

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

“Adherencia y Colonización de *Pseudomonas Fluorescens* sobre Sustratos Sólidos:
Influencia de la Topografía y Composición
Química de la Superficie”

Carolina Diaz

Directora: Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele

Co-Directora: Dra. Patricia L. Schilardi

2011

El presente trabajo de Tesis fue realizado en forma interdisciplinaria en el Laboratorio de Biomateriales y en el Laboratorio de Nanoscopías y Fisicoquímica de Superficies del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) bajo la dirección de la Dra. Mónica Fernández Lorenzo de Mele y la co-dirección de la Dra. Patricia L. Schilardi.

Agradecimientos

Durante todo este tiempo he tenido la suerte y enorme satisfacción de conocer y trabajar con personas que me han ayudado, de una u otra forma, a concretar este trabajo de Tesis Doctoral y a las que estoy profundamente agradecida. A pesar de que el hecho de exponer una lista de personas supone un riesgo de olvidar a alguna de ellas, no quisiera dejar de hacer una mención especial a aquellas que estuvieron ahí siempre.

En principio, quiero agradecer a las Instituciones que hicieron posible la realización de la presente Tesis. A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de postgrado en la mencionada casa de altos estudios.

A las autoridades anteriores y actuales del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), los Dres. Eduardo A. Castro (ex director) y Roberto C. Salvarezza (actual director), por haberme permitido llevar a cabo mis trabajos de investigación en la mencionada institución.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ya que a través de sus becas he podido dedicarme de manera exclusiva a las investigaciones pertinentes a la presente Tesis Doctoral.

Al personal técnico, de biblioteca y de secretaría del INIFTA por haber facilitado mis tareas en estos años en que me he desempeñado como tesista en dicha Institución.

En cuanto a las personas que me han brindado todo su apoyo durante este proceso, quiero agradecerles muy especialmente a Moni y a Patri. En principio, por haber aceptado la dirección de la presente Tesis Doctoral y además por haberme brindado todo su apoyo, confianza, respaldo, paciencia, tiempo y conocimientos a través de los años en que trabajé bajo su dirección. Su capacidad de trabajo y organización me han servido como referente durante todos estos años que llevo trabajando a su lado. Las admiro tanto como profesionales como personas.

A Roberto Salvarezza por haberme brindado su tiempo y sus conocimientos para la concreción de este trabajo.

A la Dra. Pilar Carro Reglero, el Dr. Alberto Hernández Creus y Alejandro Orive del Departamento de Química Física de la Universidad de La Laguna (Tenerife, España)

por la enorme amabilidad y calidez con la que me han recibido y que me han dispensado durante mi estadía en dicha Universidad.

A toda la gente del INIFTA que me ha brindado su apoyo. A Flor y Claudia, del Laboratorio de Biomateriales. A todas las personas del Laboratorio de Nanoscopías, Connie, Fede, Caro, María Elena, Anto, Emi, Eva, Bárbara, Guillermo, Aldo, Mariano, Gastón, Julio, Francisco, Álvaro, Laura, Ale, Matías y Ceci (que ya no está en el grupo).

También quiero agradecerles a todos mis compañeros de cátedra en la Facultad por su apoyo y el tiempo compartido.

A mis amigas y amigos de La Plata, que en su mayoría compartieron todos mis hermosos años de estudio universitario. A Vale, Ceci, Maru y Vane, que siempre estuvieron y me escucharon en los momentos felices y en los que no lo fueron tanto y a mis amigos, Julio, Sergio y Lucho.

A mis amigas de toda la vida, Luz, Mali, Euge y Vir, porque a pesar de la distancia, su amistad significó mucho para mí durante estos últimos años.

A Chela, Guille, Chiche, Mili y Gucho, porque fueron un sostén muy importante y me brindaron todo su amor y apoyo cuando la distancia se hacía difícil.

A Jose, mi mamá y a Roberto, mi papá, porque gracias a la libertad que me dieron y su constante e incondicional apoyo tanto emocional como económico, pude llegar a esta instancia. Gracias por haber creído en mí e incentivarme a crecer a pesar de que eso significó alejarme físicamente de ellos. A mis hermanas, Luci, Juli y Sil, por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

Y especialmente a Martín, porque siempre confió en mí, sabía lo importante del esfuerzo que estaba realizando y porque su apoyo incondicional fue el sostén durante todo este tiempo. Por la tolerancia y paciencia de todos los días, por creer en mí y por su aliento para continuar cuando los tiempos eran difíciles. Su amor fue el ingrediente más importante para la culminación de este trabajo.

A todos, todos, gracias.

Caro

Resumen del presente Trabajo de Tesis

En el presente trabajo de tesis se estudió comparativamente la adhesión, distribución y organización espacial de las bacterias móviles, *Pseudomonas fluorescens*, y sus apéndices sobre superficies con distintas topografías, composición química y propiedades físicoquímicas. Los materiales empleados para la realización de los ensayos fueron: (1) Au, (2) Cu y (3) poliisobutilcianoacrilato (PBCA). Mediante técnicas de micro y nanofabricación se obtuvieron patrones superficiales de dimensiones características similares, mayores y menores que las de las bacterias y con distintas topografías y orientaciones. Las técnicas empleadas para la fabricación de las nano y microestructuras superficiales fueron las siguientes: (i) Microfabricación por técnicas de moldeo y replicación mediante monocapas autoensambladas (SAMs) y (ii) Microfabricación mediante deposición por métodos físicos a través de máscaras. La utilización de microscopía de fuerza atómica (AFM) permitió evaluar a nivel micro y nanométrico tanto la topografía y rugosidad de los sustratos fabricados como los procesos que ocurren en la interfase sustrato/fluido tales como cambios en la ubicación, tamaño y orientación de bacterias, flagelos y pilis, en la rugosidad de membrana celular y en la división y agrupamiento celular entre otros. A partir del detallado estudio de la adhesión y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre superficies con diferentes topografías se identificaron las características iniciales del proceso de auto-organización espacial microbiano sobre los distintos sustratos sólidos con el objeto de propagarse sobre los mismos. En base a la aplicación de los resultados y conocimientos adquiridos se logró mejorar la eficacia de los antibióticos a través del uso de superficies microestructuradas específicas.

Índice General

Capítulo 1

Descripción de biofilm, desarrollo e importancia de su estudio. Impacto de las técnicas de micro-nanofabricación en sistemas biológicos

1.1	Introducción.....	1
1.2	Importancia de su estudio.....	2
1.3	Estructura de los biofilms.....	4
1.4	Desarrollo del biofilm: Etapas.....	5
1.5	Influencia de las características fisicoquímicas del sustrato en la adhesión microbiana.....	14
1.6	Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm.....	17
1.7	Movimientos individuales y cooperativos de bacterias.....	20
1.8	Intercambio génico.....	21
1.9	Resistencia de los biofilms.....	22
1.10	Nuevas estrategias para la erradicación de biofilms.....	23
1.11	Impacto de micro/nanofabricación en sistemas biológicos.....	25
1.11.1	Micro/Nanofabricación en sistemas de células eucariotas.....	26
1.11.2	Micro/Nanofabricación en sistemas de células procariotas.....	28
	Referencias Bibliográficas.....	32

Capítulo 2

Técnicas micro-nanoscópicas utilizadas para el estudio de los biofilms

2.1	Microscopia de barrido por sondas. Microscopia de fuerzas atómicas.....	45
2.1.1	AFM Modo Contacto.....	49
2.1.2	AFM Modo Intermitente.....	50
2.1.3	AFM Modo Conductivo (c-AFM).....	52
2.1.4	AFM en el análisis de muestras biológicas.....	53
2.1.5	Análisis derivado de las imágenes AFM.....	54
2.2	Microscopia óptica de epifluorescencia.....	56
2.2.1	Tinción con naranja de acridina.....	56
2.2.2	Tinción con <i>kit</i> comercial para detección de bacterias vivas y muertas.....	57
	Referencias Bibliográficas.....	58

Capítulo 3

Preparación de las superficies micro-nanoestructuradas

3.1	Introducción.....	61
3.2	Microfabricación por técnicas de moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas.....	63
3.2.1	Superficie micro y nanoestructuradas de Au.....	67
3.2.1.1	Fabricación y caracterización de superficies de Au-MS1.....	67
3.2.1.2	Fabricación y caracterización de superficies de Au-NSnb.....	70
3.2.2	Superficie microestructuradas de Cu.....	71
3.2.2.1	Fabricación y caracterización de superficies de Cu-MS1.....	72
3.2.3	Superficie micro y nanoestructuradas de PBCA.....	73
3.2.3.1	Fabricación y caracterización de superficies de PBCA-MS1.....	74
3.2.3.2	Fabricación y caracterización de superficies de PBCA-MSg.....	75
3.2.3.3	Fabricación y caracterización de superficies de PBCA-NSa.....	76
3.3	Microfabricación mediante deposición por métodos físicos a través de máscaras.....	78
3.3.1	Fabricación y caracterización de superficies de Au-MSh.....	79
3.4	Superficies nanoestructuradas de Au y Cu.....	80
3.4.1	Caracterización de superficies de Au-NSa.....	80
3.4.2	Caracterización de superficies de Cu-NSa.....	81
	Referencias Bibliográficas.....	84

Capítulo 4

Evaluación de propiedades fisicoquímicas de sustratos

4.1	Introducción.....	87
4.2	Propiedades de mojado. Ángulos de contacto.....	88
4.2.1	Evaluación de ángulos de contacto de sustrato.....	89
4.3	Determinación de las carga superficial de los sustratos.....	92
4.4	Adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie de sustratos metálicos.....	93
	Referencias Bibliográficas.....	97

Capítulo 5

Caracterización microbiológica

5.1	Microorganismos y medios de cultivo utilizados.....	99
5.1.1	Cepa bacteriana.....	99
5.1.1.1	Técnicas de conservación de la cepa bacteriana.....	101
5.1.2	Medios de cultivo.....	102
5.2	Cultivo de <i>P. fluorescens</i> en medio líquido: Curva de calibración.....	103
5.3	Cultivo de <i>P. fluorescens</i> en medio líquido: Curva de crecimiento.....	104
5.4	Crecimiento de biopelículas sobre superficies.....	106
5.4.1	Curva de crecimiento del biofilm.....	106
5.4.2	Formación de biofilms sobre distintos sustratos.....	107
5.5	Factores que influyen sobre la adhesión microbiana.....	107
5.6	Determinación de la hidrofobicidad de la membrana celular bacteriana.....	108
5.6.1	Método de adhesión microbiana a solventes (MATS).....	108
5.6.1.1	Resultados obtenidos a través de MATS.....	109
5.6.2	Método de medida del ángulo de contacto (CAM).....	110
5.6.2.1	Resultados obtenidos a través de CAM.....	111
5.7	Determinación del tamaño de <i>P. fluorescens</i> planctónicas mediante AFM.....	111
	Referencias Bibliográficas.....	112

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.....	117
6.2	Primeras etapas en la adhesión bacteriana sobre sustratos de Au con diferentes topografías.....	120
6.2.1	Influencia de la topografía superficial sobre la distribución y tamaño de bacterias.....	122
6.2.1.1	Distribución de bacterias sobre superficies de Au-NSa y Au-MS1.....	122
6.2.1.2	Distribución de bacterias sobre superficies de Au-NSnb.....	126
6.2.1.3	Distribución de bacterias sobre superficies de Au-MSh.....	127
6.2.1.4	Comparación de imágenes microscópicas obtenidas en aire y en medio líquido.....	128
6.3	Primeras etapas en la adhesión bacteriana sobre sustratos con diferente composición química y topografía.....	130
6.3.1	Adhesión bacteriana sobre superficies NSa.....	131
6.3.2	Adhesión bacteriana sobre superficies microestructuradas (MS1 y MSg).....	135
6.3.3	Influencia del tipo de topografía superficial sobre la longitud de las bacterias.....	139

6.3.4 Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de los sustratos de distinta composición química y topografía y de <i>P. fluorescens</i> durante las primeras etapas de adhesión.....	141
6.4 Conclusiones del presente capítulo.....	148
Referencias bibliográficas.....	149

Capítulo 7

Evaluación del rol de los flagelos en las primeras etapas de formación del biofilm mediante microscopía de fuerza atómica

7.1 Introducción.....	155
7.2 Análisis de la ubicación y orientación de flagelos en superficies MS1.....	158
7.3 Análisis de la ubicación y orientación de flagelos en superficies NSa.....	163
7.4 Transferencia electrónica a través de flagelos (<i>nanowires</i>).....	168
7.5 Conclusiones del presente capítulo.....	174
Referencias bibliográficas.....	176

Capítulo 8

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

8.1 Introducción.....	180
8.2 Organización espacial inicial de bacterias sobre los sustratos.....	182
8.2.1 Organización espacial inicial de bacterias sobre sustratos de Au-NSa.....	184
8.2.1.1 Análisis estadístico de longitud y orientación de bacterias que se propagan sobre superficies de Au-NSa.....	188
8.2.2 Organización espacial inicial de bacterias sobre sustratos de Au-MS1.....	191
8.2.2.1 Organización espacial inicial de bacterias sobre las superficies MS1Pa.....	191
8.2.2.2 Organización espacial inicial de bacterias sobre las superficies MS1Pe.....	193
8.2.2.3 Análisis estadístico de longitud y orientación de bacterias que se propagan sobre superficies de Au-MS1.....	195
8.2.3 Comparación entre la propagación de bacterias sobre superficies NSa y MS1.....	196
8.3 Ensayos de propagación bacteriana sobre sustratos sólidos simulando los ensayos con agar.....	200
8.4 Conclusiones del presente capítulo.....	203
Referencias bibliográficas.....	205

Capítulo 9

Efecto de los antibióticos sobre las bacterias adheridas a sustratos con diferente topografía

9.1	Introducción.....	209
9.2	Mecanismos de resistencia de los biofilms a la acción de los antibióticos.....	211
9.3	Nuevas terapias para la erradicación de los biofilms.....	214
9.4	Características de los antibióticos utilizados.....	215
9.4.1	Penicilina.....	215
9.4.2	Estreptomicina.....	217
9.4.3	Combinación de antibióticos. Efecto sinérgico.....	217
9.5	Estudio de la eficacia de los antibióticos en bacterias planctónicas.....	218
9.6	Evaluación de la eficacia de los antibióticos sobre biofilms de <i>P. fluorescens</i> sobre superficies nano y microestructuradas.....	220
9.7	Efecto de los antibióticos sobre la estructura de la membrana bacteriana.....	230
9.8	Efecto de los antibióticos sobre la formación de microcolonias.....	232
9.9	Efecto de los antibióticos sobre el tamaño y morfología bacteriana.....	237
9.10	Conclusiones del presente capítulo.....	238
	Referencias bibliográficas.....	240

Capítulo 10

Conclusiones generales

10.1	Conclusiones generales.....	246
------	-----------------------------	-----

Abreviaturas

AFM	Microscopía de fuerza atómica
c-AFM	Microscopía de fuerza atómica conductiva
DLVO	Derjaguin, Landau, Verway y Overbeek
EPS	Material polimérico extracelular
HOPG	Grafito pirolítico altamente orientado
LFM	Microscopía de fuerza atómica lateral
MATS	Método de adhesión microbiana a solventes
MFM	Microscopía de fuerza atómica magnética
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MS1	Microestructura superficial con canales micrométricos
MSh	Microestructura superficial con hexágonos micrométricos
MSg	Microestructura superficial globular
NSa	Nanoestructura superficial sin patrón topográfico regular
NSnb	Nanoestructura superficial con nanobandas
OTS	Octadeciltriclorosilano
PBCA	Poliisobutilcianocrilato
PBS	Solución tampón de fosfatos
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PI	Punto isoeléctrico
PSD	Densidad espectral de potencia (<i>Power spectral density</i>)
PVD	Deposición física desde fase vapor
PZC	Potencial de carga cero
QS	<i>Quorum sensing</i>
Ra	Rugosidad promedio o aritmética
RMS	Desviación cuadrática media de la rugosidad
SAM	Monocapa autoensamblada
SCE	Electrodo de calomel saturado
SCLM	Microscopio confocal de barrido
SEM	Microscopía de barrido electrónico
SPFM	Microscopía potencial de superficie

SPM	Microscopía de barrido por sonda
STM	Microscopía de barrido por efecto túnel
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
%EFB	Porcentaje de eficacia biocida
%BM	Porcentaje de bacterias muertas

Capítulo 1

Descripción de biofilms, desarrollo e importancia de su estudio.

Impacto de las técnicas de micro-nanofabricación en sistemas biológicos.

1.1. Introducción.

Uno de los mayores avances en microbiología que se ha realizado en los últimos 50 años ha sido, sin lugar a dudas, el conocimiento del crecimiento y el desarrollo de microorganismos sobre diferentes superficies formando biopelículas o biofilms.

Vale la pena recordar que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- a) bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido,

b) bacterias sésiles (formadoras de biofilm), creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (1-3). Este singular comportamiento tiene profundas consecuencias en el modo de analizar la supervivencia de las células procariotas tanto en ambientes naturales o industriales como en el organismo humano.

En un principio, el estudio de los biofilms estuvo ligado al ensuciamiento biológico o *biofouling* que causaba problemas en la industria (4) definiéndose a los biofilms o biopelículas como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (5-6). Estudios posteriores, con técnicas más avanzadas permitieron a Donlan (7) en 2002 efectuar una descripción ampliamente aceptada de un biofilm, estableciendo que es “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”.

Resulta interesante que, a pesar de que los biofilms pueden estar formados por una o más especies de diferentes géneros, los mismos presentan similitudes en relación a las características estructurales y al comportamiento resultante. Por ejemplo, el tipo de estructuras observada para las microcolonias de biofilms maduros es, sorprendentemente, similar para comunidades de una o más especies que crecen en diferentes tipos de hábitats (8-10).

1.2. Importancia de su estudio.

La adhesión microbiana a superficies y posteriormente el desarrollo del biofilm han sido reportados en gran variedad ambientes. Las biopelículas constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambiente hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido.

Actualmente, la combinación de técnicas de observación tridimensionales de alta resolución, colorantes moleculares específicos fluorescentes y los equipos necesarios para el cultivo de biofilms han demostrado que las biopelículas no son simplemente agregados pasivos de células que están adheridos a una superficie, sino que son sistemas biológicos

complejos desde el punto de vista estructural y dinámico. La importancia de estas estructuras microbianas complejas reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de señales célula-célula y un grado de especialización celular. El proceso de desarrollo del biofilm es único en biología debido a que involucra la actividad coordinada de varios genomas de procariotas relativamente pequeños, en comparación con los grandes genomas eucarióticos, para generar una comunidad funcional multicelular. Esta noción modifica el conocimiento que se tenía de las bacterias debido a que las células individuales que se han estudiado en cultivos planctónicos en realidad son miembros de una comunidad multicelular cuya complejidad y sofisticación recién ha sido apreciada en las últimas décadas (11).

Se pueden encontrar biofilms en todos los medios en donde existan microorganismos: en el medio natural, clínico o industrial. Sólo se requiere la presencia de un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse en gran variedad de superficies. La presencia de biopelículas en una gran diversidad de ambientes trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas relacionados tanto con la medicina (infecciones), la industria en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento), la industria alimentaria en particular (contaminación microbiana de alimentos), el biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. Cabe aclarar también que los biofilms están relacionados con algunos procesos beneficiosos (biolixiviación, biorremediación, etc.). De allí, el significativo interés de su estudio.

Por su importancia en la salud humana la relación biofilm/infecciones merece una descripción detallada. La mayor parte de las enfermedades infecciosas del siglo pasado eran causadas por bacterias dotadas de mecanismos patogénicos específicos: difteria, tuberculosis, cólera, coqueluche, etc. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos gérmenes lograron una notable eficacia en su control. En la actualidad, la frecuencia y gravedad de las infecciones de estas bacterias han sido desplazadas del primer plano por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Diversas publicaciones recientes señalan que por lo menos el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar la formación de biofilms (1-3, 12).

En los últimos 10 años, debido a su prevalencia abrumadora, los biofilms han sido reconocidos progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal,

neumonía por *Pseudomonas*, fibrosis quística, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, y prostatitis crónica. También se ha demostrado que los biofilms se desarrollan en una variedad de dispositivos médicos implantables, provocando infecciones asociadas, destacándose entre ellas la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales. Además se han descrito en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contacto. Constituyen también un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas las cuales, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver mediante antibióticos (1, 7, 12-16).

Por otra parte, desde los años '70 se ha documentado la acumulación bacteriana en tubos endotraqueales en unidades de cuidado intensivo. La presencia de biofilms Gram-negativos en estos tubos ha sido relacionada con neumonía intrahospitalaria, presumiblemente por diseminación mecánica durante la aspiración (17).

Vale la pena recordar que la placa dental es también un biofilm. La naturaleza de la placa dental comenzó a adquirir gran importancia a partir de los mediados de los '60, poniéndose énfasis en los factores contribuyentes a la diversidad de ecosistemas, incluyendo pH, potencial de oxido-reducción y requerimientos nutricionales.

En otorrinolaringología, aunque existe escasa literatura respecto a la participación de los biofilms en enfermedades localizadas en esta área, gradualmente se está evidenciando que los biofilms poseerían un rol importante en derrame crónico en oído medio, amigdalitis crónica, sinusitis crónica, colesteatoma, e infecciones asociadas a dispositivos, tales como tubos de timpanostomía, prótesis vocales y tubos endotraqueales (18-21). Los tubos de timpanostomía son quizás los dispositivos de material foráneo más frecuentemente implantados en humanos. Se ha estudiado con microscopía, tanto electrónica como láser confocal, la influencia que tienen la superficie y las propiedades físicas del material en la formación de biofilm en estos dispositivos (22-25).

1.3. Estructura de los biofilms.

Claude Zobell fue el primero en notar la marcada preferencia de las bacterias marinas por el crecimiento sobre superficies (26) y el grupo de Costerton extendió esta observación a una gran variedad de ecosistemas microbianos incluyendo también superficies vivas como, por ejemplo, los tejidos de los organismos eucariotas (14). Este

concepto inicial sobre el crecimiento preferencial sobre superficies no insinuaba, en un principio, ningún tipo de estructura compleja del biofilm (4), y hasta el año 1987, se creía que los biofilms eran simples cúmulos de material polimérico dentro del cual se encontraban embebidas aleatoriamente las células microbianas sin ningún tipo de organización (5). Durante esta primera etapa de estudio del biofilm, una pregunta permanecía inconclusa: ¿De qué manera las bacterias dentro de la matriz polimérica tenían acceso a los nutrientes, entre ellos, el oxígeno? Esta pregunta fundamental fue respondida cuando se obtuvieron las primeras imágenes de biofilms *in vivo* con el microscopio confocal de barrido (SCLM), demostrando que las bacterias sésiles crecen dentro de microcolonias embebidas en una matriz polimérica que incluye canales abiertos. Este tipo de estructura abierta permite que el agua, presente en el ambiente en donde se desarrolla el biofilm, pueda penetrar a través de los canales y por lo tanto los nutrientes lleguen a zonas profundas de la microcolonia dentro de la comunidad del biofilm. El intercambio de nutrientes, facilitado por la arquitectura del biofilm, permite que estas comunidades desarrollen un espesor y una complejidad considerable mientras que las células individuales que las componen se mantienen en óptimas condiciones nutricionales, en muchas ubicaciones dentro del biofilm.

La formación del biofilm puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la división binaria de las células adheridas (27). El segundo mecanismo es la redistribución de las células adheridas mediante la movilidad superficial (28). Es decir que a medida que las células se dividen, las células hijas se desplazan sobre la superficie para formar cúmulos celulares, de manera similar a lo que ocurre en la formación de colonias en las placas de agar. Un tercer mecanismo de agregación es la captación de células planctónicas a partir del fluido hacia el biofilm desarrollado (29). La contribución relativa de estos tres mecanismos depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie colonizada y las condiciones físicas y químicas del medio ambiente e impacta sobre la estructura del biofilm.

1.4. Desarrollo del biofilm: Etapas.

En la mayor parte de la literatura, se describe la formación de biofilms sobre superficies a través de una serie de etapas (5, 9, 14, 30-32). Tradicionalmente, se aceptaba que la formación de la biopelícula comienza con el transporte de los microorganismos

hacia una superficie pero, en la mayoría de los ecosistemas estudiados, el transporte de masa está precedido por la adsorción de una fina película orgánica sobre dicho sustrato (33). Esta película puede cambiar drásticamente las características fisicoquímicas del sustrato dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas sobre la superficie (Etapa 1 en la Figura 1.1). La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de microorganismos (Etapa 2 en la Figura 1.1). La repulsión neta entre la superficie celular y el sustrato puede ser superada por interacciones moleculares específicas mediadas por apéndices extracelulares (por ejemplo, pilis, fimbrias y flagelos). Muchas de estas células son capaces de moverse independientemente (34) mediante los apéndices celulares llamados pilis con movimientos del tipo *twitching* o *gliding* (del inglés movimiento con contracciones o deslizamiento, respectivamente). Estas células todavía no se encuentran en proceso de diferenciación y pueden abandonar la superficie para volver al estado planctónico. Durante esta etapa reversible (35) (Etapa 2 en la Figura 1.1), las bacterias presentan ciertos comportamientos específicos como, por ejemplo, rodar, reptar, formación de agregados e hileras bacterianas (36) antes de comenzar a exudar material polimérico extracelular (EPS) y adherirse irreversiblemente (Etapa 3 en la Figura 1.1).

Las células adheridas que inician la formación del biofilm sobre una superficie están rodeadas por pequeñas cantidades de EPS. Este material polimérico está compuesto por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Los autores Davies y Geesey (37) han demostrado que en *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), los genes responsables de la producción de alginatos comienza a regularse después de los 15 min del primer contacto celular con la superficie. A medida que el biofilm madura, se desarrolla la estructura típica de las microcolonias con los espacios intercelulares o canales (Etapa 4 en la Figura 1.1) y muchas células alteran sus procesos fisiológicos (por ejemplo crecer anaeróbicamente en las zonas profundas del biofilm) en respuesta a las condiciones particulares del ambiente dentro del biofilm. Posteriormente algunas microcolonias pueden desprenderse de la superficie o pueden liberarse células individuales revirtiendo su estado a bacterias planctónicas que se desprenden de la matriz extracelular dejando espacios entre las microcolonias que pueden actuar como canales dentro de la estructura del biofilm (Etapa 5 en la Figura 1.1). Estos procesos no necesariamente se encuentran sincronizados a través de todo el biofilm sino que generalmente ocurren de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por biofilm en distintos estadios del desarrollo.

