

# Capítulo 10

## Conclusiones Generales

### 10.1. Conclusiones Generales

En el presente trabajo de tesis se estudió comparativamente la adhesión, distribución y organización de bacterias móviles (*P. fluorescens*) y el rol de sus flagelos sobre superficies de distintas topografías, composición química y propiedades físicoquímicas. Mediante técnicas de micro y nanofabricación se obtuvieron patrones superficiales de dimensiones características similares, mayores y menores que las de las bacterias y con distintas topografías y orientaciones. La utilización de microscopía de fuerzas atómicas permitió evaluar a nivel micro y nanométrico tanto la topografía y rugosidad de los sustratos fabricados como los procesos biológicos que ocurren en la

interfase sustrato/fluido tales como ubicación y orientación de bacterias, flagelos y pilis, rugosidad de membrana celular, división celular, etc. A partir del detallado estudio de la adhesión y colonización de *P. fluorescens* sobre superficies con diferente topografías se identificaron las características iniciales del proceso de auto-organización espacial microbiano sobre las distintas superficies sólidas. En base a los resultados y conocimientos adquiridos se seleccionó la mejor estrategia de erradicación de las biopelículas en su etapa inicial de formación para optimizar la acción de los antibióticos. Las conclusiones de dichos estudios se enumeran a continuación:

***Influencia de las propiedades superficiales del sustrato sobre la adherencia de bacterias***

- La estructura de los agregados microbianos que se forman durante las primeras etapas del desarrollo del biofilm en medios conteniendo sustancias orgánicas, está marcadamente influenciada por la topografía y la rugosidad de la superficie.
- Las células responden de manera análoga frente a los mismos patrones topográficos en superficies inertes de distinta composición química.
- Las bacterias *P. fluorescens* forman estructuras bidimensionales organizadas de bacterias tipo balsas, *rafts*. Las mismas están constituidas por bacterias conectadas entre sí lateralmente y son estructuras indispensables durante los procesos de movilidad microbiana grupal sobre superficies.
- La agregación de bacterias en estructuras tipo *raft* se ve inhibida sobre sustratos con canales submicrométricos cuyo ancho es similar al diámetro de las bacterias y su profundidad es cercana a 100 nm (sustratos tipo MS1), independientemente de la composición del sustrato.
- El tamaño promedio de las células atrapadas es inferior al de las bacterias no atrapadas en los canales micrométricos indicando el impacto de las características topográficas sobre la morfología celular.
- Sobre sustratos tóxicos como el Cu la formación de agregados tipo *raft* se encuentra inhibida. Se observó la formación de colonias tridimensionales. La estructura de los biofilms formados sobre Cu revela la presencia de bacterias no activas metabólicamente o

muerdas en la zona cercana al sustrato constituyendo una barrera frente a la difusión de iones Cu.

- La formación de una capa de sustancias orgánicas adsorbidas (película condicionante) provenientes del medio de cultivo y la producción de material polimérico extracelular, cambian las propiedades fisicoquímicas originales del material.

- En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, no se encontró una correlación clara entre las propiedades fisicoquímicas superficiales (carga superficial y ángulo de contacto) del sustrato y de las células y la distribución y colonización bacteriana. La película orgánica condicionante podría jugar un rol importante en este tipo de respuestas.

- Los sustratos microestructurados tipo MS1 son herramientas muy útiles para atrapar bacterias móviles como las *Pseudomonas* e investigar los posibles roles de los flagelos sobre los sustratos sin recurrir al empleo de tratamientos químicos.

- La microscopía AFM permitió visualizar los pilis y flagelos sobre la superficie, sin embargo, sólo los pilis pudieron ser detectados mediante la microscopía SEM.

- Las imágenes de AFM mostraron que la mayoría de los flagelos se orienta hacia las células vecinas y por lo tanto pueden percibir la presencia de bacterias próximas. Se observó que frecuentemente hacen contacto con las mismas, rodeándolas y, probablemente, participando como sensores de las señales químicas enviadas por ellas.

- La orientación preferencial indicaría un rol específico del flagelo durante las primeras etapas de formación de la biopelícula, que no ha sido descrito previamente.

- Sobre superficies tóxicas como el Cu, gran parte de los flagelos no presentan una orientación preferencial, ya que su rol no estaría asociado a los procesos de agrupación de las bacterias en agregados bidimensionales y movimientos cooperativos, ausentes sobre estas superficies.

- Experiencias preliminares mostraron que los flagelos que conectan a las células serían capaces de conducir la corriente eléctrica en la escala nanométrica (*nanowire*). De confirmarse este resultado a través de experiencias en curso podrían asignarse distintos roles a los flagelos que implicarían el uso de esta capacidad.

### ***Influencia de las propiedades del sustrato en la colonización de superficies por bacterias móviles***

● La microscopía AFM permitió identificar tres etapas del proceso de auto-organización espacial microbiano tipo *swarming* sobre una superficie sólida que se repiten en el tiempo con el objeto de propagarse sobre la misma. Las mismas se describen a continuación:

- i. Durante la primera etapa se observa el desarrollo de un frente con células ubicadas perpendicularmente a la dirección de avance microbiano que deja áreas desnudas durante su desplazamiento, que posteriormente son ocupadas por células individuales.
- ii. Durante la segunda etapa los agregados celulares y las células individuales que avanzan detrás del frente se conectan entre sí formando redes.
- iii. Durante la tercera etapa algunas de las células que forman el frente bacteriano compacto escapan y avanzan más rápidamente que el frente, hacia zonas del sustrato no colonizado.

