

INSTITUTO/FACULTAD/UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata / Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas / Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA).

NÚCLEO DISCIPLINARIO/ COMITÉ ACADÉMICO: Ciencia e Ingeniería de los Materiales.

TÍTULO DEL TRABAJO: INFLUENCIA DE LA MICRO-NANO ESTRUCTURA SUPERFICIAL DEL SUSTRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MATERIAL POLIMÉRICO EXTRACELULAR Y LA DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS ADHERIDAS.

AUTORES: C. Díaz (*), M.C. Cortizo, P.L. Schilardi, S. Gómez de Saravia, y M. Fernández Lorenzo de Mele.

E-MAIL: (*) cdiaz@inifta.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES: Biopelícula, Material polimérico extracelular, Adhesión bacteriana, Micro/nanotopografía.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las reacciones biológicas no ocurren en solución sino en las interfases (Castner and Ratner 2002). Las interfases de interés médico e industrial incluyen la interacción bacteria/superficie metálica. Las células asociadas a una biopelícula se diferencian de aquellas en solución debido a la producción de material polimérico extracelular (MPE). Básicamente, las características más significativas y peligrosas de las biopelículas son su ubicuidad y notoria resistencia ante diversos agentes microbianos (Stewart et al. 2000).

La adherencia de bacterias a una superficie es proceso complejo, regulado por diversas características del medio de cultivo, el sustrato y la superficie de la célula. Las etapas iniciales en la formación de una biopelícula bacteriana parecen estar influenciadas por la movilidad de las células. Las microcolonias se desarrollan para formar una biopelícula con una arquitectura caracterizada típicamente por macrocolonias separadas por canales (Tolker, Nielsen, 2000). Se cree que estos canales transportan nutrientes y oxígeno a la bacteria y además ayuda en la remoción de los desechos (Costerton, 1995, Davey and O'Toole 2000). Las propiedades superficiales gobiernan significativamente los primeros pasos en los procesos de adherencia microbiana.

La rugosidad y la composición de la superficie del sustrato pueden ser modificadas a través de técnicas apropiadas de micro/nanofabricación para estudiar la influencia de estas propiedades sobre la adhesión bacteriana. Las técnicas de micro/nanofabricación le

permiten al investigador diseñar con control a nivel micro y nanométrico, la composición bioquímica y la topografía del sustrato (Mrksich, 2002, Caster and Ratner, 2002). El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de las características superficiales de diversos sustratos en la fijación de bacterias durante las etapas tempranas del desarrollo de las biopelículas bacterianas. Se utilizó para los ensayos, sustratos con distinta rugosidad, y también metales nanoestructurados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Bacterias y medios de cultivo.

Para determinar la respuesta de las bacterias ante diversos sustratos de interés, un consorcio de *Streptococcus* obtenido a partir de cavidades orales de varios pacientes con estado periodontal normal fue utilizado en las experiencias. Un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) aisladas de un ambiente industrial, también fue usado en los ensayos para investigar el efecto de la movilidad en la fijación microbiana. *P. fluorescens* fue mantenido en Cetrimide agar a 28 °C. El inóculo de *P. fluorescens* fue preparado suspendiendo un pico de flauta de agar Cetrimide (crecido durante 24 h) en 2 ml de medio nutritivo estéril. Luego, el inóculo fue vertido en un recipiente Erlenmeyer conteniendo 300 ml de caldo nutritivo como medio de cultivo y mantenido en un agitador rotatorio durante 3 h a 28° C.

Los microorganismos colectados de cavidades orales fueron obtenidos por raspado del área gingival y de superficies linguales y dentales y a lo largo de fisuras en reconstrucciones en superficies de oclusión de diversos pacientes. Cada muestra fue dispersada por sonicación durante 10 segundos en un medio de cultivo estéril. Cada dos meses fueron completamente reemplazados por nuevas muestras obtenidas a partir de los mismos pacientes. El consorcio fue cultivado en Mitis-Salivarius agar para aislar *Streptococcus mitis* y *S. Salivarius*. Los microorganismos aislados fueron mantenidos en Mitis-Salivarius modificado como medio de cultivo líquido como se describe en [Cortizo and

Fernández Lorenzo de Mele, 2003].

Después de 24 horas de crecimiento, se colocaron los diferentes sustratos dentro del medio de cultivo con los microorganismos con el objeto de que se formara una biopelícula bacteriana sobre los mismos. Las muestras se retiraron después de tiempos de exposición que variaron entre los 30 minutos y las 2 horas.

2.2 Sustratos

Los sustratos usados en los experimentos fueron: láminas de Ti pulidas con papel esmeril de diferentes grados (320 a 800), Si (plano 100 y rugoso), y Cu y Au (lisos y nanoestructurados).