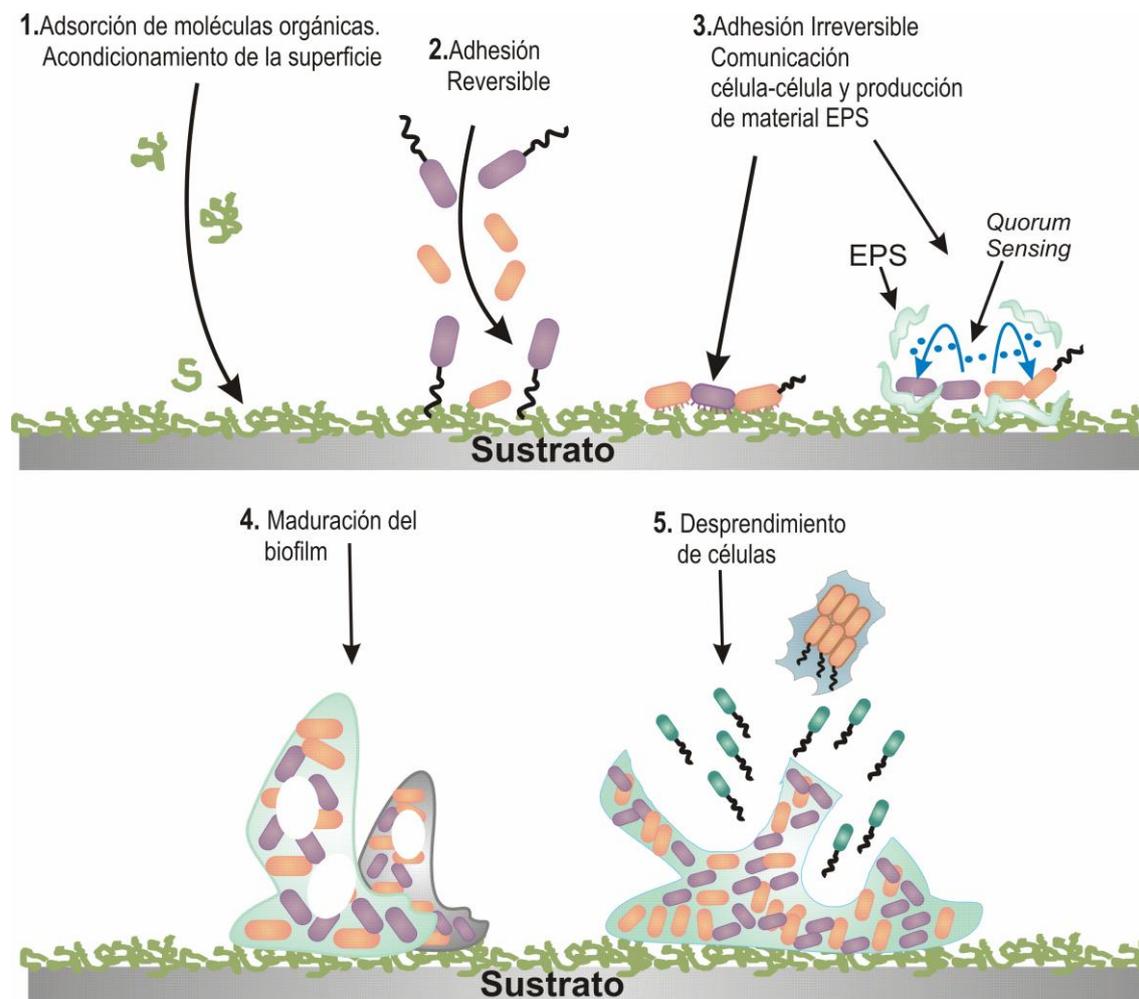


Figura 1.1. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato

Las 5 fases en el desarrollo de una biopelícula (Figura 1.1) y los procesos involucrados en ellas se describen en detalle a continuación.

ETAPA 1. Acondicionamiento de la superficie.

Existen factores externos que afectan la adhesión de las bacterias desde un medio líquido sobre un sólido.

- Factores físicos: Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, los fenómenos interfaciales, el desprendimiento y las reacciones en la interfase (38).
- Factores químicos: Los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son: la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH, el oxígeno disuelto (38).

La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies y forma lo que se conoce como “película acondicionante” (*conditioning film*), cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y tornándola más amigable para la adhesión bacteriana.

ETAPA 2. Adhesión reversible.

La adhesión primaria (reversible) de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de dos maneras:

- Activa: La motilidad, otorgada por flagelos, fimbrias y pilis tipo IV, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no parece ser un requisito esencial para el acercamiento al sustrato, puesto que bacterias Gram-positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biofilms. En el caso de las bacterias Gram-positivas se ha descrito, en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie. Una vez que llegan a la superficie pueden desplazarse sobre ella mediante movimientos individuales o grupales.
- Pasiva: Factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos pueden favorecer la adhesión de los microorganismos a cualquier superficie.

Las propiedades físicoquímicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión, que se analizará en particular en la Sección 1.4 del presente capítulo. En la adhesión bacteriana primaria pueden también influir, tal como se mencionó previamente, variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua, y concentración de nutrientes. Así, por ejemplo, se ha encontrado que la variación en la concentración de diversos cationes (sodio, calcio, hierro) afecta la adhesión de *Pseudomonas spp* a superficies de vidrio (39).

Una vez que las bacterias se encuentran cerca de la interfase, interacciones de largo alcance entre las células y la superficie del sólido determinan si la célula será atraída o repelida desde la interfase (40-42).

Frecuentemente, se tiende a predecir o interpretar el mecanismo de adhesión microbiana mediante los conceptos desarrollados en la literatura de coloides (43-45). Al respecto debe tenerse en cuenta que generalmente, se considera que las fuerzas de largo

alcance gobiernan la velocidad de deposición de una partícula coloidal cargada sobre una superficie. Estas fuerzas incluyen las interacciones de van der Waals de largo alcance y las fuerzas electrostáticas de doble capa que constituyen la base de la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (46)). Las fuerzas de van der Waals son generalmente atractivas y resultan de las interacciones entre dipolos inducidos entre moléculas de la partícula coloidal y moléculas de la superficie. Las fuerzas eléctricas de doble capa se generan a partir del solapamiento de las nubes electrónicas de los contraiones de las superficies cargadas y el cambio en la energía libre a medida que las superficies se alejan o se acercan. El resultado es una fuerza neta de atracción entre superficies cargadas opuestamente y una fuerza neta repulsiva entre superficies de cargas de igual signo.

Las expresiones basadas en la teoría DLVO para aproximar las interacciones y la energía potencial como función de la distancia de separación han sido desarrolladas y validadas para sistemas ideales en donde se asume que las superficies que interactúan son homogéneas, uniformemente cargadas y molecularmente planas. Evidentemente, estas aproximaciones claramente no se verifican para las bacterias reales, por lo que la naturaleza real de las fuerzas de largo alcance puede ser significativamente diferente. De hecho, debido a la estructura heterogénea macromolecular de las superficies celulares, existe un gran número de limitaciones al momento de aplicar la teoría DLVO en las predicciones cuantitativas de la adhesión microbiana. Entre ellas pueden mencionarse:

1. El concepto de distancia de separación requiere un límite definido entre la superficie y el medio; sin embargo, el punto de referencia para determinar la distancia de separación no es evidente en el caso de las bacterias. Por ejemplo, las cargas involucradas en cualquier interacción electrostática pueden estar difusamente dispersas en el glicocálix (material filamentoso que recubre a ciertos microorganismos) de la célula en vez de presentarse en una capa plana.
2. La longitud de la escala a partir de la cual las fuerzas ejercen su influencias (menor que 1 nm para las fuerzas electrostáticas en una solución fisiológica) es generalmente menor que el tamaño característico de las macromoléculas ubicadas en la interfase bacteria/sustrato.
3. Las interacciones estéricas o de enlace entre las macromoléculas de la interfase, particularmente las de los apéndices extracelulares (pilis, fimbrias y flagelos) pueden dominar sobre cualquier interacción tipo DLVO.

4. Las expresiones resultantes de la teoría DLVO que predicen las fuerzas *vs.* la distancia de separación asumen que las interacciones célula-sustrato se encuentran en un equilibrio termodinámico para cualquier distancia de separación. Sin embargo, a medida que la célula se acerca a la superficie, se requiere una significativa cantidad de tiempo para que las macromoléculas en la interfase se unan a la superficie del sustrato y se reorganicen durante dicho estado transitorio para obtener las configuraciones de menor energía (47-48).

Por todas las razones mencionadas anteriormente, no resulta sorprendente que la aplicación de la teoría DLVO a los estudios de adhesión microbiana haya dado resultados no coincidentes aún en el caso de la predicción de tendencias cualitativas. Por lo tanto, se necesitan teorías más detalladas y realistas que tengan en cuenta la estructura macromolecular de la superficie celular y las interacciones de enlace discretas o las repulsiones estéricas en la interfase así como otros factores biológicos. El avance hacia este tipo de teorías requiere técnicas sofisticadas de medidas de fuerzas entre las superficies, algunas de estas fuerzas podrían llegar a determinarse con un microscopio de fuerza atómica.

ETAPA 3. Adhesión irreversible.

El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Investigaciones recientes han sugerido que la transición hasta la adhesión permanente a una superficie está acompañada por cambios fisiológicos profundos (49). En esta segunda fase de adhesión, predominan las reacciones moleculares entre las estructuras superficiales bacterianas y la superficie del sustrato. Estas reacciones implican una adhesión firme entre la bacteria y la superficie mediadas por estructuras poliméricas superficiales como, por ejemplo, cápsulas, fibrilas, fimbrias, pilis y EPS. La adhesión irreversible específica puede ser definida como la unión específica entre las adhesinas bacterianas (un componente específico molecular de la superficie bacteriana) y un receptor del sustrato (un componente específico de la superficie del material o tejido superficial) estando menos afectada por factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura).

Debe tenerse en cuenta que la pared celular de una bacteria Gram-negativa como las *Pseudomonas* consta de tres regiones, una membrana exterior, una monocapa de

peptidoglicano y una membrana interior plasmática. Estas dos membranas pueden mostrar continuidad en varios puntos de adhesión y pueden también estar unidas por los cuerpos basales del flagelo.

Las cápsulas bacterianas son estructuras superficiales compuestas por polisacáridos y proteínas (50-51). En varios trabajos se ha sugerido que los polisacáridos y proteínas de la superficie celular pueden actuar como adhesinas bacterianas (50, 52).

El sello distintivo que diferencia a los biofilms de las bacterias simplemente adheridas a una superficie es que los biofilms contienen EPS que rodea a las bacterias residentes. El EPS microbiano consiste en polímeros biosintéticos que pueden variar su composición química y también polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (53). La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* hasta poly-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (5, 54-56).

El material extracelular exudado por las bacterias, es liberado por las células y luego se dispersa parcialmente en medio líquido (57). Las especies bacterianas que no producen EPS son menos adherentes y menos patogénicas (58-59). Se ha sugerido que la producción de EPS es importante durante la conexión intercelular durante la colonización superficial (60), protección contra fagocitosis e interferencia contra la respuesta inmune celular y la reducción de los efectos de los antibióticos.

Entre los componentes del EPS mejor caracterizados se encuentra el alginato, que está involucrado en la formación de biofilms por parte de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares y en sistemas de aguas industriales. La producción de alginatos está regulada en respuesta a una variedad de factores ambientales y puede activarse, por ejemplo, durante la limitación de nitrógeno, por perturbación de la membrana inducida por etanol, y en presencia de soluciones de alta osmolaridad (61-62). La producción de alginatos ocurre en la etapa inicial del desarrollo del biofilm de *P. aeruginosa*, y se supone que forma parte de la estructura necesaria para la maduración del mismo.

Las fimbrias (o pilis) son un grupo de apéndices rígidos, rectos y filamentosos sobre la superficie bacteriana. Estos pilis, pueden observarse generalmente mediante

microscopía electrónica de barrido. Sobre la superficie celular pueden encontrarse cientos de fimbrias (63-65). Se encuentran principalmente en las bacterias Gram-negativas y se cree que son estructuras adhesivas importantes sobre la superficie celular. Las fibrilas son apéndices celulares más amorfos que no presentan la estructura filamentosa regular de las fimbrias. Las estructuras fibrilares se han observado en la superficie de varios *Streptococos* y se ha reportado que contribuyen para una mejor adhesión en sustratos de hidroxapatita. (66). Los pilis sexuales son apéndices proteináceos que se presentan en bacterias donoras y cuya presencia está determinada por la presencia de plásmidos conjugados. Los flagelos están compuestos por polipéptidos que forman parte del filamento (20 nm de diámetro) y un cuerpo basal complejo que interactúa tanto con la membrana interior como la exterior (67).

Uno de los mecanismos de transición de adhesión reversible a irreversible está mediado, en algunos microorganismos como las *Pseudomonas*, por los pilis tipo IV. El pili polar tipo IV puede extenderse y contraerse, impulsando al microorganismo a través de la superficie. La movilidad superficial tipo *twitching* es una forma de desplazamiento mediado por pilis utilizada por *P. aeruginosa*. Los autores O'Toole y Kolter (34) sugieren que este tipo de movilidad es uno de los factores responsables de la formación de microcolonias. Proponen, además, que las interacciones entre bacterias sobre la superficie, formando grupos ordenados de células, refuerzan el grado de adhesión a una superficie. En el caso del microorganismo *Staphylococcus epidermidis*, se ha demostrado que las células adherentes producen un polisacárido intercelular que une a las células entre sí y facilita la formación de microcolonias y la maduración del biofilm. Por lo tanto, durante estas primeras etapas de formación del biofilm es de suma importancia tanto la movilidad superficial como la organización de los microorganismos sobre la superficie del sustrato.

Los movimientos individuales y grupales de las bacterias se discutirán específicamente en las secciones siguientes del presente capítulo junto con las formas de comunicación célula-célula que intervienen tanto en los estadios iniciales de adhesión reversible como en la adhesión irreversible, durante el desarrollo de biofilm maduro y frente a cambios en el medio circundante.

ETAPA 4. Maduración del biofilm

La siguiente etapa del desarrollo del biofilm corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias

en el sustrato (37). La densidad global y la complejidad del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante.

El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.

ETAPA 5. Desprendimiento de bacterias

El término desprendimiento es un término que se utiliza para describir la liberación de células (ya sea individualmente o en grupos) de un biofilm o sustrato. El desprendimiento activo es un evento fisiológicamente regulado, pero sólo pocos estudios (68) han demostrado la base biológica para este proceso. Allison y colaboradores (69) han reportado que luego de una extensa incubación, los biofilms de *P. fluorescens* pueden desprenderse y al mismo tiempo reducir la producción de EPS. Se ha sugerido que la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas puede conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos mediante un mecanismo aún desconocido (9). Las células del biofilm dispersadas pueden revertir su estado al crecimiento planctónico, por lo que, el desarrollo de vida del biofilm se transforma en un ciclo completo (10).

Otro punto a tener en cuenta es que una microcolonia en división continua libera residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar las superficies desnudas y para alimentar a otras células. Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, se establece el equilibrio entre el crecimiento de la colonia y el flujo laminar del agua que favorece la liberación de pocas células, pero con un flujo intenso o turbulento se pueden desprender muchas más.

Los tres principales mecanismos para generar el desprendimiento serían: (a) erosión: remoción continua de pequeñas partes del biofilm; (b) separación: remoción rápida y masiva; y (c) abrasión: liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con el biofilm. La separación es menos frecuente que la erosión, y se piensa que derivaría de la disminución de nutrientes u oxígeno en el interior del biofilm. Se

observa preferentemente en biofilms voluminosos, que se han desarrollado en medioambientes ricos en nutrientes.

La separación y erosión proporcionarían los mecanismos para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas desnudas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes. Un ejemplo de este tipo de desprendimiento es la sepsis recurrente en un paciente con un catéter infectado.

La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de los microorganismos. Los conglomerados desprendidos desde el biofilm conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos.

1.5. Influencia de las características fisicoquímicas del sustrato en la adhesión microbiana.

Por su impacto en las etapas iniciales de crecimiento del biofilm es importante analizar en detalle la influencia de las características superficiales del sustrato sobre las mismas. Al momento de analizarlas surgen inevitablemente las siguientes preguntas: ¿Es posible que la película orgánica inicial actúe como amortiguador de las propiedades del material y enmascare sus características, produciéndose una adhesión muy similar independiente del sustrato?. ¿Es posible que el sustrato transmita sus características fisicoquímicas a la película modificando el proceso de adhesión?.

Existen estudios que apoyan estas preguntas en ambos sentidos. En los párrafos siguientes se analizarán características físicoquímicas tales como energía superficial, rugosidad y carga superficial y su relación con la adsorción de compuestos orgánicos sobre el sustrato y la adherencia bacteriana.

a. Energía superficial. Hidrofobicidad

Existen superficies con alta energía superficial como el acero inoxidable o el oro y otras, como las resinas, con baja energía superficial. Una alta energía superficial del sustrato favorecería condiciones de hidrofilia y una baja energía superficial, la hidrofobia. Si la energía superficial de la bacteria es superior

que la del medio, la adhesión se ve favorecida por la hidrofilia. Por el contrario, en condiciones de hidrofobia, la energía superficial de la bacteria debe ser menor que la del medio circundante para favorecer la adhesión. De forma general, las bacterias con mayor energía superficial tendrán mayor afinidad por sustratos con mayor energía superficial y viceversa. Sin embargo, cuando el sustrato es revestido por el film proteico, éste tiene la cualidad de bajar la energía superficial de aquellos sustratos con alta energía superficial y subir la de los sustratos con baja energía superficial. Es decir, tiene un efecto amortiguador que puede enmascarar los efectos del material.

Otros estudios confirman que sólo pequeñas diferencias en la películas, pero importantes, dependen de la cepa bacteriana. Por ejemplo, una rica capa de mucinas, favorece la adhesión de *Streptococcus mutants* y baja la adhesión de *Streptococcus sanguis* (70). Estas observaciones confirmarían que algunas propiedades físicoquímicas del sustrato pueden ser transferidas a la película condicionante alterando la composición, la densidad y la configuración de la película adquirida en cuanto al tipo de proteínas, y en consecuencia, tener una influencia en las etapas iniciales de adhesión.

b. Rugosidad

En general, una gran diversidad de trabajos reportan que aquellas superficies más rugosas tienen la capacidad de retener mayor cantidad de microorganismos. Por ejemplo, la microtopografía de sustratos de acero inoxidable examinada por técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM) (71) y microscopía de fuerza atómica (AFM) (72) ha revelado que la existencia de grietas superficiales podría proveer mayor área para la adhesión celular y, posiblemente, protección frente a la limpieza y la fuerza de corte del fluido. Los autores Verran y Whitehead (73) han determinado que las superficies con rayas y grietas de tamaño similar al tamaño de las bacterias adheridas retienen mayor cantidad de células que las superficies con características topográficas de dimensiones algo mayores. Varios grupos han observado una adhesión bacteriana superior en superficies rugosas y por lo tanto concluyeron que la rugosidad superficial es un factor importante durante la adhesión bacteriana (74-75). Por el contrario, los autores Mafu y

colaboradores (76), Vanhaecke (77) y Flint (78) han propuesto que no existe una correlación entre la rugosidad del sustrato y la adhesión microbiana sobre superficies inertes. Por lo tanto, no se ha encontrado aún, si existe, una clara correlación entre la rugosidad, topografía y la adhesión microbiana.

c. *Carga superficial.*

Las células bacterianas tienen, en general, una carga negativa neta en su pared celular a pH 7 (79). Sin embargo, la magnitud de esta carga varía entre especies y está influenciada generalmente por las condiciones de cultivo (80-81), la etapa del cultivo (82), la fuerza iónica (83) y el pH (84). La carga de la superficie celular se determina generalmente mediante la evaluación del potencial zeta, calculado a partir de la movilidad de la célula bacteriana en presencia de un campo eléctrico bajo concentraciones definidas de sales y pH. La mayoría de las bacterias tienen potenciales zeta negativos a un pH fisiológico (80, 85-86). Se han reportado explicaciones disímiles con respecto a la relación entre la carga superficial del microorganismo y la adherencia a un sustrato. Una justificación para este hecho podría ser que la carga superficial bacteriana viene dada por la disociación de los grupos ácidos como los carboxilos, fosfatos, y grupos aminos como también de los grupos básicos que se encuentran en la membrana celular. En consecuencia, el potencial zeta de la bacteria depende de la fuerza iónica del medio. A mayor fuerza iónica, la disponibilidad de iones para proteger y luego neutralizar la carga superficial es mayor. La carga superficial de los sustratos inertes sobre los que las bacterias se adhieren probablemente tenga también un rol en la adhesión microbiana.

Narenan y colaboradores (87) han reportado que la adhesión bacteriana no puede ser explicada sólo por la influencia de la carga superficial celular y sugieren que la adherencia de microorganismos es un mecanismo complejo con muchos factores involucrados.

La interacción entre una superficie y una célula bacteriana parece estar mediada por un arreglo complejo de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encuentra afectada por las características físicas y químicas del ambiente al cual están expuestos tanto el sustrato como la bacteria. Los múltiples factores involucrados en la

adhesión celular reversible e irreversible dificultan la caracterización del rol y la importancia que tiene cada factor en el proceso de adhesión.

1.6. Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm.

La comunicación célula-célula ejerce también un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo del biofilm. Las bacterias utilizan una amplia variedad de mecanismos para comunicarse entre ellas y en los casos de infecciones, con sus huéspedes eucariotas. En algunos casos, las interacciones sociales permiten la sincronización del comportamiento de todos los miembros del grupo y por lo tanto actuar como organismos multicelulares. Por el contrario, algunas organizaciones sociales promueven la individualidad entre algunos de los miembros del grupo y por lo tanto la diversidad de los mismos. Existen varios tipos de mecanismos de comunicación: canales de señales químicas de largo y corto alcance; comunicación en un sentido, en ambos sentidos y en múltiples sentidos y señalización mediada por el contacto, que se describirán a continuación.

a. *Quorum sensing (QS)*

Los resultados observados por los autores Tomasz (88) y Hastings y colaboradores (89) sugieren que ciertas bacterias utilizan la producción, liberación, intercambio y detección de moléculas señalizadoras para medir la densidad poblacional y controlar su comportamiento en respuesta a las variaciones en el número de células. Durante aproximadamente 20 años se consideró que el fenómeno de señalización química entre células estaba limitado a un cierto grupo de especies. Actualmente, se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional sino que es una norma en el ecosistema bacteriano y este proceso conocido como *quorum sensing (QS)* es fundamental en la formación de biofilms (90).

El desarrollo de interacciones célula-célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias del biofilm. Esta interrelación, vía pequeñas moléculas mensajeras beneficia a la bacteria al permitirle percibir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso *QS* funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se

unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado esto, se inducen diferentes fenómenos en la bacteria, para finalmente activar la diferenciación en el biofilm.

Los procesos que controla el mecanismo de *QS* son en general improductivos a nivel de las bacterias individuales pero efectivos cuando se llevan a cabo por el grupo celular. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad, los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios (7, 13, 91).

Las principales moléculas señalizadoras o auto-inductoras que son empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las acil-homoserina-lactonas, que predominan en bacterias Gram-negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en gérmenes Gram-positivos. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar específicamente el auto-inductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (92).

Los primeros microorganismos en quienes se observó *QS* fueron especies de *Myxobacterias* y *Streptomyces*. Sin embargo, el ejemplo más conocido es la regulación de la producción de luz en el *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*), una bacteria bioluminiscente que vive como un simbiote en el órgano generador de luz del calamar hawaiano. Cuando el *V. fischeri* se encuentra en estado planctónico, el auto-inductor está en baja concentración y, de este modo, carece de luminiscencia. En cambio, en el órgano luminoso del calamar están muy concentrados (niveles mayores que 10^{11} células/ml), induciéndose la transcripción enzimática y generándose bioluminiscencia.

El estudio de esta relación simbiótica comenzó a revelar algunos de los misterios de señales célula-célula. En el *V. fischeri* se identificaron dos sistemas *QS*: *luxI* y *luxR*. Estos sistemas de señalización se han encontrado en casi todas las bacterias Gram-negativas, mientras que moléculas mensajeras célula-célula han sido detectados en más de 30 especies de bacterias Gram-positivas.

Los sistemas *lux* se han estudiado extensamente en *Pseudomonas spp* y *Escherichia coli* (*E. coli*), y se les considera necesarios para la maduración del biofilm y activación de numerosos genes de factores de virulencia. Davies (37) demostró que en la formación de biofilm en *P. aeruginosa* están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula-célula: *lasR-lasI* y *rhlR-rhII* (reguladores globales de la expresión

genética en *P. aeruginosa*). Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación del biofilm. Los mutantes incapaces de elaborar ambas señales producen biofilms notoriamente más delgados y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidos mucho más fácilmente de superficies mediante uso de surfactantes. La adición de lactona homoserina al medio que contiene los biofilms mutantes da origen a biofilms similares a los de bacterias no mutantes confirmando la participación de este tipo de moléculas en el desarrollo y estructuración del biofilm.

b. Comunicación de corto alcance

En el extremo opuesto del *QS* se encuentran las señales de corto alcance que requieren el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información. Un ejemplo de este tipo de comunicación es la formación de una estructura multicelular por parte de *Myxococcus xanthus*. Este tipo de comunicación promueve un movimiento cooperativo celular de deslizamiento sobre la superficie (*gliding*) que finalmente culmina en un cúmulo de células en el cual se lleva a cabo el proceso de formación de esporas. Durante este tipo de comunicación es esencial el contacto y la alineación entre bacterias (93-94).

Uno de los primeros mecanismos de comunicación contacto-dependiente celular conocidos es la conjugación mediada por los pilis sexuales. Las células bacterianas también pueden producir una serie de pilis diferentes y moléculas adhesivas encargadas principalmente de las interacciones bacteria-huésped. Sin embargo, es posible que algunos de estos apéndices celulares también estén involucrados en la comunicación interbacteriana. Por ejemplo, investigaciones recientes han demostrado que algunas bacterias presentes en suelos y metalo-reductoras pueden expresar redes complejas de pilis eléctricamente conductivos conocidos como *nanowires* (64-65). Se ha propuesto que los *nanowires* podrían actuar en la transferencia de electrones desde el medio ambiente hacia y entre bacterias dentro de una población celular definida. También se ha sugerido que ese sistema podría ser capaz de transmitir señales entre bacterias como un posible mecanismo para coordinar el comportamiento bacteriano grupal. Los *nanowires*, como cualquier otro pili, podrían también facilitar la formación de biofilms, independientemente de la transferencia electrónica (95). Datos recientes sugieren que la expresión de estos apéndices celulares se encuentra extensamente difundida entre grupos bacterianos metabólica y

taxonómicamente diferentes (64-65). Esto plantea la posibilidad de que estas estructuras puedan impactar en muchos procesos bacterianos, incluyendo la patogenicidad.

1.7. Movimientos individuales y cooperativos de bacterias.

En la naturaleza, las bacterias deben enfrentarse generalmente a condiciones ambientales desfavorables. Para ello han desarrollado sofisticados mecanismos de cooperación. Henrichsen ha estudiado la movilidad superficial en más de 40 especies bacterianas perteneciendo a 18 géneros diferentes y consiguió identificar varios tipos de movimiento: *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching*, *sliding* (96). Los modos *swimming* y *swarming* dependen de la presencia de flagelos; *twitching* es individual y requiere la presencia de pilis tipo IV y el movimiento tipo *gliding* es cooperativo y se produce a lo largo del eje mayor del microorganismo sin ayuda de flagelos ni de pilis. Este tipo de movimiento parece haber evolucionado independientemente en varias líneas celulares pero en general involucra el movimiento del cuerpo celular a través de complejos de adhesión focal que se unen a la superficie. La movilidad tipo *sliding* es una forma pasiva de desplazamiento sobre la superficie que no requiere un motor activo sin embargo se requiere la presencia de surfactantes que reduzcan la tensión superficial y permita la propagación de la colonia desde el origen mediante la presión ejercida por la duplicación celular. *Sliding* puede confundirse con *swarming* y puede ocurrir cuando se pierde el flagelo en bacterias que normalmente se desplazan mediante el movimiento tipo *swarming*.

Las bacterias que nadan en medio líquido (*swimming*) lo hacen en forma individual, pero durante el *swarming* los microorganismos se desplazan en grupos de células conectadas entre sí lateralmente conocidos como *rafts* (97). La formación de este tipo de *raft* es un proceso dinámico. Esto indica que ninguna sustancia o matriz mantiene la estabilidad del agregado microbiano sino que las bacterias sólo se mantendrían unidas mediante la utilización de los flagelos bacterianos.

Swarming es una manera eficiente de colonización rápida de superficies debido a la naturaleza cooperativa del movimiento (98). Los fenotipos asociados a este proceso incluyen la elongación de células, la producción de dos o más flagelos por célula y la formación de patrones de colonias. Además muchas de estas bacterias excretan surfactantes que permiten el desplazamiento sobre las superficies. Este tipo de movilidad requiere el contacto con una superficie sólida. Aún existen muchas preguntas asociadas a

este tipo de desplazamiento y cabe destacar además que todos los desplazamientos microbianos sobre superficies han sido estudiados principalmente sobre superficies de agar. El estudio del desplazamiento tipo *swarming* es muy importante ya que el mismo está asociado a la formación de biofilms sobre superficies y a ciertos mecanismos de resistencia bacteriana frente a antibióticos como así también para profundizar en el conocimiento de la fisiología del comportamiento multicelular de los microorganismos. Este tipo de comportamiento se describirá con mayor detalle en el Capítulo 8.

