



Raport/Studiu

Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Gabriela Tănăsie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Conf. Dr. Carmen Tatu, Doctorand Alina-Georgiana Simina

Data finalizării: 15.11.2020

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Introducere

Bacteriile rezistente la antibiotice nu numai că afectează sănătatea umană, dar amenință și siguranța pacienților din spitale și comunități. Cu toate acestea, apariția bacteriilor rezistente la medicamente este inevitabilă datorită selecției evolutive dar și ca o consecință a utilizării nediscriminatorii a antibioticelor. La bacteriile patogene, rezistența la antibiotice este în continuă creștere față de majoritatea antibioticelor utilizate în prezent, astfel, constituind o amenințare gravă pentru sănătatea umană. Preocupările crescând față de rezistența multiplă la medicamente au alarmat comunitatea științifică internațională. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în raportul global privind rezistența la antibiotice publicat în 2014 preciza că: „Această amenințare gravă nu mai este o previziune pentru viitor, se întâmplă chiar acum în fiecare regiune a lumii și are potențialul de a afecta pe oricine, de orice vârstă, în orice țară”. Problema rezistenței la antibiotice este amplificată în continuare prin transferul orizontal al genelor de rezistență în rândul populațiilor microbiene. În consecință, nu este amenințată numai sănătatea umană, ci se poate provoca și o criză de mediu. De exemplu, contaminarea ecosistemelor acvatice și a rezervoarele de apă cu antibiotice determină apariția multirezistentei la antibiotice la un nivel alarmant și are ca rezultat direct creșterea ratelor de infecție.

Prin urmare, este necesară dezvoltarea de noi strategii prin care bacteriile patogene ar putea fi eliminate. Controlul microorganismelor este esențial pentru a preveni transmiterea bolilor și infecțiilor și pentru a preveni contaminarea microbiană nedorită. Microorganismele sunt controlate prin intermediul agenților fizici și al agenților chimici. Agenții fizici includ metode de control, cum ar fi temperatura ridicată sau scăzută, desicarea, radiațiile, presiunea osmotică, filtrarea. Controlul prin agenți chimici se referă la utilizarea de dezinfectanți, antiseptice, antibiotice și substanțe chimice antimicrobiene chimioterapeutice. Activitatea bacteriilor este influențată de un complex de factori fizici, chimici și biologici. Rezultatul acțiunii acestor factori este legat de intensitatea acestora, de timpul de expunere a celulei bacteriene, mediul în care activează, structura celulei dar și sensibilitatea ei la unul sau mai mulți factori.

2. Acțiunea agenților fizici asupra bacteriilor

1. Temperatura

Speciile microbiene au, aproape fiecare dintre ele, o temperatură zisă “optimă” la care își desfășoară activitatea normală și anumite limite sub care și peste care dezvoltarea lor este stănjinită. Astfel, din punct de vedere al temperaturii optime bacteriile se clasifică în următoarele categorii (Setlow P., 2006):

- mezofile – specii patogene sau condiționat patogene adaptate la o temperatură optimă de 37-38°C, temperatura corpului uman, cu limite între 25-34°C/ 10-45°C;

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

- psihrofile (criofile) – care cuprind microorganismele a caror temperatura optima este între 15-20°C cu limite între 0 și 20°C/ 0-35°C;
- termofile – includ bacteriile de putrefacție a gunoaielor a caror temperatura optima este între 50-53°C cu limitele între 50-80°C (85°C - bacteriile din gheizere).

Temperatura ridicata – dincolo de limita superioara este nociva, ducand la dezorganizarea reactiilor metabolice prin coagularea proteinelor (teoria denaturarii si coagularii proteinelor) sau prin acumularea de produși toxici rezultati in urma proceselor biochimice (teoria intoxicatiei). Exista diferente între modul de actiune a caldurii uscate si a caldurii umede (Podolak R. Et. al., 2010). In practica medicala, caldura este folosita in procesul de sterilizare a instrumentarului medical si a materialelor folosite in diagnosticul de laborator. Sterilizarea se efectueaza prin caldura uscata (flambare si pupinel) si caldura umeda (fierbere, autoclavare si pasteurizare).

