaciones realizadas sobre la erradicación bacteriana de células platónicas por plasma frío, mientras que los mecanismos que conducen a la inactivación de biofilms aún no están claros. Se han propuesto varias vías de inactivación, entre las que se encuentra la alteración de la integridad y disrupción de la membrana celular y los componentes celulares, reducción del espesor del biofilm y disminución de la cultivabilidad y actividad metabólica de las células

(Vandervoort *et al.*, 2008; Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2012; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Khan *et al.*, 2016).

La inactivación de biofilms mediante plasma se ha comenzado a estudiar desde mediados de la década pasada y el grupo de la Dra. Brelles-Mariño en la Universidad del Estado de California fue pionero en esta línea (Abramzon *et al.*, 2006, Brelles-Mariño *et al.*, 2005, Joaquín *et al.*, 2009; Kamgang *et al.*, 2007, Vandervoort *et al.*, 2008, Zelaya *et al.* 2010). Desde entonces, se ha incrementado el número de investigaciones dirigidas a entender la inactivación de biofilms mediante plasma, y muchas de ellas se han centrado en la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa* (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Zelaya *et al.*, 2010; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016; Ben Belgacem *et al.*, 2016; Modic *et al.*, 2017)

Aunque se ha reportado la eficiencia del plasma para la inactivación de biofilms, poco se sabe acerca de los mecanismos que explican este fenómeno. La aplicabilidad del método, tanto para distintos microorganismos como superficies, depende no solo de un mayor conocimiento acerca de los distintos tipos de dispositivos de generación de plasma, sus diferentes composiciones químicas y de las condiciones que resultan en inactivación del biofilm, sino también de los mecanismos que producen la inactivación celular. La hipótesis general de la presente tesis doctoral es que el plasma frío de descarga de gases representa una herramienta útil para la inactivación de biofilms de *P. aeruginosa*. Además, se espera dilucidar algunos de los aspectos de los mecanismos que explican la inactivación de biofilm por plasma.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Marino, G. (2006). Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34, 1304–1309.
2. Afshari, R., y Hosseini, H. (2013). Non-thermal plasma as a new food preservation method, Its present and future prospect. *J. Paramed. Sci.* 5, 1 ISSN 2008-4978.

3. Akishev, Y., Grushin, M., Karalnik, V., Trushkin, N., Kholodenko, V., Chugunov, V., Kobzev, E., Zhirkova, N., Irkhina, I., y Kireev, G. (2008). Atmospheric-pressure, nonthermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on surfaces. *Pure Appl Chem* 80, 1953–1969.
4. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012a). Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbio* 65, 381–384.
5. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Lavery, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012b). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS ONE* 7, e44289.
6. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
7. Battán, P.C., Barnes, A.I., y Albasa, I. (2004). Resistance to oxidative stress caused by ceftazidime and piperacillin in a biofilm of *Pseudomonas*. *Luminescence* 19, 265–270.
8. Bayles, K.W. (2014). Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. *Nat Rev Microbiol* 12, 63.
9. Becker, K., Koutsospyros, A., Yin, S.-M., Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J.C., y Brelles-Mariño, G. (2005). Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Control Fusion* 47, B513.
10. Ben Belgacem, Z., Carré, G., Boudifa, M., Charpentier, E., Cawe, B., y Gellé, M.P. (2016). Effectiveness of non-thermal O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> plasma on *P. aeruginosa* multilayer biofilms cultured on hydroxyapatite. *IRBM* 37, 68–74.
11. Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K., y Zehnder, A.J.B. (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 59, 3973–3977.
12. Billings, N., Millan, M.R., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., y Ribbeck, K. (2013). The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLOS Pathog* 9, e1003526.
13. Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., y van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim Acta B* 57, 609–658.
14. Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P.J., y Gilmore, B.F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol* 123, 308–324.
15. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., y Balaban, N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320–330.
16. Brelles-Mariño, G., Joaquin, J.C., Bray, J. y Abramzon, N. (2005). Gas discharge plasma as a novel tool for biofilm destruction. *En: Proceedings of the 2nd International Workshop on Cold Atmospheric Pressure Plasmas*. pp. 69-72. ISBN:908086692X.

17. Brelles-Mariño, G. (2012). Challenges in biofilm inactivation: the use of cold plasma as a new approach. *J Bioprocess Biotech* 2, 1–4.
18. Brelles-Mariño, G., y Boiardi, J.L. (1996). Nitrogen limitation of chemostat-grown *Rhizobium etli* elicits higher infection-thread formation in *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology* 142, 1067–1070.
19. Bryers, J.D. (1987). Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol Prog* 3, 57–68.
20. Bryers, J.D., y Ratner, B.D. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News* 70, 232–237.
21. Cabisco, E., Tamarit, J., y Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3, 3–8.
22. Carpentier, B., y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75, 499–511.
23. de Carvalho, C.C.C.R. (2007). Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Pat Biotechnol* 1, 49–57.
24. Chmielewski, R., y Frank, J. f. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2, 22–32.
25. Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., y Parsek, M.R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* 14, 1913–1928.
26. Conrads, H., y Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci Technol* 9, 441.
27. Costerton, J.W., Geesey, G.G., y Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci Am* 238, 86–95.
28. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., y Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711–745.
29. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
30. Crookes, W. (1878). Contributions to Molecular Physics in High Vacua. *Proc R Soc Lond* 28, 477–482.
31. Davey, M.E., y O’toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867.
32. Davey, M.E., Caiazza, N.C., y O’Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027–1036.
33. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., y Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
34. Davis, M.R., Muszyński, A., Lollett, I.V., Pritchett, C.L., Carlson, R.W., y Goldberg, J.B. (2013). Identification of the mutation responsible for the temperature-sensitive lipopolysaccharide o-antigen defect in the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate 2192. *J Bacteriol* 195, 1504–1514.
35. Digel, I., Temiz, A.A., Nishikawa, K., Cook, M., Kurulgan, E., y Artmann, G.M. (2005). Bactericidal effects of plasma-generated cluster ions. *Med Biol Eng Comput* 43, 800–807.

- 36.** Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., y Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11, 115020.
- 37.** Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881–890.
- 38.** Dosti, B., Guzel-Seydim, Z., y Greene, A.K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *Int J Dairy Technol* 58, 19–24.
- 39.** 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.
- 40.** Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15, 155–166.
- 41.** Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Woedtke, T. von, Brandenburg, R., Hagen, T. von dem, y Weltmann, K.-D. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys Appl Phys* 44, 013002.
- 42.** Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., y Dart, J.K.G. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye* 9, 102–109.
- 43.** Finkel, S.E., y Kolter, R. (2001). DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* 183, 6288–6293.
- 44.** Flemming, H.-C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633.
- 45.** Fletcher, M. (1991). The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol* 32, 53–85.
- 46.** Fletcher, M., y Loeb, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 37, 67–72.
- 47.** Fridman, A., Chirokov, A., y Gutsol, A. (2005). Non-thermal atmospheric pressure discharges : Cluster on dielectrics at meso and nano scales. *J Phys Appl Phys* 38, R1–R24.
- 48.** Fridman, G., Shereshevsky, A., Jost, M.M., Brooks, A.D., Fridman, A., Gutsol, A., Vasilets, V., y Friedman, G. (2007). Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 27, 163–176.
- 49.** Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A.B., Vasilets, V.N., y Fridman, A. (2008). Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 5, 503–533.
- 50.** Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., y Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res* 30, 1749–1758.
- 51.** Gabriel, A.A., Ugay, M.C.C.F., Siringan, M.A.T., Rosario, L.M.D., Tumlos, R.B., y Ramos, H.J. (2016). Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. *Innov Food Sci Emerg Technol* 36, 311–319.
- 52.** Garrett, T.R., Bhakoo, M., y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 18, 1049–1056.
- 53.** Gaunt, L.F., Beggs, C.B., y Georghiou, G.E. (2006). Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans. Plasma Sci* 34, 1257–1269.

54. Gordon, C.A., Hodges, N.A., y Marriott, C. (1988). Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 22, 667–674.
55. Gram, L. (1993). Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Appl Environ Microbiol* 59, 2197–2203.
56. Graves, D.B. (2012). The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J. Phys. Appl. Phys.* 45.
57. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., y Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95–108.
58. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., y Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322–332.
59. 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.
60. Irie, Y., Borlee, B.R., O'Connor, J.R., Hill, P.J., Harwood, C.S., Wozniak, D.J., y Parsek, M.R. (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 109, 20632–20636.
61. Ishizaki, K., Shinriki, N., Ikehata, A., y Ueda, T. (1981). Degradation of nucleic acids with ozone. I. degradation of nucleobases, ribonucleosides and ribonucleoside-5'-monophosphates. *Chem Pharm Bull* 29, 868–872.
62. Jahn, A., Griebe, T., y Nielsen, P.H. (1999). Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* 14, 49–57.
63. Jamasbi, R.J., y Taylor, N.M. (2010). Correlation between the lipopolysaccharide expression and adhesiveness of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lab Med* 41, 24–30.
64. Jensen, P.Ø., Briaies, A., Brochmann, R.P., Wang, H., Kragh, K.N., Kolpen, M., Hempel, C., Bjarnsholt, T., Høiby, N., y Ciofu, O. (2014). Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog Dis* 70, 440–443.
65. Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2009). Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology* 155, 724–732.
66. Kamgang, J.O., Briandet, R., Herry, J.M., Brisset, J.L. y Naïtali, M. (2007). Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air. *J Applied Microbiol* 103, 621–628
67. Keidar, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Ann Stepp, M., Srinivasan, P., Sandler, A., y Trink, B. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys Plasmas* 20, 057101.
68. Khadre, M. a., Yousef, A.E., y Kim, J.-G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J Food Sci* 66, 1242–1252.
69. Khakimova, M., Ahlgren, H.G., Harrison, J.J., English, A.M., y Nguyen, D. (2013). The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J Bacteriol* 195, 2011–2020.

- 70.** Khan, M.S.I., Lee, E.-J., y Kim, Y.-J. (2016). A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 6, 37072.
- 71.** Kinner, N.E., Balkwill, D.L., y Bishop, P.L. (1983). Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. *Appl Environ Microbiol* 45, 1659–1669.
- 72.** Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48, 1511–1524.
- 73.** Kogelschatz, U. (2003). Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem Plasma Process* 23, 1–46.
- 74.** Królasik, J., Zakowska, Z., Krepska, M., y Klimek, L. (2010). Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Pol J Microbiol* 59, 281–287.
- 75.** Kühn, M., Rickelt, L.F., y Thar, R. (2007). Combined imaging of bacteria and oxygen in biofilms. *Appl Environ Microbiol* 73, 6289–6295.
- 76.** Laroussi, M. (2002). Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30, 1409–1415.
- 77.** Laroussi, M., y Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* 233, 81–86.
- 78.** Laroussi, M., Alexeff, I., y Kang, W.L. (2000). Biological decontamination by nonthermal plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci* 28, 184–188.
- 79.** Lee, K., Paek, K., Ju, W.-T., y Lee, Y. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol Seoul Korea* 44, 269–275.
- 80.** Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem. Biokhimiia* 70, 267–274.
- 81.** Li, L., Zhang, H., y Huang, Q. (2015). New insight into the residual inactivation of *Microcystis aeruginosa* by dielectric barrier discharge. *Sci Rep* 5, 13683
- 82.** Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., and Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control* 75, 83–91.
- 83.** Lunov, O., Churpita, O., Zablotskii, V., Jäger, A., Dejneka, A., Deyneka, I.G., Meshkovskii, K., JagerI, A., Syková, E., Kubinová, Š., y Dejneka, A. (2015). Non-thermal plasma kills bacteria: scanning electron microscopy observations. *Appl Phys Lett* 106, 053703
- 84.** Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polívka, L., Syková, E., Dejneka, A., y Kubinová, Š. (2016). The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82, 71–83.
- 85.** Lyczak, J.B., Cannon, C.L., y Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2, 1051–1060.
- 86.** Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., y Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLOS Pathog* 5, e1000354.

- 87.** Machala, Z., Chládková, L., y Pelach, M. (2010). Plasma agents in bio-decontamination by dc discharges in atmospheric air. *J. Phys. Appl Phys* 43, 222001.
- 88.** Mah, T.-F.C., y O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34–39.
- 89.** Mai-Prochnow, A., Bradbury, M., Ostrikov, K., y Murphy, A.B. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS ONE* 10, e0130373.
- 90.** Mann, E.E., y Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36, 893–916.
- 91.** Marshall, K.C., Stout, R., y Mitchell, R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology* 68, 337–348.
- 92.** McEldowney, S., y Fletcher, M. (1987). Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch Microbiol* 148, 57–62.
- 93.** Menashi, W.P. (1968). Treatment of surfaces. U.S. Patent No.3383163 A
- 94.** Mendis, D.A., Rosenberg, M., y Azam, F. (2000). A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci* 28, 1304–1306.
- 95.** Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeterior.Biodegrad* 51, 249–253.
- 96.** Modic, M., McLeod, N.P., Sutton, J.M., y Walsh, J.L. (2017). Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 49, 375–378.
- 97.** Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., y Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 226, 1–21.
- 98.** Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., y Saoudi, B. (2002). Plasma sterilization. methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 74, 349–358.
- 99.** Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., y Saoudi, B. (2009). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 74, 349–358.
- 100.** 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.
- 101.** Monds, R.D., y O'Toole, G.A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 17, 73–87.
- 102.** Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A., y O'Toole, G.A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 595.
- 103.** Mosier, A.P., Kaloyeros, A.E., y Cady, N.C. (2012). A novel microfluidic device for the in situ optical and mechanical analysis of bacterial biofilms. *J Microbiol Methods* 91, 198–204.
- 104.** Nichols, W.W., Evans, M.J., Slack, M.P.E., y Walmsley, H.L. (1989). The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 135, 1291–1303.
- 105.** Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop* 41–47.

- 106.** Pavlovich, M.J., Sakiyama, Y., Clark, D.S., y Graves, D.B. (2013). Antimicrobial synergy between ambient-gas plasma and UVA treatment of aqueous solution. *plasma process. Polym* 10, 1051–1060.
- 107.** Persat, A., Nadell, C.D., Kim, M.K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., Gitai, Z., y Stone, H.A. (2015). The mechanical world of bacteria. *Cell* 161, 988–997.
- 108.** Peterson, R.V., y Pitt, W.G. (2000). The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 17, 219–227.
- 109.** Pringle, J.H., y Fletcher, M. (1983). Influence of Substratum Wettability on Attachment of Freshwater Bacteria to Solid Surfaces. *Appl Environ Microbiol* 45, 811–817.
- 110.** Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K., y Stewart, P.S. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189, 4223–4233.
- 111.** Rey, R.P., Sellés, A.N., Baluja, C., y Otero, M.L. (1995). Ozonation kinetics of glucosamine and n-acetyl glucosamine in aqueous medium. *Ozone Sci Eng* 17, 463–467.
- 112.** Rowan, N.J., Espie, S., Harrower, J., Anderson, J.G., Marsili, L., y MacGregor, S.J. (2007). Pulsed-Plasma Gas-Discharge Inactivation of Microbial Pathogens in Chilled Poultry Wash Water. *J Food Prot* 70, 2805–2810.
- 113.** Safari, A., Habimana, O., Allen, A., y Casey, E. (2014). The significance of calcium ions on *Pseudomonas fluorescens* biofilms – a structural and mechanical study. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Res* 30, 859–869.
- 114.** Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., y Julak, J. (2015). Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv* 33, 1108–1119.
- 115.** Siemens, W. (1857). Ueber die elektrostatische induction und die verzögerung des stroms in flaschendrähnen. *Ann Phys* 178, 66–122.
- 116.** Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I., y Azeredo, J. (2004). Bacteriophage  $\Phi$  S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling* 20, 133–138.
- 117.** Simões, M., Simões, L.C., Machado, I., Pereira, M.O., y Vieira, M.J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *food bioprod. Process* 84, 338–345.
- 118.** Simões, M., Simões, L.C., y Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 573–583.
- 119.** Singh, R., Paul, D., y Jain, R.K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol* 14, 389–397.
- 120.** Sladek, R.E.J., Stoffels, E., Walraven, R., Tielbeek, P.J.A., y Koolhoven, R.A. (2004). Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Trans Plasma Sc.* 32, 1540–1543.
- 121.** Spoering, A.L., y Gilmore, M.S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 9, 133–137.
- 122.** Srey, S., Jahid, I.K., y Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585.

123. Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J Med Microbiol* 292, 107–113.
124. Stewart, P.S. (2003). Diffusion in Biofilms. *J Bacteriol* 185, 1485–1491.
125. Stewart, P.S., y Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
126. Stewart, P.S., y Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199–210.
127. Stewart, P.S., Peyton, B.M., Drury, W.J., and Murga, R. (1993). Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 59, 327–329.
128. Stoffels, E. (2006). Gas plasmas in biology and medicine. *J Phys Appl Phys* 39.
129. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. d., y Lappin-Scott, H. m. (1998). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* 85, 19S–28S.
130. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
131. Sutherland, I.W. (2001a). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9, 222–227.
132. Sutherland, I.W. (2001b). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9.
133. Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., y Tait, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 232, 1–6.
134. Sydnor, E.R.M., y Perl, T.M. (2011). Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev* 24, 141–173.
135. Tiina, M.-S., y Gun, W. (1992). Biofilm formation in the industry: a review. 8, 573-603.
136. Tolker-Nielsen, T., y Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 40, 75–84.
137. Tonks, L., y Langmuir, I. (1929). Oscillations in ionized gases. *Phys Rev* 33, 195–210.
138. Toté, K., Horemans, T., Berghe, D.V., Maes, L., y Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 76, 3135–3142.
139. Tseng, B.S., Zhang, W., Harrison, J.J., Quach, T.P., Song, J.L., Penterman, J., Singh, P.K., Chopp, D.L., Packman, A.I., y Parsek, M.R. (2013). The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* 15, 2865–2878.
140. Van Acker, H., Van Dijck, P., y Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol* 22, 326–333.
141. Vandervoort, K.G., Abramzon, N., y Brelles-Marino, G. (2008). Plasma interactions with bacterial biofilms as visualized through atomic force microscopy. *IEEE Trans Plasma Sci* 36, 1296–1297.

142. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. PLoS ONE 9, e108512.
143. Venezia, R.A., Orrico, M., Houston, E., Yin, S.-M., y Naumova, Y.Y. (2008). Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. Infect Control Amp Hosp Epidemiol 29, 430–436.
144. Watnick, P., y Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. J Bacteriol 182, 2675–2679.
145. Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., and Stewart, P.S. (2004). Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 70, 6188–6196.
146. Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., y Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295, 1487–1487.
147. Wilson, R., y Dowling, R.B. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. Thorax 53, 213–219.
148. Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., Huang, C.-T., y McFeters, G.A. (1998). Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. Appl. Environ Microbiol 64, 4035–4039.
149. Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153, 1318–1328.
150. Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A., y Eichwald, O. (2014). Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. Fundam Clin Pharmacol 28, 123–135.
151. Zelaya, A., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2012). Battling bacterial biofilms with gas discharge plasma. In Plasma for Bio-decontamination, medicine and food security, Z. Machala, K. Hensel, y Y. Akishev, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–148.
152. Zelaya, A.J., Stough, G., Rad, N., Vandervoort, K., y Brelles-Marino, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces, and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. IEEE Trans Plasma Sci 38, 3398–3403.
153. Zhang, X., y Bishop, P.L. (2003). Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. Chemosphere 50, 63–69.
154. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Boehm, D., y Bourke, P. (2014). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Plasma Med 4, 137-152.
155. Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., y Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. PLOS ONE 10, e0138209.

# **OBJETIVOS**

## **Hipótesis y objetivo general.**

Los métodos convencionales de destrucción de bacterias en vida libre, tales como agentes antimicrobianos y desinfección, suelen ser inefectivos con bacterias que forman un biofilm. Por lo tanto, la capacidad de destruir estas estructuras demanda el desarrollo de nuevas técnicas. La hipótesis de trabajo es que el plasma de descarga de gases es útil para la inactivación de biofilms bacterianos. Como objetivo general, se espera dilucidar algunos de los aspectos del mecanismo o los mecanismos que explica/n la inactivación de biofilm por plasma.

## **Objetivos específicos.**

Resultados del grupo de la Dra. Brelles-Mariño en la Universidad del Estado de California demostraron la eficacia del plasma para la inactivación de biofilms. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos que explican el fenómeno. Para que el método sea aplicable a distintos microorganismos y superficies, es preciso conocer las condiciones y los mecanismos a través de los cuales las bacterias son inactivadas. Además, en los experimentos preliminares se utilizó solo un sistema de producción de plasma y es posible que otros sean económicamente más ventajosos. En colaboración con los Dres. Kelly y Grondona (INFIP- UBA/CONICET) se desarrolló una fuente de plasma que opera en aire comprimido y se probó con los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

**Objetivo específico 1):** Estudiar la adhesión de biofilms bacterianos en distintas superficies abióticas y condiciones de crecimiento.

**Objetivo específico 2):** Estudiar la arquitectura de los biofilms bacterianos en combinaciones selectas superficie abiótica-condición de crecimiento.

**Objetivo específico 3):** Estudiar la cinética de inactivación de biofilms luego del tratamiento con plasma.

**Objetivo específico 4):** Estudiar la fisiología del biofilm luego del tratamiento con plasma.

**Objetivo específico 5):** Evaluar el efecto del plasma frío a presión atmosférica sobre la penetración de antibióticos en biofilms de *P. aeruginosa*.

# **CAPÍTULO 1**

# **CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM DE *Pseudomonas aeruginosa* EN TRES SUPERFICIES ABIÓTICAS, DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DOS CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

## **RESUMEN**

Aunque los microorganismos pueden existir de forma independiente como células en vida libre o planctónicas, generalmente se encuentran formando parte de manera integral de una comunidad. Un biofilm es una comunidad microbiana en la cual los microorganismos están adheridos irreversiblemente a un sustrato o interfase y entre sí, e inmersos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellos mismos han producido. Los microorganismos dentro del biofilm expresan características fenotípicas diferenciales con respecto a sus células planctónicas respectivas. Los biofilms pueden estar formados por una única especie o bien por múltiples especies de un tipo de microorganismo, por microorganismos de distintos géneros, o por diferentes grupos de organismos (hongos, algas y protozoos). La mayoría de los biofilms bacterianos de origen natural son de especies mixtas. Sin embargo, los biofilms de una sola especie, como los de *Pseudomonas aeruginosa*, son clínicamente importantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de biofilms de *P. aeruginosa* en varios escenarios, incluyendo medio rico y mínimo, tres superficies abióticas y dos sistemas de cultivo diferentes (discontinuo y continuo). No se ha reportado en la literatura la influencia de este conjunto de factores en la formación de biofilms de *P. aeruginosa*.

La mejor formación de biofilm, medida como adhesión a la superficie, se obtuvo en acero inoxidable, medio mínimo y cultivo continuo, mientras que el vidrio fue la mejor superficie para el cultivo batch. Proponemos que la fijación inicial de las células al vidrio se produce por interacciones hidrofílicas entre los óxidos del borosilicato y las estructuras superficiales de las bacterias, más la contribución de los iones del medio de cultivo mínimo. A medida que se agotan los nutrientes en el cultivo batch, los ramnolípidos que son sintetizados a lo largo del desarrollo del biofilm, dejan de ser producidos y la concentración de exopolisacáridos alcanza una meseta. En el cultivo continuo, el suministro de nutrientes

favorece la síntesis de exopolisacáridos y ramnolípidos y las interacciones hidrofóbicas entre los ramnolípidos y las superficies serían frecuentes. La rugosidad de los cupones de acero inoxidable en comparación con los de policarbonato podría explicar la mejor adhesión a esta superficie. La adhesión bacteriana y la formación de biofilm son procesos multifactoriales, donde algunos factores contribuyen en etapas tempranas y otros en etapas posteriores.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un nuevo campo de investigación ha surgido en las últimas décadas: la Sociomicrobiología. Este término fue acuñado por Parsek y Greenberg para referirse a los sistemas de comunicación y el comportamiento cooperativo en el mundo microbiano (Parsek y Greenberg, 2005). Aunque los microorganismos pueden existir de forma independiente como células planctónicas, generalmente se encuentran formando parte de manera integral de una comunidad. Se ha establecido por observación directa de una amplia variedad de hábitats naturales, que la mayoría de los microbios persisten unidos a superficies formando un ecosistema dentro de un biofilm estructurado (Davey y O'Toole, 2000). Los biofilms o biopelículas bacterianas son comunidades microbianas adheridas entre sí y a superficies o interfases, e inmersas en una matriz compuesta principalmente de exopolisacáridos con algunas proteínas y ácidos nucleicos (Costerton *et al.*, 1999). El biofilm puede diferenciarse de otros agregados de microorganismos, ya que por definición se forma en interfases. Aunque cualquier interfase puede ser colonizada, el tipo más común de biofilm se forma en interfase sólido-líquido (Wimpenny, 2000).

Los biofilms bacterianos representan un serio problema por su impacto en distintos aspectos sanitarios e industriales y en general, en todos los aspectos de nuestra vida. Los biofilms colonizan prótesis, contaminan productos, dañan equipos y taponan tuberías. Además, son responsables de enfermedades como la otitis media, la enfermedad del legionario, y juegan un rol muy importante en la fibrosis quística. También producen caries dentales y placa dental, entre otras (Donlan y Costerton, 2002). Los Institutos Nacionales

de Salud (NIH, sigla del inglés de “The National Institutes of Health”) y el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos informaron respectivamente que el 90 por ciento de las infecciones en humanos y el 65 por ciento de las infecciones nosocomiales se deben a biofilms.

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que afecta a personas inmunocomprometidas, a pacientes con respiradores y causa infecciones de tejido quemado. Este patógeno coloniza, junto con *Burkholderia cenocepacia*, el tejido pulmonar de los pacientes con fibrosis quística, contribuyendo a su mortalidad (Tümmler y Kiewitz, 1999). *P. aeruginosa* forma biofilms en los implantes y en los tejidos muertos o vivos, contribuyendo así a una variedad de infecciones persistentes (Davey *et al.*, 2003). El agua es uno de los principales depósitos ambientales de *P. aeruginosa*. En las unidades de terapia intensiva, se ha asociado brotes de este patógeno a grifos de agua contaminados con *P. aeruginosa*. Este organismo es una preocupación debido a la morbilidad y mortalidad asociadas y al impacto en los costos de atención en salud (Sydnor y Perl, 2011). La mayoría de los biofilms de origen natural son de especies mixtas, sin embargo, los monoespecies son de interés debido a su importancia clínica. Los biofilms monoespecies formados por *P. aeruginosa* se han convertido en un modelo para el estudio de este aspecto de la biología microbiana (Davey *et al.*, 2003).

La formación del biofilm comienza cuando las células bacterianas en vida libre (planctónicas) reconocen una superficie, se adsorben reversiblemente y luego se adhieren firme e irreversiblemente. Posteriormente, las células unidas crecen, se dividen y reclutan otras células planctónicas adicionales que se unen a las que ya están en la superficie. Este proceso da lugar al desarrollo de un biofilm maduro con una arquitectura particular en la cual los racimos de células y los canales del agua entre ellos forman un sistema circulatorio primitivo (Kolter y Losick, 1998). La formación del biofilm en una superficie particular es un proceso multifactorial que depende no sólo del tipo de organismo que compone la biopelícula. No se puede obtener una imagen clara de la adhesión sin considerar los efectos del sustrato, la hidrodinámica del medio acuoso, las características del medio y las diversas propiedades de la superficie celular (Donlan, 2002). Además, a lo largo del desarrollo del

biofilm, las células pueden producir sustancias que también desempeñan un papel en la estructura o el mantenimiento del biofilm, por ejemplo, los ramnolípidos, cuya producción es importante para mantener los canales sin colonizar garantizando las interacciones célula-célula y la unión de células bacterianas a las superficies (Davey *et al.*, 2003).

La comprensión de la adhesión bacteriana a las superficies requiere información detallada sobre el sustrato, los componentes del medio, el tiempo de crecimiento y el régimen de cultivo. En el presente trabajo se evaluaron las condiciones de superficie abiótica, medio de cultivo y sistema de crecimiento que condujeron a la formación de un biofilm robusto. El objetivo fue estimar indirectamente la formación de biofilm en varios escenarios diferentes, incluyendo dos medios de cultivo (rico y mínimo, LB y AB respectivamente), tres superficies abióticas (policarbonato, acero inoxidable y borosilicato), dos sistemas de cultivo (batch y continuo) y dos tiempos de crecimiento para el cultivo batch (uno y tres días). Aunque hay muchas contribuciones utilizando diferentes superficies abióticas o diferentes medios de cultivo en la literatura, no se ha reportado la influencia de este conjunto de factores en la formación de biofilm.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Microorganismo y medios de cultivo

Se utilizó la bacteria *P. aeruginosa* cepa PAO1, **que se mantuvo en medio LB** (Bertani, 1951) **con glicerol 30% v/v a -70 °C. Se repicó mensualmente en medio solido LB o AB suplementado con 0.5% p/v de glucosa** (Clark y Maaløe, 1967) **y se incubó a 37 °C.** Se utilizaron dos medios de cultivo para el desarrollo del biofilm, uno rico (LB) y uno mínimo (AB) cuyas composiciones se detallan a continuación:

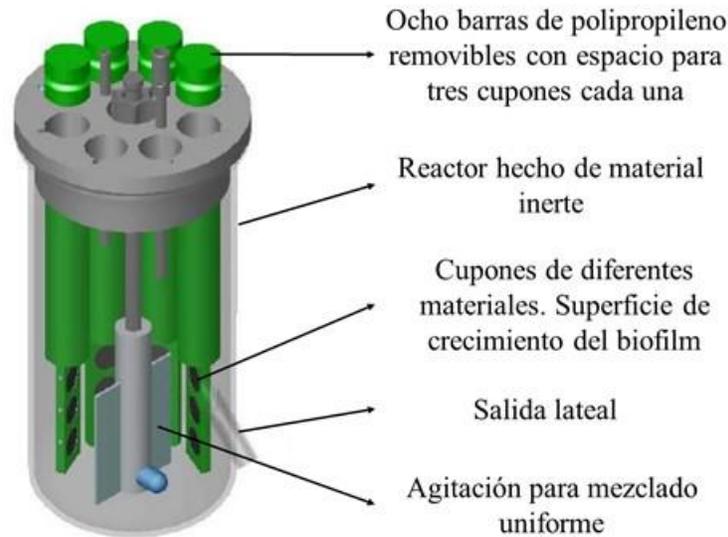
*Medio líquido LB:* 1 g/L de glucosa, 5 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona y 5 g/L de extracto de levadura

*Medio liquido AB:* Solución A (volumen final de 200 mL de H<sub>2</sub>O): 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de NaCl, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.011 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; solución B (volumen final de 800 mL H<sub>2</sub>O): 0.2 g de MgCl<sub>2</sub>, 0.01 g CaCl<sub>2</sub> y 0.0005 g de FeCl<sub>3</sub> · 7 H<sub>2</sub>O. Las soluciones A y B se esterilizaron por separado, se mezclaron y se adicionó glucosa 0.5 % p/v (stock 2 M previamente esterilizado por filtración).

## 2.2 Inoculación del reactor

Se preparó un preinóculo a partir de una placa fresca de *P. aeruginosa* PAO1 crecida en medio solido LB o AB, inoculando 10 mL del medio líquido estéril correspondiente (LB o AB) con una colonia aislada del cultivo sólido. Se incubó durante 24 hs a 37 °C y 180 rpm. Se inoculó el reactor de modo tal que la densidad óptica a 550 nm (DO<sub>550nm</sub>) en el seno del reactor fuera igual a 0.1. El reactor se incubó a 37°C y 130 rpm.

Para todos los experimentos, se utilizó un reactor de biofilm CDC (BioSurface Technologies Corp., Bozeman, Montana, EEUU). El reactor cuenta con un recipiente de vidrio de 1 L de capacidad y ocho barras de polipropileno removibles, cada una con espacios para tres cupones de 12.7 mm de diámetro, para un total de 24 eventos de muestreo independientes en cada ensayo. También cuenta con una paleta de agitación que se acciona magnéticamente y una sonda de temperatura (**Figura 1**). Tanto la agitación como la temperatura se controlaron mediante una plataforma de calentamiento con agitación magnética.



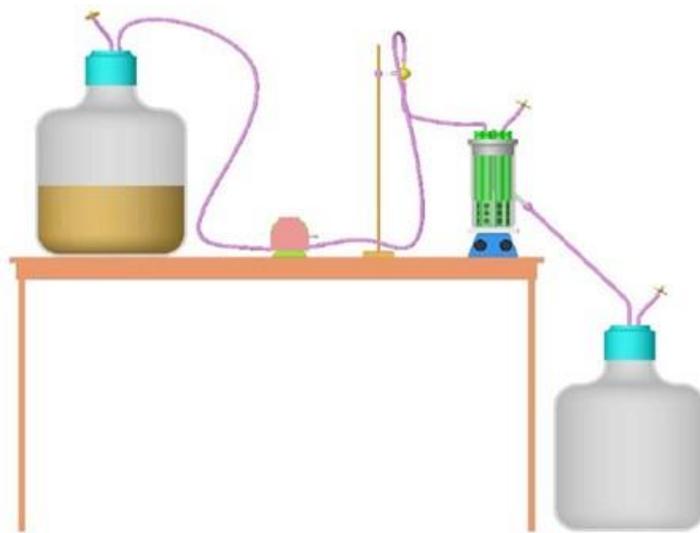
**Figura 1.** Esquema del reactor de biofilm CDC (CDC Biofilm Reactor Operator Manual, Biosurface Technologies Corp., 2003).

Previo a la preparación del reactor, se lavaron los cupones en una solución de detergente neutro, se sonicaron durante 10 min a 30 °C y se enjuagaron con agua. Se repitió el procedimiento hasta eliminar todo el detergente. En cada barra del reactor se pusieron cupones de acero inoxidable 316L, policarbonato y/o borosilicato (vidrio). Se esterilizó el reactor con 500 mL de medio líquido correspondiente (LB o AB) para la condición batch o 350 mL de medio líquido para el cultivo continuo. Se esterilizaron por separado cupones de cada material para usarlos como control (cupones sin biofilm).

### 2.3 Crecimiento del biofilm en batch y en sistema continuo

Luego de la inoculación del reactor con el preinóculo de *P. aeruginosa* como se indica en 2.2, el biofilm creció en cultivo batch sobre cupones de acero inoxidable, policarbonato o vidrio durante 24 o 72 hs, a una temperatura de 37 °C y una agitación de 130 rpm. Una vez concluido el plazo de crecimiento, se removieron asépticamente las barras y se lavaron dos veces en solución fisiológica estéril para eliminar las bacterias que no formaban parte del biofilm. Luego se removieron de la misma manera los cupones de las barras y se secaron al aire del flujo laminar durante 10 min para la posterior evaluación de la formación de biofilm sobre los mismos.

Para el cultivo del biofilm en sistema continuo, se inoculó el reactor como se indica en **2.2** y se utilizaron las mismas superficies abióticas que fueron usadas para el ensayo en batch. El reactor se operó en batch durante 24 hs y luego se prosiguió a operar el sistema en continuo bombeando medio fresco LB o AB y retirando el medio gastado al mismo flujo (**Figura 2**). Se operó el reactor como un quimiostato, con un volumen de cultivo constante de 350 mL y una DO<sub>550</sub> constante durante 24 hs. Se trabajó con un flujo promedio de 2.6 mL/min para el medio LB y de 0.6 mL/min para el AB, en ambos casos el flujo fue controlado con una bomba LKB BROMMA 2120 Varioperpex. Después de que se cumpliera la condición de 24 hs de DO<sub>550</sub> constante, se procedió a procesar los cupones de la forma indicada para el cultivo en batch.

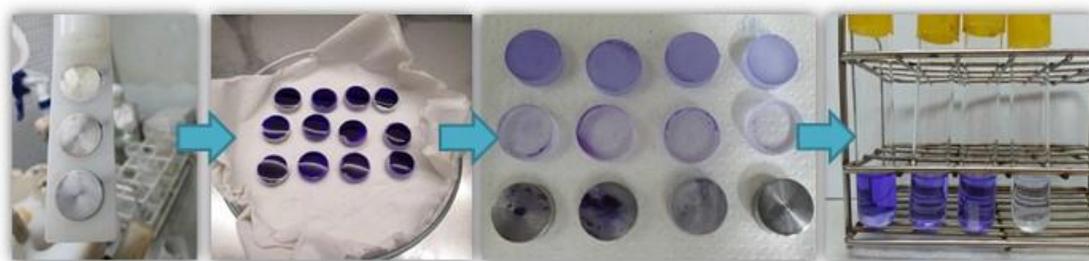


**Figura 2.** Esquema del sistema continuo para el crecimiento del biofilm de *P. aeruginosa* (CDC Biofilm Reactor Operator Manual, Biosurface Technologies Corp., 2003)

#### **2.4 Capacidad de formación de biofilm**

La capacidad de formación de biofilm en tres superficies abióticas, dos regímenes de cultivo y dos medios de cultivo fue indirectamente evaluada por medio de la técnica de tinción de cristal violeta (O'Toole y Kolter, 1998, con modificaciones).

Para cuantificar el biofilm formado, el mismo se tiñe con cristal violeta, un colorante básico no específico que se une a moléculas cargadas negativamente presentes en la superficie bacteriana. Los cupones se secaron al aire durante 10 min, se cubrió su superficie con 28  $\mu\text{L}$  de solución al 1% p/v de cristal violeta durante 15 min en oscuridad (tapados con papel aluminio). Como control, se incluyó un cupón estéril de cada material sin biofilm. Se retiró el exceso de cristal violeta con una toalla de papel estéril, y para eliminar el colorante no adherido a los cupones, éstos se lavaron en solución fisiológica y se dejaron secar al aire del banco de flujo laminar. Se introdujo cada cupón en un tubo con 3 mL de alcohol etílico al 95% v/v para eluir el colorante incorporado a las células del biofilm y se midió la  $\text{DO}_{540}$  (**Figura 3**). La concentración de cristal violeta en la solución es proporcional a la cantidad de bacterias adheridas e indirectamente, a la cantidad de biofilm sobre la superficie.



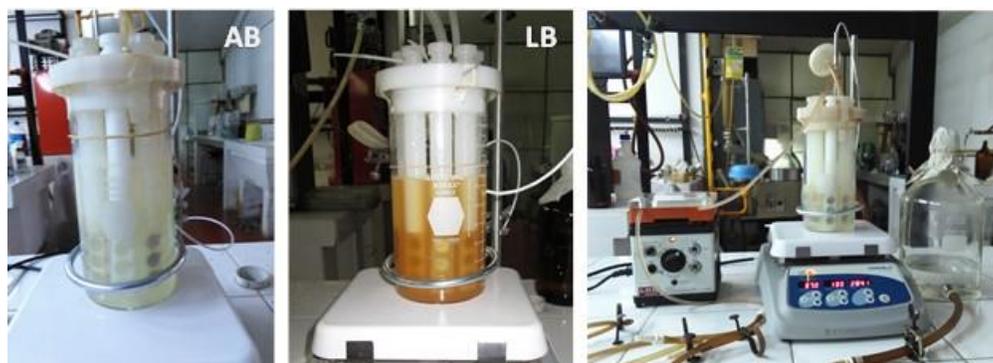
**Figura 3.** Secuencia del procesamiento de los cupones para la evaluación indirecta de la formación de biofilm de *P. aeruginosa* en tres superficies abióticas. De arriba hacia abajo en la figura: policarbonato, vidrio y acero inoxidable.

## 2.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANOVA). La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Levene. La comparación entre medias se realizó mediante el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Se utilizó el software STATISTICA de la compañía Statsoft® (Copyright © StatSoft, 2011). Se realizaron cuatro experimentos independientes y cada uno por duplicado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

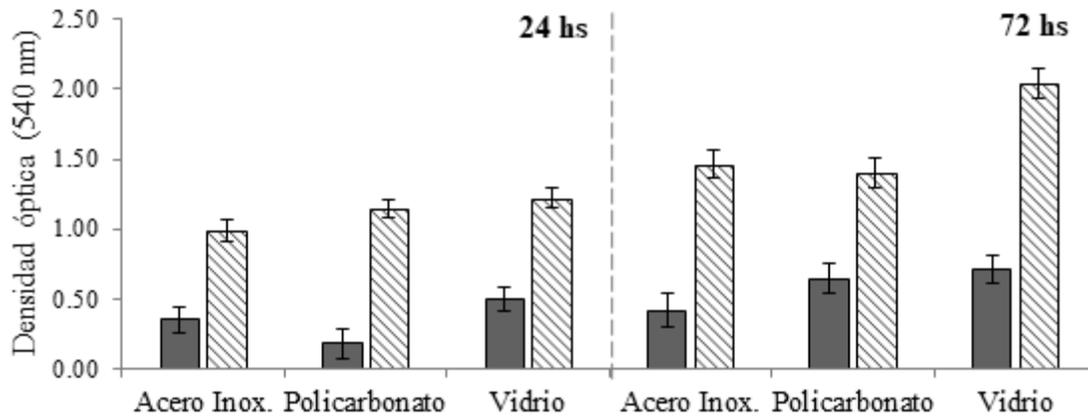
Se evaluó la formación de biofilm indirectamente con el método de tinción por cristal violeta bajo diferentes condiciones de crecimiento: dos medios de cultivo (rico y mínimo, LB y AB respectivamente), tres superficies de crecimiento (acero inoxidable, policarbonato y vidrio) y dos sistemas de cultivo (batch y continuo) (**Figura 4**). Una mayor DO se interpretó como una mejor adhesión de las células a la superficie abiótica y por lo tanto una mayor cantidad de biofilm sobre la misma.



**Figura 4.** Crecimiento del biofilm de *P. aeruginosa* en sistema de cultivo batch en medios AB o LB (primeras dos fotos) y cultivo continuo en medio AB (tercera foto).

#### 3.1 Capacidad de formación de biofilm de *P. aeruginosa* en batch durante 24 o 72 hs

En la **Figura 5** se muestra la  $DO_{540}$  de una solución de colorante cristal violeta liberado de las células del biofilm de *P. aeruginosa* formado en la superficie de los cupones de diferentes materiales. El biofilm se produjo en cultivo batch durante 24 o 72 hs utilizando medio LB o medio AB. Se observó una mayor formación de biofilm en el caso del cultivo en batch de 72 hs. Tanto para el cultivo en batch de 24 hs como para el de 72 hs, se presentó una mejor formación de biofilm cuando se utilizó medio mínimo AB, independientemente del tipo de superficie abiótica utilizada. En el caso del cultivo en batch de 72 hs, la formación de biofilm sobre superficie de vidrio es claramente superior.

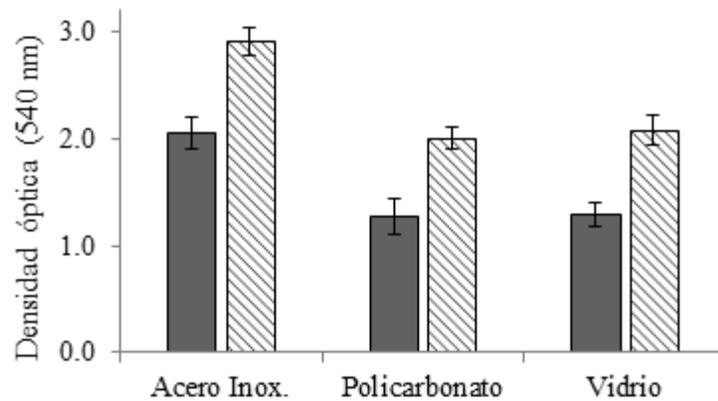


**Figura 5.** Densidad óptica ( $DO_{540}$ ) de una solución de colorante cristal violeta liberado de las células del biofilm de *P. aeruginosa* crecido sobre acero inoxidable, policarbonato y vidrio, en cultivo batch durante 24 o 72 hs en medio LB (barras grises) y AB (barras rayadas).

Independientemente de la superficie y el medio utilizado, los biofilms fueron más robustos después de 72 hs de crecimiento, lo que indica que después de la fijación inicial de las células, el biofilm sigue incorporando más células a través del tiempo.

### 3.2 Capacidad de formación de biofilm de *P. aeruginosa* en sistema continuo

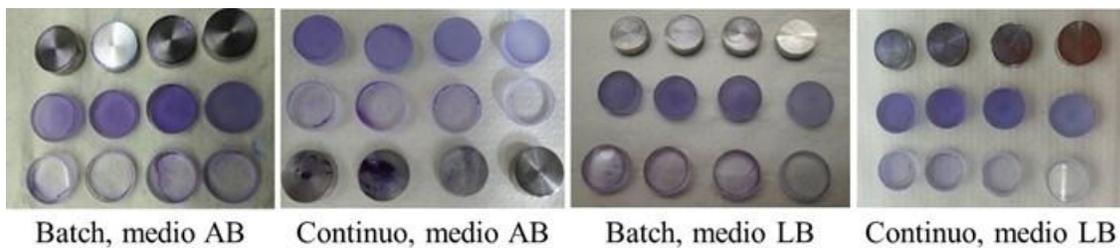
La  $DO_{540}$  de una solución de colorante cristal violeta liberado de las células del biofilm de *P. aeruginosa* crecido en cultivo continuo durante 24 hs en las tres superficies evaluadas se muestra en la **Figura 6**. Se observa una mayor capacidad de formación de biofilm en el medio AB para las tres superficies utilizadas, siendo acero inoxidable y medio AB las mejores condiciones de crecimiento del biofilm para el cultivo continuo.



**Figura 6.** Densidad óptica (DO<sub>540</sub>) de una solución de colorante cristal violeta liberado de las células del biofilm de *P. aeruginosa* crecido sobre acero inoxidable, policarbonato y vidrio, en sistema continuo durante 24 hs, en medio LB (barras grises) y AB (barras rayadas).

### 3.3 Comparación de la capacidad de formación de biofilm de *P. aeruginosa* en batch y cultivo continuo

Se muestra la comparación gráfica de los cupones teñidos con cristal violeta para todas las condiciones evaluadas: medio de cultivo, sistema de cultivo y superficie (**Figura 7**)



**Figura 7.** Biofilm teñido con cristal violeta y formado sobre cupones de diferentes materiales (acero inoxidable, policarbonato y vidrio, de arriba hacia abajo respectivamente), en dos medios de cultivo (AB y LB) y dos sistemas de cultivo diferentes (batch y continuo).

Tanto para las tres superficies como para los dos sistemas de cultivo se observó mayor formación de biofilm en el medio mínimo AB (**Figuras 5 y 6**). El medio rico LB se compone de glucosa, triptona y extracto de levadura; mientras que el medio de cultivo

mínimo consiste en una mezcla de sales iónicas y glucosa, proporcionando una mayor concentración de iones al medio ambiente. Se ha reportado que características del medio acuoso como pH, niveles de nutrientes, fuerza iónica y temperatura, pueden desempeñar un papel en la velocidad de unión microbiana al sustrato (Donlan, 2000). Fletcher (1988a, 1988b) encontró que un aumento en la concentración de varios cationes (sodio, calcio, lantano, hierro férrico) afecta la unión de *Pseudomonas fluorescens* a las superficies de vidrio, posiblemente al reducir las fuerzas repulsivas entre las células bacterianas cargadas negativamente y la superficie de vidrio. La presencia de sodio, calcio, ion férrico y magnesio en el medio AB puede explicar la mejor unión de las células a las tres superficies obtenidas con este medio.

En la **Tabla 1** se analiza y compara estadísticamente ( $\alpha=0.05$ ) la capacidad de formación de biofilm en medio rico (LB) y mínimo (AB). De los gráficos y tablas se desprende claramente que la formación del biofilm bacteriano depende de la superficie abiótica en la que crece y que fue significativamente mejor en cupones de acero inoxidable y en cultivo continuo para ambos medios de cultivo.

**Tabla 1.** Análisis de varianza y comparación de medias entre las diferentes condiciones: cultivo batch de 24 o 72 hs y cultivo continuo, medios de cultivo (AB y LB) y tres superficies de crecimiento (acero inoxidable, policarbonato y vidrio).

Medio	Sistema de cultivo	Superficie		
		Acero inoxidable	Policarbonato	Vidrio
AB	Batch 24hs	0.98 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.07 <sup>a</sup>
	Batch 72hs	1.46 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.04 ± 0.10 <sup>c</sup>
	Continuo	2.91 ± 0.13 <sup>d</sup>	2.00 ± 0.11 <sup>e</sup>	2.08 ± 0.14 <sup>e</sup>
LB	Batch 24hs	0.35 ± 0.10 <sup>f</sup>	0.18 ± 0.11 <sup>f</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>f</sup>
	Batch 72hs	0.42 ± 0.12 <sup>g</sup>	0.64 ± 0.11 <sup>g</sup>	0.71 ± 0.10 <sup>g</sup>
	Continuo	2.05 ± 0.15 <sup>h</sup>	1.27 ± 0.16 <sup>i</sup>	1.29 ± 0.11 <sup>i</sup>

Letras iguales representan que no hay diferencia significativa ( $p>0.05$ )

Letras diferentes representan diferencia significativa ( $p<0.05$ )

Los biofilms producidos en cultivo continuo fueron consistentemente mejores que los del cultivo batch, ya que las densidades ópticas fueron al menos una unidad más alta independientemente de la superficie y el medio utilizado. Un cultivo batch es un sistema cerrado que comienza con un inóculo que crece hasta que los nutrientes se agotan o se acumulan productos tóxicos en el reactor, por lo que la concentración bacteriana varía con el tiempo. En un cultivo continuo siempre hay una entrada de medio fresco mientras se retira el medio gastado, proporcionando un flujo continuo de nutrientes para un crecimiento microbiano óptimo. Por lo general, el uso del cultivo continuo resulta en un entorno más homogéneo que conduce a un mejor biofilm (Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014). En el cultivo batch se presentó una mejor adhesión a la superficie del vidrio, aunque no siempre las diferencias fueron significativas (**Figura 5** y **Tabla 1**). Los biofilms de 72 hs mostraron una mayor adherencia en comparación con los de 24 hs, independientemente del medio de cultivo utilizado, pero nuevamente, la formación de biofilm fue mejor en superficies de vidrio ( $DO_{540}$  de  $2.04 \pm 1.02$  en medio AB) (**Figura 5** y **Tabla 1**). En ambos casos, la peor formación de biofilm se presentó sobre el acero inoxidable. En cuanto al cultivo continuo (**Figura 6**), la formación de biofilm fue mejor en acero inoxidable comparado con las otras dos superficies para ambos medios de cultivo. Para el medio de cultivo AB, la formación de biofilm en los cupones de vidrio fue similar en el cultivo continuo y en el batch de 72 hs; además, la adhesión en policarbonato y acero inoxidable fue mayor que en LB en todos los casos.

La adhesión bacteriana a las superficies y la posterior formación del biofilm son indudablemente multifactoriales. Algunos factores contribuyen más en las etapas iniciales del proceso de adhesión y otros en etapas posteriores del desarrollo del biofilm o a veces a lo largo de todo el proceso. En las bacterias juegan un papel muy importante los apéndices de superficie tales como fimbrias, pili, flagelos o fibras de exopolisacáridos, pero también la envoltura bacteriana externa puede desempeñar un papel en el proceso de adhesión. Además, los metabolitos bacterianos producidos a alta densidad celular y regulados por “quorum sensing” también pueden contribuir al proceso. Las características de la superficie del sustrato tales como rugosidad, hidrofobicidad o hidrofiliidad son también importantes para la adhesión. Los componentes del medio de cultivo también podrían afectar las

propiedades superficiales del sustrato y el proceso de adhesión.