1.8. Intercambio génico.

Las bacterias de los biofilms poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes planctónicas, que da lugar a bacterias fenotípicamente distintas respecto a aquéllas. En los últimos años diversos grupos de investigadores han orientado sus esfuerzos intentando identificar, tanto los genes responsables de la transición biofilm/planctónica, al igual que aquellos que están expresados únicamente en biofilms y que son indispensables para mantener su particular estructura. Se ha encontrado que hasta el 30% de los genes puede expresarse de manera diferente entre la misma bacteria desarrollada en condiciones planctónicas o en un biofilm (1-3, 16).

Los biofilms hospedan un medioambiente muy dinámico, donde se intercambia material genético tal como plásmidos (ácido desoxirribonucleico extracromosómico), enzimas y otras moléculas. Estudios recientes postulan que la matriz de biofilms de *P. aeruginosa* contiene ácido desoxirribonucleico como constituyente principal (99-101). Estos estudios, combinados con otros que muestran una tasa de transferencia génica mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre las bacterias de los biofilms (102), sugieren que la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva.

Se ha planteado que cepas bacterianas de importancia clínica unidas a plásmidos desarrollan biofilms más fácilmente (103-104). Se ha observado, además, que cepas portadoras de plásmidos transfieren éstos a organismos receptores, generando la formación del biofilm. Sin plásmidos asociados, estos mismos gérmenes producen únicamente microcolonias de escaso desarrollo. Debido a que los plásmidos pueden codificar resistencia a múltiples antimicrobianos, su asociación al biofilm proporciona también un mecanismo para selección e incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

1.9. Resistencia de los biofilms.

Para desarrollar estrategias capaces de erradicar los biofilms es necesario analizar previamente los mecanismos de resistencia que los caracteriza. Se ha podido demostrar que las células de las biopelículas pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas correspondientes a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono (105-111). Se han descrito dos tipos de resistencia bacteriana, la correspondiente a las bacterias planctónicas que son resistentes a los medicamentos y que está asociada a alguna mutación de genes y la de las bacterias que crecen dentro de biopelículas presentando una mayor barrera frente a biocidas, desinfectantes o agentes antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica (112-113).

En el caso de las bacterias planctónicas o pequeños grupos de cepas, la resistencia se entiende como la habilidad de los microorganismos para crecer en presencia de una elevada concentración de biocida ó al incremento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dicho agente antimicrobiano, necesaria para detener el crecimiento celular. Los biofilms en cambio, presentan diversos mecanismos de resistencia que se describen a continuación.

- *Penetración restringida y degradación de antibióticos.*

La penetración de los agentes antimicrobianos en el biofilm está restringida por la presencia de exopolisacáridos de la matriz que limitan la difusión de sustancias y por la unión del antimicrobiano a las bacterias externas proporcionando una efectiva resistencia a las células del interior de la biopelícula.

- *Baja tasa de crecimiento.*

Generalmente todos los antibióticos son más efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida para que algunos antibióticos puedan atacar. Por ese motivo, la disminución de la tasa de crecimiento dentro de ciertos sectores del biofilm es una estrategia efectiva para la supervivencia de dichas células. Otro mecanismo que contribuye indirectamente a la disminución del crecimiento es el gradiente de concentración de oxígeno y pH que se establece dentro del biofilm. Así por ejemplo el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente sobre la eficiencia de ciertos antibióticos.

- *Cambios fenotípicos.*

Las bacterias expresan genes en respuesta a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños de ADN, los cuales se transfieren entre ellas logrando un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes. Entre ellos pueden mencionarse la galactocidasa, la cual es expresada en respuesta al Imipenen (114) y la Piperamicina, así como las bombas de difusión de multiresistencia a los medicamentos como la expresada por *E. coli* en respuesta al cloramfenicol (115).

- *Persistencia bacteriana.*

La persistencia, último factor considerado recientemente, se relaciona con la capacidad de un cierto número de células del biofilm de resistir al ambiente agresivo. Las bacterias de las biopelículas no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos.

Estos factores son usados tanto solos o en combinación para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.

1.10. Nuevas estrategias para erradicación de biofilms.

A través del conocimiento de las características y etapas de desarrollo de los biofilms se posibilita la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y prevención tanto en el ámbito médico como el industrial. Así por ejemplo, una posible alternativa química para disminuir la fijación de *Pseudomonas sp* a superficies incluye el uso de agentes quelantes, que limitan el hierro soluble, el cual es necesario para la adhesión de los pili (91). El xilitol, un alcohol natural del azúcar administrado bajo la forma de jarabe o goma de mascar, ha mostrado una efectividad clínica significativa en prevenir caries y disminuir la incidencia de otitis media en niños, posiblemente vía reducción de mecanismos de adhesión bacteriana.

Debido a que la persistencia que presenta el biofilm depende de la agregación de bacterias en comunidades multicelulares, una alternativa puede ser desarrollar estrategias para impedir la formación de su estructura compleja. Si la multicelularidad del biofilm es inhibida, es posible que las defensas del huésped sean capaces de resolver la infección logrando, de esta manera, restituir la eficacia de los antibióticos.

Otras terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz del biofilm y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula-célula, indispensables para la formación de un biofilm (105).

Se ha demostrado que los antibióticos macrólidos parecen inhibir la síntesis de polisacáridos y, de esta manera, reducirían la protección de la matriz del biofilm. Estos antimicrobianos podrían tener un efecto inmunomodulador logrando impedir señales bacterianas. El tratamiento de biofilms con claritromicina reduce la matriz que cubre el biofilm, tanto de *P. aeruginosa* como de *S. epidermidis*, aunque las bacterias mismas sean resistentes al antibiótico.

Finalmente, otras dos estrategias promisorias son cambios en el medioambiente a través de la inhibición competitiva por otras bacterias (116-117) (por ejemplo, microorganismos competidores como *Streptococcus gordonii* dificulta la formación de biofilm de *Streptococcus mutans* reduciendo su acción como agente productor de caries) o el incremento de la presión de oxígeno (118) (en pacientes con tubos de timpanostomía).

Se ha identificado una molécula denominada “furanona”, producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acil-homoserinalactonas. Estas moléculas bloquean el sistema *quorum sensing* y la consiguiente formación de biofilm. En la actualidad se intenta desarrollar inhibidores de la formación de biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica (119).

La llamada biomedicina, así como otras nuevas disciplinas, como la biotecnología, la genómica o la proteómica, persiguen también la creación de nuevos materiales que puedan dar lugar al desarrollo, por ejemplo, de tejidos y órganos artificiales biocompatibles, células madre, contenedores de tamaño molecular e inteligentes para la dosificación controlada de fármacos, proteínas bioactivas y genes, chips de ADN, dispositivos de bombeo, válvulas altamente miniaturizadas, los polímeros, altamente biodegradables y medioambientalmente limpios, a partir de microorganismos para evitar la utilización de derivados del petróleo como materia prima, y un sinnúmero de posibilidades.

Por último, un campo muy prometedor para desarrollar materiales y planificar estrategias para la erradicación de biofilms es la micro y la nanotecnología.

1.11. Impacto de micro/nanofabricación en sistemas biológicos.

La micro/nanotecnología, es uno de los campos que promete cambios espectaculares en la fabricación de nuevos materiales. La nanotecnología y la microtecnología consisten en fabricar (nanofabricar o microfabricar, según la escala) y controlar estructuras y máquinas a nivel molecular.

La utilidad de la micro/nanotecnología en las ciencias biomédicas reside en la posibilidad de crear materiales y diseñar dispositivos capaces de interactuar con el cuerpo a escalas celular y sub-celular con un alto grado de especificidad. La nanotecnología ofrece muchas oportunidades revolucionarias en la lucha contra todo tipo de cáncer, trastornos cardíacos, enfermedades neurodegenerativas, infecciones y otras enfermedades. Otras aplicaciones que contemplan el desarrollo de pequeños laboratorios en forma de circuito integrado, en los cuales se realiza una secuencia de reacciones químicas y de pruebas analíticas, permitirían realizar análisis *in situ*, obtener los resultados inmediatamente y facilitar el diagnóstico y la terapia. Muchas sustancias biológicamente relevantes necesitan ser detectadas o actuar ellas mismas como sensores. Un biosensor es un sistema (no necesariamente microfabricado) que convierte una señal biológica en una señal eléctrica generalmente. Algunos ejemplos de biosensores pueden ser los sensores para moléculas pequeñas (oxígeno, pH y glucosa) o grandes moléculas (inmunosensores). El campo de los biosensores se encuentra ampliamente desarrollado y ha sido estudiado durante los últimos 30 años. Los nanotubos de carbono pueden ser utilizados para monitorear la actividad enzimática. Actualmente, algunos grupos ya han conseguido inmovilizar proteínas sobre las paredes de los nanotubos de carbono (120). Asimismo, durante los últimos años, ha sido muy importante la investigación en el desarrollo de materiales especialmente diseñados para que puedan ser implantados en el cuerpo humano y provocar respuestas biológicas específicas para la regeneración de los tejidos. Los materiales utilizados en el cuerpo humano deben poder adaptarse continuamente a los cambios dinámicos que ocurren dentro de él. Los materiales nanoestructurados y bioactivos tienen la habilidad de interactuar con el tejido vivo y son los más promisorios para la formación de una interfaz fuerte y perdurable entre el implante y el tejido vivo que lo rodea. Nuevos materiales nanoestructurados podrían ser empleados para fabricar huesos, cartílagos y pieles

artificiales que, además de no ser rechazados por el organismo, facilitarían la regeneración de ciertos tejidos (121-122).

En el futuro próximo, una de las aplicaciones clínicas más importante de la nanotecnología será probablemente el desarrollo farmacéutico. Estas aplicaciones aprovechan las propiedades de las nanopartículas o nanocápsulas para diseñar nuevas estrategias de liberación controlada, direccionalidad de fármacos, y resguardo de aquellas drogas con baja disponibilidad (123-124). Estas estructuras podrían ser utilizadas para almacenar y transportar medicinas al lugar exacto donde se necesite ya que de esta manera se podrían atenuar los efectos secundarios de los actuales medicamentos.

El desarrollo de bactericidas nuevos y más eficientes es muy importante debido al reciente aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. En la actualidad las nanopartículas de plata se utilizan como agentes bactericidas en la instrumentación médica (125-126) (catéteres, implantes, etc). También como agente cicatrizante y bactericida en vendajes, cremas y geles o en la fabricación de productos textiles con propiedades antimicrobianas que reducen la proliferación de hongos y bacterias en la ropa (127-128).

1.11.1 Micro/nanofabricación en sistemas de células eucariotas.

Recientemente, una gran variedad de técnicas de microfabricación han sido utilizadas para el diseño superficial de materiales que permitan regular funciones celulares. Esta tecnología es una herramienta muy importante para estudiar diferentes factores como la adhesión y el crecimiento celular y para producir cultivos de células organizadas para su aplicación en ingeniería de tejidos. Aunque los sustratos con patrones topográficos definidos se utilizan principalmente en el cultivo celular, este tipo de estructuras ha despertado interés en áreas tecnológicas relacionadas con los implantes médicos, ya que la interacción entre las células y la superficie de los materiales es muy importante durante la integración o rechazo del implante.

Los factores topográficos de la superficie juegan un rol muy importante no sólo en la orientación de células y biocompatibilidad sino también en factores como la expresión de proteínas y diferenciación celular (129-131).

Existen numerosas técnicas que permiten crear patrones superficiales, tanto topográficos como químicos, en la micro/nanoescala (132). Entre estas técnicas se pueden mencionar:

- (i) Fotolitografía, que consiste en cubrir el sustrato de interés con un material sensible a la luz ultravioleta (UV); luego se coloca sobre éste una máscara perforada en la que se encuentra el diseño a transferir y se irradia con luz UV. Las zonas de interés se tratan con un revelador adecuado, que disuelve selectivamente ya sea las zonas irradiadas o las zonas enmascaradas.
- (ii) Impresión por microcontacto (*microcontact printing*), que consiste en la utilización de un sello o *stamp* elastomérico que contiene en relieve el patrón micrométrico a transferir. Luego se sumerge el sello en una solución conteniendo la molécula a transferir y se apoya sobre la superficie del sustrato. De esta manera las moléculas son transferidas a la superficie del sustrato siguiendo el patrón del sello.
- (iii) Moldeo y replicación, que consiste en generar un molde polimérico del patrón a transferir y luego depositar el material de interés sobre este molde, de modo de obtener una réplica de la estructura original. En este trabajo de Tesis se utilizaron técnicas de moldeo y replicación que serán descriptas en el Capítulo 3.

Se han realizado diversos estudios que involucran el análisis de la respuesta del organismo frente a materiales cuyas superficies han sido modificadas en la nano/microescala. Los autores Van Kooten y colaboradores han demostrado que el empleo de sustratos de polidimetilsiloxano (PDMS) microestructurados puede reducir significativamente el encapsulamiento de los materiales implantables (133). Un estudio *in vivo* realizado por Cheroundi y colaboradores con materiales microtexturados (134) ha demostrado que dichos materiales implantables inducen el crecimiento y la invaginación epitelial alrededor del implante. También, la respuesta de los fibroblastos se encuentra significativamente afectada por las dimensiones de la microestructura superficial del sustrato.

La migración celular (velocidad y orientación del movimiento) también se encuentra afectada por la topografía superficial. Tan y colaboradores han demostrado que la velocidad del movimiento de células neutrófilas depende de la microestructura y dimensiones de los canales superficiales diseñados sobre el sustrato (135). Los patrones topográficos superficiales tanto en la micro como en la nanoescala presentan una marcada influencia en las interacciones celulares con el sustrato. La regulación de diferentes

actividades celulares como la proliferación, adhesión y apoptosis podría ser muy útil para el diseño de dispositivos médicos, implantes y biomateriales.

Algunas técnicas de microfabricación permiten la modificación química de las superficies. Los patrones químicos han sido ampliamente utilizados para estudiar la interacción de las células con sustratos (136-138). Estas técnicas han sido aplicadas en la producción de patrones de biomoléculas para el estudio y la manipulación de las interacciones celulares con diferentes sustratos. Por ejemplo, el diseño de microestructuras con factores de crecimiento celular ha resultado muy interesante ya que se ha demostrado que las proteínas de factor de crecimiento inmovilizadas pueden regular funciones celulares sin la internalización de las células (139).

1.11.2 Micro/nanofabricación en sistemas de células procariotas.

La microtecnología también ha comenzado a impactar significativamente en la microbiología. Su escala de tamaños coincide perfectamente bien con las dimensiones de la mayoría de los microorganismos y las herramientas disponibles en la microescala hacen posible la manipulación y exploración de células individuales, su ambiente inmediato extracelular así como su forma y organización interna. Se cree que el desarrollo de técnicas físicas, incluyendo aquellas basadas en las microestructuras, serán un complemento esencial para la genética y la genómica, incluyendo nuevas técnicas para aislar, manipular, crecer y estudiar células aisladas y estructuras multicelulares como los biofilms.

Como ya se ha mencionado, varias técnicas de micro/nanofabricación permiten la fabricación de materiales biocompatibles con características topográficas coincidentes con las dimensiones celulares. Estas herramientas de microfabricación ofrecen nuevas capacidades para la microbiología y especialmente para el entendimiento de la fisiología y comportamiento de los microorganismos.

Algunas de las aplicaciones en microbiología se describen a continuación.

- *Inmovilización de bacterias sobre superficies*

La inmovilización y el diseño de patrones de bacterias sobre superficies ofrecen nuevas oportunidades para la detección de biomoléculas utilizando las células completas y para el estudio de las interacciones célula-célula y las interacciones entre las células y sus alrededores. Las monocapas autoensambladas (SAMs) han sido utilizadas para inmovilizar células sobre superficies en el estudio de interacciones huésped-patógeno. La unión

covalente de los ligandos biológicos a las regiones terminales de las SAMs permite controlar la densidad del ligando sobre la superficie y lo más importante es que estos ligandos mantienen su actividad biológica. Un ejemplo reciente describe la aplicación de las SAMs para medir las fuerzas de adhesión entre bacterias patógenas de *E. coli* con pilis tipo IV y SAMs con manosa como grupo terminal (140).

La combinación de técnicas de impresión por microcontacto y las SAMs han sido empleadas para inmovilizar células bacterianas selectivamente sobre superficies. Por ejemplo, los autores Rowan y colaboradores han utilizado sellos de PDMS para generar patrones de SAMs hidrofóbicos y reactivos sobre Au para generar sitios específicos que atrapen a las células de *E. coli* (141). Varios grupos han empleado la impresión por microcontacto para capturar y detectar organismos patógenos (142-144).

- *Patrones de bacterias utilizando hidrogeles.*

El agar y la agarosa forman hidrogeles. Este tipo de polímeros tiene dos características específicas que son particularmente útiles en microbiología. Por un lado, las células que crecen en estas superficies permanecen hidratadas y por otro lado, los nutrientes, gases y productos secundarios del metabolismo difunden a través de la red polimérica del gel. Existen también muchos otros hidrogeles con diversas aplicaciones en microbiología. Por ejemplo, los autores Heo y colaboradores han llenado canales de PDMS con una solución fotoreactiva de un prepolímero de polietilenglicol (PEG) que contiene células de *E. coli* y luego expuestos a luz UV (145). La exposición a la luz UV produce la fotopolimerización, haciendo que las células queden atrapadas dentro de los microcanales de PEG.

- *Microfluídica: movilidad, quimiotaxis, quorum sensing, y dinámica de población.*

La microfluídica (*microfluidics*) presenta muchas características interesantes para su empleo en el estudio de las células (146-147). La microfluídica trata con el diseño y la fabricación de dispositivos que puedan canalizar los flujos muy pequeños (nano/microlitros) de fluidos. Mao y colaboradores han empleado un flujo laminar de moléculas atractivas y repelentes dentro de microcanales como medio para estudiar la quimiotaxis bacteriana (148). Los autores encontraron que los sistemas microfluídicos son tres órdenes de magnitud más sensibles que los ensayos capilares de quimiotaxis tradicionales.

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias pueden alterar colectivamente la expresión genética cuando la densidad de células alcanza un cierto nivel (*quorum sensing*). Como parte de este proceso, las células se comunican mediante la liberación de pequeñas moléculas dentro del medio circundante. Los autores Park y colaboradores estudiaron el crecimiento de *E. coli* en dispositivos microfluídicos de PDMS y encontraron que las células se acumulaban en áreas cerradas (149-150), concluyendo que la quimiotaxis entre células permite alcanzar la densidad de bacterias requerida para el proceso de *quorum sensing*.

Los sistemas microfluídicos también tienen aplicaciones en el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas. En un estudio reciente, se fabricó un ambiente microestructurado para generar heterogeneidades en los hábitats bacterianos y permitió estudiar cómo las bacterias se adaptan a distintas regiones del ambiente (151). También se han utilizado este tipo de dispositivos para el crecimiento de células con diferentes formas mediante el confinamiento de las bacterias en microcámaras de agarosa (152). Asimismo se ha utilizado la microfluídica para estudios genéticos y para la detección específica de células bacterianas (153-155). Las plataformas microfluídicas presentan varias características interesantes para la investigación genética como por ejemplo, el empleo de pequeños volúmenes de reactivos, la producción de pequeñas cantidades de residuos, bajo costo, cortos tiempos de reacción y la capacidad de análisis de células individuales.

Teniendo en cuenta los estudios descriptos arriba, la micro/nanofabricación presenta grandes posibilidades para el desarrollo de nuevas técnicas microbiológicas y materiales que faciliten el estudio de la fisiología y el comportamiento de los microorganismos.

En el presente trabajo de Tesis se estudió el impacto de las micro y nanoestructuras generadas en el Laboratorio sobre las primeras etapas de formación del biofilm. Se plantea entonces como objetivo analizar la influencia de la topografía y rugosidad de superficies micro y nanoestructuradas de distinta composición química sobre la adherencia y colonización bacteriana de dichos sustratos con el fin de poder seleccionar una estrategia adecuada para lograr inhibir la formación de biofilms sobre superficies sólidas y mejorar la eficacia de los antibióticos sobre los mismos.

Los sustratos empleados se obtuvieron a través de procesos de micro y nanofabricación que permitieron obtener superficies de Au, poliisobutilcianoacrilato

(PBCA) y Cu con micro y nanotopografías sobre los que se estudiaron las primeras etapas de formación de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* tal como se describirá en los capítulos posteriores.

Referencias Bibliográficas.

1. Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., y Ramadan, H. H. (2005) Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 115, 578-582.
2. Ramadan, H. H., Sanclement, J. A., y Thomas, J. G. (2005) Chronic rhinosinusitis and biofilms, *Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 414-417.
3. Ramadan, H. H. (2006) Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14, 183-186.
4. Characklis, W. G. (1973) Attached microbial growths--I. Attachment and growth, *Water Research* 7, 1113-1127.
5. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., y Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464.
6. Characklis, W. G. (1973) Attached microbial growths--II. Frictional resistance due to microbial slimes, *Water Research* 7, 1249-1258.
7. Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg Infect Dis* 8, 881-890.
8. Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., y Caldwell, D. E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms, *J Bacteriol* 173, 6558-6567.
9. O'Toole, G., Kaplan, H. B., y Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
10. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., y Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J Bacteriol* 184, 1140-1154.
11. Monds, R. D., y O'Toole, G. A. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review, *Trends Microbiol* 17, 73-87.
12. Sanderson, A. R., Leid, J. G., y Hunsaker, D. (2006) Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 116, 1121-1126.
13. Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., y Ehrlich, G. D. (2004) The role of biofilms in otolaryngologic infections, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12, 185-190.

14. Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284, 1318-1322.
15. Costerton, J. W. (2001) Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *Trends Microbiol* 9, 50-52.
16. Chole, R. A., y Faddis, B. T. (2003) Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 634-636.
17. Sottile, F. D., Marrie, T. J., Prough, D. S., Hobgood, C. D., Gower, D. J., Webb, L. X., Costerton, J. W., y Gristina, A. G. (1986) Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes, *Crit Care Med* 14, 265-270.
18. Rayner, M. G., Zhang, Y., Gorry, M. C., Chen, Y., Post, J. C., y Ehrlich, G. D. (1998) Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion, *JAMA* 279, 296-299.
19. Post, J. C. (2001) Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media, *Laryngoscope* 111, 2083-2094.
20. Ehrlich, G. D., Veeh, R., Wang, X., Costerton, J. W., Hayes, J. D., Hu, F. Z., Daigle, B. J., Ehrlich, M. D., y Post, J. C. (2002) Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media, *JAMA* 287, 1710-1715.
21. Chole, R. A., y Faddis, B. T. (2002) Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 1129-1133.
22. Jang, C. H., Cho, Y. B., y Choi, C. H. (2007) Structural features of tympanostomy tube biofilm formation in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas otorrhea*, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71, 591-595.
23. Saidi, I. S., Biedlingmaier, J. F., y Whelan, P. (1999) In vivo resistance to bacterial biofilm formation on tympanostomy tubes as a function of tube material, *Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 621-627.
24. Jang, C. H., Park, H., Cho, Y. B., y Choi, C. H. (2010) Effect of vancomycin-coated tympanostomy tubes on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: in vitro study, *J Laryngol Otol* 124, 594-598.
25. Psaltis, A. J., Ha, K. R., Beule, A. G., Tan, L. W., y Wormald, P. J. (2007) Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 117, 1302-1306.

26. Zobel, C. E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *J Bacteriol* 46, 39-56.
27. Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., y Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT, *Microbiology* 146 (Pt 10), 2395-2407.
28. Dalton, H. M., Goodman, A. E., y Marshall, K. C. (1996) Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17, 228-234.
29. Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., y Molin, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms, *J Bacteriol* 182, 6482-6489.
30. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche, *J Bacteriol* 176, 2137-2142.
31. Davey, M. E., y O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
32. Dunne, W. M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?, *Clin Microbiol Rev* 15, 155-166.
33. Schneider, R. P., y Marshall, K. C. (1994) Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces -- effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 387-396.
34. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
35. Marshall, K. C., Stout, R., y Mitchell, R. (1971) Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *J Gen Microbiol* 68, 337-348.
36. Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. W. (1995) *Microbial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
37. Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., y Greenberg, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science* 280, 295-298.
38. Characklis, W. G. (1981) Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnology and Bioengineering* 23, 1923-1960.

39. Fletcher, M. (1988) Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance, *J Bacteriol* 170, 2027-2030.
40. Lips, A., y Jessup, N. E., (Eds.) (1979) *Colloidal Aspects of Bacterial Adhesion*, Academic Press, London, New York.
41. Dolowy, K., (Ed.) (1980) *The theory of cell-cell and cell-substratum interactions*, Cambridge University Press, New York.
42. Rutter, P. R., (Ed.) (1980) *Physical chemistry of the adhesion of bacteria and other cells*, Cambridge University Press, New York.
43. Busscher, H. J., Cowan, M. M., y van der Mei, H. C. (1992) On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion, *FEMS Microbiol Rev* 8, 199-209.
44. Krekeler, C., Ziehr, H., y Klein, J. (1989) Physical methods for characterization of microbial surfaces, *Experientia* 45, 1047-1055.
45. van Loosdrecht, M. C., Norde, W., y Zehnder, A. J. (1990) Physical chemical description of bacterial adhesion, *J Biomater Appl* 5, 91-106.
46. Verwey, E. J. W. (1948) *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, New York.
47. Klein, J., y Luckham, P. (1982) Forces between two adsorbed polyethylene oxide layers immersed in a good aqueous solvent, *Nature* 300, 429-431.
48. Klein, J. (1980) Forces between mica surfaces bearing layers of adsorbed polystyrene in cyclohexane, *Nature* 288, 248-250.
49. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209.
50. Kroncke, K. D., Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., y Jann, K. (1990) Electron microscopic study of coexpression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsules in *Escherichia coli*, *Infect Immun* 58, 2710-2714.
51. Troy, F. A., 2nd. (1979) The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers, *Annu Rev Microbiol* 33, 519-560.
52. Hogt, A. H., Dankert, J., Hulstaert, C. E., y Feijen, J. (1986) Cell surface characteristics of coagulase-negative *staphylococci* and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene), *Infect Immun* 51, 294-301.

53. Wingender, J., Neu, T. R., y Flemming, H.-C. (1999) *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*, Springer, New York.
54. Uhlinger, D. J., y White, D. C. (1983) Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*, *Appl Environ Microbiol* 45, 64-70.
55. Moller, S., Korber, D. R., Wolfaardt, G. M., Molin, S., y Caldwell, D. E. (1997) Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community, *Appl Environ Microbiol* 63, 2432-2438.
56. Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., y Caldwell, D. E. (1998) In situ Characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics, *Microb Ecol* 35, 213-223.
57. Duguid, J. P. (1951) The demonstration of bacterial capsules and slime, *J Pathol Bacteriol* 63, 673-685.
58. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., y Beachey, E. H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, *Infect Immun* 37, 318-326.
59. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., y Beachey, E. H. (1983) Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*, *Infect Immun* 40, 407-410.
60. Hussain, M., Collins, C., Hastings, J. G., y White, P. J. (1992) Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase-negative *staphylococci* on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm, *J Med Microbiol* 37, 62-69.
61. Berry, A., DeVault, J. D., y Chakrabarty, A. M. (1989) High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains, *J Bacteriol* 171, 2312-2317.
62. May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., Rothmel, R. K., y et al. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients, *Clin Microbiol Rev* 4, 191-206.

63. Brinton, C. C., Jr. (1965) The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria, *Trans N Y Acad Sci* 27, 1003-1054.
64. Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H., y Fredrickson, J. K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11358-11363.
65. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435, 1098-1101.
66. Phillips, G. N., Jr., Flicker, P. F., Cohen, C., Manjula, B. N., y Fischetti, V. A. (1981) Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4689-4693.
67. Beveridge, T. J. (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall, *Int Rev Cytol* 72, 229-317.
68. Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. W. (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms, *Appl Environ Microbiol* 67, 5608-5613.
69. Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., y Gilbert, P. (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol Lett* 167, 179-184.
70. Gibbons, R. J., Cohen, L., y Hay, D. I. (1986) Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors, *Infect Immun* 52, 555-561.
71. Zoltai, P. T., Zottola, E. A., y McKay, L. L. (1981) Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surface., *Journal of Food Protection* 44, 204-208.
72. Arnold, J. W., y Bailey, G. W. (2000) Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study, *Poult Sci* 79, 1839-1845.

