

Capítulo 6

Efecto de la topografía, composición y características fisicoquímicas de los sustratos sobre la adhesión y organización espacial de *P. fluorescens*.

6.1. Introducción.

Durante los últimos años, se han realizado diversidad de estudios con el objetivo de mejorar las propiedades superficiales de los biomateriales implantables para lograr minimizar las reacciones del organismo frente al cuerpo extraño, facilitar la adhesión celular (osteointegración) y simultáneamente, tratar de evitar la adhesión microbiana y

colonización de la superficie del material (1). La naturaleza nos brinda modelos de superficies que pueden prevenir la colonización microbiana. Así por ejemplo los materiales con características topográficas imitando la piel de los tiburones, han demostrado una significativa resistencia frente al ensuciamiento biológico (en inglés, *biofouling*) (2). La modificación de la topografía de la superficie (3) parece ser una estrategia adecuada para tratar de controlar la interacción del material con el medio biológico circundante.

En el caso de las células eucariotas los efectos de la topografía superficial sobre la adhesión y proliferación de células han sido extensamente estudiados (4-9). Se ha observado que el comportamiento de estas células puede ser manipulado utilizando sólo señales de tipo espaciales o mecánicas (10-12). Diversos procesos celulares (apoptosis, proliferación y diferenciación) dependen del confinamiento espacial de las células (13) y hasta la función de una célula madre puede estar determinada por la elasticidad del sustrato donde se produce el crecimiento (14). Se ha constatado que las células eucariotas responden a dichas variaciones del entorno si se cumplen ciertas relaciones con las dimensiones efectivas del patrón topográfico superficial del sustrato.

De forma similar las bacterias también parecen responder a señales mecánicas y químicas provenientes del medio ambiente que las rodea. Las características topográficas superficiales pueden afectar la organización y el comportamiento resultante de las células sobre la superficie y por lo tanto el posterior desarrollo del biofilm. Efectivamente, el proceso de adhesión microbiana a una superficie, una de las etapas dentro del desarrollo del biofilm, genera una serie de señales químicas entre las células bacterianas (15). Se ha sugerido también que la rigidez de un sustrato puede afectar la densidad de la colonización microbiana (16). Sin embargo, el conocimiento del efecto de las estructuras superficiales en la modificación de la adherencia bacteriana y el comportamiento celular posterior dista de ser completo.

Otro factor importante que condiciona la adhesión microbiana es la composición química de los sustratos. Para estudiar el impacto de la misma sobre las etapas iniciales de formación del biofilm se han empleado diferentes técnicas cuyo fin es modificar químicamente las superficies. Entre ellas pueden mencionarse: el uso de monocapas autoensambladas de moléculas (SAMs) con diferentes funcionalidades químicas (17-18) e implantación de grupos reactivos (*grafting*) (19) y de iones (20-21). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que si bien la bacteria puede no ser capaz de adherirse directamente a la superficie pre-tratada, la adsorción no específica de proteínas o

moléculas surfactantes excretadas sobre la misma, podría eventualmente enmascarar la funcionalidad química subyacente, reduciendo las propiedades antiadherentes del sustrato pre-tratado (22-24).

Asimismo se ha reportado que los parámetros fisicoquímicos superficiales del material y de la membrana bacteriana también podrían afectar los procesos iniciales de formación del biofilm (25). Efectivamente, los mismos parecen depender de la hidrofobicidad y carga superficial del sustrato, como así también de las propiedades superficiales de la membrana celular, condicionada por las propiedades del medio de cultivo (fuerza iónica y pH).

Los biofilms contienen una gran variedad de fenotipos microbianos y forman patrones espaciales a través de la organización cooperativa tanto a nivel macroscópico como microscópico. De acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1, las interacciones celulares generalmente se basan en compuestos que difunden marcando diferencias de concentración con el entorno que son captadas por sensores específicos de la bacteria, como es el caso de las moléculas señalizadoras del *quorum sensing*. Otras formas de comunicación dependen de las interacciones físicas entre células vecinas (26). Cabe mencionar que algunos procesos celulares críticos como la división y mecanismos de regulación externos como los sensores de quimiotaxis se ubican en los polos de las bacterias (27). Por lo tanto, la alteración del empaquetamiento natural de las células dentro de los biofilms puede afectar algunas de las funciones cooperativas de estas comunidades de microorganismos.

El objetivo principal de las experiencias descritas en este capítulo es evaluar los efectos combinados de la topografía y las características fisicoquímicas superficiales del sustrato sobre la organización bidimensional de *P. fluorescens*, y establecer si alguno de estos factores, la topografía o las propiedades fisicoquímicas, domina el proceso de autoorganización bacteriana sobre la superficie del material. En primer lugar, se procederá al análisis de la influencia de la topografía sobre la organización microbiana empleando sustratos modelo, inertes, de Au con diferentes características topográficas. En una segunda parte se compararán en detalle las etapas iniciales de adhesión y organización de *P. fluorescens* sobre materiales con distinta nano y microestructura superficial y distinta composición química: Au (material modelo), Cu (material biocida), PBCA (material biocompatible). Finalmente, se compararán las propiedades fisicoquímicas de la interfase biológicamente activa y su posible correlación con la distribución y organización bacteriana en las distintas superficies.

La formación del biofilm sobre las superficies se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 5.

6.2. Primeras etapas en la adhesión bacteriana sobre sustratos de Au con diferentes topografías.

Se han reportado pocos estudios sobre la adhesión de *Pseudomonas* sobre superficies sólidas, siendo la mayoría de ellos sobre sustratos transparentes. En algunos estudios, se han utilizado diversas técnicas, como microscopía de contraste de fases y de campo oscuro para observar la colonización de bacterias en dichos sustratos (28). Se ha descrito que inicialmente las bacterias se mueven libremente, realizando movimientos circulares tipo “bucle” en la interfase sólido-líquido. Posteriormente, las bacterias se adhieren apicalmente sobre la superficie y rotan. Este tipo de adhesión es reversible. Luego, la posición de las células varía y se ubican longitudinalmente sobre la superficie e incrementan su longitud. Después de 1 h, las células se dividen (tiempo de duplicación: 1,2 h), se separan y se disponen en forma paralela de forma de quedar en contacto lateralmente y el proceso se repite formando estructuras tipo balsas (*rafts*) de bacterias paralelas. Los autores Shapiro y Hsu (29), mostraron este tipo de interacción entre bacterias para células de *E. coli* sobre agar mediante microscopía óptica *time lapse*. En la Figura 6.1a (correspondiente al trabajo de Shapiro y Hsu) puede observarse el proceso completo que incluye la duplicación y el desplazamiento para dar lugar, finalmente, a la formación de *rafts* (termino en inglés que identifica a agrupaciones en forma de balsa). Las secuencias de la Figura 6.1a corresponden a bacterias *E.Coli* CS315 inoculadas sobre agar nutritivo. En la secuencia A se observa un comportamiento normal de las bacterias formando un típico *raft*. Sin embargo, en la secuencia B, la presencia de una célula malformada impide la formación de la estructura ordenada tipo balsa. Se demostró que este tipo de comportamiento hace que las microcolonias formadas posteriormente no presenten una estructura compacta (30). De forma similar a lo observado en agar, (Figura 6.1a), en la Figura 6.1b se observa un ejemplo de *raft* formado sobre Au-NSa (sin patrón topográfico regular) después de exposición durante 1 h a un cultivo de *P. fluorescens*.

Cabe hacer notar también que este tipo de estructuras celulares, en donde las bacterias se encuentran alineadas y en contacto lateral, han sido identificadas en ciertos

procesos de comunicación célula-célula de corto alcance (31-32). La comunicación célula-célula ejerce un impacto significativo en las distintas etapas de desarrollo del biofilm. Este tipo de comunicación de corto alcance requiere el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información.

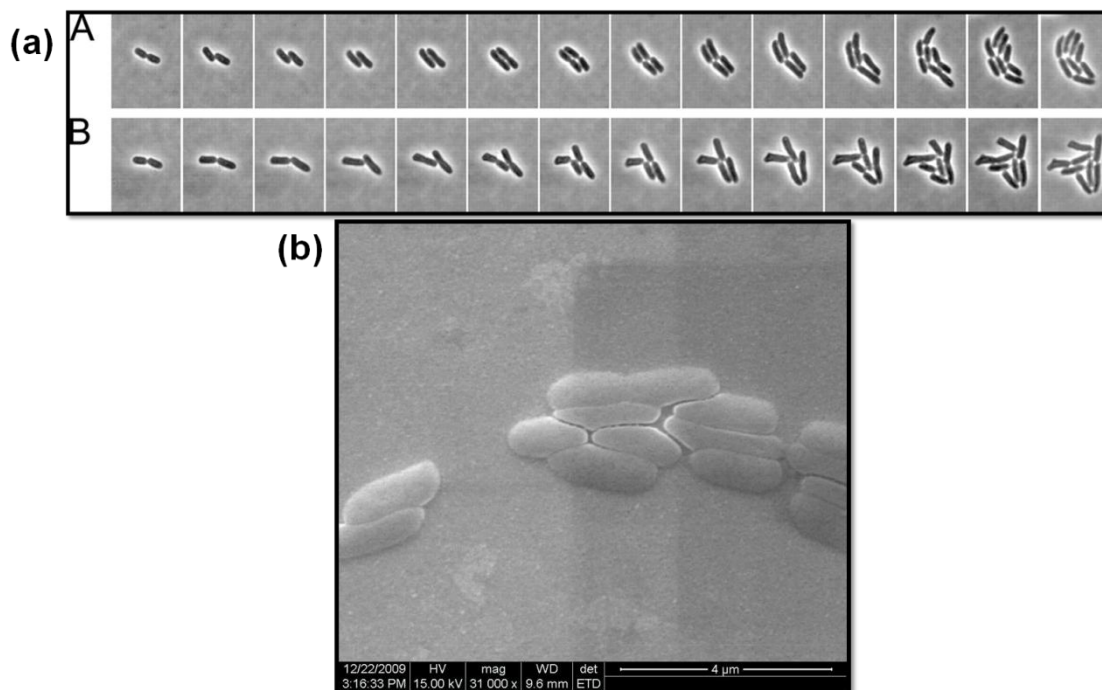


Figura 6.1 (a) Secuencia del proceso de duplicación y desplazamiento de *E. coli* sobre agar nutritivo para dar lugar a la formación de “rafts” (29–30). Las imágenes fueron tomadas cada 10 min mediante microscopía “time lapse” por el grupo de Shapiro y colaboradores (29). La secuencia A corresponde al comportamiento normal durante la formación del “raft”, mientras que en la secuencia B la presencia de una bacteria malformada impide el desarrollo normal de la estructura tipo balsa. (b) Imagen de SEM de *P. fluorescens* sobre un sustrato de Au-NSa (1 h de exposición al cultivo) en donde puede observarse la presencia de rafts.

En esta primera parte del capítulo, se estudiará el efecto de las dimensiones topográficas de los sustratos sobre la morfología celular, orientación, alineación y organización de las bacterias adheridas utilizando los sustratos descritos en el Capítulo 3, cuyas dimensiones características se relacionan con las de las bacterias de la siguiente manera (Figura 6.2): Au-NSa, cuya superficie nanoestructurada no tiene un patrón topográfico regular ni presenta dimensiones características relacionada con las dimensiones de las bacterias en estudio; Au-NSnb, presenta una estructura superficial de nanobandas regulares cuyo ancho coincide aproximadamente con el diámetro de los flagelos de *P. fluorescens*; Au-MS1 cuya topografía característica consiste en una serie de canales regulares de tamaño similar al diámetro del microorganismo en análisis y Au-MSh,

que consiste en una serie de hexágonos micrométricos cuyas dimensiones superan considerablemente las dimensiones de las bacterias).

