

Capítulo 8

Propagación de *Pseudomonas fluorescens* sobre superficies con distinta topografía.

8.1. Introducción.

Tal como se ha mencionado previamente los biofilms participan en numerosos procesos en los campos médico, industrial y ambiental. Con respecto al área médica, es de destacar que las infecciones que resultan de la colonización de materiales implantables son la principal causa de falla en los implantes. Los microorganismos que causan este tipo de infecciones son muy difíciles de erradicar debido a que desarrollan biofilms muy resistentes (1). Se ha reportado que los dispositivos implantables que resultan más

afectados por las infecciones debido al desarrollo de biofilms son (2): catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas, dispositivos ventriculares, stents coronarios, vías ventriculares neuroquirúrgicas, estimuladores neurológicos implantables y placas de sostén para traumatologías y prótesis ortopédicas. Estos procesos infecciosos podrían evitarse diseñando una estrategia que permita la inhibición de la propagación de biofilms bacterianos. Por lo tanto, uno de los mayores desafíos en el área de los biomateriales consiste en el desarrollo de sustratos con propiedades superficiales específicas que eviten la colonización bacteriana y, consecuentemente, prevengan las infecciones asociadas a biofilm.

Durante el proceso de colonización bacteriana, los microorganismos utilizan diversos tipos de movilidad y migración conocidos por su nomenclatura en inglés: *swarming*, *swimming*, *twitching*, *gliding* y *sliding* (Figura 8.1). Cabe aclarar que el término *gliding* también se utiliza para definir a un movimiento cooperativo de pequeños grupos de células en ciertos microorganismos. La migración de bacterias es un proceso que puede afectar las interacciones patógenos-huésped en animales y vegetales. Por ejemplo, la movilidad facilita tanto la colonización ascendente microbiana del tracto urinario iniciada por la formación de biofilms sobre catéteres (3-4) como la migración en suelos y raíces (5).

Swarming es el modo más rápido de traslado social superficial caracterizado por el movimiento cooperativo de bacterias que migran sobre sustratos sólidos en grupos. De acuerdo a estudios realizados en agar, el proceso de *swarming* es estrictamente dependiente de la habilidad del microorganismo para llevar a cabo un proceso de diferenciación que se caracteriza por la producción de células más largas (*swarmer bacteria*) y a veces más flageladas que las bacterias planctónicas o nadadoras (*swimming bacteria*) (6-7). Este tipo de diferenciación también se asocia con la resistencia microbiana a antibióticos (8-10).

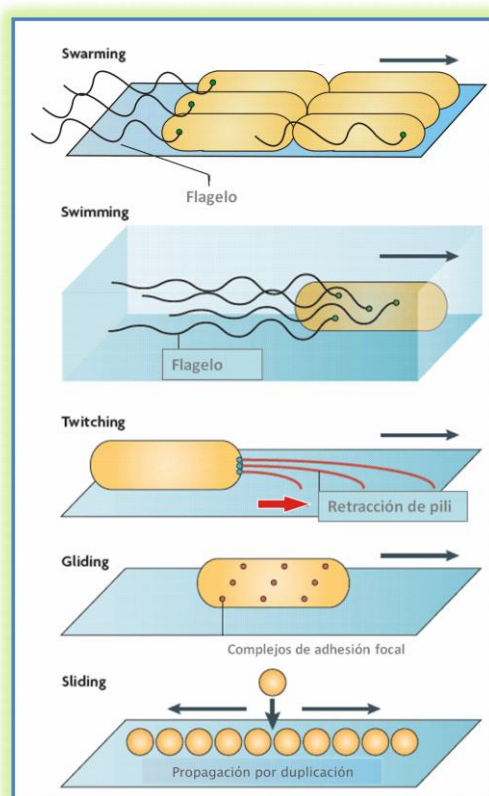


Figura 8.1 Esquema representado los tipos de movilidad que pueden realizar las bacterias sobre superficies. **Swarming** es el movimiento multicelular de bacterias sobre una superficie y está impulsado por el flagelo rotando helicoidalmente. **Swimming** es el movimiento de las bacterias individuales en medio líquido, también impulsado por la rotación del flagelo. **Twitching** es un movimiento del microorganismo provocado por la extensión del pili, que luego se adhiere a la superficie y se retrae, acercando la célula al sitio de adhesión. **Gliding** es un movimiento que no requiere la utilización del flagelo o pili pero involucra el empleo de complejos de adhesión focal. **Sliding** es un tipo de movimiento caracterizado por el desplazamiento pasivo sobre la superficie provocado por el crecimiento y facilitado por la presencia de surfactantes.

Tal como se mencionó en el Capítulo 1, las bacterias del género *Pseudomonas* son utilizadas como modelo para estudiar la movilidad social de bacterias sobre superficies sólidas (8-20). Al igual que con otros biofilms bacterianos, los biofilms de *Pseudomonas* son más resistentes a los ambientes agresivos que las respectivas bacterias planctónicas (21).

8.2. Organización espacial inicial de bacterias sobre los sustratos.

Como ya se ha descrito anteriormente (Capítulo 3), se ha elegido Au como material de estudio a causa de su biocompatibilidad, maleabilidad, y resistencia a la corrosión, especialmente en medios biológicos. Debido a esta importante característica,

podrá evaluarse la influencia de la microtopografía superficial sin la interferencia de los productos de corrosión y/o la toxicidad de los iones metálicos asociados con la corrosión metálica.

Los ensayos que se describen a continuación tienen por objetivo evaluar la migración superficial de los agregados bacterianos sin la interferencia de bacterias planctónicas. Para ello se utilizaron los sustratos Au-NSa y Au-MS1 con biofilms primitivos (formados en un breve período de tiempo) sumergidos en medio de cultivo estéril. Con el fin de facilitar el estudio, se diseñó una nueva metodología experimental (ver el esquema de la Figura 8.3) en la que la mitad de la superficie de los sustratos fue cubierta con una máscara de teflón, para evitar la adherencia de bacterias en dicha zona del metal permitiendo así el estudio de la colonización sobre superficies desnudas. Las superficies de Au parcialmente enmascaradas fueron sumergidas en el cultivo de 24 h de *P. fluorescens* para permitir la formación del biofilm inicial y, luego de 30 min, las muestras fueron retiradas del mismo y se enjuagaron con agua bidestilada estéril para remover aquellas células que no se encontraban irreversiblemente adheridas a la superficie. Seguidamente, se quitaron las máscaras de teflón y los sustratos parcialmente cubiertos por el biofilm se sumergieron completamente en medio nutritivo estéril durante diferentes tiempos (10 min, 30 min, 1 h y 2 h). Durante esos períodos, las células adheridas a la región del sustrato originalmente cubierto por el biofilm podrían colonizar el área desnuda anteriormente cubierta por la lámina de teflón.

Cabe destacar que los sustratos MS1 fueron sumergidos en el medio nutritivo estéril según dos orientaciones (Figura 8.3): (a) con los canales submicrométricos ubicados en forma paralela (Au-MS1Pa) a la dirección de avance del biofilm y (b) con los canales submicrométricos ubicados perpendiculares a la dirección de avance del biofilm (Au-MS1Pe).

Es importante hacer notar que durante los ensayos, los sustratos Au-Nsa y Au-MS1 fueron sumergidos simultáneamente en el mismo cultivo y bajo idénticas condiciones, de modo que la respuesta frente a la topografía superficial sea la única variable a analizar. Luego de los diferentes períodos de inmersión, los sustratos se enjuagaron con agua bidestilada estéril y se secaron al aire con una humedad relativa de 70 %. Los ensayos se realizaron por duplicado y tres veces en las mismas condiciones experimentales en forma independiente.

El análisis de las muestras se realizó mediante el empleo de AFM (modo contacto) y de microscopía de epifluorescencia utilizando el colorante naranja de acridina.

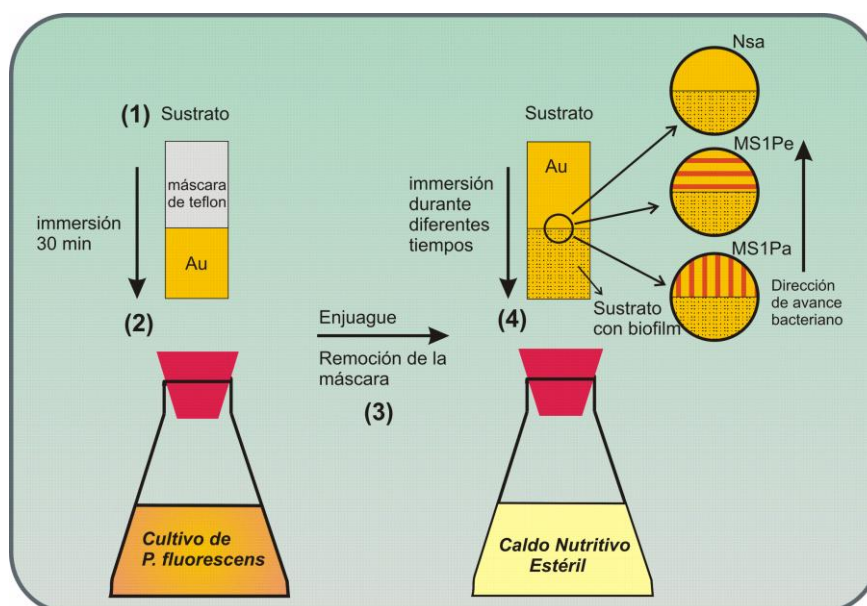


Figura 8.3 Esquema experimental de los ensayos de movilidad bacteriana sobre sustratos sólidos.