73. Verran, J., y Whitehead, K. A. (2006) Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces, *Food and Bioproducts Processing* 84, 260-264.
74. Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and pvc surfaces in drinking water, *Water Research* 24, 239-243.
75. Leclercq-Perlat, M. N., y Lalande, M. (1994) Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries, *Journal of Food Engineering* 23, 501-517.
76. Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., Savoie, L., y Roy, R. (1990) Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces, *J Dairy Sci* 73, 3428-3432.
77. Vanhaecke, E., Remon, J. P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D., y Van Peteghem, A. (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 56, 788-795.
78. Flint, S. H., Brooks, J. D., y Bremer, P. J. (2000) Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant *streptococci*, *Journal of Food Engineering* 43, 235-242.
79. Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Lyklema, J., y Zehnder, A. J. B. (1999) DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 179-195.
80. Gilbert, P., Evans, D. J., Evans, E., Duguid, I. G., y Brown, M. R. (1991) Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, *J Appl Bacteriol* 71, 72-77.
81. Kim, K. Y., y Frank, J. F. (1995) Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel, *Journal of Food Protection* 58, 24-28.
82. Walker, S. L., Hill, J. E., Redman, J. A., y Elimelech, M. (2005) Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g, *Appl Environ Microbiol* 71, 3093-3099.
83. Dan, N. (2003) The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27, 41-47.

84. Husmark, U., y Ronner, U. (1990) Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions, *J Appl Bacteriol* 69, 557-562.
85. Millsap, K. W., Reid, G., van der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (1997) Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane., *Can J Microbiol* 43, 284-291.
86. Lerebour, G., Cupferman, S., y Bellon-Fontaine, M. N. (2004) Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate, *Journal of Applied Microbiology* 97, 7-16.
87. Narenan, V. (2003) Bacterial attachment to meat surfaces., In *Massey University*.
88. Tomasz, A. (1965) Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria, *Nature* 208, 155-159.
89. Neelson, K. H., Platt, T., y Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, *J Bacteriol* 104, 313-322.
90. Bassler, B. L., y Losick, R. (2006) Bacterially speaking, *Cell* 125, 237-246.
91. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., y Welsh, M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, *Nature* 417, 552-555.
92. Thomas, J. G., y Nakaishi, L. A. (2006) Managing the complexity of a dynamic biofilm, *J Am Dent Assoc* 137 Suppl, 10S-15S.
93. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*, *Science* 249, 926-928.
94. 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.
95. Reguera, G., Pollina, R. B., Nicoll, J. S., y Lovley, D. R. (2007) Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation, *J Bacteriol* 189, 2125-2127.
96. Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification, *Bacteriol Rev* 36, 478-503.
97. Harshey, R. M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal, *Annu Rev Microbiol* 57, 249-273.

98. 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.
99. Flemming, H. C., y Wingender, J. (2010) The biofilm matrix, *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
100. Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 153, 1318-1328.
101. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., y Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *PLoS Pathog* 4, e1000213.
102. Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Curr Opin Biotechnol* 14, 255-261.
103. Ghigo, J. M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature* 412, 442-445.
104. Luo, H., Wan, K., y Wang, H. H. (2005) High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMBeta1 transmission by *Lactococcus lactis*, *Appl Environ Microbiol* 71, 2970-2978.
105. Stewart, P. S., y Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* 358, 135-138.
106. Anderl, J. N., Franklin, M. J., y Stewart, P. S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824.
107. De Beer, D., Srinivasan, R., y Stewart, P. S. (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection, *Appl Environ Microbiol* 60, 4339-4344.
108. Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., y Geesey, G. G. (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2125-2133.
109. Cochran, W. L., McFeters, G. A., y Stewart, P. S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine, *J Appl Microbiol* 88, 22-30.

110. Brown, M. L., Aldrich, H. C., y Gauthier, J. J. (1995) Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms, *Appl Environ Microbiol* 61, 187-193.
111. Muller, P., Guggenheim, B., y Schmidlin, P. R. (2007) Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro, *Eur J Oral Sci* 115, 77-80.
112. Mah, T. F., y O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol* 9, 34-39.
113. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., y Read, R. R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can J Vet Res* 66, 86-92.
114. Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., y Pechere, J. C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 183, 5213-5222.
115. Moreira, M. A., Oliveira, J. A., Teixeira, L. M., y Moraes, C. A. (2005) Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass, *Vet Microbiol* 109, 75-81.
116. Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., y Davey, M. E. (2010) A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development, *Microbiology* 156, 3469-3477.
117. Kreth, J., Zhang, Y., y Herzberg, M. C. (2008) Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*, *J Bacteriol* 190, 4632-4640.
118. Manning, S. C. (2003) Basics of biofilm in clinical otolaryngology, *Ear Nose Throat J* 82, 18-20.
119. Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., y Givskov, M. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology* 148, 87-102.
120. Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D., y Dai, H. (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization, *J Am Chem Soc* 123, 3838-3839.

121. Zhang, L., Hemraz, U. D., Fenniri, H., y Webster, T. J. (2010) Tuning cell adhesion on titanium with osteogenic rosette nanotubes, *J Biomed Mater Res A* 95, 550-563.
122. Zhang, L., Ramsaywack, S., Fenniri, H., y Webster, T. J. (2008) Enhanced osteoblast adhesion on self-assembled nanostructured hydrogel scaffolds, *Tissue Eng Part A* 14, 1353-1364.
123. Roy, I., Ohulchansky, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J., Dougherty, T. J., y Prasad, P. N. (2003) Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J Am Chem Soc* 125, 7860-7865.
124. Brigger, I., Dubernet, C., y Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv Drug Deliv Rev* 54, 631-651.
125. Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L., y Jingchao, Z. (2010) Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect, *Int J Nanomedicine* 5, 261-267.
126. Thomas, V., Yallapu, M. M., Sreedhar, B., y Bajpai, S. K. (2009) Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application, *J Biomater Sci Polym Ed* 20, 2129-2144.
127. Nair, A. S., Binoy, N. P., Ramakrishna, S., Kurup, T. R., Chan, L. W., Goh, C. H., Islam, M. R., Utschig, T., y Pradeep, T. (2009) Organic-soluble antimicrobial silver nanoparticle-polymer composites in gram scale by one-pot synthesis, *ACS Appl Mater Interfaces* 1, 2413-2419.
128. Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W., y Newton, E. (2006) Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles, *J Hosp Infect* 62, 58-63.
129. Charest, J. L., Garcia, A. J., y King, W. P. (2007) Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries, *Biomaterials* 28, 2202-2210.
130. Yim, E. K., Reano, R. M., Pang, S. W., Yee, A. F., Chen, C. S., y Leong, K. W. (2005) Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells, *Biomaterials* 26, 5405-5413.
131. Motlagh, D., Senyo, S. E., Desai, T. A., y Russell, B. (2003) Microtextured substrata alter gene expression, protein localization and the shape of cardiac myocytes, *Biomaterials* 24, 2463-2476.

132. Gates, B. D., Xu, Q., Stewart, M., Ryan, D., Willson, C. G., y Whitesides, G. M. (2005) New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques, *Chem Rev* 105, 1171-1196.
133. van Kooten, T. G., Whitesides, J. F., y von Recum, A. (1998) Influence of silicone (PDMS) surface texture on human skin fibroblast proliferation as determined by cell cycle analysis, *J Biomed Mater Res* 43, 1-14.
134. Chehroudi, B., McDonnell, D., y Brunette, D. M. (1997) The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing, *J Biomed Mater Res* 34, 279-290.
135. Tan, J., y Saltzman, W. M. (2002) Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry, *Biomaterials* 23, 3215-3225.
136. Lu, L., Nyalakonda, K., Kam, L., Bizios, R., Gopferich, A., y Mikos, A. G. (2001) Retinal pigment epithelial cell adhesion on novel micropatterned surfaces fabricated from synthetic biodegradable polymers, *Biomaterials* 22, 291-297.
137. Chen, G., y Ito, Y. (2001) Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation, *Biomaterials* 22, 2453-2457.
138. Ito, Y., Chen, G., y Imanishi, Y. (1998) Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function, *Bioconjug Chem* 9, 277-282.
139. Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y., Magnani, A., Lamponi, S., y Barbucci, R. (1997) Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity, *Bioconjug Chem* 8, 730-734.
140. Liang, M. N., Smith, S. P., Metallo, S. J., Choi, I. S., Prentiss, M., y Whitesides, G. M. (2000) Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13092-13096.
141. Rowan, B., Wheeler, M. A., y Crooks, R. M. (2002) Patterning bacteria within hyperbranched polymer film templates, *Langmuir* 18, 9914-9917.
142. St John, P. M., Davis, R., Cady, N., Czajka, J., Batt, C. A., y Craighead, H. G. (1998) Diffraction-based cell detection using a microcontact printed antibody grating, *Anal Chem* 70, 1108-1111.

143. Morhard, F., Pipper, J., Dahint, R., y Grunze, M. (2000) Immobilization of antibodies in micropatterns for cell detection by optical diffraction, *Sensors and Actuators B: Chemical* 70, 232-242.
144. Howell, S. W., Inerowicz, H. D., Regnier, F. E., y Reifengerger, R. (2002) Patterned protein microarrays for bacterial detection, *Langmuir* 19, 436-439.
145. Heo, J., Thomas, K. J., Seong, G. H., y Crooks, R. M. (2003) A microfluidic bioreactor based on hydrogel-entrapped *E. coli*: cell viability, lysis, and intracellular enzyme reactions, *Anal Chem* 75, 22-26.
146. Whitesides, G. M. (2006) The origins and the future of microfluidics, *Nature* 442, 368-373.
147. Beebe, D. J., Mensing, G. A., y Walker, G. M. (2002) Physics and applications of microfluidics in biology, *Annu Rev Biomed Eng* 4, 261-286.
148. Mao, H., Cremer, P. S., y Manson, M. D. (2003) A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5449-5454.
149. Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Silberzan, P., Stock, J. B., y Austin, R. H. (2003) Motion to form a quorum, *Science* 301, 188.
150. Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Lin, H., Darnton, N. C., Stock, J. B., Silberzan, P., y Austin, R. (2003) Influence of topology on bacterial social interaction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13910-13915.
151. Keymer, J. E., Galajda, P., Muldoon, C., Park, S., y Austin, R. H. (2006) Bacterial metapopulations in nanofabricated landscapes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17290-17295.
152. Takeuchi, S., DiLuzio, W. R., Weibel, D. B., y Whitesides, G. M. (2005) Controlling the shape of filamentous cells of *Escherichia coli*, *Nano Lett* 5, 1819-1823.
153. Nagamine, K., Onodera, S., Torisawa, Y. S., Yasukawa, T., Shiku, H., y Matsue, T. (2005) On-chip transformation of bacteria, *Anal Chem* 77, 4278-4281.
154. Cady, N. C., Stelick, S., y Batt, C. A. (2003) Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures, *Biosens Bioelectron* 19, 59-66.
155. Jong Wook, H., y et al. (2006) Molecular biology on a microfluidic chip, *Journal of Physics: Condensed Matter* 18, S691.

Capítulo 2

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

2.1. Microscopía de barrido por sondas.

Microscopía de fuerzas atómicas.

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

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

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

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

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

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

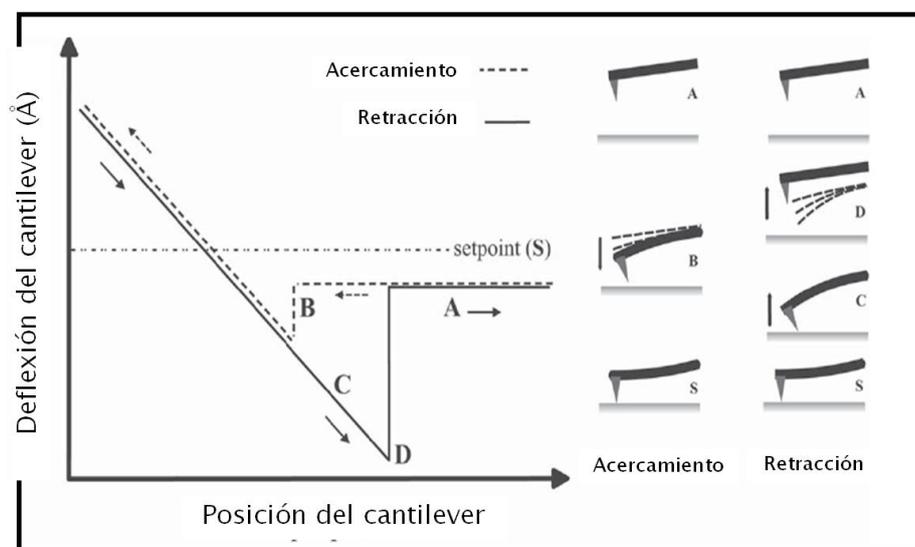


Figura 2.1. Esquema representando la curva de fuerzas y el comportamiento del cantilever. Las posiciones A y B representan a la punta acercándose a la superficie y en la posición B se produce el contacto. Luego de la posición B, la punta se inclina hasta que se alcanza la fuerza aplicada (Setpoint (S)).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

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

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

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

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

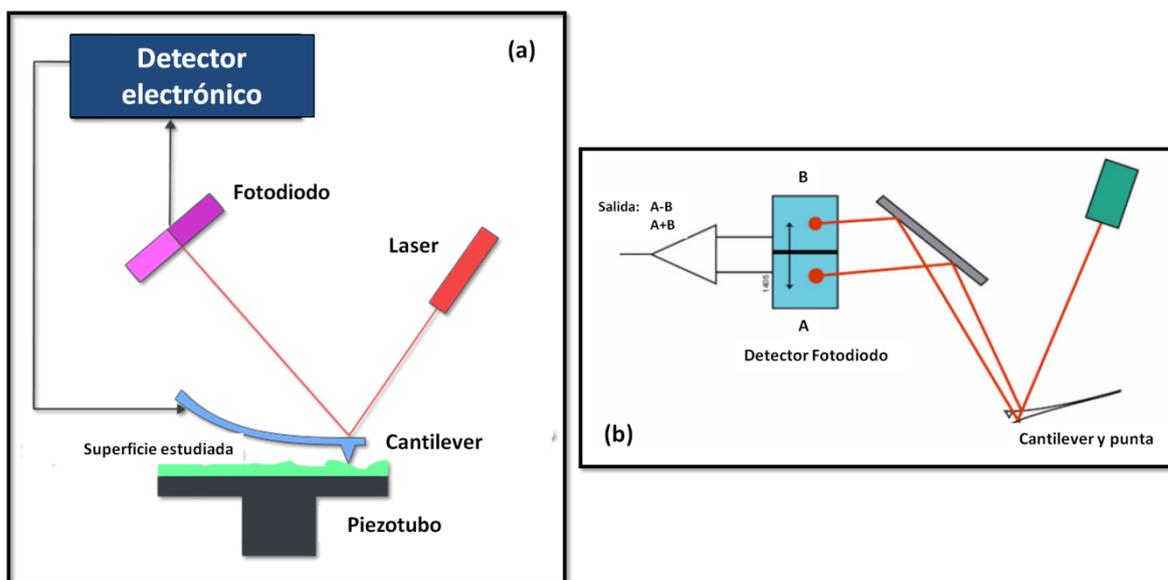


Figura 2.2 (a) Esquema representando al microscopio de fuerzas atómicas. (b) Detección de la señal del láser entre los segmentos verticales A y B del fotodetector.

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

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

2.1.1. AFM modo contacto.

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

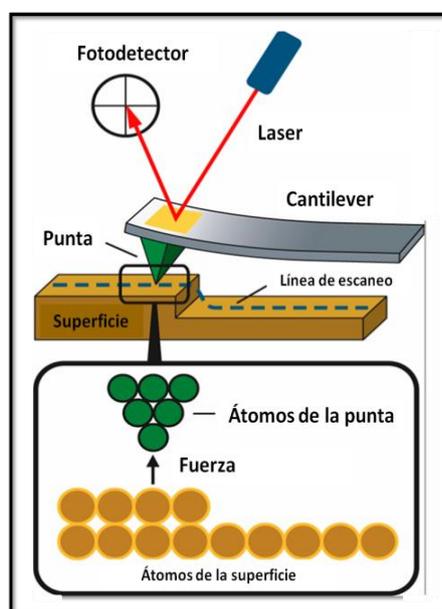


Figura 2.3. Esquema representando el escaneo de la punta del AFM sobre una superficie

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

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

Las puntas comúnmente utilizadas para mediciones de AFM son cantilevers integrados de Si_3N_4 ó Si. Los cantilevers son preparados con diferentes longitudes, espesores y formas. La forma de la punta y la constante elástica del cantilever son parámetros de suma importancia en mediciones de AFM. La constante de fuerza k de un cantilever rectangular puede ser expresada como:

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

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

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

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

2.1.2. AFM modo intermitente.

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

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

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

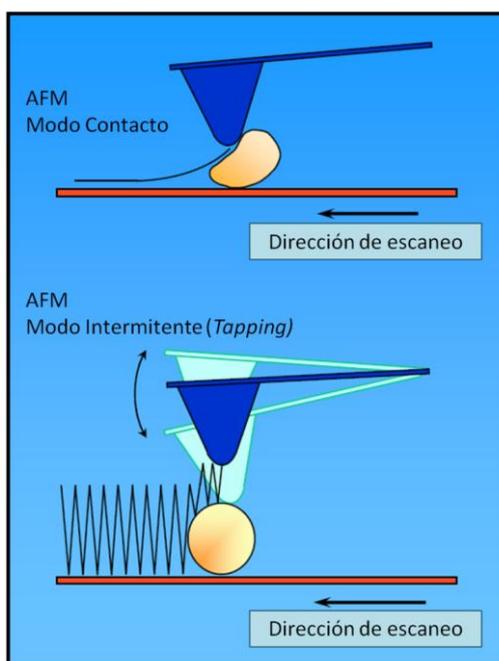


Figura 2.4. Representación de AFM en modo contacto y AFM en modo intermitente (*Tapping*) de una muestra esférica blanda.

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

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

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

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

2.1.3. AFM modo conductivo (c-AFM).

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

2.1.4. AFM en el análisis de muestras biológicas.

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

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

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

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

2.1.5. Análisis topográfico derivado de imágenes AFM.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2. Microscopía óptica de epifluorescencia.

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

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

2.2.1. Tinción con naranja de acridina.

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

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

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

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

Referencias Bibliográficas.

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

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

22. Schippers, A., Neretin, L. N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J., y Jorgensen, B. B. (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria, *Nature* 433, 861-864.
23. Evans, L. V. (2000) *Biofilms : recent advances in their study and control*, Harwood Academic ; Abingdon : Marston, Amsterdam.
24. Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. U., y Egli, T. (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry, *Appl Environ Microbiol* 73, 3283-3290.
25. Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J., y Nystrom, T. (2000) Sorting out bacterial viability with optical tweezers, *J Bacteriol* 182, 5551-5555.
26. Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J. S., y Kjelleberg, S. (2004) Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*, *Appl Environ Microbiol* 70, 3232-3238.
27. Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., y Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 185, 4585-4592.

Capítulo 3

Preparación de las superficies micro- nanoestructuradas.

3.1. Introducción.

Con el objetivo de estudiar la influencia de la composición química y la topografía de la superficie del sustrato sobre los procesos de adhesión y colonización de *P. fluorescens*, se han preparado sustratos de distinta composición química: (1) Au, (2) Cu y (3) poliisobutilcianoacrilato. Las técnicas de preparación y la caracterización de los mismos se detallan en las secciones siguientes y sus características principales se describen a continuación:

(1) Au, empleado como material modelo debido a que es bioinerte, maleable y resistente a la corrosión, especialmente en el medio biológico. Existen muchas aplicaciones directas que utilizan al Au como parte de su estructura en dispositivos biomédicos, entre ellos: materiales dentales, cables para marcapasos, implantes para membranas de oído y ciertos tipos de cubrimientos para *stents* (1-3).

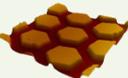
Se han preparado dos tipos de sustratos con microestructuras superficiales diferentes: (i) Au-MS1, sustrato microestructurado que consiste en canales de 650 nm de ancho y 120 nm de alto; (ii) Au-MSh, sustrato con una microestructura que consiste en un arreglo de hexágonos de 10 μm de apotema y 150 nm de alto aproximadamente. Además, se han utilizado sustratos nanoestructurados de dos tipos: (i) Au-NSa, que consiste en un sustrato con una nanoestructura superficial de granos distribuidos al azar. Los granos tienen tamaños en el rango 50 - 100 nm, sin ningún tipo de orientación preferencial. Estos sustratos fueron adquiridos a la empresa Arrandee (Alemania); (ii) Au-NSnb, sustrato con un patrón nanotopográfico que consiste en arreglo de nanobandas de 45 nm de ancho y 4 nm de alto separadas por espacios de 10 nm.

(2) Cu, se ha empleado debido a sus características tóxicas y su susceptibilidad a la corrosión, opuestas a la del Au inerte. Por otra parte tiene interés como aplicación en dispositivos intrauterinos (DIU). Para el caso del Cu se han fabricado dos tipos de superficies, una superficie microestructurada (MS1) y otra nanoestructurada (NSa): (i) Cu-MS1, consiste en una microestructura de canales de 600 nm de ancho y 120 nm de alto; (ii) Cu-NSa, es una estructura similar a la correspondiente al sustrato nanoestructurado al azar Au-NSa.

(3) Poliisobutilcianoacrilato (PBCA), material polimérico biocompatible que se utiliza como adhesivo para diversos tipos de biomateriales y tejidos. En este caso, se prepararon dos tipos de sustratos microestructurados: (i) PBCA-MS1, que consiste en un sustrato microestructurado de canales de 750 nm de ancho y 120 nm de alto; (ii) PBCA-MSg, este sustrato tiene una microestructura tipo “globular”. Los diámetros de los glóbulos se encuentran entre 1 y 5 μm , con alturas que varían entre 80 y 125 nm. También se preparó una superficie nanoestructurada de PBCA: PBCA-NSa, superficie que presenta un arreglo hexagonal de nanopuntos con diámetros de aproximadamente 45 nm y alturas de 6 nm.

En la Tabla 3.1 se muestra un resumen de las características topográficas de cada uno de los sustratos utilizados. Los métodos de fabricación de los mismos, así como su caracterización topográfica se presentan en las secciones siguientes.

Tabla 3.1 Sustratos micro y nanoestructurados utilizados en los ensayos.

	Au		Cu		PBCA	
Sustratos Microestructurados	MS1 	Canales de 650 nm de ancho y 120 nm de alto	MS1 	Canales de 700 nm de ancho y 120 nm de alto	MS1 	Canales de 750 nm de ancho y 120 nm de alto
	MSh 	Hexágonos de 10 μm de apotema y 150 nm de alto			MSg 	Glóbulos de 1–5 μm de diámetro y 85–120 nm de alto
Sustratos Nanoestructurados	NSa 	Granos de 50–100 nm sin orientación definida	NSa 	Granos de 50–100 nm sin orientación definida	NSa 	Nanopuntos de 45 nm de diámetro y 6 nm de altura
	NSnb 	Nanobandas de 45 nm de ancho y 4 nm de alto				

3.2. Microfabricación por técnicas de moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas.

Durante las últimas décadas se han utilizado diversas estrategias para fabricar patrones topográficos en la micro y nano escala. Estos métodos de fabricación comprenden múltiples etapas de diversa dificultad, dependiendo del tipo de estructura deseada. Una de las estrategias empleadas para la fabricación en serie de nano/microestructuras superficiales es la técnica de moldeo y replicación, que consiste en dos etapas fundamentales que involucran procesos diferentes: *escritura* de una matriz, cuya estructura proporciona el código que luego será copiado y *replicación* en la que se preparan múltiples copias de la matriz original (4). La manufacturación de las matrices es usualmente llevada a cabo mediante técnicas litográficas que utilizan haces de electrones o haces de iones

enfocados, comúnmente denominadas “*técnicas litográficas duras*”. Estas técnicas son muy costosas o muy lentas como para ser utilizadas en la producción en serie de nanoestructuras, por lo que se emplea la replicación de una matriz. Este método permite generar un material nanoestructurado de una manera sencilla, rápida, económica y con un alto grado de fidelidad, generando múltiples copias de las nanoestructuras escritas en la matriz.

Una de las técnicas más utilizadas en la replicación en serie es la fotolitografía. Sin embargo, este método tiene la desventaja de su alto costo y que la resolución está limitada por la difracción de la luz incidente. Por este motivo, se han desarrollado técnicas alternativas para la nanofabricación que involucran procesos de impresión, moldeo, etc. en la nano/microescala (5). En estas técnicas, la resolución está determinada principalmente por interacciones de van der Waals, propiedades de mojado de las superficies, etc.. Las técnicas de replicación basadas en el contacto físico poseen la gran ventaja de poder producir estructuras complejas con una resolución de unos pocos nm (4). Generalmente en los procesos de replicación de micro- y nanoestructuras mediante técnicas de contacto físico (*impresión, moldeo, etc.*) se utiliza un polímero para transferir la estructura, para lo cual es necesario proveer una interfase no-adherente entre la superficie estructurada que actúa como matriz y el polímero, cuya topografía es moldeada por la matriz. Esto permite desmoldar la película polimérica sin degradar la fidelidad de la replicación.

Un método sencillo y directo para la fabricación en serie de superficies nano/microestructuradas consiste en la utilización de técnicas de moldeo y replicación asistido por monocapas autoensambladas (SAMs) (6-8). Las SAMs han sido ampliamente estudiadas debido a la posibilidad que ofrecen de crear superficies con recubrimientos uniformes de espesor molecular (de orden de unos pocos nm), con funcionalidades químicas bien definidas (9). Esta característica permite la utilización de las mismas en múltiples aplicaciones como, por ejemplo, prevención de la corrosión (10-11), desarrollo de dispositivos electrónicos (12) y formación de patrones específicos (13). Además, las SAMs pueden actuar como recubrimientos antiadherentes debido a que las superficies modificadas por éstas presentan una significativa disminución en la energía superficial, siendo ésta una condición favorable para la separación del material moldeado.

La técnica de moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas utiliza las propiedades antiadherentes de las SAMs para facilitar el despegado entre el molde y el material depositado sobre él. Este paso es de suma importancia, ya que en

muchos casos el material moldeado posee una gran afinidad por la superficie del molde lo que dificulta la separación de ambos. Esta técnica se ha utilizado en el presente trabajo de Tesis para transferir en forma directa una topografía regular a la superficie de interés.

Los pasos a seguir para conseguir una superficie micro-nanoestructurada son los siguientes (Figura 3.1):

1. Modificar la superficie del molde con una monocapa autoensamblada de un alcanotiol (dodecanotiol).
2. Depositar el material de interés sobre el molde modificado mediante una técnica adecuada (evaporación metálica en vacío, electrodeposición, depósito por goteo, etc).
3. Despegar la superficie moldeada mediante el empleo de pinzas.

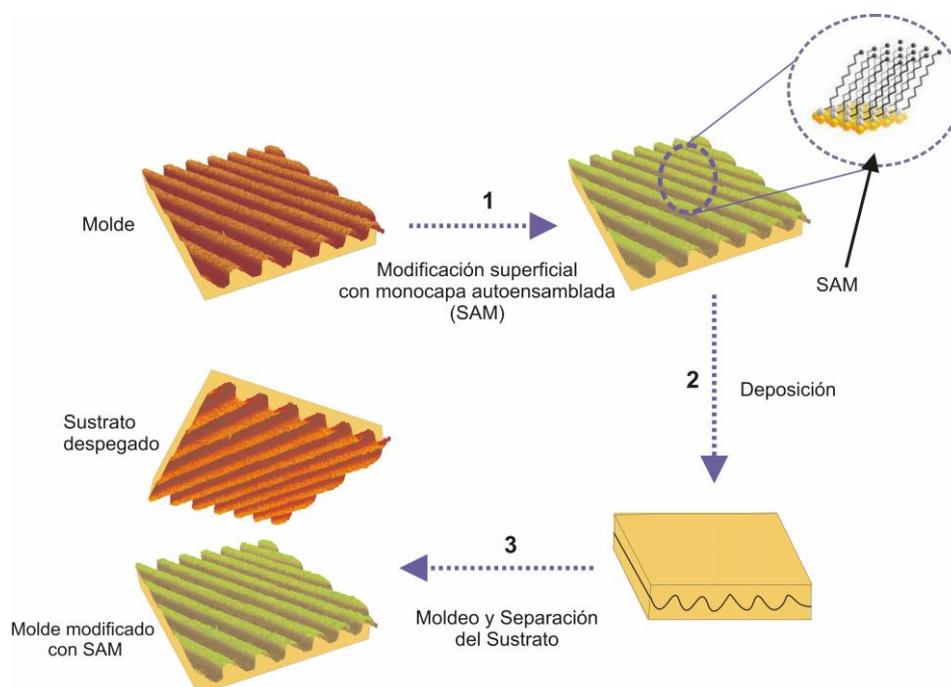


Figura 3.1. Esquema experimental representando las etapas necesarias durante el proceso de moldeo y replicación mediante el uso de monocapas autoensambladas (SAMs)

El molde utilizado consiste en una superficie de Cu que tiene un patrón topográfico regular de escala micrométrica (Figura 3.2) modificado superficialmente por una SAM de dodecanotiol, preparada por inmersión del sustrato en una solución 7 mM del reactivo en tolueno durante 2 h. Las dimensiones características típicas del patrón regular del molde empleado se muestran en la Figura 3.2. Dadas las características topográficas de la estructura en relieve, se determinó el ancho como la distancia medida a mitad de altura del relieve.