- a) Caldura uscata patrunde mai greu prin peretele celulei bacteriene, spre deosebire de caldura umeda. Caldura uscata este mai putin eficienta necesitand pentru a distruge bacilul Clostridium temperatura de 140°C si un timp de expunere între 5-15 minute iar pentru Bacillus anthracis temperatura de 180°C cu expunere 60 minute. Căldura uscată ucide microorganismele printr-un proces de oxidare a proteinelor, mai degrabă decât prin coagularea proteinelor. Exemple de sterilizare prin căldură uscată includ (Setlow P., 2006; Podolak R. Et. al., 2010):
- Sterilizare cu aer cald - se utilizează temperaturi uscate foarte ridicate: 171°C timp de 1 oră; 160°C timp de 2 ore sau mai mult; sau 121°C timp de 16 ore sau mai mult, în funcție de volum. În general, acestea sunt utilizate numai pentru sterilizarea obiectelor din sticlă, a instrumentelor metalice și a altor materiale inerte, cum ar fi uleiurile și pulberile care nu sunt deteriorate de temperatura excesivă.
 - Incinerarea - Incineratoarele sunt folosite pentru a distruge materialele de unică folosință sau consumabile prin ardere.
- b) Caldura umeda patrunde mai usor, datorita inmuierii peretelui celulelor si cresterii permeabilitatii acestuia. Caldura umeda are efect bactericid asupra formelor vegetative expuse la 100°C timp 2-3' sau la 60°C timp de 1 ora. Sporii bacterieni sunt distrusi prin autoclavare in 15' la 121°C si la o presiune variind între 1,5 atm – 2 atm. Autoclavarea folosește deci abur sub presiune. In mod normal apa fierbe la 100 °C dar când este pusa sub presiune, temperatura de fierbere se ridica la 121°C, suficientă pentru a distruge endosporii bacterieni. Acelasi procedeu al autoclavarii se utilizeaza si pentru distrugerea virusurilor hepatitei care pot supraviețui expunerii la apă clocotită până la 30 de minute, iar endosporii anumitor specii de Clostridium și Bacillus pot supraviețui chiar și ore de fierbere (Jin-Hong Yoo, 2018).
- c) Pasteurizare este încălzirea ușoară a laptelui și a altor materiale pentru a distruge anumite microorganisme sau agenți patogeni. Cu toate acestea, nu ucide toate microorganismele. Laptele este de obicei pasteurizat prin încălzire la 71,6°C timp de cel puțin 15 secunde prin metoda flash sau 62,9°C timp de 30 de minute prin metoda de menținere.

Temperatura scazuta - in general, inhibă creșterea microbiană prin încetinirea metabolismului microbial, bacteriile la temperaturi scazute nu se mai multiplica si intra in viata latentă (Paluch E. Et. al., 2020). Exceptie fac meningococul si gonococul. Frigul inaintat, sub minus 5-10°C, conserva proprietatile biologice mai eficient decat temperatura de 0°C sau - 10°C. Congelarea lenta distruge bacteriile in mai mare masura decat una

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

brusca, deoarece în primul caz se formează cristale de gheață, care rup structurile celulare și se produce hiperconcentrarea salină cu denaturarea stării coloidale a proteinelor. Nocivă pentru microbi este congelarea și decongelarea repetată. Frigul își găsește aplicațiile în conservarea alimentelor, a unor medicamente și tulpinilor microbiene de laborator (culturi bacteriene de referință).

Numeroase studii și-au propus urmărirea efectului variațiilor de temperatură asupra unor culturi microbiene. Astfel, Cebrian și colaboratorii au studiat influența temperaturii de cultivare asupra rezistenței *E. coli* la 3 agenți diferiți: căldură, câmp electric cu impulsuri și peroxid de hidrogen. *E. coli* a fost cultivat într-o fază staționară la o temperatură de 10°C, 20°C, 30°C, 37°C și 42°C. Rezultatele obținute au arătat o influență a temperaturii de cultivare în funcție de tipul de stres aplicat (Fig 1). Celule supuse unei temperaturi de cultivare ridicate au fost rezistente și la căldură dar au fost mult mai sensibile la câmpul electric cu impulsuri și peroxidul de hidrogen, iar celulele care au fost cultivate la o temperatură de 10°C și 20°C au fost mult mai rezistente la câmpul electric cu impulsuri și peroxidul de hidrogen.

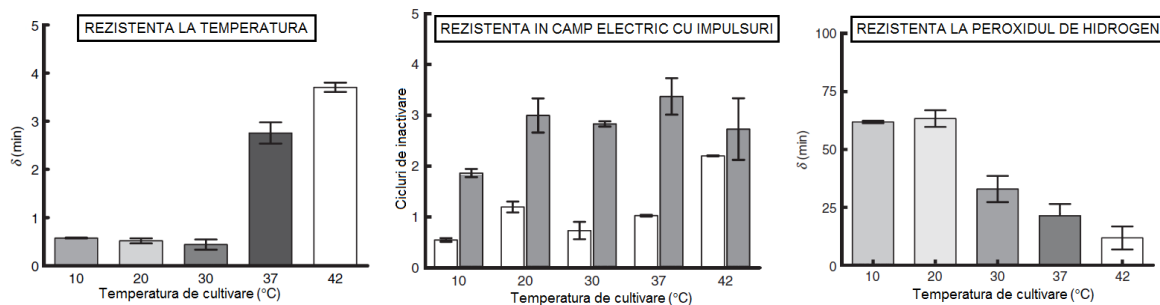


Fig. 1 Rezistența la cei trei agenți a celulelor *Escherichia coli* crescute la 10°C, 20°C, 30°C, 37°C și 42°C.