Existen varios tipos de interacciones que podrían afectar los procesos de unión de las células en medios acuosos. Las fuerzas electrostáticas, ya sea de atracción o repulsión entre célula y superficie, pueden desempeñar un papel inicial (Marshall *et al.*, 1971) y los polímeros extracelulares podrían unir la brecha entre bacteria y sustrato, dando como resultado una adhesión más permanente. Fletcher y Loeb (1979) reportaron una baja fijación de *Pseudomonas* sp al vidrio, estructura química que contiene oxianiones en su superficie, y una alta fijación a superficies hidrófobas. En nuestro caso, la adhesión al vidrio fue menor en cultivo continuo y mayor en cultivo batch. Estos resultados sugieren un papel de las fuerzas electrostáticas o interacciones hidrofílicas al inicio del proceso de fijación en batch. El régimen continuo probablemente ofrece condiciones nutricionales bajo las cuales la interacción electrostática inicial se sustituye por una interacción hidrofóbica más permanente.

Las propiedades hidrófilas de las bacterias Gram-negativas se deben principalmente a la presencia del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de membrana externa. Los mutantes de *P. fluorescens* que carecen del antígeno O se adhieren mejor a las superficies hidrofóbicas (Williams y Fletcher, 1996). Otro componente bacteriano que puede jugar un papel en la adhesión y la unión es el exopolisacárido excretado por las bacterias que forman biofilm y que componen la matriz. Diferentes microorganismos producen diferentes cantidades de exopolisacáridos y las cantidades aumentan con la edad del biofilm (Leriche *et al.*, 2000). La producción de exopolisacárido se ve afectada por el estado nutricional de la célula bacteriana, depende en gran medida de la disponibilidad de la fuente de carbono (tanto dentro como fuera de la célula) y del balance entre el carbono y otros nutrientes limitantes. Se ha demostrado que un medio de cultivo con exceso de carbono disponible y limitación de otros nutrientes como nitrógeno, potasio o fosfato, puede promover su síntesis (Brelles-Mariño y Boiardi, 1996; Sutherland, 2001). El crecimiento bacteriano lento también mejora su producción (Sutherland, 2001). Debido a su estructura ácida, el exopolisacárido puede unirse a las superficies hidrófilas, pero también puede asociarse con iones metálicos, cationes divalentes y otros componentes del medio de cultivo (Flemming *et al.*, 2007). En

el caso de *P. aeruginosa* PAO1, cepa no mucoide, se ha reportado que la matriz está compuesta de los polisacáridos alginato, Psl y Pel. El polímero aniónico alginato, compuesto de ácido manurónico y gulurónico, se considera el principal exopolisacárido de la matriz (Govan y Deretic, 1996; Periasamy *et al.*, 2015). Mencionamos antes que el medio mínimo AB utilizado es rico en cationes divalentes que pueden interactuar con el exopolisacárido excretado por el biofilm.

Los microorganismos producen diversos tipos de compuestos a través del metabolismo y algunos de ellos no están necesariamente presentes en etapas tempranas del cultivo, siendo los ramnolípidos un ejemplo de estos compuestos. Se cree que los ramnolípidos se adsorben a la superficie de la célula de *P. aeruginosa* haciéndola hidrofóbica (Davey *et al.*, 2003). Por lo tanto, las interacciones hidrofílicas iniciales entre el LPS bacteriano o el exopolisacárido ácido podrían ser sustituidas más tarde por interacciones hidrofóbicas a través de ramnolípidos. Además de las propiedades fisicoquímicas de una superficie, las características de la misma son también un factor importante a considerar en el cuadro general de la fijación bacteriana a superficies. Las superficies más rugosas ofrecen un área superficial más alta y menores fuerzas de corte. Se demostró que el grado de colonización microbiana parece aumentar a medida que aumenta la rugosidad de la superficie (Characklis y Marshall, 1990). La rugosidad fue evaluada mediante microscopía de fuerza atómica y el acero inoxidable fue el más rugoso, ya que las vetas dejadas por la maquinaria de producción de los cupones eran fácilmente visibles (Vandervoort y Brelles-Mariño, inédito). Gabriel y colaboradores (2016), evaluaron la adhesión de biofilms de *P. aeruginosa* sobre dos tipos de acero inoxidable (316 y 304) con tres acabados diferentes (superficie pulida lisa, con líneas de pulido y sin pulir). Encontraron que la velocidad de fijación del biofilm fue más afectada por el tipo de acabado que por el tipo de acero inoxidable. Los resultados mostraron que, para los dos tipos de acero inoxidable, el acabado superficial sin pulir presentó la población celular más alta, mientras que el pulido liso obtuvo la población celular más baja.

Aunque muchos investigadores afirman que los microorganismos se adhieren más rápidamente a las superficies hidrófobas y no polares como el teflón y otros plásticos que a

los materiales hidrófilos como el vidrio o los metales, los resultados de la literatura a veces son contradictorios porque no hay métodos estandarizados para determinar la hidrofobicidad. Pringle y Fletcher (1983) reportaron que no existe un patrón genérico de unión a las superficies, aunque la mayoría de los microorganismos aislados mostraron una preferencia por las superficies hidrófobas. Parece que algún tipo de interacción hidrofóbica se produce entre la célula bacteriana y la superficie que permitiría a la célula superar las fuerzas repulsivas y poder unirse irreversiblemente (Donlan, 2002). Estudios de laboratorio sobre la adhesión inicial de una pseudomonas marina han demostrado que estas bacterias tienen una preferencia por las superficies de baja energía o hidrofóbicas (Fletcher y Floodgate, 1973; Fletcher y Loeb, 1979).

De las tres superficies que hemos probado, el policarbonato es hidrófobo y el vidrio es hidrófilo. En cuanto al acero inoxidable, el fabricante declara que basándose en los ángulos de contacto de la literatura, la superficie de partida es hidrófila ya que los discos de acero inoxidable se cortan a partir de varillas de acero inoxidable 316L y no se añaden recubrimientos o tratamientos de superficie después del corte (Warwood, comunicación personal). Determinamos los ángulos de contacto para los tres materiales:  $70^\circ \pm 5^\circ$  para el acero inoxidable,  $55^\circ \pm 5^\circ$  para el vidrio y  $70^\circ \pm 5^\circ$  para el policarbonato. Por lo tanto, el acero inoxidable y el policarbonato no difieren en la hidrofobicidad. No podemos concluir si los cupones originales de acero inoxidable eran hidrófilos y luego se volvieron más hidrófobos probablemente debido a la deposición de material en las vetas del cupón dejadas por la maquinaria de producción.

De todas las condiciones probadas, **el mejor biofilm se obtuvo sobre superficie de acero inoxidable, medio mínimo AB y cultivo continuo**. Mientras que la mejor superficie para el crecimiento de biofilms en batch fue vidrio y medio AB. Basándonos en estos últimos resultados proponemos un modelo en el que la fijación inicial de las células al vidrio se produce a través de la interacción de las superficies bacterianas y el sustrato hidrófilo, probablemente por enlaces de hidrógeno entre los óxidos presentes en el borosilicato ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{BaO}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ) y estructuras superficiales en la célula bacteriana tal como el antígeno O. El medio AB, rico en iones, también contribuiría al proceso. A medida

que se agotan los nutrientes en el medio de cultivo en el sistema batch, se puede reducir la producción de algunos metabolitos como los ramnolípidos y la cantidad de exopolisacárido excretada puede alcanzar una meseta.

En el cultivo continuo, la entrada de medio fresco en el reactor asegura un suministro continuo de nutrientes, especialmente de la fuente de carbono, y por lo tanto otros compuestos formados a través del metabolismo bacteriano pueden contribuir a etapas posteriores de formación de biofilm después de la fijación inicial. La cantidad de exopolisacárido producido será favorecida por el suministro continuo de la fuente de carbono y la edad del biofilm. Posteriormente, las interacciones hidrofóbicas entre compuestos recién sintetizados tales como ramnolípidos y superficies hidrófobas como policarbonato y acero inoxidable pueden ser frecuentes. El hecho de tener una mejor adhesión al acero inoxidable en comparación con el policarbonato podría estar relacionado con la rugosidad de los cupones de acero inoxidable que "atrapan" microorganismos entre las vetas de la superficie dejadas por la maquinaria de producción.

#### **4. CONCLUSIÓN**

En el presente capítulo se evaluó la formación de biofilms de *P. aeruginosa* en varios escenarios, incluyendo medio rico y mínimo, tres superficies abióticas y dos sistemas de cultivo (discontinuo y continuo). La mejor formación de biofilm se obtuvo en acero inoxidable, medio mínimo AB y cultivo continuo. La adhesión bacteriana a la superficie y la posterior formación del biofilm son indudablemente multifactoriales. Algunos de estos factores contribuyen más en las etapas iniciales del proceso de adhesión, otros en las etapas posteriores en el desarrollo del biofilm o a veces a lo largo de todo el proceso.

#### **5. BIBLIOGRAFÍA**

1. Brelles-Mariño, G., y Boiardi, J.L. (1996). Nitrogen limitation of chemostat-grown *Rhizobium etli* elicits higher infection-thread formation in *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology* 142, 1067–1070.

2. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293–300.
3. Clark, D. J., y Maaløe, O. (1967). DNA replication y the division cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 23, 99–112.
4. Characklis, W.G., McFeters, G.A., y Marshall, K.C. (1990). Physiological ecology in biofilm systems. *In* *Biofilms*, W.G. Characklis, y K.C Marshall, eds. (New York: John Wiley & Sons), pp. 341–94
5. CDC biofilm reactor operator's manual. (2003). Center for biofilm engineering, Montana State University, Bozeman, MT.
6. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
7. Davey, M.E., y O'Toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847–867.
8. Davey, M.E., Caiazza, N.C., y O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027–1036.
9. Donlan, R.M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* 46, S47-52.
10. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881–890.
11. Flemming, H.C., Neu, T.R., y Wozniak, D.J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J Bacteriol* 189, 7945–7947.
12. Fletcher, M. (1988a). The application of interference reflection microscopy to the study of bacterial adhesion to solid surfaces. *In* *Biodeterioration* 7, D.R. Houghton, R.N. Smith, y H.O.W. Eggins, eds. (Springer Netherlands), pp. 31–35.
13. Fletcher, M. (1988b). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol* 170, 2027–2030.
14. Fletcher, M., y Floodgate, G.D. (1973). An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *Microbiology* 74, 325–334.
15. Fletcher, M., y Loeb, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 37, 67–72.
16. Gabriel, A.A., Ugay, M.C.C.F., Siringan, M.A.T., Rosario, L.M.D., Tumlos, R.B., and Ramos, H.J. (2016). Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. *Innov Food Sci Emerg* 36, 311–319.
17. Govan, J.R., y Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60, 539–574.
18. Kolter, R., y Losick, R. (1998). One for all and all for one. *Science* 280, 226–227.
19. Leriche, V., Sibille, P., y Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66, 1851–1856.
20. Marshall, K.C., Stout, R., y Mitchell, R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology* 68, 337–348.

21. O'Toole, G.A., y Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449–461.
22. Parsek, M.R., y Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing y biofilms. *Trends Microbiol* 13, 27–33.
23. Periasamy, S., Nair, H.A.S., Lee, K.W.K., Ong, J., Goh, J.Q.J., Kjelleberg, S., y Rice, S.A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development y stress tolerance. *Front Microbiol* 6, 851.
24. Pringle, J.H., y Fletcher, M. (1983). Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 45, 811–817.
25. Sydnor, E.R.M., y Perl, T.M. (2011). Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev* 24, 141–173.
26. Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9.
27. Tümmler, B., y Kiewitz, C. (1999). Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today* 5, 351–358.
28. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
29. Williams, V., y Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol* 62, 100–104.
30. Wimpenny, J. (2000). An overview of biofilms as functional communities. In *Community structure and co-operation in biofilms*, Fifty-Ninth Symposium of the Society for General Microbiology. D. G. Allison, P. Gilbert, H. M. Lappin-Scott y M. Wilson (Eds.), Cambridge, University Press, pp.1-24.

## **CAPÍTULO 2**

## INACTIVACIÓN DE BIOFILMS DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIANTE PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

### RESUMEN

Los biofilms son más resistentes a los métodos típicos de descontaminación o esterilización que las bacterias en estado planctónico, por lo tanto, se requieren técnicas alternativas para su inactivación. El plasma, cuarto estado de la materia, contiene una mezcla de partículas cargadas, especies químicas reactivas y radiación UV y es una alternativa apropiada ya que estos agentes reactivos son conocidos por su capacidad de descontaminación bacteriana. El objetivo de este capítulo fue evaluar una fuente de plasma recientemente desarrollada, que opera en aire, sobre biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable, en medio AB y cultivo continuo. Se probaron dos dispositivos para generar plasma, uno de descarga tipo barrera dieléctrica (DBD) y otro tipo jet. Se seleccionó el dispositivo DBD ya que con éste se obtuvo un menor porcentaje de células inactivadas debido al simple flujo de aire (sin descarga de plasma). Se probaron dos formas de generar la descarga en el dispositivo DBD: utilizando aire ambiental circundante o con flujo de aire humidificado. Los biofilms se erradicaron después de un tratamiento de 15 min con plasma para ambas condiciones, aire ambiental circundante y aire humedecido, resultando en una disminución de 5.6 unidades logarítmicas de UFC/mL. En esas mismas condiciones, se obtuvieron disminuciones de UFC/mL de 1.6 y 2.7 unidades logarítmicas después de una exposición de 3 min al plasma. El plasma de aire humedecido presentó una cinética de doble pendiente con una inactivación más rápida del biofilm respecto del plasma generado en aire circundante, con tiempos de reducción decimal (valores D) de 1.47 y 4.36 min. Además, se encontró que la radiación UV del plasma representa una importante contribución en la erradicación del biofilm. La fuente DBD coaxial de plasma generado en aire presentada en este trabajo demostró ser eficaz para la inactivación de biofilms de *P. aeruginosa* crecidos en las condiciones indicadas, asequible ya que no utiliza gases inertes caros y fácil de manejar para el tratamiento superficial indirecto.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los biofilms son más resistentes a los métodos típicos de descontaminación o esterilización que las bacterias en vida libre o planctónicas. Los mecanismos que explican esta resistencia son muy amplios e incluyen barreras de difusión física o química a la penetración de antimicrobianos, crecimiento lento del biofilm debido a limitación de nutrientes, activación de respuestas al estrés, aparición de fenotipos específicos y presencia de diferentes estados fisiológicos dentro del biofilm, entre otros (Mah *et al.*, 2003). La estructura tridimensional del biofilm permite que el exopolisacárido funcione como una barrera de difusión para compuestos como los agentes antimicrobianos (Hoyle y Costerton, 1991; Stewart y Costerton, 2001; Stewart, 2002; Leriche *et al.*, 2003; Saravanan *et al.*, 2006; Brelles-Mariño, G. 2012). Los mecanismos que explican la resistencia de los biofilms a casi todas las formas de esterilización son muy diversos, por lo tanto, el problema de su erradicación exige el desarrollo de técnicas alternativas. El uso de plasmas de descarga de gases se ha investigado durante más de una década obteniéndose interesantes resultados (Moisan *et al.*, 2001; Moisan *et al.*, 2002; Purevdorj *et al.*, 2003; Abramzon *et al.*, 2006; Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.* 2014; Ziuzina *et al.*, 2015; Scholtz *et al.*, 2015; Ben Belgacem *et al.*, 2016; Gabriel *et al.*, 2016; Heaselgrave *et al.*, 2016; Modic *et al.*, 2017; Pignata *et al.*, 2017; Puligundla *et al.*, 2017).

El plasma, cuarto estado de la materia, es una mezcla de especies reactivas que pueden ser de oxígeno (ROS), como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_3$  y  $\text{O}_2^-$  y moléculas excitadas; de nitrógeno (RNS) como  $\text{NO}$  y  $\text{NO}_3$  y moléculas excitadas; partículas cargadas ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}^+$ , electrones, etc.) y fotones UV; bien conocidos por su potencial de descontaminación frente a microorganismos (Moisan *et al.*, 2001, 2002; Purevdorj *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2017). El plasma puede ser generado por diferentes métodos, incluyendo descarga de gases, fotoionización, radiación de calor y radiofrecuencia, siendo la descarga de gases el más común. En este tipo de descarga, el plasma se obtiene cuando una fuente transfiere energía al gas circundante y parte de las moléculas de gas son excitadas desde su estado básico energético a un nivel de energía superior con una distribución de electrones diferente

(Moreau *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2017). La forma más común de generar plasmas es mediante la aplicación de un campo eléctrico a un gas neutro (Conrads y Schmidt, 2000). Los electrones e iones son acelerados por el campo eléctrico y nuevas partículas cargadas se producen cuando estas partículas chocan con átomos y moléculas en el gas o con las superficies de los electrodos. Este proceso conduce a una avalancha de partículas cargadas eventualmente equilibradas por pérdidas de cargas que resultan en un plasma en estado estacionario. El plasma térmico se obtiene cuando los niveles de energía de los electrones y de las especies pesadas son altos y cercanos entre sí. El plasma se considera frío o no térmico cuando la energía de los electrones es más alta que la de las especies pesadas. Los plasmas no térmicos se pueden obtener a presión atmosférica y son útiles para tratar materiales termosensibles que no pueden someterse a tratamiento en autoclave (Sladek *et al.*, 2007; Fridman, 2010; Mertens y Viöl, 2010). Este tipo de plasma puede ser generado por una descarga eléctrica usando diferentes gases como argón, helio y aire. Los dispositivos comunes para la producción de plasmas no térmicos incluyen descargas de barrera dieléctrica (DBD), barrera resistiva (RBD), corona, lumínica, radiofrecuencia (RFD) y jet a presión atmosférica. Hasta ahora, las DBD y jet son las más estudiadas. La DBD, también llamada descarga silenciosa, tiene la ventaja de producir plasma no térmico estable y uniforme que trabaja a temperatura relativamente baja y a presión atmosférica. La descarga jet requiere de un flujo auxiliar de gas para empujar la corriente fuera del área del electrodo (Liao *et al.*, 2017).

Las DBD se caracterizan por presentar por lo menos una capa aislante en el espacio entre los electrodos que son conectados a una fuente de alta tensión alterna. Cuando son operadas a presión atmosférica, las DBD usualmente presentan una estructura filamentosa (Laroussi, 2002). Debido a la temperatura moderada que alcanzan las especies pesadas del plasma, las DBD ofrecen además la posibilidad de tratar superficies sensibles al calor como tejidos vivos (Ehlbeck *et al.*, 2011). La descarga puede ser generada en el aire del ambiente o en un gas que fluye a través de los electrodos. En un plasma no térmico producido por una DBD en aire atmosférico, están presentes un gran número de agentes reactivos. Las especies reactivas más significativas para la esterilización son el ozono, el oxígeno atómico, el radical oxhidrilo y el radical óxido nítrico, entre otros (Gaunt *et al.*, 2006), pero el

mecanismo de la inactivación microbiana es un tema que todavía está en discusión (Laroussi *et al.*, 2002; Gaunt *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2016).

La descarga tipo jet que utilizamos, consta de dos electrodos concéntricos a través de los cuales pasa el gas. Mediante la aplicación de energía a un voltaje determinado, se enciende la descarga de gases. El gas ionizado sale a través de una boquilla y se dirige al sustrato o superficie a unos milímetros por debajo (Schutze *et al.*, 1998). Los electrones libres son generalmente acelerados mediante un campo eléctrico y colisionan con las moléculas gaseosas. Estas colisiones inelásticas producen las especies activas, que salen por la boquilla a velocidades altas. Las especies generadas pueden entonces reaccionar con la superficie contaminada (Laroussi, 2002).

La mayoría de los trabajos que estudian el efecto del plasma sobre las células bacterianas se realizaron con microorganismos planctónicos o esporas. Desde mediados de la década pasada, se ha informado el uso del plasma para la erradicación de biofilms (Becker *et al.*, 2005; Brelles-Mariño *et al.*, 2005; Abramzon *et al.*, 2006; Akishev *et al.*, 2008, 2009). Desde entonces, se ha publicado una cantidad creciente de investigaciones dirigidas a entender la inactivación de biofilms mediada por plasma y algunas de las contribuciones se han centrado en biofilms de *P. aeruginosa* (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Zelaya *et al.*, 2010, 2012; Alkawareek *et al.*, 2012a; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016; Lunov *et al.*, 2016; Ben Belgacem *et al.*, 2016; Modic *et al.*, 2017).

Se han utilizado varios enfoques para inactivar los biofilms de *Pseudomonas*, incluyendo el uso de diversos compuestos, tales como agentes antimicrobianos (Tanaka *et al.*, 2000; Gillis y Iglewski, 2004), quelantes (Banin *et al.*, 2005), furanona y N-acil homoserina lactonas (Davies *et al.*, 1998; Hentzer *et al.*, 2002) y modificación de superficies (Balazs *et al.*, 2004; Bryers y Ratner, 2004). El objetivo de este capítulo fue evaluar una fuente de plasma recientemente desarrollada, que opera en aire, sobre biofilms de *P. aeruginosa*. Se probaron dos dispositivos de generación de plasmas en aire: DBD y jet. Se seleccionó el dispositivo DBD para trabajar y se demostró su utilidad para la inactivación del biofilm.

Además, con el fin de empezar a dilucidar algunos de los mecanismos de acción del plasma sobre la erradicación de biofilms, se evaluó el efecto de la radiación UV del plasma sobre los biofilms de *P. aeruginosa*.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 Microorganismo, medio de cultivo y crecimiento del biofilm**

Todos los experimentos se llevaron a cabo con *P. aeruginosa* cepa PAO1 y el medio de cultivo AB como se describe en el **Capítulo 1 sección 2.1**. Para el crecimiento del biofilm se escogieron las mejores condiciones que condujeron a un biofilm robusto evaluadas en el **Capítulo 1** del presente trabajo. La mejor formación de biofilm se obtuvo en acero inoxidable, medio mínimo AB y cultivo continuo. La inoculación del reactor y las condiciones de crecimiento del biofilm se describen en el **Capítulo 1 secciones 2.2 y 2.3**.

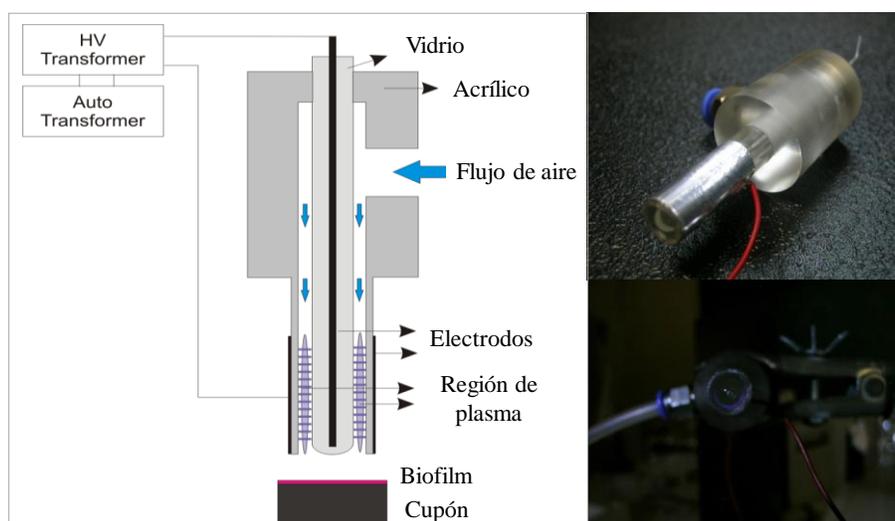
### **2.2 Selección del dispositivo de generación de plasma**

Se probaron dos dispositivos de plasma generado en aire, uno tipo DBD y otro tipo jet, ambos desarrollados en el Instituto de Física del Plasma (INFIP) de la Universidad de Buenos Aires. Posteriormente, y basándose en los resultados obtenidos, se seleccionó sólo uno de los dispositivos, el DBD, para tratar los biofilm de *P. aeruginosa*.

Para determinar si el flujo de aire en los dispositivos (sin generación de plasma) producía inactivación de las células del biofilm por simple desecación, se expuso el biofilm al flujo de aire circundante y humidificado, a diferentes distancias del aplicador de plasma al biofilm y diferentes flujos de aire. Posteriormente, se removió el biofilm de la superficie del cupón como se indica en **2.4**. y se evaluó la formación de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 hs.

### 2.2.1 Dispositivo de plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD)

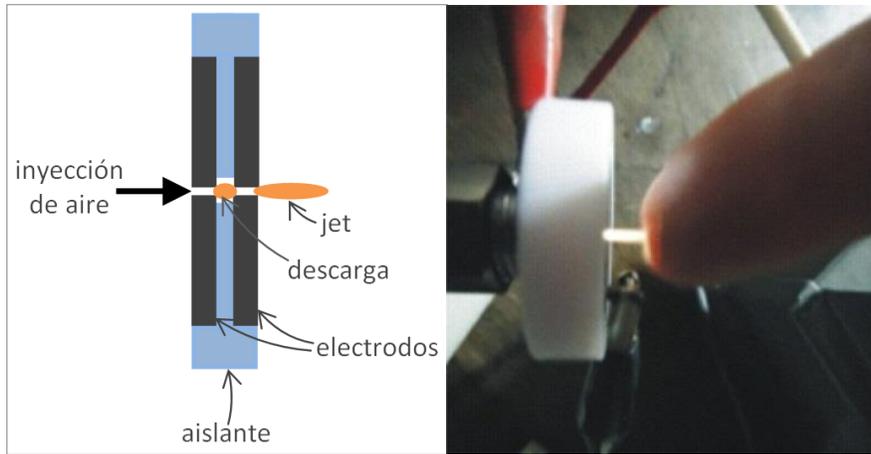
Se produjo plasma de descarga de gas a presión atmosférica usando una configuración DBD, consistente en dos electrodos axiales y una doble barrera dieléctrica. Un esquema del dispositivo experimental se muestra en la **Figura 1**. El electrodo interior consiste en un hilo de hierro de 1 mm de diámetro dentro de un tubo capilar de vidrio de 6 mm de diámetro externo, sellado en la punta. El electrodo exterior consiste en una lámina de aluminio de 25 mm de longitud unida a un tubo de acrílico de 1 mm de grosor y de 10 mm de diámetro.



**Figura 1.** Esquema e imagen del dispositivo de plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD). Se muestran los electrodos axiales y la doble barrera dieléctrica.

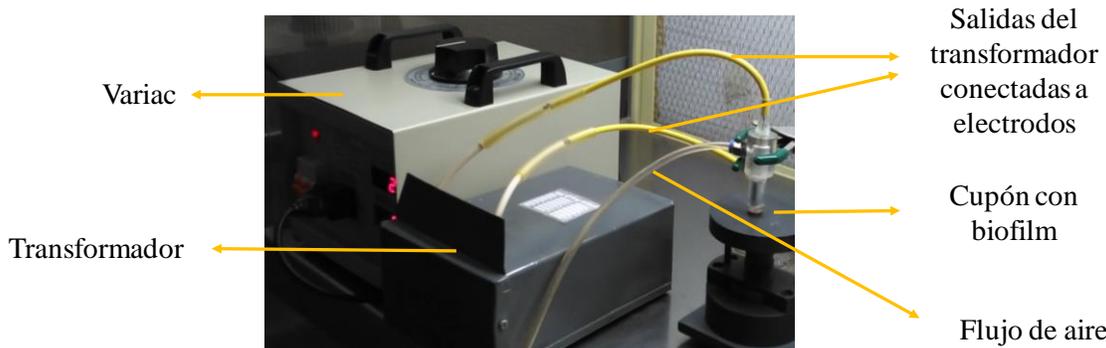
### 2.2.2 Dispositivo de plasma de descarga jet

El dispositivo jet utilizado consta de dos electrodos de acero con una perforación central de 1 mm de diámetro a través de la cual fluye el gas de operación. Los electrodos son discos de acero inoxidable de 20 mm de diámetro y 3 mm de espesor, separados por una capa dieléctrica de teflón de 1 mm de espesor y una perforación central de 3 mm (**Figura 2**). La descarga eléctrica se produce en la región entre los dos electrodos que no está cubierta por el aislante. La inyección de aire a través de la perforación central da lugar a una pluma de plasma no confinada.



**Figura 2.** Esquema e imagen del dispositivo de plasma jet. En la imagen de la derecha se observa un dedo en contacto con el jet de plasma, ya que el plasma es no térmico y no daña tejido humano.

Para ambos dispositivos, la fuente de alimentación de corriente alterna fue un transformador comercialmente disponible para luz de neón (8 kV, 70 mA y 50 Hz). Dicha fuente se conectó a un autotransformador variable (Variac) para controlar la amplitud del voltaje de funcionamiento. Ambas descargas funcionaron con una fuente de alimentación a un voltaje máximo de 8 kV (amplitud de voltaje en circuito abierto). Cada electrodo estaba conectado a una de las dos salidas del transformador de alta tensión y estaba desfasado del otro (16 kV entre los electrodos) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Transformador conectado a autotransformador variable (Variac), electrodos conectados las salidas del transformador, alimentación del flujo de aire y cupón con biofilm.

### 2.3 Caracterización de la descarga

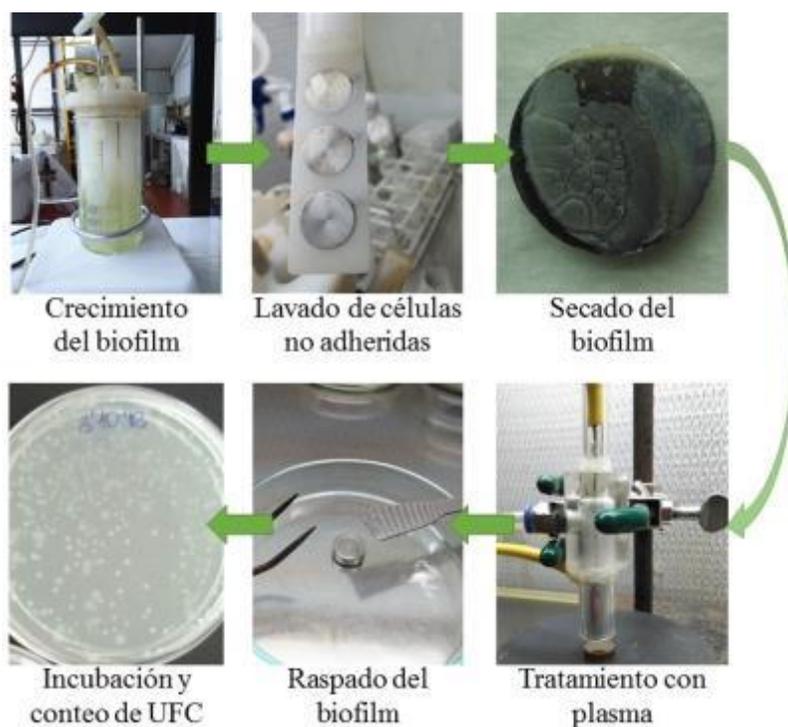
La descarga se realizó en tres condiciones: 1) aire ambiental circundante, 2) flujo de aire sin humidificar de 1 L/min y 3) flujo de aire humedecido de 1 L/min. La humedad relativa del aire fue de aproximadamente  $60 \pm 5\%$ ,  $32 \pm 5\%$  y  $80 \pm 5\%$  en las tres condiciones citadas, respectivamente.

El voltaje se midió con una sonda de alto voltaje (Tektronix 1000X 3.0pF 100 M $\Omega$ ) conectada al electrodo interno. Las mediciones de corriente se realizaron con un transformador (Bergoz CT-D5.0-B). Las señales eléctricas se registraron con un osciloscopio de digitalización de dos canales con un ancho de banda de 60 MHz y una velocidad de muestreo de 1 Gs/s. El espectro de emisión óptico de la descarga se obtuvo con un espectrógrafo (Horiba iHR320) equipado con un detector CCD (dispositivo de carga acoplada, sigla del inglés “charge-coupled device”). Se analizó el espectro y se determinó la temperatura de rotación utilizando las transiciones positivas de la segunda línea del N<sub>2</sub>. El software SPECAIR se utilizó para modelar el espectro de emisión óptico y para la determinación de la temperatura de rotación mediante comparación entre el modelo y el espectro experimental (Laux *et al.*, 2003).

### 2.4 Tratamiento con plasma

Los biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable en medio AB, se sometieron al tratamiento de plasma generado con el dispositivo seleccionado, durante diferentes tiempos de exposición (1, 3, 5, 15 y 30 min) bajo condiciones estériles. Se incluyó un control sin tratamiento con plasma (tiempo de exposición de 0 min). Los cupones se colocaron en una cámara húmeda después del tratamiento y se incubaron con 35  $\mu$ L de solución fisiológica durante 10 min. Los biofilms fueron despegados por raspado con espátula estéril y suspendidos en 1 mL de solución fisiológica. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron por duplicado 100  $\mu$ L de cada suspensión en medio sólido AB. Las placas se incubaron a 37 °C y se evaluó la formación de unidades formadoras de colonias (UFC) por recuento de las mismas. Se realizaron curvas de supervivencia (log de UFC/mL

versus tiempo de exposición a plasma) y se determinó el tiempo de reducción decimal (valor D). El valor D es el tiempo requerido para reducir una concentración original de microorganismos en un 90% (o una unidad logarítmica). En la **Figura 4** se muestra un esquema del procedimiento.



**Figura 4.** Proceso del tratamiento del biofilm de *P. aeruginosa* con plasma DBD.

Una vez seleccionada la fuente DBD como dispositivo de generación de plasma, el aplicador se dispuso de forma que la descarga de plasma se encontrara a 1 o 4 mm del biofilm. Se probaron dos condiciones de operación: descarga generada utilizando 1) aire ambiental circundante a 1 y 4 mm de distancia del aplicador y 2) aire humidificado a un flujo de 1 L/min a 4 mm del aplicador. La humedad relativa del aire ambiental circundante fue de  $60 \pm 5\%$  y del flujo de aire humidificado de  $80 \pm 5\%$ . Se utilizó un compresor de 120 L para lograr un flujo de aire constante. El aire se humedeció pasándolo a través de un humidificador con agua destilada y se determinó el flujo de aire usando un medidor de flujo comercial. La humedad se determinó con un higrómetro analógico (Luft48HIG-DH) a la salida del aplicador de plasma. La temperatura que alcanzó la superficie del cupón se evaluó con una termocupla.

## **2.5 Efecto de la radiación UV del plasma sobre el biofilm**

Para evaluar el rol de la radiación UV presente en el plasma sobre la erradicación de los biofilms de *P. aeruginosa*, éstos fueron sometidos al tratamiento de plasma generado con el dispositivo seleccionado, durante diferentes tiempos de exposición (1, 3, 5, 15 y 30 min) de la misma manera que se describió en la **sección 2.4**, utilizando una ventana de cuarzo de 3 cm de diámetro y 2.5 mm de espesor que permitiera sólo el paso de los fotones UV emitidos a más de 200 nm y no de los demás agentes reactivos del plasma. La ventana de cuarzo se dispuso a la salida del dispositivo y a unos 4 mm del biofilm. Una vez tratados los biofilms con la luz UV del plasma, se procedió a realizar una curva de supervivencia y a determinar el valor D como se describe en la **sección 2.4**

## **2.6 Análisis estadístico**

Se realizó análisis de varianza (ANOVA). La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Levene. La comparación entre medias se realizó mediante el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Se utilizó el software STATISTICA de la compañía Statsoft® (Copyright © StatSoft, 2011). Se realizaron cuatro experimentos independientes y cada uno por duplicado.

# **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **3.1 Selección del dispositivo de plasma**

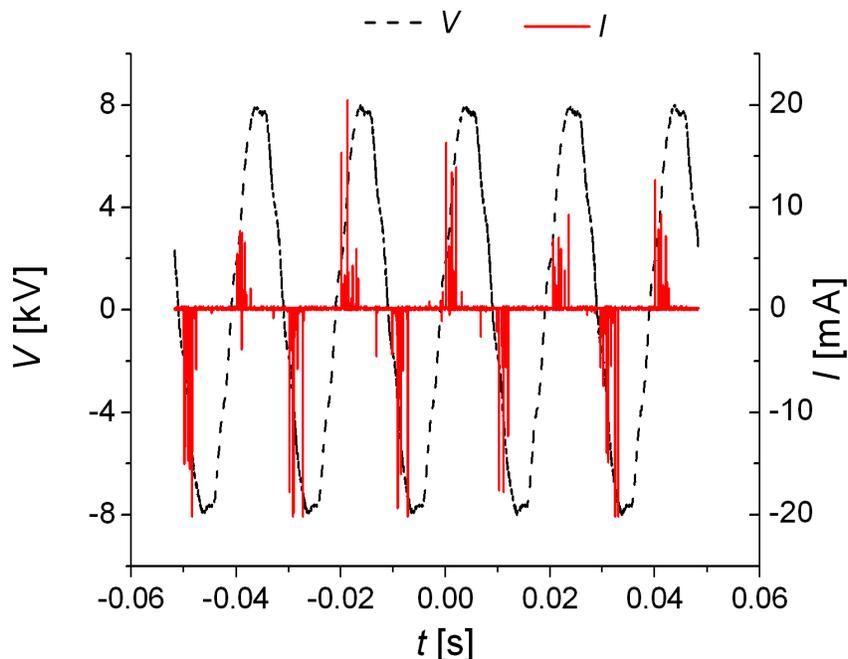
Para descartar los efectos del flujo de aire sobre los biofilms, se realizaron experimentos preliminares para comparar el biofilm tratado con plasma con el biofilm expuesto a un flujo de aire en ausencia de plasma (fuente de plasma apagada). Utilizando aire sin humidificar, el dispositivo jet causó una disminución en el número de UFC entre el 86 y 93 %, y con aire humidificado entre el 55 y 72 %. Dado que los resultados obtenidos con este dispositivo operando en aire sin descarga de plasma mostraron un gran descenso en el

número de UFC/mL debido al simple efecto de desecación producido por el flujo de aire y no por el plasma, se descartó este dispositivo para la continuación de los estudios.

Para el dispositivo DBD, en aire no humidificado la disminución en las UFC fue aproximadamente del 23 % y de solo 6 % para aire humidificado a un flujo de 1 L/min y una distancia de 4 mm. Por lo tanto, se seleccionó el dispositivo plasma DBD generado en aire humidificado para realizar todos los experimentos sobre el biofilm y así asegurar que la inactivación celular se debe al tratamiento con plasma y no al excesivo secado de las células por el flujo del aire.

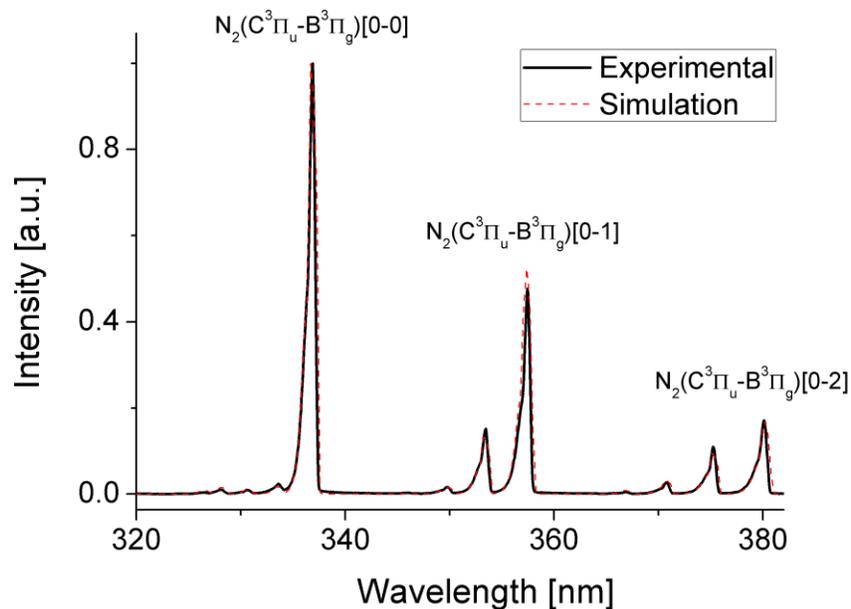
### **3.2 Caracterización de la descarga**

Se caracterizó la descarga del dispositivo DBD seleccionado para continuar con los experimentos de erradicación del biofilm. Las señales eléctricas típicas de corriente (I) y tensión (V) aplicadas al electrodo interior y tomadas durante la descarga se muestran en la **Figura 5**. La señal eléctrica de tensión tuvo una amplitud de 8 kV y una frecuencia de 50 Hz correspondiente a la frecuencia de línea. La señal eléctrica de la corriente de descarga tuvo un número de impulsos de corriente de alrededor de 10 mA y duraciones de ~ 20 ns, que se superponen a la corriente de desplazamiento casi insignificante de ~ 0.01 mA en amplitud. Estas señales eléctricas I-V fueron características de una descarga DBD con estructura filamentosa y se observaron las mismas características para las tres condiciones de descarga ensayadas (aire ambiental circundante, flujo de aire sin humidificar de 1 L/min y flujo de aire humedecido de 1 L/min).



**Figura 5.** Señales eléctricas de tensión (kV) y corriente (mA) de la descarga de plasma DBD.

La **Figura 6** muestra el perfil de emisión simulado y experimental de la banda del segundo sistema positivo del  $N_2$  entre 305 y 345 nm. La determinación del mejor ajuste entre el espectro experimental y el espectro calculado con el software SPECAIR proporciona la temperatura de rotación que es una estimación de la temperatura del gas en la región entre electrodos (Staack *et al.*, 2006). Se obtuvo una temperatura consistente con plasmas no térmicos en equilibrio, donde el gas es relativamente frío en comparación con los electrones que están a aproximadamente 1 eV (11327 °C) (Walsh y Kong, 2007). Se determinó que la temperatura de rotación fue de 27°C, correspondiente a la temperatura del gas en la región entre electrodos (Staack *et al.*, 2006). Sin embargo, la temperatura que el gas alcanzó en la superficie del cupón bajo todas las condiciones ensayadas fue de  $30 \pm 2$  °C, según lo determinado por la termocupla. Por lo tanto, la temperatura no fue responsable de la inactivación del biofilm.

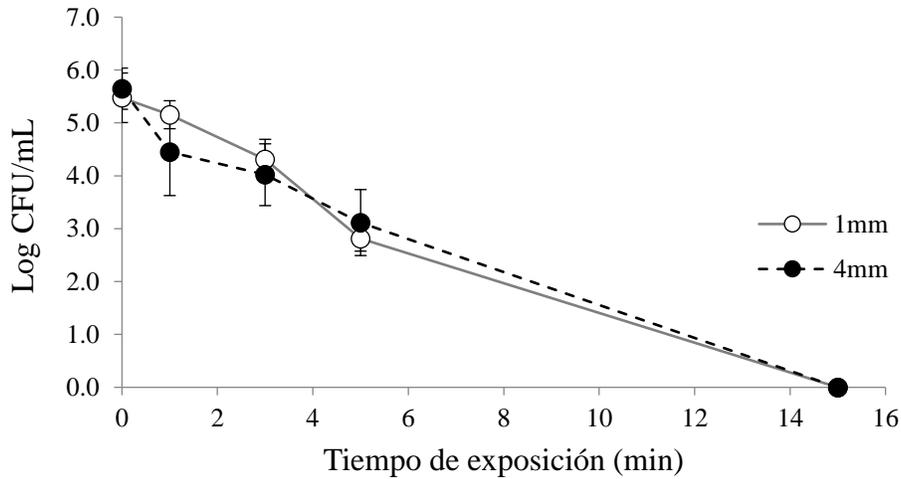


**Figura 6.** Espectros experimentales (línea continua) y simulaciones espectrales de software SPECAIR (línea punteada) de las transiciones positivas de la segunda línea del  $N_2$ .

### 3.3 Curvas de supervivencia y cinética de inactivación

Todos los ensayos de exposición del biofilm al plasma se llevaron a cabo utilizando el dispositivo DBD. Se realizaron las descargas usando dos condiciones: aire ambiental circundante y aire humidificado de 1 L/min.

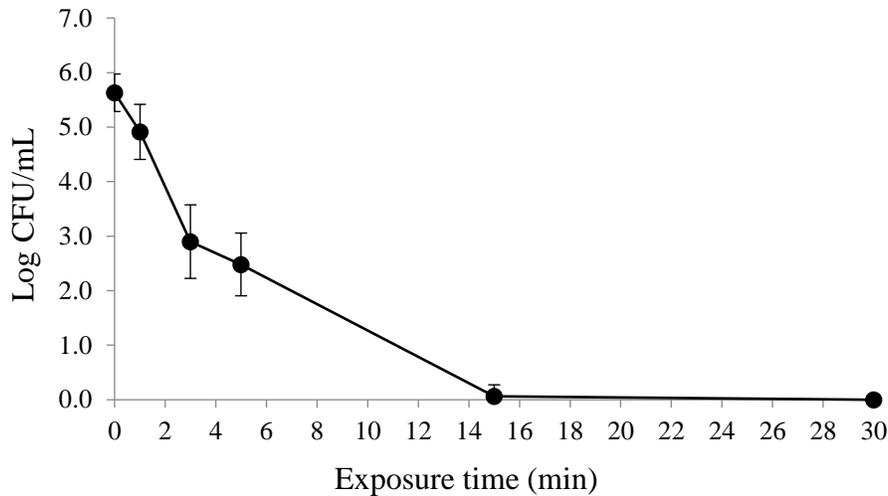
Las curvas de supervivencia de los biofilms de *P. aeruginosa* crecidos en medio mínimo AB sobre cupones de acero inoxidable y tratados con plasma generado en aire ambiental circundante se muestran en la **Figura 7**. Para ambas distancias entre el aplicador de plasma y la muestra (1 y 4 mm), se presentó mayor disminución de UFC/mL a mayor tiempo de exposición al plasma, sin presentarse diferencias significativas entre ambas. Los biofilms fueron completamente erradicados después de un tratamiento de 15 min.



**Figura 7.** Curva de supervivencia de biofilm de *P. aeruginosa* tratado con dispositivo DBD de plasma en aire ambiental circundante durante diferentes tiempos de exposición. Fuente de plasma localizada a 1 o 4 mm de la superficie de la muestra (línea continua y punteada, respectivamente). Las barras de error representan el error estándar de la media. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Como no hubo diferencias significativas en la concentración de células cultivables sobrevivientes luego del tratamiento con plasma para las dos distancias, se eligió una distancia de 4 mm para los experimentos con aire humidificado, debido a razones prácticas operativas (más fácil manipulación).

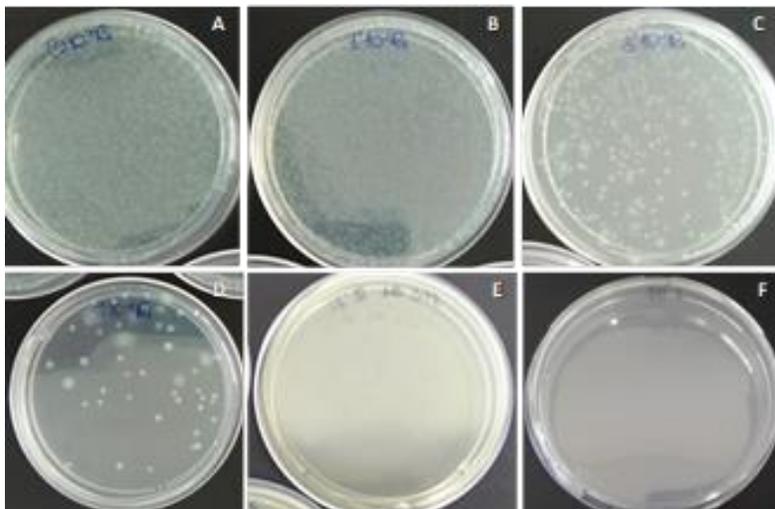
La **Figura 8** muestra la curva de supervivencia de los biofilms de *P. aeruginosa* tratados con plasma operando con aire humidificado a un flujo de 1 L/min. Como en el caso anterior, se presentó mayor disminución de UFC/mL a mayor tiempo de exposición al plasma.



**Figura 8.** Curva de supervivencia de biofilm de *P. aeruginosa* tratado con dispositivo DBD de plasma en aire humedecido a un flujo de 1 L/min. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes, cada uno por duplicado.

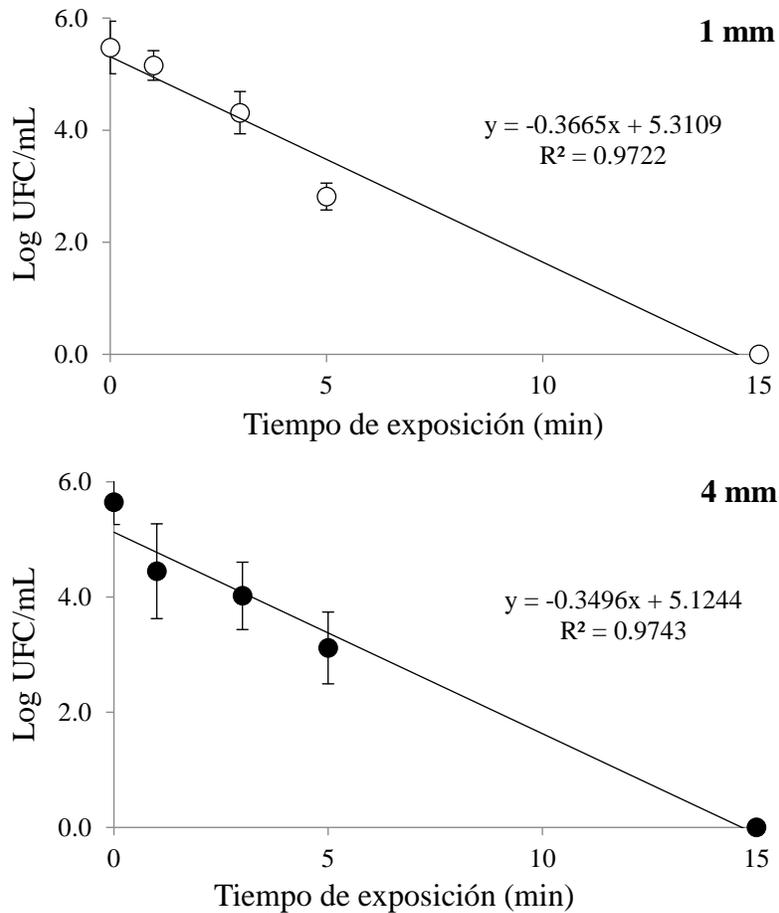
Los gráficos muestran que los biofilms de *P. aeruginosa* fueron completamente erradicados después de un tratamiento de 15 min con plasma ambiental circundante y humidificado, resultando en una disminución de UFC/mL de 5.6 unidades logarítmicas (> 99,999% de eficacia letal) (**Figuras 7 y 8**). Para una exposición de 3 min al plasma generado en aire ambiental circundante se determinó una disminución de UFC/mL de 1.6 unidades logarítmicas, mientras que para el mismo tiempo de exposición al plasma usando aire humedecido se determinó una disminución de 2.7 unidades logarítmicas. Estos resultados demuestran que el aire humedecido inactiva los biofilms más rápidamente que el aire ambiental circundante. Se reportaron disminuciones de 5.50, 6.88 y 4.20 en el número de unidades logarítmicas de UFC/cupón para biofilms de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC438), *Cronobacter sakazakii* (ATCC29004) y *Staphylococcus aureus* (KCCM40050), respectivamente, tratados durante 90 minutos con una fuente de plasma DBD sumergida en agua que operaba en aire seco (Khan *et al.*, 2016). Además, se reportó una reducción de 5.8 log<sub>10</sub> para los biofilms de *P. aeruginosa* tratados con plasma de O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> durante 60 minutos (Ben Belgacem *et al.*, 2016). Por lo tanto, nuestra metodología proporciona una buena eficacia de erradicación con exposiciones más cortas al plasma.