La topografía típica de esta superficie podría describirse como una estructura regular en relieve de 600 nm de ancho, canales de 650 nm y 115 nm de altura, con una periodicidad de 1,25 μm . Estas dimensiones se mencionan a modo de ejemplo de un molde típico ya que puede haber variaciones de un molde a otro, siendo la desviación estándar del canal superficial de 51 nm, la del relieve 48 nm y la de la altura 10 nm. Las dimensiones características que se mencionan en la Tabla de la Figura 3.2 se obtuvieron mediante la medición de las mismas sobre 10 moldes distintos. De esta forma, se calcularon dimensiones características promedio con sus respectivas desviaciones estándar. Lo mismo se realizó para la caracterización de todos los demás sustratos descritos a lo largo del presente capítulo.

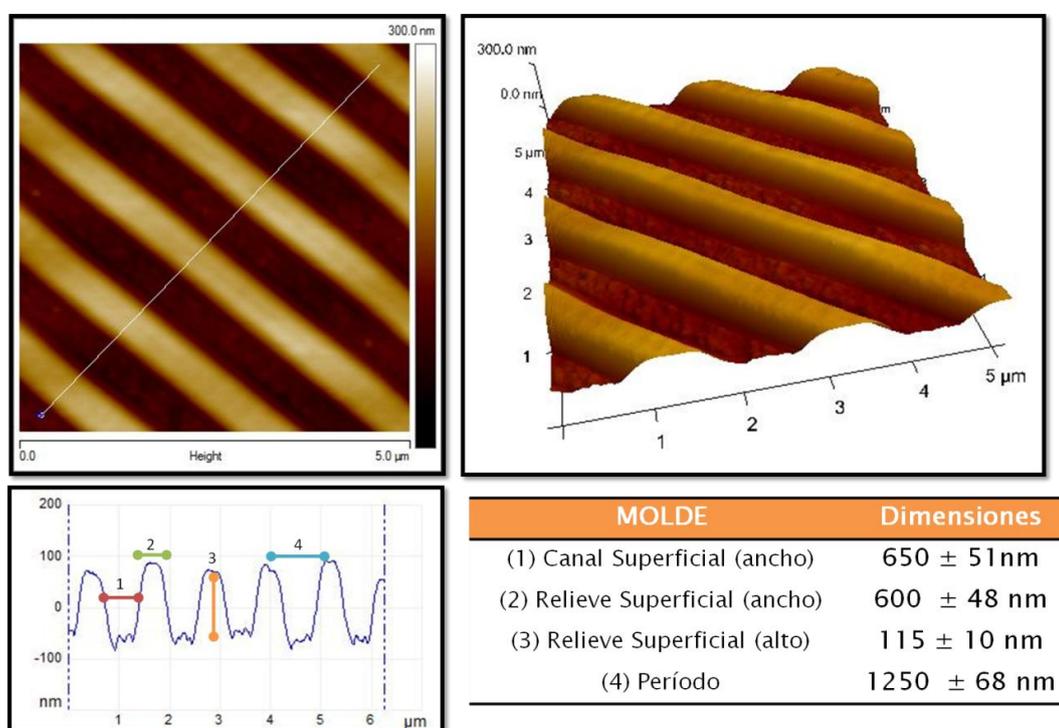


Figura 3.2. Caracterización topográfica de un molde típico de Cu empleado: Imagen AFM topográfica *top view* (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie del molde (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones características de uno de los moldes utilizados (abajo derecha). Los datos corresponden a dimensiones promedio con sus respectivas desviaciones estándar obtenidos a partir de 10 moldes diferentes.

Una vez quimisorbida la monocapa, la superficie de Cu es sumergida en tolueno puro durante 30 min para eliminar las multicapas de moléculas de dodecanotiol fisisorbidas sobre la superficie. En este momento, el molde está preparado para la deposición del material a moldear.

Las técnicas de deposición sobre el molde dependen del material que va a depositarse sobre el mismo. Debe tenerse en cuenta que, en todos los casos, dicha técnica debe posibilitar la formación de películas de morfología uniforme y baja rugosidad, con tamaños de grano suficientemente pequeños como para poder replicar la estructura. Asimismo, la técnica de deposición debe ser tal que permita que la monocapa permanezca sobre la superficie del molde sin sufrir alteraciones durante el proceso.

3.2.1. Superficies micro y nanoestructuradas de Au

3.2.1.1. Fabricación y caracterización de superficies Au-MS1

Los sustratos de Au se prepararon por deposición física desde fase vapor (PVD), evaporando el metal en vacío, técnica que permite obtener películas delgadas de Au uniformes, de baja rugosidad y con granos de Au muy pequeños. La PVD comprende una amplia variedad de técnicas que incluyen evaporación, deposición mediante ablación láser y distintas variantes de la deposición mediante descarga catódica, o *sputtering* (14). Los procesos de PVD generalmente involucran átomos individuales o pequeños agregados de átomos que son emitidos por la fuente sólida o líquida. Para lograr esta emisión se puede utilizar el calentamiento de la fuente o el bombardeo de la misma utilizando electrones, átomos, iones o fotones. Las especies emitidas transitan a través de la cámara evacuada y, finalmente, colisionan sobre una superficie sólida en la cual los átomos pierden su energía cinética quedando inmovilizados y formando una película sobre el sustrato.

En los procedimientos de evaporación del tipo térmico, el material se calienta a temperaturas elevadas hasta alcanzar una presión de vapor suficientemente alta, de manera de que una fracción apreciable de átomos o moléculas de la superficie pasa a estado vapor, depositándose sobre el sustrato y formando una película delgada. El calentamiento se logra pasando una corriente eléctrica a través del propio material o utilizando un soporte adecuado.

La evaporación tiene múltiples ventajas como técnica de deposición que incluyen la sencillez de montaje y la posibilidad de evaporar materiales disponibles en diferentes formas (polvo, hilo, pastilla, etc.). La evaporación metálica requiere que el proceso se realice en vacío para evitar los problemas asociados a la oxidación en altas temperaturas

del sustrato o de la película depositada. En este trabajo se utilizó una evaporadora Edwards Metal Coater Modelo 306, de la que se muestra un esquema en la Figura 3.3.

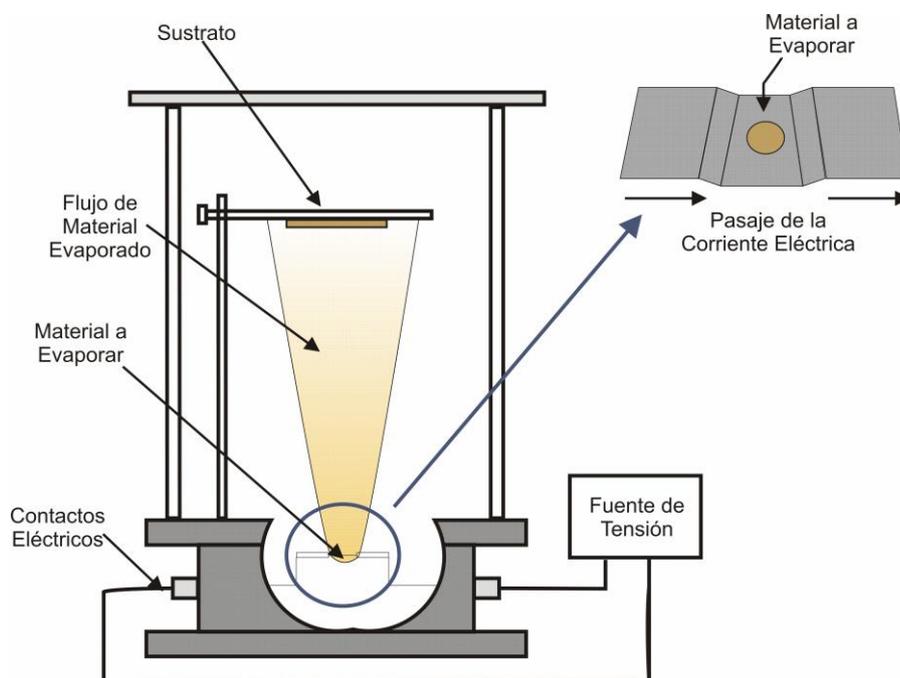


Figura 3.3. Esquema de la cámara de evaporación utilizada para preparar las películas metálicas mediante evaporación térmica en vacío.

Desde el punto de vista experimental, es preciso tener en cuenta varios aspectos relacionados con el proceso de evaporación. La evaporación térmica se lleva cabo con una presión residual de cámara, p , por debajo de los $7,5 \times 10^{-5}$ torr. En estas condiciones, el recorrido libre medio de las partículas evaporadas es $\lambda > 50$ cm (15). Esto implica que λ es del orden del diámetro de la cámara de vacío, y por lo tanto las partículas evaporadas describen esencialmente trayectorias rectilíneas, sin colisiones en la fase gaseosa, hasta alcanzar el sustrato. Por consiguiente, la evaporación térmica es un proceso direccional, y solamente la superficie del sustrato que se encuentra “a la vista” de la fuente de evaporación queda recubierta.

Para obtener el depósito, los moldes microestructurados y modificados superficialmente con la SAM de dodecanotiol se introdujeron en la cámara de la evaporadora (Figura 3.3) y se metalizaron mediante el calentamiento de aproximadamente 0,32 g de Au. Utilizando esta cantidad de Au, se obtiene un espesor de película depositada de aproximadamente 200 nm.

Con el fin de reforzar las propiedades mecánicas de las películas metálicas evaporadas, se procedió a electrodepositar sobre el reverso de las mismas una película de

Cu de 10 μm de espesor aproximadamente. El electrodeposición se realizó de manera galvanostática, a una densidad de corriente de $20 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, a partir de una solución electrolítica 0,6 M de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 M H_2SO_4 en una celda convencional de tres electrodos (contraelectrodo: chapa de Cu; electrodo de referencia: alambre de Cu; electrodo de trabajo: sustrato microestructurado). Luego, la película evaporada y “reforzada” con Cu se despegó fácilmente del molde microestructurado mediante el empleo de una pinza adecuada, siguiendo los pasos indicados en el esquema de la Figura 3.1.

En la Figura 3.4 se pueden observar imágenes AFM topográficas correspondientes a una superficie de Au-MS1. Las dimensiones características del mismo se obtuvieron mediante la medida de las longitudes en el corte transversal del sustrato.

El período se determinó mediante el análisis estadístico a través de la PSD. Tanto este parámetro como la rugosidad (RMS) y la altura (z), se calcularon, tal como se describe en el Capítulo 2, mediante el empleo del programa Nanoscope V5.31. Tanto la determinación de la rugosidad como el período se realizaron en imágenes AFM de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Estas mismas determinaciones se realizaron para todas las caracterizaciones topográficas realizadas en el presente Capítulo.

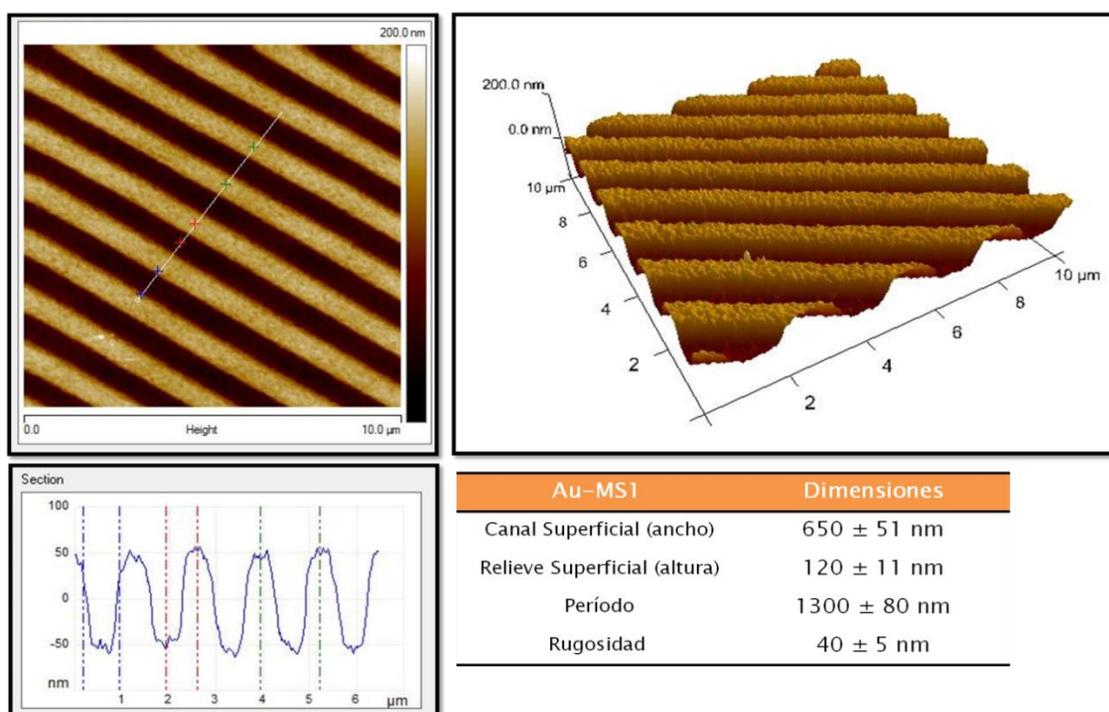


Figura 3.4. Caracterización topográfica de la superficie de Au-MS1: Imagen AFM topográfica vista de arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la imagen izquierda superior realizada a lo largo de la línea blanca (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.2.1.2. Fabricación y caracterización de superficies Au-NSnb

Las superficies de Au nanoestructuradas fueron fabricadas empleando el método de moldeo y replicación descritos arriba a partir de una matriz de Si y su correspondiente molde de Au. Para el caso de la matriz de Si, la película anti-adherente consiste en una monocapa de octadeciltriclorosilano (OTS). En la Figura 3.5 se muestra la nanoestructura correspondiente a la matriz de Si utilizada. Esta superficie consiste en un arreglo de nanobandas (“ripples”), cuyo ancho típico promedio es de 38 nm, la altura promedio (z) correspondiente es de 4 nm y la rugosidad (RMS) característica de este tipo de sustratos es de 7 nm.

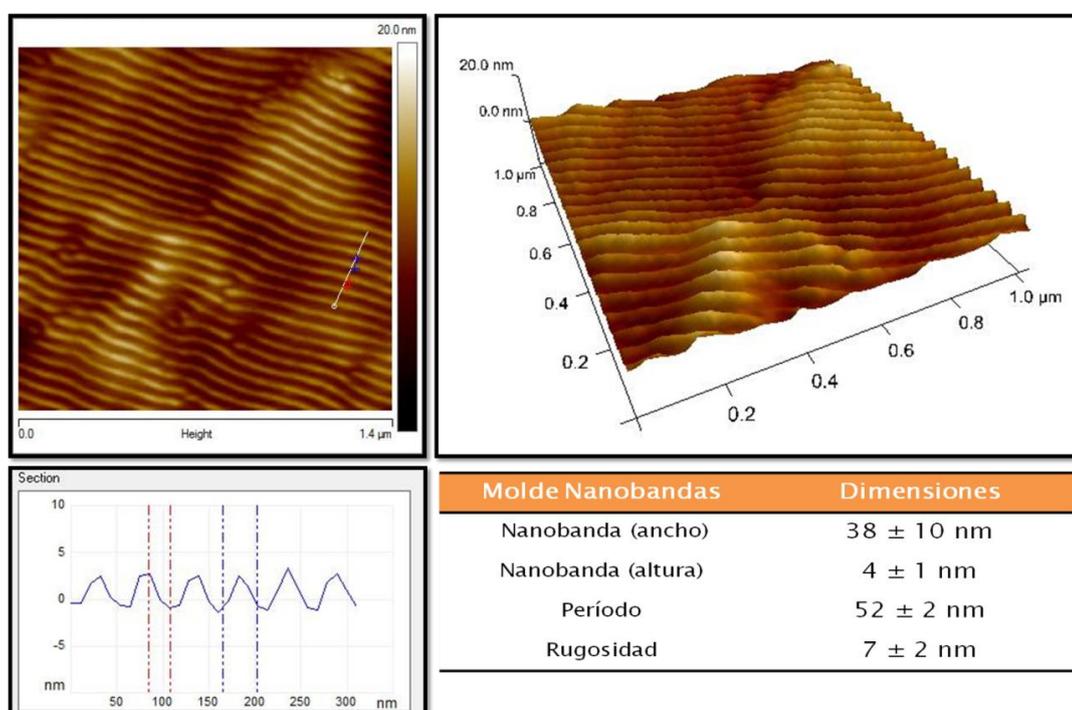


Figura 3.5. Caracterización topográfica del molde de nanobandas de Si: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie del molde (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características del molde (abajo derecha).

Posteriormente, el molde de Au (obtenido a partir de la matriz original de Si) fue modificado superficialmente mediante la formación de una SAM, preparada sumergiendo el mismo en una solución etanólica de dodecanotiol (7 mM dodecanotiol en etanol). Luego, el sustrato fue transferido a una solución pura de etanol para remover las moléculas de dodecanotiol fisorbidas sobre la superficie.

Luego, se depositó Au sobre la nanoestructura mediante el proceso de PVD. La presión de la cámara fue de aproximadamente 1×10^{-6} torr y la cantidad de Au pesada fue 0,32 g aproximadamente. Después de la metalización, la superficie de Au pudo separarse fácilmente del molde debido a la presencia de la SAM de dodecanotiol. La superficie obtenida luego del proceso de deposición es la que se muestra en la Figura 3.6.

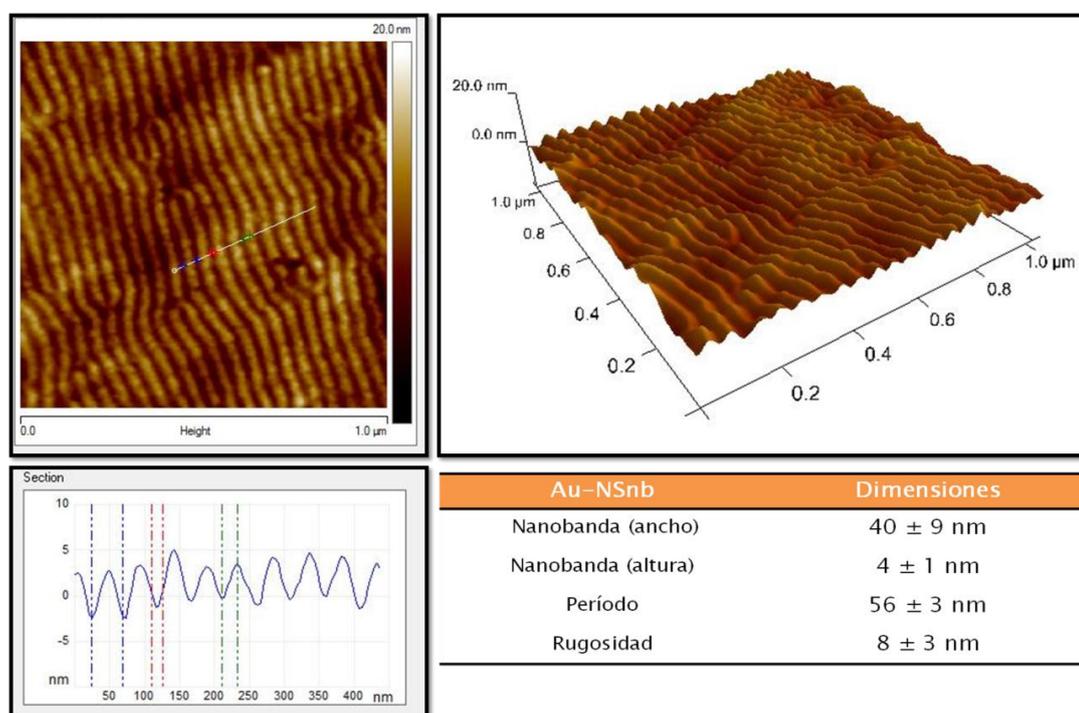


Figura 3.6. Caracterización topográfica de la superficie de Au-NSnb: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de Au-NSnb (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.2.2. Superficies microestructuradas de Cu

Para la microfabricación de las superficies de Cu se utilizó el mismo método de moldeo y replicación anteriormente descrito. En este caso se depositó el Cu mediante técnicas electroquímicas.

Ya se mencionó que la rugosidad y el tamaño de grano del depósito son factores que afectan sensiblemente la calidad de cada etapa de transferencia del patrón topográfico. Por este motivo, estos factores deben ser tenidos en cuenta cuando se desea replicar superficies estructuradas por la vía electroquímica.

Los factores preponderantes que determinan la implementación exitosa del proceso de micromoldeo por técnicas electroquímicas son: (a) la estabilidad electroquímica

de la monocapa autoensamblada y (b) la morfología del material electrodepositado. El primero de estos factores está relacionado con la selección de la ventana de potencial adecuada en la que la SAM es más estable, evitando la electrodesorción reductiva que experimentan los alcanotioles adsorbidos sobre superficies polarizadas catódicamente (7). De esta manera se evita la desorción total o parcial de la SAM, que afectaría notablemente el proceso de delaminación. El segundo factor, que condiciona el éxito del proceso está relacionado con el volumen del grano característico del depósito que puede competir con las dimensiones características del patrón que se desea replicar. Se ha demostrado que cuanto menor es el tamaño de grano del depósito mejor es la fidelidad del proceso de moldeo. En el caso de la electrodeposición de Cu, el agregado de tiourea como aditivo permite alcanzar tamaños de grano uniformes de hasta 15-20 nm, obteniéndose depósitos de baja rugosidad (16).

3.2.2.1. Fabricación y caracterización de superficies Cu-MS1

En forma similar a lo descrito para el Au, la superficie molde de Cu microestructurada (Figura 3.2) se modificó superficialmente con una monocapa autoensamblada de dodecanotiol, mediante la inmersión del sustrato de Cu en una solución 7 mM de dodecanotiol en tolueno durante 2 h. El sustrato fue transferido a tolueno puro durante 30 min de manera de remover las multicapas de moléculas que podrían permanecer fisorbidas sobre la superficie. Posteriormente se procedió a la electrodeposición de una película de Cu de aproximadamente 10 μm de espesor, utilizando como cátodo el sustrato de Cu, microestructurado y cubierto con la SAM de dodecanotiol. La composición del baño electrolítico empleado fue 0,6 M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 M H_2SO_4 + 0,025 mM de tiourea, siendo la condiciones de electrodeposición utilizadas 20 $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ de densidad de corriente de deposición catódica a 298 K.

Una vez electrodepositada, la película de Cu fue delaminada con la ayuda de pinzas adecuadas. Cabe destacar que la delaminación del electrodeósito no promueve daños en la muestra electrodepositada ni en el electrodo microestructurado.

En la Figura 3.7, puede observarse el sustrato de Cu-MS1 obtenido y su correspondiente caracterización topográfica.

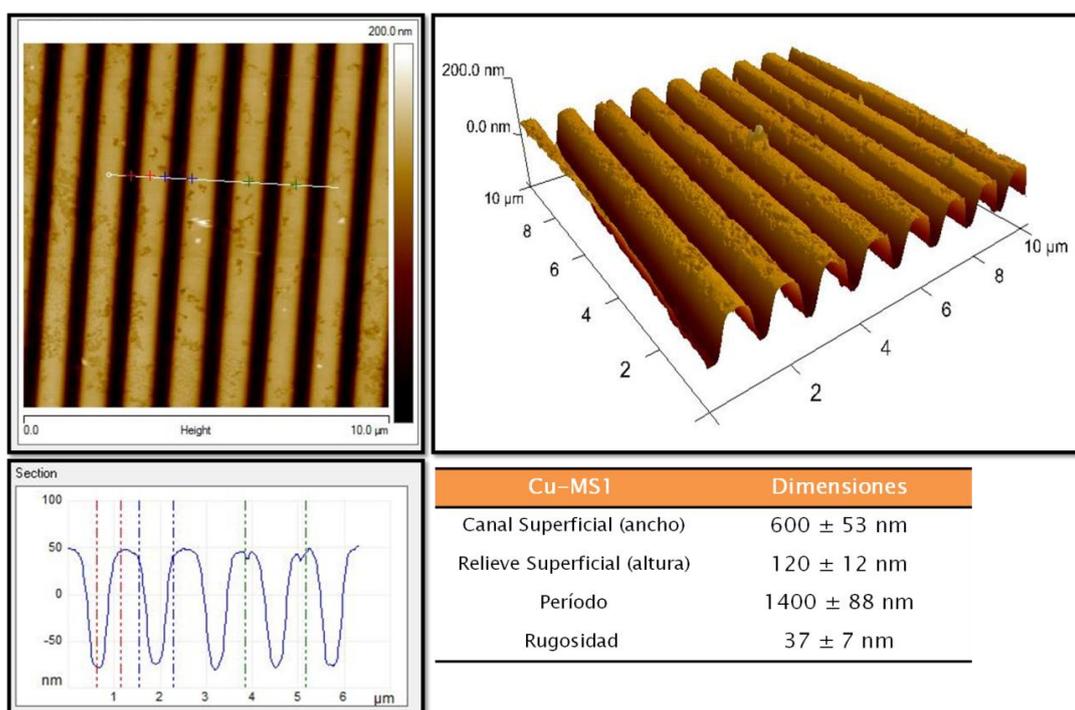


Figura 3.7. Caracterización topográfica de la superficie de Cu-MS1: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de Cu-MS1 (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.2.3. Superficies micro y nanoestructuradas de PBCA.

El tercer tipo de material que se utilizó para fabricar las superficies estructuradas fue un polímero biocompatible, el PBCA. El mismo es un pegamento cianoacrilato, que es empleado en el ámbito clínico para cerrar pequeñas heridas (La Gotita®, Poxipol, Argentina).

La misma técnica de moldeo y replicación que se utiliza para fabricar superficies metálicas con patrones micro/nanotopográficos, puede emplearse para la obtención de sustratos micro/nanoestructurados poliméricos (17-18).

Cabe destacar que la gran diferencia entre la mayoría de las técnicas de moldeo y replicación reportadas en la literatura y el método empleado en el presente trabajo de Tesis para obtener los sustratos poliméricos estructurados es que el material generalmente utilizado por otros autores como molde es un polímero, el polidimetilsiloxano (PDMS), mientras que la técnica reportada en este trabajo utiliza un metal como molde debido a que la naturaleza elastomérica del PDMS puede hacer que los patrones topográficos transferidos sean defectuosos (19). La gran estabilidad del molde de Au empleado en el

presente trabajo hace que el patrón sea transferido sin defectos tanto en la micro como en la nano escala.