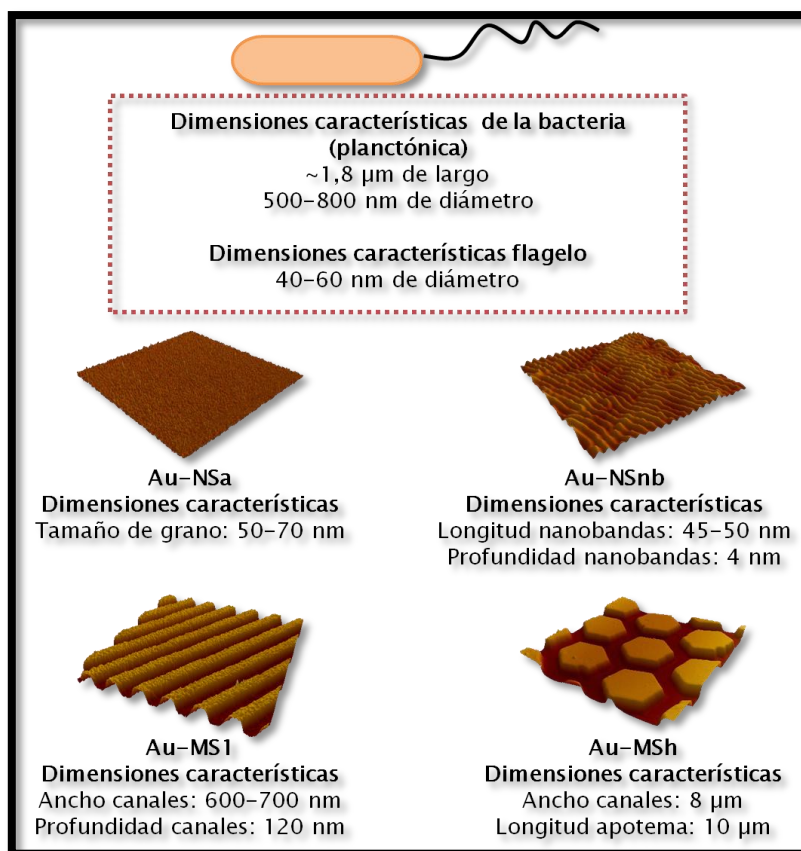


Figura .6.2. Esquema representando las dimensiones características de los sustratos empleados y de *P. fluorescens*.

Los sustratos fueron sumergidos en un cultivo de *P. fluorescens* durante 30 min y 2 h. Cabe mencionar que para el microorganismo en estudio, se pueden observar las primeras etapas de adhesión bacteriana y colonización aún en períodos tan breves como 30 min.

6.2.1. Influencia de la topografía superficial sobre la distribución y tamaño de las bacterias.

6.2.1.1 Distribución de bacterias sobre superficies de Au-NSa y Au-MS1.

En la Figura 6.3 se muestran imágenes AFM de *P. fluorescens* adheridas sobre un sustrato de Au-NSa luego de 30 min de exposición al cultivo bacteriano. Las imágenes

muestran agregados de bacterias formados sobre estas superficies en donde los microorganismos se encuentran alineados según un eje longitudinal y en contacto lateral. Este tipo de estructura celular organizada ya ha sido reportada para *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) (33-34) y *P. aeruginosa* (35).

Las flechas blancas en la Figura 6.3b indican la presencia de bacterias elongadas dentro de la estructura tipo *raft*, similares a las reportadas en artículos previos (35). Algunas de estas células tienen longitudes cercanas a 4 μm , el doble del largo promedio de las células individuales adheridas ($1,99 \mu\text{m} \pm 0,12 \mu\text{m}$) medido en otros lugares de la muestra.

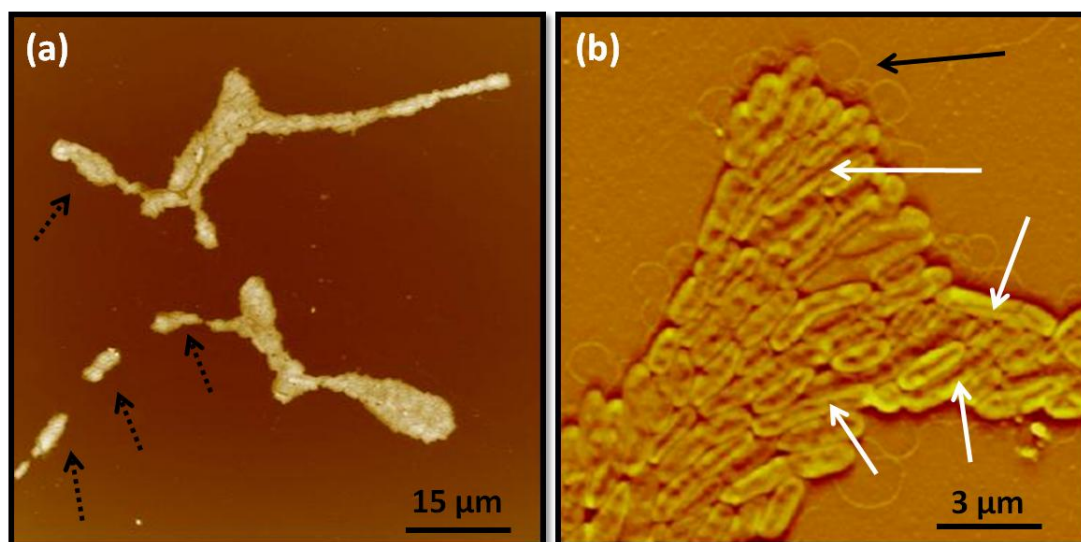


Figura 6.3. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (a) $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ (b) $14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$ (con filtro paso alto). Las flechas negras discontinuas indican los agregados que emergen de la estructura central, las negras sólidas los flagelos curvos y las blancas las células elongadas. El tiempo de exposición al cultivo bacteriano fue de 30 min.

En la Figura 6.3a se pueden observar, además, algunos pequeños agregados bacterianos (flechas discontinuas) que emergen de la estructura central del *raft*. Este tipo de comportamiento también fue descrito para *P. mirabilis* en agar. En la Figura 6.3b, también se observan flagelos curvos en el borde del agregado celular (flecha negra). En otros trabajos también se ha encontrado la presencia de este tipo de flagelos polares y laterales en *Pseudomonas* en distintas interfases (vidrio-aire, agar-aire) (35-36). La producción de flagelos laterales podría estar implicada en el aumento de las fuerzas que mantienen unidas a las células durante la migración sobre el sustrato, antes de la adhesión irreversible. Dichos flagelos también podrían estar involucrados en el movimiento colectivo del agregado celular.

Cabe mencionar que este tipo de estructuras celulares organizadas, en donde las bacterias se encuentran en contacto lateral, son importantes en varios procesos cooperativos relacionados con la movilidad y el desarrollo del biofilm. En capítulos posteriores (Capítulos 8 y 9) se describirá con mayor detalle las consecuencias de este tipo de auto-organización espacial sobre la superficie.

Las estructuras bacterianas formadas sobre las superficies de Au-MS1 son significativamente diferentes a las encontradas sobre Au-NSa. Mientras que sobre la superficie Au-NSa se forman agregados densamente empaquetados de células con límites bien definidos (Figura 6.3), sobre la superficie microestructuradas Au-MS1, las agrupaciones de bacterias tienen una estructura más abierta y los límites no se encuentran claramente definidos (Figura 6.4a). Estos resultados indican que la topografía superficial afecta significativamente la organización microbiana sobre la superficie. Cabe mencionar que durante los primeros 30 min de exposición el 76% de las bacterias aisladas se ubicaron en los canales de la superficie y se orientaron en la dirección de los mismos (Figura 6.4a y 6.4b).

Es interesante resaltar que estos microorganismos tienen menor longitud que aquellos que se ubican oblicuos o perpendiculares a la dirección de los canales (flechas negras en la Figura 6.4c y 6.4d). Al realizar un análisis estadístico de los tamaños de las bacterias adheridas, se observó que el largo promedio de una bacteria aislada sobre una superficie de Au-MS1 es $1,44 \mu\text{m} \pm 0,12 \mu\text{m}$ (Tabla 6.1), mientras que como se ha mencionado anteriormente, el largo promedio correspondiente a las bacterias aisladas sobre Au-NSa es $1,99 \mu\text{m} \pm 0,12 \mu\text{m}$. Cabe recordar que el tamaño de las bacterias planctónicas, tal cual fue mencionado en el Capítulo 5, es $1,86 \mu\text{m} \pm 0,60 \mu\text{m}$, y está en concordancia con los datos de literatura (37). Este valor es significativamente más largo ($p < 0,05$) que el de las bacterias aisladas atrapadas en los canales de la superficie de Au-MS1, pero no es significativamente diferente al largo de los microorganismos adheridos a la superficie de Au-NSa.

Tabla 6.1 Influencia de la microestructura superficial sobre la longitud de las bacterias.

Bacteria	Longitud
Planctónica	$1,86 \pm 0,06 \mu\text{m}$
Adherida sobre Au-NSa	$1,99 \pm 0,12 \mu\text{m}$
Adherida sobre canales de Au-MS1	$1,44 \pm 0,12 \mu\text{m}$

La elongación de las células que se encuentran fuera de los canales superficiales del sustrato de Au-MS1 podría ser una estrategia para lograr contactar a las células atrapadas dentro de los canales (flecha negra en la Figura 6.4c y 6.4d y círculo punteado en la Figura 6.4c). Estos resultados permiten inferir que el medio ambiente induce cambios importantes en el comportamiento fisiológico y la forma de las bacterias. En concordancia, se ha reportado que las bacterias creciendo en agar alteran significativamente su fisiología (aumento en la cantidad de flagelos laterales, cambios en la forma) comparado con las bacterias creciendo en caldo nutritivo líquido (38-39).

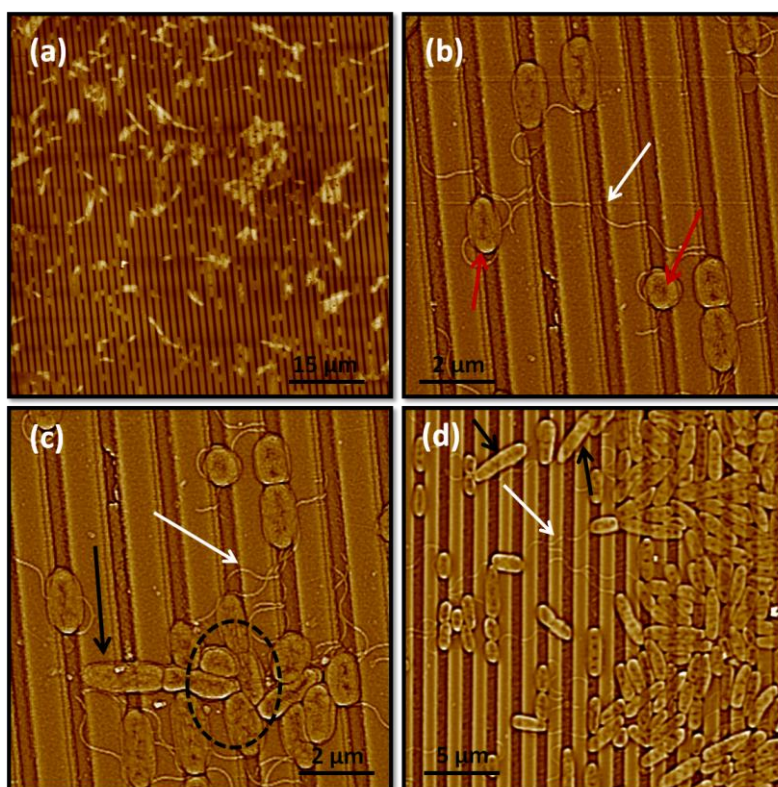


Figura 6.4. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (a) 75 μm x 75 μm (b) 10 μm x 10 μm (con filtro de paso alto) en donde pueden observarse células acortadas dentro de los canales superficiales (flechas rojas), flagelos conectando a las células (flecha blanca) y células oblicuas a la dirección de los canales (flechas negras). (c) 10 μm x 10 μm (con filtro de paso alto) (d) 25 μm x 25 μm (con filtro de paso alto). El tiempo de exposición al cultivo microbiano fue de 30 min.