En la **Figura 9** se presenta un registro fotográfico de las placas de Petri en las que se observa una disminución de las UFC/mL del biofilm de *P. aeruginosa* tratado con plasma durante diferentes tiempos de exposición. Todas las placas se sembraron de una dilución del inóculo de  $10^{-1}$  en medio sólido AB y se incubaron a 37 °C durante 24 hs.



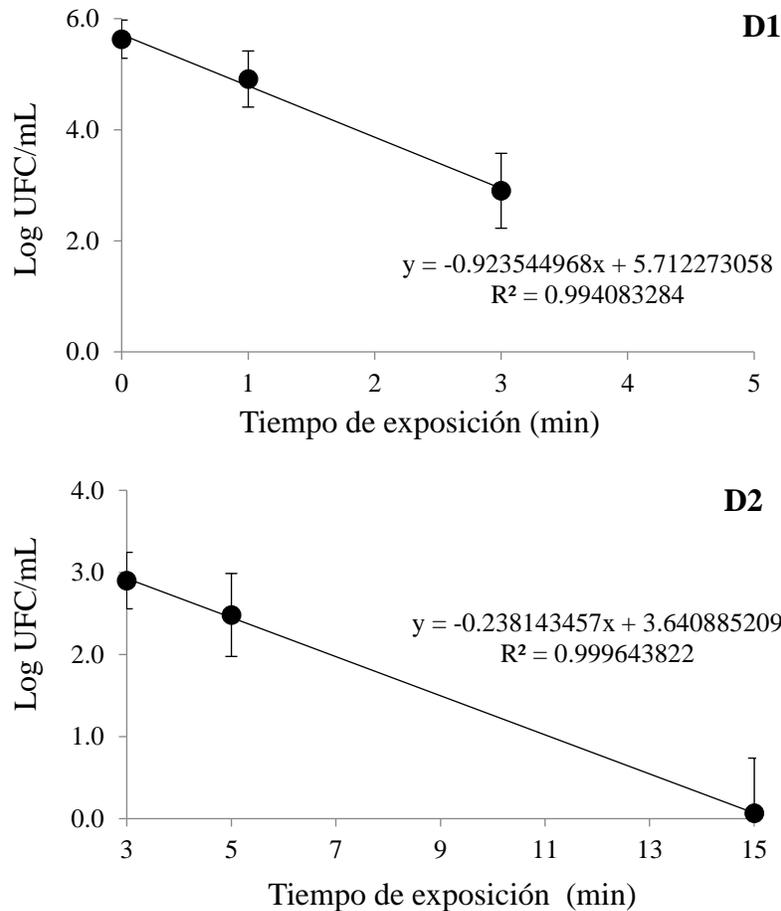
**Figura 9.** UFC provenientes del biofilm de *P. aeruginosa* sin tratamiento con plasma (A) y tratado con dispositivo DBD de plasma durante 1 (B), 3 (C), 5 (D), 15 (E) y 30 min (F).

Una buena medida de la eficiencia de eliminación es la determinación del valor D, el tiempo requerido para reducir una concentración original de microorganismos en un 90%. Este parámetro ha sido originalmente definido para la muerte térmica de microorganismos en autoclave. Para el plasma generado en aire ambiental circundante, los resultados muestran una cinética de una sola pendiente, con una disminución constante de UFC/mL y con un valor D de  $2.78 \pm 0.14$  min para la distancia de 1 mm y de  $2.49 \pm 0.38$  min para 4 mm (**Figura 10**). La cinética de una sola pendiente fue reportada recientemente por Ziuzina y colaboradores (2015) para biofilms de *Listeria monocytogenes* tratados con plasmas fríos atmosféricos producidos en configuración DBD.



**Figura 10.** Línea de tendencia y ecuación del gráfico de la curva de supervivencia de biofilms de *P. aeruginosa* tratados con plasma generado en aire ambiental circundante. Fuente de plasma localizada a 1 o 4 mm de la superficie de la muestra (gráfica superior e inferior respectivamente). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Para el plasma generado en aire humidificado, la curva de supervivencia muestra una cinética típica de doble pendiente (**Figura 11**). Por lo tanto, se determinaron dos valores de D, uno para los tiempos de exposición cortos ( $D_1$ ) de  $1.47 \pm 0.28$  min y otro para la porción de la curva con un descenso más lento ( $D_2$ ) de  $4.36 \pm 0.63$  min.



**Figura 11.** Línea de tendencia y ecuación del gráfico de la curva de supervivencia de biofilms de *P. aeruginosa* tratados con fuente DBD de plasma en flujo de aire humedecido de 1 L/min. Pendiente para tiempos de exposición cortos y largos (gráficas superior e inferior respectivamente). Las barras de error representan el error estándar de la media.

La cinética de doble pendiente podría explicarse considerando que el plasma inactiva en primer lugar a las células más expuestas o más susceptibles del biofilm, requiriéndose luego mayores tiempos de exposición para erradicar a las células menos expuestas o a los microorganismos persistentes. Esta cinética de inactivación es similar a resultados previamente descritos (Zelaya *et al.*, 2010, 2012). Vandervoort y Brelles-Mariño (2014) informaron cinética de doble pendiente para biofilms de *P. aeruginosa* crecidos en cupones de borosilicato en cultivo continuo. Estos autores informaron valores D de 27 seg ( $D_1$ ) y 6.13 min ( $D_2$ ). Zelaya y colaboradores (2010) y Alkawareek y colaboradores (2012b), informaron cinética de doble pendiente para el biofilm de *P. aeruginosa* crecido en batch,

aunque no calcularon valores D. En el trabajo de Alkawareek y colaboradores (2012b), se utilizó un plasma jet operado en una mezcla de gases de 0.5 % oxígeno y 99.5 % helio y flujo de 2 L/min y se obtuvo una completa erradicación del biofilm a los 10 min de exposición.

El valor D correspondiente a los biofilms tratados con plasma generado en aire ambiental circundante es casi el doble de  $D_1$  obtenido para los biofilms tratados con plasma en aire humedecido (**Figuras 10 y 11**). La diferencia podría deberse a mayor presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y a ozono en el plasma en aire humedecido. Purevdorj y colaboradores (2003) estudiaron la muerte mediada por plasma de *Bacillus pumilus*, formador de esporas. En este caso, la mortalidad de esporas varió dependiendo de la composición del gas de alimentación y fue mayor con el plasma de aire humedecido, lo que sugiere que la inactivación puede ocurrir a través de radicales oxhidrilos generados a partir de moléculas de agua.

Ziuzina y colaboradores (2014), trataron un biofilm de *P. aeruginosa* ATCC27853 directa e indirectamente con plasma DBD generado en aire y reportaron que después de 5 min de tratamiento no se presentó recuento de UFC/mL pero sí actividad metabólica. En nuestro trabajo fue necesaria una exposición de 15 min al plasma para no observar células en el medio agarizado. Las diferencias en los tiempos necesarios de exposición al plasma para la completa erradicación del biofilm pueden deberse a la cepa utilizada, a la configuración del dispositivo de generación de plasma o la metodología empleada. En el trabajo de Ziuzina y colaboradores (2014), se utilizó un biofilm crecido durante 48 hs en placas de 96 pocillos y luego del tratamiento con plasma, el biofilm fue sometido a un post-tratamiento conservándolo a temperatura ambiente durante 24 hs. Además, las muestras fueron tratadas dentro de recipientes de polipropileno sellados.

Vandervoort y Brelles-Mariño (2014) reportaron una mayor disminución en el porcentaje de células viables del biofilms de *P. aeruginosa* cultivados en continuo, al tratarlas durante 5 min con un jet de plasma. La mayor parte de la inactivación ocurrió durante una exposición de biofilm al plasma de menos de 1 min. Gabriel y colaboradores (2016),

establecieron la eficacia de un jet de plasma a presión atmosférica sobre biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre dos tipos de acero inoxidable (316 y 304) con tres acabados diferentes (superficie pulida lisa, con líneas de pulido y sin pulir). Los valores D para el acero inoxidable 316 oscilaron entre 2.53 seg (lisa) y 3.16 seg (sin pulir); mientras que para el 304 oscilaron entre 1.95 seg (con líneas de pulido) y 3.27 seg (sin pulir). La eficacia antimicrobiana observada la atribuyeron a la generación de especies reactivas de oxígeno, a los rayos UV y al aumento rápido de la temperatura dentro de los 15 seg del tratamiento (temperatura final de 143.42 °C y 174.05 °C, para 316 y 304 respectivamente). En este mismo trabajo, en ausencia de calentamiento, el valor D fue de 16.45 seg (temperatura de 42.3 °C después de un tiempo de tratamiento de 90 seg). Sin embargo, estos autores incuban el inóculo bacteriano durante sólo cuatro horas y, aunque tuvieran un biofilm y no una capa de células unidas, es más fácil remover una estructura joven comparada con un biofilm maduro.

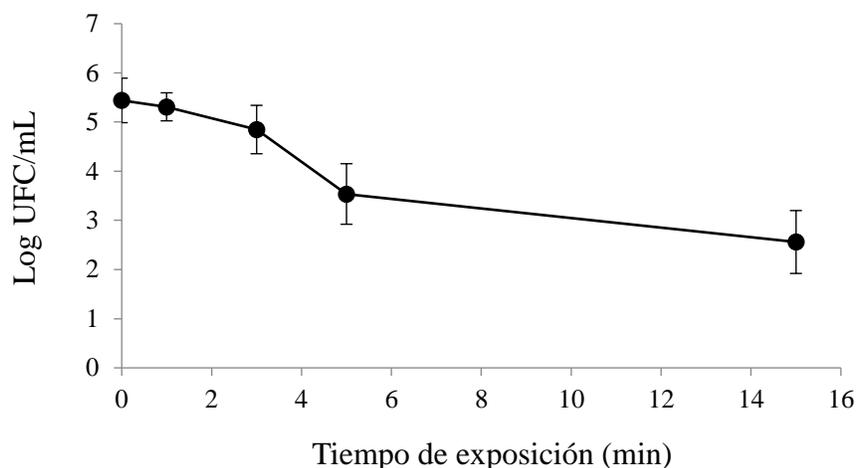
Ben Belgacem y colaboradores (2016), desarrollaron un prototipo que genera plasma no térmico dentro de una bolsa sellada. Evaluaron la eficacia de dos plasmas producidos a partir de mezclas de oxígeno y nitrógeno (5 % O<sub>2</sub> y 95 % N<sub>2</sub>; o 15 % de O<sub>2</sub> y 85 % N<sub>2</sub>) en biofilms de *P. aeruginosa* crecidos en discos de una aleación de titanio revestida con hidroxiapatita. Obtuvieron un efecto bactericida después de un tratamiento de 60 min independientemente de las mezclas de gases, pero no observaron erradicación total del biofilm. También reportaron una cinética de doble pendiente, para las dos mezclas de gases utilizadas y obtuvieron una reducción rápida de la viabilidad bacteriana los primeros 30 min con una reducción más lenta hasta los 60 min. Sin embargo, cualquiera que sea el porcentaje de oxígeno en el plasma, el efecto bactericida no condujo a una reducción total de la viabilidad bacteriana.

Modic y colaboradores (2017) evaluaron un sistema de plasma de descarga de barrera superficial generado en aire bajo dos condiciones de descarga diferente, una que favoreció la producción de RNS y otra la de ROS. Este grupo de trabajo trató biofilms de 24 hs de *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* con plasma en condiciones que favorecieron las RNS y observaron que los biofilms de *P. aeruginosa* fueron erradicados a los 15 seg de

exposición. Al tratar los mismos biofilms con plasma en condiciones que favorecieron las ROS, *P. aeruginosa* mostró una mayor supervivencia, siendo inactivada a los 120 seg.

Se han reportado varios trabajos de inactivación por plasma de biofilms de *P. aeruginosa*, la mayoría utilizando dispositivos jet y gases inertes. También se ha informado el uso de plasma DBD para la inactivación de biofilms, entre ellos de *P. aeruginosa*. Los resultados de cada trabajo muestran una eficiencia de inactivación diferente, que va desde pocos segundos hasta horas de exposición al plasma. Estas diferencias pueden deberse a las cepas, a las configuraciones de los dispositivos de plasma, al gas utilizado o la metodología empleada. Es importante señalar que la mayoría de los trabajos previos se llevaron a cabo utilizando dispositivos de plasma comercialmente disponibles y que en muchos casos funcionan con gases costosos.

En la **Figura 12** se muestra la curva de supervivencia de los biofilms tratados con la radiación UV del plasma operando con aire humidificado a un flujo de 1 L/min. Se presentó una disminución poco pronunciada de UFC/mL hasta los 5 min de exposición a la luz UV, haciéndose aún más lenta a partir de ese tiempo de exposición, aunque sin alcanzar la erradicación del biofilm. Esta disminución inicial lenta posiblemente se deba a que la profundidad de acción de los fotones UV se limita a una capa de un micrómetro (Laroussi y Leipold, 2004). Para la primera porción de la curva (hasta los 5 min de tratamiento con plasma), se encontró un valor D de  $5.03 \pm 0.73$  min, lo que refleja una inactivación más lenta. La comparación de los resultados de la presente curva y de la curva mostrada en la **Figura 8**, obtenida en las mismas condiciones pero sin el uso de la ventana de cuarzo, muestra que la contribución de la radiación UV a la inactivación del biofilm es importante. En el tratamiento con plasma obtenido en aire humidificado se obtuvo un descenso en las UFC/mL de 5.6 unidades logarítmicas, lo cual representó más de un 99.999% de eficacia letal, en tanto que en el tratamiento sólo con radiación UV el descenso de UFC/mL fue de 2.9 unidades logarítmicas y 47.06% de eficacia letal, lo cual indica una importante contribución de la radiación UV a la inactivación del biofilm.



**Figura 12.** Curva de supervivencia de biofilm de *P. aeruginosa* tratado con la radiación UV generada por el dispositivo DBD de plasma en aire humedecido a un flujo de 1 L/min. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los resultados son el promedio de al menos 4 experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Algunos autores han propuesto que la inactivación microbiana mediada por plasma se debe en parte al daño del ADN inducido por la luz UV presente en el plasma. La energía de los fotones de la luz UV es absorbida principalmente por los ácidos nucleicos, lo que puede resultar en formación de dímeros de timina y citosina en la cadena de ADN y dañar gravemente la capacidad replicativa de las bacterias (Boudam *et al.*, 2006; Moisan *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2000). Por otro lado, otros autores encontraron que la radiación UV del plasma no es el agente microbicida dominante en la erradicación de biofilms (Laroussi *et al.*, 2005; Machala *et al.*, 2010; Pavlovich *et al.*, 2013). Estos autores propusieron que la luz UV y los demás agentes activos en el plasma producen un efecto antimicrobiano en sinergia con el resto de los agentes reactivos. En nuestro caso, la radiación UV representó un aporte importante a la inactivación de los biofilms, lo que nos permitiría pensar que en nuestra descarga plasma se están generando cantidades importantes de fotones UV. Se ha propuesto que la radiación UV producida por los plasmas a presión atmosférica desempeña un papel bactericida si se producen fotones en la región UVC (220-280 nm) o UV al vacío (Heise *et al.*, 2004). La radiación UVC proviene típicamente del sistema  $\gamma$  del NO, que se forma en plasmas de aire a altas potencias y donde se generan los radicales O y N. Las radiaciones UVC y UV al vacío también se producen parcialmente en descargas generadas

en Ar o en agua (Heise *et al.*, 2004; Laroussi y Leipold, 2004; Ma *et al.*, 2008; Machala *et al.*, 2010). La radiación UVA y UVB también pueden generar daños sobre las células. La UVA (320 a 400 nm) se ha relacionado con daños directos sobre las proteínas y las membranas celulares y daños indirectos sobre el ADN al generar ROS por fotooxidación del O<sub>2</sub>; y la UVB (290 a 320 nm) es absorbida directamente por el ADN creando dímeros de pirimidina y fotoproductos (Elasri y Miller, 1999).

#### 4. CONCLUSION

Nuestros resultados muestran que la fuente DBD de plasma desarrollada y que opera en aire es una herramienta útil para la inactivación del biofilms de *P. aeruginosa* crecidos en cupones de acero inoxidable, cultivo continuo y medio mínimo. Informamos una cinética de inactivación similar a los resultados previamente descritos. El plasma de aire humedecido a un flujo de 1 L/min resultó en una inactivación más rápida del biofilm que el plasma de aire ambiental circundante. Además, se encontró que la luz UV generada en el plasma representa un aporte importante a la inactivación de los biofilms. Nuestro dispositivo DBD, desarrollado en el INFIP, representa una fuente de plasma económica, ya que al utilizar aire como gas de trabajo no depende del uso de gases costosos.

#### 5. REFERENCIAS

1. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Mariño, G. (2006). Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1304–1309.
2. Akishev, Y., Grushin, M., Karalnik, V., Trushkin, N., Kholodenko, V., Chugunov, V., Kobzev, E., Zhirkova, N., Irkhina, I., y Kireev, G. (2008). Atmospheric-pressure, nonthermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on surfaces. *Pure Appl Chem* 80, 1953–1969.
3. Akishev, Y., Grushin, M., Karalnik, V., Trushkin, N., Kholodenko, V., Chugunov, V., Kobzev, E., Zhirkova, N., Irkhina, I., y Kireev, G. (2009). Atmospheric-pressure, nonthermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on surfaces. *Pure Appl Chem* 80, 1953–1969.
4. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Laverty, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012a). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS ONE* 7, e44289.

5. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O'Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012b). Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Mic* 65, 381–384.
6. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
7. Balazs, D.J., Triandafillu, K., Wood, P., Chevolut, Y., van Delden, C., Harms, H., Hollenstein, C., y Mathieu, H.J. (2004). Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials* 25, 2139–2151.
8. Banin, E., Vasil, M.L., y Greenberg, E.P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PNAS* 102, 11076–11081.
9. Becker, K., Koutsospyros, A., Yin, S.-M., Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J.C., y Brelles-Mariño, G. (2005). Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Contr F* 47, B513-B523.
10. Ben Belgacem, Z., Carré, G., Boudifa, M., Charpentier, E., Cawe, B., y Gellé, M.P. (2016). Effectiveness of non-thermal O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> plasma on *P. aeruginosa* multilayer biofilms cultured on hydroxyapatite. *IRBM* 37, 68–74.
11. Boudam, M.K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., y Massines, F. (2006). Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *J Phys D Appl Phys* 39, 3494e3507.
12. Brelles-Mariño, G. (2012). Challenges in biofilm inactivation: the use of cold plasma as a new approach. *J Bioproc Biotechniq* 2, e107 doi:10.4172/2155-9821.1000e107.
13. Brelles-Mariño, G., Joaquin, J.C., Bray, J.D., y Abramzon, N. (2005). Gas discharge plasma as a novel tool for biofilm destruction. *In Proc. 2nd Int. Workshop Cold Atmospheric Pressure Plasmas*. ISBN: 908086692X, pp. 69-72.
14. Bryers, J.D., y Ratner, B.D. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM NEWS* 70, 232–237.
15. Cheng, H., Liu, X., Lu, X., y Liu, D. (2016). Active species delivered by dielectric barrier discharge filaments to bacteria biofilms on the surface of apple. *Phys Plasma* 23, 073517.
16. Clark, D.J., y Maaløe, O. (1967). DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 23, 99–112.
17. Conrads, H., y Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci T* 9, 441-455.
18. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
19. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., y Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

20. Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Woedtke, T. von, Brandenburg, R., Hagen, T. von dem, y Weltmann, K.-D. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D Appl Phy* 44, 013002.
21. Elasri, M.O., y Miller, R.V. (1999). Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 65, 2025–2031.
22. Fridman, G. (2010). Non-equilibrium plasmas in biology and medicine. *In Biological and environmental applications of gas discharge plasmas*, G. Brelles-Mariño, eds. (New York: Nova Science Publishers), pp. 99–188.
23. Gabriel, A.A., Ugay, M.C.C.F., Siringan, M.A.T., Rosario, L.M.D., Tumlos, R.B., y Ramos, H.J. (2016). Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. *Innov Food Sci Emerg* 36, 311–319.
24. Gaunt, L.F., Beggs, C.B., y Georghiou, G.E. (2006). Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1257–1269.
25. Gillis, R.J., y Iglewski, B.H. (2004). Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Clin Microbiol* 42, 5842–5845.
26. Heaselgrave, W., Shama, G., Andrew, P.W., y Kong, M.G. (2016). Inactivation of *Acanthamoeba* spp. and other ocular pathogens by application of cold atmospheric gas plasma. *Appl Environ Microbiol* 82, 3143–3148.
27. Heise, M., Neff, W., Franken, O., Muranyi, P., y Wunderlich, J. (2004). Sterilization of polymer foils with dielectric barrier discharges at atmospheric pressure. *Plasmas Polym* 9, 23–33.
28. Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., y Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 148, 87–102.
29. Hoyle, B.D., y Costerton, J.W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *In Progress in Drug Research / Fortschritte Der Arzneimittelforschung / Progrès Des Recherches Pharmaceutiques*, E. Jucker, ed. (Birkhäuser Basel), pp. 91–105.
30. Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2009). Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology* 155, 724–732.
31. Khan, M.S.I., Lee, E.-J., y Kim, Y.J. (2016). A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 6, 37072.
32. Laroussi, M. (2002). Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30, 1409–1415.
33. Laroussi, M. (2005). Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym* 2, 391–400.
34. Laroussi, M., y Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* 233, 81–86.

35. Laux, C.O., Spence, T.G., Kruger, C.H., y Zare, R.N. (2003). Optical diagnostics of atmospheric pressure air plasmas. *Plasma Sources Sci T* 12, 125.
36. Leriche, V., Briandet, R., y Carpentier, B. (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environ Microbiol* 5, 64–71.
37. Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., y Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control* 75, 83–91.
38. Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polívka, L., Syková, E., Dejneka, A., y Kubinová, Š. (2016). The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82, 71–83.
39. Ma, Y., Zhang, G.J., Shi, X.M., Xu, G.M., y Yang, Y. (2008). Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air. *IEEE Trans Plasma Sci* 36, 1615–1620.
40. Machala, Z., Chládeková, L., y Pelach, M. (2010). Plasma agents in bio-decontamination by dc discharges in atmospheric air. *J Phys Appl Phys* 43, 222001.
41. Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., y O’Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310.
42. Mai-Prochnow, A., Bradbury, M., Ostrikov, K., y Murphy, A.B. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS ONE* 10, e0130373.
43. Mertens, N., y Viöl, W. (2010). Dielectric barrier discharge: a versatile tool for biological applications. In *Biological and environmental applications of gas discharge plasmas*, G. Brelles-Mariño, eds. (New York: Nova Science Publishers), pp. 237-262.
44. Modic, M., McLeod, N.P., Sutton, J.M., y Walsh, J.L. (2017). Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *Int J Antimicrob Ag* 49, 375–378.
45. Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., y Yahia, L.H. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 226, 1–21.
46. Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., y Saoudi, B. (2002). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 74, 349–358.
47. Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A. 2000. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions. *J Appl Phys* 88, 1166e1174.
48. Moreau, M., Feuilloy, M.G.J., Orange, N., y Brisset, J.L. (2005). Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. *J Appl Microbiol* 98, 1039–1046.
49. Pavlovich, M.J., Sakiyama, Y., Clark, D.S., y Graves, D.B. (2013). Antimicrobial synergy between ambient-gas plasma and UVA treatment of aqueous solution. *plasma process. Polym* 10, 1051–1060.

50. Pignata, C., D'Angelo, D., Fea, E., y Gilli, G. (2017). A review on microbiological decontamination of fresh produce with nonthermal plasma. *J Appl Microbiol* 122, 1438-1455.
51. Puligundla, P., y Mok, C. (2017). Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms in vitro. *J Appl Microbiol* 122, 1134-1148.
52. Purevdorj, D., Igura, N., Ariyada, O., y Hayakawa, I. (2003). Effect of feed gas composition of gas discharge plasmas on *Bacillus pumilus* spore mortality. *Lett Appl Microbiol* 37, 31–34.
53. Saravanan, P., Nancharaiyah, Y.V., Venugopalan, V.P., Rao, T.S., y Jayachandran, S. (2006). Biofilm formation by *Pseudoalteromonas ruthenica* and its removal by chlorine. *Biofouling* 22, 371–381.
54. Schutze, A., Jeong, J.Y., Babayan, S.E., Park, J., Selwyn, G.S., y Hicks, R.F. (1998). The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources. *IEEE Trans Plasma Sci* 26, 1685–1694.
55. Sladek, R.E. j, Filoche, S.K., Sissons, C.H., y Stoffels, E. (2007). Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Lett Appl Microbiol* 45, 318–323.
56. Staack, D., Farouk, B., Gutsol, A.F., y Fridman, A.A. (2006). Spectroscopic studies and rotational and vibrational temperature measurements of atmospheric pressure normal glow plasma discharges in air. *Plasma Sources Sci Technol* 15, 818-827.
57. Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292, 107–113.
58. Stewart, P.S., y Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
59. Tanaka, G., Shigeta, M., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., y Usui, T. (2000). Effect of clarithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Chemotherapy* 46, 36–42.
60. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
61. Walsh, J.L., y Kong, M.G. (2007). 10 ns pulsed atmospheric air plasma for uniform treatment of polymeric surfaces. *Appl Phys Lett* 91, 251504.
62. Zelaya, A., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2012). Battling bacterial biofilms with gas discharge plasma. In *Plasma for Bio-decontamination, medicine and food security*, Z. Machala, K. Hensel, y Y. Akishev, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–148.
63. Zelaya, A.J., Stough, G., Rad, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. *IEEE Trans Plasma Sci* 38, 3398–3403.
64. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Boehm, D., y Bourke, P. (2014). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Plasma Medicine* 4, 137-152.
65. Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., y Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLOS ONE* 10, e0138209.

# **CAPÍTULO 3**

## EFFECTOS DEL PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA SOBRE LA FISIOLOGÍA CELULAR DE BIOFILMS DE *Pseudomonas aeruginosa*

### RESUMEN

Los mecanismos de inactivación de biofilms mediados por plasma no han sido completamente dilucidados y documentados. Los principales mecanismos reportados incluyen alteraciones en la integridad de la membrana celular, destrucción de las EPS, células y componentes celulares, reducción del espesor del biofilm, y pérdida de cultivabilidad y actividad metabólica de las células. En el **Capítulo 2** se presentó el efecto de una fuente DBD coaxial de plasma recientemente desarrollada que opera en aire, sobre biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo. Se determinó que los biofilms fueron erradicados después de un tratamiento de 15 min con plasma. El objetivo del presente capítulo fue estudiar los efectos del plasma sobre la fisiología del biofilm y para ello se determinó la viabilidad y la virulencia de las células del mismo después del tratamiento. Al realizar el test de viabilidad celular, tanto en el control sin tratamiento como en los biofilms tratados con plasma se observó fluorescencia predominantemente roja, teóricamente correspondiente a células muertas, a pesar de que se esperaba que las células del biofilm control estuvieran en su mayoría vivas (fluorescencia verde). Como uno de los componentes de la matriz del biofilm es ADN extracelular (eDNA) y el colorante yoduro de propidio se intercala en la estructura de doble hélice del ADN, se formuló la hipótesis de que el color rojo observado en la tinción del control, no se debía a células muertas sino a la presencia de eDNA. Por lo tanto, se realizó un tratamiento con ADNasa seguido de la tinción de viabilidad y se observó, tal cual se esperaba, fluorescencia verde en el biofilm control. Posteriormente, se llevaron a cabo los tratamientos con plasma, seguidos de degradación enzimática del ADN extracelular. Se encontró que, a los 15 min de exposición al plasma, aunque no hay conteo de UFC aún hay células viables y fueron necesarios 30 min de exposición para que se perdiera la viabilidad. Para evaluar virulencia, se inyectó la vena central de hojas de lechuga con una suspensión de bacterias tratadas con plasma y se evaluó necrosis del tejido vegetal. A los 15 min de exposición al plasma se observó daño en las hojas de lechuga, por lo cual se concluyó que

las bacterias retenían virulencia a pesar del tratamiento; y a los 30 minutos de exposición, no se presentó daño en el tejido vegetal. Nuestros resultados indican que es necesario realizar experimentos de viabilidad antes de concluir que el plasma erradica los biofilms basándose únicamente en la cultivabilidad celular y demuestran, además, la abundancia del ADN extracelular en la matriz del biofilm.

## 1. INTRODUCCIÓN

La composición extracelular de los biofilms bacterianos es muy compleja y depende de la genética microbiana y del ambiente en el que crecen las bacterias y en el que la matriz se desarrolla (Costerton *et al.*, 1995; Montanaro *et al.*, 2011). Inicialmente se consideró que las EPS estaban compuestas de polisacáridos extracelulares; luego se encontró que la matriz extracelular del biofilm incluye lipopolisacáridos, glicolípidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Costerton *et al.*, 1999; Flemming *et al.*, 2007; Flemming y Wingender, 2010). Recientemente se ha demostrado la importancia del eDNA, en la estructura y conexión célula-célula dentro de los biofilms. Inicialmente, su presencia se observó en biofilms de *P. aeruginosa*, *S. intermedius*, *S. mutans*, *E. faecalis* y *staphylococci* (Montanaro *et al.*, 2011).

Los plasmas no térmicos a presión atmosférica han evolucionado rápidamente como tecnología para la descontaminación microbiana, cicatrización de heridas y alternativa para aplicaciones biomédicas, incluyendo terapia del cáncer, desarrollo de nuevos fármacos y tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Keidar *et al.*, 2011; Alkawareek *et al.*, 2012; Keidar *et al.*, 2013; Bourke *et al.*, 2017). Los biofilms son objeto de extensas investigaciones ya que muestran una mayor estabilidad mecánica y resistencia a antimicrobianos que las células platónicas. Desde hace más de una década se investiga la inactivación de biofilms mediada por plasma (Becker *et al.*, 2005; Abramzon *et al.*, 2006, Allesen-Holm *et al.*, 2006; Vandervoort *et al.*, 2008, Joaquín *et al.*, 2009, Zelaya *et al.*, 2010, 2012; Alkawareek *et al.*, 2012a; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016; Lunov *et al.*, 2016; Ben Belgacem *et al.*, 2016; Modic *et al.*, 2017). La capacidad de los plasmas no térmicos para

reaccionar con diversas macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas y los mecanismos de inactivación microbiana se han reportado para células en vida libre (Gaunt *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008; Dobrynin *et al.*, 2009; Alkawareek *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2017); mientras que para los biofilms no han sido completamente dilucidados y documentados. Los principales mecanismos informados para la inactivación de biofilms mediada por plasma incluyen alteraciones en la integridad de la membrana celular, destrucción de las EPS, células y componentes celulares, reducción del espesor del biofilm y disminución de la cultivabilidad y actividad metabólica de las células (Vandervoort *et al.*, 2008; Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2012; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Khan *et al.*, 2016).

En el **Capítulo 2**, se presentó una fuente DBD coaxial de plasma de aire para el tratamiento de biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo y se determinó la curva de supervivencia del biofilm a diferentes tiempos de exposición al plasma. Los biofilms fueron erradicados después de un tratamiento de 15 min con plasma, tiempo de exposición para el cual no se observó crecimiento de UFC. El recuento de colonias en un medio agarizado no tiene en cuenta que las células pueden seguir viables, y hasta conservar la virulencia, aunque no den crecimiento de colonias luego del tratamiento. Las células pueden entrar en un estado de dormancia llamado viable-pero-no-cultivable (VBNC, sigla del inglés “Viable-But-Non-Culturable”) en respuesta al estrés ambiental. Este mecanismo de supervivencia ha sido reportado para muchas bacterias gram negativas (Ap y Jd, 2004; Oliver, 2005, 2010), y se ha propuesto como posible mecanismo para biofilms tratados con plasma (Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2010; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015). Otra de las hipótesis propuestas es que el plasma daña la pared celular, produciendo esferoplastos más pequeños que la célula de la cual derivan, que no son cultivables pero que todavía están viables y conservan una membrana celular intacta (Joaquin *et al.*, 2009). Para determinar la viabilidad de las células después del tratamiento con plasma es necesario hacer estudios complementarios de microscopía de fluorescencia o de estimación de actividad metabólica a través de la presencia de adenosín trifosfato (ATP) o de la determinación de reducción de sales como XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) que mide de

manera indirecta la actividad de los sistemas de transporte de electrones presentes en las bacterias. El objetivo del presente capítulo fue determinar la viabilidad y virulencia de las células del biofilm de *P. aeruginosa* expuestas al tratamiento con una fuente DBD coaxial de plasma.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.7 Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento del biofilm**

Todos los experimentos se llevaron a cabo con *P. aeruginosa* cepa PAO1 y el medio de cultivo AB como se describe en el **Capítulo 1 sección 2.1**. Para el crecimiento del biofilm se escogieron las mejores condiciones que condujeron a un biofilm robusto: superficie de acero inoxidable, medio mínimo AB y cultivo continuo (**Capítulo 1**). La inoculación del reactor y las condiciones de crecimiento del biofilm se describen en el **Capítulo 1 secciones 2.2 y 2.3**.

### **2.8 Tratamiento con plasma**

Se produjo plasma de descarga de gas a presión atmosférica usando una configuración coaxial DBD operada en aire humidificado a un flujo de 1 L/min. Las condiciones de operación se describen en el **Capítulo 2 sección 2.2**. Los biofilms de *P. aeruginosa* se sometieron al tratamiento de plasma durante diferentes tiempos de exposición (3, 15 y 30 min) bajo condiciones estériles. Se incluyó un control sin tratamiento con plasma (tiempo de exposición de 0 min).

### **2.9 Determinación de la viabilidad celular del biofilm**

Los cupones con biofilm obtenidos como se indica anteriormente se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril, se secaron al aire durante 10 min y se trataron con plasma generado en aire humidificado durante 0, 3, 15 y 30 min. Se evaluó la viabilidad celular

utilizando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, EEUU), para lo cual se añadió a cada cupón 20 µL de una mezcla de colorantes en la relación 1:2 de SYTO 9 a yoduro de propidio (PI, sigla del inglés “propidium iodide”). Los cupones se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Leica usando un filtro de excitación/emisión de 480/500 nm para SYTO 9 y de 490/635 nm para PI y un aumento de 400X. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite (2.5.0 R1) y los análisis de imágenes se realizaron con el software libre ImageJ. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada uno por duplicado.

### **2.10 Degradación enzimática del ADN extracelular del biofilm**

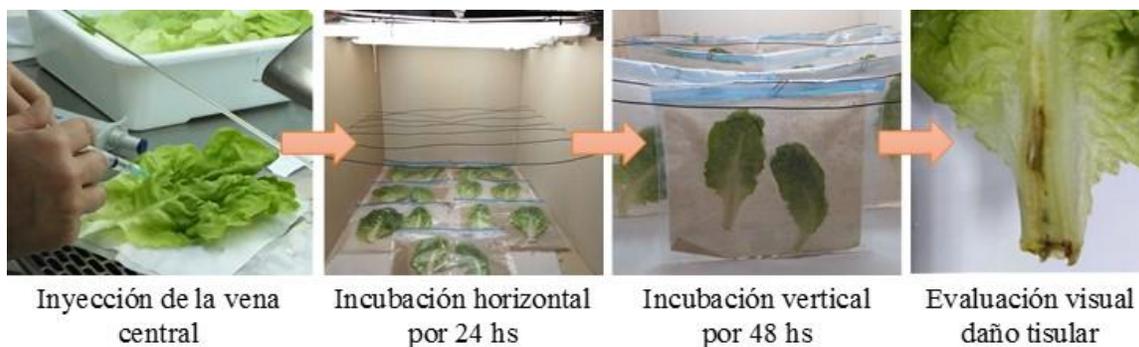
Una vez crecido el biofilm en las condiciones antes indicadas, se retiraron los cupones del reactor, se lavaron dos veces con solución fisiológica, se secaron al aire durante 10 min, se trataron con 20 µL de ADNasa 0.1 mg/mL (DNase I de páncreas bovino, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 30 °C durante 20, 40 y 60 min. Se incluyó un cupón control de biofilm sin tratamiento enzimático. Al cabo de la incubación, se eliminó la suspensión enzimática con toallas de papel estériles y se lavaron los cupones tres veces con 50 µL de solución fisiológica. Posteriormente, se llevó a cabo la determinación de viabilidad del biofilm como se indica en 2.3.

### **2.11 Determinación de la viabilidad celular del biofilm tratado con plasma y degradación enzimática del ADN**

Los cupones con biofilm se lavaron dos veces con solución fisiológica, se secaron al aire durante 10 min y se trataron con plasma durante 0, 3, 15 y 30 min. Posteriormente, se trataron con 20 µL de ADNasa y se incubaron a 30 °C durante 60 min. Se eliminó la suspensión enzimática con toallas de papel estériles y se lavaron los cupones tres veces con 50 µL de solución fisiológica. Se evaluó la viabilidad celular como se indica en 2.3.

## 2.1 Determinación de la virulencia del biofilm

Para evaluar la virulencia de las células del biofilm después de exponerlas al tratamiento con plasma durante diferentes tiempos, se utilizó el ensayo desarrollado por Zelaya y colaboradores (2012), con modificaciones. Los biofilms se trataron con plasma según se indica en 2.2. durante 0, 3, 15 y 30 min. Los cupones se colocaron en una cámara húmeda después del tratamiento y se incubaron con 35  $\mu$ L de solución fisiológica durante 10 min. Los biofilms fueron removidos por raspado y suspendidos en 250  $\mu$ L de solución fisiológica. A continuación, se inyectó suavemente y a lo largo de toda su longitud, la vena central de hojas de lechuga tipo criolla con 250  $\mu$ L de cada una de las suspensiones de células del biofilm de *P. aeruginosa* obtenidas anteriormente. Se incluyeron como controles una hoja inyectada solamente con solución fisiológica y una hoja sin inyectar. A continuación, las hojas se colocaron asépticamente en bolsas de plástico de 27 x 25 cm con cierre y esterilizadas por UV. En cada bolsa se introdujo una toalla de papel absorbente estéril sobre la cual se pusieron dos hojas de lechuga con su respectivo tratamiento (tratamiento por duplicado). Se humedecieron las toallas de papel con 10 mL de solución fisiológica estéril (para mantener la humedad del sistema), se cerraron las bolsas y se incubaron durante tres días a 34 °C en una cámara de luces. Las primeras 24 hs las hojas se mantuvieron en posición horizontal y a continuación se dispusieron de manera vertical. Se evaluó visualmente necrosis en el tejido vegetal al tercer día. En la **Figura 1** se muestra un esquema del proceso. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada uno por duplicado.



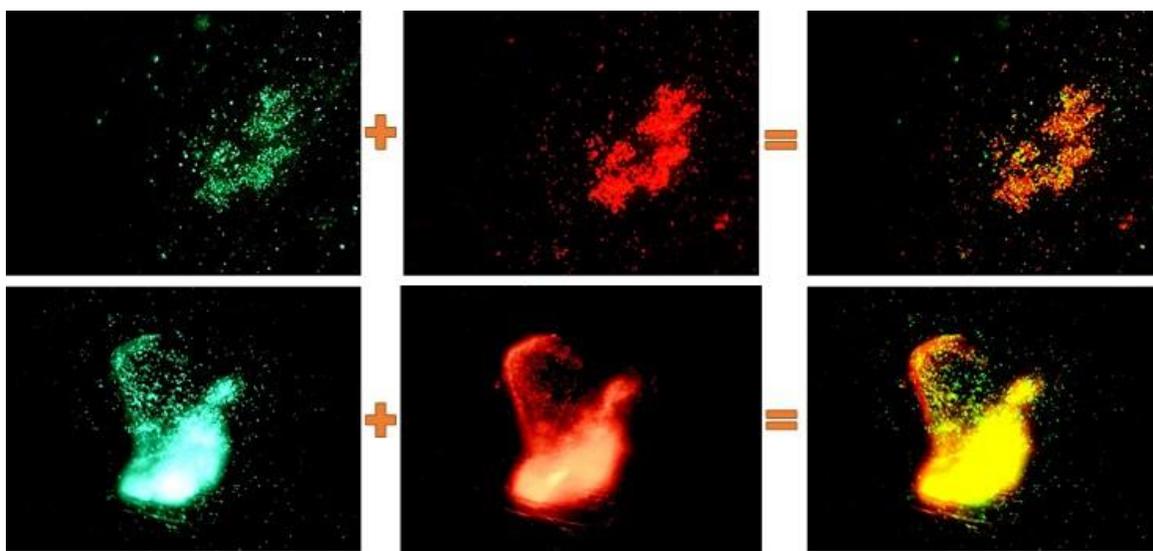
**Figura 1.** Esquema del proceso para evaluación de virulencia de células del biofilm de *P. aeruginosa*.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Efectos del plasma sobre la viabilidad celular del biofilm de *P. aeruginosa*

El kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® es un ensayo que utiliza dos colorantes fluorescentes que se unen a los ácidos nucleicos de la bacteria y basado en la integridad de la membrana celular. En esta tinción, el colorante verde SYTO 9 penetra la membrana celular de todas las células, mientras que el colorante rojo PI penetra sólo la membrana celular dañada y tiñe las células muertas. Con una mezcla apropiada de los colorantes SYTO 9 y PI, las bacterias con membranas celulares intactas se tiñen verde, mientras que las bacterias con membranas dañadas, rojo.

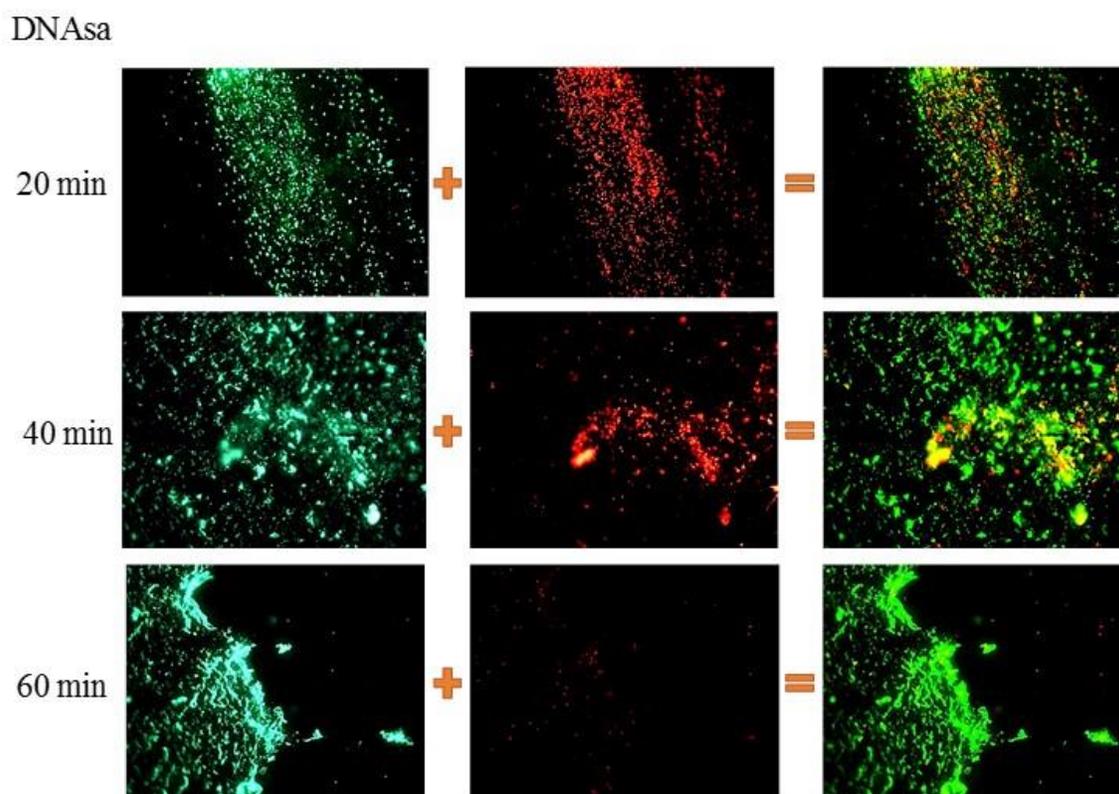
Al realizar la tinción de viabilidad celular, en todos los tratamientos (incluyendo el control sin exposición al plasma), se observó fluorescencia predominantemente roja. En la **Figura 2** se muestran las imágenes del biofilm de *P. aeruginosa* sin exposición al plasma luego de la tinción.



**Figura 2.** Biofilm de *P. aeruginosa* teñido con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®. A la izquierda se muestran las imágenes correspondientes a la tinción con el colorante SYTO 9, seleccionadas con el filtro de excitación/emisión de 480/500 nm, en el centro las mismas imágenes con el colorante PI, seleccionadas con el filtro de 490/635

nm, y a la derecha la superposición de las dos imágenes anteriores. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite con aumento de 400X.

Se esperaba que las células del biofilm control estuvieran en su mayoría vivas, y por ende, fluorescieran verdes. Es sabido que uno de los componentes de la matriz del biofilm es eDNA y que el colorante PI se intercala en la estructura de doble hélice del ADN. Por lo tanto, se formuló la hipótesis de que el color rojo observado en la tinción del biofilm control, no se debía a células muertas sino a abundancia de eDNA en la matriz y, para contrastar esta hipótesis, se realizó un tratamiento con ADNasa. En la **Figura 3** se muestra un biofilm de *P. aeruginosa* sin exponer al plasma, tratado con ADNasa durante diferentes tiempos (20, 40 y 60 min) y teñido con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®. Se comprobó que el eDNA estaba presente en forma abundante en la matriz del biofilm y fueron necesarios 60 min para degradarlo enzimáticamente por completo (**Figura 3**).



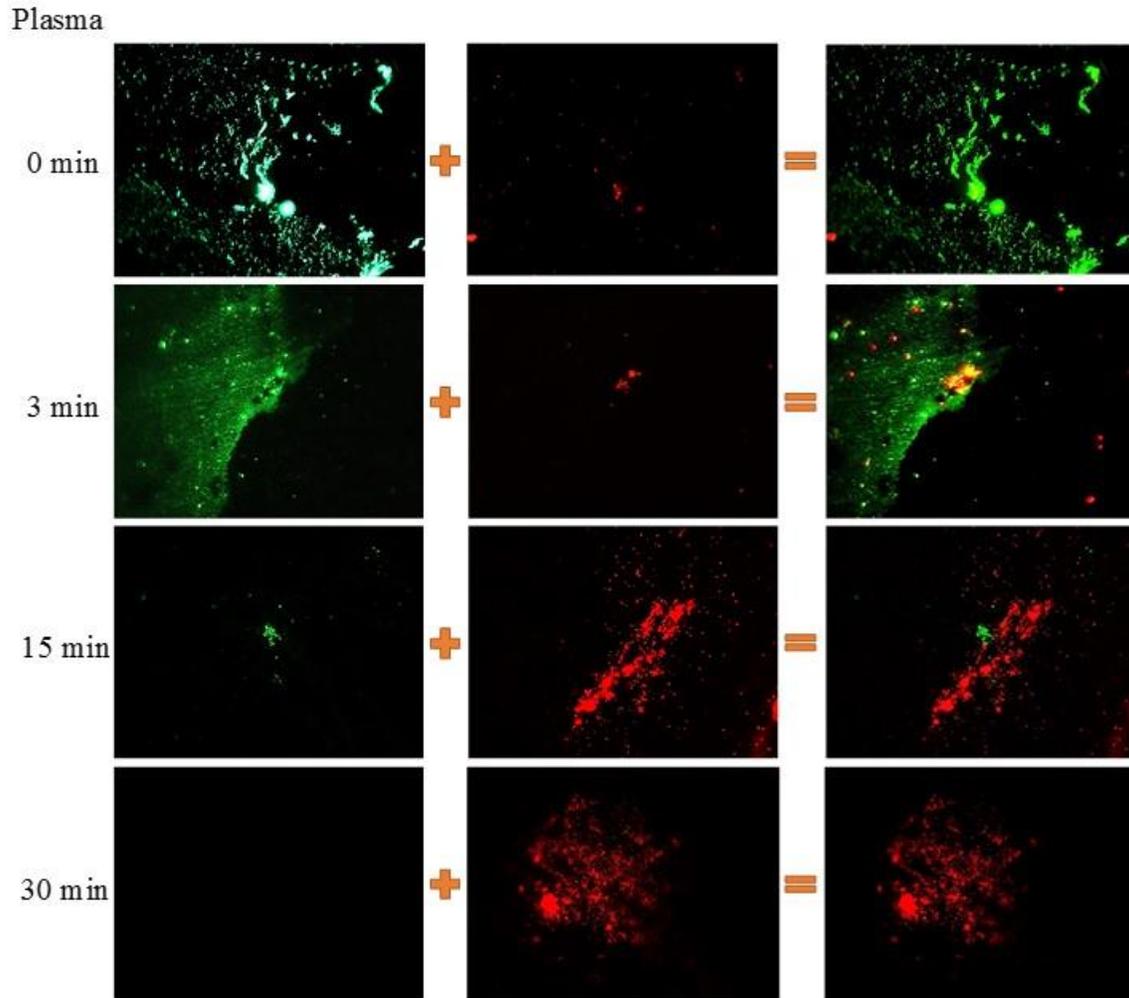
**Figura 3.** Biofilm de *P. aeruginosa* tratado con ADNasa durante diferentes tiempos (20, 40 y 60 min) y teñido con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®. A la izquierda se

muestran las imágenes correspondientes a la tinción con el colorante SYTO 9, seleccionadas con el filtro de excitación/emisión de 480/500 nm, en el centro las mismas imágenes con el colorante PI, seleccionadas con el filtro de 490/635 nm, y a la derecha la superposición de las dos imágenes anteriores. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite con aumento de 400X.

Al comparar las **Figuras 2 y 3**, es claro que el biofilm control tenía la mayoría de sus células vivas y que la fluorescencia roja se debía a la presencia de eDNA. La importancia relativa del eDNA, los exopolisacáridos y las proteínas como componentes estructurales de los biofilms puede depender de las condiciones ambientales, la edad del biofilm, y la cepa del microorganismo, en caso de tratarse de un biofilm monoespecie. Después del tratamiento enzimático con ADNasa durante 60 min no se observó daño en la estructura de los biofilms (**Figura 3**), lo cual implica que el eDNA no cumple una función vital estructural en biofilms maduros de *P. aeruginosa*. Allesen-Holm y colaboradores (2006), informaron que el tratamiento con ADNasa disolvió biofilms jóvenes sin afectar a los ya establecidos, sugiriendo que las células en biofilms jóvenes se mantienen unidas por eDNA mientras que los maduros se unen por otros compuestos, por lo tanto el ADN desempeñaría un papel estructural durante el desarrollo del biofilm, pero sólo sería un componente importante de una matriz más diversa en biofilms ya desarrollados.