3.2.3.1. Fabricación y caracterización de superficies PBCA-MS1

Para obtener el sustrato microestructurado polimérico, se dejó caer una gota de PBCA sobre la superficie de Cu microestructurada (Figura 3.2) y modificada con la SAM de dodecanotiol. Una vez polimerizado el material, la película de PBCA es fácilmente despegada del molde mediante el empleo de pinzas pequeñas. Debe mencionarse que la delaminación de la película polimérica es un proceso con mínimo esfuerzo mecánico y que por lo tanto no genera defectos en la superficie obtenida. De hecho, se ha reportado que la adherencia del polímero a la SAM resulta ser muy deficiente (20), y por lo tanto esta condición es favorable para la separación de la película polimérica moldeada del metal con la monocapa autoensamblada.

Las imágenes de la Figura 3.8 corresponden al sustrato de PBCA-MS1 obtenido a partir del molde de Cu microestructurado con su correspondiente caracterización topográfica.

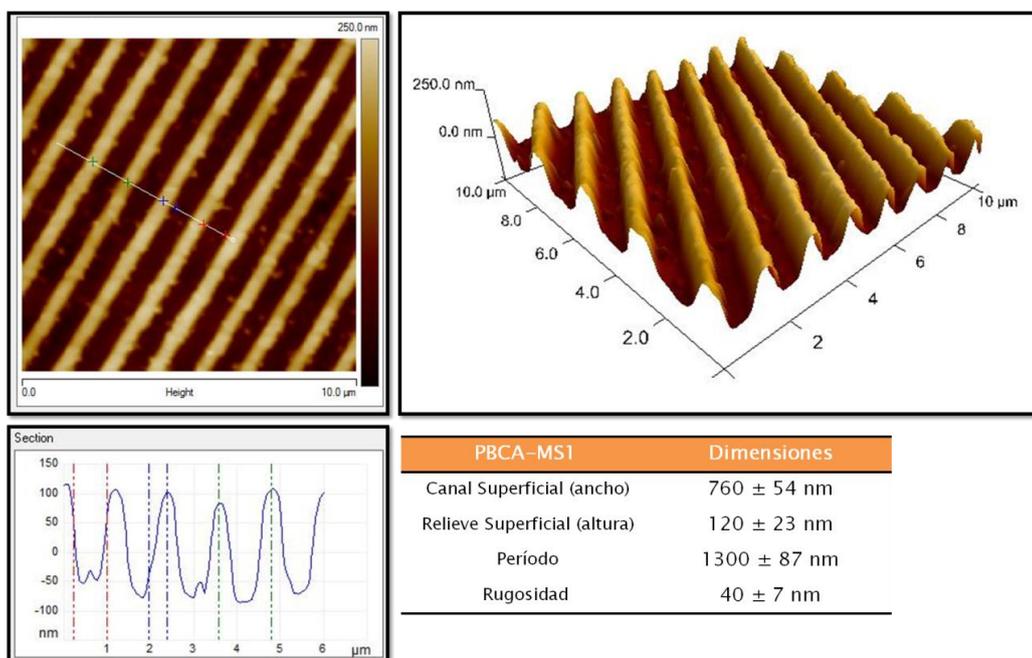


Figura 3.8. Caracterización topográfica de la superficie de PBCA-MS1: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de PBCA-MS1 (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.2.3.2. Fabricación y caracterización de superficies PBCA-MSg

En este caso se utilizó como molde una superficie nanoestructurada de Au (Au-NSa Arrandee, Alemania). Dicha superficie fue sumergida en una solución etanólica de dodecanotiol 7 mM durante 2 h. Posteriormente, se transfirió el sustrato a una solución de etanol absoluto durante 30 min para remover las moléculas de dodecanotiol fisisorbidas sobre la superficie. Luego, se dejó caer una gota del polímero sobre la superficie nanoestructurada. Una vez curado el PBCA, la película se despegó mediante el empleo de pequeñas pinzas. En este caso no se moldea la superficie del Au, sino que espontáneamente se forma una estructura globular. Este tipo comportamiento ha sido reportado previamente para el PBCA (21-22)

En la Figura 3.9, se observa la estructura globular del sustrato de PBCA-MSg obtenido a partir de un molde de Au-NSa.

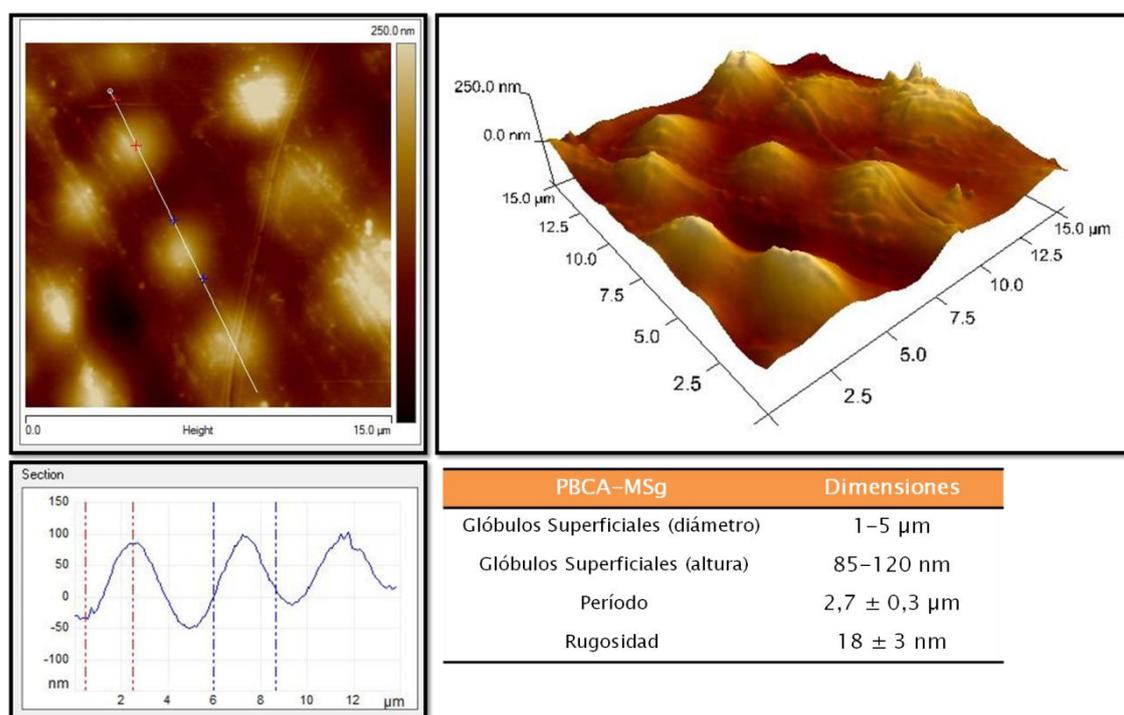


Figura 3.9. Caracterización topográfica de la superficie de PBCA-MSg: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de PBCA-MSg (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.2.3.3. Fabricación y caracterización de superficies PBCA-NSa

Con el objetivo de emular los granos presentes en las superficies nanoestructuradas de Au y Cu (Au-NSa y Cu-NSa, tal cual se describirá en la sección 3.4), se fabricó un sustrato de PBCA, utilizando como molde una superficie nanoestructurada de Au que consiste en un arreglo hexagonal de nanocavidades con una densidad de aproximadamente 10^{11} nanocavidades por cm^2 . Las dimensiones características de las nanocavidades son: diámetros de 48 ± 4 nm y profundidades de 6 ± 2 nm (Figura 3.10).

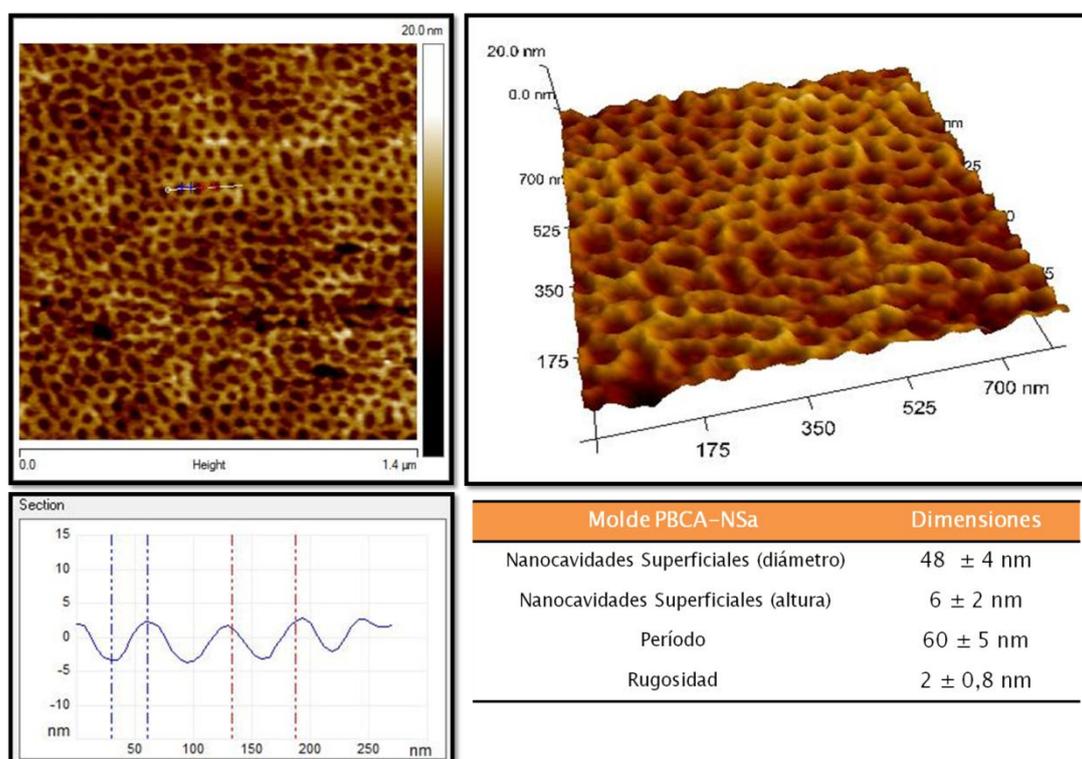


Figura 3.10. Caracterización topográfica de la superficie del molde de Au: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie del molde (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

Para obtener los sustratos PBCA se repitió el mismo procedimiento de moldeo y replicación descrito anteriormente. El molde de Au fue sumergido en una solución etanólica 7 mM de dodecanotiol durante 2 h. Luego el sustrato fue transferido a una solución de etanol absoluto durante 30 min y se colocó una gota de PBCA sobre la superficie.

El sustrato de PBCA-NSa obtenido luego de la delaminación del molde de Au, es el que puede observarse en la Figura 3.11. A través del análisis de las dimensiones

características del sustrato de PBCA-NSa, se puede concluir que este tipo de superficies emula considerablemente bien la topografía de los sustratos de Au-NSa y Cu-NSa.

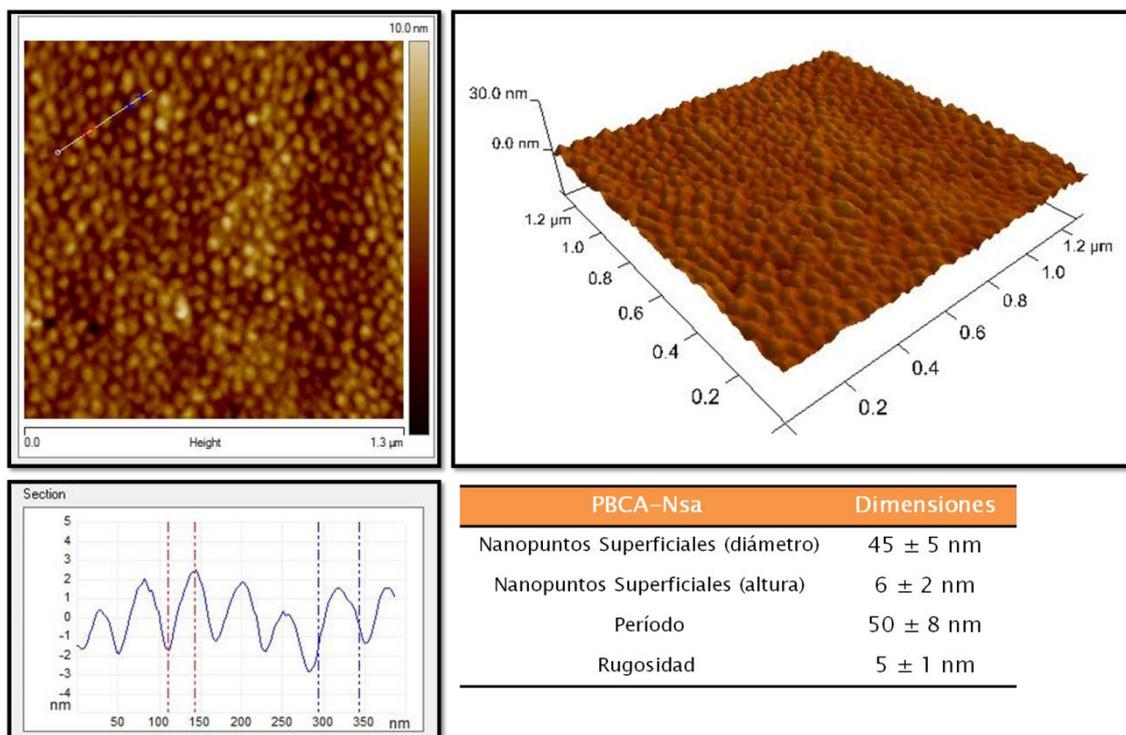


Figura 3.11. Caracterización topográfica de la superficie de PBCA-NSa: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de PBCA-NSa (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.3. Microfabricación mediante deposición por métodos físicos a través de máscaras

Otra estrategia que se utilizó en este trabajo de Tesis para microfabricar superficies de Au fue la deposición metálica en vacío asistida por máscaras (litografía esténcil). El método consiste en cubrir el sustrato con una máscara que contiene el patrón a transferir. Las máscaras se utilizan para depositar material selectivamente en ciertas áreas del sustrato y, de esta manera, se pueden construir estructuras con diferentes arreglos, de acuerdo a las máscaras utilizadas. La evaporación asistida por máscaras en contacto con la superficie permite depositar cantidades controladas de material en posiciones específicas del sustrato, sin necesidad de recurrir a procesamientos posteriores. En la Figura 3.12 se muestra un esquema del proceso.

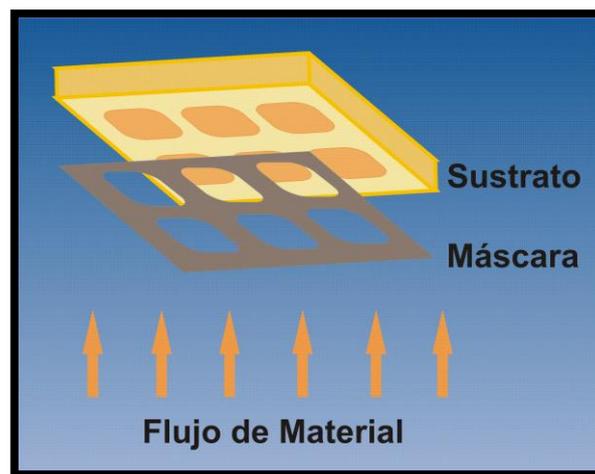


Figura 3.12. Esquema representando el proceso de microfabricación mediante la utilización de máscaras

Este tipo de litografía es un método muy versátil, que puede emplearse en gran variedad de aplicaciones. A partir del estudio de todas las variantes existentes de este tipo de litografía, se ha encontrado una serie de ventajas muy importantes. Las principales son: sencillez del proceso, flexibilidad y alta resolución. Además, es una técnica de no-contacto, característica que permite obtener superficies ultra-limpias con depósitos de alta pureza (23). Cabe destacar que pueden diseñarse estructuras sobre superficies mecánicamente frágiles y funcionalizadas químicamente, debido a la ausencia de etapas cíclicas durante el proceso. La litografía esténcil permite, además, la utilización de una gran variedad de materiales (la limitación proviene del método de deposición) y la deposición selectiva sobre superficies en un solo paso.

3.3.1. Fabricación y caracterización de superficies Au-MSh

En el caso de las estructuras de Au-MSh, el sustrato donde se realizó la deposición fue Au-NSa (Arrandee®, Alemania). La superficie se limpió con solución piraña ($H_2O_2 + H_2SO_4$) durante 20 min. Como máscara se utilizaron grillas hexagonales de Ni (Ted Pella Inc.). Las dimensiones de las mismas son: (A) apotema del hexágono: 14 μm ; (B) ancho del borde: 8 μm ; espesor de la grilla: 40 μm (Figura 3.13).

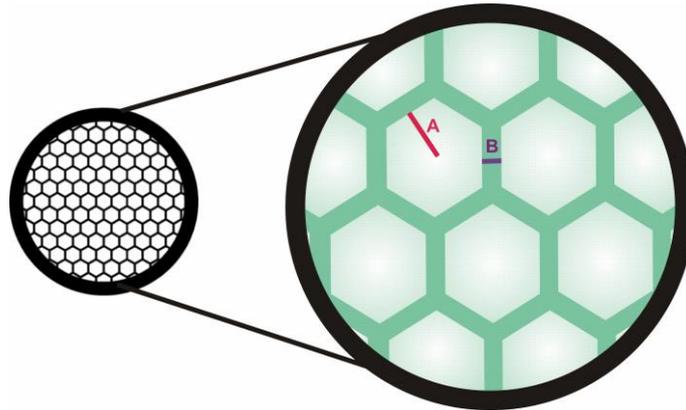


Figura 3.13. Grillas hexagonales de Ni empleadas como máscaras durante el proceso de microfabricación.

La presión de base empleada en la cámara de evaporación fue entre $2,5 \times 10^{-7}$ torr y 3×10^{-7} torr y la separación entre la fuente de evaporación metálica y la superficie del sustrato fue de 20 cm, distancia adecuada para que la dirección del flujo de material sea perpendicular al sustrato. La cantidad de Au evaporada fue 0,32 g aproximadamente. Esta cantidad de material asegura un espesor del hexágono de Au sobre la superficie de vidrio de aproximadamente 200 nm. El tiempo de deposición fue próximo a 30 s.

La Figura 3.14 muestra la topografía y las dimensiones promedio características del sustrato de Au-MSh obtenido.

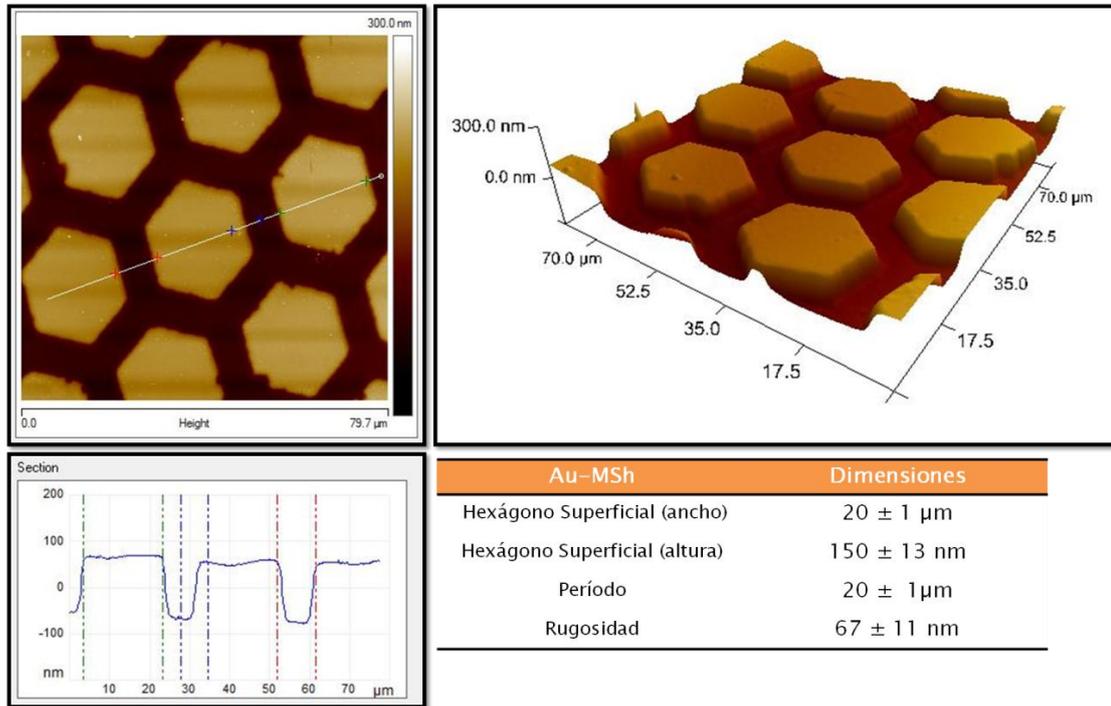


Figura 3.14. Caracterización topográfica de la superficie de Au-MSh: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de Au-MSh (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.4. Superficies nanoestructuradas de Au y Cu

3.4.1. Caracterización de superficies de Au-NSa.

Este tipo de sustratos de Au disponibles en el mercado (Arrandee®, Alemania), presenta una superficie con granos de tamaños entre 50 y 100 nm sin ningún tipo de orientación específica. Los mismos consisten en una capa de Au de 200 nm depositada sobre un sustrato de vidrio que fue previamente cubierto por una fina capa de Cr. El Cr se utiliza como fijador de la capa de Au.

La caracterización de la superficie de Au-NSa se describe en la Figura 3.15.

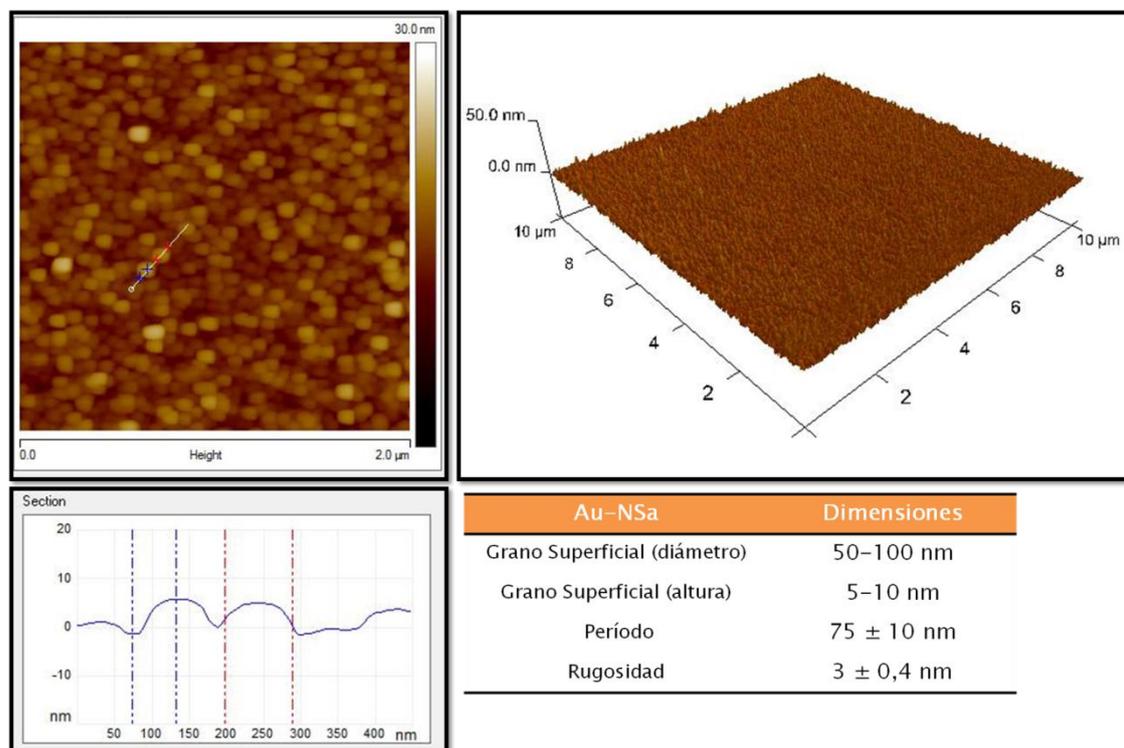


Figura 3.15. Caracterización topográfica de la superficie de Au-NSa: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de Au-NSa (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

3.4.2. Caracterización de superficies de Cu-NSa.

Para el caso del Cu, se utilizó el mismo tipo de sustrato nanoestructurado que para el Au, adquirido a la firma Arrandee®, que consiste en una capa de alrededor de 200 nm de Cu depositada sobre vidrio cubierto por una delgada capa de Cr, que actúa como mordiente.

La superficie de Cu nanoestructurada está formada por granos de diámetros entre 50 y 100 nm sin ningún tipo de orientación específica.

En la Figura 3.16, se observa la topografía y las dimensiones características de la superficie de Cu-NSa.

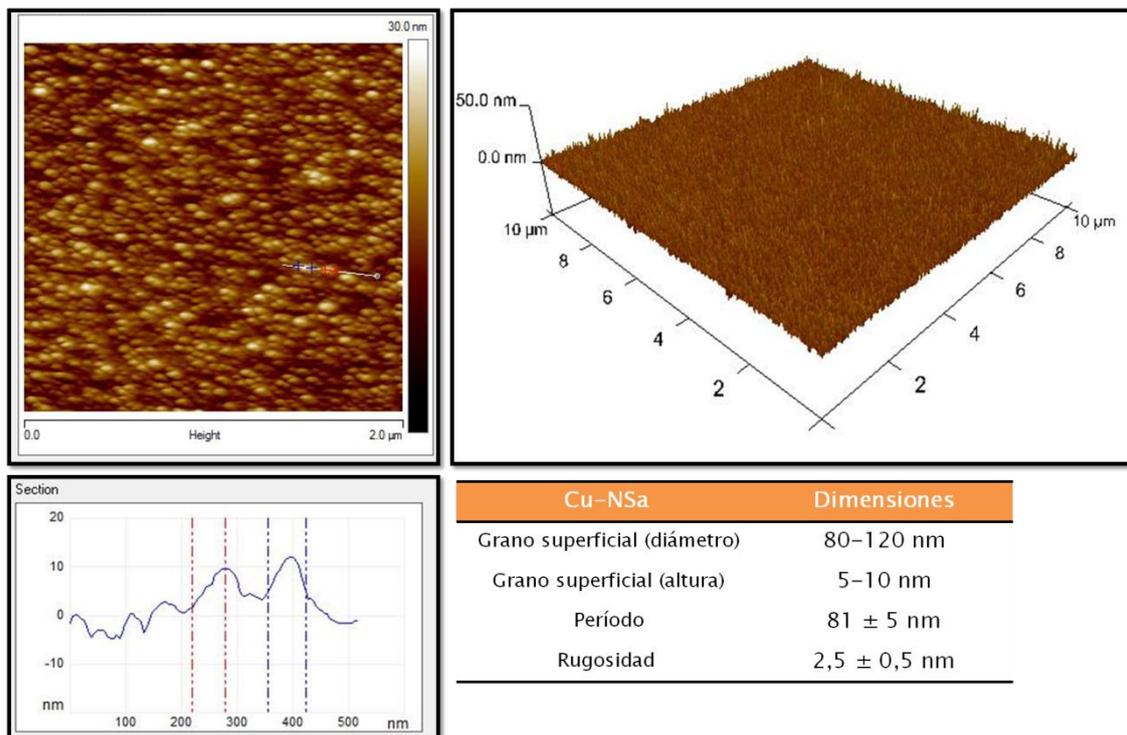
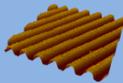
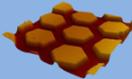
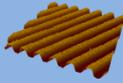
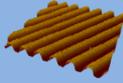
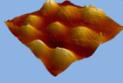
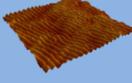


Figura 3.16. Caracterización topográfica de la superficie de Cu-NSa: Imagen AFM topográfica vista desde arriba (*top view*) (arriba izquierda); Imagen AFM tridimensional (arriba derecha); Corte transversal de la superficie de Au-NSa (abajo izquierda); Tabla presentando las dimensiones promedio características (abajo derecha).

Tabla 3.2 Técnicas y materiales utilizados en la preparación de los sustratos.