En la Figura 6.4c y 6.4d se puede observar con particular detalle que las bacterias que están ubicadas oblicua y perpendicularmente a los canales superficiales (flecha negra) parecen estar empujando a aquellos microorganismos confinados en el sustrato a los que se adhiere por los polos o lateralmente (interacciones de corto alcance). También, es interesante notar que los flagelos polares están uniendo a las bacterias aisladas (Figura 6.4b y 6.4c) o grupos de células (Figura 6.4d). Estos flagelos podrían actuar como sensores de

condiciones externas (por ejemplo, ubicación de agrupaciones celulares) (39), tal como se discutirá en el Capítulo 7. En la Figura 6.4b, se observa que el proceso de alineación y contacto lateral entre bacterias aisladas se encuentra dificultado por la presencia de los canales característicos de la superficie MS1 cuyas dimensiones además coinciden aproximadamente con el diámetro de los microorganismos adheridos. Los grupos que se forman (Figuras 6.4c y 6.4d) tienen una distribución más irregular que los de la Figura 6.3.

6.2.1.2 Distribución de bacterias sobre superficies de Au-NSnb.

En la Figura 6.5 se muestran bacterias *P. fluorescens* adheridas sobre una superficie con nanobandas Au-NSnb. La organización de bacterias sobre esta superficie consiste en grupos pequeños de tres o cuatro células alineadas que a su vez pueden unirse con otros grupos que muestran orientaciones diferentes. Es decir que aún las pequeñas dimensiones de las nanobandas superficiales, marcadamente inferiores a las dimensiones del microorganismo, consiguen afectar el proceso de auto-organización inicial de los microorganismos adheridos. Es interesante notar que los agregados de bacterias se agrupan con una alineación preferida perpendicular o paralela a la dirección de las nanobandas y que las estructuras organizadas tipo *raft* se forman más fácilmente en esta superficie NSnb que en las superficies microestructuradas MS1. La orientación de los flagelos también parece estar influenciada por los canales nanométricos de la superficie NSnb (Figura 6.5c y d), cuyas dimensiones son similares al diámetro de estos apéndices (diámetro del flagelo: 40-60 nm, ancho de la nanobanda: 45-60 nm). Este resultado sugiere que los flagelos podrían percibir las estructuras superficiales cuando las dimensiones de ambos son semejantes y condicionar la distribución espacial de las bacterias.

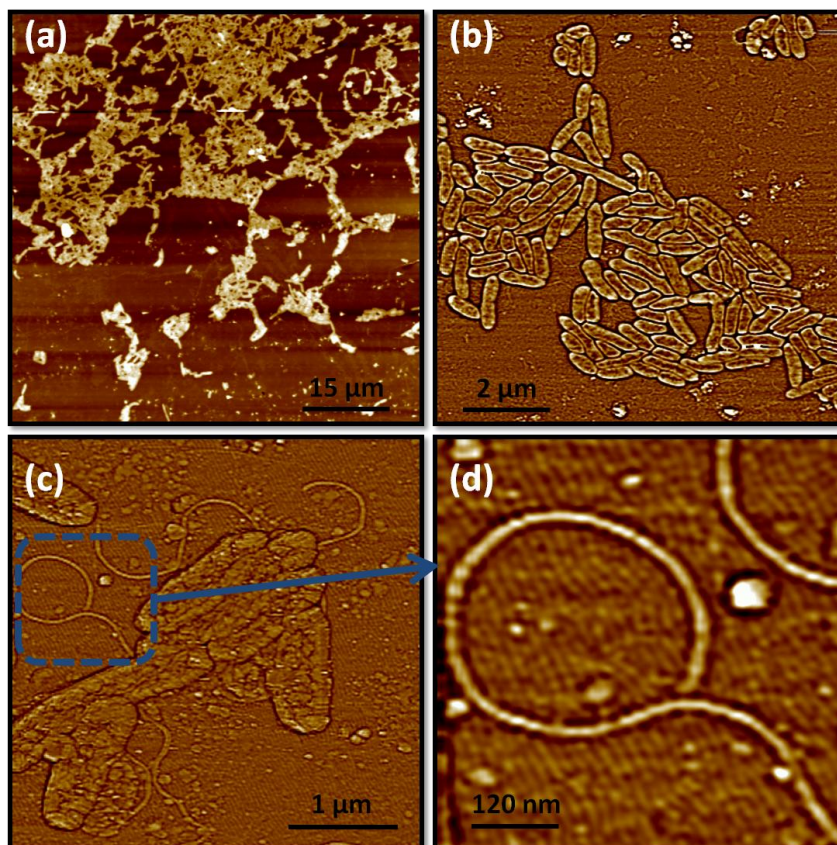


Figura .6.5. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSnb. (a) 75 μm x 75 μm (b) 10 μm x 10 μm (con filtro de paso alto), en donde pueden observarse pequeños grupos de células alineadas. (c) 4 μm x 4 μm (con filtro de paso alto) grupo de células alineadas lateralmente y ubicadas perpendicularmente a la dirección de las nanobandas superficiales (d) Detalle de la imagen (c) en donde puede observarse la ubicación del flagelo (con filtro de paso alto).

6.2.1.3 Distribución de bacterias sobre superficies de Au-MSh.

La Figura 6.6 muestra bacterias de *P. fluorescens* sobre una superficie de patrones hexagonales Au-MSh, cuyas dimensiones superan a los de las bacterias. Para el caso de esta topografía, se encontraron algunas bacterias y pequeños grupos distribuidos aleatoriamente sobre la superficie, sin evidencias que indiquen una orientación espacial preferencial (Figura 6.6) tal como ocurre sobre una superficie MS1.

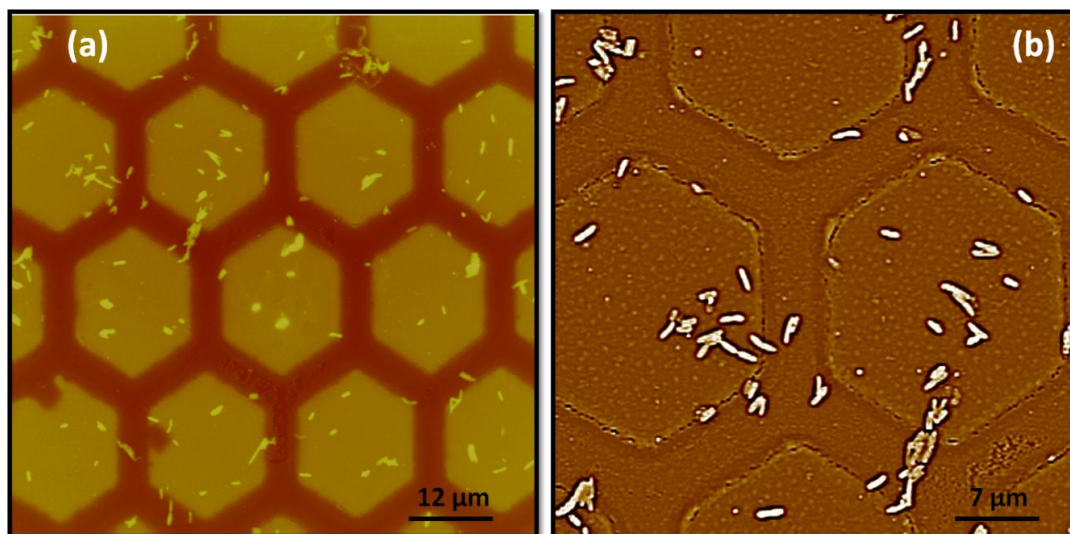


Figura 6.6. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MSH. (a) 75 µm x 75 µm (b) 45 µm x 45 µm (con filtro paso alto) en donde pueden observarse pequeños grupos de células sin orientación preferencial.

La comparación de las Figuras 6.4 y 6.6 muestra que cuando la dimensión del patrón topográfico de la superficie se acerca a la dimensión de las bacterias (Au-MS1) se observa la alineación y orientación preferencial de los microorganismos adheridos siguiendo dicho patrón de confinamiento (Figura 6.4), mientras que cuando las dimensiones de la topografía exceden el tamaño de las células (Au-MSH), la adhesión bacteriana se produce con dirección aleatoria (Figura 6.6).

6.2.1.4 Comparación de imágenes microscópicas obtenidas en aire y en medio líquido.

En diversos trabajos (40), se ha planteado la posibilidad de que cuando las imágenes son tomadas al aire a partir de las muestras secas la alineación de bacterias sobre superficies microestructuradas se deba al proceso de deshumectación, conocido técnicamente como *dewetting*. Al respecto, es sabido que la tensión superficial tiene una influencia significativa sobre la distribución de coloides sobre las superficies (41) y algunos autores han sugerido que las bacterias podrían describirse como sistema coloidales (42). Sin embargo, esta aproximación falla al explicar una serie de ejemplos biológicos (43). De hecho, algunos resultados recientes demuestran que la adhesión microbiana es significativamente diferente a la adhesión de partículas coloidales debido a la presencia de los apéndices celulares tales como flagelos y pilis que favorecen la reubicación de los

microorganismos hasta que los mismos logran situarse en la posición energética más favorable [41]. Con el objetivo de descartar la posibilidad de que el proceso de deshumectación sea el responsable de las diferencias de organización bacteriana sobre las distintas superficies, se realizaron los ensayos de adhesión y observación de las muestras manteniéndolas en un ambiente líquido durante todo el experimento, impidiendo el contacto de los sustratos con el aire. Para ello, se empleó un cultivo de *P. fluorescens* similar a los utilizados en experiencias descriptas previamente. Los sustratos fueron expuestos al cultivo bacteriano durante 2 h. Posteriormente, el cultivo fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Para esto se extrajeron sucesivamente alícuotas del cultivo, reemplazándolas en cada etapa por la misma cantidad de agua bidestilada estéril y manteniendo las muestras sumergidas en todo momento. Este proceso fue repetido hasta que, a través de observaciones en el microscopio óptico, no se detectaron bacterias en solución. Además, este hecho fue confirmado por la ausencia de crecimiento bacteriano encontrada a través de la técnica de conteo de microorganismos en placa. Seguidamente, las muestras fueron teñidas con naranja de acridina y observadas mediante microscopía de epifluorescencia utilizando un objetivo 100X y aceite de inmersión.

En la Figura 6.7 se muestran imágenes de los agregados bacterianos y la distribución de microorganismos sobre los dos tipos de sustratos (Au-NSa y Au-MS1) obtenidas mediante dos técnicas: AFM en aire, bajo humedad relativa del 70 % (Figuras 6.7a y 6.7c) y microscopía de epifluorescencia en medio líquido (Figura 6.7b y 6.7d). Puede observarse que las imágenes de la estructura de los grupos microbianos son similares para las dos técnicas utilizadas. Esto demuestra que, tanto la formación de las agrupaciones celulares tipo *raft* como la alineación de microorganismos según la topografía superficial, no dependen de las fuerzas de capilaridad asociadas al secado de las muestras y que los fenómenos relacionados con la capilaridad no son los principales responsables de la distribución de *P. fluorescens* sobre la superficie de Au-NSa y Au-MS1.

