

# Capítulo 2

## Técnicas micro-nanoscópicas utilizadas para el estudio de los biofilms.

### 2.1. Microscopía de barrido por sondas.

#### Microscopía de fuerzas atómicas.

En las últimas décadas, las microscopías de barrido de sonda (SPMs), dentro de las cuales se destacan la microscopía de barrido de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM), se han transformado en herramientas esenciales para la caracterización de superficies de materiales. Tanto el STM como el AFM poseen una altísima resolución de manera tal que permiten visualizar la materia a nivel atómico. Estas

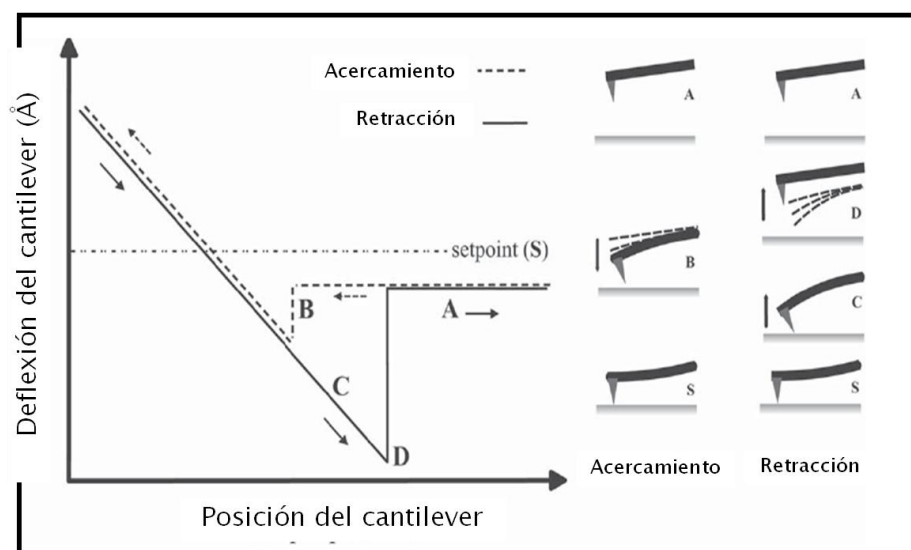
técnicas han trascendido su utilidad primaria de visualizar superficies en escalas pequeñas, puesto que actualmente se las utiliza como instrumentos de escritura para diseñar patrones nanométricos sobre superficies, y medir distintas propiedades superficiales (magnetismo, conductividad, fuerzas de adhesión, etc.) en forma local en superficies de muestras conductoras (STM) y no conductoras (AFM).

Una de las principales ventajas respecto a otras técnicas de caracterización superficial a nivel micro y nanométrico (p.ej. microscopía de barrido electrónico, SEM, y microscopía de transmisión electrónica, TEM) es que las SPMs son técnicas no destructivas que pueden operar en prácticamente cualquier ambiente incluyendo aire, líquido y vacío. Otra gran ventaja es que en la mayoría de los casos no hace falta ningún tratamiento especial de la muestra para poder realizar el análisis.

Estas técnicas de caracterización permiten que las muestras a analizar puedan permanecer en su ambiente nativo (se puede trabajar en aire, bajo atmósfera de nitrógeno o argón, en medio líquido acuoso, etc.), lo cual es una gran ventaja frente a otras técnicas en las que se requiere, por ejemplo, trabajar en vacío. En cualquier medio, el sistema se puede termostatar entre temperatura ambiente y 250°C, hecho que pone de manifiesto su gran potencial para investigar muestras biológicas en un rango que se extiende desde células hasta moléculas únicas, tales como ADN o gran variedad de proteínas. Los microscopios trabajan grabando digitalmente la topografía de un material (o de una muestra adecuadamente depositada en un sustrato) para después procesar esta información y obtener, tanto medidas de rugosidad superficial (microscopio interferométrico y AFM), altura de capas o defectos como la forma y la distribución de los objetos o de las estructuras encontradas en superficie. También permite la medida cuantitativa de diferentes propiedades de los materiales, como, por ejemplo, la respuesta mecánica bajo fuerzas de compresión con resolución en el rango de los piconewtons (modo Espectroscopía de Fuerzas), la detección y presencia de dominios magnéticos (modo MFM), la detección de cargas estáticas superficiales (modo Potencial de Superficie SPM), el contraste composicional de diferentes materiales (medida de fase), cambios en fuerzas de fricción (LFM), etc.