Sustrato	Técnica de preparación	Condiciones experimentales
Au MS1 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución etanólica 7mM de dodecanotiol (2 h) + enjuague con etanol (30 min) Técnica de deposición: Evaporación metálica en vacío	0,32 g de Au en cámara evaporadora Edwards Presión dentro de la cámara: 10^{-6} torr Tiempo de evaporación: 30 s Electrodeposición de Cu para estabilidad mecánica
Au MSh 	Técnica: Deposición por métodos físicos asistido por máscaras. Máscara: grillas hexagonales de níquel Técnica de deposición: Evaporación metálica en vacío	0,32 g de Au en cámara evaporadora Edwards Presión dentro de la cámara: 10^{-6} torr Tiempo de evaporación: 30 s
Cu MS1 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución 7mM de dodecanotiol en tolueno (2 h) + enjuague con tolueno (30 min) Técnica de deposición: Electrodeposición	Baño electrolítico: 0,6 M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 M H_2SO_4 + 0,025 mM de tiourea Densidad de corriente: 20 mA.cm ⁻² (298 K) Espesor de capa depositada $\approx 10 \mu\text{m}$
PBCA MS1 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución etanólica 7mM de dodecanotiol (2 h) + enjuague con etanol (30 min) Técnica de deposición: Deposición Manual	Molde: Superficie MS1 de Au Gota de PBCA sobre el molde funcionalizado Curado durante 24 h
PBCA MSg 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución etanólica 7mM de dodecanotiol (2 h) + enjuague con etanol (30 min) Técnica de deposición: Deposición Manual	Molde: Superficie NSa de Au Gota de PBCA sobre el molde funcionalizado Curado durante 24 h
Au NSa 	Producto comercial Arrandee®	
Au NSnb 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución etanólica 7mM de dodecanotiol (2 h) + enjuague con etanol (30 min) Técnica de deposición: Evaporación metálica en vacío	0,32 g de Au en cámara evaporadora Edwards Presión dentro de la cámara: 10^{-6} torr Tiempo de evaporación: 30 s Electrodeposición de Cu para estabilidad mecánica
Cu NSa 	Producto comercial Arrandee®	
PBCA NSa 	Técnica: Moldeo y replicación asistida por monocapas autoensambladas. Condiciones para el autoensamblado: Solución etanólica 7mM de dodecanotiol (2 h) + enjuague con etanol (30 min) Técnica de deposición: Deposición Manual	Molde: Superficie Nanoestructurada de Au, arreglo hexagonal de nanopuntos (densidad 10^{11} cm ⁻²) Gota de PBCA sobre el molde funcionalizado Curado durante 24 h

Referencias Bibliográficas

1. Rosi, N. L., Giljohann, D. A., Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K., Han, M. S., y Mirkin, C. A. (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation, *Science* 312, 1027-1030.
2. Steegmueller, R., Wagner, C., Fleckenstein, T., y Schuessler, A. (2002) Gold coating of Nitinol devices for medical applications, pp 161-164.
3. Tanigawa, N., Sawada, S., y Kobayashi, M. (1995) Reaction of the aortic wall to six metallic stent materials, *Acad Radiol* 2, 379-384.
4. Xia, Y., McClelland, J. J., Gupta, R., Qin, D., Zhao, X.-M., Sohn, L. L., Celotta, R. J., y Whitesides, G. M. (1997) Replica molding using polymeric materials: A practical step toward nanomanufacturing, *Advanced Materials* 9, 147-149.
5. Sotomayor Torres, C. M., (Ed.) (2004) *Alternative Lithography: Unleashing the Potentials of Nanotechnology*, Plenum Press, New York.
6. Azzaroni, O., Fonticelli, M. H., Benítez, G., Schilardi, P. L., Gago, R., Caretti, I., Vázquez, L., y Salvarezza, R. C. (2004) Direct Nanopatterning of Metal Surfaces Using Self-Assembled Molecular Films, *Advanced Materials* 16, 405-409.
7. Azzaroni, O., Schilardi, P. L., y Salvarezza, R. C. (2003) Metal electrodeposition on self-assembled monolayers: a versatile tool for pattern transfer on metal thin films, *Electrochimica Acta* 48, 3107-3114.
8. Schilardi, P. L., Azzaroni, O., y Salvarezza, R. C. (2001) A Novel Application of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers in Nanofabrication: Direct Molding and Replication of Patterned Conducting Masters, *Langmuir* 17, 2748-2752.
9. Ulman, A. (1996) Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem Rev* 96, 1533-1554.
10. Jennings, G. K., Munro, J. C., Yong, T.-H., y Laibinis, P. E. (1998) Effect of Chain Length on the Protection of Copper by n-Alkanethiols, *Langmuir* 14, 6130-6139.
11. Zamborini, F. P., y Crooks, R. M. (1998) Corrosion Passivation of Gold by n-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers: Effect of Chain Length and End Group, *Langmuir* 14, 3279-3286.
12. Haag, R., Rampi, M. A., Holmlin, R. E., y Whitesides, G. M. (1999) Electrical Breakdown of Aliphatic and Aromatic Self-Assembled Monolayers Used as

- Nanometer-Thick Organic Dielectrics, *Journal of the American Chemical Society* 121, 7895-7906.
13. Geissler, M., Bernard, A., Bietsch, A., Schmid, H., Michel, B., y Delamarche, E. (2000) Microcontact-Printing Chemical Patterns with Flat Stamps, *Journal of the American Chemical Society* 122, 6303-6304.
 14. Rossnagel, S. M. (2003) Thin film deposition with physical vapor deposition and related technologies, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 21, S74-S87.
 15. Mattox, D. M. (1998) *Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing : film formation, adhesion, surface preparation and contamination control*, Noyes Publications, Westwood, N.J.
 16. Schilardi, P., Méndez, S., Salvarezza, R. C., y Arvia, A. J. (1998) Evolution of the Growth Front for Copper Electrodeposition Followed by Real Time Imaging, *Langmuir* 14, 4308-4314.
 17. Azzaroni, O., Schilardi, P. L., y Salvarezza, R. C. (2001) Pattern Transfer Using Alkanethiolate-Protected Templates: A New Approach in Polymeric Materials Nanofabrication, *Nano Letters* 1, 291-294.
 18. Azzaroni, O., Schilardi, P. L., Salvarezza, R. C., Gago, R., y Vazquez, L. (2003) Direct molding of nanopatterned polymeric films: Resolution and errors, *Applied Physics Letters* 82, 457-459.
 19. Xia, Y., y Whitesides, G. M. (1998) Soft Lithography, *Angewandte Chemie International Edition* 37, 550-575.
 20. Huang, Z., Wang, P.-C., MacDiarmid, A. G., Xia, Y., y Whitesides, G. (1997) Selective Deposition of Conducting Polymers on Hydroxyl-Terminated Surfaces with Printed Monolayers of Alkylsiloxanes as Templates, *Langmuir* 13, 6480-6484.
 21. Burke, S. E. B., C.J. (2004) Controlling the physicochemical properties of weak polyelectrolyte multilayer films through acid/base equilibria, *Pure Appl. Chem.* 76, 1387-1898.
 22. Carvalho, E., Consolin Filho, N., Venancio, E., O., O., Mattoso, L., y Martin-Neto, L. (2007) Detection of Brominated By-Products Using a Sensor Array Based on Nanostructured Thin Films of Conducting Polymers, *Sensors* 7, 3258-3271.

23. Brugger, J., Berenschot, J. W., Kuiper, S., Nijdam, W., Otter, B., y Elwenspoek, M. (2000) Resistless patterning of sub-micron structures by evaporation through nanostencils, *Microelectronic Engineering* 53, 403-405.

Capítulo 4

Evaluación de propiedades fisicoquímicas de sustratos

4.1. Introducción

En el presente Capítulo se evaluarán las propiedades fisicoquímicas de los sustratos que podrían ejercer alguna influencia sobre los procesos de adhesión bacteriana. En particular se estudiarán las propiedades de mojado y carga superficial. También se analizará el comportamiento electroquímico de los metales en soluciones de interés biológico que contienen sustancias orgánicas.

4.2. Propiedades de mojado. Ángulos de contacto

Las mediciones de ángulos de contacto es un método fiable para caracterizar la interacción entre un líquido y una superficie. Cuando la gota de agua no penetra en el sustrato, la interacción puede ser caracterizada por un ángulo de contacto si la superficie es suave y homogénea. Cuando el líquido penetra o se expande en el sustrato la interacción puede ser caracterizada por el ángulo de contacto dinámico como función del tiempo.

El ángulo de contacto es una función de la tensión superficial del líquido y de la energía libre superficial del sustrato. Puede evaluarse mediante una gota de un líquido puro dispuesta sobre un sólido. El ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor, cuyo vértice está donde las tres interfaces se encuentran, constituye el ángulo de contacto (Figura 4.1).

La ecuación de Young que se muestra a continuación describe las interacciones entre las fuerzas de adhesión y cohesión y a partir de esta ecuación puede determinarse la energía superficial por unidad de área.

$$\gamma^{sv} = \gamma^{sl} + \gamma^{lv} \cos\theta$$

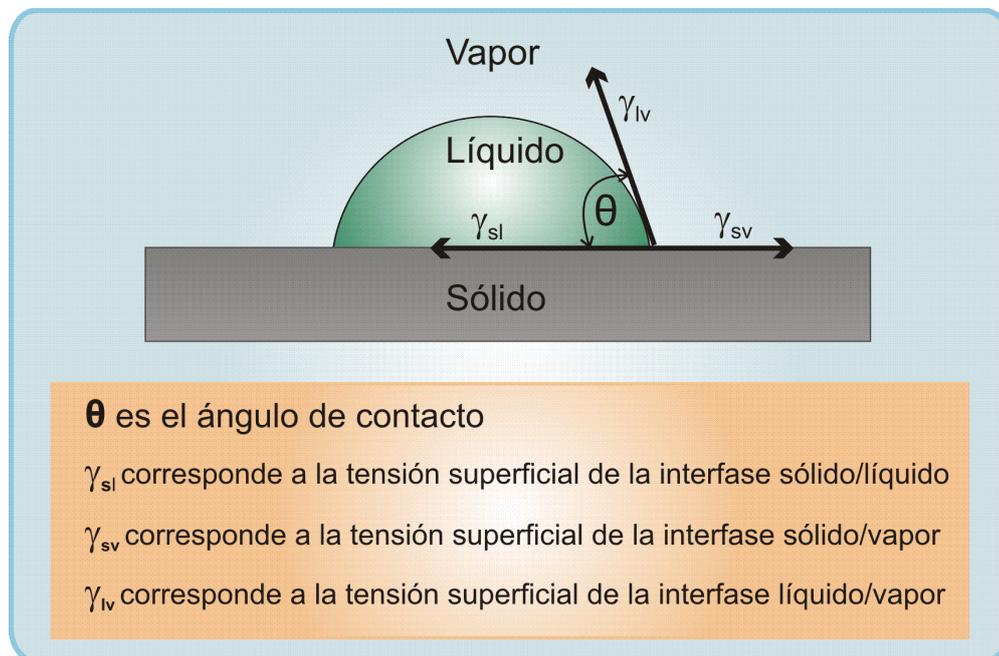


Figura 4.1. Esquema representando el ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor y el vértice en el que las tres interfaces se encuentran constituye el ángulo de contacto

Una superficie en la cual la gota forma un ángulo de contacto mayor que 90° , es una superficie hidrofóbica. Esta condición implica que la mojabilidad, adhesividad y la energía superficial del sólido son bajas. En cambio, si la superficie es hidrofílica, se

observará un ángulo de contacto menor a 90° y tanto la mojabilidad, adhesividad como la energía superficial del sólido serán altas (Figura 4.2).

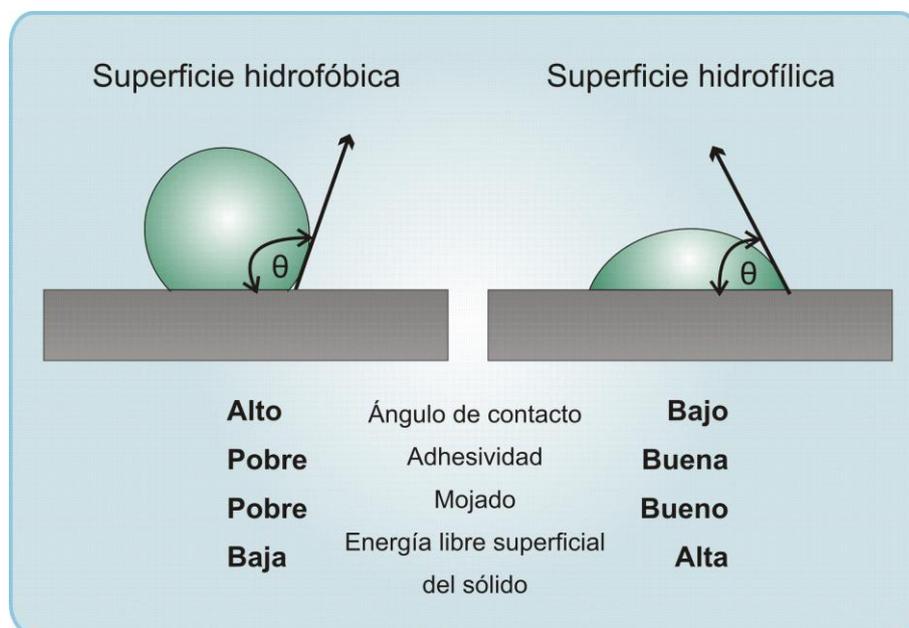


Figura 4.2. Esquema representando los ángulos de contacto de una superficie hidrofóbica e hidrofílica y las distintas propiedades de los mismos.

4.2.1. Evaluación de ángulos de contacto de sustratos

El método empleado para determinar el ángulo de contacto se basa en el método de la gota yacente que surge a partir del método de mojabilidad. El ángulo de contacto θ puede medirse con un instrumento llamado goniómetro, que realiza mediciones estáticas y dinámicas de los ángulos de contacto. En nuestro caso, se empleó la medición estática debido a que los sustratos utilizados son superficies planas, rígidas, químicamente homogéneas y además el líquido no penetra en los sustratos. Se deposita una gota de agua y se mide el ángulo de contacto haciendo una captura digital de la imagen y utilizando programas informáticos específicos.

Para determinar los componentes de tensión superficial de las superficies, se necesitan realizar medidas de ángulos de contacto utilizando líquidos con propiedades de tensión superficial conocidas. Los líquidos más frecuentemente utilizados son el agua ($\gamma=72,75$ mN/m donde γ es la tensión superficial a 20°C) y formamida ($\gamma=58,20$ mN/m) como solventes polares y diiodometano ($\gamma=50,80$ mN/m) como solvente no polar (1-2). El agua fue seleccionada como el líquido más adecuado para los ensayos debido a que el

mismo puede utilizarse tanto para superficies abióticas (metales, polímeros, etc) como para la determinación de la hidrofobicidad de la superficie del microorganismo (3), tal cual se describe en el Capítulo 5.

La determinación de los ángulos de contacto correspondientes a los diferentes sustratos utilizados en este trabajo, se realizó mediante el empleo de un goniómetro Ramé Hart 200 (Figura 4.3).



Figura 4.3. Equipo Ramé-Hart utilizado para la medida de los ángulos de contacto.

Cada dato de ángulo de contacto determinado es el resultado del promedio de 10 medidas de ángulos de contacto estáticos medidos tanto en la zona derecha como izquierda de la gota formada sobre la superficie en estudio. Estas imágenes fueron analizadas con un software específico, DROP Image Advanced 2.2v. El tipo de imagen y los datos que se obtienen se muestran en la Figura 4.4.

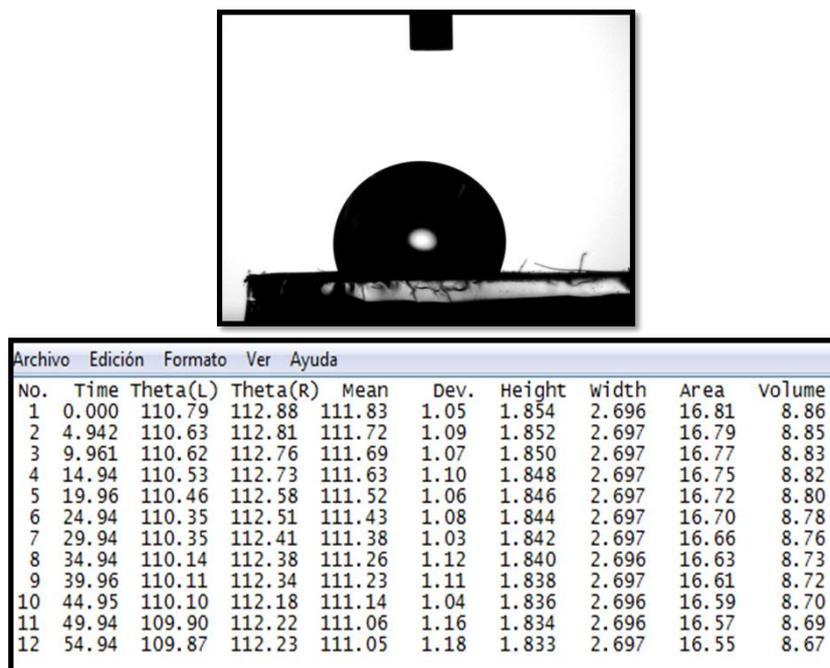


Figura 4.4. Imagen de la gota de agua bidestilada sobre una superficie obtenida con la cámara del goniómetro Ramé–Hart y las medidas obtenidas utilizando el software DROP Imagen Advanced 2.2v.

Los ángulos de contacto fueron determinados a temperatura ambiente, colocando una gota de agua bidestilada sobre la superficie del sustrato correspondiente y los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Ángulos de contacto de los diferentes sustratos

Au		Ángulo de contacto
NSa		51,7 ± 0,3
MS1		97,5 ± 0,1
NSnb		95,6 ± 0,3
Cu		Ángulo de contacto
NSa		98,6 ± 0,1
MS1		90,1 ± 0,1
PBCA		Ángulo de contacto
NSa		78,1 ± 0,1
MS1		83,7 ± 0,1
MSg		82,8 ± 0,2

Como puede observarse los mayores valores corresponden a la superficie Cu-NSa y los menores a la superficie Au-NSa. Es interesante notar que esta última difiere significativamente de los valores correspondientes a la superficie Au-MS1 y Au-NSnb. Estas diferencias no se observaron en los sustratos de Cu y PBCA.

4.3. Determinación de la carga superficial de los sustratos metálicos.

Para la evaluación de la carga superficial de los sustratos metálicos se determinó el potencial a circuito abierto y se obtuvo de la literatura el potencial de carga cero (pcz) (4-5) y el punto isoeléctrico (PI) en el caso del Cu (6).

El potencial a circuito abierto (también conocido como potencial de reposo o potencial de corrosión) es el potencial del electrodo de trabajo relativo al electrodo de referencia utilizado, cuando no se aplica voltaje ni corriente a la celda.

El potencial fue medido contra un electrodo de calomel saturado (SCE) y mediante el empleo de un potenciostato *PAR 632 EG&G Instruments*. El contraelectrodo utilizado fue una chapa de Pt.

Para las medidas de potencial a circuito abierto, se emplearon los sustratos de Au-NSa y Cu-NSa como electrodos de trabajo y un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo como solución electrolítica. Los gráficos registrados para la determinación de los potenciales a circuito abierto de Au y Cu se muestran en la Figura 4.5.

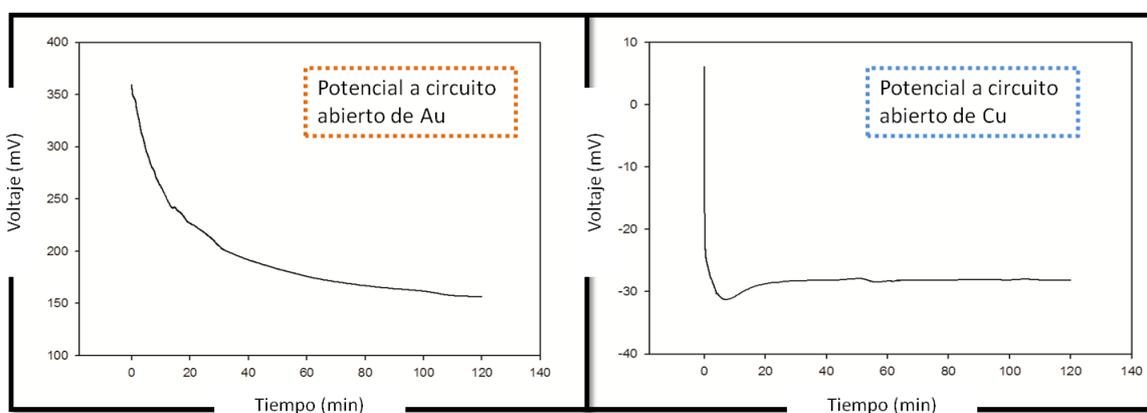


Figura 4.5. Potenciales de circuito abierto de un electrodo de Au y Cu con un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo como solución electrolítica.

El análisis de los gráficos anteriores muestran que los valores de potencial a circuito abierto para el Au y Cu después de 2 h de inmersión en un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo fueron los indicados en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2. Potenciales a circuito abierto y potenciales de carga cero de Au y Cu vs SCE.

	Potencial a circuito abierto vs SCE	Potencial de carga cero vs SCE
Au	153 mV	-600 mV (a)
Cu	-28 mV	-310 mV (b)

(a) De la referencia (4); (b) De la referencia (5)

Para el caso del Au, el potencial a circuito abierto (153 mV) tiene un valor más positivo que el pcz (-600 mV) (4), entonces, se puede concluir que la superficie de Au presenta una carga superficial positiva.

El potencial a circuito abierto del electrodo de Cu (-28 mV) también es más positivo que el pcz (-310 mV) (5). Sin embargo, los datos electroquímicos indican que las superficies de Cu se cubren progresivamente de Cu₂O en medio neutro (6), por lo tanto el PI es una variable más adecuada para la determinación de la carga superficial del sustrato de Cu. Cabe recordar que el PI es el pH al que una molécula o superficie tiene carga cero. Debe tenerse en cuenta que el valor del PI varía con la adsorción de moléculas a la superficie (7). Como el PI del Cu es aproximadamente 9,5 a 25 °C en medio acuoso, la carga superficial del Cu también es positiva debido a que el pH del medio de cultivo es 7,6.

La carga superficial del PBCA es levemente negativa (8) según datos obtenidos de bibliografía.

4.4. Adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie de sustratos metálicos.

Para evaluar la posible adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie de sustratos metálicos se realizaron medidas de capacidad de la doble capa en el caso de sustratos de Au. En el caso de sustratos de Cu, se emplearon medidas de ángulo de contacto, debido a que la electroquímica de superficies de Cu oxidadas en medios que contienen cloruros es muy compleja.

Cuando dos fases de distinta composición química se ponen en contacto, entre ellas se establece una diferencia de potencial que va acompañada por una separación de

cargas: un lado de la interfaz se carga positivamente y el otro negativamente y se establece una doble capa eléctrica. En particular, cuando la interfaz consiste en un metal y un electrolito, la doble capa actúa como un capacitor que es cargado cuando la interfaz se polariza. Uno de los métodos más aceptados para estudiar especies adsorbidas es el análisis de la respuesta electroquímica del metal mediante voltamperometría cíclica en la ventana de potencial correspondiente a la doble capa. La formación de una capa de especies adsorbidas disminuye la capacidad de la doble capa, comparada con la del electrodo desnudo (9).

La voltamperometría cíclica es un tipo de medida electroquímica en donde se usa una señal de potencial que varía con el tiempo según una función lineal (10). Permite el estudio de las propiedades redox de compuestos químicos y de estructuras interfaciales. Es una herramienta útil para el estudio de la doble capa eléctrica. En la voltamperometría cíclica, el potencial aplicado varía con el tiempo según una velocidad ($\Delta E/\Delta t$) determinada. Para las medidas que se llevaron a cabo en este trabajo se utilizaron variaciones lineales de potencial hasta un cierto límite anódico y luego un barrido inverso hasta el potencial inicial (Figura 4.6), es decir, curvas de barrido triangulares. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante debida al potencial aplicado. Si se grafica la corriente vs. el potencial aplicado, se obtiene un voltamperograma como el que se observa en la Figura 4.6b, que es una función de un gran número de parámetros fisicoquímicos. Estas curvas brindan información acerca de la naturaleza de la solución y de los electrodos y acerca de las reacciones que ocurren en la interfaz.

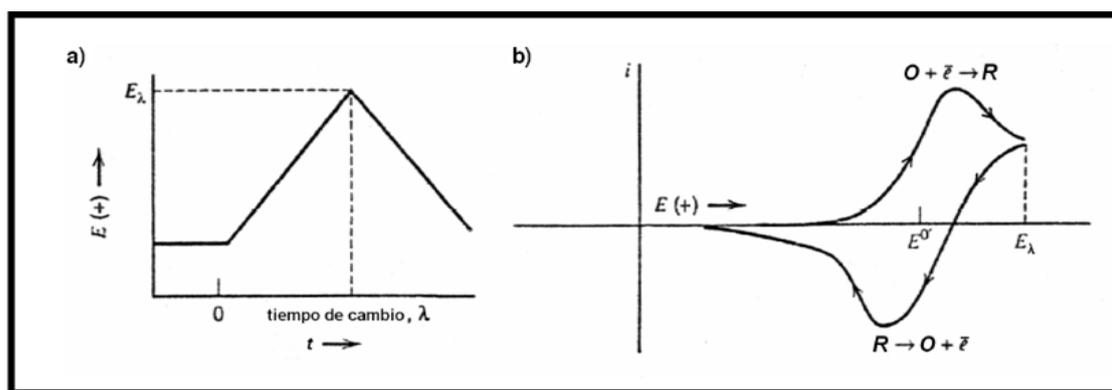


Figura 4.6. (a) Rampa triangular de voltaje aplicada durante la realización de un voltamperograma. (b) Ejemplo de un voltamperograma obtenido con la aplicación de una rampa triangular de voltaje.

La celda electroquímica empleada posee tres electrodos: electrodo de trabajo (ET), contraelectrodo (CE) y electrodo de referencia (ER). En este arreglo la corriente

circula entre el ET y CE, y la diferencia de potencial se mide entre el ET y ER. El CT, en este caso de Pt, debe ser inerte. Como electrodos de trabajo se utilizaron sustratos de Au-NSa. Se ha utilizado un electrodo de calomel saturado (SCE) como electrodo de referencia. La solución electrolítica es una solución 0,5% p/v de NaCl.

Los sustratos de Au fueron sumergidos previamente, tanto en caldo nutritivo como en una solución de albúmina durante distintos tiempos y luego fueron utilizados como electrodos de trabajo en la celda electroquímica. La concentración de albúmina (Sigma 99.9%) utilizada para simular la concentración de la misma en sangre fue de 34 g/l. El solvente empleado para la disolución fue una solución tampón de fosfatos (PBS), 5mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , de pH 7,2.

Los voltamperogramas se obtuvieron a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s.

El voltamperograma de color rojo de la Figura 4.7 corresponde al sustrato de Au-NSa que fue sumergido en una disolución de caldo nutritivo durante 2 h, la misma solución que fue utilizada para el crecimiento de las bacterias y los ensayos de adhesión. El gráfico de color azul en la Figura 4.7, corresponde al electrodo de Au-NSa inmerso en una solución de albúmina durante 2 h. El voltamperograma de color negro de esta Figura corresponde al sustrato de Au-NSa limpio, sin tratamiento previo de inmersión en soluciones de compuestos orgánicos (blanco).