- (1) Enmascaramiento con teflón de la mitad del sustrato de Au . De esta manera sólo la mitad de la superficie estará disponible para la adhesión de bacterias.
- (2) Inmersión de los sustratos en cultivo de *P. fluorescens* durante 30 min.
- (3) Enjuague de los sustratos con agua bidestilada estéril y remoción de la máscara de teflón.
- (4) Se transfieren los sustratos sin la máscara a un medio nutritivo estéril durante diferentes tiempos. Los sustratos MS1 fueron sumergidos de acuerdo a dos orientaciones perpendicular (MS1Pe) y paralela (MS1Pa) con respecto al frente de avance.

A partir del diseño experimental previamente descrito, fue posible estudiar las etapas iniciales de la propagación del biofilm sobre los sustratos sumergidos en medio de cultivo estéril, evitando la interferencia de bacterias planctónicas.

Para una mayor claridad, se describirá en primer lugar el análisis de las primeras etapas de colonización bacteriana sobre la superficie Au-Nsa y, posteriormente, se realizará lo mismo con el sustrato microestructurado Au-MS1. En este último caso se evaluará también el efecto de las diferentes orientaciones de los canales superficiales en relación con la dirección de avance del frente microbiano.

8.2.1 Organización espacial inicial de bacterias sobre sustratos Au-NSa.

La imagen de AFM que se presenta en la Figura 8.4 corresponde al sustrato Au-NSa después de haber retirado la máscara de teflón y transcurridos 10 min de inmersión en

medio nutritivo estéril. Puede observarse cómo las bacterias comienzan a migrar y colonizar el área desnuda formando un frente o barrera primitivo que con el tiempo se va consolidando (a_1 en la Figura 8.4). Teniendo en cuenta las condiciones del ensayo, particularmente la ausencia de microorganismos planctónicos, es posible inferir que este tipo de organización se debe a la movilidad, reproducción y reorganización de las bacterias sésiles sobre la superficie. También pueden observarse los pequeños agregados, *rafts*, que se liberan del frente de avance (r en la Figura 8.4). En el recuadro superior de la Figura 8.4 se muestra un detalle, en el que se evidencia la presencia de una película, probablemente de EPS y sustancias surfactantes producidas por las bacterias adheridas. La producción de sustancias surfactantes y el agregado de células en grupos podría disminuir la energía necesaria para el desplazamiento y facilitar la movilidad colectiva. Se ha reportado (22) que la viscosidad de monocapas de surfactantes o polímeros juega un papel fundamental en los procesos dinámicos que ocurren a nivel de las interfases del fluido. Consecuentemente, la exudación de sustancias orgánicas tensioactivas podría estar relacionada con las pérdidas de energía por fricción entre las bacterias y la superficie y/o el medio líquido circundante. Por otro lado, la fuerza transmitida por el fluido sobre las superficies en contacto con él es proporcional al esfuerzo de corte y al área de contacto (23). De acuerdo a las observaciones realizadas por AFM podría estimarse que el área de contacto de una bacteria sésil con el fluido es alrededor de un 75% de la superficie total de la bacteria (el 25% restante correspondería al contacto bacteria/sólido), mientras que si esa bacteria se une a otras células lateralmente, dicha superficie se reduce a aproximadamente al 50%. Por lo tanto, la formación de grupos de bacterias en forma de balsas reduciría la superficie de contacto bacterias/sustrato, bacterias/solución respecto a la correspondiente al mismo número de bacterias aisladas, reduciendo la pérdida de energía por fricción. Esto induciría una velocidad de desplazamiento mayor, con la consecuente disminución en los tiempos de colonización.

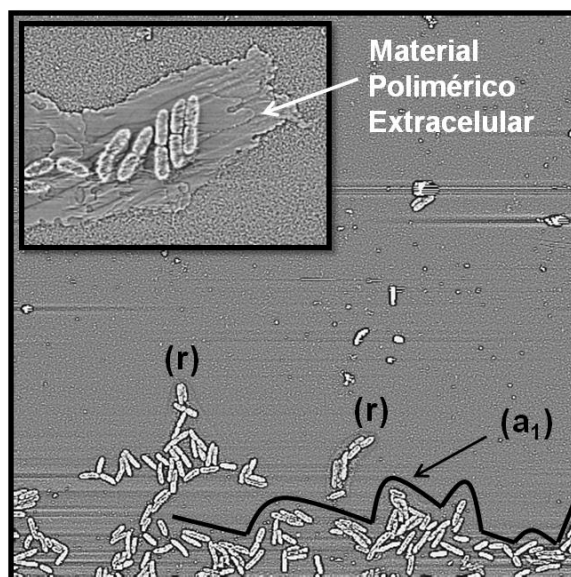


Figura 8.4 Imagen AFM topográfica (con filtro de paso alto) en modo contacto (75 μm x 75 μm) correspondiente al frente bacteriano formado sobre una superficie Au-NSa después de 10 min de inmersión en medio nutritivo estéril. Las líneas negras muestran el límite correspondiente al frente de avance. Recuadro superior: un grupo de microorganismos rodeado por una película constituida probablemente por EPS.

Una vez transcurridos 30 min de inmersión en el medio de cultivo, el frente de avance se torna más definido, con un tipo de organización celular característico para el desplazamiento tipo *swarming* (a_2 en la Figura 8.5a). El frente bacteriano consiste en una barrera de 2 a 10 microorganismos, ubicados perpendicularmente a la dirección de migración de las bacterias (flecha negra en la Figura 8.5b) y conforma un límite de avance para los cientos de microorganismos que se desplazan desde el biofilm inicial hacia la superficie desnuda colonizándola. Este borde bien definido que impide el paso de las células que se encuentran detrás, fuerza el proceso de agregación de bacterias. Además puede notarse que varios agregados de bacterias emergen desde el frente de avance (s en la Figura 8.5a) y se desprenden del mismo (r en Figura 8.4) con el objeto de colonizar áreas desnudas sin “explorar”. Este tipo de agregados bacterianos que podrían deslizarse sobre la superficie ya han sido reportados y consiste en el movimiento colectivo denominado *gliding* (24).

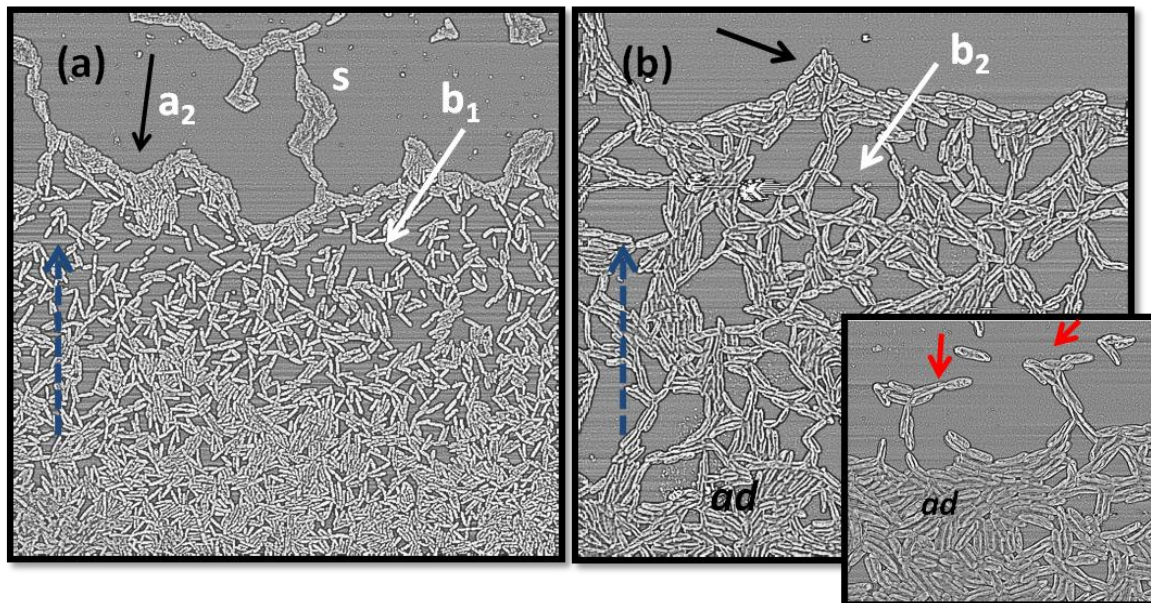


Figura 8.5 Imágenes de AFM en modo contacto (filtro paso alto). Las flechas discontinuas de color azul indican la dirección de avance. **(a)** Imagen AFM de 100 μm x 100 μm luego de 30 min de desplazamiento bacteriano. Se observa un frente bacteriano (a_2) y grupos menos densos de bacterias (b_1). **(b)** En esta imagen (60 μm x 60 μm) se observa la organización espacial microbiana más densa (b_2) luego de 2 h de desplazamiento sobre una superficie NSa de Au. En el recuadro inferior se muestra una imagen AFM (24 μm x 24 μm) en donde se observan grupos de bacterias escapando del frente de avance para colonizar nuevas zonas (s en la Figura (a)).

Un análisis detallado de las Figuras 8.4 y 8.5, permite deducir la posible secuencia de las diferentes etapas en el proceso de organización espacial sobre una superficie. El avance del frente bacteriano deja áreas libres del sustrato que son ocupadas por células individuales (b_1 en la Figura 8.5a). Estas células pueden unirse a otros agregados de bacterias dando lugar a la formación de redes sobre la superficie (b_2 en la Figura 8.5b). Estas etapas se han observado también en sistemas microorganismos-agar-aire, comúnmente utilizados en microbiología (10, 25-27). Sin embargo, a pesar de su gran importancia en medicina y odontología, no existen datos sobre colonización de sólidos opacos como los que son objeto del presente trabajo.