Rezultatele obținute în cadrul acestei investigații susțin opinia că cei trei agenți studiați acționează prin diferite mecanisme, din cauza cineticii diferite a inactivării observate. În ciuda diferențelor dintre modul de acțiune a celor trei agenți studiați, toate implică membrana la un moment dat, care este o structură esențială în supraviețuirea bacteriană la stresul mediului. Astfel, se pare că celulele cu membrane mai fluide, adică acelea cultivate la 10°C, ar fi mai sensibile la acțiunea căldurii, dar mai rezistente la formarea de pori în câmp electric cu impulsuri și la penetrarea peroxidului de hidrogen în citoplasmă.

Studiul va trebui să continue pentru a clarifica mecanismele de acțiune ale fiecărui agent și în plus trebuie luat în considerare rolul altor structuri celulare care ar putea fi implicate în rezistență, respectiv distrugerea celulei. În concluzie, celulele mai tolerante la căldură nu au fost în același timp rezistente și la stresul oxidativ și la tratamentele în câmp electric cu impulsuri.

2. Desicarea (uscaciunea)

Desicarea sau uscarea are în general un efect static asupra microorganismelor pentru că lipsa apei inhibă acțiunea enzimelor microbiene. Alimentele deshidratate și liofilizate, de exemplu, nu necesită refrigerare deoarece absența apei inhibă creșterea microbiană.

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

Sensibilitatea bacteriilor la deshidratare difera în raport cu specia și chiar tulpina. Microorganismele ca meningococii, gonococii, treponemele, leptospirele sunt foarte sensibile. Bacilii tuberculozei, stafilococii rămân viabili perioade îndelungate de timp. Temperatura scăzută, mediul proteic și lipsa oxigenului protejează considerabil microbii față de efectele nocive ale deshidratării. Pe aceste principii se bazează liofilizarea (criodesicarea). Metoda constă în congelarea suspensiei microbiene în mediu protector, uscarea în vid și păstrarea în fiole închise cu gaz inert. Prin liofilizare se conservă vaccinurile și tulpinile microbiene de referință.

3. Radiatiile

Radiatiile acționează asupra bacteriilor prin mecanisme diverse: producerea de peroxizi în mediu cu efect bactericid (radiatiile ionizante: X, α , β , γ) și prin efect direct asupra acizilor nucleici celulari (radiatiile solare, ultraviolete).

Radiatiile ionizante (X, α , β , γ , neutroni) au acțiune bactericida puternică, fiind purtătoare ale unor energii mai înalte. Ele produc denaturarea proteinelor și acizilor nucleici celulari prin inactivarea ribozomilor, ruperea lanțurilor de acizi nucleici, se produce inactivarea acțiunii enzimelor datorită formării de radicali liberi (OH, H) în apa mediului, formarea de peroxizi (R-O-O-R) ce acționează ca agenți oxidanți. În doze mici pot produce mutații bacteriene (radiatii X) cu modificări morfologice și patogenitate. Se utilizează pentru sterilizarea instrumentelor medicale, medicamentelor, alimentelor.

Radiatiile ultraviolete

Porțiunea ultravioletă a spectrului de lumină include toate radiațiile cu lungimi de undă de la 100 nm la 400 nm. Are o lungime de undă scăzută și energie redusă. Activitatea bactericidă a luminii ultraviolete (UV) depinde de durata expunerii (cu cât expunerea este mai lungă, cu atât este mai mare activitatea bactericidă) și de lungimea de undă a razelor UV utilizate (intervalul 260 nm - 270 nm este puternic bactericid pentru că acționează prin absorbție selectivă la nivelul acizilor nucleici) (Podolak R. Et. al., 2010).

Mecanismul prin care radiatiile UV distrug bacteriile: Lumina UV este absorbită de ADN-ul microbial și face ca bazele adiacente de timină de pe aceeași catenă de ADN să se lege covalent între ele, formând ceea ce se numește dimeri timină-timină. Pe măsură ce ADN-ul se replică, nucleotidele nu sunt perechi de baze complementare cu dimerii timinei și acest lucru pune capăt replicării acelei catene de ADN (Fig 2).

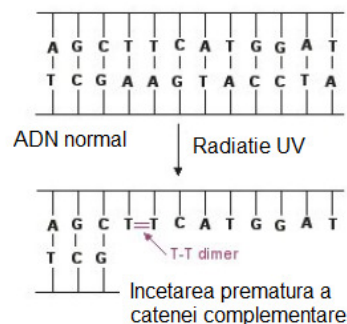


Fig. 2 Incetarea replicării ADN

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

Majoritatea daunelor cauzate de radiațiile UV provin din faptul din celula încearcă să repare daunele ADN-ului prin procesul numit „reparare SOS”. În ADN-ul foarte puternic care conține un număr mare de dimeri timinici, procesul reparare SOS este activat ca un ultim efort de aducere a ADN-ului la normal se sintetizează un ADN care conține multe baze încorporate greșit. Cu alte cuvinte, radiațiile UV provoacă mutații și pot duce la sinteza defectuoasă a proteinelor. Cu o mutație suficientă, metabolismul bacterian este blocat și organismul moare. Agenții precum radiațiile UV care provoacă rate mari de mutație sunt numiți agenți mutageni. Radiațiile se utilizează la sterilizarea încăperilor, boxelor, materialelor plastice, medicamentelor.