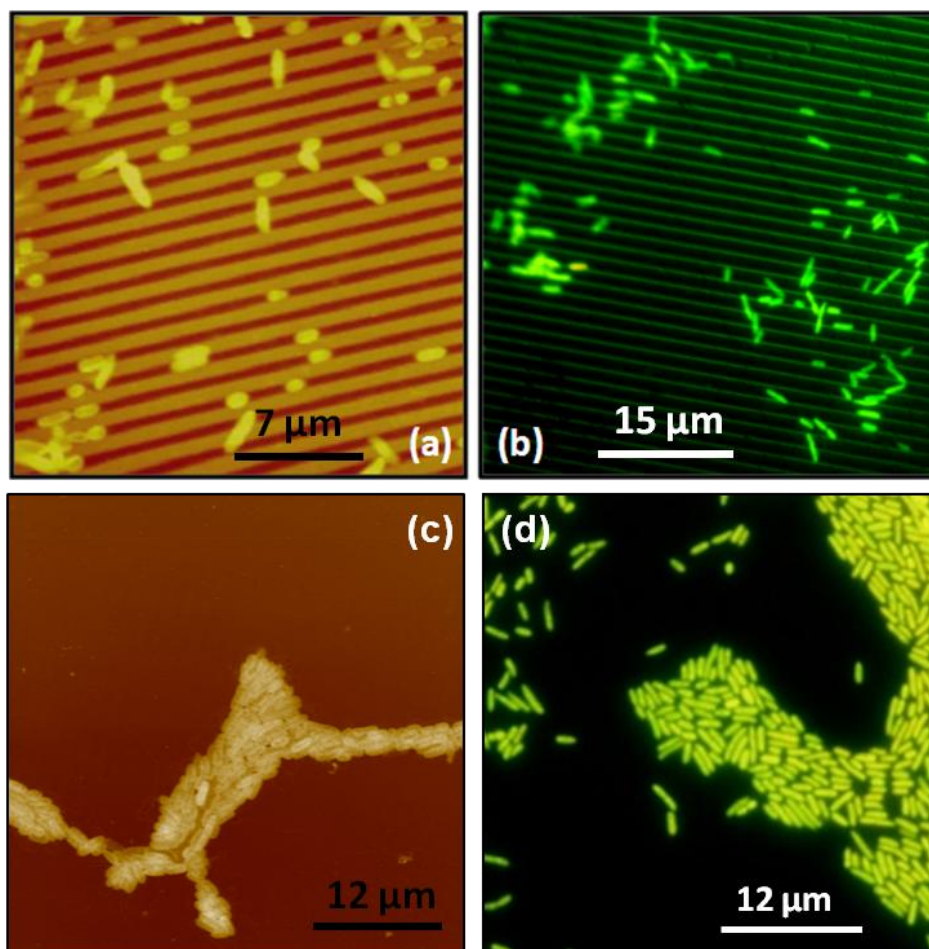


Figura .6.7. (a) Imagen AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MS1 (25 μm x 25 μm) (b) Imagen de epifluorescencia en medio líquido (50 μm x 50 μm) de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (c) Imagen AFM (45 μm x 45 μm) en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (d) Imagen de epifluorescencia en medio líquido de *P. fluorescens* sobre Au-NSa

6.3. Primeras etapas en la adhesión bacteriana sobre sustratos con diferente composición química y topografía.

En esta segunda parte del Capítulo se comparará la distribución y organización de *P. fluorescens* durante la etapa inicial de formación del biofilm sobre superficies de distinta composición química (Au y PBCA (inertes) y Cu (tóxico para los microorganismos) y simultáneamente diferentes topografías superficiales. Primeramente se describirán las nanoestructuras tipo NSa y posteriormente las microestructuras MS1 y MSg.

Como ya se ha descrito en el Capítulo 3, los sustratos utilizados Au-NSa, Cu-NSa y PBCA-NSa presentan una topografía nanoestructurada, carente de un patrón regular, caracterizada por granos superficiales de tamaños entre 50-100 nm. Las rugosidades de

todos estos sustratos se corresponden entre sí y por lo tanto, puede concluirse que estos materiales tienen el mismo tipo de topografía y difieren únicamente en sus características químicas.

El segundo tipo de topografía superficial empleada para Au, Cu y PBCA, consiste en la estructura con canales micrométricos alineados (MS1) obtenidas tal cual se describe en el Capítulo 3. Como ya se ha mencionado los canales correspondientes a los sustratos Au-MS1 cuyo ancho coincide aproximadamente con el diámetro de la bacteria *P. fluorescens* ejercen significativa influencia en las primeras etapas de colonización y por lo tanto cabe preguntarse si la composición de la superficie ejerce un rol importante en este proceso. Para el caso particular del polímero, PBCA, también se ha analizado una estructura superficial tipo globular (MSg). Este sustrato se caracteriza por la presencia de glóbulos de tamaños entre 1-5 μm y entre 80-125 nm de alto.

6.3.1 Adhesión bacteriana sobre superficies NSa.

En la Figura 6.8 se presentan imágenes de AFM y de epifluorescencia en las que se puede observar bacterias adheridas a sustratos NSa después de 2 h de colonización. Cabe destacar que esta primera etapa de formación del biofilm es consecuencia de la adhesión de las bacterias provenientes del medio de cultivo y de su duplicación sobre la superficie.

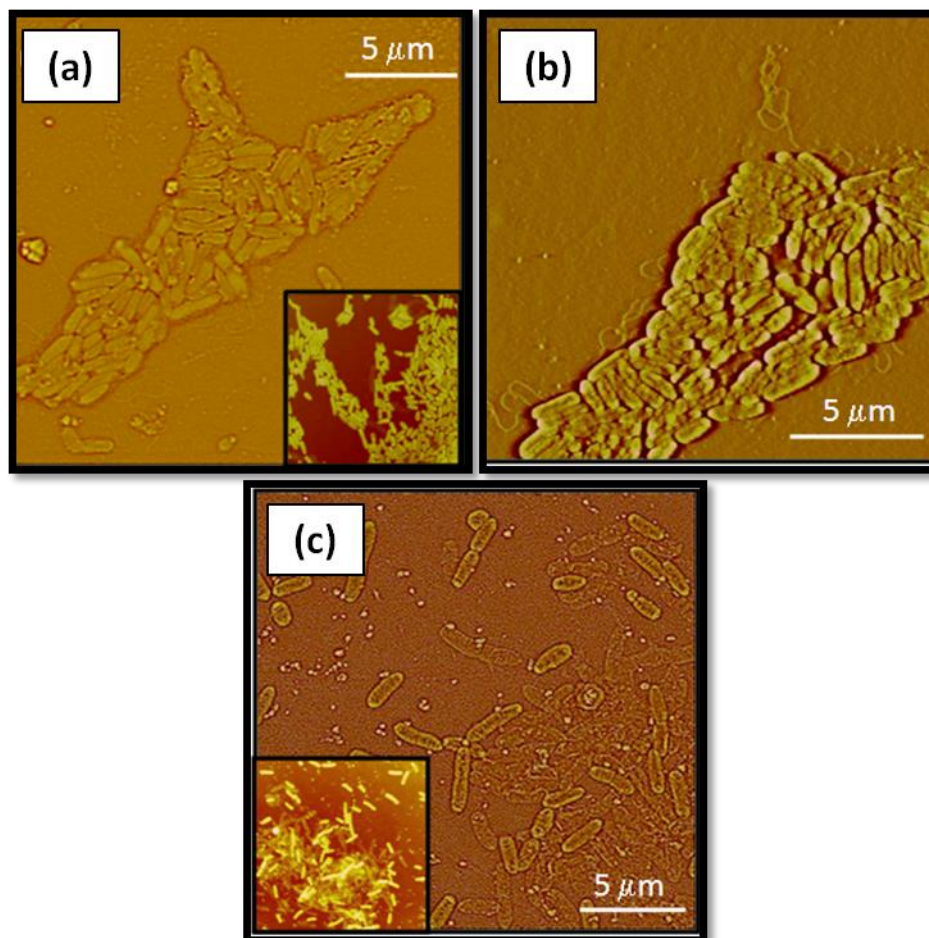


Figura 6.8. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos NSa luego de 2 h de inmersión en el cultivo bacteriano. (a) Au-NSa (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, $20.5 \times 20.5 \mu\text{m}^2$); el recuadro inferior corresponde a una imagen topográfica AFM en modo contacto, $19.7 \times 19.7 \mu\text{m}^2$, de un agregado ordenado bidimensional de bacterias (b) PBCA-NSa (Imagen topográfica AFM en modo contacto, con filtro paso alto, $17 \times 17 \mu\text{m}^2$). Se observan claramente los flagelos alrededor de los agregados bacterianos. (c) Cu-NSa (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, $20.7 \times 20.7 \mu\text{m}^2$); el recuadro inferior corresponde a un cúmulo tridimensional de células (Imagen topográfica AFM en modo contacto, $20.6 \times 20.6 \mu\text{m}^2$).

Sobre las superficies de PBCA-NSa y Au-NSa, la mayoría de las células se encuentran formando agregados densos de bacterias y se detectan pocos microorganismos aislados (Figura 6.8a y 6.8b). Este tipo de estructura se encuentra caracterizada por la presencia de bacterias alineadas dentro de la misma así como la aparición de flagelos alrededor de estos cúmulos celulares. La similitud del comportamiento microbiano sobre estas superficies puede relacionarse con la analogía en la nanoestructura aleatoria de los sustratos. Los granos de Au tienen un tamaño promedio de 75 nm y coinciden aproximadamente con los 50 nm de tamaño promedio de los nanopuntos en la superficie de PBCA. La rugosidad (RMS) de la superficie de Au (3 nm) es comparable a la rugosidad del sustrato polimérico (5 nm).

Sobre las superficies de Cu se observan agregados microbianos tridimensionales rodeados por bacterias aisladas (Figura 6.8c). A diferencia de lo observado en los sustratos NSa de Au y PBCA en donde existen estructuras de monocapas de bacterias, en este caso la colonización inicial se produce a partir de la acumulación tridimensional de células. Mediante una revisión detallada sobre extensas áreas de la superficie, se pudo comprobar que en los sustratos Cu-NSa no hay evidencia de estructuras organizadas bidimensionales tipo *raft* de bacterias, sino cúmulos celulares desorganizados.

Con el objetivo de explorar la distribución y la actividad biológica de las bacterias en amplias regiones de superficie de los distintos sustratos, se utilizó la microscopía de epifluorescencia (Capítulo 2). Las bacterias que se observan en la Figura 6.9 fueron teñidas con naranja de acridina y posteriormente observadas con un microscopio óptico con accesorio para epifluorescencia. Debe tenerse en cuenta que cuando este colorante 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, en cambio, el complejo presenta una fluorescencia color rojo o naranja. Las células que se encuentran metabólicamente activas, contienen importantes cantidades de ARN y por lo tanto tendrán fluorescencia naranja al estar en contacto con el colorante. En la Figura 6.9b puede verse la estructura tridimensional de los agregados bacterianos que se encuentran sobre las superficies de Cu donde una gran cantidad de bacterias se encuentran adheridas en forma desorganizada formando cúmulos de células. Es interesante notar que aquellas que se encuentran en contacto directo con la superficie de Cu producen una fluorescencia de color verde, mientras que las células que se encuentran adheridas sobre las primeras capas de bacterias fluorescen de color naranja. Esta diferencia de coloración indica una disminución en la producción de ARN para el caso de aquellas células que se encuentran en contacto directo con la superficie tóxica del Cu. Por otra parte, la fluorescencia de las bacterias que están formando el biofilm sobre las superficies de Au y PBCA (Figura 6.9a y 6.9c) indica una mayor actividad metabólica que las células adheridas al Cu. Por lo tanto, sería válido suponer que, en el caso de los sustratos de Cu, las bacterias adheridas directamente a la superficie tienen menos actividad celular debido al efecto tóxico de los iones de Cu y de óxidos de Cu sobre los microorganismos.

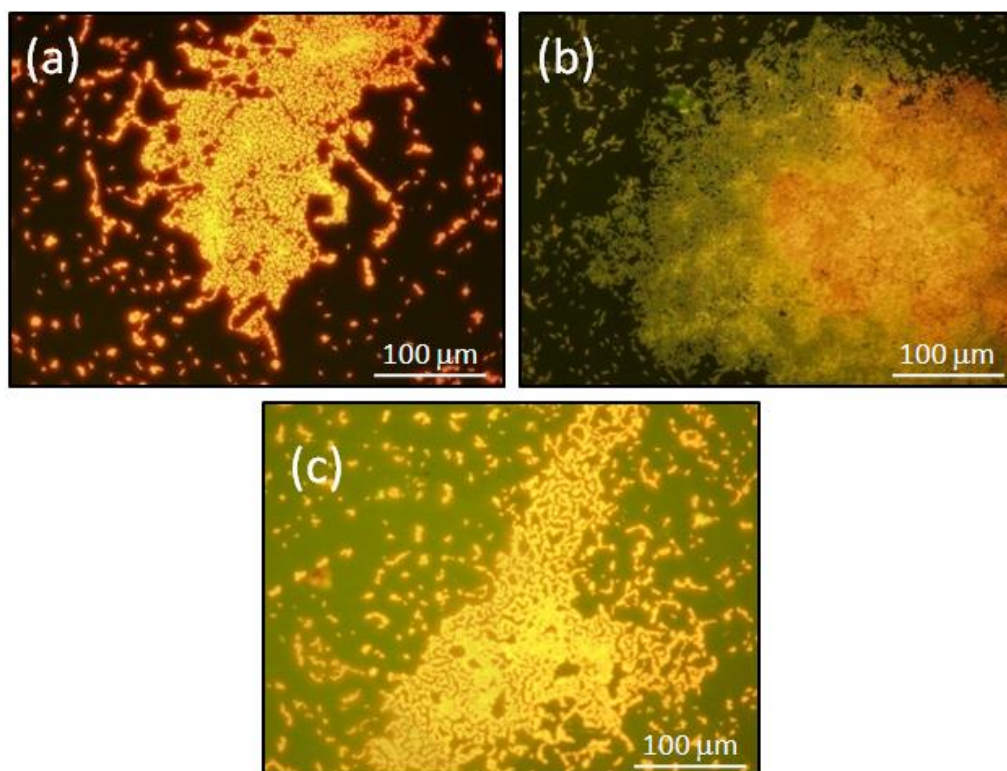


Figura 6.9 . Imágenes ópticas de epifluorescencia de sustratos NSa luego de 2 h de exposición el cultivo de *P. fluorescens*. (a) Au-NSa; (b) Cu-NSa; (c) PBCA-NSa.