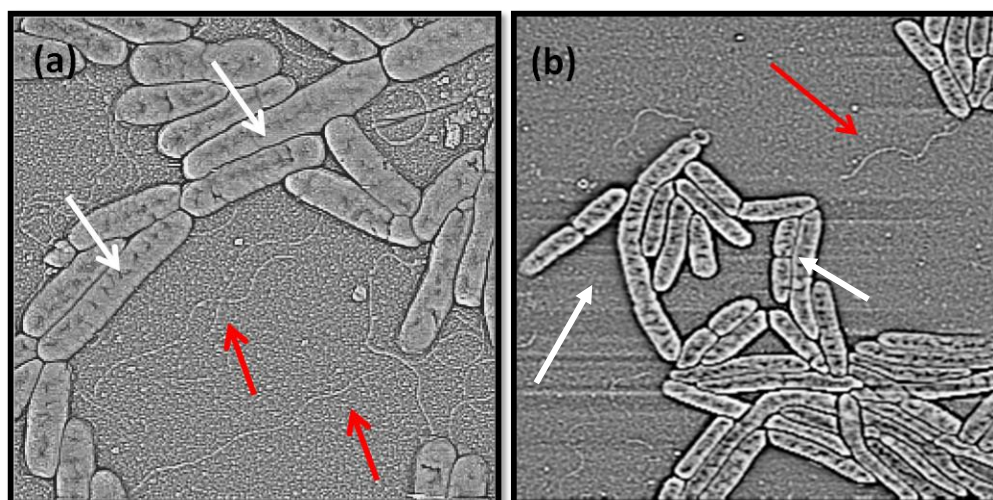


Figura 8.6 (a) Imagen AFM (10 μm x 10 μm), organización espacial bacteriana detrás del frente de avance. Las flechas blancas indican bacterias alargadas y las flechas rojas señalan la presencia de flagelos conectando microorganismos (b) Imagen AFM (15 μm x 15 μm) en donde puede observarse la presencia de flagelos conectando bacterias entre sí (flecha roja).

En las imágenes AFM correspondientes a las Figuras 8.6a y 8.6b, puede notarse que algunas de las células están particularmente elongadas (flechas blancas Figura 8.6a) con el fin de conectar pequeños agregados de células, favoreciendo la formación de redes celulares (b₂ en la Figura 8.5b). Se ha reportado que este proceso de consolidación podría estar facilitado por la transmisión de señales químicas entre células (13).

Los agregados celulares que forman redes comienzan a poblarse y a transformarse en estructuras densas de bacterias (ad en Figuras 8.5b). La presencia de flagelos durante todo el proceso de colonización de la superficie (flechas de color rojo en las Figuras 8.6a y 8.6b) podría no sólo favorecer la movilidad sobre la superficie de los agregados celulares sino también, la comunicación célula-célula que asistiría al proceso continuo de agregación bacteriana para el caso de las células individuales (10, 13).

8.2.1.1. Análisis estadístico de longitud y orientación de bacterias que se propagan sobre superficies de Au-NSa.

Para evaluar la influencia de las microestructuras superficiales sobre la orientación y tamaño de las bacterias que migran sobre las superficies NSa, se analizaron dichos parámetros sobre las células en el frente de avance y detrás del mismo.

El análisis de la longitud (Figura 8.7a y 8.7b) y la orientación (Figura 8.7c y 8.7d) de las bacterias sobre los sustratos, muestra que el 87% de las células detrás del frente de avance tienen una longitud mayor a 2,5 μm y más de un 10% de las bacterias un largo

mayor a 4 μm . Por el contrario, al evaluar las células que constituyen el frente de avance, se observó que sólo el 10% de las bacterias superan las 2,5 μm .

En la Tabla 8.1, se muestran los datos de la longitud promedio de las bacterias sobre las superficies Au-NSa dependiendo de su ubicación en el agregado (en el frente de avance o detrás del mismo). Considerando que el tamaño promedio de las células planctónicas es $1,86 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$, las células ubicadas detrás del frente ($3,21 \mu\text{m} \pm 0,57 \mu\text{m}$) son significativamente ($p < 0,05$) más largas que las bacterias planctónicas.

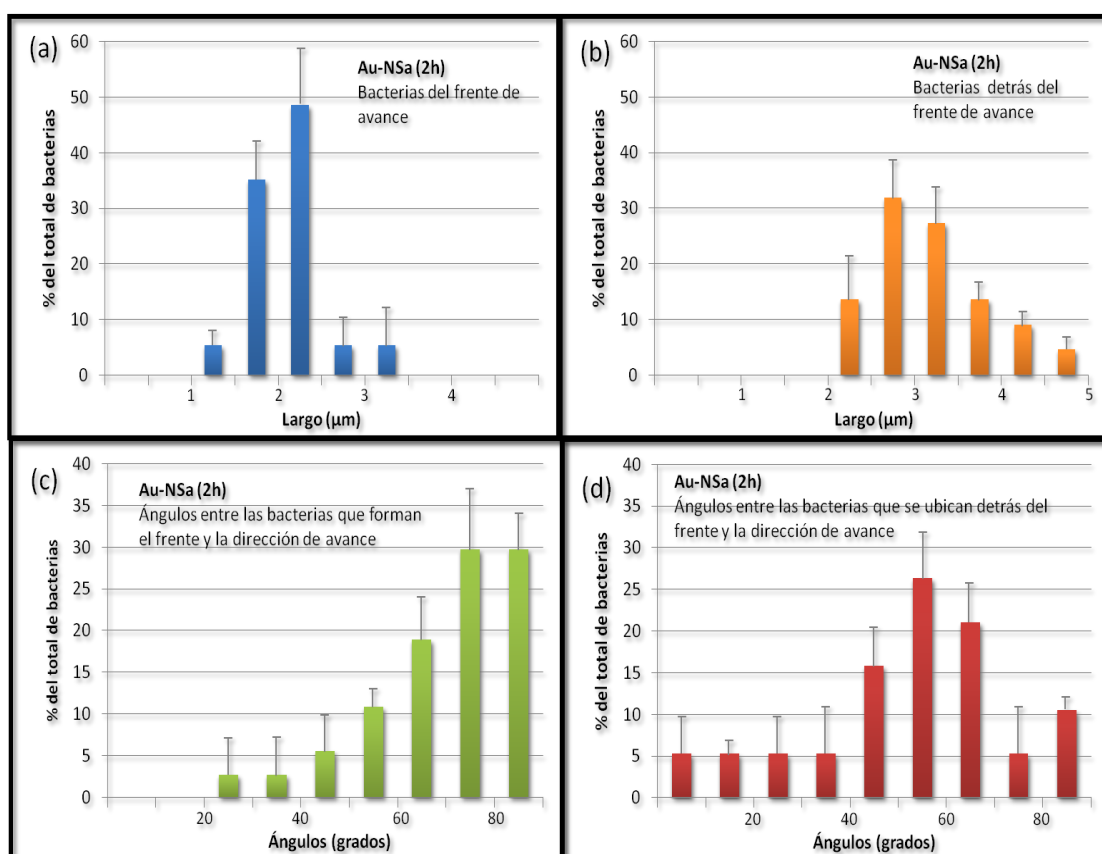


Figura 8.7 Histogramas que muestran la distribución de las longitudes de las bacterias (a y b) y las orientaciones (c y d) luego de 30 min de inmersión en medio nutritivo estéril. Los histogramas (a) y (c) corresponden a las bacterias que forman el frente de avance mientras que los histogramas (b) y (d) corresponden a las bacterias ubicadas detrás del frente de avance. Los datos fueron obtenidos a partir de las imágenes AFM.

Tabla 8.1 Longitud promedio de bacterias sobre superficies de Au-NSa.

Posición	Largo promedio (μm) ^a
Bacterias formando el frente	$2,15 \pm 0,35$
Bacterias detrás del frente	$3,21 \pm 0,57$

^a Significativamente diferente ($p < 0,05$)

La elongación de bacterias llega en algunos casos a ser muy importante llegando a alcanzar longitudes varias veces superiores a la de las bacterias planctónicas (Figura 8.8) y tal como se sugirió previamente podría considerarse una estrategia para contactar células individuales y grupos bacterianos con el objeto de formar estructuras organizadas sobre la superficie. De hecho, la elongación de bacterias ha sido descrita por otros autores (3, 7) como un proceso de diferenciación durante la formación del *raft* para favorecer el contacto célula a célula. Para lograr este aumento de longitud, las bacterias suprimen el proceso de división bacteriana (28-30). Posterior a la elongación, muchas células individuales alteran su movimiento sobre la superficie transformando el típico desplazamiento vertical de las células pequeñas, que consiste en “dar tumbos”, en otro tipo de movimiento coordinado similar a la acción de reptar hacia adelante y hacia atrás, que da lugar a la formación de una estructura ramificada organizada (25, 27). Conforme a lo dicho anteriormente, la zona interna de la red que se forma detrás del frente de avance consiste en *rafts* conectados formando estructuras ramificadas constituidas generalmente por células elongadas.

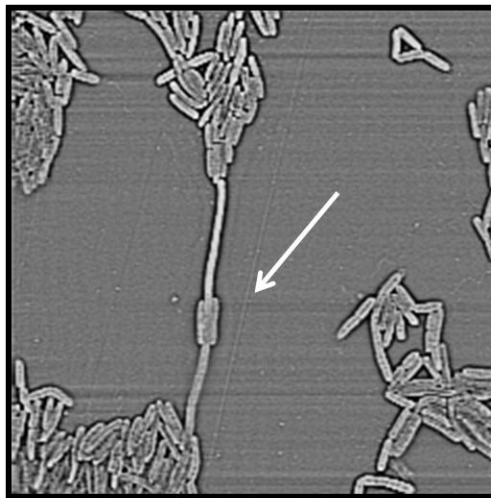


Figura 8.8. Imagen AFM (30 μm x 30 μm) en donde se observa el alargamiento de una bacteria para conectar dos grupos de células próximos.