Printre studiile care au utilizat radiații pentru creșterea eficienței antibacteriene, se numără și cel realizat de către Chen și colaboratorii în anul 2020. Aceștia au utilizat 2 tulpini de *E. coli* multi-rezistente care au fost izolate din probe de urină recoltate în cadrul laboratorului clinic și acestor tulpini le-a fost testată susceptibilitatea la antibiotic. Prima tulpină denumită MDR-1 prezenta rezistență la penicilină (ampicilină - AMP), tetraciclină (tetraciclină - TETRA), chinolina (acidul nalidixic (nalixid)) și aminoglicozide (streptomycină - STR), iar a doua tulpină izolată numită MDR-2 prezenta și ea rezistență la penicilină (ampicilină - AMP), tetraciclină (tetraciclină - TETRA), chinolina (acidul nalidixic (nalixid)) dar și la alte aminoglicozide (spectinomycină, gentamicină), cloramfenicol. Cultura bacteriană de *E. coli* MDR-2 lăsată peste noapte a fost resuspendată în bulion LB proaspăt având o concentrație finală de 10^7 - 10^8 CFU ml⁻¹. Un volum de 10 % nanocompozite (oxid de grafen prescurtat GO, argint suportat pe oxid de grafen prescurtat GO-Ag) sau apă (în cazul controlului) a fost adăugat în bulionul LB astfel încât concentrația finală a nanocompozitelor GO, GO-Ag să fie 3, respectiv 7 μg ml⁻¹. Înainte de a fi supus iradierii cu rază laser (lungime de undă 808 nm), bulionul a fost supus agitării timp de o oră la o temperatură de 37°C. Pe perioada iradierii, temperatura a fost măsurată cu o cameră termică, timpul de iradiere fiind de 7 minute.

Câteva aspecte ale experimentului realizat de acești cercetători sunt ilustrate în figurile 3, și 4.

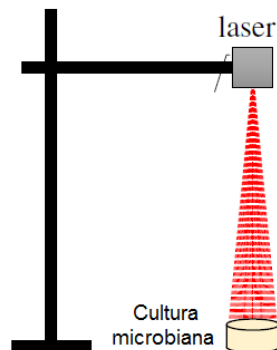


Fig. 3 – Modul de aplicare a iradierii bacteriene după iradiere

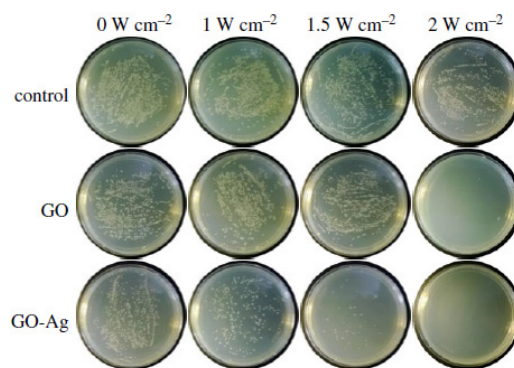


Fig. 4 – Aspectul coloniilor

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

Proba mixtă tratată a fost cultivată timp de 6 ore înainte de a fi evaluată viabilitatea bacteriană. Printre numeroasele utilizări ale nanocompozitului GO-Ag, autorii au raportat pentru prima oară utilizarea acestuia într-o combinație cu terapia foto-termală. În urma rezultatelor obținute s-a constatat o creștere a eficienței antibacteriene datorită nanoparticulelor de argint care inhibă creșterea bacteriană în timp ce foiele de oxid de grafen absorb lumina de NIR (near - infrared spectroscopy=spectroscopia în infraroșu de aproape) și generează căldură. Concluzia acestui studiu este una promitoare în ceea ce privește utilitatea clinică. Comparativ cu AgNP utilizat pe scară largă, nanocompozitul GO-Ag a prezentat o eficiență antibacteriană mult mai bună la *E. coli* multirezistent izolat clinic. Mai mult, tratamentul fototermic ar putea fi combinat pentru a scădea doza de antibiotice și în acest fel *E. coli* multirezistent ar fi omorât complet cu citotoxicitate redusă. Imaginile în imunofluorescență făcute pentru a vizualiza rezultatele au arătat că integritatea bacteriilor a fost compromisă după tratament cu GO-Ag. Având în vedere performanța antibacteriană excelentă a nanocompozitelor GO-Ag împotriva bacteriilor *E. coli* multirezistente răspândite pe scară largă, acestea ar putea fi utilizate împreună cu antibacterienele uzuale în viitoare aplicații medicale.