Además de encontrar eDNA de manera abundante en la matriz extracelular del biofilm, podemos decir que este ADN estaba firmemente unido, ya que no se desprendió después de realizar los dos lavados consecutivos con solución fisiológica. Se ha demostrado que los biofilms de *P. aeruginosa*, incluyendo PAO1, producen eDNA como componente de la matriz que funciona como interconexión célula-célula (Whitchurch *et al.*, 2002). Allesen-Holm y colaboradores (2006), reportaron que para biofilms de *P. aeruginosa* el eDNA forma una estructura parecida a una rejilla y que su localización es dependiente de la etapa de desarrollo del biofilm: en biofilm jóvenes el ADN se encuentra en la superficie de las microcolonias, mientras que a los 4 días de edad en los tallos de las estructuras de hongos y a los 6 días se localiza en todo el biofilm.

Los biofilms de *P. aeruginosa* se caracterizan por una arquitectura tridimensional consistente en estructuras en forma de “hongo” o pilares de microcolonias, separadas por espacios vacíos que constituyen verdaderos canales de comunicación por los cuales fluyen los nutrientes (Costerton *et al.* 1999). La formación de estas estructuras es un proceso secuencial, donde primero hay una subpoblación bacteriana no móvil que forma las microcolonias iniciales, que más tarde se convierten en los tallos de los hongos, y posteriormente una subpoblación migratoria que forma las cabezas a través de un proceso dependiente de los pili tipo IV (Klausen, 2003). Allesen-Holm y colaboradores (2006), propusieron que la alta concentración de eDNA en los tallos podría estar relacionada con la acumulación de bacterias migratorias que resulta luego en la formación de las cabezas de la estructura, es decir que el ADN de los tallos permitiría que las bacterias "trepen" y formen las tapas de las estructuras de los hongos. Esta hipótesis se basa en lo reportado por van Schaik y colaboradores (2005), quienes muestran que los pili tipo IV, encargados de mediar la migración bacteriana por un mecanismo de extensión-agarre-retracción, se unen al ADN. La **Figura 4** muestra los biofilms de *P. aeruginosa* expuestos al plasma durante diferentes tiempos (0, 3, 15 y 30 min), tratados con ADNasa durante 60 min y teñidos con el kit de viabilidad bacteriana. A los 3 min de exposición al plasma la mayoría de las células del biofilm se encuentran viables, mientras que a los 15 min la mayoría se encuentran muertas. Fue necesario un tratamiento con plasma durante 30 min para la erradicación completa del biofilm.



**Figura 4.** Biofilm de *P. aeruginosa* expuesto al plasma (0, 3, 15 y 30 min), tratado con ADNasa por 60 min y teñido con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD®. A la izquierda se muestran las imágenes correspondientes a la tinción con el colorante SYTO 9, seleccionadas con el filtro de excitación/emisión de 480/500 nm, en el centro las mismas imágenes con el colorante PI, seleccionadas con el filtro de 490/635 nm, y a la derecha la superposición de las dos imágenes anteriores. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite con aumento de 400X.

Es importante señalar que las curvas de supervivencia no mostraron células cultivables a los 15 min de exposición al plasma (**Capítulo 2, Figuras 7 y 8**). Sin embargo, los resultados obtenidos con el kit de viabilidad celular muestran la presencia de células vivas. Muchos autores todavía evalúan la letalidad del plasma basándose en el conteo de UFC

luego del tratamiento; sin embargo, como respuesta a la exposición al plasma, las células del biofilm podrían entrar en el estado VBNC (Ap y Jd, 2004; Oliver, 2005, 2010) o se podrían producir esferoplastos más pequeños que las bacterias planctónicas, que no son cultivables pero que todavía están viables (Joaquin *et al.*, 2009). Aunque no se producen colonias en un medio de cultivo agarizado, las células aún podrían estar vivas y conservar la virulencia, como se discute a continuación.

### **3.2 Efectos del plasma sobre la virulencia de las células del biofilm de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es un patógeno oportunista para los seres humanos, pero también es un patógeno vegetal que produce daño tisular (Elrod y Braun, 1942), y por lo tanto, se puede evaluar su virulencia en plantas. Zelaya y colaboradores (2012) realizaron un ensayo de virulencia utilizando hojas de lechuga y reportaron que las células del biofilm de *P. aeruginosa* tratadas durante tiempos cortos de exposición al plasma aún retienen viabilidad y virulencia, aunque no sean cultivables. En el presente capítulo obtuvimos resultados similares. La **figura 5** muestra necrosis en las hojas de lechuga inyectadas con una suspensión de bacterias tratadas con plasma durante 3 y 15 min, mientras que no se observa daño tisular en los restantes tratamientos, por lo cual se concluye que las bacterias retienen virulencia luego de ser tratadas con plasma durante tiempos cortos. Aunque a los 15 min de tratamiento con plasma ya no hay presencia de UFC en una placa de petri, estas células son no sólo viables sino también virulentas.



**Figura 5.** Hojas de lechuga tipo criolla sin inyectar, inyectada con solución fisiológica o con una suspensión de células del biofilm de *P. aeruginosa* control o tratado con plasma durante 3, 15 y 30 min, según se indica.

#### 4. CONCLUSIÓN

La microscopía de epifluorescencia y el kit de viabilidad bacteriana permitieron evaluar el estado fisiológico de las células del biofilm tratadas con plasma, mediante el monitoreo de la viabilidad como función de la integridad de la membrana celular. Se demostró la presencia de abundante eDNA en los biofilms maduros de *P. aeruginosa* PAO1 cultivados sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo. Se encontró que los biofilms tratados con plasma durante tiempos de exposición cortos conservan la viabilidad incluso en el caso de la falta de cultivabilidad celular y además las células aún son virulentas. Nuestros resultados apoyan el planteamiento de que los experimentos de viabilidad siempre deben llevarse a cabo antes de llegar a la conclusión de que el plasma

erradica los biofilms a cortos tiempos de exposición y no es suficiente basarse solo en el recuento de células cultivables.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Mariño, G. (2006). Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1304–1309.
2. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012). Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Mic* 65, 381–384.
3. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
4. Ap, D., y Jd, O. (2004). Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J Microbiol* 42, 69–73.
5. Becker, K., Koutsospyros, A., Yin, S.-M., Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J.C., y Brelles-Mariño, G. (2005). Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Contr F* 47, B513-B523.
6. Bourke, P., Zuizina, D., Han, L., Cullen, P., y Gilmore, B.F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol* 123, 308–324.
7. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., y Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbio* 49, 711–745.
8. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
9. Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., y Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11, 115020.
10. Elrod, R.P., y Braun, A.C. (1942). *Pseudomonas aeruginosa*: its role as a plant pathogen 1. *J Bacteriol* 44, 633–645.
11. Flemming, H.C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Micro* 8, 623–633.
12. Flemming, H.C., Neu, T.R., y Wozniak, D.J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J Bacteriol* 189, 7945–7947.
13. Gaunt, L.F., Beggs, C.B., y Georghiou, G.E. (2006). Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1257–1269.

14. Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2009). Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?. *Microbiol* 155, 724–732.
15. Karatan, E., y Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 310–347.
16. Keidar, M., Walk, R., Shashurin, A., Srinivasan, P., Sandler, A., Dasgupta, S., Ravi, R., Guerrero-Preston, R., y Trink, B. (2011). Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer* 105, 1295–1301
17. Keidar, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Ann Stepp, M., Srinivasan, P., Sandler, A., y Trink, B. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys Plasmas* 20, 057101.
18. Khan, M.S.I., Lee, E.J., y Kim, Y.J. (2016). A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii* and *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 6, 37072.
19. Klausen, M. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 50, 61–68.
20. Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., y Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control* 75, 83–91.
21. Ma, Y., Zhang, G.J., Shi, X.M., Xu, G.M., y Yang, Y. (2008). Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air. *IEEE Trans Plasma Sci* 36, 1615–1620.
22. Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., y Arciola, C.R. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 34, 824–831.
23. Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43, 93–100.
24. Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Re* 34, 415–425.
25. van Schaik, E.J., Giltner, C.L., Audette, G.F., Keizer, D.W., Bautista, D.L., Slupsky, C.M., Sykes, B.D., y Irvin, R.T. (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. *J Bacteriol* 187, 1455–1464.
26. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
27. Vandervoort, K.G., Abramzon, N., y Brelles-Mariño, G. (2008). Plasma Interactions with bacterial biofilms as visualized through atomic force microscopy. *IEEE Trans Plasma Sci* 36, 1296–1297.
28. Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., y Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487–1487.
29. Zelaya, A., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2012). Battling bacterial biofilms with gas discharge plasma. *In Plasma for bio-decontamination, medicine and food security*, Z. Machala, K. Hensel, y Y. Akishev, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–148.

- 30.** Zelaya, A.J., Stough, G., Rad, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. *IEEE T Plasma* 38, 3398–3403.
- 31.** Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Boehm, D., y Bourke, P. (2014). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Plasma Medicine* 4, 137-152.
- 32.** Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., y Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS ONE* 10, e0138209.

# **CAPÍTULO 4**

## EFFECTOS DEL PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA SOBRE LA MATRIZ DEL BIOFILM DE *Pseudomonas aeruginosa*

### RESUMEN

Existe una gran diversidad en la composición de la matriz extracelular de los biofilms y entre los componentes más estudiados están los exopolisacáridos, las proteínas y el eDNA. Las EPS de la matriz proporcionan estabilidad mecánica, median la adhesión a la superficie, permiten la acumulación de nutrientes, mantienen un microambiente altamente hidratado, facilitan la transferencia horizontal de genes y actúan como barrera protectora. En el **Capítulo 2** se presentó el efecto de una fuente DBD coaxial de plasma operada en aire sobre biofilm de *P. aeruginosa* crecido sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo. El **Capítulo 3** se enfocó principalmente en el efecto del plasma sobre el componente celular del biofilm. Se determinó que es necesario un tratamiento de 30 min con plasma para erradicar completamente los biofilms, ya que a tiempos más cortos de exposición conservan la viabilidad y la virulencia incluso en el caso de falta de cultivabilidad celular. Además, se demostró la presencia de abundante ADN extracelular en la matriz del biofilm.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto del plasma sobre la matriz y la estructura del biofilm de *P. aeruginosa*; en particular sobre los polisacáridos de la misma, como así también determinar la función que desempeña el eDNA en la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma. Se utilizaron los colorantes fluorescentes Calcofluor White y SYTO 9 para teñir los polisacáridos y las células respectivamente y se encontró una reducción de la matriz del biofilm a mayor tiempo de exposición al plasma. Se observó la estructura del biofilm mediante microscopía electrónica de barrido y se determinó que los biofilms expuestos a tiempos largos del tratamiento con plasma pierden la estructura tridimensional, presentan daño celular y desintegración de la matriz. Además, se realizó un análisis de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, sigla del inglés “Fourier-transform infrared spectroscopy”) del biofilm expuesto al tratamiento con plasma. Se observaron cambios en la composición química y estructural del biofilm al

ser tratado con plasma, siendo los cambios mayores a mayor tiempo de exposición. Por otro lado, se degradó enzimáticamente el eDNA antes del tratamiento con plasma y se determinó la curva de supervivencia del biofilm. Se observó una disminución constante en el número de UFC/mL a mayor tiempo de exposición al plasma y se determinó un tiempo de reducción decimal de  $0.91 \pm 0.07$  min, mientras que en el **Capítulo 2** se informó un tiempo de reducción decimal de  $1.47 \pm 0.28$  min para el biofilm sin tratar previamente con ADNasa y sometido al mismo tratamiento con plasma, sugiriendo la importancia del ADN extracelular en la protección del biofilm frente a la exposición al plasma.

## 1. INTRODUCCIÓN

En general, los microorganismos no viven en cultivos puros de células individuales sino que se acumulan y forman agregados como flóculos, lodos o películas. En la mayoría de los biofilms, los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca, mientras que la matriz puede representar más del 90% (Sutherland, 2001; Flemming y Wingender, 2010). Existe una gran diversidad en la composición de la matriz extracelular de los biofilms, tanto entre los formados por diferentes especies como dentro de los formados por diferentes cepas de una sola especie (Branda *et al.*, 2005; Flemming *et al.*, 2007; Flemming y Wingender, 2010). Incluso, para una misma cepa, es posible que bajo diferentes condiciones y diferentes momentos del desarrollo, ciertos componentes de la matriz puedan ser más importantes para la integridad o funcionamiento del biofilm (Karatan y Watnick, 2009).

La matriz generalmente está compuesta por lipopolisacáridos, glicolípidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Costerton *et al.*, 1999; Flemming *et al.*, 2007; Flemming y Wingender, 2010), y se estima que podría contener hasta un 97% de agua (Zhang *et al.*, 1998). Las EPS proporcionan estabilidad mecánica, median la adhesión a la superficie, forman una red polimérica cohesiva y tridimensional que interconecta e inmoviliza transitoriamente las células dentro del biofilm, actúa como un “sistema digestivo” externo manteniendo las enzimas extracelulares cerca de las células, permite la acumulación de

nutrientes del medio ambiente, mantiene un microambiente altamente hidratado alrededor de las células conduciendo a tolerancia a la desecación, facilita la transferencia horizontal de genes y actúa como barrera protectora confiriendo resistencia a las defensas del huésped durante la infección y tolerancia a varios agentes antimicrobianos (Flemming y Wingender, 2010).

Entre los componentes más estudiados de la matriz de los biofilms están los exopolisacáridos, las proteínas y los compuestos proteicos como fimbrias y pili y el eDNA (Karatan y Watnick, 2009). Algunos exopolisacáridos han sido ampliamente estudiados, entre ellos el alginato, componente principal de la matriz de los biofilms de cepas mucoides de *P. aeruginosa*. Sin embargo, varios informes han demostrado que otros polisacáridos, como Psl y Pel, contribuyen a la matriz de biofilms formados por cepas de *P. aeruginosa* no mucoides, como la PAO1, que se cree que son las primeras en colonizar los pulmones de pacientes con fibrosis quística (Ma *et al.*, 2006; Byrd *et al.*, 2009; Colvin *et al.*, 2011, 2012; Franklin *et al.*, 2011). Otro componente importante y abundante en la matriz de los biofilms son los ácidos nucleicos, específicamente el ADN. Aunque inicialmente el eDNA fue visto como material residual de células lisadas, se ha hecho cada vez más claro que es una parte integral de la matriz y del modo de vida del biofilm.

Los estudios de inactivación de células planctónicas por plasma han demostrado que el tratamiento puede afectar la envoltura celular, las proteínas y el ADN de los microorganismos (Lackmann *et al.*, 2013; Puligundla y Mok, 2017). Los principales mecanismos de inactivación se pueden dividir entre biológicos y físicos; entre los biológicos se encuentran daño del ADN, peroxidación de lípidos, modulación de proteínas e inducción de apoptosis (Venezia *et al.*, 2008; Moisan *et al.*, 2002; Alkawareek *et al.*, 2012; Lunov *et al.*, 2016); y entre los físicos la disrupción celular por fuerzas electrostáticas producidas por la acumulación de partículas cargadas y la formación de poros en la membrana celular que conduce a fugas de contenido y finalmente a la muerte del microorganismo (Laroussi, 2002; Lunov *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017). Los estudios de erradicación de biofilm por plasma frío a presión atmosférica se han centrado en su mayoría en el efecto sobre las células y las moléculas. Aunque los mecanismos exactos que

conducen a la inactivación del biofilm por plasma aún no están claros, se han informado alteraciones en la integridad de la membrana celular, disrupción celular y componentes celulares, reducción del espesor del biofilm y disminución de la cultivabilidad y actividad metabólica de las células (Vandervoort *et al.*, 2008; Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2012; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Khan *et al.*, 2016).

Muy pocos estudios se han llevado a cabo sobre el efecto del plasma sobre la matriz del biofilm. Vandervoort y Brelles-Mariño (2014) observaron que el área correspondiente a las zonas de matriz del biofilm es menor en el caso de tratamiento con plasma, con respecto al biofilm sin tratar. Estos autores sugirieron que el plasma podría reducir las áreas correspondientes a matriz posiblemente por oxidación o peroxidación de los exopolisacáridos que componen la matriz de biofilm por parte de los agentes reactivos presentes en el plasma. Recientemente Khan y colaboradores (2016), reportaron los cambios bioquímicos que se producen en la célula y en las EPS de la matriz durante el proceso de inactivación por plasma de biofilms de *E. coli*, *C. sakazakii* y *S. aureus*. Mostraron la reducción gradual de carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN a medida que aumentaba el tiempo de exposición al plasma.

En el **Capítulo 2**, se presentó una fuente DBD coaxial de plasma operada en aire sobre biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo y se determinó la curva de supervivencia del biofilm a diferentes tiempos de exposición al plasma. En el **Capítulo 3** se encontró que los biofilms tratados con plasma durante tiempos de exposición cortos conservan la viabilidad incluso en el caso de la falta de cultivabilidad celular y además las células aún son virulentas, por lo que fueron necesarios 30 min de exposición al plasma para erradicarlos. También, se demostró la presencia de abundante eDNA en la matriz del biofilm. El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de una fuente DBD coaxial de plasma operada en aire sobre la matriz del biofilm de *P. aeruginosa*; en particular sobre los polisacáridos y la matriz desprovista del eDNA, y determinar la función que cumple este ADN en cuanto a la protección del biofilm frente el tratamiento con plasma.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Microorganismo, medio de cultivo y condiciones de crecimiento del biofilm**

Todos los experimentos se llevaron a cabo con *P. aeruginosa* cepa PAO1 como se describe en el **Capítulo 1 sección 2.1**. El biofilm se creció bajo las condiciones que condujeron a un biofilm robusto: superficie de acero inoxidable, medio mínimo AB y cultivo continuo. La inoculación del reactor y las condiciones de crecimiento del biofilm se describen en el **Capítulo 1 secciones 2.2 y 2.3**.

### **2.2. Tratamiento con plasma**

Se produjo plasma de descarga de gas a presión atmosférica usando una configuración coaxial DBD operado en aire humidificado a un flujo de 1 L/min. Las condiciones de operación se describen en el **Capítulo 2 sección 2.2**. Los biofilms de *P. aeruginosa* se sometieron al tratamiento con plasma durante diferentes tiempos de exposición (3, 15 y 30 min) bajo condiciones estériles. Se incluyó un control sin tratamiento con plasma (tiempo de exposición de 0 min).

### **2.3. Efecto del plasma sobre los polisacáridos de la matriz del biofilm de *P. aeruginosa***

#### **2.3.1. Tinción del polisacárido con Calcofluor White**

Para visualizar la estructura de la matriz tanto del biofilm control como del tratado con plasma, se utilizó el colorante Calcofluor White (Sigma-Aldrich, 1 g/L de Calcofluor White M2R y 0.5g/L de azul de Evans). Una vez crecido el biofilm, se retiraron los cupones del reactor, se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril, se secaron al aire durante 10 min, se trataron con plasma generado en aire humidificado durante 0, 3, 15 y 30 min, se les agregó 15 µL de una solución 1:1 de Calcofluor White e hidróxido de potasio al 10% p/v y se incubaron 1 min en oscuridad. Los cupones se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Leica usando un filtro de excitación/emisión de 355/433 nm. Las imágenes

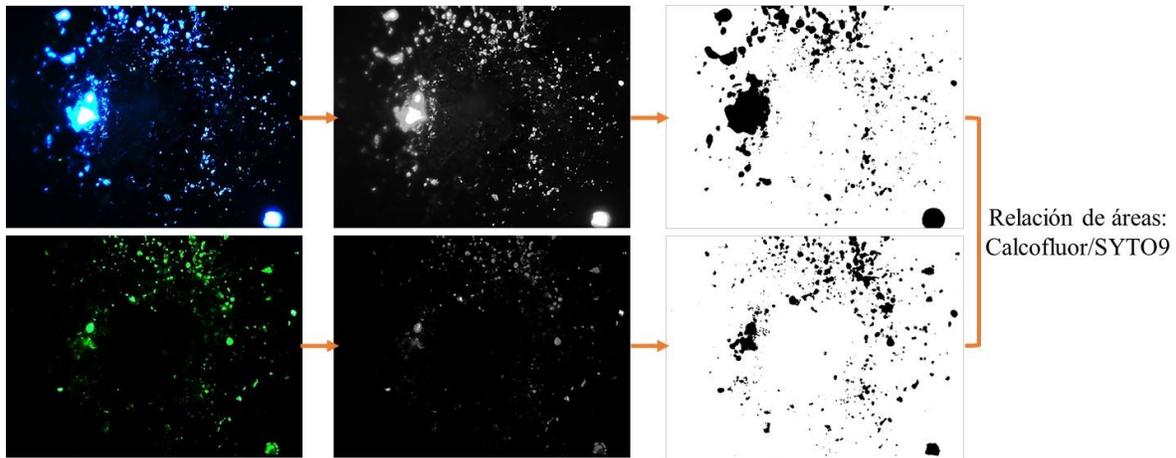
fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite (2.5.0 R1) en un aumento de 400X y los análisis de imágenes se realizaron con el software libre ImageJ.

### **2.3.2. Tinción simultánea del biofilm con Calcofluor White y SYTO 9**

Para visualizar al mismo tiempo las células bacterianas y la matriz del biofilm, se utilizaron los colorantes verde fluorescente SYTO 9 y Calcofluor White. Una vez crecido el biofilm, los cupones se procesaron como se describe en **2.3.1** y se trataron con plasma durante 0, 3 y 30 min. Se les agregó 15  $\mu$ L del colorante SYTO 9 y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se retiró el exceso de colorante con toallas de papel estériles y posteriormente, se agregó a los cupones 15  $\mu$ L de una solución 1:1 de Calcofluor White e hidróxido de potasio al 10% p/v y se incubaron 1 min en oscuridad. Los cupones se visualizaron como se describió en **2.3.1**, se adquirieron las imágenes correspondientes a la matriz teñida con Calcofluor White seleccionándolas con el filtro de excitación/emisión de 355/433 nm y las mismas imágenes correspondientes a la tinción de las células con el colorante SYTO 9 seleccionándolas con el filtro de excitación/emisión de 480/500 nm.

### **2.3.3. Relación de áreas entre las imágenes de la matriz y las células del biofilm**

Una vez adquiridas las imágenes como se describe en **2.3.2**, se determinó la relación de áreas entre la matriz y las células del biofilm utilizando el software ImageJ. El tratamiento digital consistió en pasar las imágenes de color a escala de grises y posteriormente se transformaron a binarias. La binarización consiste en un proceso de reducción de la información en el que solo persisten dos valores: píxeles blancos y negros. En este caso, se determinó el área de los píxeles negros. Se calculó la relación dividiendo el área de la imagen binaria de la matriz por el área de las imágenes binarias de las células del biofilm (**Figura 1**). El mismo procedimiento se realizó para los biofilms control y tratados con plasma por 3 y 30 min como se indica en **2.3.2**.



**Figura 1.** Esquema del tratamiento digital de imágenes con el software ImageJ. En la parte superior se muestra la secuencia para procesar la imagen de la matriz del biofilm teñida con Calcofluor White, y en la parte inferior para una imagen de las células del biofilm teñidas con SYTO 9. En este esquema se muestran las imágenes del biofilm control de *P. aeruginosa*.

#### **2.4. Microscopia electrónica de barrido de biofilms de *P. aeruginosa* expuestos a plasma**

Se creció el biofilm sobre cupones de acero inoxidable para la observación mediante SEM. Una microplaca de 24 pocillos de polipropileno (Cellstar, Greiner Bio-One), con un cupón estéril en cada pocillo, fue inoculada de modo tal que la  $DO_{550\text{ nm}}$  fuera igual a 0.1, en medio LB y con un volumen final de 2 mL. La placa se incubó 24 hs, a 37 °C y sin agitación. Finalizado el período de incubación, se realizó un lavado de los cupones con 1 mL de solución fisiológica, se secaron al aire y se trataron con plasma durante 0, 3 y 30 min. Posteriormente, se procedió a fijar y deshidratar las muestras. La fijación se realizó sumergiendo los cupones en glutaraldehído 2.5 % v/v durante 30 min y luego en agua destilada para retirar el exceso de este último. A continuación, la deshidratación se llevó a cabo mediante gradientes de etanol frío. En este proceso se sumergen los cupones durante 20 min en soluciones de etanol progresivamente más concentradas: 30, 50, 70, 90 y 95 % v/v. Finalmente, se realizan dos inmersiones de 20 min en etanol absoluto. Una vez finalizado este proceso, las muestras se secan mediante secado por punto crítico. Este procedimiento consiste en el desplazamiento de etanol de las muestras por  $CO_2$  líquido, y

seguidamente su evaporación en condiciones de 31.1 °C y 1072 psi. Luego, las superficies de las muestras fueron recubiertas con oro pulverizado mediante un metalizador Balzers SCD 030, hasta obtener un espesor de entre 15 y 20 nm. Tanto este procedimiento como el recubrimiento con oro de las muestras son llevados a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco”- CINDECA- UNLP. Finalmente, las imágenes fueron adquiridas con un SEM Philips 505 (Rochester, EE.UU.)

## **2.5. Degradación enzimática de eDNA de la matriz del biofilm de *P. aeruginosa* previo al tratamiento con plasma**

Los biofilms crecidos sobre cupones de acero inoxidable fueron tratados con 20 µL de ADNasa 0.1 mg/mL (DNase I de páncreas bovino, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 30 °C durante 60 min. Se eliminó la suspensión enzimática con toallas de papel estériles y se lavaron los cupones tres veces con 50 µL de solución fisiológica estéril. Luego se expusieron los biofilms al plasma durante 0, 1, 3 y 15 min. Los cupones se colocaron en una cámara húmeda después del tratamiento con plasma y se incubaron con 35 µL de solución fisiológica durante 10 min. Los biofilms fueron despegados por raspado con espátula estéril y suspendidos en 1 mL de solución fisiológica. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron por duplicado 100 µL de cada suspensión en medio solido AB. Las placas se incubaron a 37 °C y se evaluó la formación de UFC por conteo de las mismas. Se realizaron curvas de supervivencia (log de UFC/mL versus tiempo de exposición a plasma) y se determinó el Valor D. Se incluyeron dos controles: uno con enzima y sin tratamiento con plasma y otro sin enzima y sin tratamiento con plasma.

## **2.6. Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) del biofilm de *P. aeruginosa* expuesto a plasma**

Para crecer el biofilm, se utilizaron microplacas estériles de poliestireno de 24 pocillos (Greiner CELLSTAR®, Sigma-Aldrich) y medio AB. Se inoculó cada pocillo de modo tal que la DO<sub>550 nm</sub> fuera igual a 1 con un volumen final de 2 mL. La microplaca se incubó durante 24 hs a 37°C y sin agitación. Una vez crecido el biofilm, se retiró el medio de

cultivo con las células plantónicas, se lavaron los pocillos dos veces con solución fisiológica estéril y se dejaron secar durante 10 min al aire. Los biofilms fueron sometidos al tratamiento con plasma durante diferentes tiempos de exposición (0, 3 y 30 min) bajo condiciones estériles. Luego del tratamiento, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución fisiológica a cada pocillo y se despegó el biofilm con espátula estéril. La  $\text{DO}_{550\text{nm}}$  de cada suspensión resultó de aproximadamente 2. Con el fin de incrementar el número de células a analizar, se combinaron los contenidos de dos pocillos y se depositaron sobre la superficie de una celda óptica de SeZn (13 mm de diámetro, Korth Kristalle GMBH, Alemania) que se dejó secar al aire durante 1 h (Naumann, 2000). Se realizaron tres réplicas biológicas independientes y al menos tres repeticiones técnicas de cada condición (0, 3 y 30 min de exposición al plasma).

Los espectros del FTIR de absorción/transmisión (A/T) se adquirieron en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  con un espectrómetro FTIR (Bruker IFS 66 Burker Optics), utilizando una resolución espectral de 6  $\text{cm}^{-1}$  y 64 co-adiciones de escaneo (Bosch *et al.*, 2006; Naumann, 2000), aplicando la tecnología de película seca (films delgados entre o sobre soportes transparentes). Para evitar la interferencia de bandas de vapor de agua, los espectros se midieron bajo una purga continua de aire seco. Antes del análisis de los datos, los espectros crudos se sometieron a una prueba de calidad (QT, siglas del inglés “quality test”) utilizando el software OPUS (Naumann, 2000). Esta prueba incluyó un control de: i) absorbancia en la región amida I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ), con valores aceptables entre 0.20 y 1.20 unidades de absorbancia; ii) señal de ruido, con valores inferiores a  $1.5 \times 10^{-4}$ , calculada a partir de la primera derivada entre 2100 y 2000  $\text{cm}^{-1}$ ; y iii) contenido de vapor de agua, con valores inferiores a  $3 \times 10^{-4}$ , determinado a partir de las primeras derivadas entre 1847 y 1837  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros que pasaron la QT se pre-procesaron de la siguiente manera: primero se promediaron las réplicas técnicas y luego, para aumentar el número de características discriminantes dentro del conjunto de bandas espectrales, asignar las bandas y minimizar los problemas con los cambios en la línea base, se calcularon las segundas derivadas sobre los espectros promedios utilizando el algoritmo Savitzky-Golay con suavizado de 9 puntos (Helm y Naumann, 1995; Naumann, 2000; Bosch et al., 2006). Finalmente, para evitar la interferencia de las variaciones de biomasa entre las diferentes

muestras, se normalizaron vectorialmente las segundas derivadas en todo el rango del espectro. Para el pretratamiento espectral se utilizó el software OPUS (versiones 4.2 y 7.0 Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania). Los espectros de FTIR y el análisis de los mismos se llevaron a cabo en el CINDEFI con la asesoría de la Dra. Cecilia Figoli.

### **2.6.1. Análisis jerárquico de cluster**

Con el objetivo de determinar la variabilidad entre los fenotipos de los espectros del FTIR obtenidos después de tratar los biofilms con plasma, se realizó un análisis jerárquico de “cluster” de los espectros técnicos promedios obtenidos de cada tratamiento (0, 3 y 30 min de exposición al plasma) y de cada experimento biológico independiente, es decir 9 repeticiones en total. Para este fin, como datos de entrada se utilizaron las segundas derivadas normalizadas vectorialmente y se calcularon los valores de distancia espectral (medidos como heterogeneidad) en diferentes rangos de número de onda y el valor de fusión en cada dendrograma se calculó mediante el algoritmo de Ward (OPUS, Bruker Optics, EE.UU.).

### **2.7. Análisis estadístico**

Para comparar las medias de la relación entre el área de píxeles negros de la imagen binaria de la matriz y de las células de biofilms tratados con plasma durante diferentes tiempos, se realizó análisis de varianza (ANOVA). La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Levene. La comparación entre medias se realizó mediante el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Se utilizó el software STATISTICA de la compañía Statsoft® (Copyright © StatSoft, 2011). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes en el tiempo y cada experimento se realizó por duplicado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

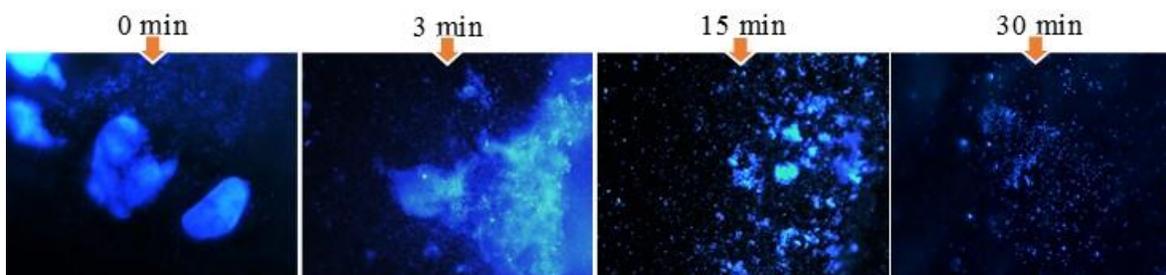
#### 3.1. Efecto del plasma sobre los polisacáridos de la matriz y la estructura del biofilm de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* tiene la capacidad de producir al menos tres polisacáridos que difieren en su estructura química y mecanismos biosintéticos: alginato, Psl y Pel. Dado que el alginato se asocia a menudo con infecciones pulmonares crónicas, su vía biosintética es la mejor caracterizada, sin embargo, sólo es producido por un subconjunto de cepas (Franklin *et al.*, 2011). El alginato se compone de residuos de ácido D-manurónico intercalados con residuos de ácido L-gulurónico; el Psl de un pentámero que se repite de residuos de D-manosa, L-ramnosa y D-glucosa; y el Pel no ha sido bien caracterizado. Se ha reportado que el Psl está asociado a la adherencia a la superficie, construcción de la matriz, conexión célula a célula, mantenimiento de la estructura e incluso a la señalización celular (Byrd *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2006). Se informó que la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* presenta predominantemente el Psl, asociado a la estabilidad de la matriz, pero puede producir los componentes necesarios para generar el Pel (Colvin *et al.*, 2011). Si bien no se ha definido la estructura, composición y naturaleza del Pel, Colvin y colaboradores (2011) reportaron que este polisacárido es crucial para mantener las interacciones entre células en los biofilms de *P. aeruginosa* PA14.

Wang y colaboradores (2013), indicaron que el Psl desempeñaría un papel muy importante en la formación del biofilm, ya que rodea las células y conecta las microcolonias; actúa como soporte tipo red fortaleciendo el biofilm; funciona como una superficie de adherencia para reclutar nuevas bacterias y cubre rápidamente la superficie para obtener más biomasa. Además, propusieron que la formación de las fibras de Psl son el resultado de la liberación del polisacárido de la superficie celular bacteriana durante la migración mediada por pili tipo IV.

El Calcofluor White es un colorante que se une a un gran número de polisacáridos y se ha utilizado para teñir la matriz extracelular de los biofilms. Este colorante interactúa

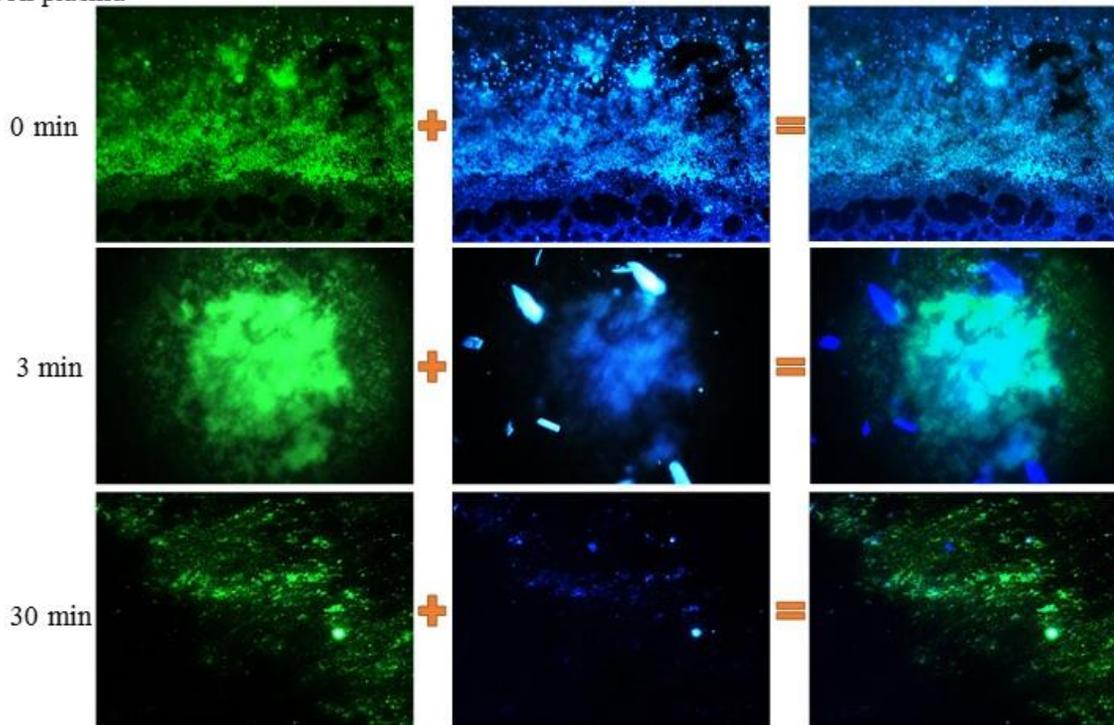
fuertemente con los enlaces glucosídicos de las unidades continuas de (1→4)- $\beta$ -D-glucopiranosil, como los  $\beta$ -D-glucanos, xiloglucanos y sustitutos de la celulosa; también interactúa con otros polisacáridos, como (1→3)- $\beta$ -D-glucanos y galactoglucomanos hemicelulósicos (Wood, 1980). En la **Figura 2** se muestran las imágenes de la matriz de *P. aeruginosa* teñida con el Calcofluor White. En los biofilms control y tratados con plasma durante 3 min se observaron cúmulos de matriz, mientras que en los tratados durante tiempos largos de exposición se observó desintegración de la misma.



**Figura 2.** Biofilm de *P. aeruginosa* tratado con plasma (0, 3, 15 y 30 min) y teñido con Calcofluor White. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite con el filtro de excitación/emisión de 355/433 nm en un aumento de 400X.

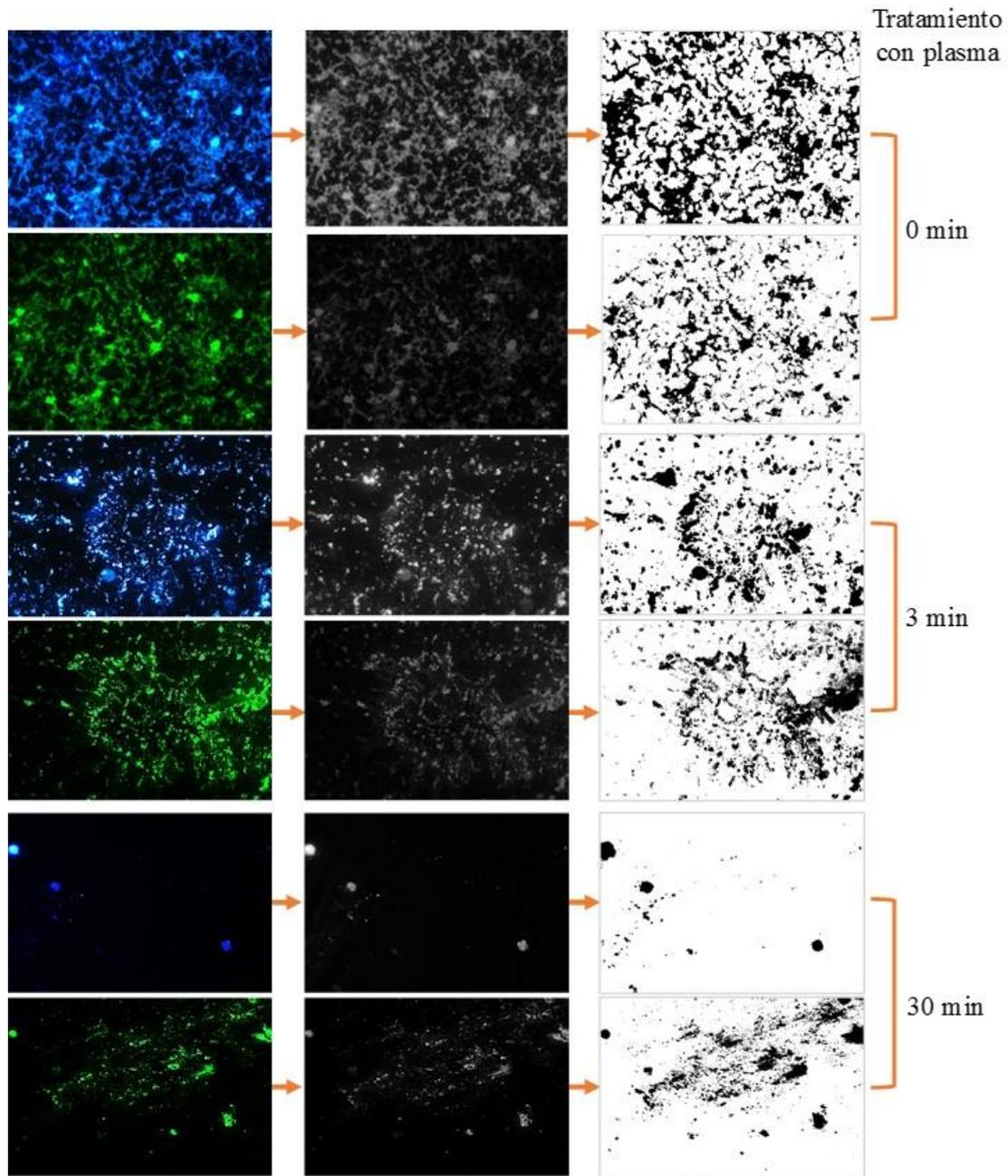
Para distinguir las células bacterianas de la matriz del biofilm, se utilizó el colorante Calcofluor White a continuación de la tinción con SYTO 9. Se encontró que en los biofilms control y tratados por 3 min la matriz cubría las células del biofilm, mientras que para el tiempo largo de exposición al plasma se presentó menor cantidad de matriz entre las células (**Figura 3**).

Tratamiento  
con plasma

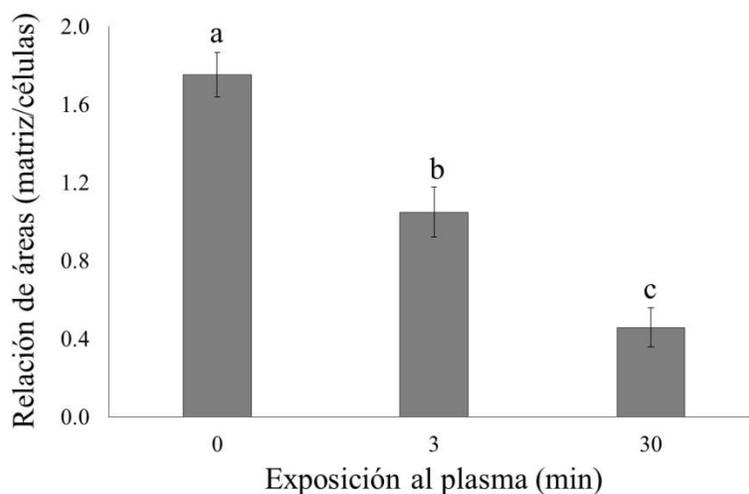


**Figura 3.** Biofilm de *P. aeruginosa* tratado con plasma durante 0, 3 y 30 min. A la izquierda se muestran las imágenes correspondientes a la tinción de las células con el colorante SYTO 9 y seleccionadas con el filtro de excitación/emisión de 480/500 nm, en el centro las mismas imágenes correspondientes a la matriz teñida con Calcofluor White y seleccionadas con el filtro de excitación/emisión de 355/433 nm, y a la derecha la superposición de las imágenes anteriores. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite en un aumento de 400X.

Se cuantificó la proporción de matriz y células por medio de tratamiento digital de las imágenes (**Figura 4**), y se determinó la relación de áreas dividiendo el área de los píxeles negros de las imágenes binarias de la matriz por el de las imágenes binarias de las células del biofilm tratadas durante diferentes tiempos de exposición al plasma (**Figura 5**). Se presentó una relación de área (matriz/células) mayor a uno para los biofilm control, indicando mayor proporción de matriz que de células, cercana a uno para los biofilms tratados por 3 min, y menor a uno para los tratados por 30 min, sugiriendo una disminución de la matriz.

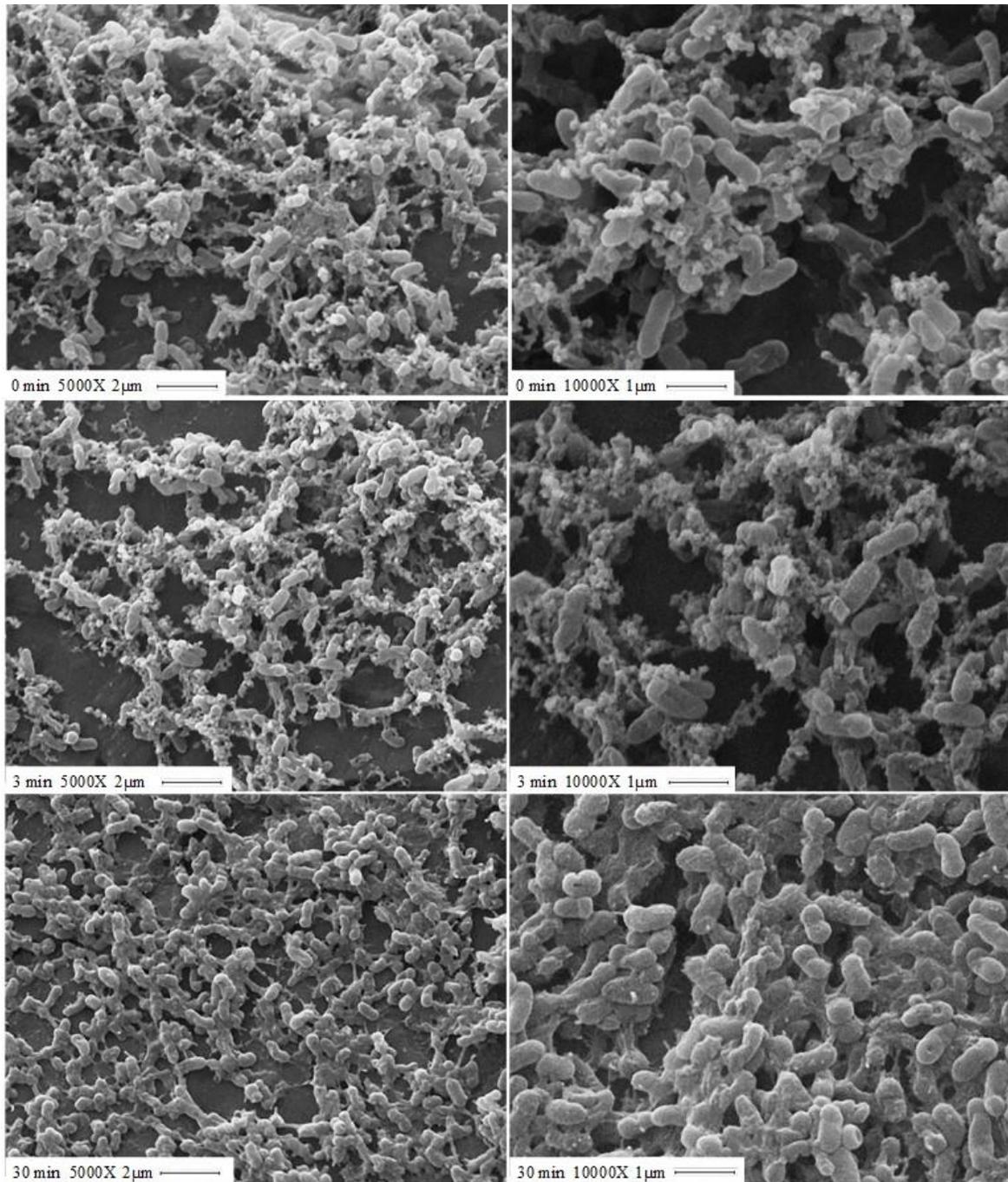


**Figura 4.** Biofilm de *P. aeruginosa* tratado con plasma durante 0, 3 y 30 min. A la izquierda se muestran las imágenes adquiridas con el programa Leica Application Suite en un aumento de 400X, correspondientes a la tinción de las células con SYTO 9 y de la matriz con Calcofluor White, en el centro las imágenes anteriores convertidas a blanco y negro y a la derecha, convertidas a binario con el software ImageJ.



**Figura 5.** Relación entre el área de píxeles negros de la imagen binaria de la matriz teñida con Calcofluor White y de las células teñidas con SYTO 9 de biofilms tratados con plasma durante diferentes tiempos (0, 3 y 30 min). Las medias son el promedio de la relación de áreas de 40 fotos adquiridas en 4 ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras representan diferencia significativa ( $p < 0.001$ ).

En la **Figura 6** se muestran las imágenes del SEM de biofilms de *P. aeruginosa* tratados durante diferentes tiempos de exposición al plasma (0, 3 y 30 min). Los biofilms control presentaron una estructura tridimensional compuesta por cúmulos de células y espacios vacíos, además de fibras entrelazando las bacterias y cubriendo toda la matriz. Los espacios vacíos corresponderían a los canales por los que circulan agua y nutrientes en el biofilm. Según el modelo que propone Wang y colaboradores (2015), las fibras podrían estar compuestas por el exopolisacárido Psl y ADN extracelular. Tanto a un aumento de 5000X como de 10000X se observaron células intactas de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . En las imágenes de los biofilms tratados durante tiempos cortos de exposición al plasma, se empiezan a observar algunas células de forma irregular, pero no se observan daños significativos sobre las células o la matriz; mientras que el biofilm expuesto a tiempos largos del tratamiento, perdió la estructura tridimensional, presentó daño celular y desintegración de la matriz. A los 30 min de exposición al plasma, se observó un biofilm plano, desestructurado, con células deformadas y rotas.



**Figura 6.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de biofilms de *P. aeruginosa* tratados durante diferentes tiempos de exposición al plasma (0, 3 y 30 min). Las imágenes de la izquierda fueron adquiridas con un aumento de 5000X y las de la derecha con 10000X.

Los estudios de erradicación de biofilm por plasma frío a presión atmosférica se han centrado en su mayoría en el efecto sobre las células y las moléculas y muy pocos estudios se han enfocado sobre lo que le ocurre a la matriz. En contribuciones anteriores de Zelaya y colaboradores (2010, 2012), y de Vandervoort y Brelles-Mariño (2014), se reportaron los efectos del plasma sobre la matriz del biofilm de *P. aeruginosa* utilizando microscopía de fuerza atómica. Vandervoort y Brelles-Mariño (2014) estudiaron la topografía de biofilms de *P. aeruginosa* tratados con plasma y observaron que el área correspondiente a las zonas de matriz del biofilm es menor en el caso de tratamiento con plasma, con respecto al biofilm sin tratar. Luego de 30 min de tratamiento, prácticamente no se observan zonas correspondientes a matriz. Estos autores sugirieron que el plasma podría reducir las áreas correspondientes a matriz posiblemente por oxidación o peroxidación de los exopolisacáridos que componen la matriz de biofilm por parte de los agentes reactivos presentes en el plasma. Una reducción o eventual pérdida de esa matriz reduciría la adhesividad del biofilm a la superficie a la cual está anclado y conduciría a la desorganización de su estructura tridimensional. En ese mismo trabajo se demostró que la adhesividad del biofilm varía a lo largo de su superficie, y es mayor en áreas con gran cantidad de matriz y se reduce luego del tratamiento con plasma.

También se ha estudiado el efecto del plasma sobre la matriz de biofilms por medio de SEM. Ziuzina y colaboradores (2014, 2015), utilizaron esta microscopía para visualizar el efecto del tratamiento de un plasma DBD sobre biofilms de *E. coli* y *P. aeruginosa* formados en membranas de policarbonato. Para los biofilms de *P. aeruginosa*, reportaron daños significativos de las células bacterianas y de las EPS después de los tratamientos directos e indirectos con plasma, pero la desintegración completa de las células y la matriz del biofilm se presentó solo con el tratamiento directo. Nuestros resultados muestran que los biofilms expuesto a tiempos largos del tratamiento con plasma, pierden la estructura y presentan daño celular y desintegración de la matriz.