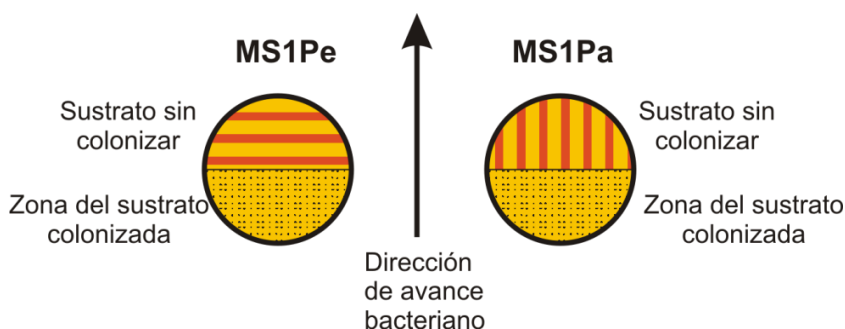
Como ha sido mencionado anteriormente, las bacterias ubicadas en el frente de avance se posicionan perpendicularmente a la dirección de avance. El 60% de las células en esta región se ubican aproximadamente perpendiculares a la dirección de avance (ángulos mayores de 70° con respecto a la misma) (Figura 8.7c). Este tipo de orientación preferida no se observa para las bacterias posicionadas detrás del frente donde el 85% presenta ángulos menores de 70° (gráfico d en la Figura 8.7).

Teniendo en cuenta que el tiempo de duplicación para *P. fluorescens* sobre superficies sólidas es de 1,2 h (31), podría considerarse que en las experiencias llevadas a cabo con tiempos de inmersión de 10 min, 30 min, 1 h y 2 h, la colonización de la superficie es principalmente debida a la movilidad bacteriana sobre la misma, sin influencia significativa del crecimiento bacteriano. Por otra parte, el efecto que sobre este tipo de ensayos (realizados en ausencia de bacterias planctónicas) ejercen las células planctónicas que se liberan del biofilm formado sobre la superficie debería ser mínimo, debido a que se ha reportado que este proceso tiene lugar luego de 4 h de exposición para el caso de *P. fluorescens* (31) y 5 h para el caso de otras especies de *Pseudomonas* (32).

8.2.2. Organización espacial inicial de bacterias sobre sustratos de Au-MS1.

En esta sección se describirá el efecto de la microtopografía superficial y la orientación de las mismas sobre la movilidad superficial bacteriana. Con el objeto de investigar el efecto de la orientación de la estructura acanalada sobre la movilidad social microbiana se ensayaron sustratos con dos orientaciones, de acuerdo al siguiente esquema (detalle de la Figura 8.3):

- MS1Pa: los canales se ubican en dirección paralela al avance microbiano.
- MS1Pe: los canales se ubican en dirección perpendicular al avance microbiano.



8.2.2.1. Organización espacial inicial de bacterias sobre las superficies MS1Pa.

El conjunto de bacterias que avanzan sobre la superficie MS1Pa (canales orientados en forma paralela a la dirección de avance de las bacterias), presenta una estructura y distribución completamente desorganizada después de 10 y 30 min de exposición al medio nutritivo estéril (Figura 8.9).

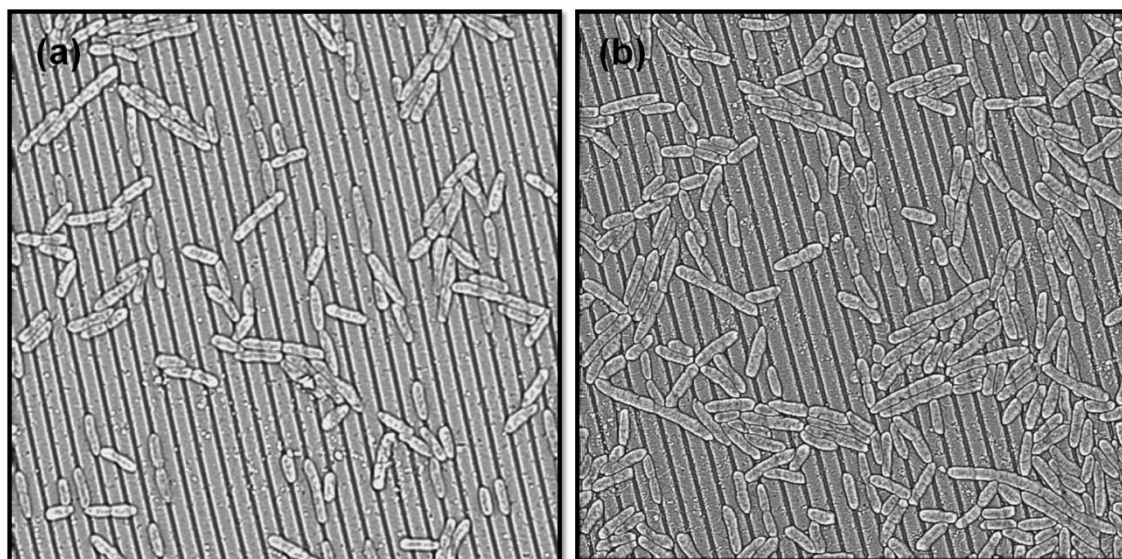


Figura 8.9 Imágenes AFM topográficas (40 μm x 40 μm , filtro de paso alto) de la disposición de bacterias sobre un sustrato MS1Pa: (a) luego de 10 min, (b) luego de 30 min en medio nutritivo estéril.

En este tipo de experimento puede observarse que la movilidad cooperativa y social de bacterias mediante la organización en *rafts* es más lenta (menor desplazamiento para el mismo período) y dificultosa (avanzan menos células) (comparar figuras 8.9b y 8.5a de 30 min de exposición y 8.10a de 1h de exposición). De hecho, los procesos necesarios para el movimiento de deslizamiento cooperativo tipo *swarming* se encuentran más obstaculizados en las superficies MS1 que en las superficies NSa. Incluso para un tiempo de exposición de 1 h y 2 h, el frente de avance constituido por células ubicadas perpendicularmente a la dirección de avance es sólo parcial y no se encuentra tan claramente definido (Figura 8.10a) como en el caso del frente formado sobre las superficies NSa (Figura 8.5a). Se ha reportado que las bacterias de los frentes de *swarming* se desplazan a lo largo del mismo y es de suponer que lo mismo ocurre sobre las superficies de Au-NSa. En la superficie MS1Pa, este movimiento está inhibido debido a la dificultad en el desplazamiento sobre esta topografía. Puede observarse en las imágenes AFM de las Figuras 8.10a y 8.10b, que los *rafts* formados después de largos tiempos de inmersión (1h) se ubican en forma oblicua a la dirección de los canales superficiales, de manera de evitar que las bacterias queden atrapadas en los mismos. Algunas de las células que están ubicadas dentro de los canales parecen ser empujadas por aquellas no atrapadas con el objetivo de apartarlas del canal (flechas blancas en la Figura 8.10b). Además, en la Figura 8.10b, se observa la aparición de células elongadas que unen pequeños grupos de bacterias sobre la superficie facilitando la agregación de bacterias (flechas negras).

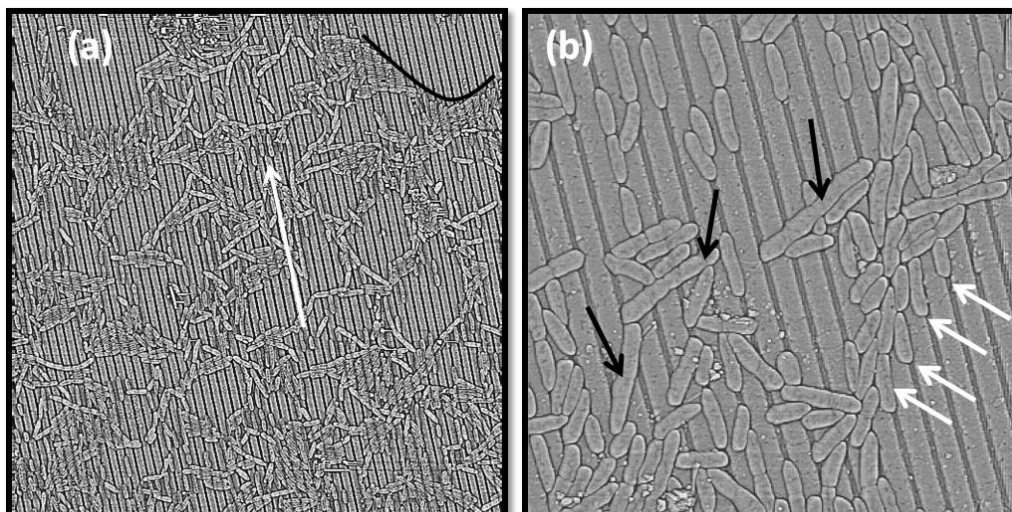


Figura 8.10 (a) Imagen AFM (80 μm x 80 μm) de la disposición de bacterias sobre un sustrato MS1Pa luego de 1 h de inmersión en medio nutritivo estéril. La línea negra indica la formación de un posible frente de avance y la flecha blanca señala la dirección de los canales superficiales. **(b)** Imagen AFM (25 μm x 25 μm) en donde puede observarse bacterias atrapadas en los canales del sustrato MS1Pa (flechas blancas) que parecen estar siendo empujadas por las células que se ubican en forma oblicua a la dirección de los canales. Las flechas negras señalan la presencia de células elongadas sobre la superficie uniendo grupos de bacterias.

8.2.2.2. Organización espacial inicial de bacterias sobre las superficies MS1Pe.

El proceso de formación de un frente de avance sobre la superficie MS1Pe (canales orientados perpendicularmente a la dirección de avance de las bacterias) se ve inhibido porque las células tienden a quedar atrapadas (Figura 8.11, flechas blancas) en los canales micrométricos de la superficie que son paralelos a la dirección del frente (Figura 8.11).