Efectul radiației electromagnetice cu interval vizibil asupra probelor de *E. coli* a fost studiat de către Azeemi și colaboratorii (2017) pentru a putea găsi doza potrivită care ar putea fi folosită în tratamentul bolilor cauzate de *E. coli*. Tulpina a fost izolată din probe de urină obținute de la pacienți internați cu Infecție a Tractului Urinar (ITU). Prezența *E. coli* în probele obținute a fost identificată prin metode standarde de laborator realizându-se o caracterizare morfologică dar și teste biochimice. O singură colonie de *E. coli* a fost inoculată în 3 ml de bulion de liză. Din suspensia obținută, 40 μl au fost transferați în tuburi urmând a fi supuși radiațiilor de diferite lungimi de undă din spectrul vizibil (Fig. 5) pentru 18 ore, după iradiere probele au fost păstrate într-un incubator cu agitare la o temperatură de 37°C.

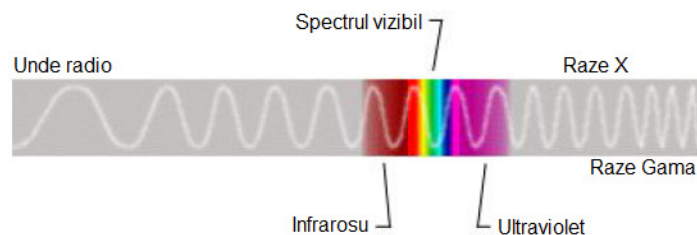


Fig. 5 Spectrul vizibil - radiațiile electromagnetice

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul IBM SPSS, versiunea 20. Un coeficient de corelare Pearson a fost utilizat pentru a evalua relația dintre densitățile optice ale probelor iradiate și numărul de colonii, obținându-se o corelare pozitivă, puternică între cele 2 variabile. Rezultatele obținute au arătat un răspuns diferit al culturii *E. coli* la cele 6 unde, cel mai profund efect de inhibare a fost la 538 nm caracteristic culorii verzi care s-a dovedit a fi bactericid în contrast cu lungimea de undă 453 nm caracteristic culorii albastre, proba iradiată la această lungime de undă înregistrând cel mai mare număr de colonii (Fig. 6).

Astfel, se poate concluziona că radiațiile din regiunea vizibilă, adică 538 nm (verde), 590 nm (galben) pot fi efectiv utilizate pentru tratarea bolilor transmise de *E. coli*. Efectele radiațiilor vizibile pe *E. coli* arată în mod clar că diferite lungimi de undă au afectat *E. coli* diferit. Toate aceste rezultate indică faptul că unele modificări genetice duc la comportamente morfologice particulare.

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

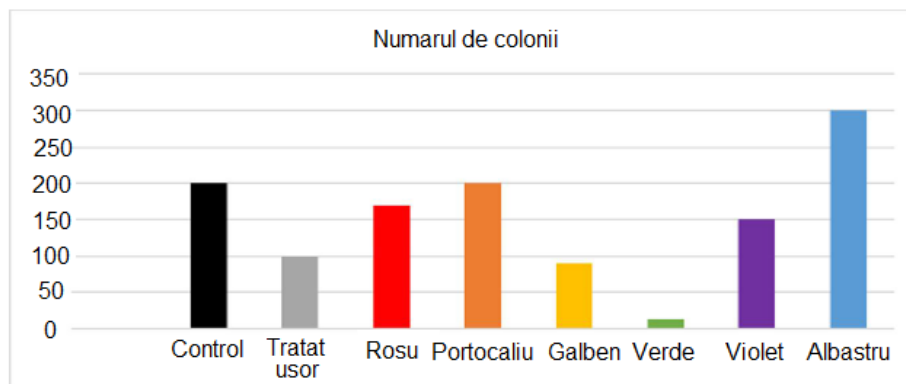


Fig. 6 Numărul de colonii măsurate pentru fiecare probă iradiată + control

Efectul direct și determinarea parametrilor optimi de acțiune a LED (radiații albastru-roșu și roșu-infraroșu) asupra sensibilității la antibiotice a izolatelor clinice *Staphylococcus aureus* și a tulpinii testate de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a fost studiată de către Pantyo și colaboratorii în anul 2019. Acești cercetători au realizat un experiment în care timpul de expunere la radiații a culturilor studiate a variat de la 5 la 25 de minute cu un interval de 5 minute iar frecvența radiațiilor a fost de 0 Hz; 10 Hz; 600 Hz; 3000 Hz; 8000 Hz (Fig 7). Rezultatele cercetărilor au pus în evidență o creștere a sensibilității microorganismului la câteva dintre antibioticele testate. Bazându-se pe datele obținute, cercetătorii implicați în studiu au dezvoltat un algoritm și recomandări clinice pentru folosirea acestui tip de radiații în cadrul unor terapii complexe care sunt implicate în tratamentul bolilor inflamatorii (Pantyo VV. et. al., 2019).



Fig. 7 - Expunerea microorganismelor la radiații LED (MEDOLIGHT Roșu și Dispozitive MEDOLIGHT BluDoc) în cutii Petri cu mediu nutritiv (Pantyo și colab., 2019)

În figura 8 sunt prezentate comparativ 2 plăci de cultură cu *Staphylococcus aureus* la care s-a realizat antibiograma, placa 1 reprezintă placa control iar placa 2 a fost iradiată LED cu ajutorul dispozitivului Medolight Red timp de 5 minute la o frecvență de 0 Hz. Se remarcă cu ușurință creșterea diametrelor de inhibiție la majoritatea antibioticelor testate.