A diferencia del STM, que utiliza la corriente túnel como señal para monitorear la superficie, el AFM (en modo contacto) utiliza las fuerzas repulsivas entre una punta situada en el extremo de un fleje (*cantilever*) y la muestra (Figura 2.1). Por razones de diseño y de construcción, en el AFM la muestra es montada en el piezotubo que se

desplaza en relación a la punta, que permanece fija. Las fuerzas repulsivas experimentadas por el sistema punta-muestra, son medidas mientras la muestra se acerca a la punta mediante el registro de la deflexión del cantilever. La deflexión puede ser medida por diversos métodos (deflexión óptica, interferometría, piezoresistividad), pero la deflexión óptica es la más utilizada. De este modo, la variación espacial de las fuerzas repulsivas punta-muestra (deflexión del cantilever) o la altura de la punta es convertida en una imagen (I).



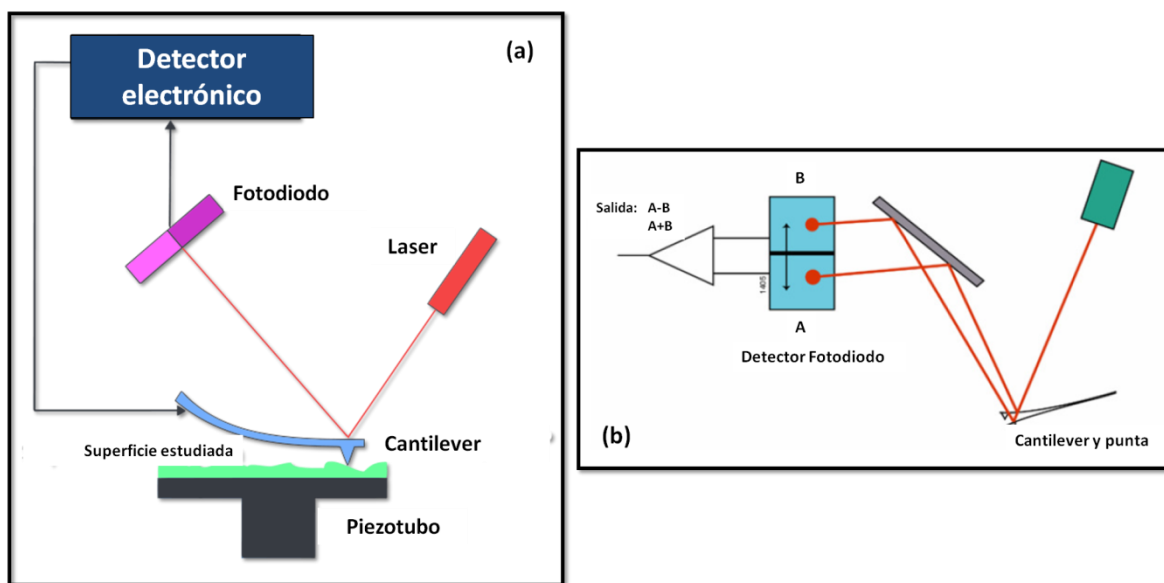
**Figura 2.1.** Esquema representando la curva de fuerzas y el comportamiento del cantilever. Las posiciones A y B representan a la punta acercándose a la superficie y en la posición B se produce el contacto. Luego de la posición B, la punta se inclina hasta que se alcanza la fuerza aplicada (Setpoint (S)). Dependiendo de la elasticidad de la muestra, la punta puede llegar a penetrar el sustrato. Posteriormente, se retira la punta hacia las posiciones C y D. En la posición D, bajo la aplicación de la fuerza de retracción, la punta se desprende de la superficie. Entre las posiciones D y A, el cantilever regresa a su posición de descanso en donde está listo para otra medida.