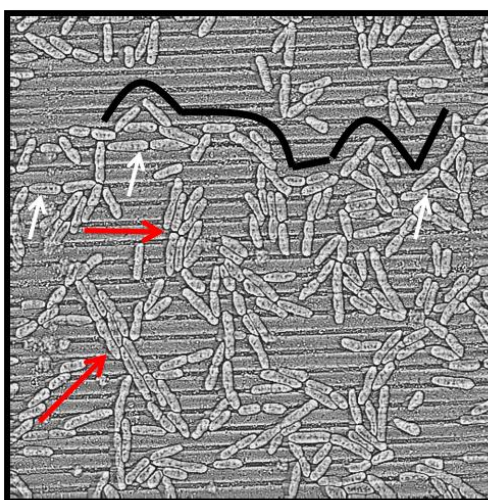


Figura 8.11 Imagen AFM (40 μm x 40 μm) correspondiente a la disposición espacial de *P. fluorescens* luego de 1h sobre un sustrato MS1Pe. La línea negra indica las etapas iniciales de formación de un posible frente de avance. Las flechas rojas señalan grupos de bacterias en contacto lateral ubicados en dirección oblicua a la dirección de los canales micrométricos superficiales.

Es interesante notar que si bien el frente de avance no se encuentra bien definido en este tipo de superficies y se desplaza lentamente, el avance global y cooperativo de bacterias parece estar menos impedido cuando la orientación de los canales es perpendicular a la dirección de avance. En este tipo de superficies se forman más fácilmente grupos de bacterias que logran reunirse y ubicarse en forma adecuada para llevar a cabo el avance global bacteriano, arrastrando eventualmente a las células atrapadas, como puede observarse en la Figura 8.12.

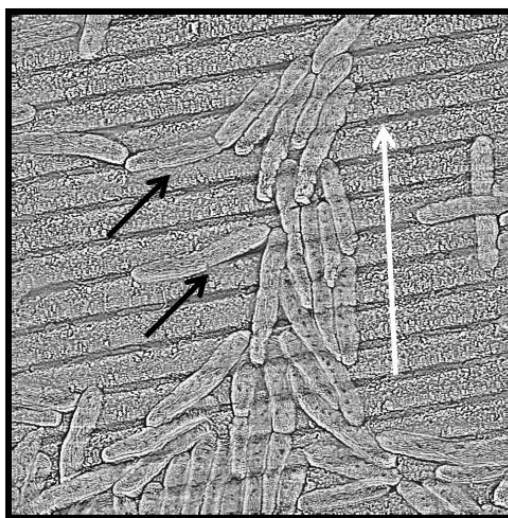


Figura 8.12 Imagen AFM (20 μm x 20 μm) de *P. fluorescens* sobre un sustrato MS1Pe. Se observa un grupo de bacterias ordenadas espacialmente para intentar desplazarse en forma conjunta sobre la superficie evitando quedar inmovilizadas dentro de los canales y arrastrando a las que se encuentran atrapadas (flecha negra). La flecha blanca indica la dirección del avance microbiano.

Lawrence y colaboradores (31), demostraron que, después de 1 h de exposición las células se adhieren sobre una superficie de vidrio, se dividen, se separan y luego ambas bacterias se desplazan para ubicarse lateralmente sobre el mismo plano (ver Capítulo 6). Este tipo de movimiento, que fue descrito detalladamente por los autores en un sustrato transparente, probablemente se encuentra inhibido para el caso de las superficies microestructuradas (MS1), impidiendo el desplazamiento de los agregados bacterianos y disminuyendo así la capacidad de colonización respecto a la de los sustratos NSa.

Los resultados muestran que el avance bacteriano de tanto la superficie MS1Pa como la MS1Pe parece ser más eficaz si la orientación de los grupos microbianos es oblicua o perpendicular a la dirección de los canales, ya que de esta manera se evita la inmovilización de células en los mismos. En ambos casos, las bacterias que se encuentran en posición oblicua a la dirección de los canales parecen estar empujando a aquellos

microorganismos atrapados. Debe tenerse en cuenta que las bacterias atrapadas en las superficies MS1 requerirán una alta energía para superar la barrera física que impone el patrón topográfico para el desplazamiento de las bacterias sobre esta superficie microestructurada.

8.2.2.3. Análisis estadístico de longitud y orientación de bacterias que se propagan sobre superficies Au-MS1.

En la Figura 8.13 se muestran los gráficos que resultan del análisis estadístico del tamaño y la orientación de bacterias sobre las superficies MS1Pa y MS1Pe.

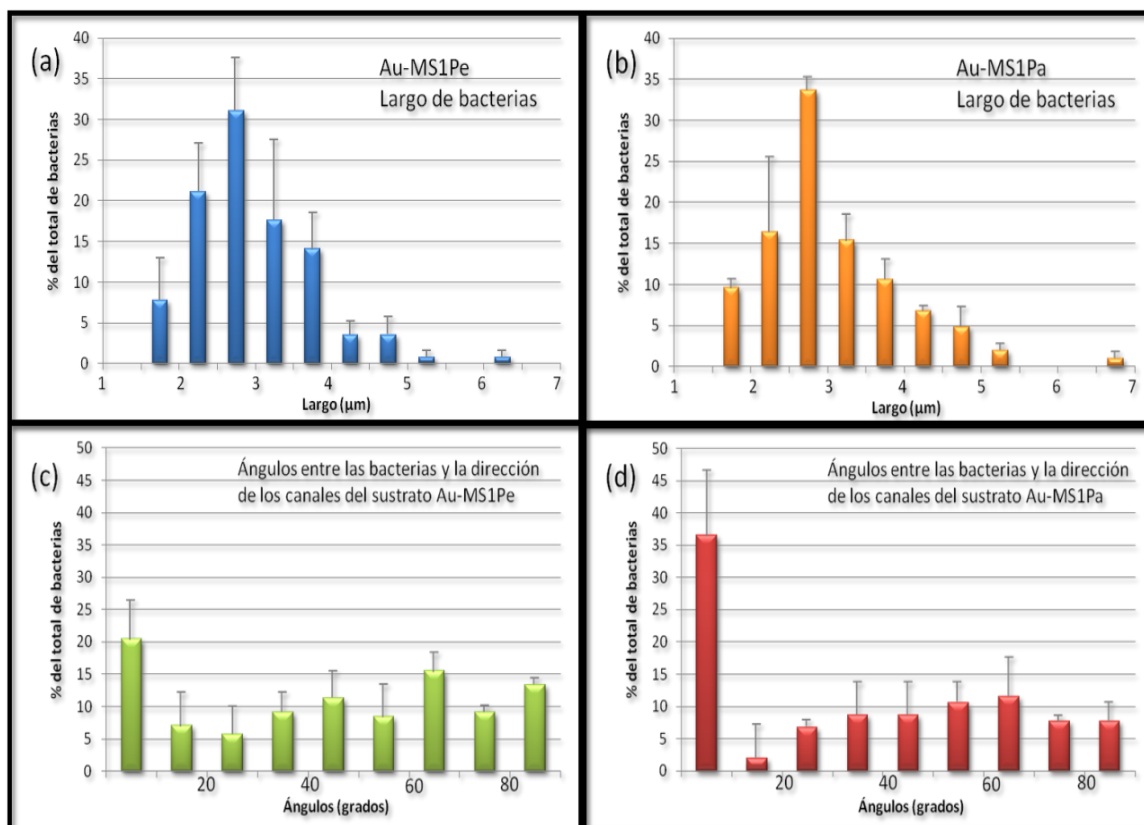


Figura 8.13 Histogramas representando la distribución de la longitud de bacterias (a y b) y la orientación (c y d) (ángulos con respecto a la dirección de los canales micrométricos superficiales) sobre sustratos MS1Pe y MS1Pa. Los datos se obtuvieron a partir de imágenes AFM de 40 μm x 40 μm.

Las Figuras 8.13a y 8.13b muestran que la distribución de tamaños de los microorganismos sobre las superficies microestructuradas con diferentes orientaciones (MS1Pa y MS1Pe) es similar en ambos sustratos.

Con respecto a la orientación de bacterias (Figuras 8.13c y 8.13d), es interesante notar que más del 35% de las bacterias se encuentran atrapadas o ubicadas casi en forma

paralela (ángulos entre 0°-19°) a la dirección de los canales superficiales en la superficie MS1Pa (Figura 13d). Esta orientación no fue tan frecuente en el caso del sustrato MS1Pe (Figura 8.13c).

En la Tabla 8.2, se muestra que el largo promedio de estas bacterias ($2,71 \pm 0,71 \mu\text{m}$) es significativamente menor que el de aquellas bacterias ubicadas en dirección oblicua a los canales ($3,13 \pm 1,06 \mu\text{m}$).

Tabla 8.2 Largo promedio de bacterias sobre superficies MS1

Orientación	Largo promedio (μm) ^a	
	MS1Pa	MS1Pe
Paralelas a los canales (Ángulos entre 0–19°)	$2,71 \pm 0,71$	$2,75 \pm 0,90$
Oblicuas a los canales (Ángulos entre 20–90°)	$3,13 \pm 1,06$	$3,21 \pm 0,76$
^a Significativamente diferente ($p < 0,05$)		

8.2.3. Comparación entre la propagación de bacterias sobre superficies NSa y MS1.

Para comparar las estrategias de colonización de *P. fluorescens* sobre las superficies Au-NSa y Au-MS1, se realizaron ensayos de movilidad similares a los descritos arriba y se analizaron los sustratos mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando la tinción con naranja de acridina, de modo de evaluar, a menor magnificación que la microscopía AFM, zonas más extensas del sustrato colonizado.

En la Figura 8.14 pueden observarse las imágenes de epifluorescencia correspondientes a la colonización bacteriana sobre sustratos Au-NSa (secuencia a-c) y Au-MS1 (secuencia d-f). Las regiones analizadas del sustrato, para las distintas distancias del frente del biofilm inicial, pueden identificarse a través de la Figura 8.15.