Recientemente, Khan y colaboradores (2016), reportaron el uso de una fuente de plasma DBD sumergida en agua para tratar biofilms de *E. coli*, *C. sakazakii* y *S. aureus* formados sobre cupones de acero inoxidable y medio TSB. Utilizaron espectroscopía infrarroja por

transformadas de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR, sigla del inglés “attenuated total reflectance Fourier transform infrared”) para elucidar los cambios que se producen en la célula y en las EPS del biofilm durante el proceso de inactivación por plasma. Las mediciones de ATR-FTIR mostraron la reducción gradual de carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN a medida que aumentaba el tiempo de exposición al plasma. Después de 60 min de tratamiento del biofilm con plasma, observaron un descenso rápido en los picos de los espectros del ATR-FTIR correspondientes a los 2960 y 2920  $\text{cm}^{-1}$ , mostrando que se produce una disrupción de la membrana celular y una ruptura de las EPS presentes en la superficie del biofilm. Además, analizaron imágenes del detector de electrones secundarios del SEM, y reportaron que los biofilms no fueron uniformes a lo largo del cupón y que las células estaban cubiertas por EPS, lo cual aumentaba la estabilidad del biofilm.

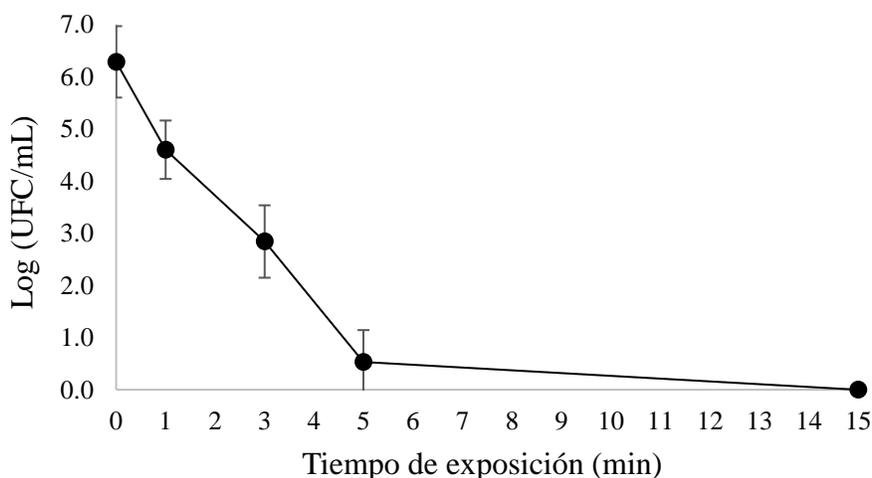
Nuestros resultados concuerdan con los reportes anteriores. Observamos una reducción de la matriz del biofilm tanto a tiempos cortos como largos de exposición al plasma (**Figuras 3, 4, 5 y 6**) obteniéndose inclusive la casi completa remoción de la matriz a mayor tiempo de exposición al plasma (**Figuras 2 y 6**). Además, como se mostró en las figuras del Capítulo 3 y en el presente capítulo en las **Figuras 2, 3 y 4**, los biofilms no fueron uniformes a lo largo del cupón. Estos resultados muestran que la erradicación del biofilm por la exposición al plasma no es debida solamente a la inactivación/muerte celular sino también a la disminución de la matriz. Las especies reactivas del plasma podrían degradar la matriz a medida que penetran a través de las EPS y dejar las células vulnerables al tratamiento.

### **3.2. Implicancia del eDNA en la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma**

Para determinar el rol que cumple el ADN extracelular en cuanto a la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma, se degradó enzimáticamente el eDNA antes del tratamiento, y se determinó la curva de supervivencia del biofilm a diferentes tiempos de exposición (**Figura 7**). Se observó una disminución constante en el número de UFC/mL a

mayor tiempo de exposición al plasma. Los biofilms fueron erradicados después de un tratamiento de 15 min, resultando en una disminución del número de UFC/mL de 6.3 unidades logarítmicas, y obteniendo una disminución en ese número de 3.4 unidades logarítmicas después de una exposición de 3 min al plasma.

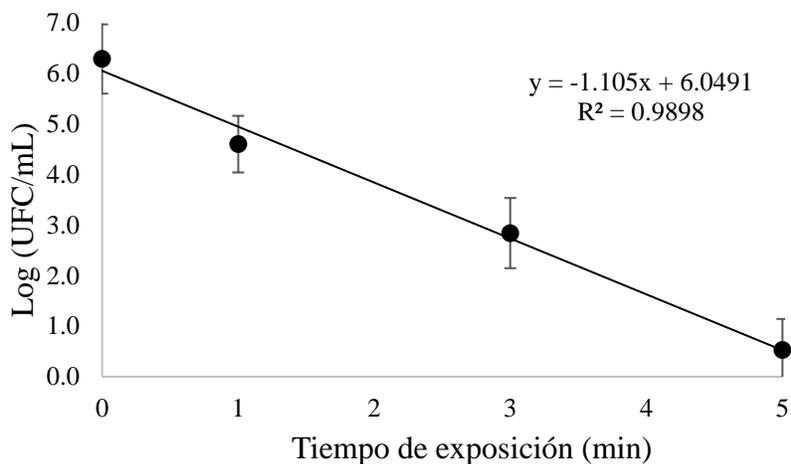
Se incluyeron dos controles: un cupón con biofilm sometido a tratamiento enzimático, pero no a plasma y un cupón sin tratamiento alguno. Se encontró una disminución de  $13.34 \pm 2.00$  UFC/mL (13.4 %) en el control sin tratamiento con respecto al control tratado con ADNasa y sin exposición al plasma, posiblemente debido al desprendimiento de células en los lavados posteriores a la degradación enzimática, sugiriendo que, aunque este eDNA no cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la estructura de los biofilms maduros de *P. aeruginosa* (**Capítulo 3**) sirve como unión para células del exterior del biofilm.



**Figura 7.** Curva de supervivencia de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* tratados con ADNasa y posteriormente con plasma de aire humidificado durante diferentes tiempos de exposición. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Se observó una cinética de dos pendientes, con una disminución rápida del número de UFC/mL y un valor  $D_1$  de  $0.91 \pm 0.07$  min (**Figura 8**) seguido de un posterior descenso lento en el número de UFC/mL. Estos resultados muestran una inactivación más rápida que para biofilms sin tratar previamente con ADNasa y sometidos al tratamiento con plasma. En este último caso se encontró una cinética de doble pendiente con un tiempo de

reducción decimal de  $1.47 \pm 0.28$  min para tiempos de exposición cortos (**Capítulo 2**). Estos dos valores D fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Línea de tendencia y ecuación del gráfico de la curva de supervivencia de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* tratados con ADNasa y posteriormente con plasma de aire durante tiempos cortos de exposición. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Al evaluar el efecto del plasma sobre la matriz del biofilm desprovista del eDNA, se encontró un cambio en la cinética de inactivación y una reducción en el valor D con respecto al biofilm con eDNA, sugiriendo que este ADN es importante en la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma ya que al degradarlo, el biofilm se erradica más rápidamente. Abramzon y colaboradores (2006), propusieron que la cinética de doble pendiente podría deberse a que primero ocurre la muerte de los microorganismos de las capas superiores fácilmente disponibles y más expuestas al plasma. Después de esta rápida muerte inicial, el plasma penetra las capas de restos celulares y células muertas antes de llegar a la parte interna del biofilm. Posiblemente en nuestro caso, al degradar el eDNA las células quedan más expuestas al plasma y las especies reactivas llegan más rápido a la parte interna del biofilm, resultando en un menor tiempo de erradicación.

Se ha documentado la importancia del eDNA para la adhesión a la superficie y el desarrollo del biofilm (Whitchurch *et al.*, 2002), como fuente de material genético en la transferencia

horizontal de genes (Molin y Tolker-Nielsen, 2003), como fuente de carbono y energía en condiciones de bajos nutrientes (Finkel y Kolter, 2001) y para la señalización de quórum sensing (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Spoering y Gilmore, 2006). En biofilms de *P. aeruginosa*, funciona como un conector intercelular (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Mann y Wozniak, 2012; Whitchurch *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007) y se han descrito varias vías bioquímicas para su producción: primero se reportó la excreción de ADN de doble cadena de células vivas (Hara *et al.*, 1981) y la liberación de vesículas que contenían ADN (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996), luego la lisis mediada por profagos de una subpoblación de células bacterianas (Webb *et al.*, 2003), y posteriormente Allesen-Holm y colaboradores (2006), informaron que la estructura de este eDNA es en gran parte similar al ADN cromosómico del organismo, sugiriendo que es generado por lisis de una subpoblación bacteriana.

El eDNA puede actuar como una barrera protectora contra agentes antimicrobianos. Mulcahy y colaboradores (2008), mostraron que en biofilms de *P. aeruginosa*, el eDNA puede causar la lisis celular por la quelación de cationes que estabilizan los LPS y la membrana externa de los microorganismos, produciendo la liberación del contenido citoplasmático (incluyendo ADN genómico) y aumentando las concentraciones de ADN, lo cual crea un entorno limitado en cationes que da como resultado la inducción del operón de resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos. De este modo, la presencia de eDNA en la matriz del biofilm contribuye al gradiente de cationes, la liberación de ADN genómico y la resistencia inducible a antibióticos. En función de los resultados encontrados en el presente trabajo, se podría pensar que el eDNA podría cumplir un papel como barrera protectora contra las especies reactivas, las moléculas excitadas y los iones del plasma.

La conexión entre los polisacáridos Pel y Psl, el eDNA, los pili tipo IV, el quórum sensing y la organización del biofilm es compleja y requiere más investigación. Ma y colaboradores (2009) investigaron el papel de los polisacáridos y el ADN durante el desarrollo del biofilm. Encontraron que, aunque tanto el ADN como los polisacáridos son abundantes en los biofilms de *P. aeruginosa*, tienen papeles divergentes durante la formación y el proceso de maduración. El contenido de Psl y de eDNA, parecen coordinar actividades para

mantener la estructura del biofilm. Durante el proceso de adhesión, encontraron que el Psl estaba anclado a la superficie celular en un patrón helicoidal, promoviendo las interacciones célula a célula y la síntesis de matriz; durante la maduración, observaron acumulación del polisacárido en la periferia de las microcolonias y ausencia del mismo en el centro de las estructuras en forma de hongos características de estos biofilms, formando una especie de “cavidad” en las cabezas de los hongos; mientras que en la etapa de dispersión, la cavidad no presentaba Psl pero sí células platónicas, células muertas y eDNA. Los genes que controlan la lisis celular parecen estar ayudando a la formación de la cavidad, contribuyendo a la liberación del ADN y tal vez de enzimas que degradan el polisacárido, y así facilitando la dispersión de las células.

Por otro lado, Wang y colaboradores (2015), estudiaron la interacción física entre el eDNA y el polisacárido Psl y reportaron la formación de una red de fibras de ADN-Psl que funciona como esqueleto o soporte de la estructura de los biofilms de *P. aeruginosa* PAO1. Propusieron que esta interacción puede beneficiar a los biofilms de muchas maneras, como limitando el acceso de agentes antimicrobianos y reduciendo la quelación de cationes del eDNA. Además, estos autores también informaron que el Psl no sólo interactúa con el ADN de *P. aeruginosa*, sino también con el ADN genómico de los neutrófilos humanos y de otras bacterias, lo que implicaría que este patógeno tendría la capacidad de utilizar el ADN de otros organismos para formar sus propias comunidades. En el presente estudio, a través de las imágenes del SEM, se pudo observar la formación de fibras entrelazando las células del biofilm control de *P. aeruginosa*. Las fibras se observaron en menor medida en los biofilms tratados durante tiempos cortos con plasma y fueron degradadas totalmente en los expuestos a tiempos largos del tratamiento (**Figura 6**). Esta interacción física entre el eDNA y el Psl podría explicar la razón por la cual al tratar el biofilm previamente con ADNasa se observa una inactivación más rápida debida tratamiento con plasma. Al degradar enzimáticamente este ADN, se podría estar desestabilizando las redes eDNA-Psl que sirven como soporte estructural del biofilm, lo que podría permitir que el tratamiento con plasma sea más eficaz

No se han reportado estudios de la interacción entre el eDNA y el tratamiento con plasma. En el presente trabajo, encontramos que el eDNA cumple un rol en la protección del biofilm frente a la exposición al plasma, ya que al degradar este ADN aumentó la eficiencia de erradicación del tratamiento y cambió la cinética de inactivación del biofilm. Se han reportado diferentes eficiencias de inactivación de biofilms de *P. aeruginosa* por plasma frío a presión atmosférica, con valores D que van desde pocos segundos hasta horas de exposición. Estas diferencias podrían estar relacionadas no solo con el dispositivo y la descarga de plasma generada, sino también con la composición de la matriz, ya que las EPS pueden variar y cambiar según la genética microbiana y las condiciones bajo las cuales se desarrolla el biofilm.

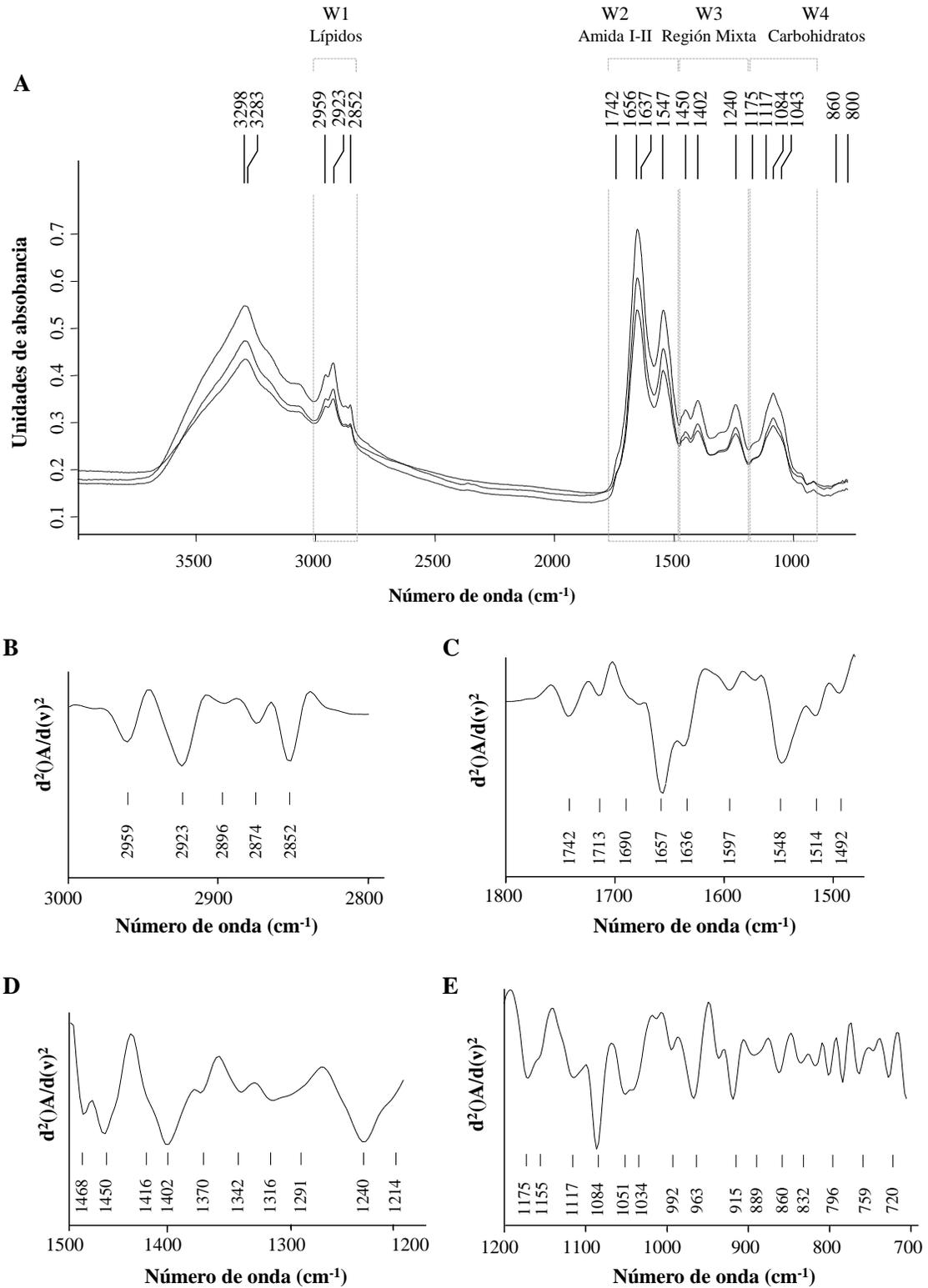
### **3.3. Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del biofilm de *P. aeruginosa* expuesto a plasma**

La técnica de FTIR proporciona una huella dactilar espectroscópica de la composición bioquímica y estructural del material en estudio. En la última década se ha utilizado para la detección e identificación de bacterias, hongos y levaduras (Bosch *et al.*, 2006; Grunert *et al.*, 2013; van der Mei *et al.*, 1996; Büchl *et al.*, 2008); y como una herramienta no destructiva para el monitoreo de la composición bioquímica de bacterias que crecen tanto en forma planctónica como en biofilms (Schmitt, *et al.* 1995; Nivens, *et al.* 1993; Nivens, *et al.* 2001; Serra *et al.*, 2007). En el presente trabajo, se empleó esta técnica para evaluar la composición de los biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 y las modificaciones químicas y estructurales que ocurren cuando se tratan por plasma durante diferentes tiempos de exposición.

Una molécula irradiada con IR puede absorber esta energía para alcanzar un estado vibracional excitado. El espectro de la radiación remanente mostrará una banda de absorción a determinada energía, de modo que el espectro infrarrojo se obtiene escaneando la intensidad de la radiación IR antes y después de irradiar la muestra. Las interacciones de la radiación con la materia pueden ser estudiadas en términos de cambios en los dipolos de

las moléculas asociados a vibraciones y rotaciones. Las vibraciones pueden ser debidas a cambios en la longitud (estiramiento) o en el ángulo (flexión) del enlace.

La **Figura 9A** presenta los espectros promedio sin procesar de las tres réplicas biológicas independientes correspondientes a los biofilms de *P. aeruginosa* sin exposición al plasma (control). Las **Figuras 9B, C, D y E** muestran las segundas derivadas de dichos espectros. La segunda derivada se realiza para mejorar la resolución, facilitar la asignación de bandas y crear una huella dactilar que se pueda analizar mediante algoritmos de reconocimiento de patrones (Helm *et al.*, 1995; Wenning y Sherer, 2013). Los espectros de absorción de FTIR del biofilm mostraron las características espectrales generales y los marcadores particulares previamente reportados para biofilms de otras cepas de *P. aeruginosa* y otros biofilms de bacterias gram negativas (Naumann *et al.*, 1991; Nivens *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2007). Las ventanas espectrales asociadas a los grupos funcionales de los biofilms se indican como: i) W1 (3.000-2.800  $\text{cm}^{-1}$ ), región espectral asociada con lípidos; ii) W2 (1780-1480  $\text{cm}^{-1}$ ), indicativa del contenido de biomasa, ya que incluye la región Amida I (1780-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) asignada a la absorción del enlace  $>\text{C}=\text{O}$  en proteínas, que también es sensible a cambios en la conformación de la estructura secundaria de proteínas, y a la región Amida II (1600-1480  $\text{cm}^{-1}$ ) debida al estiramiento del enlace C-N y a la flexión del N-H en péptidos y proteína; iii) W3 (1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ ), llamada región mixta, donde se observan bandas a 1450, 1402 y 1240  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la flexión de los enlaces C-H y a estiramientos simétricos de C-O,  $>\text{C}-\text{O}$  y  $>\text{P}=\text{O}$  correspondientes a ácidos grasos, proteínas y carbohidratos que contienen fósforo; y iv) W4 (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ), región típica de carbohidratos (Helm *et al.*, 1991; Naumann, 2000). El análisis de las modificaciones químicas y estructurales que ocurren cuando se tratan los biofilms con plasma se realizarán respecto a las segundas derivadas de los espectros promedios de los biofilms control.



**Figura 9.** Espectros de absorción de FTIR de biofilms control de *P. aeruginosa* PAO1. **A.** Espectros promedio de las réplicas biológicas independientes. Las ventanas espectrales

asociadas a los grupos funcionales de las biomoléculas se indican como W1, W2, W3 y W4. **B.** W1, asociadas a lípidos ( $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ). **C.** W2, correspondiente a absorción de proteínas ( $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ). **D.** W3, región mixta ( $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ ). **E.** W4, correspondiente a carbohidratos ( $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ).

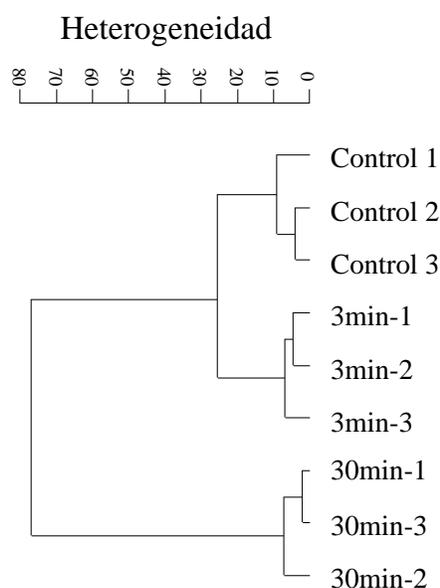
En la **Tabla 1** se resume la asignación tentativa de las bandas correspondientes a los grupos funcionales. Las principales características espectrales asociadas a los lípidos de membrana celular se incluyen en W1, debido a estiramientos asimétricos y simétricos del  $>\text{CH}_2$  de ácidos grasos; en W3 con la flexión del enlace C-H en  $\text{CH}_2$ ; y en W2 con una banda asociada a la vibración del estiramiento del  $>\text{C}=\text{O}$  de grupos éster que se derivan principalmente de fosfolípidos, y una oscilación del  $>\text{C}-\text{H}$  del  $\text{CH}_2$  del metileno (Naumann, 2000). Con respecto a la absorción de los carbohidratos y otros contenidos de la matriz, en la ventana W4 se incluyen las bandas típicas debidas a los estiramientos del C-OH, a las vibraciones de los anillos C-O-C y C-O en polisacáridos y a los estiramientos del C-P-O (Nichols *et al.*, 1985, Schmitt *et al.*, 1995; Nivens *et al.*, 2001; Naumann, 2000; Helm *et al.*, 1991). También se encontraron picos característicos debidos al ADN correspondientes a la vibración del C-O-C y C-O-P en polisacáridos, a grupos  $\text{PO}_2^-$  en ácidos nucleicos y a vibraciones del enlace fosfodiéster del ADN/ARN (Holman *et al.*, 2009; Nivens *et al.*, 2001).

Es importante señalar que bajo nuestras condiciones experimentales y con la cepa utilizada, no se observaron las bandas reportadas para el alginato de la matriz del biofilm (Nivens *et al.*, 2001). Las bandas presentes en W1 y W4 confirman que bajo nuestras condiciones experimentales la matriz del biofilms contiene Psl (Byrd *et al.*, 2009). Además, se encontraron otras bandas informadas para biofilms de *P. aeruginosa* y correspondientes a otros componentes de la matriz, como bandas típicas en el rango de  $1480-1400\text{ cm}^{-1}$  debidas a la absorción de grupos carboxilatos, al estiramiento del C-O a  $1450\text{ cm}^{-1}$  y a la flexión del C-O del  $\text{COO}^-$ , relacionadas con la presencia de LPS en la matriz.

**Tabla 1.** Asignación de bandas FTIR correspondientes a grupos funcionales.

Ventana y región del espectro (cm <sup>-1</sup> )	Frecuencia FTIR (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Referencia	
3300-3100	3298 3283	Estiramiento N-H y O-H de polisacáridos y proteínas	42, 5, 57	
W1 Lípidos 3000-2800	2960	Estiramiento asimétrico C-H del -CH <sub>3</sub> de ácidos grasos	42, 5	
	2923	Estiramiento asimétrico C-H de >CH <sub>2</sub> de ácidos grasos	42, 5	
	2875	Estiramiento simétrico C-H de -CH <sub>3</sub> de ácidos grasos		
	2852	Estiramiento simétrico del C-H de -CH <sub>2</sub> de ácidos grasos	42, 5, 57, 46, 32, 52	
W2 Amida I y II 1780-1480	1745 1715	Estiramiento C=O en esteres y iones carboxilatos	42, 5	
	1742	Estiramiento >C=O en esteres	5	
	Amida I 1650	Estiramiento >C=O y flexión C-N de proteínas y péptidos. Conformación de proteínas	1695-1675: β-Antiparalela	14, 37, 13, 19
			1670-1666: β-Giro	
			1660-1650: α-Hélice	
1635-1625: β-Lamina				
Amida II 1540	Flexión N-H y estiramiento C-N de péptidos y proteínas			
W3 Región mixta 1500-1200	1450	Flexión C-H de CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub>	42, 5	
	1402	Estiramiento simétrico >C=O de grupos COO- desprotonados y flexión C-O del COO-	42, 46, 32, 52	
	1240	Estiramiento asimétrico P=O del PO <sub>2</sub> del ADN/ARN	24, 45, 5, 52	
W4 Carbohidratos 1200-900	1175 1117 1084 1043	Estiramiento C-OH, vibración anillo C-O-C y C-O en polisacáridos y estiramiento C-P-O	43, 52, 45, 42, 23	
900-700	860	α- enlace glicosídico	56	
	800	β- enlace glicosídico	56	
	720	Flexión "rocking" C-H del CH <sub>2</sub>	42	

Se analizó el efecto general del plasma sobre los biofilms de *P. aeruginosa* comparando las segundas derivadas de los espectros normalizados en todo el rango IR, de los biofilms obtenidos después de diferentes periodos de exposición al plasma. Se realizó un análisis jerárquico de “cluster” de las segundas derivadas de los espectros normalizados y se construyó el dendrograma (**Figura 10**). Se encontraron dos grupos principales: uno formado por el biofilm control y el tratado durante 3 min, aunque separados entre sí; y otro formado por el biofilm tratado durante 30 min, claramente separado. Este análisis mostró que la composición química de los biofilms se modifica luego del tratamiento con plasma, presentándose el mayor impacto después de 30 min de exposición al mismo. Los cambios ocurrieron en la biomasa (W2 y W3), las membranas celulares (principalmente cubiertas por W1) y la matriz, incluyendo carbohidratos, LPS y ADN (W1 a W4).



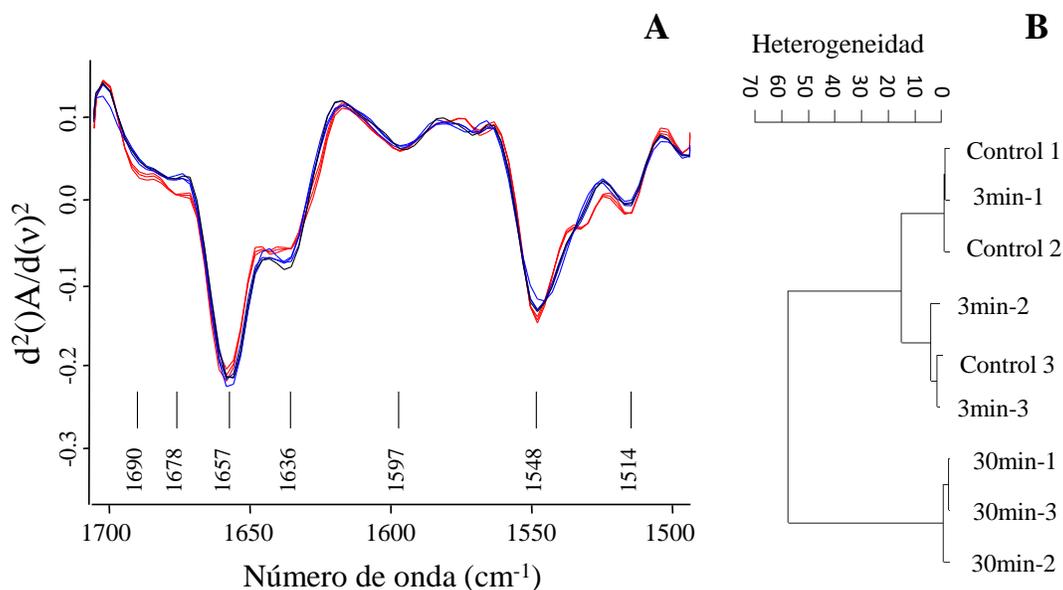
**Figura 10.** Análisis jerárquico de “cluster” de las segundas derivadas de los espectros normalizados correspondientes a biofilms de *P. aeruginosa* tratados con plasma durante diferentes tiempos de exposición. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en los siguientes rangos espectrales: 3000-2800, 1800-1550, 1500-1250 y 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . El dendrograma fue construido utilizando el algoritmo de Ward.

Para realizar un análisis más profundo del efecto del plasma sobre la biomasa y las proteínas del biofilm, se estudiaron las características espectrales de las regiones amida I (~

1650  $\text{cm}^{-1}$ ), que proporciona información sobre la conformación de las proteínas; y amida II ( $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ ), que junto con la amida I se consideran marcadores de biomasa (Haris y Severcan, 1999; Naumann, 2000). La banda amida I es particularmente sensible a la estructura secundaria de las proteínas, se basa en los diferentes entornos del enlace de hidrógeno para hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  paralelas y antiparalelas, giros y conformaciones desordenadas. A través de esta banda es posible evaluar las alteraciones en las proteínas mediante cambios en la contribución de cada conformación. Aunque existen algunas dificultades y limitaciones para diferenciar la contribución de cada conformación dentro de la estructura secundaria global de las proteínas, la aplicación de la técnica de la segunda derivada permite llevar a cabo el estudio (Miller *et al.*, 2013, Beyler y Susi, 1986)

Se presentaron diferencias significativas entre las contribuciones de los picos de las bandas amida I y II de los espectros promedio de los diferentes tratamientos (0, 3 y 30 min de exposición al plasma) (**Figura 11**). En biofilms de *P. aeruginosa*, la conformación de proteínas que contribuyen a las bandas de amida son principalmente una combinación de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  a aproximadamente a 1655 y 1630  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, se observó una disminución en la intensidad del pico correspondiente a la conformación de láminas  $\beta$  (1635-1625  $\text{cm}^{-1}$ ) a mayor tiempo de exposición al plasma. Además, mientras que las láminas  $\beta$  disminuyeron, aumentaron las bandas correspondientes a los giros  $\beta$  (1670-1666  $\text{cm}^{-1}$ ) y a láminas  $\beta$  antiparalelas (1695-1675  $\text{cm}^{-1}$ ) (**Figura 11A**). Se detectaron desplazamientos de las bandas de carbonilo que corresponden a transformaciones conformacionales, principalmente entre hoja  $\beta$  y hoja  $\beta$  antiparalela. Estos cambios en la estructura secundaria de las proteínas después de la exposición al plasma podrían explicarse debido a que en la estructura de láminas  $\beta$  antiparalelas el empaquetamiento de la cadena tiene una menor energía total, y la alineación de los dipolos dipéptidos es más favorable que en las láminas  $\beta$  paralelas (Chou *et al.*, 1982). Por lo tanto, bajo el tratamiento con plasma, las estructuras de las láminas  $\beta$  paralelas parecen cambiar a giros  $\beta$  y láminas  $\beta$  antiparalelas, produciendo una estructura estable “súper-secundaria” que se repite regularmente y que está relacionada con la desnaturalización de proteínas (Santos, 2009).

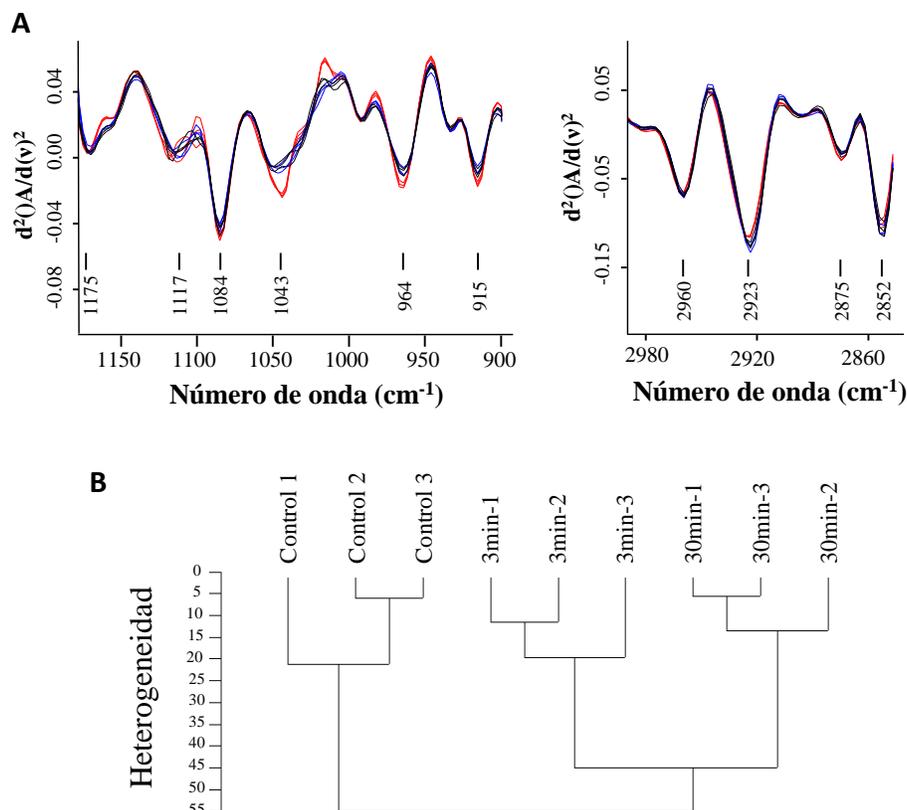
El efecto del plasma sobre la biomasa del biofilm se pudo observar a través de los cambios de en la región amida II. El dendrograma realizado con los espectros normalizados de las regiones amida I y II, mostró que la exposición al plasma produce desnaturalización o agregación de proteínas y modificación en el contenido de biomasa, principalmente después de 30 min de tratamiento (**Figura 11B**). En el análisis jerárquico de “clusters” se encontraron dos grupos principales, donde el biofilms control y tratado durante 3 min no se diferenciaron claramente, sugiriendo que no hay diferencias entre la estructura de las proteínas y la biomasa a tiempos cortos de exposición al plasma. Además, las modificaciones en la región amida permitieron inferir que en los tiempos largos de exposición al plasma se presentó mayor daño o modificación en las células del biofilm. Estos resultados concuerdan con las imágenes del SEM (**Figura 6**), donde no se observan daños significativos sobre las células tratadas durante 3 min con plasma, pero sí sobre las tratadas durante tiempos largos; además, soportan otras investigaciones en las que la inactivación completa del biofilms ocurre después de exposiciones más prolongadas al plasma (Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Khan *et al.*, 2016).



**Figura 11.** Efecto del plasma sobre las proteínas. **A.** Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros promedio del biofilm control (línea negra) y tratado con plasma durante 3 (línea azul) y 30 min (línea roja) en la región amida (W2, 1750-1550  $cm^{-1}$ ). **B.** Análisis jerárquico de “cluster” de la segunda derivada de los espectros normalizados.

La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región amida (1669-1697 y 1633-1661  $\text{cm}^{-1}$ ). El dendrograma fue construido utilizando el algoritmo de Ward.

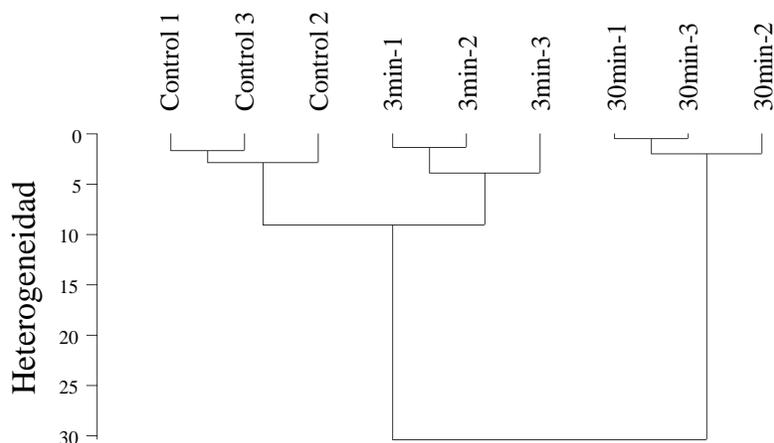
Por otro lado, es importante destacar que mediante la espectroscopia FTIR también se obtuvo información referida al efecto del plasma sobre la matriz del biofilm. Se observó una alteración química y estructural en los carbohidratos (**Figura 12**). El daño en el Psl causado por el tratamiento con plasma se evidenció debido al aumento en la absorbancia de los grupos funcionales característicos de la ramnosa (CH en  $\text{CH}_3$  a  $2874 \text{ cm}^{-1}$  y C-O-C a  $1044 \text{ cm}^{-1}$ ) y de la D-manosa y D-glucosa (C-O-C en W4), que están ocultos en la estructura helicoidal del Psl y parecen estar expuestos después del tratamiento con plasma (**Figura 12A**). El análisis jerárquico de “clusters” de la segunda derivada de los espectros en W4 y la banda del  $\text{CH}_3$  mostró las variaciones globales en la estructura de los polisacáridos producidas a los 3 y 30 min de exposición al plasma (**Figura 12B**). En el dendrograma se observan dos grande grupos, en los cuales se separan claramente los biofilms control de los tratados durante cortos y largos tiempos de exposición al plasma. Esta disminución desde los primeros minutos de tratamiento también se observó en la relación de áreas de matriz/células en la **Figura 5**. Estos resultados evidencian que el efecto del plasma sobre los polisacáridos de la matriz se presenta desde tiempos de exposición cortos, por lo que se podría proponer que la degradación de la matriz es uno de los primeros mecanismos de acción.



**Figura 12.** Efecto del plasma sobre los carbohidratos. **A.** Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros promedio del biofilm control (línea negra) y tratado con plasma durante 3 (línea azul) y 30 min (línea roja) en la región W1 (3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ) y W4 (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ). **B.** Análisis jerárquico de “cluster” de la segunda derivada de los espectros normalizados. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región 2880-2870 y 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . El dendrograma fue construido utilizando el algoritmo de Ward.

Previamente se informó que el daño al ADN debido a la luz UV no se refleja directamente en la intensidad de las bandas asignadas a esta macromolécula (2950, 1963, 1220 y 1067  $\text{cm}^{-1}$ ) (Naumann, 2000). Investigaciones anteriores mostraron que una alta cantidad de ADN intracelular es liberado del citoplasma debido al daño a la membrana celular generado por el plasma, lo que interfiere en el análisis de las bandas (Khan *et al.*, 2016). Además, las modificaciones en las bandas de fosfato también son difíciles de observar debido a las numerosas bandas superpuestas en la región del ADN (Quiles *et al.*, 2016). No obstante, fue posible observar un daño general del ADN a través de cambios en las características de

la segunda derivada de los espectros en la región  $1500-1300\text{ cm}^{-1}$  (W3) después de la exposición al plasma. Estos cambios fueron particularmente significativos en los picos  $1464$ ,  $1396$  y  $1302\text{ cm}^{-1}$ , que se reportaron previamente para el fotodaño de los oligonucleótidos de timina (Schleicher *et al.*, 2005). En el análisis jerárquico de “clusters” se encontraron dos grupos principales, uno compuesto por el biofilm control y tratado durante 3 min y otro por el biofilm tratado durante 30 min; sugiriendo que no hay efecto del plasma sobre el ADN a tiempos cortos de exposición (**Figura 13**). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la curva de supervivencia del biofilm de *P. aeruginosa* tratado con la radiación UV generada por el dispositivo DBD de plasma (**Figura 12 del Capítulo 2**), donde el biofilm control y tratado durante 3 min de exposición a la luz UV no presentaron diferencias significativas en el conteo de UFC/mL, y se presentó una disminución del 47.06% de las UFC/mL a los 30 min de exposición a esta radiación.



**Figura 13.** Efecto del plasma sobre el ADN. Análisis jerárquico de “cluster” de la segunda derivada de los espectros normalizados. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ . El dendrograma fue construido utilizando el algoritmo de Ward.

#### 4. CONCLUSIÓN

Se observaron cambios morfológicos secuenciales en la matriz durante el tratamiento con plasma, siendo nuestros resultados concordantes con lo reportado en la literatura, en la cual se ha informado reducción gradual de las EPS de la matriz del biofilm al aumentar los tiempos de exposición al plasma. Se presentaron cambios en la composición química y estructural del biofilm al ser tratados con plasma, mostrando los mayores cambios a mayores tiempos de exposición. En el presente trabajo, encontramos que el eDNA podría actuar como barrera protectora del biofilm frente a la exposición al plasma, ya que al degradar este ADN aumentó la eficiencia de inactivación del tratamiento.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Mariño, G. (2006). Biofilm destruction by rf high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1304–1309.
2. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012). Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 381–384.
3. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
4. Byler D.M., y Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25:469–487
5. Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O. (2006). Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:736–742
6. Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., y Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13, 20–26.
7. Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S. y Wozniak, D.J. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* 73, 622–638.

8. Büchl, N. R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H., y Scherer, S. (2008). Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast* 25, 787-798.
9. Chou, K.C., Pottle, M., Némethy, G., y Scheraga, H. A. (1982). Structure of  $\beta$ -sheets: Origin of the right-handed twist and of the increased stability of antiparallel over parallel sheets. *J Mol Biol* 162, 89-112.
10. Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., y Parsek, M.R. (2011). The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathog* 7, e1001264.
11. Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., y Parsek, M.R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* 14, 1913–1928.
12. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
13. Fabian, H., y Mäntele, W. (2002). Infrared spectroscopy of proteins. *Handbook of vibrational spectroscopy. In: Biochemical Applications*; Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., Eds. (John Wiley and Sons Ltd: Chichester), p.p. 3399.
14. Ferrer, E.G., Bosch, A., Yantorno, O., y Baran, E.J. (2008). A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin. *Bioorgan Med Chem* 16:3878-3886.
15. Finkel, S.E., y Kolter, R. (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol* 183, 6288–6293.
16. Flemming, H.C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Micro* 8, 623–633.
17. Flemming, H.C., Neu, T.R., y Wozniak, D.J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol* 189, 7945–7947.
18. Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., y Howell, P.L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* 2, 1-16.
19. Gilmanshin, R., Williams, S., Callender, R.H., Woodruff, W.H., y Dyer, R. B. (1997). Fast events in protein folding: relaxation dynamics of secondary and tertiary structure in native apomyoglobin. *P Natl Acad Sci*, 94:3709-3713.
20. Grunert, T., Wenning, M., Barbagelata, M. S., Fricker, M., Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., y Ehling-Schulz, M. (2013). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Clin Microbiol* 51: 2261.
21. Hara, T., Aumayr, A., y Ueda, S. (1981). Genetic transformation of *Pseudomonas aeruginosa* with extracellular DNA. *J Gen Appl Microbiol* 27, 109–114.
22. Haris, P.I., y Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *J Mol Catal B Enzym* 7:207–221.
23. Helm, D., Labischinsky, H., Schallehn, G., y Naumann, D. (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137:69–79.

24. Holman, H.Y., Miles, R., Hao, Z., Wozniak, E., Anderson, L.M., y Yang, H. (2009). Real-Time Chemical Imaging of Bacterial Activity in Biofilms Using Open-Channel Microfluidics and synchrotron FTIR spectromicroscopy. *Anal Chem* 81:8564–8570
25. Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2009). Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiol* 155, 724–732.
26. Kadurugamuwa, J.L., y Beveridge, T.J. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* 178, 2767–2774.
27. Karatan, E., y Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 310–347.
28. Khan, M.S.I., Lee, E.J., y Kim, Y.J. (2016). A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 6, 37072.
29. Lackmann, J.W., Schneider, S., Edengeiser, E., Jarzina, F., Brinckmann, S., Steinborn, E., Havenith, M., Benedikt, J., y Bandow, J.E. (2013). Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria y biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface* 10, 20130591.
30. Laroussi, M. (2002). Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30, 1409–1415.
31. Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., y Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control* 75, 83–91.
32. Lu, X., Al-Qadiri, H.M., Lin, M., y Rasco, B.A. (2011). Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria. *Food Bioprocess Tech* 4:919-935.
33. Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polívka, L., Syková, E., Dejneka, A., y Kubinová, Š. (2016). The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82, 71–83.
34. Ma, L., Jackson, K.D., Landry, R.M., Parsek, M.R., y Wozniak, D.J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol* 188, 8213–8221.
35. Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., y Wozniak, D.J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLOS Pathog* 5, e1000354.
36. Mann, E.E., y Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36, 893–916.
37. Miller, L.M., Bourassa, M.W., y Smith, R.J. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 438, 2339–2346.
38. Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., y Saudi, B. (2002). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 74, 349–358.
39. 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.

40. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., y Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLOS Pathog 4, e1000213.
41. Naumann, D., Helm, D. y Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FTIR spectroscopy. Nature 351, 81–82
42. Naumann, D. (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry: applications, theory, and instrumentation., Wiley, J., y Chichester, S.L, eds. (R.A. Meyers), pp. 1–29
43. Nichols, P.D., Henson, J.M., Guckert, J.B., Nivens, D.E., y White, D.C. (1985). Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures, and biofilms. J Microbiol Methods 4:79–94.
44. Nivens, D., Chambers, J.Q., Anderson, T.R., Tunlid, A., Shmitt, J., y White, D.C. (1993). Monitoring microbial adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. J Microbiol Methods 17:199–213
45. Nivens, D.E., Ohman, D. E., Williams, J., y Franklin, M.J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J Bacteriol 183:1047–1057.
46. Ojeda, J.J., Romero-González, M.E., Bachmann, R.T., Edyvean, R.G., y Banwart, S.A. (2008). Characterization of the cell surface and cell wall chemistry of drinking water bacteria by combining XPS, FTIR spectroscopy, modeling, and potentiometric titrations. Langmuir 24:4032-4040
47. Puligundla, P., y Mok, C. (2017). Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms in vitro. J Appl Microbiol 122, 1134–1148.
48. Quilès, F., Saadi, S., Francius, G., Bacharouche, J., y Humbert, F. (2016). In situ and real time investigation of the evolution of a *Pseudomonas fluorescens* nascent biofilm in the presence of an antimicrobial peptide. BBA-Biomembranes 1858, 75-84.
49. Santos, J. (2009). Proteínas: estructuras fascinantes. In Proteínas: estructuras fascinantes; Krschenbaum J.M., Eds (Las ciencias naturales y la matemática), ISBN 978-950-00-0707-8, 192 p.
50. Schleicher, E., Heßling, B., Illarionova, V., Bacher, A., Weber, S., Richter, G., y Gerwert, K. (2005). Light-induced reactions of *Escherichia coli* DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. FEBS J 272, 1855-1866.
51. Schmitt, J., Nivens, D., White, D.C., Flemming, H.C. (1995). Changes of biofilm properties in response to sorbed substances - an FTIR-ATR study. Water Sci Technol 32:149–155
52. Schmitt, J., Udelhoven, T., Naumann, D., y Flemming, H. C. (1998). Stacked spectral data processing and artificial neural networks applied to FT-IR and FT-Raman spectra in biomedical applications. In: Infrared spectroscopy: new tool in medicine. International Society for Optics and Photonics. Vol. 3257, pp. 236-245
53. Serra, D., Bosch, A., Russo, D.M., Rodriguez, M.E., Zorreguieta, A., Schmitt, J., Naumann, D., y Yantorno, O. (2007). Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. Anal Bioanal Chem 387: 1759–1767
54. Spoering, A.L., y Gilmore, M.S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr Opin Microbiol 9, 133–137.

55. Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9, 222–227.
56. Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P., y Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr Polym* 54, 97–106
57. Tang, M., McEwen, G.D., Wu, Y., Miller, C.D., y Zhou, A. (2013). Characterization and analysis of mycobacteria and Gram-negative bacteria and co-culture mixtures by Raman microspectroscopy, FTIR, and atomic force microscopy. *Anal Bioanal Chem* 405, 1577-1591.
58. Van der Mei, H. C., Naumann, D., y Busscher, H. J. (1996). Grouping of *Streptococcus mitis* strains grown on different growth media by FT-IR. *Infrared Phys Techn* 37:561-564.
59. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
60. Vandervoort, K.G., Abramzon, N., y Brelles-Mariño, G. (2008). Plasma interactions with bacterial biofilms as visualized through atomic force microscopy. *IEEE Trans Plasma Sci* 36, 1296–1297.
61. Venezia, R.A., Orrico, M., Houston, E., Yin, S.M., y Naumova, Y.Y. (2008). Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 430–436.
62. Wang, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., y Ma, L.Z. (2013). A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 15, 2238–2253.
63. Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D.J., y Ma, L.Z. (2015). The exopolysaccharide Psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 7, 330–340.
64. 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.
65. Wenning, M., y Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biot* 97: 7111e7120.
66. Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., y Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487–1487.
67. Wood, P.J. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res* 85, 271–287.
68. Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153, 1318–1328.
69. Zelaya, A., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2012). Battling bacterial biofilms with gas discharge plasma. *In Plasma for bio-decontamination, medicine and food security*, Z. Machala, K. Hensel, y Y. Akishev, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–148.

- 70.** Zelaya, A.J., Stough, G., Rad, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces, and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. *IEEE Trans Plasma Sci* 38, 3398–3403.
- 71.** Zhang, X., Bishop, P.L., y Kupferle, M.J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37, 345–348.
- 72.** Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Boehm, D., y Bourke, P. (2014). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Plasma Medicine* 4, 137-152.
- 73.** Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., y Bourke, P. (2015). Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS ONE* 10, e0138209.

# **CAPÍTULO 5**

## CARACTERIZACIÓN DE UNA FUENTE DBD COAXIAL DE PLASMA FRÍO A PRESIÓN ATMOSFÉRICA OPERADA EN AIRE

### RESUMEN

Los plasmas no térmicos generados a presión atmosférica mediante descargas en gases o plasmas fríos a presión atmosférica, son fuentes de partículas cargadas (electrones y iones), radicales, átomos y moléculas excitadas, radicales y radiación UV. En el presente capítulo se muestran los resultados correspondientes a la caracterización de la fuente de plasma DBD utilizada para la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa*. Además, se proponen nuevas condiciones experimentales para generar diferentes tipos de plasma que se podrían utilizar en futuros estudios de erradicación de biofilms. De este modo, haciendo uso de técnicas de Espectroscopía de Emisión Óptica (OES, sigla del inglés “Optical Emission Spectroscopy”), se estudiaron los plasmas generados utilizando diferentes composiciones del gas soporte de la descarga, como aire humedecido, seco, ambiental circundante y argón; distintos flujos de gas y diferentes voltajes aplicados.