Para confirmar estos resultados, se realizaron ensayos de viabilidad utilizando el *kit* comercial *Live/Dead BacLight*®. En la Figura 6.10 se comparan los porcentajes de células vivas sobre las diferentes superficies, encontrándose que el porcentaje de células viables sobre Au y PBCA es próximo al 80% mientras que sobre las superficies de Cu es cerca del 20%, dando cuenta de la toxicidad de este sustrato. Probablemente, tal como se describió en el Capítulo 1, hay una disminución en la tasa de crecimiento de las bacterias que se encuentran sobre la superficie o bien las mismas mueren dejando una barrera difusional que resiste la difusión de iones tóxicos (44-46) y formando un ambiente más favorable para los microorganismos que se encuentran en estratos superiores.

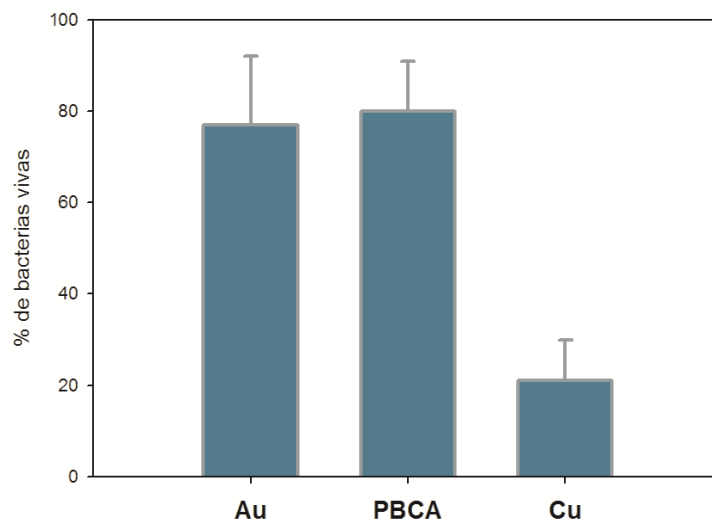


Figura 6.10. Porcentajes de bacterias vivas obtenidos a partir de imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de sustratos NSa luego de 2 h de exposición el cultivo de *P. fluorescens*. (a) Au-NSa; (b) PBCA-NSa; (c) Cu-NSa.

6.3.2. Adhesión bacteriana sobre superficies microestructuradas (MS1 y MSg).

En secciones previas se ha demostrado que las topografías superficiales tipo MS1 dificultan la formación de agregados tipo *raft* que son importantes durante el movimiento cooperativo de las bacterias [43-44]. Los resultados que se describen a continuación prueban que las superficies con topografías tipo MSg también pueden entorpecer el proceso de organización de bacterias sobre la superficie.

La topografía MSg se caracteriza por estar constituida por estructuras granulares de algunos micrones de diámetro (1-5 μm). A partir de las imágenes AFM obtenidas de *P. fluorescens* sobre el sustrato MSg de PBCA (Figura 6.11a), se pueden distinguir conjuntos de bacterias abiertos y ramificados compuestos por 1-5 células distribuidas al azar sobre la superficie y uniéndose entre sí en forma de redes. La mayoría de los microorganismos adheridos se encuentran en los valles alrededor de los gránulos de la superficie polimérica (curvas punteadas en Figura 6.11b).

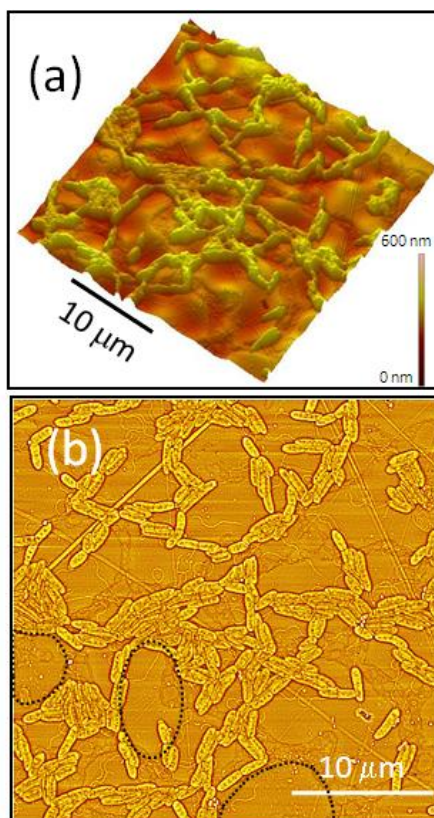


Figura 6.11. (a) Imagen AFM topográfica en modo contacto ($60 \times 60 \mu\text{m}^2$ tridimensional) de *P. fluorescens* sobre PBCA-MSg. (b) Imagen AFM en modo contacto con filtro paso alto correspondiente a la imagen (a). Algunos de los glóbulos superficiales están marcados con curvas punteadas.

Al realizar una inspección detallada sobre las estructuras bacterianas ramificadas formadas sobre la superficie se observa que, si bien están formadas por agregados de bacterias que se encuentran alineadas, no logran crear una estructura con mayor número de microorganismos y grado de organización, tipo *raft*, similares a las de la Figura 6.8a y 6.8b. Además, pueden observarse flagelos que parecerían estar conectando a las células entre sí. Por lo tanto las imágenes muestran que esta microestructura superficial, al igual que las del tipo MS1, dificulta la formación de estructuras organizadas bidimensionales de gran número de microorganismos.

En la Figura 6.12 se compara la influencia de la topografía superficial tipo MS1 para distintos sustratos. Resulta muy interesante notar que, independientemente de la naturaleza química del sustrato considerado, la organización bidimensional sobre estas superficies es considerablemente diferente a la disposición de microorganismos sobre las estructuras NSa (Figura 6.12). Efectivamente, puede advertirse a partir de las imágenes AFM, corroboradas por observaciones a través de microscopía de epifluorescencia en medio líquido, que en todos los casos (Au-MS1, PBCA-MS1 y Cu-MS1), existe un

considerable número de microorganismos aislados y atrapados dentro de los canales (flechas blancas en la Figura 6.12). Estas células, por lo tanto, se encuentran alineadas con la topografía, siguiendo la dirección de los canales. Las demás bacterias no tienen una direccionalidad preferente, sin embargo, la mayoría tiende a formar ángulos entre 45° y 90° con la dirección de los canales y a conectarse entre ellas y con las células atrapadas (Figura 6.12a y 6.12d).

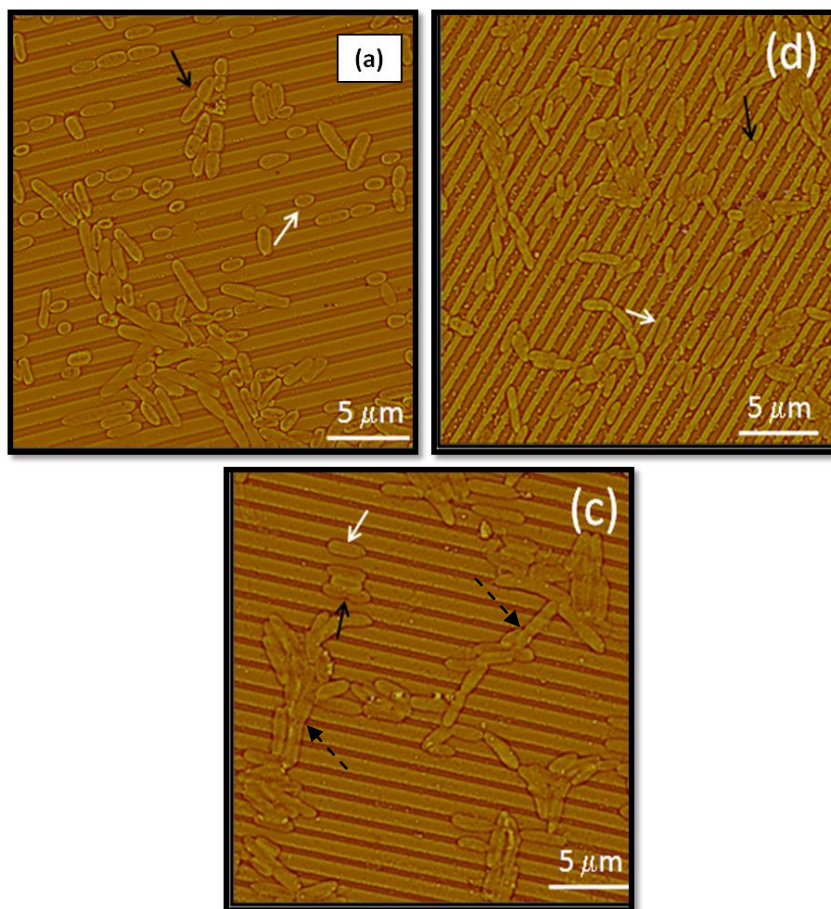


Figura 6.12. Imágenes de *P. fluorescens* sobre sustratos MS1. **(a)** Au-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 25x25 μm^2); **(b)** PBCA-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 25x25 μm^2). **(c)** Cu-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 24.3x24.3 μm^2) Las flechas blancas muestran bacterias aisladas, las flechas negras discontinuas señalan las bacterias transversales a los canales, conectando grupos contiguos y las flechas negras células en proceso de duplicación.

Las imágenes de epifluorescencia tomadas en medio acuoso, sin poner en contacto con el aire a la muestra en ningún momento, también revelan gran cantidad de bacterias alineadas con el patrón topográfico característico de estas superficies, confirmando la ausencia de efectos de *dewetting*, como ya ha sido descrito anteriormente.

Es importante resaltar que los agregados de bacterias que se forman en las superficies MS1 (independientemente del sustrato analizado) son considerablemente más

pequeños y desorganizados (Figura 6.12) que los correspondientes formados en las superficies NSa (Figura 6.8). Asimismo, su migración sobre la superficie del sustrato pareciera estar dificultada por el patrón topográfico. De hecho, sólo pocas bacterias se encuentran alineadas y densamente empaquetadas dentro de los agregados formados. Se debe resaltar que, considerando sólo aquellas células aisladas sobre la superficie, las bacterias que se encuentran atrapadas dentro de la microestructura superficial representan al menos el 70% del total, tanto en las superficies MS1 como MSg (Figura 6.13). Dicho porcentaje fue obtenido a partir del análisis de 10 imágenes de AFM.

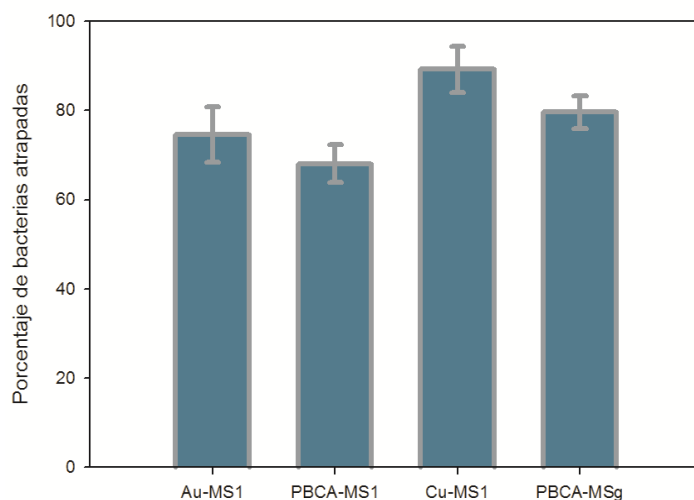


Figura 6.13. Porcentaje de bacterias aisladas que se encuentran dentro de los canales topográficos superficiales de los sustratos MS1 y MSg.