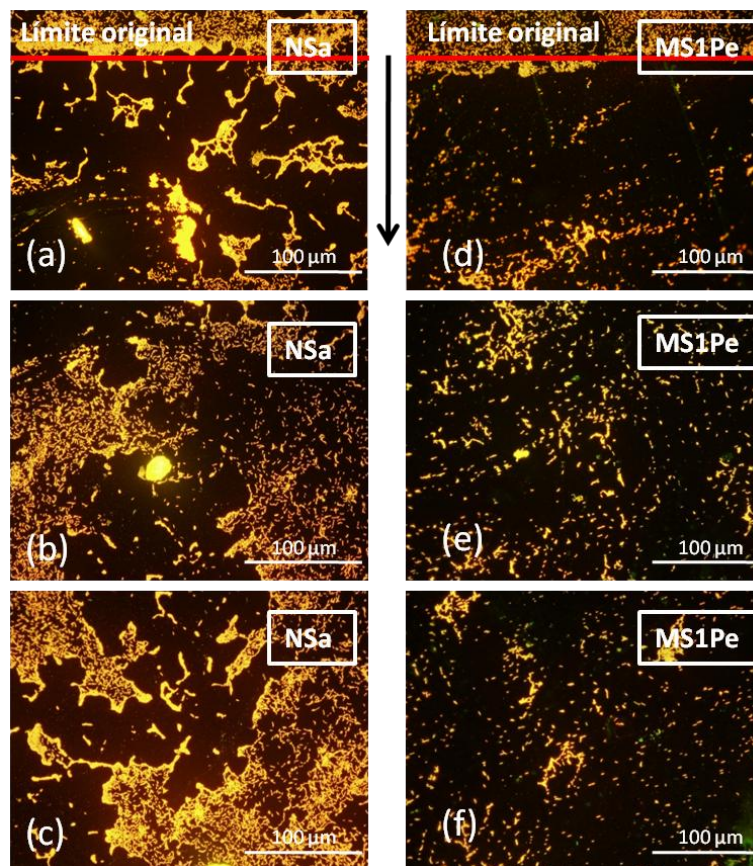


Figura 8.14 Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de la colonización bacteriana sobre sustratos NSa (a, b y c) y sustratos MS1Pe (d, e y f) luego de un período de 2 h de inmersión en medio nutritivo estéril. La línea roja en las imágenes (a) y (d) indica el límite del frente bacteriano original (antes de la etapa de inmersión en el medio de cultivo estéril). Las microfotografías muestran la colonización bacteriana a diferentes distancias (a y d: 197 μm; b y e: 435 μm; c y f: 673 μm) del frente bacteriano inicial.

Porcentaje de sustrato colonizado por *P. fluorescens* en Au-NSa y Au-MS1

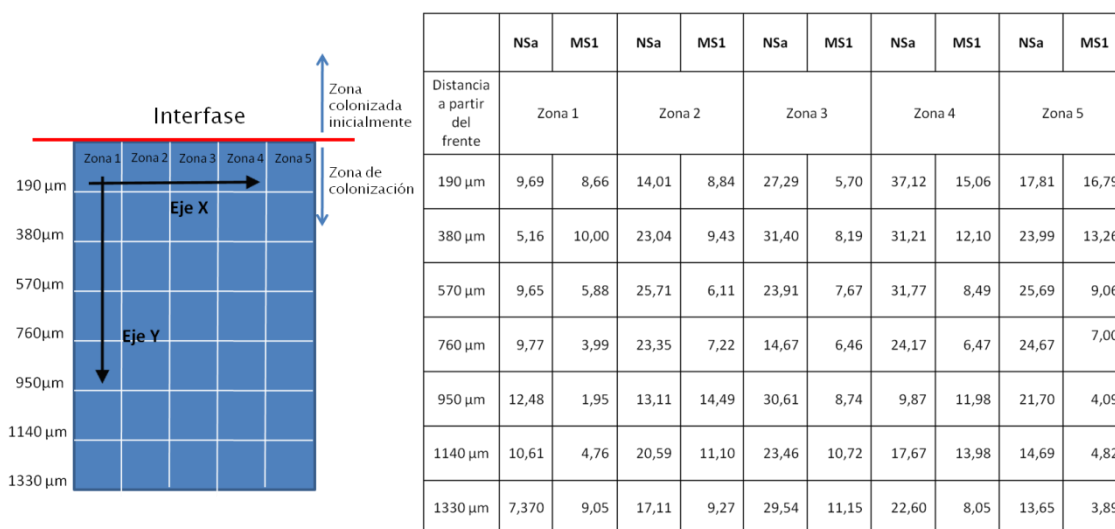


Figura 8.15. División del área total del sustrato en subáreas para evaluar en cada una de ellas el porcentaje de área colonizada (izquierda). Tabla mostrando los diferentes porcentajes de área cubierta por el biofilm de *P. fluorescens* según la zona del sustrato analizada (derecha).

Al comparar ambas secuencias de imágenes, puede observarse claramente que la superficie nanoestructurada sin patrón topográfico (NSa) se encuentra más colonizada que la superficie microestructurada (MS1). Los agregados bacterianos tipo *rafts* formados sobre la superficie lisa parecen poder desplazarse fácilmente sobre la misma. Estos extensos agregados bacterianos no se evidencian en las imágenes correspondientes a la superficie MS1. Por consiguiente, los resultados obtenidos al analizar grandes áreas de sustrato confirman las observaciones realizadas mediante AFM sobre áreas más pequeñas (Figuras 8.5 y 8.10), en el sentido que la movilidad y colonización bacteriana se encuentra impedida sobre los sustratos microestructurados (MS1).

Con el objetivo de realizar una comparación cuantitativa del área colonizada, se realizaron cálculos de los porcentajes de fluorescencia, asociados al porcentaje de área cubierta por microorganismos, a diferentes distancias del frente de colonización. Para ello se dividió el sustrato en áreas rectangulares tal cual indica la Figura 8.15. Como límite inicial se tomó la línea divisoria que había entre la máscara de teflón y la zona del sustrato colonizada inicialmente (frente de colonización).

En la Tabla asociada a la Figura 8.15 se reportan los resultados correspondientes a los porcentajes área cubierta por *P. fluorescens* según las distintas zonas del sustrato.

En el gráfico de la Figura 8.16, se compara el área cubierta por las *Pseudomonas* durante el avance sobre las superficies NSa y MS1 para diferentes distancias a partir del límite marcado por la zona colonizada inicialmente.

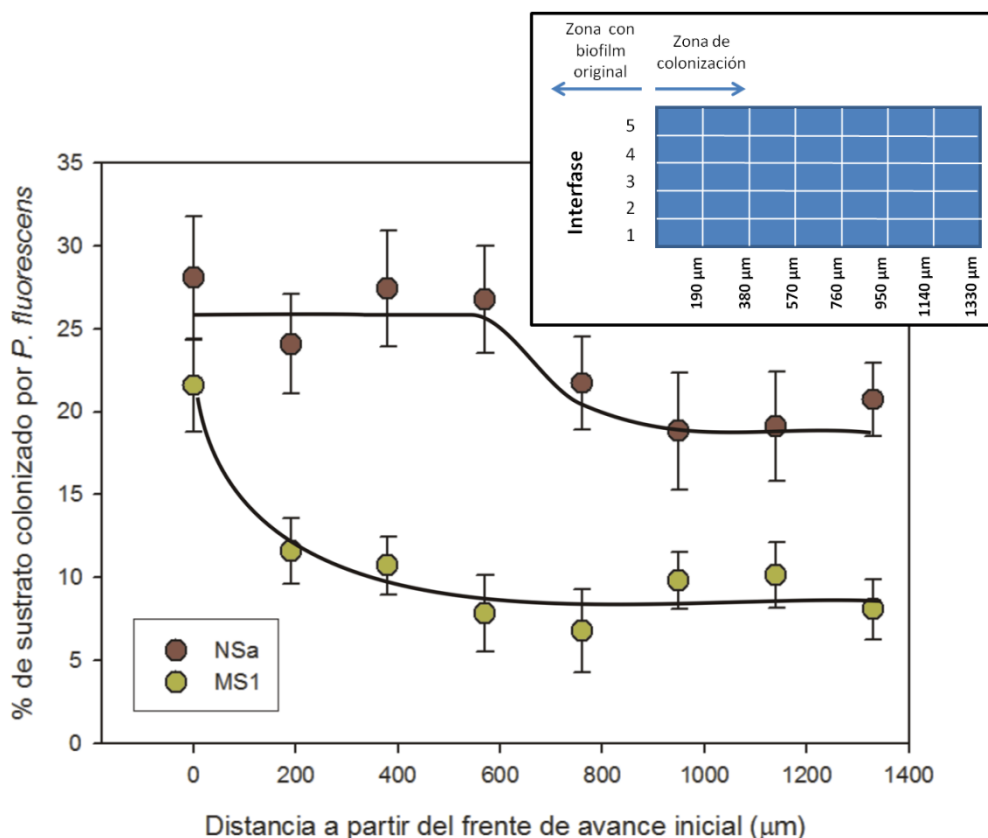


Figura 8.16 Avance del frente bacteriano evaluado a través de la distancia a partir del frente del biofilm de *P. fluorescens* para los sustratos de Au-NSa y Au-MS1. El valor correspondiente a cada distancia es el promedio obtenido del análisis de las zonas 1-5 definida de acuerdo al recuadro superior.