El cantilever se dobla hacia la superficie cuando la fuerza es atractiva, y en sentido contrario cuando la interacción es repulsiva (Figura 2.1). Cuando la muestra se aproxima hacia la punta en un régimen en el cual éstas no se tocan, la atracción debido a las fuerzas de van der Waals (vdW) dobla el cantilever hacia ésta (B en Figura 2.1). En un cierto punto (salto al contacto) la punta “salta” sobre la superficie de la muestra, estableciendo contacto con la muestra (S en Figura 2.1). Cuando la muestra aún continúa moviéndose hacia la punta, el cantilever se deflecta como consecuencia de que está tocando la muestra. Bajo estas circunstancias, la punta y la muestra pueden sufrir deformaciones reversibles (elásticas) o irreversibles (plásticas).

Cuando la muestra es retraída de la punta, el cantilever se mueve otra vez hacia la muestra. Se produce la deflexión hacia la muestra antes de que se rompa el contacto con la

misma como consecuencia de las fuerzas adhesivas y capilares. Esta última proviene de la capa líquida de contaminación que cubre la superficie de la muestra en el aire (1). La punta pierde contacto con la superficie de la muestra en el punto de despegue (*jump-out*) donde ocurre la transición del contacto a no contacto y la curva regresa a la línea de no contacto (A en Figura 2.1). La diferencia entre el punto mínimo de la curva fuerza-distancia (tomada en retroceso) y la línea de no contacto define la fuerza de separación (*pull-out*), la cual es idéntica a las fuerzas adhesivas cuando las fuerzas capilares son despreciables.

El AFM consta, básicamente de una cabeza óptica que permite detectar la deflexión del cantilever y un dispositivo de barrido (*scanner*) que contiene al piezotubo y permite el movimiento de la muestra respecto de la punta situada en la cabeza óptica. La cabeza de un microscopio de fuerzas atómicas consiste de un bloque óptico y de una base (Figura 2.2 a).



**Figura 2.2** (a) Esquema representando al microscopio de fuerzas atómicas. (b) Detección de la señal del láser entre los segmentos verticales A y B del fotodetector.

La muestra es montada en el extremo del dispositivo de barrido. El bloque óptico contiene una ventana en la parte superior, un diodo láser, espejos y el fotodetector. En este esquema, el haz del diodo láser es reflejado desde la superficie del cantilever al fotodetector (Figura 2.2.b). No obstante, debe notarse que el cantilever en la posición inicial está ligeramente inclinado ( $12^\circ$ ) con respecto al plano horizontal de manera que se refleje el láser hacia la posición del detector (Figura 2.2 b). El desplazamiento vertical del cantilever es proporcional a la señal diferencial entre los segmentos verticales del fotodetector (por ejemplo:  $\Delta_{AB}=A-B$ , donde A y B son las señales, en voltios, de los

segmentos superior e inferior, respectivamente). Para el control de realimentación del movimiento de la cabeza de barrido en la dirección  $z$ , se utiliza la señal diferencial reducida  $\Delta_{AB}/(A+B)$  para evitar la influencia de la inestabilidad del haz del láser. Para cantilevers de 100-200 micras de largo, el fotodetector magnifica los detalles superficiales en un factor 750-1500, lo cual posibilita la detección de deflexiones del cantilever por debajo del angstrom. En microscopios AFM modernos (AFM Multimode), el fotodetector tiene cuatro segmentos permitiendo la realización de la técnica LFM.

### 2.1.1. AFM modo contacto.

En la medida en modo contacto, la muestra entra en contacto con la punta y el cantilever se dobla hasta que el valor real de  $\Delta_{AB}$  alcanza el valor preseleccionado. Durante el barrido es posible cambiar el *setpoint* (fuerza aplicada) de manera de reajustar la fuerza aplicada. Dependiendo del entorno y de la constante de fuerza del cantilever, el intervalo de fuerzas en el que opera en AFM en modo contacto está entre uno hasta algunos cientos de nanonewtons ( $I$ ) (Figura 2.3).