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

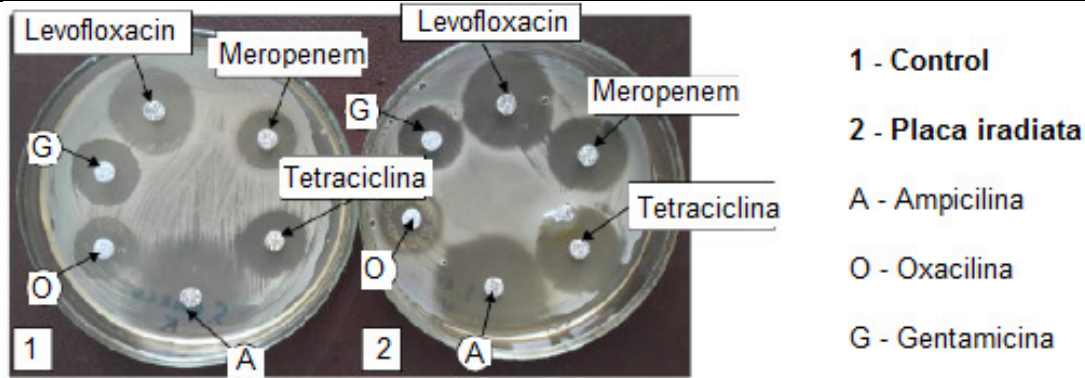


Fig. 8 - Impactul iradierii LED cu dispozitivul Medolight Red asupra sensibilității tulpinii *S. aureus* la antibiotice, expunere 5 min, frecvența 0 Hz (Pantyo și colab., 2019)

Concluzia acestui studiu este aceea că gradul de influență al radiatiilor aplicate depinde de lungimea undei, durata și frecvența impulsurilor de radiații - cea mai pronunțată creștere a sensibilității a fost observată la expunerea de 5 minute la frecvența de 0 Hz (radiație continuă).

Abdulamer și Maki au analizat efectul inactivării foto-dinamice asupra tulpinii de *Staphylococcus aureus* rezistentă la meticilină folosind 2 lasere diferite: așa numitul DPSSL (diode de pompare cu laser în stare solidă) la o lungime de undă de 532 nm combinat cu un colorant (Safranin O) și Dioda Laser cu o lungime de undă de 650 nm combinat cu albastru de metil (Abdulameer FH, Maki MA, 2017). 100 de probe provenite de la pacienți cu arsuri și plăgi infectate internați în 2 spitale din Bagdad au fost supuse testului susceptibilității antimicrobiene folosind metoda Kirby-Bauer. Probele au fost împărțite în 4 categorii: o categorie de control, o categorie axată pe reacția de fotosensibilizare, o categorie supusă iradierii și o categorie în care s-a combinat reacția de fotosensibilizare cu iradierea probelor. Rezultatele obținute de cercetători au arătat eficiența laserului DPSSL, înregistrându-se un număr redus de celule. În ceea ce privește timpul de expunere, a fost necesar 3 minute în cazul laserului DPSSL față de 11 minute înregistrat în cazul utilizării Dioda Laser, concluzia cercetătorilor fiind utilizarea inactivării foto-dinamice ca metodă alternativă în tratarea plăgilor infectate și a arsurilor superficiale.

Cercetătorii conduși de Chaurasia A (2016) propun în urma rezultatelor obținute un nou tratament bazat pe acțiunea nanoparticulelor magnetice împotriva bacteriilor patogene, care blochează formarea biofilmului și ucid bacteriile. În această abordare, tulpina de *Staphylococcus aureus* rezistentă la mai multe antibiotice (USA300) dar și *Escherichia coli* CFT073 uropatogenă sunt "prinse" în nanoparticulele magnetice încărcate pozitiv (MCSNP) prin interacțiune electrostatică ducând la uciderea completă în decurs de 30 de minute a acestora din cauza pierderii potențialului de membrană atunci când proba este expusă unui curent de radiofrecvență.

Rezultatele obținute demonstrează eficiența metodei, aceasta putând fi utilizată ca și strategie alternativă antibacteriană fără să conducă însă la o rezistență antibacteriană putând fi folosită cu succes în aplicații terapeutice. În cadrul acestui experiment, tulpini de *Escherichia coli* (*E. coli* DH5 α și *E. coli* CFT073, UPEC) au fost cultivate în mediu de bulion Luria Bertani (LB) sau plăci LB-agar (1,5% agar) la 37°C. Culturile de bulion au fost crescute sub agitare orbitală la 200 rpm, în timp ce tulpinile de pe plăci au fost crescute