El sustrato de silicio rugoso presentaba microestructuras de 8 μm de ancho y 2 μm de alto, medidas con AFM, (Fig. 1). La superficie lisa del silicio (obleas de Si (100) comercial) fue utilizado como control.

Las láminas de titanio fueron pulidas con papel esmeril de distintos grados y luego grabadas con solución de composición 60 g/l HCl + 30 g/l NaF + 20 g/l NaCl con el objeto de generar superficies con distinta rugosidad.

Materiales Nanoestructurados: los sustratos de Cu y Au presentan una nanoestructura que consiste en canales de 90 nm de altura y 900 nm de ancho (Fig. 2). Estos sustratos fueron preparados de acuerdo a Schilardi et al, 2001. Las películas evaporadas de Cu y Au sobre vidrio, que presentan una estructura lisa a nivel micrométrico, fueron usadas como control en las experiencias.

Fig. 1 Imagen AFM (50 X 50 μm^2) de la superficie rugosa de Si.

Fig 2 Imagen STM (10 X 10 μm^2) de una superficie nanoestructurada de cobre. Las muestras de oro presentan las mismas características superficiales.

4 μm

2.3 Observaciones microscópicas

Las biopelículas bacterianas fueron observadas a través de microscopía óptica de epifluorescencia. Las bacterias fueron coloreadas con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio. Se realizaron también observaciones con el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Para preservar las estructuras biológicas, las muestras fueron fijadas en 2 % de glutaraldehído en saliva estéril o en un medio fosfato buffer, deshidratadas a través de una serie de soluciones de acetona hasta llegar al 100% y secado hasta el punto crítico. El efecto de la topografía del sustrato fue también analizado utilizando un microscopio de fuerza atómica Nanoscope IIIa AFM (Digital Instruments).

3. RESULTADOS

El efecto de la composición superficial del sustrato fue analizado mediante comparación de las etapas iniciales en la formación de una biopelícula entre muestras lisas de

Au y Cu. Los resultados muestran (Fig. 4a y Fig. 4b) la influencia de la naturaleza del sustrato

en la adherencia microbiana. Para el mismo período de inmersión las superficies de cobre resultaron con una adherencia significativamente menor que las de oro. En concordancia con

resultados previos (Fernández Lorenzo, 2000) hay un período de inducción o acondicionamiento mayor en los sustratos de cobre, y la velocidad de adherencia es menor que en el resto de los materiales ensayados para los mismos períodos de inmersión.

Fig. 4a: Microfotografía MEB de una superficie de Cu cristalina expuesta durante 30 min a un cultivo de *P. fluorescens*. **Fig. 4b:** Microfotografía MEB de una superficie de Au expuesta durante 30 min a un cultivo de *P. fluorescens*.

El cobre y sus aleaciones presentan una menor formación de depósitos biológicos (biofouling) probablemente debido a las características tóxicas de los iones Cu (II) provenientes de la disolución del metal (Gómez de Saravia 1990, Gómez de Saravia 1993). Por lo tanto, cuando el sustrato es tóxico para los microorganismos, como es el caso del cobre, se observa una mayor producción de sustancias poliméricas extracelulares que en muestras no tóxicas, como por ejemplo, el oro (Fig. 5).

Fig. 5: Microfotografía de una superficie de Cu nanoestructurada expuesta durante 30 minutos a un cultivo de *Pseudomonas Fluorescens*.

Existen varias diferencias en las etapas iniciales de la adherencia microbiana entre las superficies lisas y aquellas que presentan nanoestructura. Se encontró una leve orientación

de *P. Fluorescens* en los canales de la superficie nanoestructurada del sustrato de cobre mientras que hay una alineación significativa de bacterias en la superficie nanomoldeada de oro. Las cepas bacterianas móviles, como muchas especies de *Pseudomonas*, se ubican fácilmente en surcos o grietas como se muestra en la Figura 6. Se ha propuesto que la formación de biopelículas a partir de *Pseudomonas* ocurre a través de una serie de pasos regulados (O'Toole, 2000a). En principio, se requiere de la movilidad a través de flagelos para que una bacteria nade hacia la superficie y se inicie la adhesión irreversible (Korber, 1994). Subpoblaciones de bacterias adheridas transitoriamente se convierten en microorganismos adheridos irreversiblemente para formar, primero, una monocapa, y seguir

luego con la formación de pequeñas microcolonias (Zobell, 1943; Marshall 1971; van Loosdrecht 1990; Jensen 1992; Fletcher, 1996).

La distribución de bacterias en superficies lisas fue uniforme.