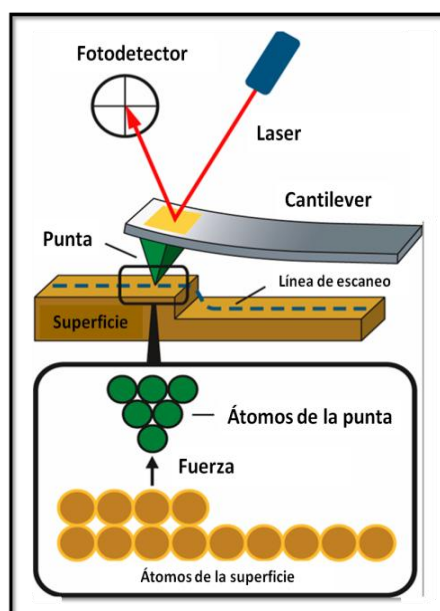


Figura 2.3. Esquema representando el escaneo de la punta del AFM sobre una superficie

La técnica de AFM en modo contacto permite obtener dos tipos de imágenes: topográficas y de deflexión. En el modo topográfico, se registran las variaciones locales de altura mientras la fuerza de interacción entre punta y muestra se mantiene constante. En el

modo de deflexión, se registra la deflexión del cantilever mientras que la altura de la sonda de escaneo se mantiene constante. Mientras que las imágenes topográficas brindan información cuantitativa de la topografía superficial de la muestra, las imágenes en modo deflexión en general exhiben mejor contraste de los detalles morfológicos. Este modo puede resultar sumamente útil al momento de analizar apéndices celulares (2) tal como se verá en los Capítulos 6, 7 y 8.

Las puntas comúnmente utilizadas para mediciones de AFM son cantilevers integrados de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ó Si. Los cantilevers son preparados con diferentes longitudes, espesores y formas. La forma de la punta y la constante elástica del cantilever son parámetros de suma importancia en mediciones de AFM. La constante de fuerza  $k$  de un cantilever rectangular puede ser expresada como:

$$k = \frac{Et^3w}{4L^3}$$

donde  $E$  es el módulo elástico y  $w$ ,  $L$  y  $t$  son el ancho, la longitud y el espesor del cantilever, respectivamente. La constante de fuerza depende sensiblemente del espesor del cantilever, el cual es más difícil de medir que el ancho o el largo. En la práctica, el espesor del cantilever puede ser determinado midiendo la frecuencia de resonancia  $F_t$ :

$$F_t = 0,162 \left(\frac{E}{\rho}\right)^{1/2} \left(\frac{t}{L^2}\right)$$

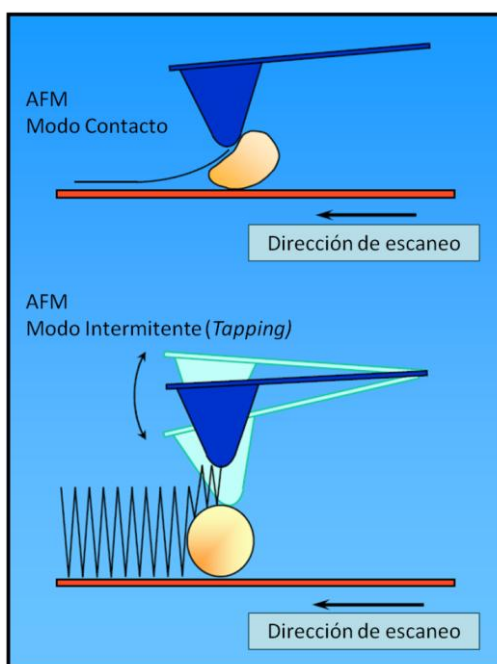
donde  $\rho$  es la densidad del material del cantilever. Los cantilevers con constantes de fuerza pequeñas son más adecuados para obtener imágenes de materiales blandos, mientras que los cantilevers con constantes de fuerza grandes son generalmente requeridos para monitorear las propiedades nanomecánicas de las muestras.

### 2.1.2. AFM modo intermitente.

Las técnicas de modulación en AFM se desarrollaron con el fin de emplear fuerzas atractivas, tanto para visualizar la superficie y superar las limitaciones que presenta el AFM en modo contacto (p ej: AFM en modo intermitente, Tapping ®) al estudiar materiales blandos como para examinar propiedades mecánicas superficiales (técnicas de modulación de fuerzas). En estos métodos se modula la frecuencia de vibración del cantilever o la posición vertical de la muestra. La fuerza de interacción punta-muestra causa un cambio en la amplitud, fase, y la frecuencia de resonancia del cantilever vibrante. Por ejemplo, la interacción atractiva punta-muestra disminuye la frecuencia, mientras que

la interacción repulsiva la aumenta. Es así que, las variaciones espaciales de los cambios pueden ser presentadas en imágenes de altura o interacción (amplitud, fase, cambios de frecuencia), siendo una práctica común coleccionar simultáneamente las imágenes de altura e interacción. Generalmente, la topografía se representa mejor mediante imágenes de altura, mientras que las nanoestructuras y los rasgos morfológicos finos son representados mejor por imágenes de fase o amplitud.