Los espectros de emisión permitieron conocer las distintas especies excitadas del plasma y la dependencia de sus densidades de población relativas con las condiciones experimentales. Al ser éste un plasma generado en aire ambiental circundante o sobre un gas conteniendo aire, las principales especies detectadas fueron las moléculas de nitrógeno, aunque también se detectaron iones moleculares de nitrógeno en pequeña cantidad en los plasmas generados en aire. En aquellos casos en que el gas soporte de la descarga fue mayoritariamente argón, se pudieron detectar también átomos excitados de argón y de oxígeno, así como especies OH. Por otra parte, las técnicas OES permitieron además medir la temperatura del gas en el plasma, a partir tanto del ensanchamiento de determinadas líneas atómicas, como de la simulación de espectros vibro-rotacionales de especies diatómicas de nitrógeno. Además, la temperatura del gas efluente del dispositivo también fue medida mediante una cámara de infrarrojo (IR). Es importante comprobar que esta temperatura se mantuvo inferior a 40°C, ya que en el presente trabajo de tesis es imprescindible asegurar que la inactivación de los biofilms se da por las especies activas

del plasma y no por la temperatura. En este capítulo además de la caracterización espectroscópica, se determinaron algunas de las especies químicas formadas por este plasma, como peróxido de hidrogeno, nitritos y ozono; que pueden desencadenar procesos de inactivación microbiana en la zona de la posdescarga donde se trataron los biofilms.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un plasma es un gas total o parcialmente ionizado compuesto por electrones, iones, átomos y moléculas neutras, radicales y fotones; todos ellos son especies activas capaces de inducir diferentes fenómenos físicos y reacciones químicas. Dependiendo del tipo de aporte de energía y de las cantidades de energía transferidas al plasma, las propiedades del mismo cambian en términos de densidad electrónica y temperatura. De forma general, los plasmas se dividen en dos grandes categorías, los plasmas térmicos y los plasmas no térmicos o plasmas fríos. A la primera categoría pertenecen aquellos plasmas cuyos componentes como electrones y partículas pesadas (iones, átomos y moléculas neutras) tienen la misma temperatura. Por otra parte, los plasmas no térmicos están caracterizados por tener temperaturas diferentes para los electrones ( $T_e$ , temperatura electrónica) y para el resto ( $T_g$ , temperatura del gas), siendo  $T_e \gg T_g$  (Bogaerts *et al.*, 2002). La reactividad de estos plasmas fríos procede de la alta energía de sus electrones, mientras que los iones, átomos y moléculas neutras, mantienen una temperatura de gas relativamente fría. En las últimas dos décadas el desarrollo de fuentes de plasma frío que operan a la presión atmosférica se ha incrementado. Además de la facilidad de manejo derivada de trabajar a presión atmosférica, su bajo consumo de potencia y su capacidad para inducir procesos físicos y químicos a temperaturas de gas relativamente bajas, son propiedades que los hacen muy atractivos desde un punto de vista aplicado.

Recientemente, se han desarrollado fuentes de plasma con temperaturas de gas incluso inferiores a 40 °C, lo que ha acercado su uso al campo biológico. Los plasmas fríos, son una nueva tecnología de esterilización con un enorme potencial debido a su alta eficiencia, mínimos efectos secundarios y a la mezcla de agentes activos con capacidad

antimicrobiana. Estos plasmas, han evolucionado rápidamente como tecnología para la descontaminación microbiana en superficies, dispositivos médicos, materiales termosensibles, aguas residuales, tecnología de envasados y superficies de alimentos frescos y procesados (Afshari y Hosseini, 2013; Alkawareek *et al.*, 2012a; Bourke *et al.*, 2017a; Rowan *et al.*, 2007). La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de los efectos del plasma sobre las células bacterianas planctónicas o esporas. Recién a mediados de la década pasada, se comenzó a investigar la inactivación de biofilms mediada por plasma (Becker *et al.*, 2005; Allesen-Holm *et al.*, 2006; Abramzon *et al.*, 2006; Joaquin *et al.*, 2009; Zelaya *et al.*, 2010, 2012; Alkawareek *et al.*, 2012b; Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014; Ziuzina *et al.*, 2014, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2016; Lunov *et al.*, 2016; Ben Belgacem *et al.*, 2016; Modic *et al.*, 2017).

Desde el primer reporte de su aplicación como agente antimicrobiano (Menashi, 1968), se han investigado las descargas más efectivas y la densidad de potencia mínima necesaria para la erradicación microbiana, los procesos físicos, químicos y biológicos responsables de la esterilización, y el tipo de gas para una aplicación en particular, entre otras (Ehlbeck *et al.*, 2011; Laroussi, 2002; Laroussi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Moisan *et al.*, 2001). En el plasma, los agentes activos producidos dependerán de los parámetros de generación de la descarga, como de la composición del gas, caudal del flujo, humedad, temperatura y propiedades de excitación. La mayoría de las especies reactivas son formas activas de moléculas y átomos de oxígeno (ROS), como oxígeno atómico, anión superóxido ( $O_2^-$ ) y ozono ( $O_3$ ); especies reactivas del nitrógeno (RNS), como nitrógeno atómico, nitrógeno excitado, óxido nítrico (NO), peroxinitrito ( $OONO^-$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ) y nitratos ( $NO_3^-$ ); y si hay humedad se puede generar  $H_2O^+$ ,  $OH^-$ ,  $OH^\bullet$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas especies neutras que contienen oxígeno y nitrógeno, comúnmente conocidas como RONS (siglas del inglés “reactive oxygen and nitrogen species”), son altamente reactivas y capaces de producir fuertes efectos oxidativos y nitrosativos sobre las estructuras celulares (Graves, 2012), aunque el rol de cada agente antimicrobiano y el proceso de inactivación aún no están claros y siguen en estudio (Graves, 2012; Moisan *et al.*, 2001, 2009; Yousfi *et al.*, 2014).

En los **Capítulos 2 y 3**, se presentaron los efectos de una nueva fuente DBD coaxial de plasma generada en aire ambiental circundante y aire humedecido sobre biofilms de *P. aeruginosa* crecidos sobre cupones de acero inoxidable, medio AB y cultivo continuo. El plasma de aire humedecido presentó una cinética de inactivación más rápida del biofilm respecto del plasma generado en aire circundante. Se determinó que, para ambas condiciones de generación de plasma, 15 min de tratamiento con plasma resultó en una disminución de 5.6 unidades logarítmicas de UFC/mL (>99.999% de eficacia de erradicación). Aunque, fue necesario un tratamiento de 30 min con plasma para erradicar completamente los biofilms, ya que a tiempos más cortos de exposición conservan la viabilidad y la virulencia incluso en el caso de falta de cultivabilidad celular. La mayor eficacia del plasma generado en aire humedecido fue atribuida a la posible presencia de las RONS. La fuente DBD coaxial de plasma generado en aire presentada en este trabajo demostró ser una herramienta útil y eficaz para la inactivación de biofilms de *P. aeruginosa*.

Es importante identificar las distintas especies excitadas en el plasma y medir su densidad de población relativa, para controlar su aplicación y tratar de dilucidar los posibles mecanismos de acción. Por otra parte, una determinación fiable de la temperatura del gas en el plasma es crucial cuando el plasma frío se utiliza para el tratamiento de muestras vivas y de materiales termosensibles. Las técnicas de OES se emplean comúnmente en la caracterización de plasmas dado su carácter no invasivo y su facilidad de implementación. Estas técnicas están basadas en el estudio de la radiación UV-visible-infrarrojo cercano emitida por las especies mono y diatómicas excitadas en el plasma, y permiten determinar algunos de los parámetros característicos del mismo, como la cantidad de especies excitadas en el plasma, así como la temperatura del gas en el mismo. Estas técnicas deben adecuarse a las condiciones específicas de densidad electrónica, temperatura de gas y temperatura electrónica de cada tipo de plasma.

Con el fin de tratar de dilucidar los posibles mecanismos que condujeron a la inactivación del biofilm de *P. aeruginosa* en los estudios presentados anteriormente, el objetivo del presente capítulo fue caracterizar la descarga de plasma DBD utilizando técnicas de OES

adecuadas. Las condiciones experimentales estudiadas en la caracterización espectroscópica del plasma fueron mucho más amplias que las analizadas en los capítulos anteriores, con el objetivo de poder entender el comportamiento del nuevo dispositivo DBD desarrollado y de proponer nuevas condiciones para generar diferentes tipos de plasmas que puedan utilizarse en futuros estudios de erradicación de biofilms. De este modo, se caracterizaron los plasmas generados utilizando diferentes composiciones del gas de alimentación de la descarga y distintos flujos de gas y voltajes aplicados. Cabe esperar que la química de los radicales libres, átomos y moléculas excitadas del plasma desempeñen un papel primordial en la generación de las especies reactivas que interactúan con el biofilm y conducen a su inactivación.

La diagnosis espectroscópica del plasma mediante técnicas de OES se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, España, en el Laboratorio de Tecnología de Plasma y Energías Renovables, bajo la tutela de la Dra. María C. García Martínez, profesora titular de dicha universidad y gracias a una beca de movilidad adjudicada por la AUIP (Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado)

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

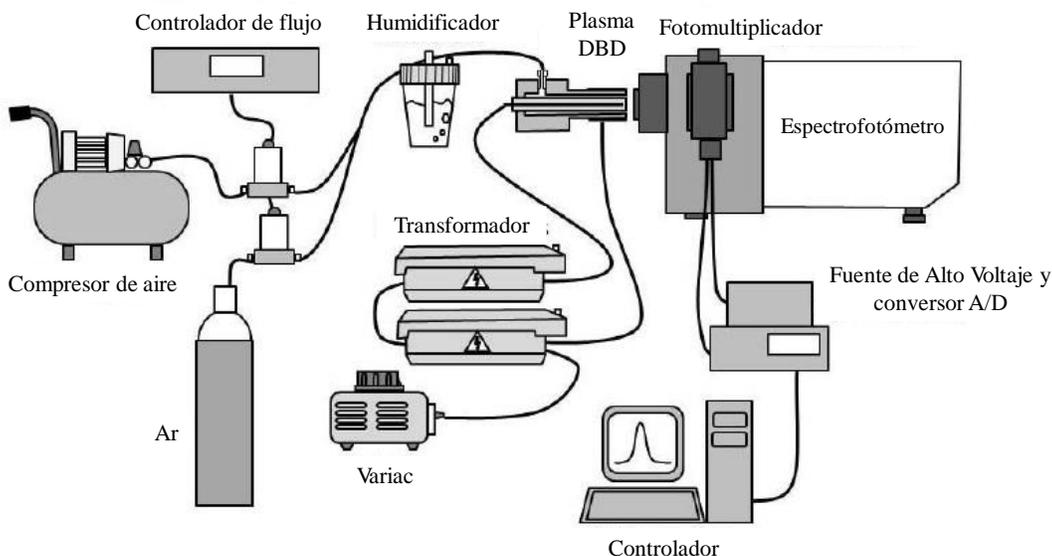
### **2.1. Dispositivo de generación de plasma de descarga de barrera dieléctrica (DBD)**

Se produjo un plasma de descarga de gas a presión atmosférica usando una configuración coaxial DBD como se describe en el **Capítulo 2 sección 2.2**. Como fuente de alimentación de corriente alterna se utilizaron dos transformadores de 10 kV, 75 mA y 50-60 Hz (transformadores comerciales empleados para la alimentación de pantallas o letreros luminosos de neón) conectados en paralelo como se muestra en la **Figura 1**, que proporcionan un voltaje máximo de hasta 20 kV. Dicha fuente se conectó a un autotransformador variable (Variac) para controlar la amplitud del voltaje de funcionamiento.

En el presente capítulo se estudiaron, por un lado, los plasmas generados utilizando aire como principal gas de alimentación en tres situaciones diferentes: (i) aire ambiental circundante, (ii) utilizando un flujo de aire sin humidificar (seco) y (iii) un flujo de aire humidificado. Por otra parte, se caracterizaron los diferentes plasmas generados en descargas en las que el argón se empleó como gas principal, o argón mezclado con diferentes proporciones de aire. Asimismo, se estudiaron los plasmas generados en distintas condiciones de voltaje aplicado (16 y 20 kV) y de flujo de gas soporte (1, 2 y 3 L/min).

## **2.2. Dispositivo experimental para la diagnosis OES**

El dispositivo DBD coaxial de plasma frío a presión atmosférica se colocó a 2.5 cm de la rendija de entrada de un espectrómetro tipo Czerny-Turner de 1 m de distancia focal, equipado con una red holográfica de difracción de 1200 ranuras/mm, como se muestra en la **Figura 1**. Como detector de la luz emitida por el plasma y dispersada en el espectrómetro, se utilizaron dos tubos fotomultiplicadores, uno con sensibilidad en el margen espectral comprendido entre 300 y 900 nm (fototubo visible) (Hamamatsu R636-10) y otro con sensibilidad entre 200 y 500 nm (fototubo UV) (Hamamatsu R212). En los espectros de emisión detectados, las bandas moleculares fueron identificadas según la longitud de onda donde se encontraba la cabeza de la banda (Pearse y Gaydon, 1963). Para la identificación de las líneas atómicas se utilizó la base de datos publicada por el NIST (sigla del inglés “National Institute of Standards and Technology”) ([https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html)).



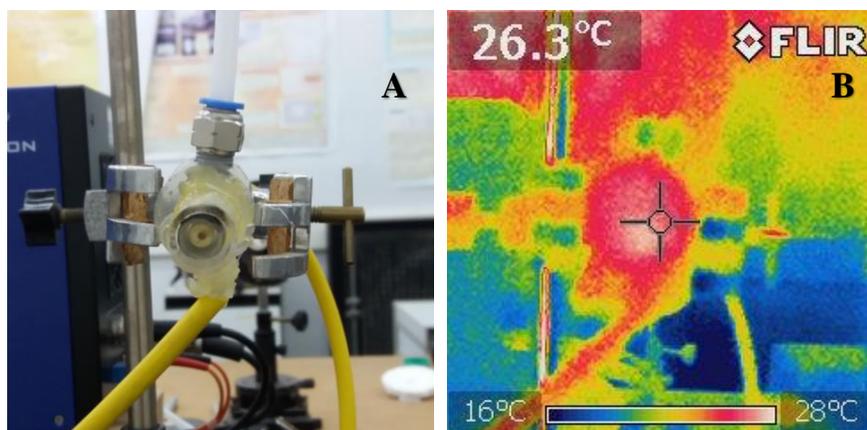
**Figura 1.** Esquema del ensamblado final del sistema experimental.

Para el registro de los espectros de emisión se utilizaron rendijas de entrada y salida del espectrómetro de 37, 87 y 137  $\mu\text{m}$  de apertura. La intensidad de las líneas atómicas y de las cabezas de las bandas moleculares (proporcional a la cantidad de especies atómicas y moleculares excitadas en el plasma, respectivamente), así como los ensanchamientos de las líneas atómicas se determinaron mediante el uso del programa MicrocalOrigin 6.0. Microsoft<sup>®</sup>. La temperatura del gas se determinó ajustando los espectros de las bandas vibro-rotacionales experimentales con los simulados con el software libre Massive OES (Voráč *et al.*, 2017a, 2017b). La temperatura del gas también se determinó a través del estudio del ensanchamiento colisional de la línea Ar I 810.37 nm (Rodero y García, 2017).

### 2.3. Determinación de la temperatura en el gas efluente del plasma por infrarrojo

Se tomó la temperatura del gas efluente del plasma con una cámara infrarroja (FLIR I7). Las fotografías tomadas con este dispositivo muestran la temperatura de la zona donde se ubica el cursor. La cámara se fijó a 17 cm del dispositivo de plasma, el cursor se ubicó entre los dos electrodos como se muestra en la **Figura 2** y se tomaron cuatro fotografías del plasma operado en aire humedecido, seco, ambiental y argón a un flujo de 1 L/min. Además, para todas las condiciones se operó el dispositivo de plasma a 16 y 20 kV. Estas

temperaturas fueron comparadas con las temperaturas del gas calculadas por el ajuste de los espectros de las bandas vibro-rotacionales experimentales con los simulados.



**Figura 2.** Dispositivo de plasma (A) y fotografía infrarroja del dispositivo (B).

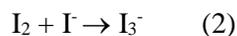
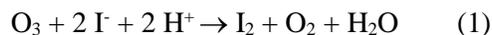
#### **2.4. Determinación de oxidantes totales en el gas efluente del plasma**

La determinación de los oxidantes totales en el gas efluente del dispositivo de plasma se realizó siguiendo el protocolo de Vowles y Connell (2013). Se preparó una solución absorbente oxidante de KI disolviendo 6.8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7.1 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 5 g de KI en 500 mL de agua destilada. Dicha solución se dejó estabilizar durante 24 hs antes de su uso y se almacenó en un recipiente opaco bajo refrigeración. Se añadieron 10 mL de esta solución a dos frascos borboteadores de 30 mL de capacidad, los cuales se conectaron a una bomba de aspiración con un flujo entre 1-2 L/min para burbujear los gases del ambiente a través de la solución oxidante de KI, como se muestra en la **Figura 3**. Las entradas de los frascos borboteadores se dispusieron a 4 mm de distancia del dispositivo de generación de plasma operado en aire humidificado a 1 L/min y la toma de la muestra se realizó durante 23 min.



**Figura 3.** Dispositivo de generación de plasma dispuesto a 4 mm de distancia de dos frascos borbotadores con la solución oxidante de KI y conectados a una bomba de aspiración.

Finalmente, se midió la capacidad del plasma de oxidar el KI a  $I_2$ , determinando la densidad óptica a 352 nm de la cantidad de  $I_3^-$  producido. Ya que el  $O_3$  es el oxidante más importante en términos cuantitativos, los resultados se expresaron en concentración del mismo. La reacción que sirvió de base en esta determinación fue la siguiente:



Se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de  $O_3$ . Se preparó una solución estándar de 20 ppm de  $I_2$  en 100 mL de agua destilada y se realizaron diluciones aforando 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución anterior a 10 mL de agua destilada. Las concentraciones se expresaron en  $\mu\text{g/mL}$  de  $O_3$  de acuerdo con la estequiometría 1:1 de  $O_3/I_3^-$ .

El cálculo de oxidantes totales se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Oxidantes totales } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{m}^3} \right) = \frac{\text{Suma de los } \mu\text{g de } \text{O}_3 \text{ en los dos borboteadores}}{\text{Volumen del aire muestreado}} \quad (3)$$

Donde el volumen del aire muestreado es:

$$\text{Volumen de aire (m}^3\text{)} = \text{Velocidad de flujo } \left( \frac{\text{L}}{\text{min}} \right) \times \text{Tiempo (min)} \times 10^{-3} \quad (4)$$

## 2.5. Medición semi-cuantitativa de peróxido de hidrógeno, nitrato y nitrito generados en el gas efluente del plasma

En este trabajo se realizó una medición semi-cuantitativa del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) generados en el gas efluente del plasma operado en un flujo de aire humedecido y seco de 1 L/min y en aire ambiental circundante. Para ello, se utilizaron tiras reactivas de Quantofix<sup>®</sup>peroxides y Nitrate/Nitrite test sticks (Macherey-Nagel, GmbH & Co). Las tiras se dispusieron enfrente del dispositivo a una distancia de 4 mm durante 1 min, pasado este tiempo se agregó una gota de agua destilada sobre la almohadilla y se siguieron las instrucciones de uso de cada una de ellas. En presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la almohadilla reactiva se tornará azul en una escala de colores que indica las concentraciones 0, 0.5, 2, 5, 10, 25 mg/L de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En presencia de iones de  $\text{NO}_3^-$ , la almohadilla reactiva en la punta de la tira se tornará violeta rojizo en una escala de colores indicando las concentraciones 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ ; mientras que en presencia de iones de  $\text{NO}_2^-$ , la segunda almohadilla reactiva se tornará violeta rojizo en una escala de colores que indica las concentraciones 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L de  $\text{NO}_2^-$ . Como control, se dejaron las tiras reactivas expuestas al aire de la habitación durante 1 min y se siguió el mismo procedimiento.

Aunque estas tiras reactivas están diseñadas para medición de especies reactivas en agua y, por tanto, la escala de colores de las concentraciones no aplicaría a nuestro caso de estudio, son de utilidad para indicar de forma semi-cuantitativa la presencia o ausencia de la correspondiente especie reactiva y para comparar entre las diferentes condiciones de operación del dispositivo de plasma.

## 2.6. Análisis estadístico

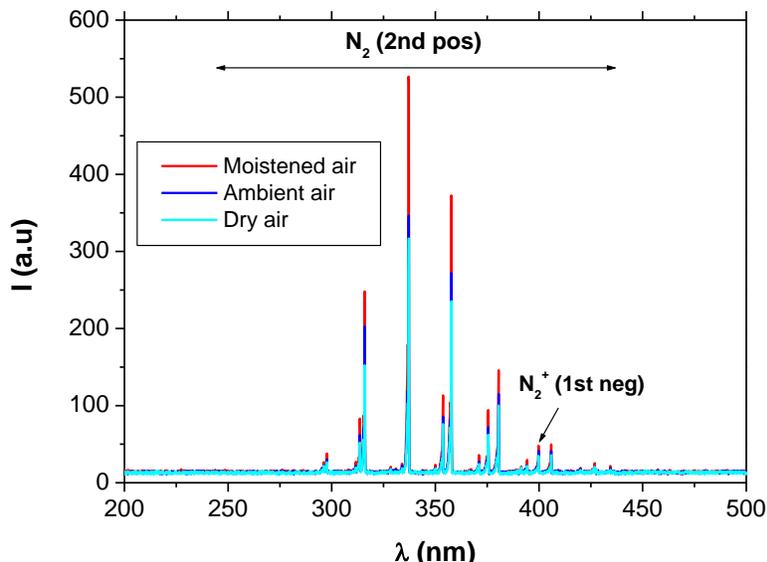
Se realizó análisis de varianza (ANOVA). La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Levene. La comparación entre medias se realizó mediante el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Se utilizó el software STATISTICA de la compañía Statsoft® (Copyright © StatSoft, 2011).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Especies excitadas en el plasma dependiendo del gas de alimentación

#### 3.1.1. Plasmas generados en aire

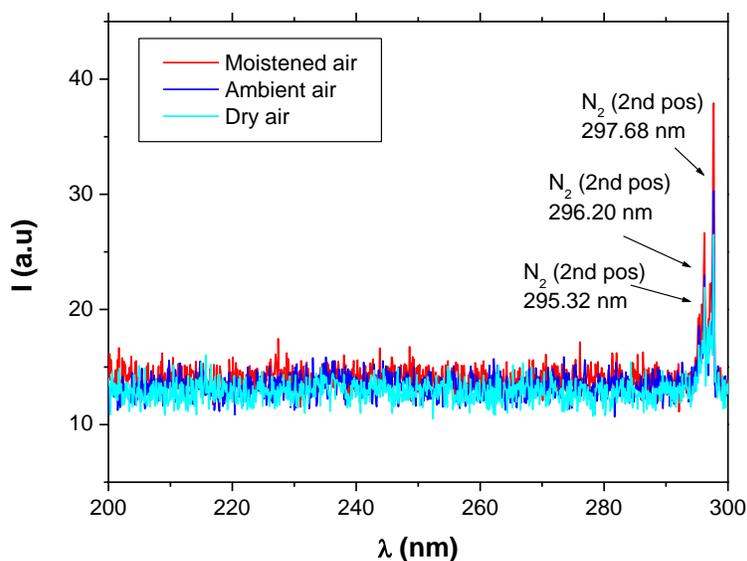
En la **Figura 4** se muestran los espectros de emisión entre 200 y 500 nm correspondientes a los distintos plasmas generados en aire aplicando un voltaje de 20 kV. Para los plasmas generados con aire húmedo y seco el flujo de gas utilizado fue de 1 L/min.



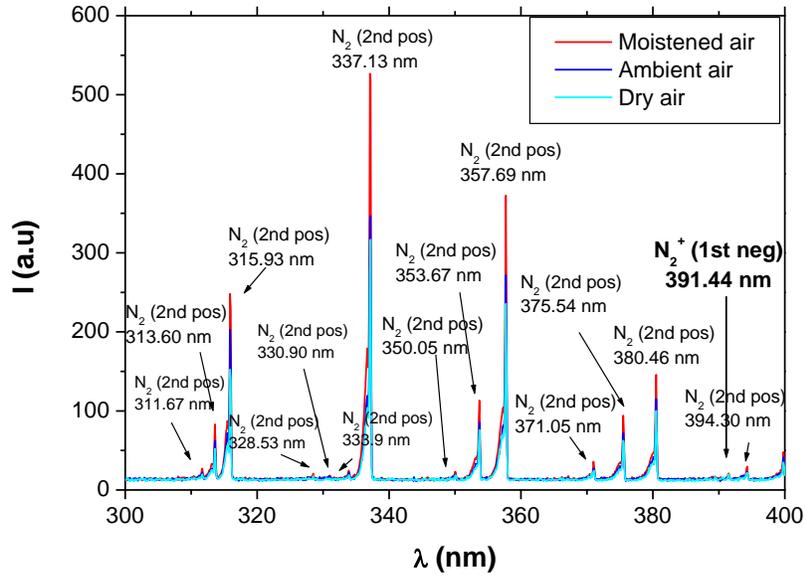
**Figura 4.** Espectro de emisión de un plasma generado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul oscuro) y aire seco 1 L/min (línea azul claro). Barrido entre los 200 y 500 nm utilizando el fototubo UV

En los espectros de las tres condiciones evaluadas, se observó la presencia de bandas vibro-rotacionales del segundo sistema positivo de la molécula  $N_2$  correspondientes a las transiciones entre los niveles  $C^3\Pi \rightarrow B^3\Pi$ . Asimismo, se detectó una muy débil emisión del primer sistema negativo de los iones moleculares  $N_2^+$  (transición  $B^2\Sigma_u^+ \rightarrow X^2\Sigma_g^+$ ), que demuestra la presencia de iones excitados en este plasma

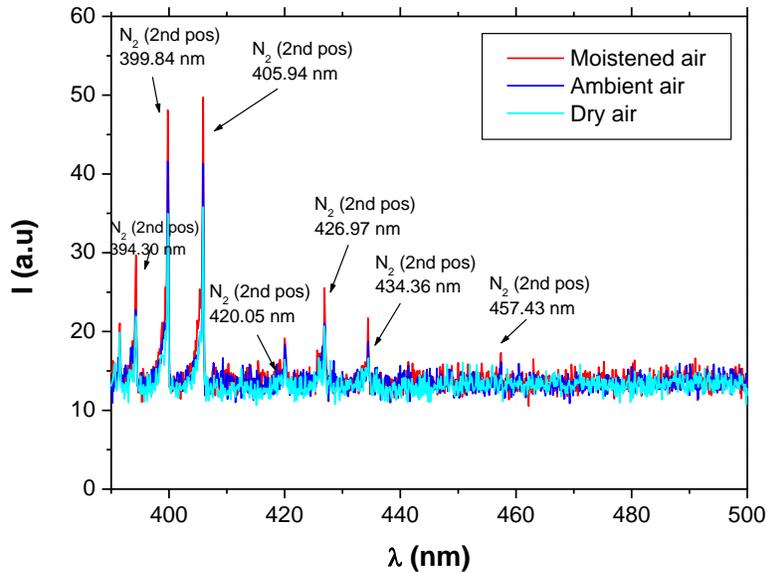
Al objeto de poder observar bandas de menor intensidad y buscar más detalladamente, se seleccionaron regiones más pequeñas del espectro comprendidas entre los 200 y 300 nm (**Figura 5**), 300 y 400 nm (**Figura 6**) y entre 400 y 500 nm (**Figura 7**). En la **Tabla 1** se recogen las características espectroscópicas de las especies excitadas observadas en estas figuras.



**Figura 5.** Bandas de emisión vibro-rotacionales del  $N_2$ , de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul) y aire seco 1 L/min (línea azul clara). Barrido entre los 200 y 300 nm utilizando el fototubo UV.



**Figura 6.** Bandas de emisión vibro rotacionales del N<sub>2</sub> y N<sub>2</sub><sup>+</sup>, de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul) y aire seco 1 L/min (línea azul clara). Barrido entre los 300 y 400 nm utilizando el fototubo UV.



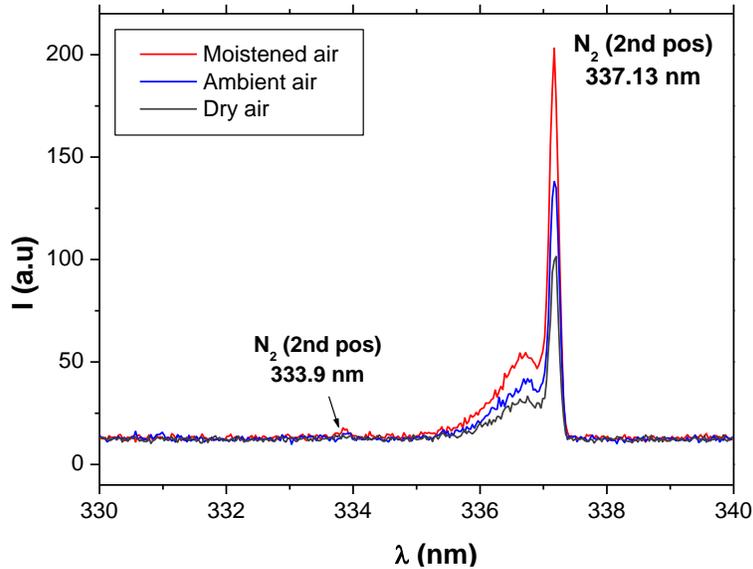
**Figura 7.** Bandas de emisión vibro-rotacionales del N<sub>2</sub>, de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul) y aire seco 1 L/min (línea azul clara). Barrido entre los 400 y 500 nm utilizando el fototubo UV.

**Tabla 1.** Características espectroscópicas de las especies excitadas observadas entre los 200 y 500 nm.

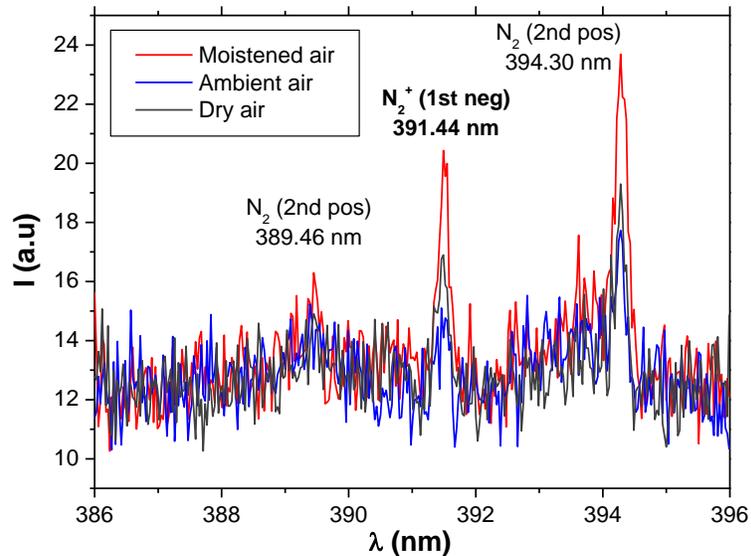
Especie	$\lambda$ (nm)	Transición	$E_u$ (eV)	Especie	$\lambda$ (nm)	Transición	$E_u$ (eV)
N <sub>2</sub>	295.32	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	N <sub>2</sub>	375.54	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	296.2	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		380.49	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	297.68	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	391.44	$B^2\Sigma_u \rightarrow X^2\Sigma_g^+$	18.9
	311.67	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	N <sub>2</sub>	394.3	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	313.6	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		399.84	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	315.93	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		405.94	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	337.13	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		420.05	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	353.67	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		426.97	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	357.69	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		434.36	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	367.19	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		457.43	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1
	371.05	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1				

Para las tres condiciones evaluadas, se escogió la banda vibro-rotacional más intensa de N<sub>2</sub> situada en 337.13 nm para comparar la intensidad de emisión y la cantidad de las especies excitadas de N<sub>2</sub> (**Figura 8**). De este modo, se realizaron barridos espectrales entre los 330 y 340 nm, a partir de los cuales se observó una mayor cantidad de especies excitadas de N<sub>2</sub> en el plasma operado en aire humedecido, seguido por el operado en aire ambiental. Finalmente, la menor intensidad de las especies se presentó en el caso de aire seco.

Por otra parte, la intensidad de emisión del ion N<sub>2</sub><sup>+</sup> fue mayor en el plasma operado en aire humedecido, pero en este caso, el aire seco presentó mayor intensidad que el ambiental (**Figura 9**).



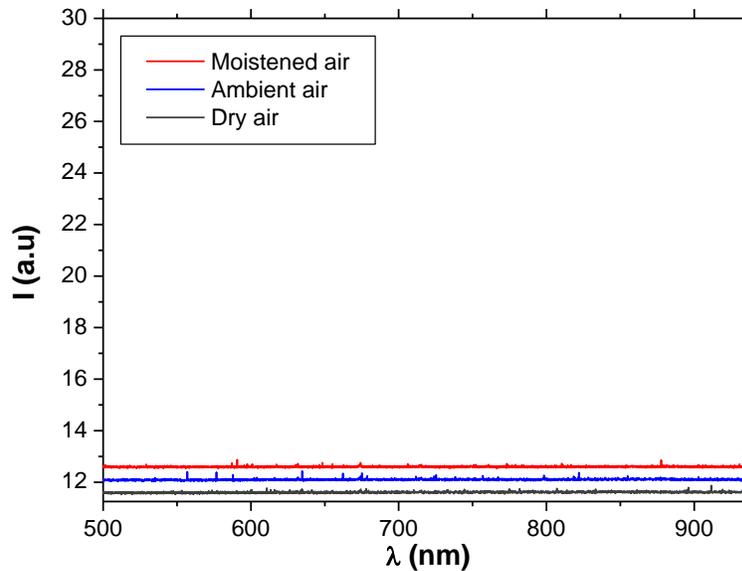
**Figura 8.** Banda de emisión vibro-rotacional del  $N_2$  del segundo sistema positivo, de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul) y aire seco 1 L/min (línea azul clara). Barrido entre los 330 y 340 nm utilizando el fototubo UV



**Figura 9.** Bandas de emisión vibro-rotacionales del  $N_2$ , de un plasma operado en aire humedecido 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea azul) y aire seco 1 L/min (línea azul clara). Barrido entre los 386 y 396 nm utilizando el fototubo UV.

De este modo, se detectó una mayor densidad de especies excitadas en el plasma generado con el aire humedecido. Este comportamiento se podría deber al aumento de la conductividad superficial de los dieléctricos provocado por la humedad, que tiene como resultado la aparición de micro-descargas de mayor intensidad de corriente (Kogelschatz, 2003). Por otra parte, no se encontraron en los espectros bandas vibro-rotacionales de las especies excitadas de OH, NO o NH, que se encuentran entre los 306 a 312 nm, 200 y 300 nm y 336 y 337 nm; respectivamente. Esto posiblemente se deba a que en los plasmas de aire que contienen humedad en mayor o menor grado, como los estudiados en nuestro caso, los radicales OH, NO y NO<sub>2</sub> rápidamente se convierten en HNO<sub>2</sub> y HNO<sub>3</sub>; y además, los radicales hidroxilo también se recombinan rápidamente para formar peróxidos (Kogelschatz, 2003).

En la **Figura 10** se muestran los espectros registrados en el margen de longitudes de onda comprendido entre 500 y 940 nm. En dicha región, en ninguna de las tres condiciones evaluadas para generar el plasma, se detectó la presencia de líneas atómicas o de bandas vibro-rotacionales esperadas para un plasma de aire, como pudieran ser las emisiones de los tripletes de oxígeno atómico situados en 777 nm y 844 nm, las bandas del primer sistema negativo del N<sub>2</sub>, las líneas atómicas del nitrógeno en la región entre los 700 y 850 nm, o la emisión de los iones moleculares de oxígeno, O<sub>2</sub><sup>+</sup>, ubicada en la región entre los 520 y 650 nm (Pearse y Gaydon, 1963).



**Figura 10.** Espectro de emisión de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja), aire ambiental circundante (línea negra) y aire seco 1 L/min (línea azul). Barrido entre los 500 y 940 nm utilizando el fototubo visible.

En nuestro caso, la presencia casi exclusiva de las bandas del  $N_2$ , y la ausencia de especies excitadas de átomos de N, indican que la energía de la descarga en este dispositivo DBD operado en aire se empleó principalmente en la excitación de los niveles vibracionales de las moléculas de nitrógeno, y apenas se utilizó en la disociación del  $N_2$  (Kogelschatz, 2003). Como veremos posteriormente en las **ecuaciones 8-14**, estos estados moleculares excitados del  $N_2$  juegan un papel importante en la producción del ozono que se está generando en la descarga.

Es importante aclarar que las técnicas de OES sólo permiten detectar las especies mono y diatómicas del plasma (como O, OH, NO) que estén lo suficientemente excitadas para emitir con la intensidad necesaria para su detección, la cual variará según la sensibilidad del detector utilizado. Para la identificación de las demás especies reactivas generadas en el plasma, como pudieran ser el  $O_3$ ,  $N_2O$  o  $NO_3$ , es necesario acoplar técnicas de detección de gases y masas (Laroussi y Leipold, 2004).

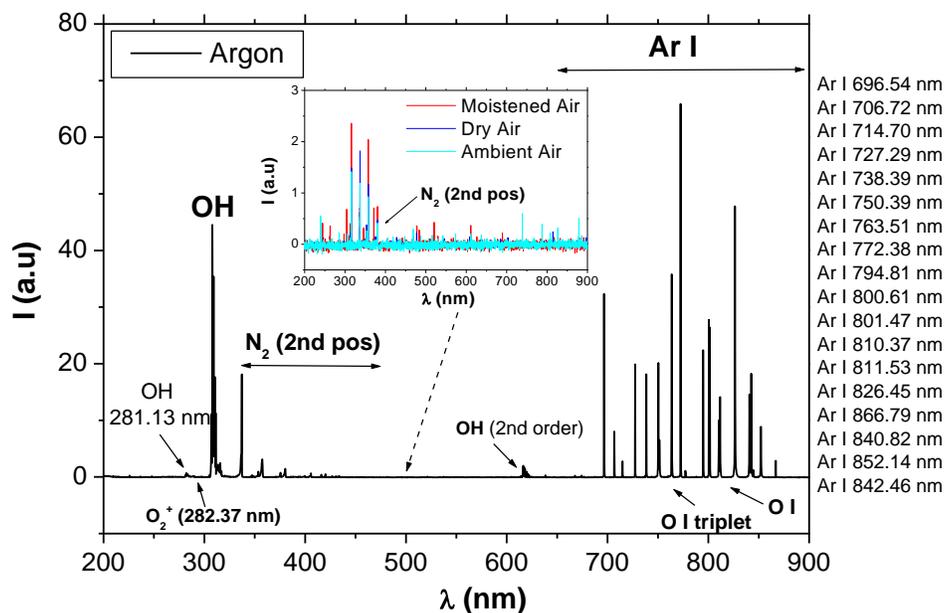
Laroussi y Leipold (2004), caracterizaron un dispositivo de plasma DBD operado en aire por medio de técnicas de OES y detectores de gases. Realizaron un barrido del espectro de

emisión entre los 200 y 300 nm y encontraron bandas vibro-rotacionales de  $N_2$  y de OH, presentando muy baja intensidad los radicales del OH. Además, detectaron presencia de  $O_3$  y  $NO_3$  por detectores de gases. Las condiciones de trabajo del dispositivo DBD que reportaron fueron flujos de entre 4 y 20 L/min, potencia entre 4 y 12 W, voltaje de hasta 20 kV, frecuencia de 2.2 kHz y temperatura del gas entre de 300 y 340 K (26.85 y 66.85 °C) dependiendo del flujo; mientras que nuestras condiciones de trabajo fueron un flujo y una frecuencia muy bajos, de 1 L/min y entre 50-60 Hz, respectivamente. Hay que tener en cuenta que la frecuencia está relacionada con el tipo de corriente en el plasma, donde un aumento en la frecuencia aumenta la corriente de desplazamiento. El diseño y los materiales de cada reactor DBD tienen gran influencia en las propiedades de la descarga que generan. Además, la constante y el espesor de los dieléctricos usados en el dispositivo, en combinación con la tensión aplicada, determinan la cantidad de corriente de desplazamiento que pasa a través del dieléctrico (Kogelschatz, 2003)

### **3.1.2. Plasmas generados en argón**

La **Figura 11** muestra el espectro de emisión entre los 200 y 900 nm del plasma de argón generado en las mismas condiciones experimentales que los plasmas de aire del apartado anterior ( $F = 1$  L/min,  $V = 20$  kV). En la figura se incluye además la comparación con los espectros de emisión de dichos plasmas.

Se representan los espectros de emisión entre los 200 y 900 nm de un plasma de descarga de gases operado en aire humedecido y seco y argón a 1 L/min. Se observa con mayor claridad el hecho de que las únicas especies excitadas detectadas en los plasmas operados con aire fueron las moléculas de nitrógeno.



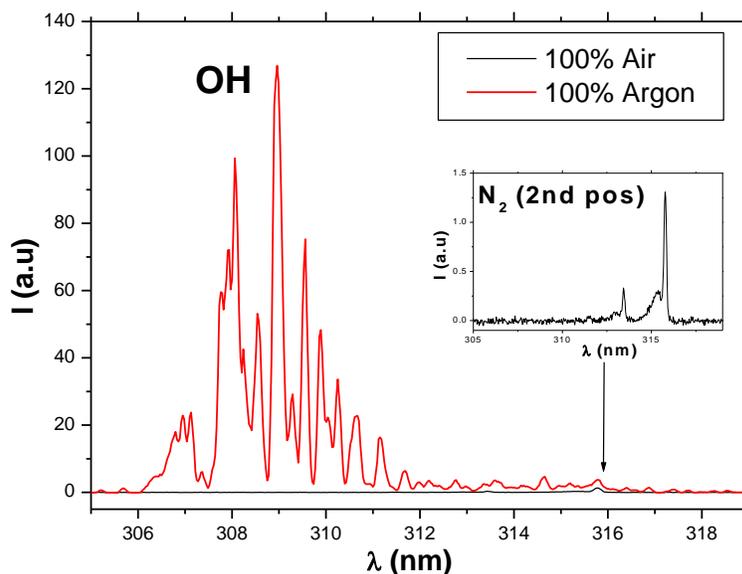
**Figura 11.** Espectro de emisión de un plasma operado en aire húmedo 1 L/min (línea roja) y Ar 1 L/min (línea negra). Barrido entre los 200 y 900 nm utilizando el fototubo visible.

El espectro del plasma de argón está caracterizado por una emisión muy intensa de la banda vibro-rotacional del radical OH (sistema 306 nm) y de las líneas atómicas del argón (sistema Ar I), así como una moderada emisión de las bandas del segundo sistema positivo del N<sub>2</sub>. Una emisión muy débil de iones moleculares de oxígeno y de átomos de oxígeno (sistema O I) fue también detectada en este caso (**Figura 11**). La presencia en el espectro de las bandas de OH, N<sub>2</sub> y de las líneas de oxígeno se atribuye a la entrada de aire ambiental, que contiene humedad, en el plasma. Asimismo, el argón que alimenta la descarga contuvo pequeñas impurezas y humedad del ambiente. La **Tabla 2** muestra las características espectroscópicas de las especies excitadas en el plasma de argón puro.

**Tabla 2.** Características espectroscópicas de las especies excitadas en el plasma de argón puro.

Especie	$\lambda$ (nm)	Transición	$E_u$ (eV)	Especie	$\lambda$ (nm)	Transición	$E_u$ (eV)
OH	281.1	$A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi$	4	Ar I	696.5	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	308.9	$A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi$	4		706.7	$4p \rightarrow 4s$	13.3
NH	336	$A^3\Pi \rightarrow X^3S^-$	3.4		714.7	$4p \rightarrow 4s$	13.3
N <sub>2</sub>	295.3	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		727.3	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	296.2	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		738.4	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	297.7	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		750.4	$4p \rightarrow 4s$	13.5
	311.7	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		751.5	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	313.6	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		763.5	$4p \rightarrow 4s$	13.2
	315.9	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		772.4	$4p \rightarrow 4s$	13.2
	337.1	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		794.8	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	353.7	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		800.6	$4p \rightarrow 4s$	13.2
	357.7	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		801.5	$4p \rightarrow 4s$	13.1
	367.2	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		810.4	$4p \rightarrow 4s$	13.2
	371.1	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		811.5	$4p \rightarrow 4s$	13.1
	375.5	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		826.5	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	380.5	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		840.8	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	394.3	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		842.5	$4p \rightarrow 4s$	13.1
	399.8	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		852.14	$4p \rightarrow 4s$	13.3
	405.9	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	866.79	$4p \rightarrow 4s$	13.2	
	420.1	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	O I	777.2	$3p \rightarrow 3s$	10.7
	427	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1		777.4	$3p \rightarrow 3s$	10.7
434.4	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	777.5		$3p \rightarrow 3s$	10.7	
457.4	$C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$	11.1	844.6		$3p \rightarrow 3s$	11	

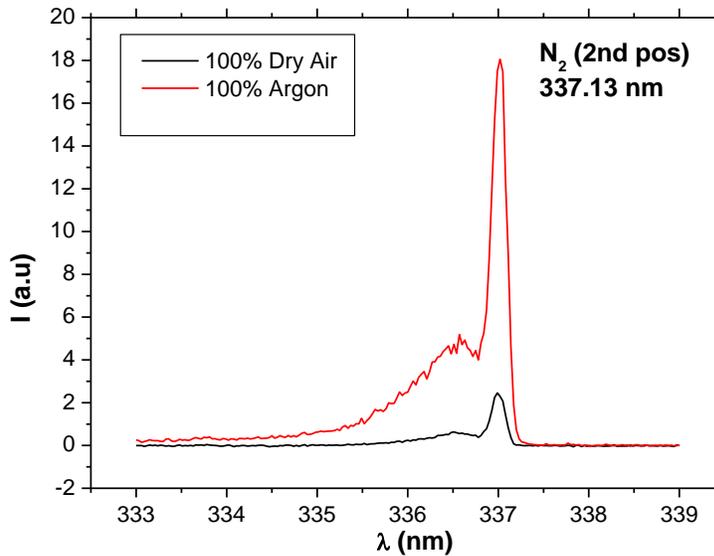
Por otra parte, en la **Figura 12** se ha ampliado la región del espectro en la que emite el radical OH (comprendida entre los 305 y 319 nm). De este modo, se pone de manifiesto nuevamente que en los plasmas de aire no se están detectando especies excitadas de este radical.



**Figura 12.** Bandas de emisión vibro-rotacionales del OH, de un plasma operado en aire seco 1 L/min (línea negra) y Ar 1 L/min (línea roja). Barrido entre los 305 y 319 nm utilizando el fototubo visible.

Los espectros demuestran una mayor excitación en el plasma de argón en comparación a los plasmas de aire. En la **Figura 13** se detalla la emisión de la banda del segundo sistema positivo del nitrógeno cuya cabeza de banda es la 337.13 nm.

De manera general, la mayor excitación observada en el plasma de argón es debida al mayor consumo de potencia en esta descarga. Por otra parte, como veremos más adelante en las **ecuaciones 5-7**, los átomos metaestables de argón contribuyen también a intensificar la emisión de las moléculas de N<sub>2</sub>.

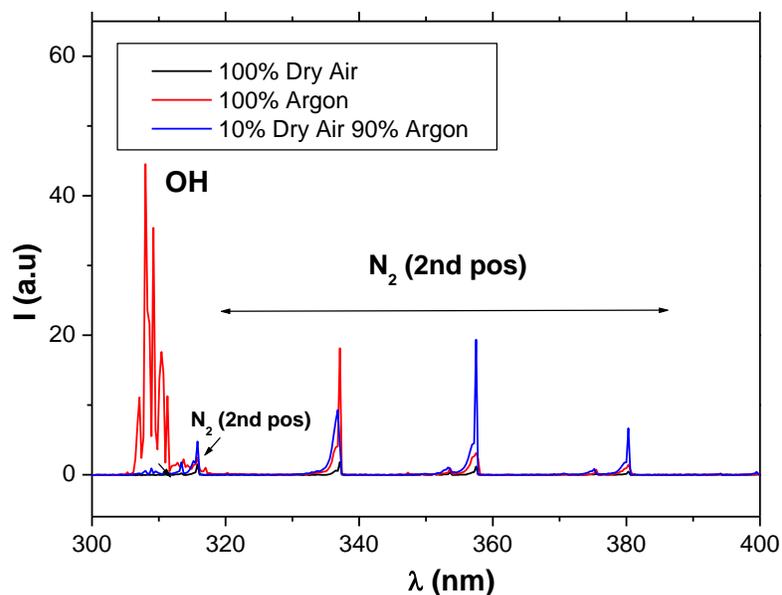


**Figura 13.** Bandas de emisión vibro rotacionales del segundo sistema positivo del  $N_2$ , de un plasma de descarga de gases operado en aire seco 1 L/min (línea negra) y Ar 1 L/min (línea roja). Barrido entre los 333 y 339 nm utilizando el fototubo visible.

### 3.1.3. Plasmas generados en mezclas argón/aire seco

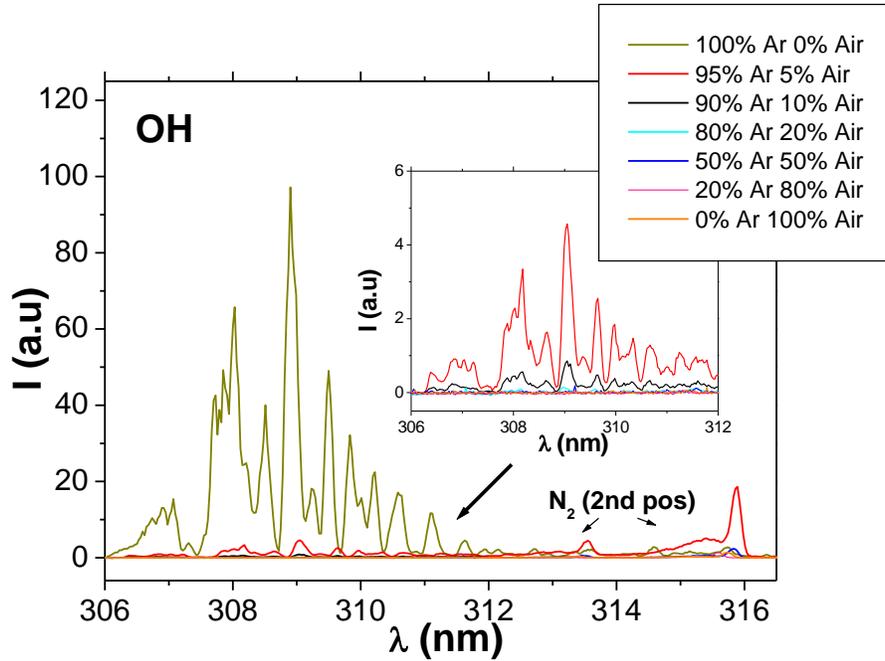
Finalmente, se estudiaron las especies excitadas generadas en plasmas operados en gases con diferentes proporciones de argón/aire. Se realizaron mezclas conteniendo un 5, 10, 20, 50 y 80 % de aire, y los resultados se compararon con los anteriormente estudiados (100% Ar y 100% aire).

La **Figura 14** muestra la región del espectro comprendida entre los 200 y 400 nm para los plasmas operados en aire seco (100%), Ar (100%) y una mezcla de 90% Ar y 10% aire seco. En ella se puede observar cómo la intensidad de las bandas del OH y el  $N_2$  disminuyen al incrementarse la proporción de aire en el gas soporte de la descarga, y cómo las bandas del OH desaparecen en los plasmas que contienen incluso moderadamente pequeñas cantidades de aire seco.