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

Într-un incubator la 37°C peste noapte. Tulpinile de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină (MRSA) au fost cultivate în tryptic soy broth (TSB) sau pe mediul brain-heart infusion (BHI) sub agitare orbitală la 200 rpm sau pe tryptic soy plăci cu agar (TSA, 1,5% agar) la 37°C. Creșterea celulei a fost monitorizată prin măsurarea densității optice la 600 nm (OD600). Cantități adecvate de antibiotice, cum ar fi ampicilina (Amp, 100 μg/mL), kanamicină (Km, 50 μg/mL), cloramfenicol (Cm, 33 μg/mL) sau streptomycină (Sm, 50 μg/mL) au fost adăugate la culturile de *E. coli* recombinant. Pentru culturi TSB și plăci TSA, s-au folosit 12,5 și respectiv 25 μg/ml cloramfenicol pentru cultivarea tulpinii recombinante *S. aureus* USA300 FPR3757 care exprimă stabil genele luxBADCE (MRSA) integrate în genom. În scopul captării bacteriilor și a vizualiza ulterior bacteriile din complexul MCSNP folosind un câmp magnetic extern, cercetătorii au dezvoltat un miez paramagnetic de oxid de fier acoperit cu un înveliș din siliciu. Motivele utilizării MCSNP (magnetic core-shell nanoparticles) sunt următoarele:

- previne aglomerarea nucleului de fier NP;
- acționează ca barieră fizică la interfața nano-bio pentru a preveni reducerea biologică a Fe (III) la Fe (II) folosind NADPH, reducând astfel generarea ROS de către Fenton, reacții de tip Fenton și / sau Haber-Weiss;
- previne internalizarea pasivă a NP de către bacterii prin mărirea dimensiunii (> 40nm);
- oferă o suprafață de interacțiune omogenă pentru celula bacteriană încărcată negativ.

Grupul condus de Chaurasia propune un model care să explice perturbările membranei microbiene în urma aplicării tratamentului cu nanoparticule magnetice expuse la radiofrecvență (RMT) și care este schematizat în figura 9. Modificările care apar duc la moartea celulei bacteriene.

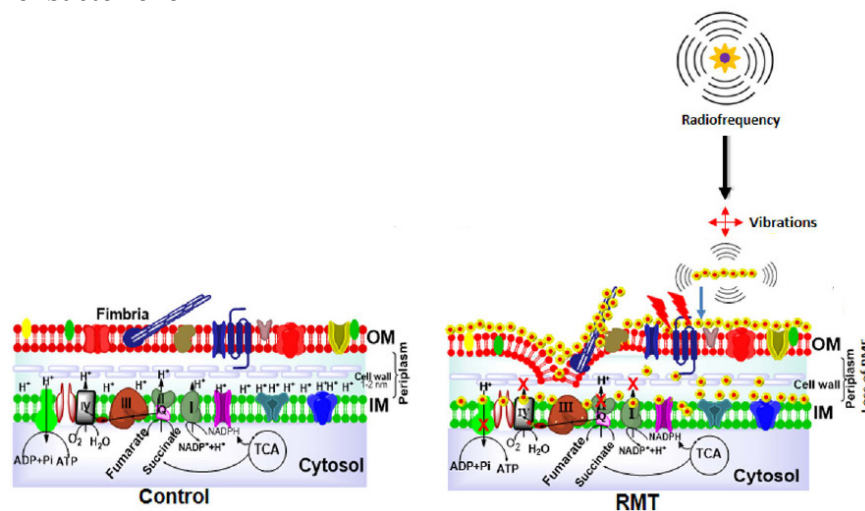


Fig. 9 – Perturbarea membranei în urma acțiunii RMT (Chaurasia A. Et. al., 2016)

Aceste rezultate indică faptul că tratamentul fizic bazat pe MCSNP (magnetic core-shell nanoparticles) poate fi o strategie antibacteriană alternativă fără a duce la rezistență la antibiotice și poate fi utilizat în mai multe scopuri, atât în aplicații terapeutice cât și pentru mediu.

4. Ultrasunetele

Ultrasunetele sunt vibrații cu frecvența mai mare decât cea a undelor sonore (peste 16.000 Hz). Ele se obțin cu ajutorul cristalelor piezoelectrice. Ultrasunetele au un puternic efect bactericid, producând relativ rapid distrucția celulei bacteriene. De altfel, una dintre cele mai eficiente metode de dezintegrare a corpilor microbieni - etapa preliminară analizei chimice a bacteriilor în laborator - este ultrasunerea suspensiei bacteriene. Unda ultrasonica, la trecerea prin apă extra și intracelulară, determină o mișcare intensă a protoplastului cu dezagregarea structurilor celulare (spargerea peretelui celular). Se utilizează la dezinfectia și curățirea instrumentarului stomatologic, chirurgical, la analize chimice determinând separarea enzimelor celulare.

5. Presiunea osmotica

Microorganismele, în mediul lor natural, se confruntă în mod constant cu modificări ale presiunii osmotice. Apa tinde să curgă prin membrane semipermeabile, cum ar fi membrana citoplasmatică a microorganismelor, către partea cu o concentrație mai mare de materiale dizolvate. Cu alte cuvinte, apa trece de la o concentrație mai mare de apă la o concentrație mai mică de apă. Dacă concentrația de substanțe dizolvate este mai mare în interiorul celulei decât în exterior, celula se află într-un mediu hipotonic, fapt care atrage intrarea apei în celulă, dar peretele celular rigide al bacteriilor și ciupercilor, totuși, previn explozia acestora sau plasmoptizia.