En el caso del AFM en modo intermitente, la punta oscila verticalmente a su frecuencia de resonancia. Cuando la muestra se aproxima a la punta vibrante, ésta entra en contacto intermitente disminuyendo así la amplitud vibracional. La disminución de la amplitud es utilizada para la realimentación. En este modo, la fuerza lateral punta-muestra es reducida considerablemente y el corto tiempo de contacto punta-muestra evita la modificación inelástica de la superficie. Tal como es de esperarse, la comparación de imágenes de los modos contacto e intermitente muestra que las superficies blandas son menos modificadas en el modo intermitente (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Representación de AFM en modo contacto y AFM en modo intermitente (*Tapping*) de una muestra esférica blanda.

En la Tabla 2.1 se comparan las ventajas y desventajas de los modos contacto e intermitente del AFM.

**Tabla 2.1.** Tabla comparativa mostrando las ventajas y desventajas de los modos contacto e intermitente del AFM

Modo de operación AFM	Ventajas	Desventajas
AFM Modo Contacto	Alta velocidad de barrido, comparado con otros modos Permite resolución molecular Pueden analizarse muestras rugosas	Imágenes distorsionadas debido a fuerzas laterales Destrucción de muestras blandas debido a la fuerte interacción punta-muestra
AFM Modo Intermitente	La disminución de las fuerzas de interacción que pueden distorsionar la imagen Mayor resolución lateral Menos daño para muestras blandas	Menor velocidad de barrido comparado con el modo contacto Menor resolución vertical que en modo contacto

En el presente trabajo de Tesis se utilizaron los microscopios Nanoscope III y Nanoscope V (Bruker, Sta. Barbara, California). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Nanoscope V5.31.

### 2.1.3. AFM modo conductivo (c-AFM).

El AFM conductivo (c-AFM) es un modo de trabajo derivado del modo de contacto. Se basa en la medida de la intensidad de corriente que pasa entre una sonda conductora (frecuentemente se trata de una punta de contacto estándar sobre la cual se ha depositado una capa de un metal) cuando se aplica una determinada diferencia de potencial entre la sonda y la muestra. Normalmente, la muestra se mantiene conectada a tierra y el potencial se aplica a la sonda. En este modo se pueden capturar dos señales simultáneamente: la topografía de la muestra en modo contacto y el mapa de intensidad de corriente. Este mapa nos permite relacionar la topografía de la muestra con su respuesta eléctrica. El rango de intensidades que se puede medir se encuentra entre 2 pA y 1  $\mu$ A. También se pueden medir curvas de intensidad de corriente vs. potencial aplicado en un punto determinado de la muestra y de esta manera cuantificar propiedades eléctricas de la muestra.



### 2.1.4. AFM en el análisis de muestras biológicas.

El AFM ha probado ser una técnica muy eficaz en el análisis de las primeras etapas de formación de biofilms. Se han reportado trabajos que utilizaron AFM en modo contacto (3-4), intermitente (5-6) y conductivo (7-8). La habilidad del AFM para analizar, por ejemplo, los biofilms en un ambiente acuoso y para realizar experimentos en tiempo real *in situ*, transforman esta técnica en una herramienta potencialmente poderosa para estudiar tanto el crecimiento del biofilm como las propiedades del sustrato.

El AFM es capaz de proporcionar imágenes topográficas en 2 y 3 dimensiones de la superficie de moléculas y células pudiendo llegar a una resolución en z de 1 Å gracias, entre otras cosas, a la microfabricación de puntas cada vez más agudas, con radios de pocos nm. Las muestras no precisan de ser teñidas o tratadas previamente, el único requerimiento es la inmovilización sobre una superficie nanométricamente plana. Por lo tanto, los procesos biológicos pueden ser estudiados *in situ* con la menor interferencia posible. A pesar de que las medidas en líquido son bastante más complejas que en aire, el hecho de poder medir en condiciones fisiológicamente relevantes es de vital importancia para estudios biológicos *in situ*, como el seguimiento de las dinámicas moleculares. Sin embargo, a diferencia de otras microscopías, la obtención de imágenes sigue siendo actualmente todavía lenta, con excepción de grupos de investigación que trabajan con sistemas electrónicos especialmente implementadas (5).