A partir del análisis de la Figura 8.16, es posible notar la marcada disminución de colonización de la superficie MS1 con respecto a la superficie NSa. Dicho decrecimiento se ha observado tanto para las superficies MS1Pa como MS1Pe. Según estos resultados, puede concluirse que la colonización en superficies NSa (23,5 %; cubrimiento promedio de la superficie por las bacterias) es 2,6 veces mayor que la colonización de sustratos microestructurados MS1 (9,0 %; cubrimiento promedio de la superficie por bacterias).

Estos resultados demuestran nuevamente que la movilidad social y cooperativa se encuentra inhibida en la superficie MS1.

A partir de la comparación del avance bacteriano en las distintas superficies NSa y MS1, se puede especular sobre las causas de las diferencias. Una posible alternativa es la mayor demanda energética que requeriría el desplazamiento microbiano en superficies tipo MS1 respecto al correspondiente a NSa contribuida por:

- Pérdida de energía cinética debido a la fricción de la superficie de las bacterias individuales con una superficie microestructurada.

- Dificultad en la formación y avance de los agregados bacterianos (*rafts*) debido a las características topográficas de la superficie microestructurada.
- Mayor producción de EPS con el objetivo de “alisar” la superficie rellenando canales (Figura 8.17).
- Mayores pérdidas de energía cinética por fricción debido al desplazamiento de bacterias aisladas y pequeños grupos bacterianos en forma independiente, con mayores superficies de contacto con el fluido que los agregados más extensos.
- Posible trabajo de las bacterias atrapadas destinado a superar la barrera de energía potencial que les impide escapar de los canales superficiales.
- Posible trabajo de empuje realizado por las bacterias “no atrapadas” para liberar a aquellas inmovilizadas dentro de los canales.

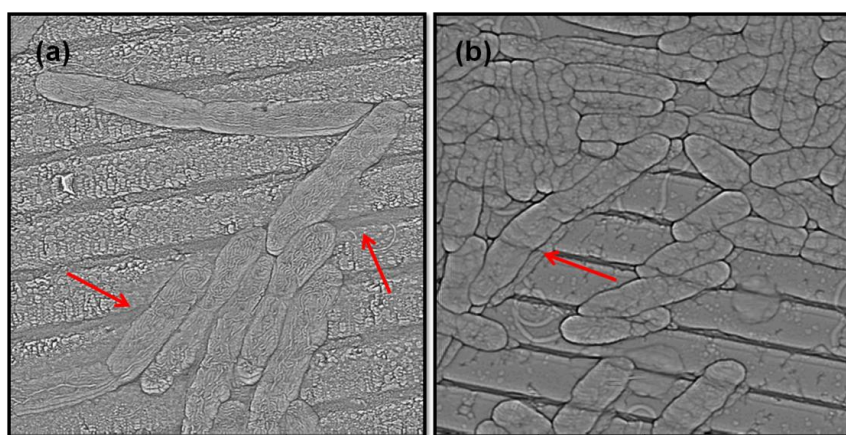


Figura 8.17 Imágenes AFM (filtro de paso alto) en las cuales se observa la presencia de EPS sobre la superficie. **(a)** ($7,5 \times 7,5 \mu\text{m}^2$) Las flechas rojas indican la presencia de material polimérico alrededor de las células. **(b)** ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) Las flechas rojas indican EPS por debajo de las bacterias.

8.3. Ensayos de propagación bacteriana sobre sustratos sólidos simulando los ensayos con agar.

Con el fin de simular los ensayos de propagación microbiana que se realizan en agar, se colocó una microgota de $10 \mu\text{l}$ del cultivo de *P. fluorescens* (10^7 UFC/ml) en el centro de los sustratos de Au-NSa y Au-MS1. El cultivo de *P. fluorescens* fue preparado a partir de un inóculo inicial de 2 ml, como ya se ha detallado anteriormente. Los ensayos se realizaron por triplicado y cada ensayo se repitió también tres veces. La microgota se mantuvo durante 1 h sobre los sustratos para que se produzca la adhesión de bacterias formando un biofilm primitivo. Posteriormente, se enjuagaron los sustratos con agua

bidestilada estéril. Las muestras control, para observación del biofilm inicial, se secaron en un ambiente estéril expuestos a temperatura ambiente y humedades relativas del 70 %. El resto de las muestras se dispusieron en placas de Petri estériles con caldo nutritivo estéril para que las bacterias puedan crecer y propagarse sobre los sustratos a partir del biofilm inicial. Dichas muestras fueron retiradas cada 30 min, se lavaron, secaron y colorearon con naranja de acridina. El análisis de los biofilms formados se realizó mediante microscopía de epifluorescencia.

En la Figura 8.18 se pueden observar imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa y de Au-MS1. La parte central coloreada más intensamente corresponde al inóculo inicial ubicado en el centro de los sustratos, similar al inóculo inicial que se coloca sobre una placa de agar. Las imágenes a y b corresponden a las muestras controles con biofilms primitivos, previos a la inmersión en medio de cultivo estéril. Se puede notar claramente que los límites de las colonias que se generan inicialmente son diferentes para ambos sustratos.

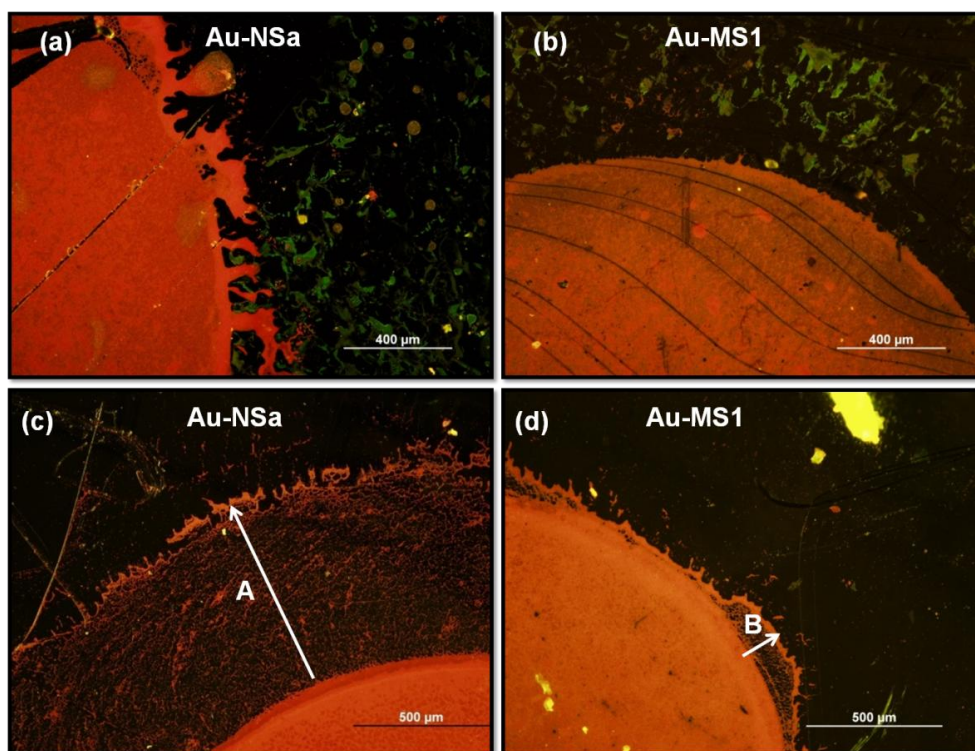


Figura 8.18 Imágenes de epifluorescencia (naranja de acridina). (a) Interfase del inóculo inicial de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (b) Interfase del inóculo inicial de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (c) Avance de *P. fluorescens* sobre sustrato de Au-NSa luego de 2 h. El segmento A corresponde a la máxima distancia de colonización (d) Avance de *P. fluorescens* sobre sustrato de Au-MS1 luego de 2 h. El segmento B corresponde a la máxima distancia de colonización.

Las imágenes de epifluorescencia c y d de la Figura 8.18 corresponden a muestras que fueron expuestas a medio nutritivo estéril durante 2 h. Estas imágenes fueron tomadas con un objetivo 10X para poder observar las distancias alcanzadas por los microorganismos. El segmento A en la Figura 8.18c corresponde a la distancia máxima de colonización a partir del borde del inóculo inicial para un sustrato de Au-NSa. El segmento B de la Figura 8.18d es la correspondiente distancia para un sustrato de Au-MS1. Las distancias que alcanzan las bacterias propagándose sobre un sustrato Au-NSa son marcadamente mayores que las distancias que pueden lograr los microorganismos sobre un sustrato Au-MS1. En la Tabla 8.3 se detallan las máximas distancias colonizadas a distintos tiempos para ambos sustratos, dando cuenta de la menor velocidad de colonización de las superficies Au-MS1.

Tabla 8.3. Máximas distancias colonizadas a distintos tiempos para Au-NSa y Au-MS1

Tiempo de inmersión en medio de cultivo estéril	Máxima distancia colonizada sobre Au-NSa	Máxima distancia colonizada sobre Au-MS1
30 minutos	312 μm	43 μm
1 hora	745 μm	437 μm
2 horas	1154 μm	618 μm

Mediante el empleo del objetivo 40X, se obtuvieron detalles de la forma de propagación bacteriana sobre los dos tipos diferentes de superficies. En la Figura 8.19, se muestran frentes de avance distintos para dichos sustratos. En la Figura 8.19a, que corresponde a la propagación bacteriana sobre un sustrato Au-NSa, se puede observar que el frente de avance microbiano que se forma (flecha blanca), es similar al de la Figura 8.4a. Además es evidente la formación de redes a partir de agregados celulares (círculo blanco), similares a las de la Figura 8.4b. Sobre la superficie de Au-MS1, no se observa este tipo de estrategias de organización espacial microbiana para propagarse sobre el sustrato (Figura 8.19b). En el recuadro inferior de la Figura 8.19a, se observa un frente de avance caracterizado por la formación de redes de bacterias detrás y la presencia de *rafts* microbianos escapando del mismo (la flecha azul indica la dirección de avance del frente).