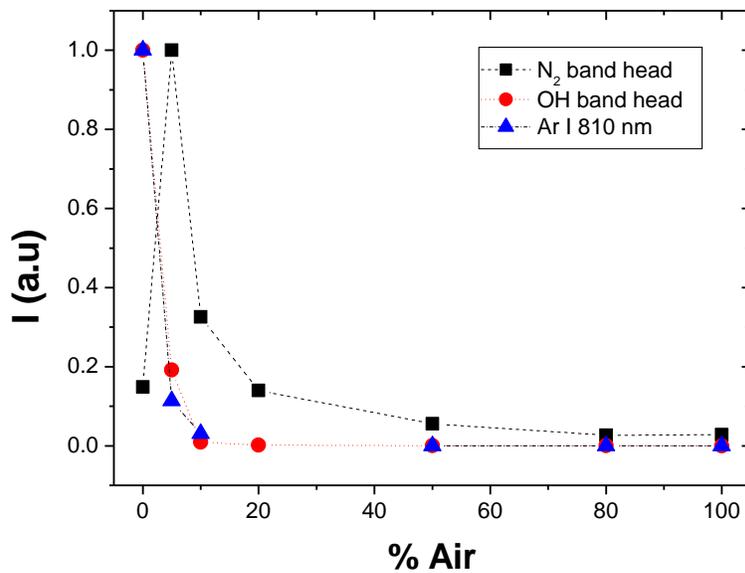


**Figura 14.** Bandas de emisión vibro rotacionales del OH y el N<sub>2</sub>, de un plasma de descarga de gases operado en aire seco 1 L/min (línea negra), Ar 1 L/min (línea roja) y 10% aire seco más 90% Ar (línea azul). Barrido entre los 300 y 400 nm utilizando el fototubo visible.

En la **Figura 15** se observa la disminución gradual de la intensidad de la banda OH a medida que aumentó la proporción de aire en la mezcla, de manera tal que, a partir de una mezcla de más del 10% de aire, ya no se observó emisión de la misma. En la **Figura 16** se muestra la evolución de la intensidad de las cabezas de las bandas de OH 308.9 nm, N<sub>2</sub> 337.1 nm y AR I 810.4 nm.

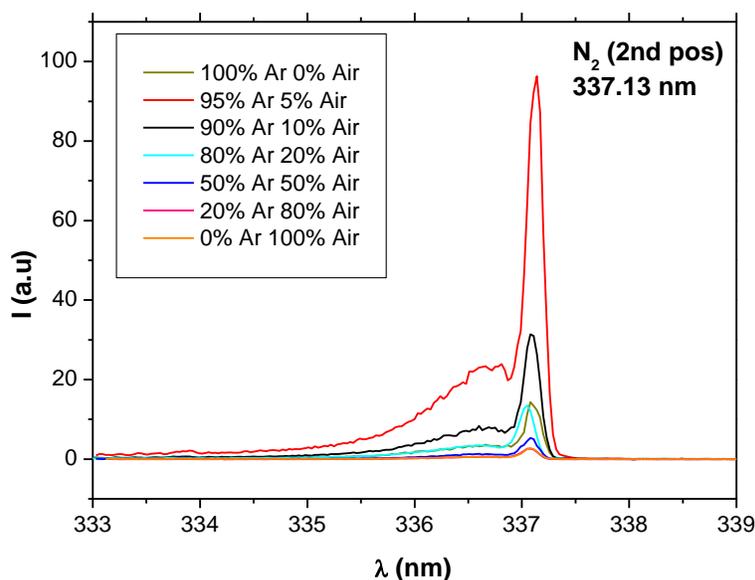


**Figura 15.** Banda de emisión del OH de un plasma de descarga de gases operado en un flujo de 1 L/min de Ar puro o de mezclas argón/aire según se indica en el recuadro.



**Figura 16.** Curva normalizada de la evolución de la intensidad de las cabezas de las bandas de las especies excitadas de  $N_2$  (línea negra), OH (línea roja) y Ar I (línea azul), en un plasma de descarga de gases operado en un flujo de 1 L/min con diferentes porcentajes de aires seco y Ar. En el eje x se muestran los porcentajes de aire en el gas de alimentación.

Por otra parte, las bandas del N<sub>2</sub> presentaron un comportamiento diferente a las bandas OH. Las mayores intensidades se presentaron en las mezclas que contenían 5 y 10% de aire, siendo el plasma que contenía un 5% de aire el más intenso (**Figura 17**). En las descargas generadas con una mezcla de 80% Ar y 20% de aire y con un 100% Ar, las bandas de N<sub>2</sub> presentaron aproximadamente la misma intensidad. Mientras que las mezclas con más de 20% de aire fueron disminuyendo gradualmente la intensidad de emisión.

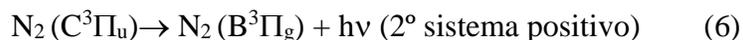


**Figura 17.** Banda de emisión del N<sub>2</sub> a 337.13 nm de un plasma de descarga de gases operado en un flujo de 1 L/min de Ar puro o de las mezclas argón/aire que se indican en el recuadro.

En el plasma de aire puro, la excitación de las moléculas hasta el estado C<sup>3</sup>Π<sub>u</sub> se produce exclusivamente a través de colisiones con los electrones:



Estas moléculas, al desexcitarse hasta el nivel B<sup>3</sup>Π<sub>g</sub>, producen la emisión del segundo sistema positivo de N<sub>2</sub> observada:

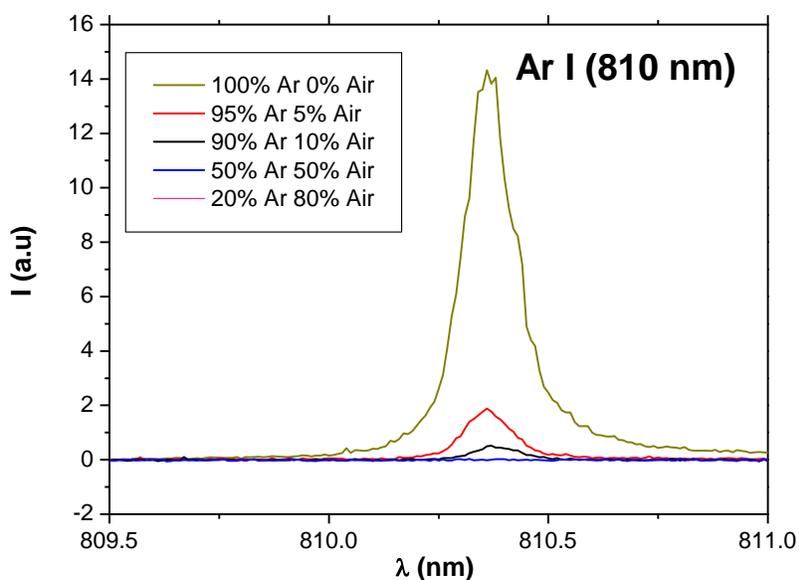


En los plasmas de argón con un moderado contenido de aire, los átomos excitados de argón juegan un papel importante en la excitación vibracional de moléculas de nitrógeno, a través de reacciones de transferencia de excitación (Yu y Yasuda, 1998):



Este mecanismo explica en parte, la intensificación de la banda de  $\text{N}_2$  observada. Cuando el contenido de aire se incrementa, la población de estados excitados metaestables de argón del plasma disminuye progresivamente, reduciéndose así la contribución de los mismos a la excitación de moléculas de nitrógeno.

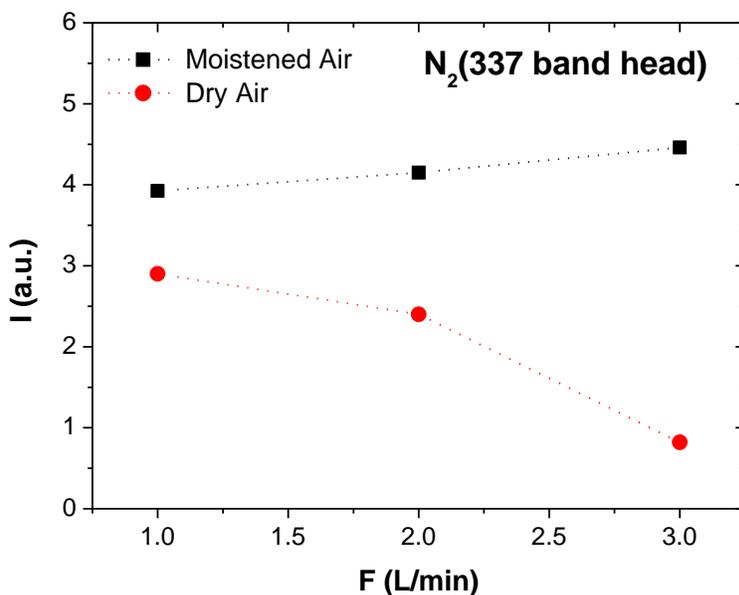
La **Figura 18** muestra el cambio de intensidad observado para la línea atómica de Ar I 810.37 nm. Su intensidad se redujo gradualmente al incrementar el porcentaje de aire en la mezcla del gas de alimentación del plasma, como consecuencia de la transferencia de excitación desde los átomos excitados de argón a las moléculas de nitrógeno, anteriormente descrita.



**Figura 18.** Banda de emisión del Ar I de un plasma de descarga de gases operado en un flujo de 1 L/min de Ar puro o de las mezclas argón/aire que se indican en el recuadro.

### 3.2. Especies excitadas en el plasma dependiendo de la velocidad de flujo del gas

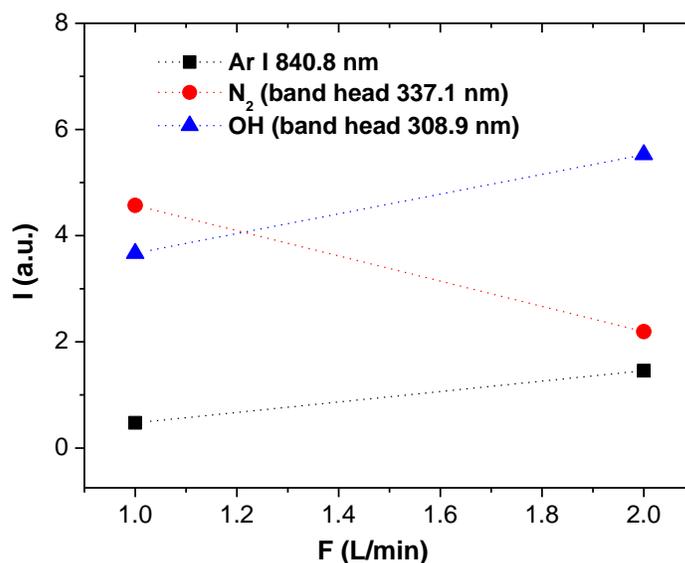
A continuación, se muestran los resultados del estudio de la cantidad de especies excitadas en el plasma al variar el flujo de gas soporte. Se midió la intensidad de la banda  $N_2$  a 337.13 nm para los plasmas generados a flujos de 1, 2 y 3 L/min de aire humedecido y seco. Se encontró que al operar en aire humedecido, la intensidad de la banda aumenta al aumentar el flujo, mientras que, sucede lo contrario al operar en aire seco (**Figura 19**). En el caso del aire humedecido, el incremento del flujo va acompañado de un incremento de la cantidad de humedad que se introduce en el plasma, y de la corriente en el mismo, hecho que favorece la excitación. Por el contrario, en el plasma de aire seco, un mayor flujo no cambia la composición del plasma, y en este caso, la disminución de la intensidad observada se puede atribuir a un menor tiempo de residencia de la especie  $N_2$  en el plasma.



**Figura 19.** Variación de la intensidad de la banda  $N_2$  337.13nm de un plasma de descarga de gases operado en un flujo de 1, 2 y 3 L/min.

Para el plasma de argón puro, en el que se excitan más especies, se midieron los cambios de intensidad de la cabeza de las bandas OH y  $N_2$  y de la línea Ar I 840, para los flujos de 1 y 2 L/min. La **Figura 20** muestra que, en el margen de flujos estudiados, un aumento de flujo de argón favorece la excitación de átomos de argón, así como de especies OH. Este

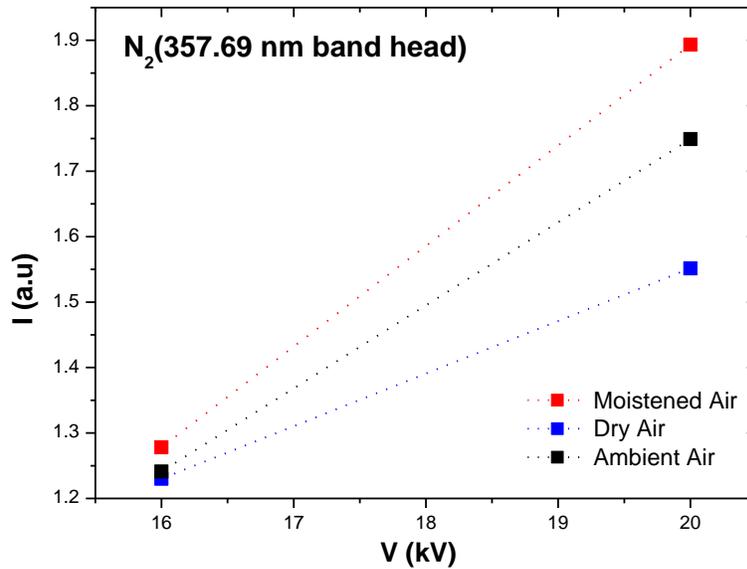
comportamiento se puede deber a que hay una mayor cantidad de argón y de sus impurezas en la descarga generada utilizando flujos altos. Por el contrario, la disminución de la intensidad observada para las bandas de  $N_2$  puede deberse nuevamente al menor tiempo de residencia de la especie  $N_2$  en el plasma.



**Figura 20.** Variación con el flujo de gas de la intensidad de emisión de las distintas especies excitadas en el plasma de argón.

### 3.3. Especies excitadas en el plasma dependiendo del voltaje aplicado a la descarga

El voltaje aplicado a la descarga permite también controlar la cantidad de especies excitadas en el plasma. En la **Figura 21** se muestran los resultados correspondientes a la curva de intensidad de la banda de  $N_2$  para los distintos plasmas de aire estudiados en dos condiciones de voltaje, 16 y 20 kV. Tanto para el plasma generado con aire humedecido, seco y ambiental, la cantidad de especies excitadas de  $N_2$  aumentó con el voltaje aplicado. Al incrementar el voltaje se aumentan las microdescargas o filamentos por unidad de tiempo y de área del electrodo, es decir, la intensidad de las bandas; pero las propiedades de la microdescarga, como la composición de las especies, no se ve afectada (Conrads y Schmidt, 2000; Kogelschatz, 2003; Laroussi, 2002).



**Figura 21.** Curva de intensidad de la banda de  $N_2$  a 337.13 nm de un plasma de descarga de gases operado con dos voltajes diferentes (16 y 20 kV), utilizando un flujo de aire humidificado o seco de 1 L/min y aire ambiental circundante .

### 3.4. Temperatura en el plasma

#### 3.4.1. Temperatura del gas en el plasma

A continuación, se muestran los resultados correspondientes al estudio de la dependencia de la temperatura del gas en el plasma con el tipo de gas soporte y el flujo de gas. Al estar presentes las especies excitadas de  $N_2$  en todas las condiciones experimentales estudiadas, las temperaturas del gas fueron determinadas en todos los casos a partir de la simulación teórica de los espectros de  $N_2$  medidos experimentalmente. Por otra parte, en aquellos casos en los que el plasma contuvo argón y la línea atómica Ar I 810.37 nm fue suficientemente intensa, se realizó una medida adicional de la temperatura del gas utilizando esta línea. Asimismo, en los casos en los que la especie OH fue detectada, se midió también la temperatura del gas a partir de la simulación de la banda del radical OH. En la **Tabla 3** se muestran los valores de temperatura de gas medidos a partir de la temperatura rotacional encontrada mediante la simulación de la banda  $N_2$  para los distintos plasmas de aire generados a 20 kV, utilizando flujos de gas de 1, 2 y 3 L/min para los casos de aire seco y

aire humedecido. Todas las temperaturas medidas fueron inferiores a los 320 K (46.85 °C), siendo la temperatura de gas más baja la del plasma generado con el aire ambiental. Recordemos que éstas son las temperaturas en la región entre los electrodos dentro del reactor de plasma, la cual es superior a la del gas efluente que sale del mismo. En la **Tabla 4** se muestran los valores de temperatura de gas medidos para los plasmas generados con diferentes proporciones de argón y aire generados a 20 kV y un flujo de 1 L/min. La temperatura más alta correspondió al plasma puro de argón. Observamos cómo un aumento en la proporción de aire conduce a una leve disminución de la temperatura del gas.

**Tabla 3.** Temperatura de gas medidas a partir de simulación de la banda de N<sub>2</sub> para los plasmas generados en aire humedecido, seco y ambiental.

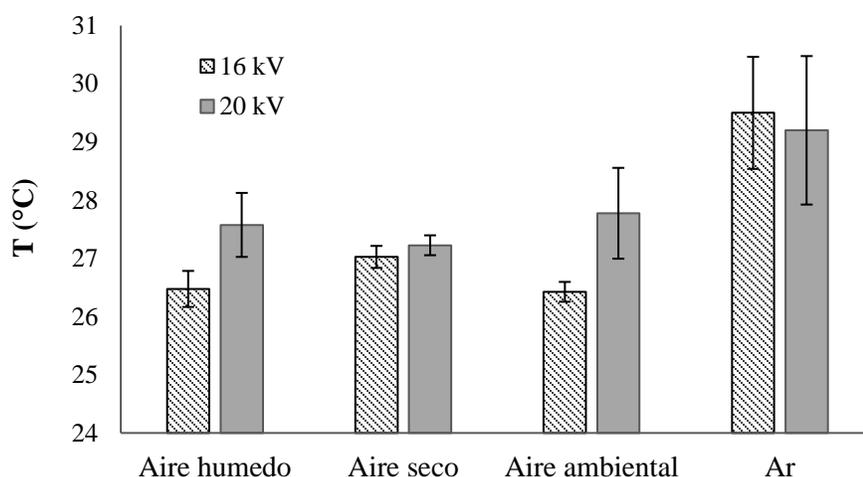
	Temperatura gas (°C)		
	1 L/min	2 L/min	3 L/min
<b>Aire humedecido</b>	<u>36.85+10</u>	<u>41.85+10</u>	<u>46.85+11</u>
<b>Aire seco</b>	<u>50.85+10</u>	<u>45.85+7</u>	<u>33.85+8</u>
<b>Aire ambiental</b>	<u>46.85+11</u>		

**Tabla 4.** Temperatura de gas medidas a partir de simulación de la banda de N<sub>2</sub>, Ar I y OH para los plasmas generados con diferentes proporciones de argón y aire.

Proporción de aire (%)	Temperatura gas (°C)		
	N <sub>2</sub>	Ar I	OH
<b>0</b>	<u>91.85+24</u>	Autoabsorbancia	<u>81.85±6</u>
<b>5</b>	<u>49.85±9</u>	<u>56.85±5</u>	-
<b>10</b>	<u>45.85±7</u>	<u>51.85±5</u>	-
<b>20</b>	<u>44.85+9</u>	<u>46.85+7</u>	-
<b>25</b>	<u>44.85+10</u>	<u>41.85+8</u>	-
<b>50</b>	<u>43.85+12</u>	-	-
<b>80</b>	<u>44.85±12</u>	-	-
<b>100</b>	<u>36.85+8</u>	-	-

### 3.4.2. Temperatura del gas efluente del plasma

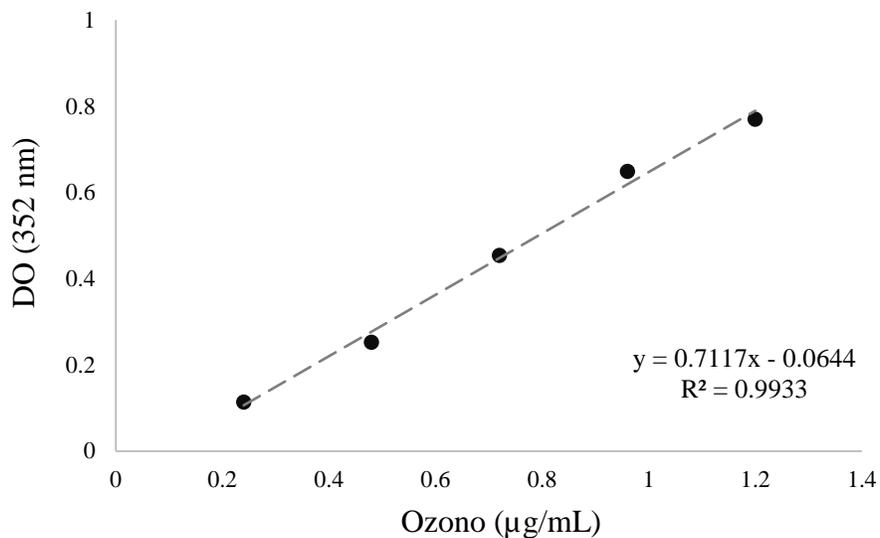
Con una cámara infrarroja, se tomó la temperatura del gas efluente del plasma generado en aire humedecido, seco y ambiental y en Ar. No se presentó diferencia significativa entre las temperaturas del gas operado a 16 y 20 kV. La mayor temperatura se presentó operando el plasma en Ar, 30 °C aproximadamente; mientras que no hubo diferencia significativa entre las temperaturas del gas efluente del plasma obtenido en aire humedecido, seco y ambiental, cuyas temperaturas fueron 27 °C aproximadamente (**Figura 22**).



**Figura 22.** Temperaturas obtenidas con una cámara infrarroja del gas efluente del plasma operado en aire humedecido, seco y ambiental y en Ar, utilizando un voltaje de 16 y 20 kV. Las barras representan la desviación estándar.

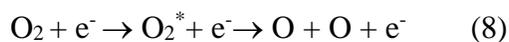
### 3.5. Oxidantes totales generado en el gas efluente del plasma operado en aire humidificado.

La **Figura 23** muestra la curva de calibración para  $DO_{352\text{ nm}}$  versus concentración de  $O_3$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Dicha curva se utilizó para extrapolar la concentración de  $O_3$  en el gas efluente del plasma generado en aire humidificado a 1 L/min. Se obtuvo una concentración de ozono de  $16.79 \pm 2.81 \mu\text{g/mL}$ , lo que es equivalente a una cantidad de oxidantes totales en el tiempo de  $1.842 \pm 0.41 \mu\text{g/min}$  de  $O_3$ .

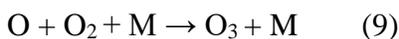


**Figura 23.** Curva de calibración densidad óptica a 352 nm ( $DO_{352}$ ) a diferentes concentraciones de ozono ( $\mu\text{g/mL}$ )

En este tipo de descargas, la mayor parte de la energía que ganan los electrones en el campo eléctrico se emplea en la excitación de moléculas y átomos. De este modo, en primer lugar, las moléculas de  $O_2$  se disocian (energía de disociación  $\sim 5.2$  eV) formando átomos de O, a partir de reacciones intermedias de excitación de las moléculas de  $O_2$  en estado fundamental mediante colisiones electrónicas, hacia los estados  $A^3\Sigma_u^+$  (6 eV) o  $B^3\Sigma_u^-$  (8.4 eV). Así, la generación de  $O_3$  en esta descarga de aire puede explicarse a partir de la siguiente secuencia de reacciones (Kogelschatz, 2003):

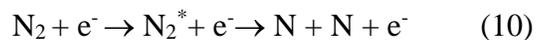


Seguidamente, a partir de reacciones de tres cuerpos que implican átomos de O y moléculas de  $O_2$  se forma el ozono:

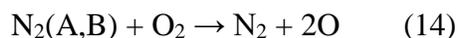


donde M es un tercer cuerpo de colisión que, en el caso del aire, puede ser O,  $O_2$ ,  $O_3$  o, más probablemente,  $N_2$ .

Asimismo, en el plasma de aire, la energía ganada por los electrones también se emplea en la excitación y disociación de moléculas de N<sub>2</sub> a moléculas de nitrógeno (~ 9.8 eV):



Una serie de reacciones que implican átomos de N y estados moleculares excitados del N<sub>2</sub>, producen también átomos de oxígeno adicionales para la generación de ozono:

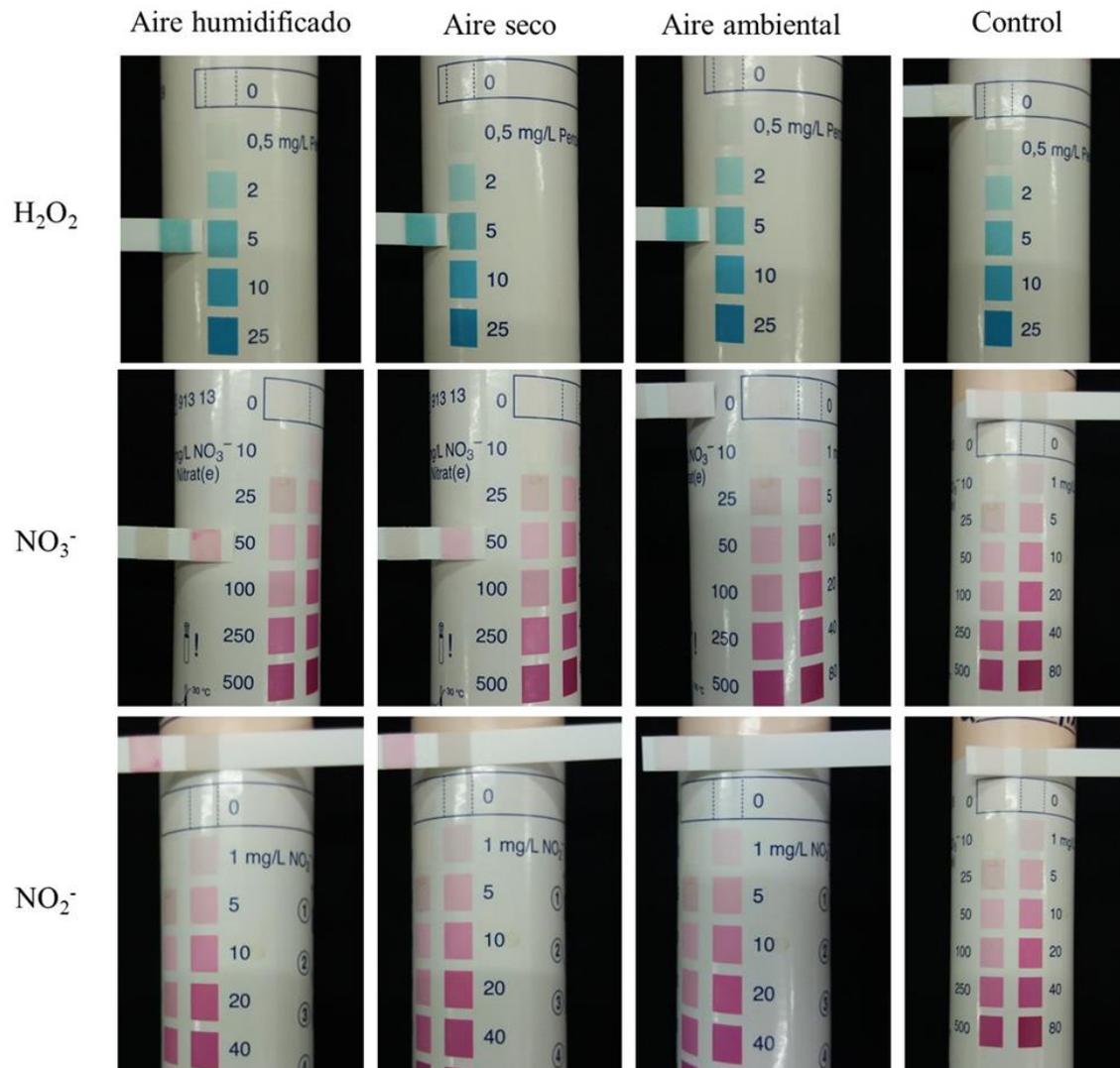


Donde A y B representan los estados moleculares excitados del N<sub>2</sub>, A<sup>3</sup>Σ<sub>u</sub><sup>+</sup> y B<sub>3</sub>Π<sub>g</sub>.

Aproximadamente la mitad del ozono formado en las descargas de aire proviene de estos procesos indirectos, razón por la cual la producción de ozono en estas descargas se produce mucho más lenta que en los plasma de oxígeno puro, y gran parte de la fracción de energía que pierden los electrones inicialmente en las colisiones con moléculas de nitrógeno puede recuperarse y utilizarse a través de las reacciones anteriores para la generación de ozono (Kogelschatz, 2003).

### **3.6. Medición semi-cuantitativa de peróxido de hidrógeno, nitrato y nitrito generados en el plasma**

En la medición semi-cuantitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> generados en el gas efluente del plasma, para todas las condiciones de operación del plasma, se pudo determinar la presencia de las especies reactivas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que se encontró NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el plasma operado en aire humedecido y seco. Finalmente, bajo ninguna de las condiciones se detectó la formación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (**Figura 23**).



**Figura 23.** Tiras reactivas para medición de  $H_2O_2$ ,  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  expuestas durante 1 min a plasma frío operado en aire humedecido, seco y ambiental.

En resumen, en el **Capítulo 2** se determinó que la cinética de inactivación del biofilm por plasma fue más rápida con plasma generado en aire humedecido respecto del generado en aire circundante. Aquí determinamos que bajo esas condiciones la emisión principal corresponde al segundo sistema positivo del  $N_2$  y no se detectaron ni líneas atómicas ni bandas moleculares de oxígeno. La presencia casi exclusiva de bandas de  $N_2$  en los espectros y la ausencia de átomos excitados de nitrógeno revelaron que la energía de la descarga se usó principalmente para la excitación de los niveles de vibración y rotación de las moléculas de nitrógeno, más que en la disociación del mismo. Estas especies

moleculares excitadas desempeñan un papel relevante en la formación de ozono en esta descarga, como se vio en la **sección 3.5, ecuaciones 8-14**. Además, como se mostró en la **sección 3.1.1**, no se detectaron emisiones de las especies excitadas de OH y NO que son típicas en los plasmas DBD generados en aire con cantidades variables de humedad, debido a que los radicales OH, NO y NO<sub>2</sub> se transforman rápidamente en HNO<sub>2</sub> y HNO<sub>3</sub>, y los radicales OH se recombinan para formar peróxidos (Kogelschatz, 2003). En la **sección 3.6**, se pudo reportar la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el gas efluente del plasma.

La presencia de superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) en el gas efluente de una descarga plasma es difícil de detectar debido a que este radical es de corta duración y no se acumula. Su presencia en el aire ionizado se ha relacionado con la detección del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que el superóxido es un precursor común para esta especie (Gaunt *et al.*, 2006):



Aunque no se detectó la presencia de NO y OH en nuestro dispositivo de plasma DBD por medio de las técnicas de OES, se encontró la presencia de bandas de N<sub>2</sub> excitadas y de iones de N<sub>2</sub><sup>+</sup> y la formación de O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el gas efluente del plasma. La erradicación eficiente y rápida de los biofilms de *P. aeruginosa* por el tratamiento con nuestro dispositivo de plasma se podría atribuir en parte a estas RONS y a otras que no fueron posibles detectar, como el radical superóxido o especies mono y diatómicas excitadas típicas de la descarga DBD que no son posibles de observar por técnicas de OES, como las especies N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> y N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Kogelschatz, 2003). Estas RONS generadas en la descarga y el gas efluente del plasma, están asociadas al daño oxidativo en las células bacterianas, produciendo daños graves a las macromoléculas como lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos. Aunque el daño oxidativo puede ser muy extremo, no están claros los mecanismos precisos que llevan a la muerte celular (Farr y Kogoma, 1991; Cabisco *et al.*, 2000; Gaunt *et al.*, 2006).

La peroxidación de los polisacáridos de la membrana celular bacteriana es catalizada por las moléculas cargadas generadas en el plasma y es altamente dependiente de la cantidad de

agua y de la composición del medio que rodea la célula. Tanto los iones positivos como negativos catalizan los procesos de peroxidación de polisacáridos y lípidos tanto dentro como fuera de la célula (Dobrynin *et al.*, 2009). Los lípidos son las macromoléculas que sufren mayor daño oxidativo, comprometiendo la integridad estructural de la membrana celular y conduciendo a un desequilibrio osmótico, que puede dar lugar a la lisis celular. Los radicales  $\text{HOO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ , el oxígeno singlete y el  $\text{O}_3$  pueden iniciar la peroxidación lipídica atacando los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular y desencadenando una reacción destructiva en cadena. La reacción en cadena de la peroxidación lipídica se inicia cuando un átomo de hidrógeno es extraído de un ácido graso insaturado para formar un radical lipídico, que a su vez reacciona con oxígeno molecular para formar un radical lípido peroxilo ( $\text{L-OO}\cdot$ ). Este radical ataca otros ácidos grasos insaturados y extrae más átomos de hidrógeno que forman hidroperóxidos de ácidos grasos ( $\text{L-OOH}$ ), creándose una cadena de reacciones (Farr y Kogoma, 1991). La peroxidación lipídica genera productos que son más cortos que los ácidos grasos insaturados iniciales, por lo que su capacidad de rotación dentro de la membrana celular es alterada y la integridad estructural de esta se ve comprometida (Gaunt *et al.*, 2006; Farr y Kogoma, 1991).

Las ROS, también pueden inducir oxidación de proteínas y daños en el ADN. Cuando las proteínas se oxidan, se producen modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos y se altera su estructura, produciendo cambios funcionales que pueden alterar el metabolismo celular. Además, durante la peroxidación lipídica se forman aldehídos que son muy reactivos y pueden causar daños en las proteínas (Berlett y Stadtman, 1997). Las ROS puede causar numerosos tipos de lesiones en el ADN, a través de reacciones con las bases y azúcares. Además del daño en el ADN causado directamente por las ROS, los radicales intermedios formados durante la peroxidación lipídica también reaccionan con el ADN, por ejemplo, la descomposición de la purina puede ocurrir como resultado de la extracción de  $\text{H}^+$  por los radicales libres de ácidos grasos (Farr y Kogoma, 1991). Estos mecanismos podrían explicar en parte la inactivación de los biofilms de *P. aeruginosa* por el tratamiento con nuestro dispositivo de plasma.

Además, en este capítulo se evaluaron diferentes condiciones experimentales que dieron como resultado diversos tipos de plasma en función de la composición del gas de alimentación. Determinamos que los plasmas de argón puro o con la contribución de un poco de aire, presentan una emisión muy fuerte del radical OH, que como se sabe es muy reactivo en términos de su actividad biológica. Se produjo una disminución progresiva de la intensidad de la banda OH a medida que aumentó la cantidad de aire. Mientras que, para las mezclas que contienen más de 10% de aire, no se detectó OH. Estos resultados muestran el potencial de los plasmas generados en argón/aire para producir un ambiente reactivo que, a su vez, oxidaría a los biofilms. Se espera poder probar estas diferentes combinaciones de argón/aire para erradicar biofilms de *P. aeruginosa* de manera más eficiente. El conocimiento adquirido a través de estos experimentos, sentaría las bases para mejores estrategias para la inactivación de biofilms bacterianos.

#### **4. CONCLUSIONES**

Las técnicas de OES permitieron determinar las distintas especies excitadas en el plasma y su densidad de población en unidades arbitrarias, así como la temperatura del gas, y sus variaciones dependiendo del tipo de gas soporte, del flujo de gas y del voltaje empleado en su generación. Para el plasma generado en aire humedecido y seco o en aire ambiental circundante, las principales especies detectadas fueron las moléculas de nitrógeno y iones moleculares de nitrógeno en pequeñas cantidades. También, se determinaron algunas de las especies químicas formadas por este plasma, como peróxido de hidrogeno, nitratos y ozono. Todas las especies detectadas podrían estar actuando sinérgicamente para desencadenar procesos de inactivación microbiana en la zona de la posdescarga donde se trataron los biofilms. Además, se propusieron nuevas condiciones experimentales para generar diferentes tipos de plasma que se podrían utilizar en futuros estudios de erradicación de biofilms.

## 5. REFERENCIAS

1. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Marino, G. (2006). Biofilm Destruction by RF High-Pressure Cold Plasma Jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1304–1309.
2. Afshari, R., y Hosseini, H. (2013). Non-thermal plasma as a new food preservation method, Its present and future prospect. *J Paramed Sci* 5, ISSN 2008-4978.
3. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012a). Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 381–384.
4. Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Laverty, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., O’Connell, D., y Gilmore, B.F. (2012b). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS ONE* 7, e44289.
5. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59, 1114–1128.
6. Becker, K., Koutsospyros, A., Yin, S.-M., Christodoulatos, C., Abramzon, N., Joaquin, J.C., y Brelles-Mariño, G. (2005). Environmental and biological applications of microplasmas. *Plasma Phys Control Fusion* 47, B513.
7. Ben Belgacem, Z., Carré, G., Boudifa, M., Charpentier, E., Cawe, B., y Gellé, M.P. (2016). Effectiveness of Non-Thermal O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> Plasma on *P. aeruginosa* multilayer biofilms cultured on hydroxyapatite. *IRBM* 37, 68–74.
8. Berlett, B.S., y Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313–20316.
9. Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., y van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. Acta B* 57, 609–658.
10. Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P.J., y Gilmore, B.F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol* 123, 308–324.
11. Cabiscol, E., Tamarit, J., y Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3, 3–8.
12. Conrads, H., y Schmidt, M. (2000). Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci Technol* 9, 441.
13. Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., y Fridman, A. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11, 115020.
14. Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Woedtke, T. von, Brandenburg, R., Hagen, T. von dem, y Weltmann, K.-D. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys Appl.Phys* 44, 013002.

15. Farr, S.B., y Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55, 561–585.
16. Gabriel, A.A., Ugay, M.C.C.F., Siringan, M.A.T., Rosario, L.M.D., Tumlos, R.B., y Ramos, H.J. (2016). Atmospheric pressure plasma jet inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel surfaces. *Innov Food Sci. Emerg Technol* 36, 311–319.
17. Gaunt, L.F., Beggs, C.B., y Georghiou, G.E. (2006). Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review. *IEEE Trans Plasma Sci.*34, 1257–1269.
18. Graves, D.B. (2012). The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys Appl Phys* 45, 263001.
19. Joaquin, J.C., Kwan, C., Abramzon, N., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2009). Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation? *Microbiology* 155, 724–732.
20. Kogelschatz, U. (2003). Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem Plasma Process* 23, 1–46.
21. Laroussi, M. (2002). Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30, 1409–1415.
22. Laroussi, M., y Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* 233, 81–86.
23. Laroussi, M., Alexeff, I., y Kang, W.L. (2000). Biological decontamination by nonthermal plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci* 28, 184–188.
24. Lee, K., Paek, K., Ju, W.T., y Lee, Y. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J Microbiol Seoul Korea* 44, 269–275.
25. Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Jäger, A., Polívka, L., Syková, E., Dejneka, A., y Kubinová, Š. (2016). The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82, 71–83.
26. Mai-Prochnow, A., Bradbury, M., Ostrikov, K., y Murphy, A.B. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS ONE* 10, e0130373.
27. Menashi, W.P. (1968). Treatment of surfaces. U.S. Patent No.3383163 A
28. Modic, M., McLeod, N.P., Sutton, J.M., y Walsh, J.L. (2017). Cold atmospheric pressure plasma elimination of clinically important single- and mixed-species biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 49, 375–378.
29. Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., y Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 226, 1–21.
30. Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., y Saoudi, B. (2009). Plasma sterilization. methods and mechanisms. *Pure Appl Chem* 74, 349–358.
31. Pearse, R.W.B., y Gaydon, A.G. (1963). The identification of molecular spectra. Third Edition, eds. (John Wiley & Sons).

32. Rodero, A., y García, M.C. (2017). Gas temperature determination of non-thermal atmospheric plasmas from the collisional broadening of argon atomic emission lines. *J Quant Spectrosc Radiat Transf* 198, 93–103.
33. Rowan, N.J., Espie, S., Harrower, J., Anderson, J.G., Marsili, L., y MacGregor, S.J. (2007). Pulsed-plasma gas-discharge inactivation of microbial pathogens in chilled poultry wash water. *J Food Prot* 70, 2805–2810.
34. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
35. Voráč, J., Synek, P., Potočňáková, L., Hnilica, J., y Kudrle, V. (2017a). Batch processing of overlapping molecular spectra as a tool for spatio-temporal diagnostics of power modulated microwave plasma jet. *Plasma Sources Sci Technol* 26, 025010.
36. Voráč, J., Synek, P., Procházka, V., y Hoder, T. (2017b). State-by-state emission spectra fitting for non-equilibrium plasmas: OH spectra of surface barrier discharge at argon/water interface. *J Phys Appl Phys* 50, 294002.
37. Vowles, P.D., y Connell, D.W. (2013). *Experiments in environmental chemistry: a laboratory manual*, eds (Elsevier), pp. 58-61.
38. Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A., y Eichwald, O. (2014). Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam. Clin Pharmacol* 28, 123–135.
39. Yu, Q.S., y Yasuda, H.K. (1998). An Optical emission study on expanding low-temperature cascade arc plasmas. *Plasma Chem Plasma Process* 18, 461–485.
40. Zelaya, A., Vandervoort, K., y Brelles-Mariño, G. (2012). Battling Bacterial Biofilms with Gas Discharge Plasma. *In Plasma for bio-decontamination, medicine and food security*, Z. Machala, K. Hensel, y Y. Akishev, eds. (Springer Netherlands), pp. 135–148.
41. Zelaya, A.J., Stough, G., Rad, N., Vandervoort, K., y Brelles-Marino, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces, and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. *IEEE Trans Plasma Sci* 38, 3398–3403.
42. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Boehm, D., y Bourke, P. (2014). Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Plasma Med.* 4, 137-152.
43. Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P.J., y Bourke, P. (2015). Cold Plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS ONE* 10, e0138209.

# CAPÍTULO 6

## **INCREMENTO DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMS DE *Pseudomonas aeruginosa* TRATADOS CON ANTIMICROBIANOS LIBRES O NANOVEHICULIZADOS Y/O PLASMA DE DESCARGA DE GASES**

### **RESUMEN**

Las bacterias creciendo en biofilm son más resistentes a los antimicrobianos comúnmente utilizados en las mismas bacterias en vida libre o planctónica. Se ha investigado y probado con éxito la aplicación del plasma frío como método de erradicación de biofilms bacterianos. En el presente capítulo, se utilizó plasma y/o antimicrobiano en su conformación libre o en nanotransportadores lipídicos. Estos fueron sintetizados con carga superficial positiva o negativa a fines de estudiar el posible aumento de la penetrabilidad debido a la interacción entre las nanopartículas y el biofilm. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de ciprofloxacina libre y nanovehiculizada tanto en cultivos planctónicos como en biofilms de *P. aeruginosa*. Por otra parte, se determinó la CIM del antimicrobiano libre y nanovehiculizado después del tratamiento de biofilms con plasma. Paralelamente se observaron los biofilms tratados con plasma y/o antimicrobiano libre o nanovehiculizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados muestran la reducción en la CIM de ciprofloxacina en biofilms de *P. aeruginosa* para el antimicrobiano nanoparticulado, en especial para las nanopartículas positivas. Los respectivos valores de CIM obtenidos fueron de 200 µg/mL para ciprofloxacina libre, 100 en µg/mL para ciprofloxacina nanovehiculizada con carga superficial negativa, y 25-50 en µg/mL para las nanopartículas con carga superficial positiva. Esto implicaría que las nanopartículas positivas logran una mejor penetración y liberación del antimicrobiano en el biofilm. El tratamiento con plasma también resultó en una reducción de la CIM para ciprofloxacina libre; sin embargo, no se observó una clara sinergia entre el plasma y el antimicrobiano nanovehiculizado. Para los biofilms sometidos previamente al tratamiento con plasma, los valores obtenidos para CIM de ciprofloxacina libre en biofilms fueron de 50-100 µg/mL, en el caso de las nanopartículas negativas de 100 µg/mL, y para las positivas de 50-100 µg/mL. Las imágenes de SEM muestran cambios en la morfología celular y estructura de matriz luego de los tratamientos con plasma y nanopartículas. Estos

resultados son interesantes al momento de plantear nuevas estrategias para combatir biofilms en casos de pacientes con historias clínicas complejas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias creciendo en biofilm son más resistentes a los antimicrobianos comúnmente utilizados en las mismas bacterias de vida libre o planctónica. Esta resistencia puede ocurrir de muchas maneras, por ejemplo, por el desarrollo de células persistentes, por la existencia de enzimas que degradan compuestos como antibióticos, o por la dificultad desde el punto de vista físico de traspasar la matriz (Høiby *et al.*, 2010; Mah y O’Toole, 2001; Stewart, 2002). La producción de una matriz de exopolisacárido es una de las características distintivas de los biofilms. Se ha sugerido que esta matriz previene el acceso de antibióticos a las células. Ya sea por reacción o sorción con el compuesto, los componentes de un biofilm pueden limitar el transporte de agentes antimicrobianos (Mah y O’Toole, 2001). Teniendo en cuenta la velocidad de transporte de un líquido por los canales de un biofilm respecto de la velocidad de los agentes antimicrobianos, si esta última es menor, las bacterias son expuestas a una concentración baja de antibiótico que aumenta progresivamente, dándoles tiempo para reaccionar (Van Acker *et al.*, 2014). Es por esto que el transporte de compuestos a través de la matriz tiene un efecto tan marcado respecto de la resistencia a antimicrobianos en biofilms.

Tradicionalmente se han utilizado liposomas en tratamientos dérmicos, farmacéuticos, cosméticos, etc. Tienen la ventaja de proteger a las drogas contra la degradación enzimática, no ser tóxicos, ser biocompatibles, enteramente biodegradables y no inmunogénicos. A pesar de esto, debido a su corto tiempo de vida, baja estabilidad y eficacia de encapsulación y remoción por el sistema retículo-endotelial surgió la necesidad de desarrollar nuevas metodologías para el *delivery* de drogas. Así es como surgieron los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC, sigla del inglés de “Nanostructured Lipid Carriers”) como sustituto de los liposomas. Fueron pensados para reducir los efectos tóxicos en la toma de drogas potentes, así como para mejorar la transferencia de genes,

implementarse en la industria alimentaria, etc. Tienen un tamaño promedio entre 40 y 1000 nm, son de morfología esférica, están compuestos de una fase lipídica sólida y una líquida, y un surfactante a modo de emulsificador. Pueden producirse por diversas técnicas como homogeneización a alta presión, evaporación y emulsificación por solvente, extracción de fluido supercrítica a partir de emulsiones, secado por spray o ultrasonificación (Naseri *et al.*, 2015). En el presente capítulo se utilizó la técnica de ultrasonificación que consiste en la formación de micelas a consecuencia de un proceso de cavitación (formación de cavidades llenas de vapor en el seno de un líquido) formado en la emulsión y provocado por el sonicador.

La ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro, empleado tanto contra bacterias gram positivas como gram negativas. Su modo de acción se basa en bloquear la replicación bacteriana por unión a la topoisomerasa II (ADN girasa), la cual es necesaria para aliviar el superenrollamiento y separar ambas hebras del ADN previo a la replicación. Es frecuentemente utilizada para tratar infecciones del tracto urinario, infecciones osteoarticulares, ginecológicas, respiratorias, de oído medio, sinusitis, de tejidos blandos, vías urinarias, de los órganos genitales, fiebre tifoidea, shigellosis, etc.

En el presente capítulo se evaluó el efecto combinado del tratamiento con plasma DBD y antibióticos para la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1. Ya que en el **Capítulo 4** se encontró que el plasma afecta la matriz del biofilm, se planteó la posibilidad de aumentar la penetración del antibiótico luego del tratamiento del biofilm con plasma. Además, se exploró la tecnología para la vehiculización del antibiótico con nanopartículas lipídicas. Hasta donde se tiene conocimiento, ninguna de estas estrategias de erradicación de biofilms ha sido estudiada hasta la fecha, por lo que los resultados de este trabajo implican un aporte original y novedoso.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Microorganismo, medio de cultivo y crecimiento del biofilm

Todos los experimentos se llevaron a cabo con *P. aeruginosa* cepa PAO1 y el medio de cultivo LB, como se describe en el **Capítulo 1 sección 2.1**. Se utilizaron dos sistemas de formación de biofilm: placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (KARTELL LABWARE®) y cupones de acero inoxidable dispuestos dentro los pocillos de microplacas de poliestireno de 24 pocillos (CELLSTAR®, GreinerBio-one). Para los dos sistemas de cultivo, se incubó una suspensión de inóculo en LB a una  $DO_{550nm}$  de 0.1 durante 24 hs a 37 °C en condición de cultivo estático.

### 2.2. Transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

Los NLC o nanopartículas, fueron sintetizados a fin de obtener partículas con carga negativa (NLC<sup>-</sup>) o positiva (NLC<sup>+</sup>). Además, fueron marcados con un colorante fluorescente. Los materiales utilizados para su síntesis fueron: una parte lipídica que consta de una mezcla de ésteres de cetilo (Crodamol™ MM y Crodamol™ GTCC-LQ, Croda, Argentina), surfactante Pluronic® F68 (cat # A-6973), quitosano (peso molecular: 190,000-310,000 Da; 75-85% desacetilado) y colorante fluorescente DiOC18 (3,3-dioctadeciloxacarbocianina perclorato) (Sigma–Aldrich, Argentina).

### 2.3. Síntesis de NLC<sup>-</sup>

Las nanopartículas se prepararon por el método de ultrasonicación (Islan *et al.*, 2016). Se fundió 800 mg de lípido Crodamol™ MM (2% p/v) sobre baño de agua a 60-70 °C y se mezcló con 40 µL del lípido Crodamol™ GTCC-LQ. Después de 5 min, se añadió a la fase lipídica 250 µL de acetona conteniendo 20 mg de ciprofloxacina. Se homogenizó y se dejó reposar 10 min para favorecer la evaporación de la acetona. Luego, se adicionaron 20 mL de una solución acuosa termostaticada con 4.5% p/v de Pluronic® F68. Inmediatamente, la mezcla se sometió a ultrasonicación por 30 min (50% de amplitud) utilizando un

procesador ultrasónico (130 Watts, Cole-Parmer, EE.UU.) equipado con una punta de titanio de 6 mm. A continuación, la dispersión se enfrió en baño de agua a 10 °C y se almacenó a 5 °C para su posterior uso.

#### **2.4. Síntesis de NLC<sup>+</sup>**

El procedimiento fue similar al descrito en **2.2.1**, pero luego de homogeneizar la fase lípido/ciprofloxacina, se adicionó 20 µL de una solución acuosa termostatzada conteniendo Pluronic® F68 al 4% p/v y quitosano al 0.5% p/v. Se continuó con el protocolo descrito anteriormente.

#### **2.5. Síntesis y marcación de NLC- y NLC+ con colorante fluorescente**

Las NLC marcadas con DiOC18 se prepararon de acuerdo al protocolo establecido por Rodenak y colaboradores (2017). Se añadió el colorante fluorescente (0.04% p/p) al lípido fundido, se homogenizó durante 10 min y se procedió a la preparación de las nanopartículas.