● El tamaño de las células adheridas y su orientación cambia dependiendo de la ubicación espacial dentro del frente global de desplazamiento.

● La velocidad de colonización y la densidad de superficie colonizada es inferior en las superficies tipo MS1.

● La orientación de los canales de las superficies MS1 en relación al desplazamiento del frente de avance bacteriano influye sobre la organización espacial de las bacterias durante su propagación.

● La movilidad cooperativa de los agregados celulares está inhibida y probablemente implique una mayor pérdida de energía cinética por fricción sobre una superficie MS1 que sobre un sustrato NSa que permite el deslizamiento de los *rafts*.

● El desplazamiento de los agregados bacterianos sobre superficies MS1 se realiza en direcciones oblicuas a los canales evitando que las bacterias queden atrapadas en los mismos.

● Cuando se forman estructuras microbianas tipo *rafts* extensos sobre los sustratos NSa se observa alrededor de las mismas la presencia de flagelos curvos, formando lazos.

Estos flagelos podrían facilitar la conexión de células dentro del raft o el desplazamiento cooperativo del grupo sobre la superficie.

- Ciertas bacterias se elongan hasta longitudes varias veces mayores que las de las bacterias planctónicas. La elongación está probablemente asociada a la conexión y contacto de bacterias y grupos de bacterias.

***Efecto de la aplicación de antibióticos sobre biofilms formados sobre diferentes superficies. Selección de la mejor estrategia para optimizar la acción de los antibióticos***

- El tamaño de las bacterias adheridas a las superficies ensayadas disminuye luego de la exposición a los antibióticos como una respuesta de las mismas a la presencia de agentes agresivos.

- Los microorganismos aislados adheridos a las superficies Au-MS1 son más susceptibles a la acción de los antibióticos que los correspondientes a las superficies Au-NSa que forman grupos densos de bacterias.

- La mayor susceptibilidad de las bacterias adheridas a las superficies Au-MS1 a la mezcla de penicilina y estreptomina se ve reflejada en el mayor número de microorganismos muertos y en la estructura altamente rugosa y fragmentada de las membranas de dichas bacterias luego del tratamiento.

- Las diferencias de resistencia observadas entre el comportamiento de los microorganismos aislados y los que conforman agregados de distinto tipo están de acuerdo con las teorías que consideran que los efectos físicos y químicos derivados de la estructura multicelular del biofilm son responsables de su mayor resistencia al ataque por biocidas.

- Debido a que la auto-organización espacial bacteriana está altamente inhibida en superficies con patrones microestructurales de dimensiones similares al tamaño de las bacterias (ej.: MS1) el empleo de dichas superficies junto con tratamientos antibióticos ha probado ser una estrategia promisoriosa para mejorar la acción biocida sobre bacterias adheridas a sustratos sólidos.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis han sido oportunamente reportados en las siguientes publicaciones:

- I. ***“Influence of the nano-microstructure on bacterial adhesion”***. C. Diaz, M.C. Cortizo, P.L. Schilardi, S. Gómez de Saravia, M. Fernández Lorenzo de Mele. *Materials Research* (2007), Vol. 10, N° 1, 1-00, 2007.
- II. ***“Influence of the surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals”***. C.Diaz, P.L.Schilardi, M.Fernández Lorenzo de Mele. *Artificial Organs* (2008) , Vol. 32 Issue 4 Pages 292-298
- III. ***“Nano/microscale order affects early stages of biofilm formation on metal surfaces”***. C.Diaz, , P.L. Schilardi, R.C. Salvarezza, M. Fernández Lorenzo de Mele. *Langmuir*.(2007) Vol 23. Issue 22. Pages 11206-11210.
- IV. ***“Sub-micron trenches reduce the P. fluorescens colonization rate on solid surfaces”*** C. Diaz, P.L. Schilardi, P. Dos Santos Claro, R. Salvarezza, M. Fernández Lorenzo de Mele. *ACS Applied Materials & Interfaces*. (2009) Vol 1. Issue 1. Pages 136-143
- V. ***“Organization of Pseudomonas fluorescens on chemically different nano/microstructured surfaces”*** C. Diaz, R. Salvarezza, M. Fernández Lorenzo de Mele, P.L. Schilardi. *ACS Applied Materials & Interfaces*. (2010) Vol 2. Issue 9. Pages 2530-2539.
- VI. ***“Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates?”*** C. Diaz, R. Salvarezza, , P.L. Schilardi, M. Fernández Lorenzo de Mele. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 82. Issue 2. Pages 536-542.
- VII. ***Comment on “The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale”*** C. Diaz, M. Fernández Lorenzo de Mele, P.L. Schilardi. *Acta Biomaterialia* (2010) En Prensa. [doi:10.1016/j.actbio.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.001)