Cabe preguntarse cómo influyen las dimensiones de los patrones estructurales sobre la distribución de bacterias en sustratos de la misma composición química. Para ello es conveniente comparar los parámetros topográficos (rugosidad y longitud de onda) del sustrato sobre la organización bacteriana superficial. La rugosidad promedio y la longitud de onda característica de los sustratos MSg son 18 nm y 2,7 μm respectivamente, mientras que los valores correspondientes para los sustratos MS1 de PBCA son 40 nm y 1,3 μm respectivamente. Estos valores indican que las superficies MSg presentan una microestructura superficial más suave que la correspondiente al sustrato MS1 y además, los espacios que quedan alrededor de los glóbulos de la superficie son más grandes que los canales del sustrato MS1 (Figura 6.11). Si bien para ambos casos se ve dificultada la formación de estructuras bacterianas organizadas tipo *raft*, el confinamiento de células es menos efectivo para la microestructura tipo MSg que para los sustratos MS1, en los cuales

el patrón topográfico característico coincide aproximadamente con el tamaño del microorganismo.

6.3.3. Influencia del tipo de topografía superficial y composición del sustrato sobre la longitud de las bacterias.

Varios estudios han demostrado que las células pueden cambiar su morfología para adaptarse a las condiciones externas existentes y de esta manera, optimizar mecanismos tales como la adhesión a superficies y la movilidad (47). Por otra parte, también se ha reportado que los microorganismos pueden modificar su morfología dependiendo del tipo de sustrato al cual se adhieran (48). Teniendo en cuenta estos antecedentes resulta de interés analizar la influencia de la topografía sobre el tamaño y morfología de las bacterias adheridas. Con ese propósito se compararon las longitudes de dichas bacterias con la longitud promedio de las bacterias planctónicas en el medio de cultivo utilizado ($1,86 \pm 0,6 \mu\text{m}$). Tal como se mencionó en secciones anteriores, este dato concuerda con resultados previamente reportados para *P. fluorescens* (37). En la Figura 6.14 se muestra el análisis estadístico del porcentaje de bacterias adheridas a las distintas superficies que son más largas o más cortas que la longitud de las planctónicas. Puede notarse que, independientemente de la composición química del sustrato, la mayoría de las bacterias que se fijaron a las superficies NSa, en particular a la superficie Au-NSa, y las bacterias que no se encuentran atrapadas en los sustratos MS1 son más largas que las bacterias planctónicas (Figura 6.14). Por el contrario, los microorganismos atrapados en las superficies MS1 de Au, PBCA y Cu, presentaron tamaños menores que el correspondiente largo de *P. fluorescens* planctónica.

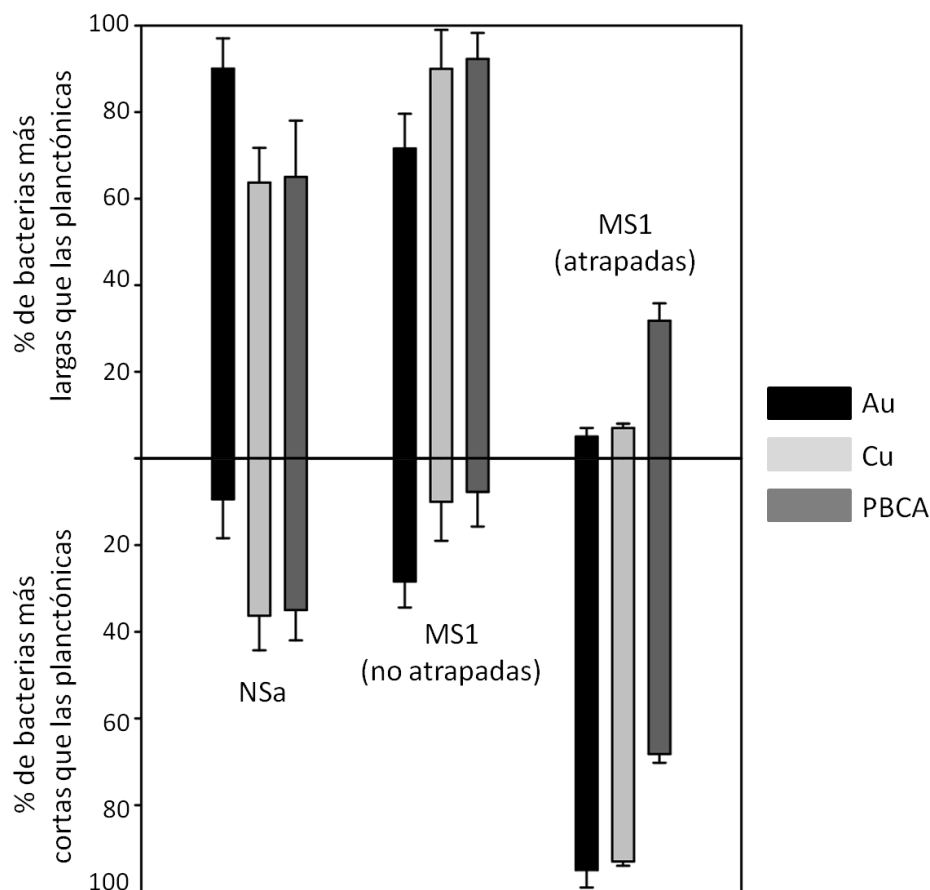


Figura 6.14. Histograma mostrando el porcentaje de bacterias adheridas sobre los diferentes sustratos y que presentan largos mayores o menores a los correspondientes de las bacterias planctónicas, representados como la línea 0.

El aumento observado en el largo de las bacterias que no se encuentran atrapadas en los canales superficiales del sustrato podría estar relacionado con las estrategias que utilizan las células para colonizar las superficies, por ejemplo en los mecanismos de movilidad colectiva tipo *swarming*, mencionados en el Capítulo 1. Se ha reportado que estas bacterias son más largas que las células individuales ya que la elongación favorece el contacto dentro del agregado celular y entre grupos vecinos de microorganismos (Figura 6.12c) (47). Este tipo de alineación, en donde la conexión lateral entre células es un proceso importante, puede observarse en la Figura 6.8a y 6.8b. En cambio, las células adheridas y atrapadas en los sustratos MS1 no son capaces de formar agregados tipo *raft* y como consecuencia tienen tamaños menores que aquellas que se encuentran fuera de los canales o en el medio de cultivo. Dicho confinamiento parece inducir una reducción de tamaño similar a la observada en otros ambientes agresivos (47, 49).

6.3.4. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de los sustratos de distinta composición química y topografía y de *P. fluorescens* durante las primeras etapas de adhesión.

Existe una importante cantidad de información relacionada con la posible influencia de las propiedades fisicoquímicas del sustrato y de la superficie bacteriana (3, 17-18), las propiedades del medio circundante (composición, fuerza iónica, pH) (50), y la topografía del sustrato (51-52) sobre la adhesión inicial de células individuales. Sin embargo hay poca información referente a la influencia de estos factores sobre la posterior agregación, migración y colonización, durante las cuales las bacterias pueden interactuar entre ellas para formar estructuras tridimensionales o moverse y propagarse a zonas no colonizadas de la superficie.

En esta sección se analiza la influencia de las propiedades de las bacterias y las superficies de los sustratos sobre la organización microbiana. Se utilizaron tres tipos de materiales con topografías superficiales controladas pero presentando propiedades fisicoquímicas diferentes, con el objeto de poder analizar y discutir las contribuciones relativas de estas propiedades sobre la organización bidimensional de bacterias sobre una superficie. Para evaluar la interacción de la membrana de *P. fluorescens* con las superficies de los distintos sustratos es importante determinar la carga superficial de la misma. Los resultados obtenidos de los ensayos MATS (Capítulo 5) indican que la bacteria tiene mayor afinidad por el cloroformo, un solvente de carácter ácido, que por el hexadecano. Esta afinidad, asociada a la tendencia a donar electrones que presenta la membrana, puede atribuirse a la existencia de grupos básicos en la superficie celular (53-54) entre los que pueden mencionarse grupos carboxilos (COO^-), grupos fosfato (PO_4^{2-}) y grupos amino (NH_2). Los resultados obtenidos para la cepa de *P. fluorescens* utilizada en este trabajo están en concordancia con otros estudios que demuestran que este microorganismo tiene una membrana hidrofílica y con carga negativa (55-56). En base a las consideraciones previas (medidas de CAM, Capítulo 5) se puede concluir que las *P. fluorescens* poseen una superficie hidrofílica cargada negativamente. Este hecho podría explicar por qué *P. fluorescens* podría interactuar mejor con las superficies que están positivamente cargadas como las superficies de Au, desplazando moléculas de agua y aniones de la interfase cuando estos sustratos son sumergidos en un medio acuoso (libre de sustancias orgánicas que puedan ser adsorbidas por la superficie). Esta observación es confirmada por

resultados de otros autores a través del aumento en intensidad de las bandas amida I y amida II de las proteínas en el espectro IR correspondiente (57).

Con el objetivo de poder describir adecuadamente las propiedades fisicoquímicas de la interfase célula/sustrato/medio de cultivo es útil analizar comparativamente, además de la carga superficial de la bacteria, el pzc, el PI, la carga superficial y los datos de ángulos de contacto de equilibrio para las superficies nano y microestructuradas. La información obtenida a partir de las medidas experimentales correspondientes (descriptas en el Capítulo 4) se muestra en la Tabla 6.1. Estos datos indican que la superficie nanoestructurada Au-NSa es el único sustrato hidrofílico entre todos los sustratos analizados. Cuando la superficie de Au presenta una topografía superficial microestructurada MS1, este sustrato se transforma en hidrofóbico. Es necesario tener en cuenta que, la tensión interfacial $\gamma = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} + \gamma_{sv}$, relacionada con las medidas de ángulo de contacto, es el resultado de la interacción de tres fases, dos de las cuales son invariantes, el aire (v) y el medio acuoso (l), mientras que la superficie del sólido (s) varía (Au-NSa vs. Au-MS1). La Tabla 6.1 muestra que los ángulos de contacto medidos son mayores para la superficie Au-MS1 que para la Au-NSa. Considerando que lo único que ha variado en los ensayos efectuados con Au-NSa y Au-MS1 es la topografía de la superficie del metal, la mayor hidrofobicidad que presenta la microestructura tipo MS1 parecería estar asociada al cambio en las interacciones del sólido con el vapor y con el líquido para esta microestructura. Sin embargo, tanto los sustratos de PBCA como los de Cu exhiben altos ángulos de contacto independientemente de la topografía superficial de los mismos.

Con respecto a la evaluación de la carga superficial de los sustratos, dicha determinación, tal como se mencionó en el Capítulo 4, se realizó a través de técnicas electroquímicas y datos bibliográficos del PI y pzc. Los resultados mostrados en dicho capítulo muestran que las medidas de potencial a circuito abierto después de 2 h de inmersión en medio de cultivo fueron 153 mV y -28 mV (vs. ECS) para el potencial a circuito abierto del Au y Cu respectivamente. En el caso del Au, el valor de 153 mV es más positivo que el pzc (Tabla 6.1), lo que demuestra que en estas condiciones los sustratos de Au se encuentran positivamente cargados.