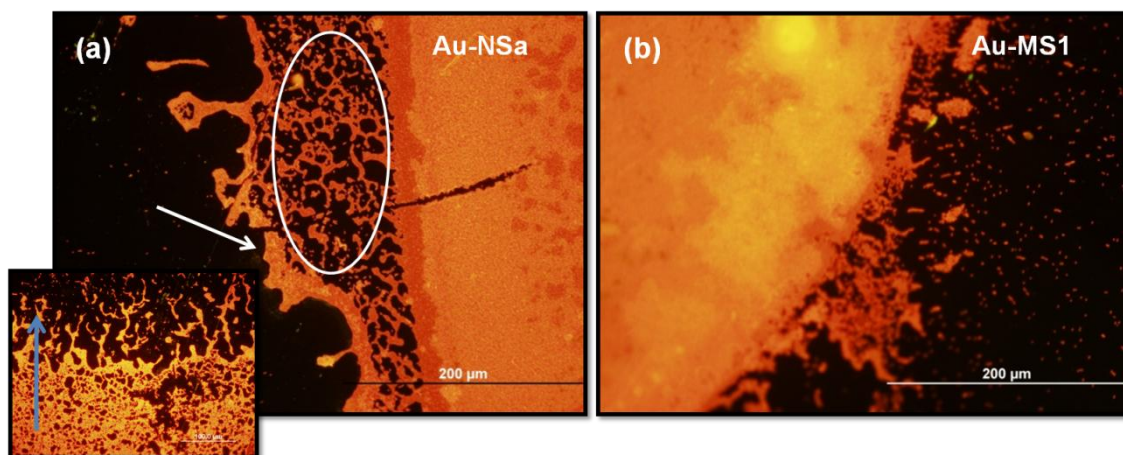


Figura 8.19 (a) Colonización de *P. fluorescens* sobre Au-NSa, la flecha blanca indica el frente de avance, el círculo blanco, las redes de bacterias. (b) Colonización de *P. fluorescens* sobre Au-MS1.

8.7. Conclusiones del presente capítulo.

A partir del análisis de la propagación de bacterias a distintos tiempos sobre una superficie de Au-NSa, se pudieron identificar las etapas iniciales del proceso de auto-organización espacial microbiano sobre una superficie sólida con el objeto de propagarse sobre la misma tal como se resume en la Figura 8.20. En primera instancia (Figura 8.20a), se define un frente de avance bacteriano con células ubicadas perpendicularmente a la dirección de avance microbiano. El avance de este frente, deja áreas desprovistas de bacterias que posteriormente son ocupadas por células individuales. En segundo lugar, los agregados celulares que avanzan pueden conectarse entre sí formando redes (Figura 8.20b). La elongación de células y la presencia de flagelos pueden facilitar este proceso. Posteriormente, algunas de las células que forman el frente bacteriano compacto pueden escapar y avanzar más rápidamente que el frente hacia zonas del sustrato no colonizado (Figura 8.20c).

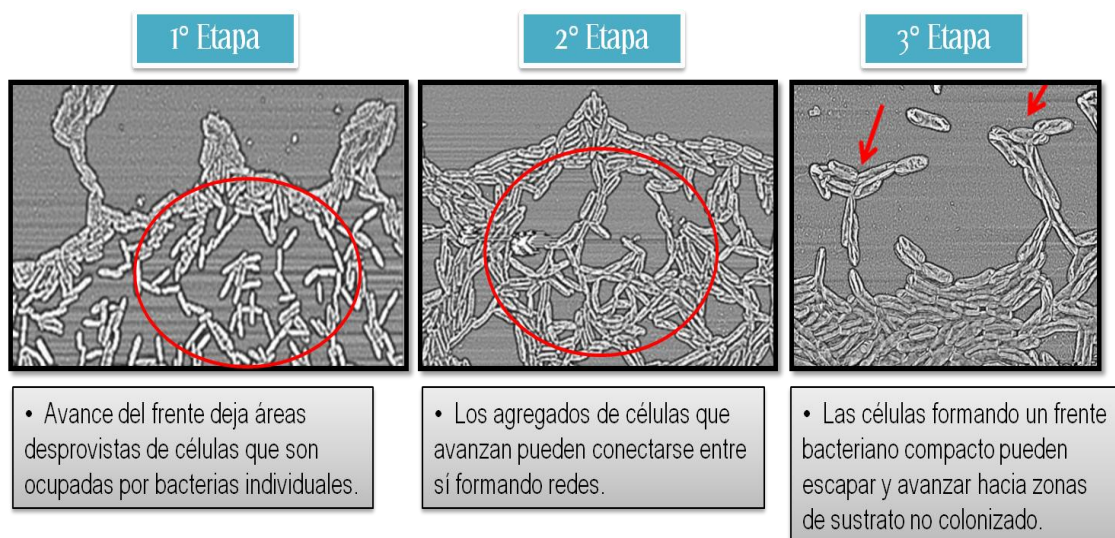


Figura 8.20 Esquema representando las etapas de auto-organización microbiano sobre una superficie de Au-NSa.

Los resultados del presente capítulo demuestran que los patrones topográficos superficiales micrométricos tienen significativa influencia en las estrategias que emplean los microorganismos para la propagación sobre un sustrato durante las primeras etapas de la formación de un biofilm. La movilidad cooperativa de los agregados celulares está dificultada y probablemente demande mayor energía sobre una superficie MS1 que sobre un sustrato NSa. Asimismo, la orientación de los canales característicos de la superficie MS1 también influye sobre la organización espacial bacteriana y sobre las estrategias de colonización. Además, tanto la orientación como el tamaño de las células adheridas manifiestan modificaciones dependiendo de la ubicación espacial dentro del desplazamiento global.

Por lo tanto, se puede concluir que la auto-organización espacial bacteriana y la propagación sobre los sustratos están altamente condicionadas por superficies con microestructuras superficiales de dimensiones similares al tamaño de las bacterias. Consecuentemente, este tipo de configuración superficial podría ser utilizada como estrategia para reducir la velocidad de colonización de los sustratos.

Referencias Bibliográficas.

1. McLean, R. J., Whiteley, M., Stickler, D. J., y Fuqua, W. C. (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms, *FEMS Microbiol Lett* 154, 259-263.
2. Costerton, J. W., Montanaro, L., y Arciola, C. R. (2005) Biofilm in implant infections: its production and regulation, *Int J Artif Organs* 28, 1062-1068.
3. Allison, C., Emody, L., Coleman, N., y Hughes, C. (1994) The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*, *J Infect Dis* 169, 1155-1158.
4. Stickler, D., Morris, N., Moreno, M. C., y Sabbuba, N. (1998) Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 649-652.
5. 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.
6. Caiazza, N. C., Shanks, R. M., y O'Toole, G. A. (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 187, 7351-7361.
7. Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Ceciliani, F., Galizzi, A., y Senesi, S. (2005) Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon, *J Bacteriol* 187, 5356-5366.
8. Doyle, T. B., Hawkins, A. C., y McCarter, L. L. (2004) The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 186, 6341-6350.
9. Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Mol Microbiol* 50, 61-68.
10. 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.
11. Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA

- release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms, *Mol Microbiol* 59, 1114-1128.
12. Hsueh, P. R., Teng, L. J., Pan, H. J., Chen, Y. C., Sun, C. C., Ho, S. W., y Luh, K. T. (1998) Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients, *J Clin Microbiol* 36, 2914-2917.
 13. Kirisits, M. J., y Parsek, M. R. (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities?, *Cell Microbiol* 8, 1841-1849.
 14. Kocoglu, M. E., Bayram, A., y Balci, I. (2005) Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system, *J Microbiol* 43, 257-259.
 15. Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K., y Parsek, M. R. (2006) Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance, *Mol Microbiol* 59, 142-151.
 16. Lequette, Y., y Greenberg, E. P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *J Bacteriol* 187, 37-44.
 17. Osawa, K., Nakajima, M., Kataoka, N., Arakawa, S., y Kamidono, S. (2002) Evaluation of antibacterial efficacy of drugs for urinary tract infections by genotyping based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *J Infect Chemother* 8, 353-357.
 18. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
 19. Pappas, G., Karavasilis, V., Christou, L., y Tsianos, E. V. (2006) *Pseudomonas fluorescens* infections in clinical practice, *Scand J Infect Dis* 38, 68-70.
 20. Ramsey, M. M., y Whiteley, M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments, *Mol Microbiol* 53, 1075-1087.
 21. Hoyle, B. D., y Costerton, J. W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog Drug Res* 37, 91-105.
 22. Petkov, J. T., Danov, K. D., Denkov, N. D., Aust, R., y Durst, F. (1996) Precise method for measuring the shear surface viscosity of surfactant monolayers, *Langmuir* 12, 2650-2653.
 23. Levenspiel, O., (Ed.) (1996) *Flujo de Fluídos e Intercambio de Calor*, Edición en español ed., Reverté.

24. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*, *Science* 249, 926-928.
25. Gallegos, A., Mazzag, B., y Mogilner, A. (2006) Two continuum models for the spreading of *Myxobacteria* swarms, *Bull Math Biol* 68, 837-861.
26. Harshey, R. M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal, *Annu Rev Microbiol* 57, 249-273.
27. Ben-Jacob, E., y Levine, H. (2006) Self-engineering capabilities of bacteria, *J R Soc Interface* 3, 197-214.
28. Belas, R., Simon, M., y Silverman, M. (1986) Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*, *J Bacteriol* 167, 210-218.
29. Jacob, E. B., Aharonov, Y., y Shapira, Y. (2004) Bacteria harnessing complexity, *Biofilms* 1, 239-263.
30. Kaiser, D. (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns, *Curr Biol* 17, R561-570.
31. 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.
32. Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M., y Greenberg, E. P. (2004) Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms, *J Bacteriol* 186, 1838-1850.