#### **2.6. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y determinación del tamaño de partícula**

La dispersión de nanopartículas fue diluida 10 veces con agua ultrapura y se colocó una gota sobre una cuadrícula de colodión cubierta de cobre (400-mesh). El exceso de líquido es removió con papel de filtro. Una gota de ácido fosfotúngstico se añadió a la dispersión para aumentar el contraste. Finalmente, el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, sigla del inglés “Transmission electron microscopy”) se realizó utilizando el microscopio Jeol-1200 EXII-TEM (JeolMa, EEUU).

El promedio del diámetro y la distribución del tamaño fueron medidos por espectroscopía de correlación de fotones (PCS, Sigla del inglés “Photon Correlation Spectroscopy”) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Corp, UK) a 25 °C en placas de poliestireno con una

longitud de camino óptico de 10 mm. El potencial Z se determinó mediante anemometría de laser Doppler también utilizando el Nano ZS Zetasizer. Se utilizaron celdas capilares con longitud de camino óptico de 10 mm y agua desionizada (Milli-Q). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

## **2.7. Determinación del porcentaje de encapsulación de las formulaciones**

Luego de finalizar la preparación de cada formulación, se procedió a medir el volumen final de reacción (ya que se produce evaporación durante la sonicación) y se determinó la concentración de ciprofloxacina no encapsulada (Islan *et al.*, 2016). Se transfirieron 500  $\mu\text{L}$  de la dispersión final a una centrífuga de ultrafiltración (punto de corte de peso molecular 30.000 Da, Microcon, Millipore, EEUU.) y se centrifugó a 10.000 G durante 10 min a fin de separar las nanopartículas de la solución acuosa. El filtrado se diluyó en agua destilada, y se determinó la concentración de ciprofloxacina no encapsulada por espectrofotometría a 271 nm. La eficiencia de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{(Q_0 - (Cr \times V)) \times 100}{Q_0}$$

Donde  $Q_0$  es la cantidad inicial de ciprofloxacina adicionada, Cr es la concentración de ciprofloxacina en la solución filtrada y V es el volumen final después de terminar la preparación.

## **2.8. Cinética de liberación de ciprofloxacina de una solución de nanopartículas**

Se estudió la liberación de antibiótico a partir de una solución de nanopartículas NLC<sup>-</sup>/ciprofloxacina y NLC<sup>+</sup>/ciprofloxacina. Se utilizaron membranas de diálisis de celulosa con tamaño de poro de 8 KDa hidratadas durante 24 h en agua destilada. La solución de nanopartículas se dializó contra 30 mL de solución fisiológica a 37 °C y 150 rpm. Se tomó 1 mL de muestra a la media hora de iniciada la incubación, y luego se muestreó cada hora durante 6 hs reponiendo el mililitro extraído a fin de mantener el volumen de la solución.

Luego se tomaron muestras a las 22, 24, 29 y 96 hs de iniciada la incubación. Por otro lado, se realizó una curva patrón de ciprofloxacina en solución fisiológica, en un rango de concentraciones de 0.5-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## **2.9. Fuente de plasma de descarga de barrera dieléctrica**

Se produjo plasma de descarga de gas a presión atmosférica usando una configuración coaxial DBD operada en aire humidificado a un flujo de 1 L/min. Las condiciones de operación se describen en el **Capítulo 2 sección 2.2**. Los biofilms de *P. aeruginosa* se sometieron al tratamiento de plasma durante 3 min de exposición bajo condiciones estériles. Se incluyó un control sin tratamiento con plasma.

## **2.10. Determinación de la CIM de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en cultivos de células planctónicas de *P. aeruginosa***

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos a las que se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de medio LB. Por otro lado, se prepararon soluciones stock de los antibióticos, de concentración 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ciprofloxacina encapsulada  $\text{NLC}^+$ , 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ciprofloxacina encapsulada  $\text{NLC}^-$  y 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ciprofloxacina libre. Se realizaron diluciones seriadas al medio de los antibióticos en los pocillos y por último, se añadió 100  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano a una  $\text{DO}_{550\text{nm}}$  de 0.2 a cada pocillo de la placa. De esta manera, la densidad óptica final de cada pocillo fue de 0.1. Se incubó la placa a 37°C durante 24 hs y se midió la  $\text{DO}_{550\text{nm}}$ . Se define la CIM como la menor concentración de antibiótico a la cual no se observa crecimiento bacteriano y se estableció en la práctica como el valor de absorbancia que no representó crecimiento celular, es decir, similar al obtenido para el control negativo conteniendo medio de cultivo.

### **2.11. Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms de *P. aeruginosa***

Una vez formado el biofilm en placas de 96 pocillos como se describió en la **sección 2.1**, se descartó el sobrenadante de cada pocillo, se realizó un lavado con 200  $\mu$ L de solución fisiológica estéril, se agregó 100  $\mu$ L de medio LB y 100  $\mu$ L de la solución de antibiótico correspondiente.

Las soluciones de antibiótico se prepararon de la siguiente manera: se realizaron diluciones seriadas de ciprofloxacina y ciprofloxacina nanoparticulada en medio LB a partir de soluciones stock. La ciprofloxacina libre fue diluida al medio a partir de una solución stock de 6.400  $\mu$ g/mL hasta alcanzar la concentración de 1.56  $\mu$ g/mL. Los análogos nanoparticulados de ciprofloxacina, NLC<sup>+</sup> y NLC<sup>-</sup>, se prepararon partiendo de una solución de 800  $\mu$ g/mL hasta alcanzar una concentración de 3.12  $\mu$ g/mL.

Una vez agregada la solución de antibiótico, se incubaron las placas a 37 °C durante 24 hs. Concluido el período de incubación, se realizó un recambio de medio de cultivo, descartando el presente en los pocillos, realizando un lavado con 200  $\mu$ L de solución fisiológica estéril y agregando medio LB hasta un volumen final de 200  $\mu$ L. Se incubó nuevamente a 37°C durante 24 hs. Al recambiar el medio de cultivo, las células viables dentro del biofilm después de la incubación con el antibiótico, crecerán tanto dentro del biofilm como en el sobrenadante, y se podrá determinar el valor de la CIM-b midiendo la DO<sub>550nm</sub> del sobrenadante, como se describió en la **sección 2.4**. Se incluyó un control de crecimiento de biofilm y un control negativo conteniendo medio de cultivo.

### **2.12. Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilm de *P. aeruginosa* luego del tratamiento con plasma frío a presión atmosférica**

Se desarrolló el biofilm en las placas de 96 pocillos como se describió en la **sección 2.1**. Una vez finalizado el crecimiento de biofilm, se descartó el medio de cultivo, y se realizó

un lavado con un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de solución fisiológica. Luego, se expusieron los pocillos durante 3 min al tratamiento con plasma. Se incluyeron controles de crecimiento de biofilm, y control negativo conteniendo medio de cultivo. Posterior al tratamiento con plasma, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de las distintas diluciones de antibiótico al pocillo correspondiente. Las soluciones de trabajo de ciprofloxacina, y sus análogos  $\text{NLC}^+$  y  $\text{NLC}^-$ , se realizaron a partir de 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se diluyeron seriadamente al medio hasta alcanzar una concentración de 3.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego, se incubaron las placas a 37°C durante 24 hs. Una vez concluido el período de incubación, las muestras se procesaron según se indica en la **sección 2.5**. Por último, se determinó el valor de la CIM-b al igual que en la **sección 2.4**.

### **2.13. Estudio cualitativo de penetrabilidad de antibiótico mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Tanto para la observación mediante microscopía de epifluorescencia como por SEM, se crecieron los biofilms sobre cupones de acero inoxidable como se describe en la **sección 2.1**. Una vez formado los biofilms, se lavaron los cupones con 1 mL de solución fisiológica estéril y se expusieron durante 3 min al tratamiento con plasma. Como control, se utilizaron biofilms crecidos en las mismas condiciones sin exposición al plasma. Para la observación con el microscopio de epifluorescencia, tanto a los biofilms tratados con plasma como a los controles, se les agregó 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 500  $\mu\text{L}$  de suspensión de nanopartículas marcadas con un colorante fluorescente y se incubaron durante 24 hs a 37 °C. Finalizado el periodo de incubación, se lavaron los cupones con 1 mL de solución fisiológica estéril y se visualizaron en el microscopio usando un filtro de excitación/emisión de 480/500 nm y aumento de 400X. Las imágenes fueron adquiridas con el programa Leica Application Suite (2.5.0 R1) y los análisis de imágenes se realizaron con el software libre ImageJ. Para la observación mediante SEM, tanto a los biofilms tratados con plasma como a los controles, se les agregó una solución de ciprofloxacina o sus análogos  $\text{NLC}^+$  o  $\text{NLC}^-$  en medio LB, a una concentración de 100, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. Se incubaron los cupones durante 24 hs a 37 °C. Una vez finalizado el período de incubación, se realizó la observación al SEM siguiendo el procedimiento descrito en el **Capítulo 4 sección 2.4**. Se realizaron cuatro experimentos independientes, cada uno por duplicado.

## **2.14. Análisis estadístico**

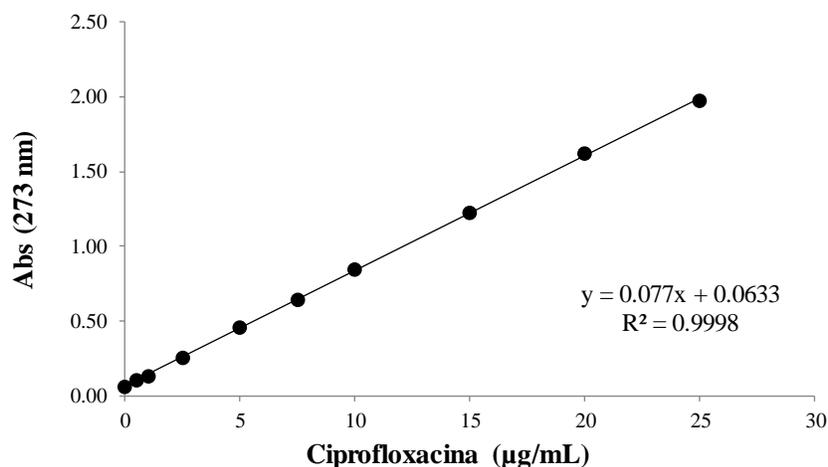
Todas las determinaciones de CIM y CIM-b se realizaron con al menos siete repeticiones independientes en el tiempo y cada una por triplicado. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las CIM y CIM-b. Se utilizó el software STATISTICA de la compañía Statsoft® (Copyright © StatSoft, 2011).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Transportadores lipídicos nanoestructurados**

#### **3.1.1. Determinación del porcentaje de encapsulación de antibiótico en las nanopartículas**

Se determinó el porcentaje de encapsulación de ciprofloxacina en las formulaciones a través de la medida de la cantidad de antibiótico obtenido luego de la filtración de las soluciones utilizando membranas que retienen a las nanopartículas. Se realizó la medición a una  $DO_{273nm}$ , y se extrapoló la concentración de ciprofloxacina utilizando una curva de calibración (**Figura 1**). Teniendo en cuenta la concentración inicial de ciprofloxacina con la que se prepararon las formulaciones, y la concentración no retenida en las nanopartículas se obtuvieron los siguientes porcentajes de encapsulación:  $35,88 \pm 2,84$  % para NLC<sup>-</sup>/ciprofloxacina y  $65,05 \pm 2,74$  % para NLC<sup>+</sup>/ciprofloxacina.



**Figura 1.** Curva de calibración de ciprofloxacina en agua

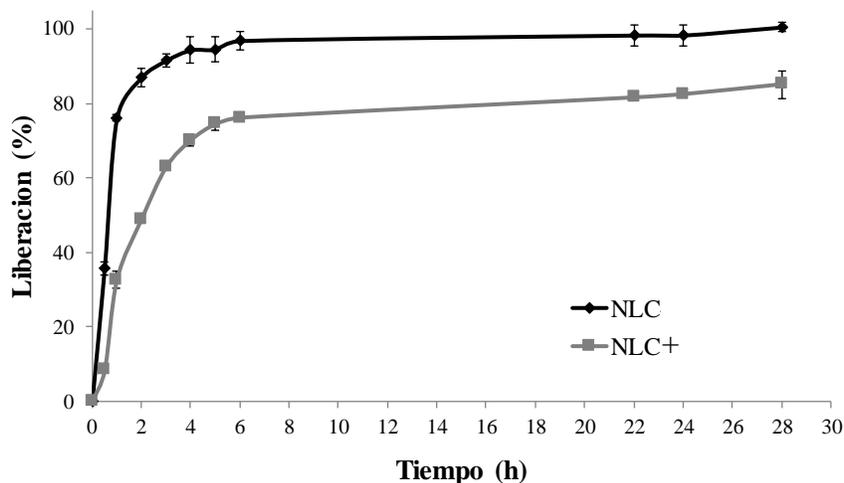
Se observa un mayor grado de encapsulación en la solución de nanopartículas cargadas positivamente  $NLC^+$ . Esta diferencia puede deberse a interacciones electrostáticas entre el antibiótico y el quitosano. Mientras que la ciprofloxacina posee carga negativa en soluciones ácidas (Breda *et al.*, 2009) como es la solución de acetona en la que se disuelve al momento de mezclar con los lípidos, el quitosano posee carga positiva en esas condiciones. La interacción entre cargas podría traducirse como un reclutamiento de antibiótico hacia la matriz de las nanopartículas, lo que explicaría el mayor porcentaje de encapsulación.

### 3.1.2. Cinética de liberación de ciprofloxacina desde soluciones de nanopartículas

A partir de los datos y de la curva de calibración de ciprofloxacina en agua (**Figura 1**), se graficaron las curvas correspondientes a la cinética de liberación de antibiótico partiendo de soluciones de nanopartículas  $NLC^-$  y  $NLC^+$  (**Figura 2**). En las curvas se observan dos etapas: una primera de liberación rápida de antibiótico al medio asociada al antibiótico libre de la formulación (no encapsulado), y otra fase de liberación gradual, típica de los sistemas de liberación de nanopartículas (Fang *et al.*, 2013; Islan *et al.*, 2016). Al inicio del experimento el antibiótico se liberó mediante el proceso de difusión. Se obtuvo un porcentaje de liberación del 35,7% a los 30 min en el caso de la solución de nanopartículas  $NLC^-$ , y 32,7% a la hora de iniciado el ensayo para las  $NLC^+$ . Posteriormente, en la meseta

de la curva comienza a liberarse el antibiótico más superficial de las nanopartículas, seguido por el que se encuentra más en profundidad. Más tarde, y para ambas nanopartículas, a partir de las 24 hs del inicio de la toma de muestra se observó que la solución fisiológica utilizada se tornó opaca, indicando la liberación de antibiótico por ruptura o degradación de las nanopartículas.

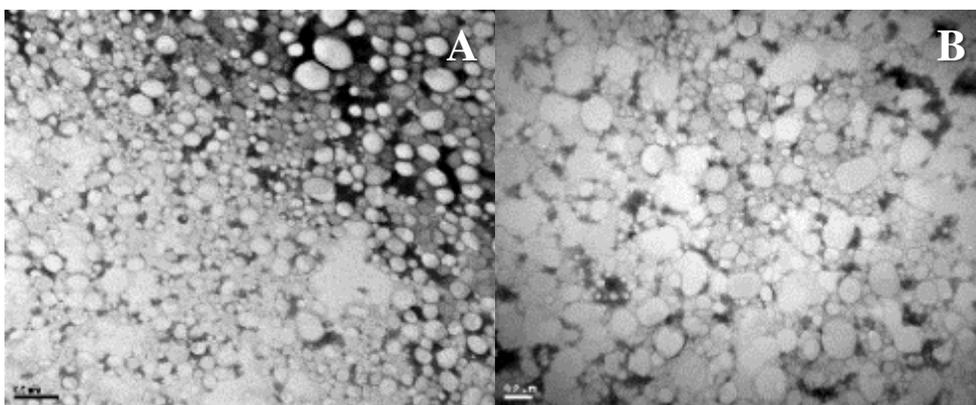
Se alcanzó un porcentaje de liberación del 100% a las 28 hs para la solución de NLC<sup>-</sup> y el mayor porcentaje obtenido para NLC<sup>+</sup> fue 86,2% a las 72 hs. La menor liberación para la solución de NLC<sup>+</sup> respecto al otro tipo de partículas, pudo deberse a un fenómeno físico que impidió el paso a través de la membrana debido a la adhesividad a la misma del quitosano remanente en la solución. Asimismo, el porcentaje de encapsulación fue mayor en esa formulación, de ahí que tarde mayor tiempo la liberación del antimicrobiano. Además, habría que considerar que el proceso de difusión pudo verse afectado por la arquitectura de la matriz de las nanopartículas.



**Figura 2.** Curva de cinética de liberación de ciprofloxacina a partir de dos soluciones de nanopartículas, una con carga neta negativa y otra con carga neta positiva.

### 3.1.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se observó un mayor tamaño de partícula y una mayor distribución de tamaños en la formulación de las NLC<sup>+</sup> en comparación con las NLC<sup>-</sup> (**Figura 3**). Los valores de potencial zeta confirmaron la carga superficial de las nanopartículas y los valores de diámetro indican el mayor tamaño de las nanopartículas NLC<sup>+</sup> (**Tabla 1**).



**Figura 3.** Imágenes obtenidas al microscopio electrónico de transmisión de **A.** NLC<sup>-</sup> y **B.** NLC<sup>+</sup>

**Tabla 1.** Caracterización de NLC preparadas por ultrasonificación.

Formulación	Diámetro (nm)	Potencial Z (mV)
NLC <sup>-</sup>	151.7 ± 0.9	-0.87 ± 0.17
NLC <sup>+</sup>	232.4 ± 2.5	+8.82 ± 1.20

### 3.2. Determinación de la CIM de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en cultivos de células planctónicas de *P. aeruginosa*

Un antibiótico comúnmente utilizado contra *P. aeruginosa* es ciprofloxacina, una droga perteneciente al grupo de las quinolonas (antimicrobiano sintético que inhibe la replicación del ADN en los microorganismos) y utilizada rutinariamente en ensayos de determinación de CIM y de sensibilidad de cepas bacterianas a antibióticos. En el presente trabajo se

determinó la CIM en cultivos de células planctónicas para corroborar la sensibilidad de este microorganismo a la ciprofloxacina.

Los resultados de la determinación de CIM en cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* se observan en la **Tabla 2** y corresponden al menos a siete experimentos independientes con más de tres repeticiones cada uno. Las CIM para el antibiótico libre y NLC<sup>-</sup> fueron significativamente más bajas que para el NLC<sup>+</sup> (p= 0.0017 y p= 0.0028, respectivamente). Los valores de CIM obtenidos con antibiótico libre, 0.5-1 µg/mL, concuerdan con los informados en bibliografía (Macià *et al.*, 2014). Los valores de CIM para ciprofloxacina NLC<sup>+</sup> y NLC<sup>-</sup> fueron 1-2 µg/mL y 0.5-1 µg/mL respectivamente.

**Tabla 2.** Valores de CIM de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en cultivo planctónico de *P. aeruginosa*.

<b>Tratamiento</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>
ciprofloxacina	0.5-1
ciprofloxacina NLC <sup>-</sup>	0.5-1
ciprofloxacina NLC <sup>+</sup>	1-2

Estos resultados se pueden explicar por el proceso de liberación del antibiótico desde las nanopartículas. Como el tiempo de incubación con el antibiótico en todas las condiciones fue de 24 hs y la liberación a partir de las NLC<sup>+</sup> a este tiempo fue menor (**Figura 2**), se necesitaría mayor concentración para inhibir el crecimiento bacteriano. Es posible que el valor de CIM de este tratamiento refleje el balance entre el efecto bactericida del quitosano, por el cual se hubiera esperado un valor más bajo de la CIM, y la lenta liberación de antibiótico de la nanopartícula, que resultaría en una CIM más alta.

La capacidad bactericida intrínseca del quitosano se basa en la interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente y las membranas celulares cargadas negativamente que altera las propiedades de barrera de las mismas, impidiendo el flujo de nutrientes y desechos y provocando la muerte celular (Chung *et al.*, 2004). Existe una interacción electrostática entre los grupos NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del quitosano y el grupo fosforilo de los

fosfolípidos en las membranas. Esta interacción causa daños provocando la salida de material intracelular. Además, puede actuar como quelante de metales, inhibiendo el accionar enzimático (Varma *et al.*, 2004).

En relación a los resultados de CIM para ciprofloxacina libre y la formulación NLC<sup>-</sup>, ambos tratamientos se comportaron de manera similar. En cultivos planctónicos, el efecto de liberación gradual de antibiótico no tiene el mismo peso que en crecimiento en biofilm donde el antimicrobiano tiene que pasar la barrera de la matriz.

### **3.3. Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms de *P. aeruginosa***

La resistencia a antimicrobianos está dada por varios mecanismos. Uno de ellos se enfoca en la diferente expresión génica de las bacterias formando biofilms, ya que el patrón de expresión difiere del de las bacterias en cultivo planctónico. Tradicionalmente los antimicrobianos han sido diseñados contra estas últimas. Las bacterias creciendo en biofilms pueden no estar produciendo las proteínas que son blanco de acción de los antimicrobianos, y por lo tanto escapan a sus efectos (Høiby *et al.*, 2010; Mah y O'Toole, 2001; Stewart, 2002). Las células que se adhieren a la superficie llevan a cabo diferentes funciones respecto de las células presentes en las capas exteriores. Estas últimas utilizan los nutrientes del medio generando un gradiente en la concentración de los mismos. Las células que no captan los nutrientes suficientes cuentan con una baja tasa metabólica por lo que son menos susceptibles a antimicrobianos. Además, las células de las capas externas pueden activar respuestas protectoras contra estrés que no son capaces de activar las células planctónicas. Además, es importante mencionar que podría producirse un efecto barrera dado por la matriz y los grupos de células en relación a la lenta o incompleta penetración de un antimicrobiano (Høiby *et al.*, 2010; Molin y Tolker-Nielsen, 2003).

Los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente constituyen un agravante en el combate contra la formación de biofilms. Ante el problema surgen nuevas tecnologías como la utilización de nanopartículas, un sistema de *delivery* que permitiría mejorar la

penetración de los antibióticos. En base a esa hipótesis se realizaron ensayos para la determinación de CIM-b utilizando ciprofloxacina y análogos nanoparticulados con cargas netas diferentes.

Se encontraron diferencias significativas entre todas las CIM-b evaluadas ( $p < 0.0001$ ), tanto para el antibiótico libre como nanoparticulado. El menor valor de CIM-b se presentó para la NLC<sup>+</sup>, seguido por la CIM-b de NLC<sup>-</sup>, y finalmente, el mayor valor lo presentó la ciprofloxacina libre (**Tabla 3**). Comparando los resultados aquí obtenidos con los de células planctónicas (**Tabla 2**), los valores de CIM-b fueron dos órdenes de magnitud mayores. Esto se correlaciona con los mecanismos de resistencia mencionados anteriormente.

**Tabla 3.** Tabla de valores de CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms de *P. aeruginosa*.

Tratamiento	CIM-b ( $\mu\text{g/mL}$ )
ciprofloxacina	200
ciprofloxacina NLC <sup>-</sup>	100
Ciprofloxacina NLC <sup>+</sup>	25-50

El antibiótico encapsulado mostró inhibición del crecimiento bacteriano a menor concentración, lo que podría explicarse por la mejor penetración de las nanopartículas a través del biofilm, resultando en una mayor incorporación de la droga y a la liberación de la misma dentro del biofilm. Las células reciben el antibiótico a través de fusión entre las membranas celulares y las de las nanopartículas, por lo cual podrían no reconocer al antibiótico, como en el caso de la droga libre, y de esta forma se evitaría su expulsión por las bombas de eflujo.

Se presentó una diferencia significativa ( $p=0.017$ ) entre las CIM de las formulaciones NLC<sup>-</sup> y NLC<sup>+</sup>, siendo esta última la que requiere menor concentración de antibiótico para lograr la inhibición del crecimiento. Este resultado se podría explicar por la interacción entre el biofilm y las nanopartículas a través de las cargas electrostáticas y por el efecto bactericida

del quitosano. Se sabe que la superficie del biofilm está cargada negativamente debido a la presencia de lipopolisacáridos, por lo que atrae nanopartículas con carga positiva. Además, éstas NLC<sup>+</sup> poseen el efecto bactericida del quitosano, que causa pérdida del material intracelular al alterar la permeabilidad de la membrana, se une al ADN bacteriano y quela metales traza necesarios para el crecimiento celular (Forier *et al.*, 2014).

### **3.4. Determinación de la CIM-b de ciprofloxacina y ciprofloxacina nanoparticulada en biofilm de *P. aeruginosa* luego de tratamiento con plasma frío a presión atmosférica**

En los **Capítulos 2, 3 y 4** se demostró la efectividad del plasma de descarga de gases operando en aire en la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1. Se encontró que una de las posibles causas de la destrucción del biofilm por plasma es el efecto sobre la matriz. Además, se ha reportado una disminución en el área y espesor de la matriz del biofilm en tratamientos con plasma respecto de otros sin tratar (Vandervoort y Brelles-Mariño, 2014). Estos autores sugirieron que el plasma podría reducir la matriz por oxidación o peroxidación de exopolisacáridos, lípidos u otros componentes.

A partir de estos conocimientos y la observación del efecto del antibiótico nanoparticulado sobre los biofilms, se evaluó el efecto del tratamiento con plasma seguido de una incubación con nanopartículas. La hipótesis de trabajo fue que el daño provocado a la matriz por el plasma frío podría aumentar la penetrabilidad de las nanopartículas cargadas con antibiótico.

En la **Tabla 4** se muestran los valores de las CIM-b de los distintos antimicrobianos utilizados sobre los biofilms control (sin tratamiento con plasma) y luego de tratados con plasma.

**Tabla 4.** CIM-b de ciprofloxacina y sus análogos nanoparticulados en biofilms control y tratados con plasma de *P. aeruginosa*.

Tratamiento	CIM-b ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Control	Con plasma
Ciprofloxacina	200	50-100
Ciprofloxacina NLC <sup>-</sup>	100	100
Ciprofloxacina NLC <sup>+</sup> )	25-50	50-100

En comparación con los resultados para los biofilms control, en los tratados con plasma previamente, los valores de CIM-b disminuyeron significativamente ( $p < 0.0001$ ) en el caso de ciprofloxacina libre, se mantuvieron para ciprofloxacina NLC<sup>-</sup> y aumentaron significativamente ( $p < 0.001$ ) para ciprofloxacina NLC<sup>+</sup>. En el caso del antibiótico libre, la disminución de la CIM-b podría deberse a la degradación de la estructura de la matriz del biofilm mediante el plasma. Se sabe que las ROS degradan proteínas de adhesión e integrinas, lo que altera la unión célula-célula afectando la permeabilidad de la matriz. Las ROS además producen oxidación y peroxidación de diversos componentes de la matriz alterando así la permeabilidad de la misma. El estrés nitrosativo por RNS también contribuiría a este efecto. Además, la degradación del exopolisacárido por despolimerización causada por radicales libres disminuiría la densidad de la matriz, por lo que el antibiótico se pondría en contacto con las células más fácilmente.

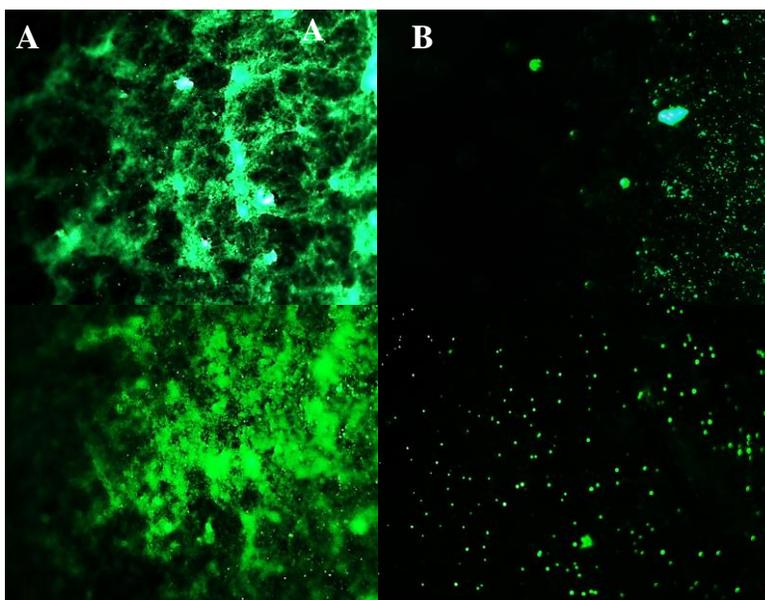
Recientemente, Kohanski y colaboradores (2007) demostraron que diferentes clases de antibióticos inducen la producción de ROS que contribuyen a la actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También, se ha reportado la producción de ROS en biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 por tratamiento con ciprofloxacina (Jensen *et al.*, 2014). Entre las especies detectadas, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son blanco de superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas, pero no se conoce enzima que catalice la detoxificación de OH<sup>·</sup>, el cual induciría lesiones oxidativas en proteínas, DNA y lípidos.

No se encontraron diferencias significativas entre las CIM-b de los distintos antimicrobianos luego de tratamiento con plasma. Teniendo en cuenta la presencia del

ambiente oxidativo en el biofilm resultante del tratamiento con el antibiótico e incrementado por las RONS generadas por el tratamiento con el plasma, se podrían explicar los valores de CIM-b obtenidos utilizando el antimicrobiano nanoparticulado. El ambiente reactivo podría degradar la cápsula de las nanopartículas por peroxidación de los lípidos que la constituye. Por consiguiente, el efecto observado sería similar a tener el antibiótico en su forma libre y de ahí que los valores sean similares en los tres casos.

### 3.5. Estudio cualitativo de biofilms tratados con nanopartículas mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido

Se incubaron los biofilms de *P. aeruginosa* junto a nanopartículas adosadas a un fluoróforo DiOC18 y posteriormente se observaron con el microscopio de epifluorescencia (**Figura 4**). Se observó mayor fluorescencia en el tratamiento con las nanopartículas positivas (**Columna A**). Esto puede estar relacionado a la interacción electrostática entre la superficie del biofilm y el antimicrobiano con las nanopartículas positivas. Se observó poca interacción entre las nanopartículas con carga negativa y el biofilm (**Columna B**)

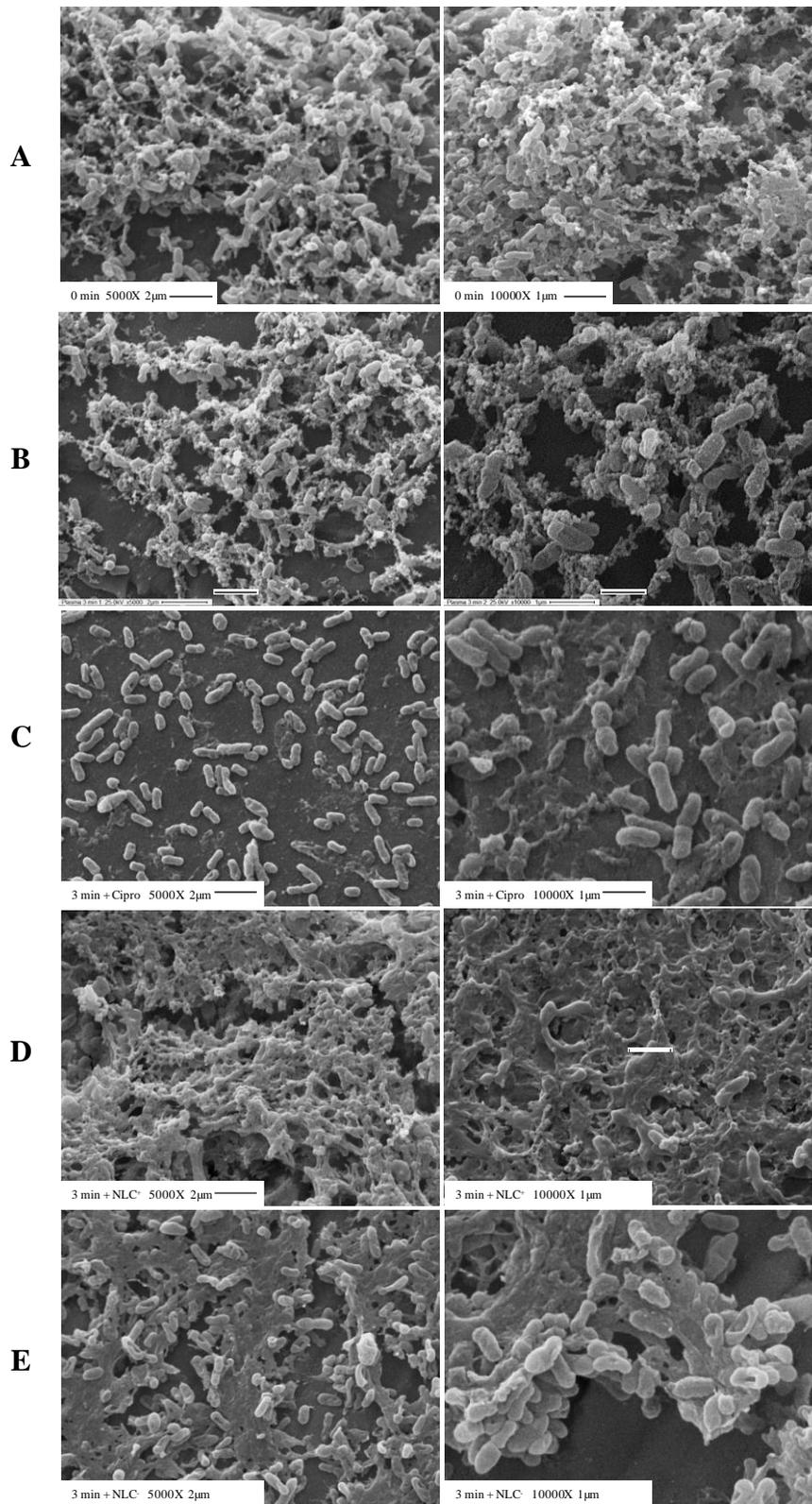


**Figura 4.** Imágenes obtenidas mediante microscopio de epifluorescencia de biofilms incubados junto a nanopartículas adosadas al fluoróforo DiOC18. **Columnas A.** incubación

de biofilm con NLC<sup>+</sup> y **B.** incubación de biofilms con NLC<sup>-</sup>. Imágenes obtenidas con un aumento 100X.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (**Figura 5**) permitieron la observación con mayor detalle del estado de las células y de la matriz tanto en los biofilms control sin exposición al plasma ni a antibiótico como en los biofilms luego del tratamiento con plasma en ausencia o en presencia de antibiótico libre o nanoparticulado.

En la **Figura 5** del biofilm control (**A**), se observó la estructura tridimensional compuesta por cúmulos de células y espacios vacíos, las células se encuentran rodeadas y entrelazadas por fibras de matriz. En estas muestras, la matriz se vio compacta y estructurada. En el biofilm tratado con plasma durante 3 min (**B**), aún se presentaron células de forma y tamaño normales, aunque también se observaron otras redondas y más pequeñas. Se evidenció una desestructuración de la matriz, que se observó menos compacta y con más espacios vacíos. Casi no se encontraron fibras como en el caso de los biofilms control y el aspecto general de la matriz es mucho más laxo.



**Figura 5.** Imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido. **A.** biofilm sin exposición a plasma ni antibiótico (control), **B.** biofilm expuesto a plasma durante 3 min,

**C.** biofilm expuesto a plasma durante 3 min e incubado con ciprofloxacina libre, **D.** biofilm expuesto a plasma durante 3 min e incubado con ciprofloxacina nanoencapsulada  $NLC^+$ , **E.** biofilm expuesto a plasma y a ciprofloxacina nanoencapsulada  $NLC^-$ . Las imágenes de la izquierda corresponden a un aumento 5000X, y las de la derecha a 10000X.

En el caso de las muestras tratadas con antibiótico y plasma, el efecto más dramático se evidenció en el tratamiento con ciprofloxacina libre, lo que correspondería con los resultados de CIM-b, ya que fue la condición en la que se observó mayor diferencia entre los biofilms tratados con plasma y sin tratar. Se observaron células mayormente sueltas, muchas de ellas deformadas o lisadas y muy poca formación de acúmulos. No se observó una estructura tridimensional ni matriz, por lo cual se podría concluir que ya no se tiene un biofilm.

En los tratamientos con plasma y ciprofloxacina nanoencapsulada, se ven diferencias entre las nanopartículas  $NLC^-$  o  $NLC^+$ . En ambos casos, la tridimensionalidad de la estructura está comprometida y no se observa una matriz típica con acúmulos de células y fibrillas. En las nanopartículas  $NLC^+$ , se observó una estructura densa y compacta que cubría o enmascaraba las células y que podría deberse a la propia formulación que contiene quitosano, ya que las cargas positivas de éste podrían interactuar con la superficie del biofilm y las cargas negativas del ADN extracelular. Este cubrimiento concuerda con las fotos obtenidas por microscopia de epifluorescencia (**Figura 4**), donde se observó la superficie del biofilm cubierta por las  $NLC^+$  adheridas al fluoróforo. Además, esa capa podría deberse a la degradación de las nanopartículas por el ambiente reactivo del biofilm en contacto con las ROS provenientes tanto del plasma como de sí mismo luego del accionar de la ciprofloxacina. En estas imágenes también se observa la presencia de nanopartículas intactas. En los tratamientos con  $NLC^-$  se distinguen células lisadas y escasez en matriz, resultando en un biofilm plano y con muy poca estructura tridimensional.

#### 4. CONCLUSIONES

Se encontró mayor efectividad del antimicrobiano nanovehiculizado respecto del libre para el tratamiento de biofilms de *P. aeruginosa*. Estos resultados abren una nueva puerta al uso farmacológico de antibióticos en formulaciones nano o microparticuladas. En conjunto, tratando los biofilms con plasma y antimicrobiano nanovehiculizado, no se observó disminución en los valores de CIM comparando con biofilms no expuestos a plasma, lo cual parecería indicar que no hay un efecto sinérgico entre el plasma y el antimicrobiano nanoparticulado. Sería interesante probar con nanopartículas hechas a partir de otra matriz o agregar algún agente protector a la formulación a fin de evitar los daños por estrés oxidativo generado por el plasma. Si bien no se evidenció sinergia entre el plasma y el antimicrobiano nanoparticulado, sería interesante evaluar si hay un efecto de orden en los tratamientos, tal como se ha demostrado para los tratamientos combinados de antibiótico y fagos, incubando el biofilm primero con el antibiótico y luego sometiéndolo a plasma. Los resultados de los experimentos de plasma y ciprofloxacina libre sí mostraron disminución en los valores de CIM en biofilms expuestos a plasma en comparación con los no tratados. Además, según lo reportado respecto de la sinergia de fagos y antibióticos en la destrucción de biofilms, también en el presente caso sería muy interesante evaluar el efecto del plasma aplicado luego del tratamiento antimicrobiano.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Breda, A.S., Kairuz, A., Manzo, R., y Olivera, M. (2009). Solubility behavior y biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm* 371, 106–113.
2. Abramzon, N., Joaquin, J.C., Bray, J., y Brelles-Mariño, G. (2006). Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34, 1304–1309.
3. Chung, Y.-C., Su, Y., Chen, C.-C., Jia, G., Wang, H., C Gaston Wu, J., y Lin, J. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25, 932–936.
4. Fang, C.L., Al-Suwayeh, S.A., y Fang, J.-Y. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent Pat Nanotechnol* 7, 41–55.

5. Forier, K., Raemdonck, K., De Smedt, S.C., Demeester, J., Coenye, T., y Braeckmans, K. (2014). Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Controlled Release* 190, 607–623.
6. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., y Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322–332.
7. Islan, G.A., Tornello, P.C., Abraham, G.A., Duran, N., y Castro, G.R. (2016). Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 143, 168–176.
8. Jensen, P.Ø., Briales, A., Brochmann, R.P., Wang, H., Kragh, K.N., Kolpen, M., Hempel, C., Bjarnsholt, T., Høiby, N., y Ciofu, O. (2014). Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog Dis* 70, 440–443.
9. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete B, Lawrence, C.A., Collins, J.J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130, 797-810.
10. Laroussi, M. (2002). Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30, 1409–1415.
11. Macià, M.D., Rojo-Molinero, E., y Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect* 20, 981–990.
12. Mah, T.-F.C., y O’Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34–39.
13. Naseri, N., Valizadeh, H., y Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Adv Pharm Bull* 5, 305–313.
14. Rodenak-Kladniew, B., Islan, G.A., de Bravo, M.G., Durán, N., and Castro, G.R. (2017). Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 154, 123–132
15. Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J Med Microbiol* 292, 107–113.
16. Van Acker, H., Van Dijck, P., y Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol* 22, 326–333.
17. Vandervoort, K.G., y Brelles-Mariño, G. (2014). Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS ONE* 9, e108512.
18. Varma, A., Deshpande, S.V., y Kennedy, J.F. (2004). Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. *Carbohydr Polym* 55, 77–93.

# **CONCLUSIÓN GENERAL**

## MODELO PROPUESTO PARA LA ERRADICACIÓN DE BIOFILM DE *P. aeruginosa* MEDIADO POR PLASMA

La hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral fue que el plasma de descarga de gases es útil para la inactivación de biofilms bacterianos y como objetivo general, se esperaba dilucidar algunos de los aspectos del mecanismo que explica la inactivación de biofilm por plasma. Con esta finalidad, se evaluó una fuente de plasma DBD operada en aire humidificado sobre biofilms de *P. aeruginosa*. Se estudió la cinética de inactivación de biofilms luego del tratamiento con plasma y el efecto del mismo sobre su fisiología y arquitectura. Además se investigó el efecto del tratamiento con plasma sobre la matriz del biofilm.

En el **Capítulo 2** se reportó una cinética de inactivación de doble pendiente, en la cual a los 15 min de tratamiento con plasma en aire humidificado se obtuvo un descenso en las UFC/mL de 5.6 unidades logarítmicas, lo cual representó más de un 99.999% de eficacia letal. Sin embargo, el recuento de colonias en un medio agarizado no tiene en cuenta que las células pueden seguir viables y hasta conservar la virulencia, aunque no den crecimiento de colonias luego del tratamiento. Es por esto que en el **Capítulo 3** se evaluó el estado fisiológico de las células del biofilm tratadas con plasma por medio de microscopía de epifluorescencia y kit de viabilidad bacteriana. Se encontró que, a los 15 min de exposición al plasma, aunque no hubo conteo de UFC aún se presentaron células viables y virulentas; por lo que fueron necesarios 30 min de exposición para la erradicación del biofilm.

Con el fin de dilucidar algunos de los mecanismos de acción del plasma en la erradicación de biofilms, se evaluó el efecto de la radiación UV del plasma sobre los mismos. En nuestro caso, la radiación UV representó un aporte importante a la inactivación de los biofilms, con un 47.06% de eficacia letal, lo que implica que en la descarga de plasma se están generando cantidades importantes de fotones UV. Se presentó una disminución inicial lenta posiblemente debida a que la profundidad de acción de los fotones UV se limita a una capa de un micrómetro.

En el **Capítulo 3** se informó la presencia de ADN de manera abundante en la matriz extracelular (eDNA) del biofilm. Para determinar el rol que cumple este eDNA en cuanto a la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma, se degradó con ADNasa antes del tratamiento y se determinó la curva de supervivencia del biofilm a diferentes tiempos de exposición. Se encontró un cambio en la cinética de inactivación y una reducción en el valor D con respecto al biofilm con eDNA, sugiriendo que este ADN es importante en la protección del biofilm frente al tratamiento con plasma ya que al degradarlo, el biofilm se erradica más rápidamente. En el **Capítulo 4** se muestran imágenes de SEM de biofilms de *P. aeruginosa* tratados durante diferentes tiempos de exposición al plasma. En estas imágenes, los biofilms control presentaron una estructura tridimensional compuesta por cúmulos de células y espacios vacíos, además de fibras entrelazando las bacterias y cubriendo toda la matriz. Estas fibras, presumiblemente de exopolisacárido Psl y eDNA, se observaron en menor medida en los biofilms tratados durante tiempos cortos con plasma y fueron degradadas totalmente en los expuestos a tiempos largos del tratamiento.

Tanto los biofilms con y sin eDNA tratados con plasma, como los tratados solo con la radiación UV del plasma, presentaron una cinética de inactivación de dos pendientes, en la cual se observó una primera etapa rápida de disminución de las UFC/mL seguida de una más lenta. La cinética de doble pendiente podría deberse a que primero ocurre la muerte de los microorganismos de las capas superiores fácilmente disponibles y más expuestas al plasma; y después, el plasma penetra las capas de restos celulares y células muertas antes de llegar a la parte interna del biofilm. En nuestro caso, es posible que la radiación UV del plasma este desestabilizando las redes eDNA-Psl y deje más expuestas las células a las especies reactivas del plasma.

En el **Capítulo 4**, se demostró la disminución en la cantidad y pérdida de la estructura de la matriz extracelular del biofilm a mayor tiempo de exposición al plasma. Por microscopia de epifluorescencia se observaron cúmulos de matriz tanto en los biofilms control como en los tratados durante tiempos cortos de exposición al plasma, mientras que en los tratados durante tiempos largos se observó desintegración de la misma. En las imágenes SEM de los biofilms tratados durante tiempos cortos de exposición al plasma, se empiezan a observar

algunas células de forma irregular, pero no se observan daños significativos sobre las células o la matriz; mientras que el biofilm expuesto a tiempos largos del tratamiento, perdió la estructura tridimensional, presentó daño celular y desintegración de la matriz. Además, por medio de la técnica FTIR, se encontraron cambios secuenciales en la composición química del biofilm al ser tratado con plasma. Se observó que el tratamiento produce agregación o desnaturalización de las proteínas del biofilm y formación de dímeros de timina que conducen a daños en el ADN, principalmente a los 30 min de exposición. Además, se encontró que el daño en los polisacáridos de la matriz ocurre en los primeros minutos de tratamiento. El principal daño se observó en el Psl de matriz, lo que sugiere que se podrían estar desestabilizando las fibras eDNA-Psl que recubren y protegen las células. Estos resultados demuestran que la erradicación del biofilm por la exposición al plasma está relacionada con la disminución de la cantidad, cambio en la composición química y pérdida de estructura de la matriz.

En el **Capítulo 5** se caracterizó la fuente de plasma DBD utilizada para la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa*. Por medio de técnicas de OES se encontró la presencia de bandas de  $N_2$  excitadas y de iones de  $N_2^+$  y la formación de  $O_3$ ,  $H_2O_2$  y  $NO_3^-$  en el gas efluente del plasma. La erradicación eficiente y rápida de los biofilms de *P. aeruginosa* por el tratamiento con nuestro dispositivo de plasma se podría atribuir a los iones y a estas RONS, ya que están asociadas al estrés oxidativo en las células bacterianas y al daño de lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos.

También hay que tener en cuenta los mecanismos físicos de erradicación microbiana por plasma, como la alteración electrostática y la electroporación. Los iones  $N_2^+$  encontrados en nuestra descarga podrían estar aumentando la fuerza electrostática y alteando la membrana celular, ya que las estructuras rígidas de la pared bacteriana se destruyen electrostáticamente debido a la repulsión mutua de los iones retenidos en la superficie celular. Además, el campo eléctrico al que se someten los microorganismos durante el tratamiento con plasma podría generar la formación de poros en la membrana y la filtración del contenido celular y finalmente conducir a la muerte del microorganismo.

Ya que en el **Capítulo 4** se mostró que el plasma afecta la matriz del biofilm, se planteó la posibilidad de aumentar la penetración de un antibiótico luego del tratamiento del biofilm con plasma. En el **Capítulo 6** se evaluó el efecto combinado del tratamiento con plasma DBD y ciprofloxacina libre y nanovehiculizada para la erradicación de biofilms de *P. aeruginosa*. El tratamiento con plasma resultó en una reducción de la CIM para ciprofloxacina libre; sin embargo, no se observó una clara sinergia entre el plasma y el antimicrobiano nanovehiculizado. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el efecto del plasma sobre la matriz del biofilm aumenta la penetración del antibiótico y por lo tanto mejora su eficacia de acción.

En virtud de los resultados presentados, se propone un modelo en el cual las especies reactivas del plasma junto con la radiación UV podrían estar degradando la matriz desde tiempos cortos de exposición a medida que penetran a través de las EPS, dejando las células vulnerables al tratamiento. Estas células sufrirían cambios morfológicos y fisiológicos secuenciales, perdiendo en primera instancia la cultivabilidad aunque no la virulencia, para finalmente sucumbir al tratamiento.

Dada la importante contribución de la radiación UV, su relación con los daños directos sobre el ADN y teniendo en cuenta su poco poder de penetración, se propone que esta radiación afectaría las células superficiales del biofilm y también el eDNA que lo recubre y protege, desestabilizando o degradando las redes eDNA-Psl de la matriz y abriendo el camino para la posterior acción de las RONS y los iones del plasma.

Las RONS y los iones del plasma inducen la oxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas tanto en la matriz como dentro de la célula. La oxidación de los componentes de la matriz lleva a la degradación y desestructuración de la misma, dando paso a las RONS y a los iones a actuar directamente sobre las células. En los primeros minutos de tratamiento, hay una degradación del polisacárido Psl de la matriz, que se evidencia por la liberación de las subunidades de ramnosa, manosa y glucosa que lo componen; lo que además, podría estar desestabilizando las fibras de eDNA-Psl que protegen las células. Posteriormente, la oxidación de las proteínas modifica su estructura secundaria, las láminas  $\beta$  paralelas

cambian a giros  $\beta$  y láminas  $\beta$  antiparalelas, produciendo una estructura estable “súper-secundaria” que se repite regularmente y que está relacionada con su desnaturalización. Esta oxidación podría producir cambios estructurales que desestabilicen la matriz y la membrana celular, y/o funcionales que alteren el metabolismo de la célula. Además, las RONS al igual que la radiación UV, inducen daños en el ADN y formación de dímeros de timina. El  $O_3$  y el  $H_2O_2$  podrían iniciar la peroxidación lipídica y desencadenar una reacción destructiva en cadena al generar radicales lipídicos. La peroxidación de lípidos compromete la integridad estructural de la membrana celular, genera un desequilibrio osmótico y da lugar a la lisis celular.

En conclusión, se plantea un mecanismo de erradicación del biofilm de *P. aeruginosa* por plasma en el que, en primera instancia, ocurre una alteración de la matriz del biofilm que se traduce en una reducción del espesor de la misma y en cambios químicos debidos al efecto conjunto de la radiación UV, los RONS y los iones del plasma. Esta alteración en la matriz se iniciaría con la degradación de los exopolisacáridos, como el Psl, y posteriormente, con la oxidación de las demás macromoléculas de la matriz, formándose dímeros de timina en el ADN y presentándose cambios en la estructura secundaria de las proteínas. Finalmente, el tratamiento con plasma actuaría directamente sobre las células, provocando la lisis celular debida el estrés oxidativo, la alteración electrostática y la electroporación; llevando a la pérdida de la viabilidad celular. La cinética de inactivación de doble pendiente refleja la primera fase rápida de destrucción superficial del biofilm, seguida de una fase más lenta de la erradicación de las capas internas celulares. Como respuesta al tratamiento con plasma, las células del biofilm podrían entrar en el estado de VBNC o producir esferoplastos, entonces seguirían viables y virulentas pero no cultivables. Por lo cual, la erradicación total del biofilm se presentaría a tiempos más largos de exposición al plasma.