Fig 6 40 μm x 40 μm Imagen AFM vista de arriba de una superficie de oro nanoestructurada expuesta durante 30 minutos a un cultivo de *Pseudomonas Fluorescens*.

La mayoría de las bacterias ubicadas en los canales se encontraron aisladas y no hubo evidencia microscópica de producción de material polimérico extracelular en sustratos de oro nanoestructurados.

También, vale la pena remarcar que fueron observados cambios en la morfología de *P. Fluorescens* adheridas a las superficies nanoestructuradas. Según las imágenes analizadas,

se notó que el largo de las bacterias era menor que aquellas bacterias adheridas al sustrato control liso. Se han medido los largos de las bacterias usando las imágenes de AFM. En las superficies de oro nanomoldeadas, el largo promedio fue $1.446 \mu\text{m} \pm [0.120 \mu\text{m}]$, mientras

que en los sustratos de oro lisos fue $1.996 \mu\text{m} \pm [0.123 \mu\text{m}]$. Estos resultados son significativamente diferentes, mostrando una reducción en el tamaño de las células en las

muestras presentando estructuras a nivel nanométrico. Todos los datos fueron analizados por

t-tests estándar con diferencias estadísticas entre medias determinadas con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Además, cabe mencionar, que las superficies de oro nanomoldeadas presentaban mayor adherencia microbiana que las muestras de control lisas.

Por otra parte, los ensayos en superficies de Ti microrugosas mostraron que la distribución de bacterias adheridas no era uniforme y seguía direcciones preferenciales. La Figura 7 muestra que *Streptococci* se ubica preferentemente en los valles.

Fig. 7. Adhesión de *Streptococci consortia* a titanio rugoso, la distancia entre las dos barras blancas indican 10 μm .

La forma de las colonias se ve marcadamente afectada por la rugosidad de la superficie en el caso de los *Streptococci*. La forma de las colonias en superficies lisas es diferente de aquellas rugosas en donde las colonias son largas y angostas. Observaciones a través de microscopía de epifluorescencia mostraron que las bacterias se adherían preferentemente en los valles de las superficies rugosas y luego crecían siguiendo una hilera.

Después de largos períodos de exposición, se observaron colonias largas y angostas (Fig. 8).

Fig. 8: Microscopía de epifluorescencia correspondiente a una superficie rugosa de titanio donde las hileras de streptococci con direcciones preferenciales pueden ser vistas dentro de los valles.

Magnificación=400X

En contraste con los resultados descritos anteriormente relacionados con la mayor adherencia bacteriana en sustratos nanoestructurados de oro, la densidad superficial de bacterias en sustratos lisos de silicio fue mayor que en aquellas muestras microrugosas (Fig. 9a y 9b).

Fig. 9a: Microfotografía MEB de una superficie **Fig. 9b:** Microfotografía MEB de una de Si liso expuesta durante 2 h a un cultivo de superficie expuesta durante 2 h a un *P. Fluorescens*. cultivo de *P. Fluorescens*.

El silicio microrugoso presenta una topografía superficial caracterizada por pequeñas cajas de 2 μm de alto y 8 μm de largo como se muestra en la Fig. 1. Durante el tiempo de exposición los hoyos son cubiertos progresivamente de una gran cantidad de material

polimérico extracelular en el caso de cultivos de *Pseudomonas*. Este incremento en la producción de material polimérico puede observarse comparando las Figuras 10a, 10b y 10c.

El material polimérico tiende a alisar la microrugosidad del sustrato de silicio, como ha sido reportado previamente (Zelver 1985, Cortizo 2003).

a) b) c)

Fig. 10: Microfotografías MEB de Si después de diferentes períodos de exposición: a) $t=0$, b) $t=30$ min, c) $t=1$ h.

4. DISCUSIÓN

En el caso de la superficie microrugosa de Ti, *Streptococci* se adhiere preferentemente en los valles de la rugosidad superficial.

Existe un efecto significativo en la adhesión microbiana debido a la presencia de nanotopografía en los sustratos. Se observó que las bacterias *P. Fluorescens* se alineaban en los sustratos de oro nanomoldeados, en donde una cantidad importante de bacterias aisladas de adhirieron en los surcos de las estructura. También se evidenció una menor cantidad de microcolonias, las cuales estaban ordenadas en dirección no paralela a los canales del sustrato.

Fue observado también que en los sustratos de oro nanoestructurados hubo menos producción de sustancias poliméricas, pero mayor adherencia bacteriana que las muestras de control.