Tabla 6.1. Características topográficas y fisicoquímicas de los sustratos y principales estructuras bacterianas formadas sobre las superficies

Sustrato	Características topográficas			Propiedades fisicoquímicas		Principales estructuras bacterianas	Características del sustrato
	Patrón	Longitud de onda (nm)	Rugosidad (nm)	Carga superficial (mV), pH = 7.7	Ángulo de contacto		
Au	NSa	75	3	pzc \approx -600 mV(vs. SCE) ^(c)	51.7 \pm 0.1	<i>Raft</i> + Agregados ordenados bidimensionales	Inerte
	MS1	1300	40		97.5 \pm 0.3	Bacterias aisladas+ Agregados desorganizados	
PBCA	NSa	50	5	-30 (casi neutro) ^(b)	83.7 \pm 0.1	<i>Raft</i>	Biocompatible
	MSg	2700	18		82.8 \pm 0.2	Agregados desorganizados	
	MS1	1300	40		78.1 \pm 0.1	Bacterias aisladas+ Agregados desorganizados	
Cu /Cu ₂ O	NSa	81	2.5	pzc \approx - 310 mV (vs SCE) ^(a) PI \approx 9.5	90.1 \pm 0.1	Bacterias aisladas + Agregados tridimensionales.	Tóxico
	MS1	1400	37.3		98.6 \pm 0.1	Bacterias aisladas+ Agregados desorganizados	

^(a)De la referencia (58); ^(b) De la referencia (59) ^(c) De la referencia (60)

El potencial a circuito abierto del Cu (-28 mV) también es más positivo que el pzc (-310 mV) teniendo en cuenta tanto los datos electroquímicos como el dato del PI. Por último, la carga superficial de los sustratos de PBCA es levemente negativa (Tabla 6.1).

Con el objetivo de discutir comparativamente la influencia de las propiedades fisicoquímicas de los sustratos sobre la organización bacteriana, se analizará primeramente la influencia de la carga superficial y las propiedades de mojado de las superficies sobre los sustratos nanoestructurados. Si la carga superficial de los sustratos fuera el factor determinante en el tipo de organización microbiana formada sobre la superficie, tanto la superficie positiva de Au como la de Cu deberían originar procesos de adhesión y organización bacterianas similares. Sin embargo, las imágenes obtenidas a partir de AFM y microscopía de epifluorescencia han demostrado que los patrones bacterianos generados sobre dichas superficies son muy distintos. Por otro lado, a pesar de que las superficies de Au y PBCA tienen cargas superficiales opuestas, el tipo de organización bacteriana que se genera en ambos sustratos es similar. Por lo tanto, se puede concluir que la distribución y organización microbiana sobre diferentes superficies no se correlaciona directamente con la carga superficial de los sustratos. Cabe destacar que la falta de correlación entre la carga superficial y la adhesión de otras especies de bacterias ya ha sido analizada en publicaciones previas (61).

Con respecto a la hidrofobicidad, no obstante, en varios trabajos publicados se ha enfatizado el papel que juega esta propiedad de la superficie en la promoción de la adhesión bacteriana. Recientemente, se ha reportado que la cepa hidrofílica *P. putida*, se adsorbe irreversiblemente sobre una superficie hidrofóbica (superficie de Au cubierta con dodecanotiol) mediante fuerzas dispersivas, mientras que la adhesión a superficies hidrofílicas (superficie de Au cubierta por una monocapa de mercaptoundecanol) es reversible (62). En este último caso, el microorganismo debe desplazar a las moléculas de agua adsorbidas sobre la superficie haciendo que este proceso de adsorción sea desfavorable. Uno de los roles más importantes que cumplen los grupos hidrofóbicos, asociados a los apéndices celulares de los microorganismos, es la capacidad deshidratante de los mismos, permitiendo la remoción de las moléculas de agua que se encuentran próximas a la superficie (63-64). En el caso del presente trabajo, el Au-NSa es hidrofílico mientras que la superficie de Cu cubierta por Cu₂O es hidrofóbica (65-66), diferencia que podría explicar las disímiles estructuras bacterianas observadas en cada uno de los materiales. Sin embargo, tanto sobre las superficies de Au-NSa como sobre las superficies

de PBCA-NSa se observan agregados bacterianos organizados análogos siendo los sustratos de Au hidrofílicos y los correspondientes de PBCA hidrofóbicos (Tabla 6.1). Por lo tanto, si bien algunos autores han considerado que tanto la carga superficial como la hidrofobicidad de los sustratos son factores claves frente a la adhesión de las bacterias pioneras, nuestros resultados muestran que esta influencia no es importante en los procesos posteriores de agregación bacteriana. Publicaciones recientes (6) y los resultados descritos previamente no demuestran una relación clara entre estas variables y la interacción célula/superficie libre de sustancias orgánicas adsorbidas.

Los resultados y el comportamiento observados podrían estar relacionados con la presencia de una capa de moléculas orgánicas adsorbida sobre la superficie a partir del medio de cultivo. Para confirmar el papel que juega esta capa de sustancias orgánicas en la modificación de las propiedades superficiales de los sustratos se han realizado varias experiencias cuyas metodologías han sido descritas en detalle en el Capítulo 4. En la Figura 6.15 se muestran algunos datos presentados en dicho capítulo relacionados a la respuesta electroquímica correspondiente a la región de potencial de la doble capa eléctrica de un sustrato Au-NSa, en una solución electrolítica de NaCl, antes y después de 2 h de inmersión en caldo nutritivo estéril.

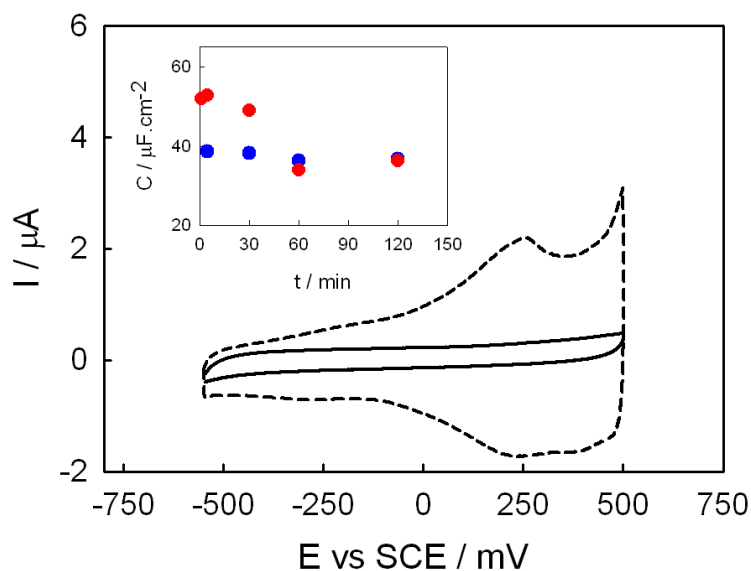


Figura 6.15. Voltaamperometría cíclica de un sustrato de Au en NaCl 0.5 % p/v con una velocidad de barrido de 0.1 V/s. La línea punteada corresponde al sustrato de Au limpio; la línea sólida corresponde al sustrato de Au luego de 2 h de inmersión en caldo nutritivo estéril. El recuadro superior corresponde al gráfico de Capacidad vs Tiempo de inmersión; (●) Au sumergido en caldo nutritivo estéril; (●) Au sumergido en solución de albúmina (34 g/L)

La Figura 6.15 muestra que la capacidad de la doble capa eléctrica disminuye significativamente después de que el electrodo de Au estuvo en contacto con el medio de

cultivo. En el recuadro superior de la Figura 6.15 se encuentran graficadas las capacidades de la doble capa en función del tiempo de inmersión (círculos rojos). A partir de este gráfico, resulta evidente que las sustancias orgánicas provenientes del medio de cultivo bloquean rápidamente la superficie de Au. Con el objeto de emular el comportamiento del material sumergido en un medio biológico, se midieron las capacidades de la doble capa para un electrodo de Au que estuvo inmerso en una solución de una proteína (albúmina (34 g/l)) durante diferentes períodos de tiempo. En este caso se observa el mismo comportamiento que el descrito para el medio de cultivo, es decir, existe una disminución significativa de la capacidad de la doble capa a medida que aumenta el tiempo de inmersión en la solución proteica (círculos azules). No obstante, el proceso de adsorción es más rápido para las proteínas que para las sustancias orgánicas contenidas en el medio de cultivo. Este comportamiento ya ha sido reportado en publicaciones anteriores, en las cuales se muestra que el potencial a circuito abierto de un electrodo de Au en una solución amortiguadora alcanza rápidamente un valor constante (después de 10-15 min de inmersión) en una solución de albúmina (67).

El caso particular del Cu merece un análisis detallado. Los resultados de medidas de ángulos de contacto entre una gota de agua bidestilada y la superficie de Cu cambian desde $90,1^\circ \pm 0,1$ a $66,0^\circ \pm 0,1$ cuando la superficie estuvo en contacto durante 2 h con medio de cultivo estéril. Consecuentemente, la superficie de Cu cambia sus propiedades de mojado debido a la adsorción de moléculas orgánicas desde la solución de caldo nutritivo. A partir de estos resultados, se puede concluir que las propiedades superficiales de los sustratos se ven modificadas por la presencia de una capa hidrofílica de sustancias orgánicas provenientes del medio de cultivo que cambian las propiedades superficiales del material. Es importante notar que aunque se adsorben moléculas orgánicas sobre la superficie de Cu, este hecho no previene la liberación de iones tóxicos de esta superficie.

Otro hecho que debe considerarse es que durante la transición desde la adhesión reversible a irreversible sobre una superficie, las bacterias producen EPS que contiene diferentes moléculas, desde homopolisacáridos hasta heteropolisacáridos más complejos. Si la cantidad de EPS producido por las bacterias es pequeña, la adhesión celular sobre superficies sólidas depende principalmente de las interacciones electrostáticas mientras que si la cantidad de material producido es importante, la adhesión estará favorecida por interacciones de las células con dicho material (68). Por lo tanto, la presencia de sustancias orgánicas provenientes del medio de cultivo o de EPS disminuiría el efecto de las

interacciones electrostáticas entre los microorganismos y las superficies sólidas y consecuentemente las mismas no tendrían un papel clave en la organización de bacterias sobre una superficie.

Una inspección detallada a la Tabla 6.1 indica que, si bien no existe una correspondencia entre las propiedades fisicoquímicas y la adherencia microbiana, existe una buena correlación entre la organización bacteriana y la topografía de los sustratos. Sobre las superficies de Au-NSa y PBCA-NSa se forman agregados bidimensionales ordenados de bacterias. La formación de estructuras bacterianas tridimensionales sobre las superficies de Cu puede ser interpretada considerando que los iones tóxicos de Cu promueven el apilamiento de los microorganismos para disminuir la cantidad de células en contacto con la superficie tóxica. Por otro lado, las características topográficas superficiales que coinciden con el tamaño del microorganismo (MS1), promueven la formación de agregados celulares desorganizados sobre dichas superficies y la posible inhibición parcial del movimiento cooperativo microbiano.

También vale la pena destacar que a pesar de que este tipo de microestructura superficial puede entorpecer la formación de las estructuras celulares organizadas tipo *rafts*, las mismas no evitan la proliferación y duplicación de los microorganismos adheridos a ellas. Puede observarse la evidencia del proceso de duplicación de bacterias sobre superficies MS1 en la Figura 6.12.

Los resultados que se presentan en este Capítulo respecto a las células bacterianas (procariotas) están en concordancia con publicaciones anteriores sobre la influencia de las propiedades químicas y topográficas de la superficie en la adhesión de células eucariotas (4-6, 69-70). Diversas investigaciones han demostrado que sobre sustratos no tóxicos, la topografía se convierte en un factor más importante que la química superficial para la adhesión y alineación celular cuando la profundidad de los canales se encuentra en el rango entre 0,5-1 μm (6). En el presente Capítulo, los resultados muestran que las células bacterianas se comportan de manera similar, independientemente de la naturaleza química del material, cuando la profundidad de los canales es de al menos 0.1 μm y su ancho similar al diámetro de las bacterias.