Când concentrațiile substanțelor dizolvate sunt aceleași atât în interiorul cât și în exteriorul celulei, se spune că celula se află într-un mediu izotonic. Apa trece în mod egal în și din celulă. Mediile hipotonice și izotonice nu sunt de obicei dăunătoare microorganismelor. Cu toate acestea, dacă concentrația materialelor dizolvate este mai mare în afara celulei decât în interior, atunci celula se află într-un mediu hipertonic. În această condiție, apa iese din celulă, rezultând contracția membranei citoplasmatică sau plasmoliza. În astfel de condiții, celula se deshidratează și creșterea sa este inhibată. Celulele vegetative tinere sunt mai sensibile decât sporii.

6. Electricitatea

Electricitatea are acțiuni minore asupra bacteriilor, dar poate produce modificări ale mediului (fizico-chimice) cu efecte secundare bactericide: creșterea temperaturii, eliberarea clorului din compuși, formarea de ozon.

7. Filtrarea

Filtrarea se realizează prin trecerea unui fluid printr-un corp poros (filtru). În funcție de diametrul porilor, filtrarea poate fi clarifiantă sau sterilizantă. Filtrele cu membrană microbiologică oferă o modalitate utilă de sterilizare a materialelor, cum ar fi vaccinurile, soluțiile de antibiotice, serurile de animale, soluțiile de enzime, soluțiile de vitamine și alte soluții care pot fi deteriorate sau denaturate de temperaturi ridicate sau agenți chimici.

R. 2.5.3 Utilizarea agenților fizici pentru elaborarea unor noi strategii antimicrobiene

Filtrele conțin pori suficient de mici pentru a preveni trecerea microbilor, dar suficient de mari pentru a permite trecerea fluidului fără organism. Lichidul este apoi colectat într-un balon steril.

Filtrele cu diametrul porilor de la 25 nm la 0,45 μm sunt de obicei utilizate în această procedură. O membrana cu porozitatea de 0,22 μm reține toate bacteriile. Filtrele pot fi folosite și pentru îndepărtarea microorganismelor din apă și aer pentru testarea microbiologică.

In concluzie, se impune dezvoltarea de noi strategii ca alternative ale tratamentului antibiotic sau asociate cu acesta, prin care bacteriile patogene sa poata fi anihilate cu usurinta.

Bibliografie

1. Abdulameer FH, Maki MA, Antibacterial Photodynamic Effect of 532 nm Diode-Pumped Solid State and 650 nm Diode Lasers on Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in *Vitro*, *Iraqi Journal of Laser*, 2017, Part B, Vol. 16, pp.21-26
2. Azeemi YTS, Shaukat FS, Azeemi SK, Khan I, Mahmood K, Naz F, Effect of visible range electromagnetic radiation on Escherichia coli. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14 (1): 24 – 31 doi:10.21010/ajtcam.v14i1.4
3. Cebrian G, Sagarzazu N, Pagan R, Condon S, Manas P, Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03745.x
4. Chaurasia A, Thorat N, Tandon A, Kim JH, Park HS., Kim KK, Coupling of radiofrequency with magnetic nanoparticles treatment as an alternative physical antibacterial strategy against multiple drug resistant bacteria, *Sci Rep*, 2016, 6, 33662 . <https://doi.org/10.1038/srep33662>
5. Chen Y, Wu W, Xu Z, Jiang C, Han S, Ruan J, Wang Y, Photothermal-assisted antibacterial application of graphene oxide-Ag nanocomposites against clinically isolated multi-drug resistant Escherichia coli, *R. Soc. Open Sci*, 2020, 7: 192019. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.192019>
6. Jin-Hong Yoo, Review of Disinfection and Sterilization – Back to the Basics, *Infect Chemother*, 2018; 50(2):101-109, doi.org/10.3947/ic.2018.50.2.101
7. Paluch E, Rewak-Soroczyńska J, Jedrusik I, Mazurkiewicz E, Jermakow K, Prevention of biofilm formation by quorum quenching, *J Appl Microbiol Biotechnol*, 2020; 104(5):1871-1881. doi: 10.1007/s00253-020-10349-w.
8. Pantyo VV, Pantyo VI, Gulyar SA, Koval GM, Danko EM, Influence of led radiation on the *Staphylococcus aureus* sensitivity to antibiotics, *Photobiol Photomed*, 2019, 26, 50–55. 10.26565/2076-0612-2019-26-07.
9. Podolak R, Enache E, Stone W, Black DG, Elliott PH, Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of Salmonella in low-moisture foods, *J Food Prot*, 2010; 73(10):1919-36. doi: 10.4315/0362-028x-73.10.1919.
10. Setlow P, Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals, *J Appl Microbiol*, 2006; 101(3):514-25. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x