Por el contrario, el sustrato microrugoso de silicio mostró más producción de MPE y

menor adherencia de *Pseudomonas* que la superficie lisa. Cuando los parámetros que caracterizan la topografía y rugosidad son del orden de las dimensiones de la bacteria, se encontró que la misma se adhiere fácilmente y se produce menos cantidad de material polimérico.

En el caso de las muestras de cobre, el material polimérico fue encontrado alrededor y por debajo de las bacterias adheridas (Fig. 5), quizás, para evitar el contacto directo con el material tóxico. El efecto de la composición química del sustrato es importante durante los

primeros minutos pero menos significativo en períodos más largos luego de la producción de abundante MPE. Las propiedades superficiales fueron severamente modificadas cuando el sustrato fue cubierto con MPE.

5. CONCLUSIONES

La composición superficial del sustrato, rugosidad y topografía juegan roles importantes en las etapas iniciales de la formación de las biopelículas.

La distribución de bacterias es irregular en superficies lisas pero sigue direcciones preferenciales en superficies rugosas.

Existe una relación entre la dimension característica de la rugosidad y el tamaño de la bacteria que afecta no solo la adherencia bacteriana sino también la producción de material

polimérico extracelular. Cuando los parámetros que caracterizan la topografía y rugosidad son

del orden de la dimension de la bacteria, se encontró que la bacteria se adhiere fácilmente y se

produce menos cantidad de material polimérico extracelular.

Se encuentra claramente que las bacterias actúan en respuesta a la nanotopografía debido a que eligen una dirección preferencial, cambian su morfología y modifican la producción de MPE.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo financiero recibido de UNLP, CONICET (PIP 02359/00), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 06-12508) y la Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA Res. 694/04). PLS agradece CONICET por apoyo financiero.

REFERENCIAS

Castner D.G., Ratner B.D., (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. Surface Science 500, 28-60.

Cortizo, M.C., Fernández Lorenzo de Mele, M., (2003). Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 805-10.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial

biofilms. In Annual Review Microbiology. Ornston, L.N., Balows, A., and Greenberg, E.P. (eds). Palo Alto: Annual Reviews, pp. 711-745.

Davey, M.E., and O'Toole, G.O. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Revs* 64: 847-867.

Fernández Lorenzo de Mele M., Cortizo M.C: (2000) Biodeterioration of Dental Materials: Influence of Bacterial Adherence; *Biofouling*, Vol. 14, pp 305-316.

Fletcher, M. (1996) Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In *bacterial adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Fletcher, M. (ed). New York: John Wiley & Sons, pp. 1-24.

Gómez de Saravia S. G., Fernández Lorenzo de Mele M, Videla H.A.: (1990) Interaction of biofilms and inorganic passive layers in the corrosion of Cu/Ni alloys in chloride environments; *Corrosion*, Vol 46, pp. 302-306.

Gómez de Saravia S. G., Fernández Lorenzo de Mele M., Videla H.A: (1993) The interaction of corrosion products and biofouling on 70/30 cupronickel in polluted seawater; *Biofouling*, Vol 7, 141-155.

Jensen, E.T, Kharazmi, A., Hoiby, N., and Costerton, J.W. (1992) Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidative burst response to *Pseudomonads Aeruginosa* biofilms. *Apmis* 100: 727-733.

Korber, D.R., Lawrence, J.R., and Caldwell, D.E. (1994) Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonads Fluorescens* in dual dilution continuous and batch culture systems. *Appl Environ Microbiol* 60: 1421-1429

Mrksich, M., (2002). What can surface chemistry do for cell biology ?. *Current Opinion Chemistry and Biology* 6, 794-797.

O'Toole, G.A., Kaplan, H., and Kolter, R. (2000a) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79

Schilardi, P.L., Azzaroni, O., Salvarezza, R.C., (2001). A Novel Application of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers in Nanofabrication: Direct Molding and Replication of Patterned Conducting Masters. *Langmuir*, 17, 2748-2752.

Stewart P.S., Mc Telers G. A. And Huang C. (2000). Biofilm control by antimicrobial agents. Bryers J. (Ed.) *Biofilm II*, Chapter 11. Process Analysis and applications, pp 373-405.

Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., and Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonads sp.* biofilms. *J Bacteriol* 182: 6482-6489.

van Loodsrecht, M.C. Lyklema, J., Norde, W., and Zehnder, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity, *Microbiol Rev* 54: 75-87.

Zelver N., Roe F.L. y Characklis W.G.: (1985) Potential for monitoring fouling in the food industry. In *Fouling*

and Cleaning in the Industry, Madison WI ed.

Zobell, C.E. (1943) The effects of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 46: 39-56.

Marshall, K.C., Stout, R., and Mitchell, R. (1971) Mechanism of the initial events in the sorbtion of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol* 68: 337-348.