6.4. Conclusiones del presente capítulo.

Los resultados obtenidos a partir de las imágenes AFM y de epifluorescencia demuestran que la distribución de bacterias y 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, rugosidad y toxicidad de las superficies, mientras que no se encontró una relación clara entre las propiedades fisicoquímicas superficiales (carga superficial y ángulo de contacto) del sustrato y de las células en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Efectivamente, los resultados muestran que las células responden de manera análoga frente a los mismos patrones topográficos en superficies no tóxicas con propiedades químicas distintas. Se observó que independientemente del material, sólo cuando las dimensiones características del patrón topográfico superficial coincide con el tamaño de la bacteria, se dificulta la organización de los agregados bacterianos. La baja correlación entre las propiedades fisicoquímicas, de los sustratos y las células, y la adhesión bacteriana, estaría asociada a la formación de una capa de sustancias orgánicas provenientes del medio de cultivo y a la producción de EPS, que cambian las propiedades superficiales originales del material.

Referencias Bibliográficas.

1. Subbiahdoss G, G. D., van der Mei HC, Busscher HJ, Kuijter R. (2010) Microbial biofilm growth versus tissue integration on biomaterials with different wettabilities and a polymer-brush coating., *J. Biomed. Mater. Res. A* 94, 533-538.
2. Schumacher, J. F., Carman, M. L., Estes, T. G., Feinberg, A. W., Wilson, L. H., Callow, M. E., Callow, J. A., Finlay, J. A., y Brennan, A. B. (2007) Engineered antifouling microtopographies - effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga *Ulva*, *Biofouling* 23, 55-62.
3. Araújo, E., de Andrade, N., da Silva, L., de Carvalho, A., de Sá Silva, C., y Ramos, A. (2010) Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology, *Food and Bioprocess Technology* 3, 321-332.
4. Britland, S., Morgan, H., Wojniak-Stodart, B., Riehle, M., Curtis, A., y Wilkinson, C. (1996) Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells, *Exp Cell Res* 228, 313-325.
5. Curtis, A., y Wilkinson, C. (2001) Nantotechniques and approaches in biotechnology, *Trends Biotechnol* 19, 97-101.
6. Curtis, A. S. (2004) Small is beautiful but smaller is the aim: review of a life of research, *Eur Cell Mater* 8, 27-36.
7. Karuri, N. W., Liliensiek, S., Teixeira, A. I., Abrams, G., Campbell, S., Nealey, P. F., y Murphy, C. J. (2004) Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells, *J Cell Sci* 117, 3153-3164.
8. Karuri, N. W., Nealey, P. F., Murphy, C. J., y Albrecht, R. M. (2008) Structural organization of the cytoskeleton in SV40 human corneal epithelial cells cultured on nano- and microscale grooves, *Scanning* 30, 405-413.
9. Karuri, N. W., Porri, T. J., Albrecht, R. M., Murphy, C. J., y Nealey, P. F. (2006) Nano- and microscale holes modulate cell-substrate adhesion, cytoskeletal organization, and -beta1 integrin localization in SV40 human corneal epithelial cells, *IEEE Trans Nanobioscience* 5, 273-280.
10. Stevens, M. M., y George, J. H. (2005) Exploring and engineering the cell surface interface, *Science* 310, 1135-1138.
11. Discher, D. E., Janmey, P., y Wang, Y. L. (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* 310, 1139-1143.

12. Huebsch, N., Arany, P. R., Mao, A. S., Shvartsman, D., Ali, O. A., Bencherif, S. A., Rivera-Feliciano, J., y Mooney, D. J. (2010) Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate, *Nat Mater* 9, 518-526.
13. Ingber, D. E. (2006) Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development, *Int J Dev Biol* 50, 255-266.
14. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., y Discher, D. E. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126, 677-689.
15. Davey, M. E., y O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
16. Lichter, J. A., Thompson, M. T., Delgadillo, M., Nishikawa, T., Rubner, M. F., y Van Vliet, K. J. (2008) Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria, *Biomacromolecules* 9, 1571-1578.
17. Burton, E. A., Simon, K. A., Hou, S., Ren, D., y Luk, Y. Y. (2009) Molecular gradients of bioinertness reveal a mechanistic difference between mammalian cell adhesion and bacterial biofilm formation, *Langmuir* 25, 1547-1553.
18. Hou, S., Burton, E. A., Simon, K. A., Blodgett, D., Luk, Y. Y., y Ren, D. (2007) Inhibition of *Escherichia coli* biofilm formation by self-assembled monolayers of functional alkanethiols on gold, *Appl Environ Microbiol* 73, 4300-4307.
19. Shi, Z., Neoh, K. G., y Kang, E. T. (2005) Antibacterial activity of polymeric substrate with surface grafted viologen moieties, *Biomaterials* 26, 501-508.
20. Xu, J., Ding, G., Li, J., Yang, S., Fang, B., Sun, H., y Zhou, Y. (2010) Zinc-ion implanted and deposited titanium surfaces reduce adhesion of *Streptococcus mutans*, *Applied Surface Science* 256, 7540-7544.
21. Yoshinari, M., Oda, Y., Inoue, T., y Shimono, M. (2002) Dry-process surface modification for titanium dental implants, *Metallurgical and Materials Transactions A* 33, 511-519.
22. Gristina, A. G. (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, *Science* 237, 1588-1595.
23. Bos, R., van der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiol Rev* 23, 179-230.

24. Neu, T. R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces, *Microbiol Rev* 60, 151-166.
25. An, Y. H., y Friedman, R. J. (2000) *Handbook of bacterial adhesion. Principles, methods and applications.*, Springer, New York.
26. Blango, M. G., y Mulvey, M. A. (2009) Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations, *Curr Opin Microbiol* 12, 177-181.
27. Shapiro, L., McAdams, H. H., y Losick, R. (2002) Generating and exploiting polarity in bacteria, *Science* 298, 1942-1946.
28. Lawrence, J. R., Delaquis, P. J., Korber, D. R., y Caldwell, D. E. (1987) Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments, *Microbial Ecology* 14, 1-14.
29. Shapiro, J. A., y Hsu, C. (1989) *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video, *J Bacteriol* 171, 5963-5974.
30. Young, K. D. (2006) The selective value of bacterial shape, *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 660-703.
31. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*, *Science* 249, 926-928.
32. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*, *Cell* 61, 19-26.
33. Fraser, G. M., y Hughes, C. (1999) Swarming motility, *Curr Opin Microbiol* 2, 630-635.
34. Kirov, S. M. (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis, *FEMS Microbiol Lett* 224, 151-159.
35. Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., y Pechere, J. C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili, *J Bacteriol* 182, 5990-5996.
36. Deflaun, M. F., Tanzer, A. S., McAteer, A. L., Marshall, B., y Levy, S. B. (1990) Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*, *Appl Environ Microbiol* 56, 112-119.
37. Ito, T., Miyaji, T., Nakagawa, T., y Tomizuka, N. (2007) Degradation of dimethyl disulfide by *Pseudomonas fluorescens* strain 76, *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 366-370.

38. Gavin, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomas, J. M., Gryllos, I., y Shaw, J. G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation, *Mol Microbiol* 43, 383-397.
39. Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S., y Harshey, R. M. (2005) Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum, *EMBO J* 24, 2034-2042.
40. Ploux, L., Anselme, K., Dirani, A., Ponche, A., Soppera, O., y Roucoules, V. (2009) Opposite responses of cells and bacteria to micro/nanopatterned surfaces prepared by pulsed plasma polymerization and UV-irradiation, *Langmuir* 25, 8161-8169.
41. Celio, H., Barton, E., y Stevenson, K. J. (2006) Patterned assembly of colloidal particles by confined dewetting lithography, *Langmuir* 22, 11426-11435.
42. Dorobantu, L. S., Bhattacharjee, S., Foght, J. M., y Gray, M. R. (2009) Analysis of force interactions between AFM tips and hydrophobic bacteria using DLVO theory, *Langmuir* 25, 6968-6976.
43. Vadillo-Rodriguez, V., Busscher, H. J., Norde, W., de Vries, J., y van der Mei, H. C. (2004) Relations between macroscopic and microscopic adhesion of *Streptococcus mitis* strains to surfaces, *Microbiology* 150, 1015-1022.
44. Harrison, J. J., Ceri, H., y Turner, R. J. (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms, *Nat Rev Microbiol* 5, 928-938.
45. Teitzel, G. M., y Parsek, M. R. (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Environ Microbiol* 69, 2313-2320.
46. Harrison, J. J., Turner, R. J., y Ceri, H. (2005) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ Microbiol* 7, 981-994.
47. Young, K. D. (2007) Bacterial morphology: why have different shapes?, *Curr Opin Microbiol* 10, 596-600.
48. Barton, L. (2005) *Structural and functional relationships in prokaryotes*, Springer, New York.
49. Deupree, S. M., y Schoenfisch, M. H. (2009) Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on gram-negative pathogens using atomic force microscopy, *Acta Biomater* 5, 1405-1415.

50. Sheng, X., Ting, Y. P., y Pehkonen, S. O. (2008) The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals, *J Colloid Interface Sci* 321, 256-264.
51. Ivanova, E. P., Truong, V. K., Wang, J. Y., Berndt, C. C., Jones, R. T., Yusuf, II, Peake, I., Schmidt, H. W., Fluke, C., Barnes, D., y Crawford, R. J. (2010) Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention, *Langmuir* 26, 1973-1982.
52. Weibel, D. B., Diluzio, W. R., y Whitesides, G. M. (2007) Microfabrication meets microbiology, *Nat Rev Microbiol* 5, 209-218.
53. Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J., y van Oss, C. J. (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47-53.
54. Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., y Bellon-Fontaine, M. N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5328-5333.
55. Smets, B. F., Grasso, D., Engwall, M. A., y Machinist, B. J. (1999) Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 121-139.
56. Williams, V., y Fletcher, M. (1996) *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition, *Appl Environ Microbiol* 62, 100-104.
57. Busalmen, J. P., Berna, A., y Feliu, J. M. (2007) Spectroelectrochemical examination of the interaction between bacterial cells and gold electrodes, *Langmuir* 23, 6459-6466.
58. Lukomska, A., y Sobkowski, J. (2004) Potential of zero charge of monocrystalline copper electrodes in perchlorate solutions, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 567, 95-102.
59. Kusonwiriawong, C., Lipipun, V., Zhang, Q., y Ritthidej, G. C. (2008) Poly([alpha]-butyl cyanoacrylate) nanoparticles for intracellular delivery of protein:

- Physicochemical properties, cytotoxicity study and cellular uptake in dendritic cells, *Journal of Controlled Release* 132, e6-e8.
60. Yu, Y., y Jin, G. (2003) Study of the adsorption of fibrinogen on gold-coated silicon wafer by an impedance method, *Journal of Colloid and Interface Science* 268, 288-292.
 61. Teixeira, P., y Oliveira, R. (1999) Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates, *Journal of Adhesion Science and Technology* 13, 1287-1294.
 62. Power, L., Itier, S., Hawton, M., y Schraft, H. (2007) Time lapse confocal microscopy studies of bacterial adhesion to self-assembled monolayers and confirmation of a novel approach to the thermodynamic model, *Langmuir* 23, 5622-5629.
 63. Busscher, H. J., y Weerkamp, A. H. (1987) Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata, *FEMS Microbiology Letters* 46, 165-173.
 64. Olsson, A. L., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., y Sharma, P. K. (2010) Novel analysis of bacterium-substratum bond maturation measured using a quartz crystal microbalance, *Langmuir* 26, 11113-11117.
 65. Mumm, F., van Helvoort, A. T., y Sikorski, P. (2009) Easy route to superhydrophobic copper-based wire-guided droplet microfluidic systems, *ACS Nano* 3, 2647-2652.
 66. Ogwu, A. A. B., E.; Placido, F. (2003) The effects of sputtering conditions on the optical transmission and wettability of amorphous copper oxide thin films prepared by magnetron sputtering, *Coating Materials News* 13.
 67. Ying, P., Viana, A. S., Abrantes, L. M., y Jin, G. (2004) Adsorption of human serum albumin onto gold: a combined electrochemical and ellipsometric study, *J Colloid Interface Sci* 279, 95-99.
 68. Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., y Hirata, A. (2003) Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface, *FEMS Microbiol Lett* 223, 287-292.
 69. Curtis, A. (2004) Tutorial on the biology of nanotopography, *IEEE Trans Nanobioscience* 3, 293-295.
 70. Curtis, A., y Wilkinson, C. (1997) Topographical control of cells, *Biomaterials* 18, 1573-1583.