Durante el estudio de muestras biológicas, es importante que la muestra se encuentre adherida al sustrato y que esta adhesión sea suficientemente fuerte como para evitar el desprendimiento de la muestra por el barrido de la punta y simultáneamente que esta fijación no cause alteraciones significativas en el sistema en estudio. Estas alteraciones pueden ser por ejemplo, el colapso inducido en la muestra durante el cambio de la tensión superficial por un secado abrupto o congelación, o la distorsión de la topografía debido a algún tipo de cubrimiento de la muestra.

La inmovilización de células vivas permite profundizar en el conocimiento de la estructura y función de numerosas células a partir de, tanto el análisis de imágenes como la medida de fuerzas mediante AFM (9-12). Además del análisis de células completas, el AFM también es capaz de estudiar biomoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos (13-17)

### 2.1.5. Análisis topográfico derivado de imágenes AFM.

Un parámetro de suma utilidad para caracterizar la topografía de un material es su rugosidad. En este aspecto el STM y el AFM son las únicas herramientas capaces de estimar variaciones espaciales en el rango del nanómetro con suma precisión, no sólo en las coordenadas x e y sino también en el eje z. Es por esto que, a través de estas técnicas, es posible crear imágenes tridimensionales de una superficie cubriendo áreas de hasta 180  $\mu\text{m}^2$  y variaciones de altura de hasta 7  $\mu\text{m}$ . Con respecto a las corrugaciones, estas técnicas son capaces de medir alturas monoatómicas sin mayores dificultades (18).

Para una completa descripción de la superficie es necesaria una caracterización cuantitativa de la topografía. Las topografías de las superficies generalmente han sido descritas mediante mediciones de rugosidad superficial tales como la desviación cuadrática media de la rugosidad, la rugosidad promedio o la rugosidad pico-a-valle. El parámetro más frecuentemente utilizado es la desviación cuadrática media de la rugosidad, también conocida como RMS. Tal como lo indica su nombre, ésta es calculada a partir de la raíz cuadrada de las desviaciones cuadráticas medias:

$$RMS = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{(z_i - \langle z \rangle)^2}{N} \right]^{1/2}$$

donde  $z_i$  representa la altura en un punto del perfil superficial,  $\langle z \rangle$  es la altura media del perfil superficial, y N es el número de puntos muestreados. La altura promedio del perfil superficial se define como:

$$\langle z \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i$$

La RMS es ampliamente utilizada debido, tanto a la simplicidad de su estimación, como a su capacidad de caracterizar a la superficie con un único valor. En el presente trabajo de Tesis, se calculó mediante la utilización del programa *Nanoscope V5.31*.

Básicamente, la RMS es conceptualmente una analogía de la desviación estándar utilizada comúnmente en estadística. La rugosidad promedio o aritmética ( $R_a$ ) es otra simple medida estadística de la rugosidad. Ésta es descripta como:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \langle z \rangle|$$

Si una superficie posee un perfil con grandes desviaciones de la altura media, la RMS y la  $R_a$  no proporcionarán un valor adecuado de la rugosidad de la superficie. Puesto

que los grandes valles o picos contribuirán al cálculo de la RMS de la rugosidad, esto puede hacer su valor significativamente más grande que la rugosidad promedio. En estos casos, es útil calcular la diferencia pico-a-valle promedio como  $R_t$ ;

$$R_t = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M (z_{max} - z_{min})_k$$

donde  $M$  es el número de picos o valles que son considerados en el cálculo. Sin embargo, estas simples mediciones estadísticas dan solamente información acerca de las alturas de las muestras, siendo esto insuficiente para caracterizar completamente la superficie. Especialmente, en el caso de topografías no uniformes, la aplicación de tratamientos estadísticos simples se torna, por sí sola, en una herramienta muy limitada para el análisis topográfico. Es así que generalmente el análisis de rugosidad se complementa con un análisis de la distribución de frecuencias. La densidad espectral de potencia (PSD, *Power Spectral Density*) es una técnica sumamente útil para obtener dicha información acerca de las frecuencias contenidas en una superficie rugosa. El análisis de PSD se basa en el cálculo de frecuencias, con lo cual, el mismo requiere transformar los datos de dominio espacial en datos de dominio frecuencial. Este proceso se realiza generalmente mediante el empleo de la transformada de Fourier. La PSD proporciona una representación conveniente de la periodicidad y amplitud de la rugosidad.

## 2.2. Microscopía óptica de epifluorescencia.

La microscopía óptica utiliza luz enfocada a través de diversos lentes de vidrio. La resolución de esta técnica depende del número de apertura de las lentes y de la longitud de onda de la luz empleada. Las resoluciones típicas se encuentran alrededor de los 200 nm. Para conseguir mayores resoluciones pueden utilizarse lentes de inmersión en aceites especiales, pero que, a su vez, pueden disminuir la calidad de la imagen. La microscopía óptica tradicional emplea luz transmitida, es decir, que la luz atraviesa la muestra. Por lo tanto, la mayoría de las muestras biológicas analizadas deben estar soportadas por sustratos transparentes (agar, vidrio entre otros). Sin embargo, este no es el caso de las observaciones de biofilms que se forman generalmente sobre diferentes sustratos. En dichos sistemas, es adecuado el uso de microscopía de epifluorescencia, que también puede proveer información del estado metabólico de la célula. En estos casos, la imagen se forma a partir de la luz emitida de un espécimen fluorescente. Generalmente, el espécimen es teñido con un colorante fluorescente que fluoresce después de haber sido iluminado con luz ultravioleta. Uno de los colorantes más comúnmente utilizados es el colorante naranja de acridina (19-22). No obstante, los *kits* comercialmente disponibles que contienen colorantes combinados (por ejemplo, *Live/Dead BacLight® de Invitrogen*) también son ampliamente utilizados.

En este trabajo de Tesis se utilizó un microscopio óptico Olympus BX-51 y filtros U-MWG2 (filtro de excitación 510-550 nm y filtro de emisión 590 nm) y U-MWB2 (filtro de excitación 460-490 y filtro de emisión 520).

### 2.2.1. Tinción con naranja de acridina.

El naranja de acridina (N,N,N', N'-tetrametilacridina según IUPAC) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos y útil para realizar determinaciones sobre el ciclo celular. Interacciona con el ADN y ARN por intercalación dentro de la molécula o por atracción electrostática, respectivamente. Cuando se encuentra asociado al ADN, el naranja de acridina es espectralmente similar a la fluoresceína, presentando un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Cuando está asociado al ARN, la excitación máxima se produce a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo). Las células que se encuentran metabólicamente activas,

deberían contener grandes cantidades de ARN y por lo tanto tendrán fluorescencia naranja al estar en contacto con el colorante (23).

### 2.2.2. Tinción con *kit* comercial para detección de bacterias vivas y muertas.

Uno de los *kits* comerciales más ampliamente utilizado para detección de bacterias vivas y muertas es el *kit Live/Dead BacLight*® (24-27). El *kit* está compuesto por una mezcla de un colorante verde fluorescente denominado SYTO9® y un colorante rojo fluorescente correspondiente al yoduro de propidio (PI). Ambas sustancias se fijan al ácido nucleico de las células y difieren entre ellos por su espectro de excitación y emisión correspondiente a 480/500 nm para el SYTO9® (color verde) y 490/635 nm para el yoduro de propidio (color rojo). Su mecanismo de acción se basa en la integridad de la membrana de las células. El SYTO9® es capaz de penetrar en todas las células, tanto si tienen o no la membrana dañada, sin embargo el yoduro de propidio solamente es capaz de penetrar en las bacterias que poseen la membrana dañada. Por lo tanto, las células con la membrana intacta emiten fluorescencia de color verde y las que tienen la membrana dañada emiten fluorescencia de color rojo porque el yoduro de propidio reduce al SYTO9® cuando los dos compuestos están presentes.

## Referencias Bibliográficas.

1. Magonov, S. N., y Whangbo, M.-H. (1996) *Surface analysis with STM and AFM : experimental and theoretical aspects of image analysis*, VCH, Weinheim ; Cambridge.
2. Dufrene, Y. F., Boonaert, C. J., Gerin, P. A., Asther, M., y Rouxhet, P. G. (1999) Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium*, *J Bacteriol* 181, 5350-5354.
3. Beech, I. B., Smith, J. R., Steele, A. A., Penegar, I., y Campbell, S. A. (2002) The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, 231-247.
4. Dufrene, Y. F. (2001) Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells, *Micron* 32, 153-165.
5. Fantner, G. E., Barbero, R. J., Gray, D. S., y Belcher, A. M. (2010) Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy, *Nat Nanotechnol* 5, 280-285.
6. Camesano, T. A., Natan, M. J., y Logan, B. E. (2000) Observation of Changes in Bacterial Cell Morphology Using Tapping Mode Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 16, 4563-4572.
7. El-Naggar, M. Y., Gorby, Y. A., Xia, W., y Neilson, K. H. (2008) The molecular density of states in bacterial nanowires, *Biophys J* 95, L10-12.
8. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435, 1098-1101.
9. Ohnesorge, F. M., Horber, J. K., Haberle, W., Czerny, C. P., Smith, D. P., y Binnig, G. (1997) AFM review study on pox viruses and living cells, *Biophys J* 73, 2183-2194.
10. Patel, D., Smith, J. R., Smith, A. W., Grist, N., Barnett, P., y Smart, J. D. (2000) An atomic force microscopy investigation of bioadhesive polymer adsorption onto human buccal cells, *Int J Pharm* 200, 271-277.

11. Gaboriaud, F., y Dufrene, Y. F. (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces, *Colloids Surf B Biointerfaces* 54, 10-19.
12. Sarah, E. C., y et al. (2006) Atomic force microscopy study of the structure–function relationships of the biofilm-forming bacterium *Streptococcus mutans*, *Nanotechnology* 17, S1.
13. Engel, A., Lyubchenko, Y., y Muller, D. (1999) Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work, *Trends Cell Biol* 9, 77-80.
14. Fritz, J., Anselmetti, D., Jarchow, J., y Fernandez-Busquets, X. (1997) Probing single biomolecules with atomic force microscopy, *J Struct Biol* 119, 165-171.
15. Kellermayer, M. S., Karsai, A., Kengyel, A., Nagy, A., Bianco, P., Huber, T., Kulcsar, A., Niedetzky, C., Proksch, R., y Grama, L. (2006) Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules, *Biophys J* 91, 2665-2677.
16. Roberts, C. J., Williams, P. M., Davies, M. C., Jackson, D. E., y Tendler, S. J. (1994) Atomic force microscopy and scanning tunnelling microscopy: refining techniques for studying biomolecules, *Trends Biotechnol* 12, 127-132.
17. van Noort, S. J., van Der Werf, K. O., de Grooth, B. G., y Greve, J. (1999) High speed atomic force microscopy of biomolecules by image tracking, *Biophys J* 77, 2295-2303.
18. Maksumov, A., Vidu, R., Palazoglu, A., y Stroeve, P. (2004) Enhanced feature analysis using wavelets for scanning probe microscopy images of surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science* 272, 365-377.
19. Back, J. P., y Kroll, R. G. (1991) The differential fluorescence of bacteria stained with acridine orange and the effects of heat, *J Appl Bacteriol* 71, 51-58.
20. Zufferey, J., Rime, B., Francioli, P., y Bille, J. (1988) Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infection by direct acridine orange staining of catheter tips, *J Clin Microbiol* 26, 175-177.
21. McFeters, G. A., Singh, A., Byun, S., Callis, P. R., y Williams, S. (1991) Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*, *Journal of Microbiological Methods* 13, 87-97.

22. Schippers, A., Neretin, L. N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J., y Jorgensen, B. B. (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria, *Nature* 433, 861-864.
23. Evans, L. V. (2000) *Biofilms : recent advances in their study and control*, Harwood Academic ; Abingdon : Marston, Amsterdam.
24. Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., y Egli, T. (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry, *Appl Environ Microbiol* 73, 3283-3290.
25. Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J., y Nystrom, T. (2000) Sorting out bacterial viability with optical tweezers, *J Bacteriol* 182, 5551-5555.
26. Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J. S., y Kjelleberg, S. (2004) Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*, *Appl Environ Microbiol* 70, 3232-3238.
27. 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.