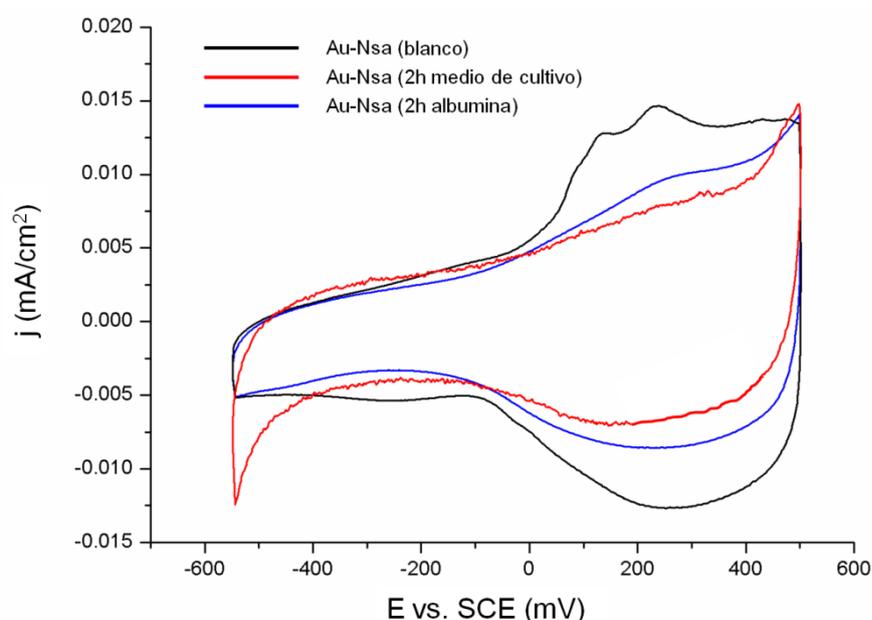


Figura 4.7. Voltamperogramas de electrodos de Au-NSa. El voltamperograma de color negro corresponde al electrodo limpio (blanco); el rojo corresponde al electrodo luego de 2 h de exposición en medio nutritivo y el azul corresponde al electrodo sumergido durante 2 h en la solución de albúmina.

Para confirmar la presencia de moléculas orgánicas adsorbidas, se calcula la capacidad de la doble capa a partir de los voltamperogramas cíclicos. La capacidad de la doble capa C_{dl} ($\mu F\ cm^{-2}$), se obtuvo dividiendo la densidad de corriente total, j_{tot} ($A\ cm^{-2}$), es decir el promedio de las densidades de las corrientes catódicas y anódicas ($(j_{anódica}+j_{catódica})/2$) por la velocidad de barrido, v [V/s]. Las densidades de corriente (j), para dicho cálculo fueron tomadas a $-200\ mV$. El método empleado para el cálculo de las capacidades de la doble capa resulta útil para comparar cualitativamente la adsorción de moléculas orgánicas sobre los sustratos. Sin embargo, para la correcta determinación de los valores de capacidad de la doble capa se debería utilizar otro tipo de técnica, como por ejemplo la espectroscopia de impedancia electroquímica.

En el gráfico de la Figura 4.8 se muestra cómo la capacidad disminuye significativamente luego de la inmersión del electrodo de Au-NSa en el medio de cultivo (círculos rojos). Los compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo bloquean rápidamente la superficie de Au y obstaculizan la transferencia de electrones.

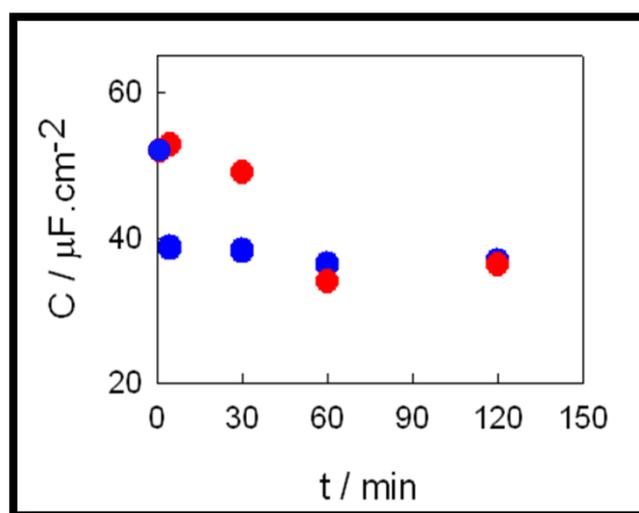


Figura 4.8. Gráfico de Capacidad (C) vs. tiempo de inmersión del sustrato de Au en caldo nutritivo (●) y en solución de albúmina (●)

En el gráfico también pueden observarse las capacidades de la doble capa del electrodo de Au-NSa (círculos azules) para los distintos tiempos de inmersión en la solución de albúmina (34 g/l). La representación gráfica muestra el mismo comportamiento, con una evidente disminución de la capacidad de la doble capa eléctrica con el tiempo en coincidencia con trabajos previos (9, 11). Sin embargo, el proceso de adsorción de proteínas es más rápido que para el caso del caldo nutritivo.

Referencias Bibliográficas

1. Brant, J. A., y Childress, A. E. (2002) Assessing short-range membrane-colloid interactions using surface energetics, *Journal of Membrane Science* 203, 257-273.
2. Ong, Y.-L., Razatos, A., Georgiou, G., y Sharma, M. M. (1999) Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces, *Langmuir* 15, 2719-2725.
3. Dong, H., Onstott, T. C., Ko, C.-H., Hollingsworth, A. D., Brown, D. G., y Mailloux, B. J. (2002) Theoretical prediction of collision efficiency between adhesion-deficient bacteria and sediment grain surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 24, 229-245.
4. 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.
5. Lukomska, A., y Sobkowski, J. (2004) Potential of zero charge of monocrystalline copper electrodes in perchlorate solutions, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 567, 95-102.
6. Feng, Y., Teo, W. K., Siow, K. S., Tan, K. I., y Hsieh, A. K. (1996) The corrosion behaviour of copper in neutral tap water. Part I: Corrosion mechanisms, *Corrosion Science* 38, 369-385.
7. Torres Sánchez, R.M., Castro Luna, A.M., Zerbino, J.O. (2003) CO adsorption on copper in alkaline electrolytes: an electrochemical and ellipsometric study, *Journal of Colloid and Interface Science* 264 (1), 114-120.
8. 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.
9. Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., y Wallace, G. G. (2004) Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions, *Electrochimica Acta* 49, 4223-4230.
10. Bard, A. J., Faulkner, L.R., (Ed.) (1980) *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, New York.

11. 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.

Capítulo 5

Caracterización Microbiológica.

5.1 Microorganismo y medios de cultivo utilizados.

5.1.1. Cepa Bacteriana.

Entre las bacterias capaces de formar biofilms se encuentran tanto las Gram positivas como Gram negativas, patógenas y no patógenas. Entre las bacterias Gram negativas los biofilms de *Pseudomonas* tienen especial importancia ya que por su ubicuidad impactan en la medicina, industria y medio ambiente.

Las *Pseudomonas* son microorganismos móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares (1). Estos microorganismos presentan además, un interés particular debido a que son tomados como modelo en estudios de desplazamiento colectivo conocido como *swarming* (2-13), tal como se detallará en los Capítulos 7 y 8. Algunas especies sintetizan una capa de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas o biofilms, y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o complementos, aumentando así su patogenicidad. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque también pueden ser patógenos oportunistas en animales (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) y patógenos de plantas (*P. syringae*). Tienen un metabolismo aerobio, con el O₂ como aceptor de electrones pero algunas cepas tienen uno anaerobio, utilizando el NO₃⁻ como aceptor de electrones. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos, fácilmente solubles en agua (14). Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo. Presentan una amplia versatilidad metabólica que se traduce en su capacidad para utilizar sustratos muy variados como fuente de carbono. Dicha versatilidad se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas las cuales permiten catabolizar los compuestos presentes en el medio. Debido a ello, las *Pseudomonas* son capaces de colonizar un amplio rango de nichos (15). En concordancia con otros biofilms bacterianos, las biopelículas de *Pseudomonas* son más resistentes a los antibióticos que las correspondientes células planctónicas (16).

Para el presente trabajo de Tesis, se eligió una cepa de *P. fluorescens* que fue cedida gentilmente por la Dra Christine Gaylarde del Departamento de Biología y Química de la UNIJUI en Brasil y fue identificada por pruebas estándares bacteriológicas utilizando medios selectivos y tests bioquímicos.

Las bacterias *P. fluorescens* son organismos aerobios quimioorganotróficos, es decir, que su metabolismo se basa en reacciones de óxido-reducción para obtener energía, utilizando sustancias oxidables a pH neutro o básico. Su diámetro varía entre 0,5 y 0,8 μm. Se reproducen a temperaturas mesófilas (entre 25 y 30°C) y como todo el género de *Pseudomonas* presentan una gran capacidad para utilizar diversidad de nutrientes, lo que explica su ubicuidad. Su versatilidad nutricional ligada a su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente

responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas.

P. fluorescens ha sido frecuentemente identificada como microorganismo contaminante de la piel humana y como agente causante de bacteremia (presencia de bacterias en sangre) e infecciones en pacientes hospitalizados (17-19). Esta especie de *Pseudomonas* también ha sido aislada de pacientes que presentaban infecciones complicadas del tracto urinario (11, 20). Asimismo cabe mencionar su presencia en biofilms desarrollados en diversos sistemas industriales, como así también su potencial riesgo para causar serios problemas en términos del proceso y la seguridad del producto final en la industria alimenticia. En los procesos industriales de alimentos percederos diarios, *P. fluorescens* es uno de los microorganismos psicotróficos más comúnmente aislados y además domina la microflora de la leche cruda o pasteurizada en el momento de su deterioro (21-22). Esta capacidad para el deterioro de este tipo de productos se debe a la producción de lipasas, proteasas y lecitinasas extracelulares altamente estables en ambientes de altas temperaturas y que, por ende, persisten durante las etapas térmicas llevadas a cabo durante el procesamiento de los productos (23-24). Recientemente, algunos estudios han demostrado que algunas cepas de *Pseudomonas*, entre ellas *P. fluorescens*, pueden incrementar la colonización de superficies por parte del microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes* (25) y/o proteger a esta bacteria de la acción de los desinfectantes. En base a lo reportado previamente, se consideró de gran interés utilizar a *P. fluorescens* en los ensayos realizados para el presente Trabajo de Tesis.

5.1.1.1. Técnicas de conservación de la cepa bacteriana.

Debe tenerse en cuenta que es de suma importancia la conservación de la cepa de trabajo para mantener los cultivos viables a lo largo del tiempo, puros, sin contaminaciones y sin cambios en sus características, o sea, estables. La técnica de conservación utilizada durante los períodos de trabajo fue el subcultivo seriado. Esta técnica consiste en resembrar el microorganismo cada cierto tiempo en un medio adecuado. Para el caso de *P. fluorescens*, se realizó un cultivo sobre agar Cetrimide (DIFCO) inclinado y se mantuvo a 28°C para posibilitar el crecimiento óptimo del microorganismo. Posteriormente se transfirió a un compartimiento refrigerado a 4°C para lentificar el metabolismo de la bacteria. Cada 20 días se resembró el microorganismo en agar Cetrimide inclinado ya que

en medio sólido se detectan mejor los contaminantes que en medio líquido y al hacerlo inclinado se evita la desecación rápida del medio.

5.1.2 Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados durante la totalidad de los ensayos realizados en el presente trabajo de Tesis fueron:

- Líquido: Caldo nutritivo (MERCK)
- Sólido: Agar Cetrimide (DIFCO)

La composición del caldo nutritivo se indica en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Composición del Caldo Nutritivo

Composición Caldo Nutritivo	g/l
Peptona de carne	5
Extracto de carne	3

El pH del este medio de cultivo es $7,0 \pm 0,2$. El Caldo Nutritivo se utilizó como medio de cultivo no selectivo para llevar a cabo todos los ensayos en medios líquidos.

La composición del Agar Cetrimide se indica en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Composición de Agar Cetrimide

Composición Agar Cetrimide	g/l
Digestivo pancreático de gelatina	20
Cloruro de magnesio	1,4
Sulfato de potasio	10
Cetrimide (Bromuro de tetradeciltrimetil amonio)	0,3
Agar	13,6

El Agar Cetrimide se utilizó como medio sólido para mantener a la cepa de *P. fluorescens* debido a que es un medio selectivo para el género *Pseudomonas*. La cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibe el crecimiento de otras bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. Dicho medio promueve la producción de piocianina y fluoresceína que se observan con luz ultravioleta en los cultivos de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*.

5.2 Cultivo de *P. fluorescens* en medio líquido: Curva de calibración.

Para realizar ensayos microbiológicos bajo condiciones equivalentes es necesario trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. Una de las formas de medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento de la misma es utilizando un método que relacione dicha biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz. Para estas determinaciones se utiliza un espectrofotómetro, en el cual la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano. El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo (I_0) y la transmitida (I) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia (A) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre I_0 y la de la luz transmitida por la suspensión, $A = \log I_0/I$. A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (dicha intensidad se detecta como corriente en un galvanómetro). Esta reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células. Sin embargo, la absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de Absorbancia (medidas a 600 nm de longitud de onda).

El conteo en placa o de colonias es un método de medición de biomasa que permite el recuento de células viables y consiste en determinar el número de células capaces de reproducirse y generar colonias sobre un medio sólido (cada célula viable da origen a una colonia). Por lo tanto este método no es capaz de cuantificar células vivas pero incapaces de reproducirse.

Para realizar el conteo en placa, la muestra original se diluyó varias veces para disminuir suficientemente la población celular. Posteriormente, 100 μ l de cada dilución se derramaron y extendieron sobre placas de petri con agar nutritivo. Se dejaron incubar a 28°C en forma invertida. Luego del período de crecimiento, se examinaron las placas y se contaron aquellas que tienen entre 30 y 300 colonias por placa para realizar un adecuado análisis estadístico.

La Figura 3.1 muestra la curva de calibración realizada que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). La medición de absorbancia es un método sencillo y más rápido que el conteo en placa pero es menos

sensible y está limitado a cultivos celulares con concentraciones de 10^7 células/ml o mayores. Con el objetivo de la determinación de una curva de calibración representativa del sistema en estudio, los ensayos se realizaron por duplicado y cada ensayo fue repetido tres veces en forma independiente

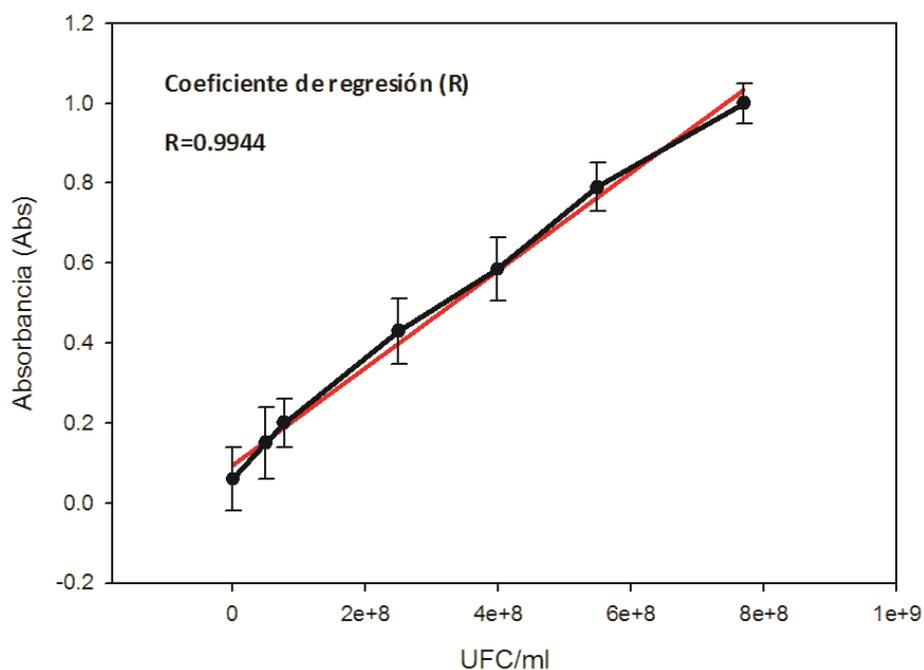


Figura 3.1. Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens*.

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{abs} = 1,218 \times 10^{-9} X_{ufc/ml} + 0,094_{abs}$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, el número de unidades formadoras de colonias. Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia de 0,5 le correspondería 3×10^8 UFC/ml.

5.3 Cultivo de *P. fluorescens* en medio líquido: Curva de crecimiento.

Para la realización de la curva de crecimiento de *P. fluorescens* se empleó un frasco erlenmeyer conteniendo 200 ml de caldo nutritivo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento con una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 600 nm corresponda a 0,10 ($4,9 \times 10^6$ UFC/ml).

Posteriormente, los frascos se sometieron a agitación durante 3 h (agitación a 120 ciclos por min) a una temperatura de 28°C. Seguidamente, se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestras de 2,5 ml de la suspensión de *P. fluorescens* a distintos tiempos y midiendo su densidad óptica con un Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800. Al finalizar la experiencia cinética, el cultivo de *P. fluorescens* fue inoculado sobre un medio sólido para asegurar la ausencia de contaminación. La curva de crecimiento obtenida es la que se muestra en la Figura 3.2 en escalas lineal y logarítmica. Los ensayos para la determinación de las curvas de crecimiento se realizaron por duplicado y tres veces en forma independiente. Con dichos datos se obtuvieron las desviaciones estándar para cada uno de los puntos de la curva de crecimiento.

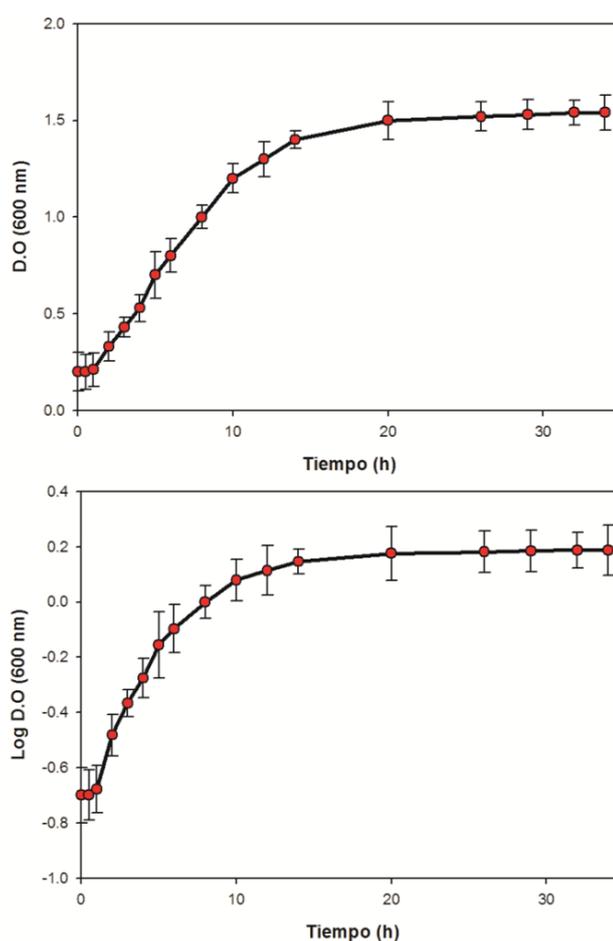


Figura 3.2. Curva de crecimiento en medio líquido de *P. fluorescens*. La curva superior muestra la relación entre la densidad óptica (DO) y el tiempo y la inferior log DO vs. tiempo.

A partir de esta curva de ordenadas logarítmicas pudo deducirse que la fase de latencia es de aproximadamente 1 h y que la fase exponencial tiene una duración cercana a 8 h. Luego de este tiempo, el cultivo entra en un estado estacionario (número de microorganismos aproximadamente constante).

5.4 Crecimiento de biopelículas sobre superficies.

5.4.1. Curva de crecimiento del biofilm.

Además de la curva de crecimiento de *P. fluorescens* en medio líquido, es necesario conocer la curva del crecimiento del microorganismo adherido a la superficie modelo en estudio. En este caso, el sustrato elegido es una superficie de Au (Au-NSa, que se describe detalladamente en el Capítulo 3). Se utilizó un cultivo de *P. fluorescens* tal cual se describió anteriormente para la curva de crecimiento en medio líquido. Posteriormente, sobre cada sustrato de Au, se colocaron microgotas de 25 μ l y se dejaron durante 30 min para que se adhirieran las primeras bacterias. Los sustratos se enjuagaron con agua bidestilada estéril para retirar los microorganismos débilmente adheridos y luego, se mantuvieron inmersos en caldo nutritivo estéril para que las células adheridas crezcan sobre la superficie durante distintos tiempos para obtener una curva de crecimiento sobre el sustrato. La misma metodología fue utilizada para el estudio de la formación de biofilms sobre los distintos sustratos estudiados.

Para determinar la cantidad de microorganismos sobre la superficie se utilizó una mezcla de colorantes (*kit Live/Dead BacLight*®) que permite identificar las células vivas adheridas sobre la superficie (se describe el mecanismo de acción del colorante en el Capítulo 2). La técnica de epifluorescencia permitió la determinación del área del sustrato cubierta por los microorganismos. Cada ensayo fue realizado por duplicado y se repitió en forma independiente tres veces.

En la Figura 3.3, se observa la curva de crecimiento sobre la superficie de Au-NSa de *P. fluorescens*. Se observa que durante las primeras 12 h el área cubierta por el biofilm crece y llega a un máximo para luego disminuir.

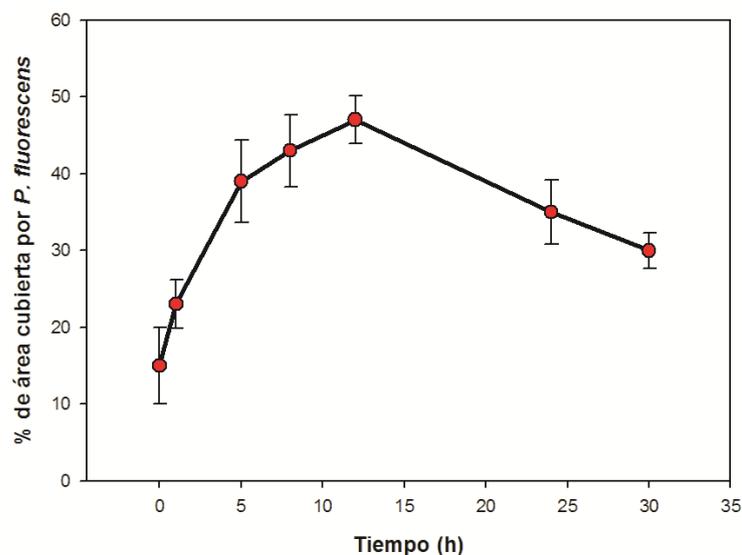


Figura 3.3. Curva de crecimiento de *P. fluorescens* adheridas sobre una superficie de Au. El crecimiento se mide como porcentaje de área cubierta por el biofilm.

5.4.1. Formación de biofilms sobre distintos sustratos.

Para el estudio de la adhesión, comportamiento y distribución de las bacterias *P. fluorescens* sobre los distintos sustratos, se realizaron ensayos a partir de un inóculo preparado a partir de un pico de flauta de *P. fluorescens* en agar cetrimide resuspendido en 2 ml de caldo nutritivo estéril. Luego, este inóculo fue vertido en un erlenmeyer con 300 ml de caldo nutritivo estéril y se mantuvo en agitación durante 3 h a 28 °C. Luego de 24 h, los sustratos en estudio se colocaron dentro del cultivo bacteriano durante diferentes tiempos, para que los microorganismos se adhieran a la superficie de los mismos y se inicie el proceso de desarrollo del biofilm. Posteriormente al período de inmersión, las muestras fueron retiradas, se realizaron varios enjuagues con agua bidestilada estéril para retirar aquellos microorganismos débilmente adheridos y por último fueron secados al aire (70% de humedad relativa).

5.5 Estudio de los factores que influyen sobre la adherencia bacteriana a superficies.

De acuerdo a lo descripto en el Capítulo 1, el proceso de adhesión es sumamente complejo y está afectado por diversos factores entre ellos: (1) características del microorganismo, (2) naturaleza química y física de la superficie en estudio, (3)

características del ambiente en el que crecen las células (propiedades físicoquímicas del medio, la presencia de carbohidratos, proteínas o sustancias bactericidas, etc.). Por lo tanto, es de sumo interés, tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado, estudiar detalladamente cómo influirían factores como la hidrofiliidad de la membrana sobre las primeras etapas de formación del biofilm. (26).

5.6 Determinación de la hidrofobicidad de la membrana celular.

Las investigaciones que se han realizado sobre los mecanismos fundamentales que rigen el proceso de adhesión bacteriana han demostrado que tanto las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals como la interacciones ácido-base de Lewis, que impactan sobre la hidrofobicidad, están involucradas en el proceso de adhesión.

La hidrofobicidad bacteriana puede determinarse por varios métodos: (1) método del ángulo de contacto (27-28); (2) evaluación de la habilidad de la bacteria para adherirse a hexadecano, hidrocarburos o poliestireno (29-33); (3) partición del microorganismo en un sistema de dos fases acuosas (34-36); (4) el test del agregado de sal (29, 37-38); (5) cromatografía de interacción hidrofóbica (29, 38-39); (6) test de aglutinación de partículas de latex (29, 40); o (7) la dirección de desplazamiento (41).

En el presente trabajo la afinidad de la membrana bacteriana por solventes y la capacidad donora y aceptora de electrones (propiedades ácido-base de Lewis) de la superficie celular de *P. fluorescens* se determinaron a través de medidas indirectas utilizando dos técnicas: (1) Adhesión Microbiana a Solventes (Microbial Adhesion To Solvents, MATS) y la medida de ángulo de contacto (Contact Angle Meter testing, CAM).

5.6.1. Método de Adhesión Microbiana a Solventes (MATS).

El método MATS se basa en la comparación entre la afinidad celular por un solvente monopolar y un solvente apolar (42). El solvente monopolar puede ser de naturaleza ácida (aceptor de electrones) o básica (donor de electrones), pero ambos solventes deben tener componentes de tensión superficial Lifshitz van der Waals similares. Teniendo en cuenta estos requisitos, los solventes elegidos fueron: cloroformo, un solvente ácido (aceptor de electrones) y hexadecano, un solvente apolar.

Se prepararon suspensiones bacterianas de densidad óptica (A_0) entre 0,8 y 0,9 en una solución tampón conocida como PUM buffer, que está compuesta por 19.7 g K_2HPO_4 , 7.26 g KH_2PO_4 , 1.8 g H_2NCONH_2 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua bidestilada hasta llegar a un volumen de 1000 ml. Esta solución amortiguadora de alta fuerza iónica (aproximadamente 150 mM), promueve la adhesión bacteriana y minimiza los efectos electrostáticos, acentuando así la importancia de las interacciones hidrofóbicas. Posteriormente, se mezclaron 3,5 ml de la suspensión bacteriana en dicho solvente con 0,8 ml del solvente bajo estudio y esta mezcla fue sometida a agitación vigorosa en vortex durante 1 min. Esta suspensión se dejó reposar durante 15 min para asegurar la completa separación de las fases. Seguidamente, se retiró cuidadosamente un volumen de 2 ml correspondiente a la fase acuosa y se midió la densidad óptica de la misma (A) a una longitud de onda de 550 nm con un Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800.

El porcentaje de las células adheridas al solvente bajo análisis se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Adherencia} = (1 - A/A_0) \times 100$$

donde A_0 es la densidad óptica medida a 550 nm de la suspensión bacteriana antes de la mezcla con el solvente y A es la absorbancia después del mezclado.

Las medidas se realizaron por triplicado empleando tres alícuotas de una misma suspensión microbiana para cada test de MATS, realizándose 3 ensayos independientes.

5.6.1.1. Resultados obtenidos a través de MATS.

Los resultados obtenidos a partir de medidas de MATS se muestran en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3. Porcentaje de afinidad de *P. fluorescens* a distintos solventes.

	% de afinidad a hexadecano	% de afinidad a cloroformo
<i>P. Fluorescens</i>	34,80 ± 5,77	76,00 ± 4,30

Considerando los resultados obtenidos con los diferentes solventes bajo estudio (Cloroformo/Hexadecano), se puede asumir que la mayor afinidad de *P. fluorescens* por el cloroformo, un solvente ácido, se debe a que las bacterias bajo estudio presentan propiedades básicas o donoras de electrones. El carácter donador de electrones puede atribuirse a la presencia de grupos básicos en la superficie celular (42-43), como por

ejemplo, grupos carboxílicos (COO^-), fosfatos (PO_4^{2-}) y grupos aminos (NH_2). Estos resultados están de acuerdo con los datos disponibles en literatura (44-45).

5.6.2. Medida del ángulo de contacto (CAM).

Con el objetivo de corroborar la hidrofiliidad de *P. fluorescens* se utilizó el método de la gota yacente para obtener la medida del ángulo de contacto entre una capa de bacterias y una gota de agua bidestilada. Una descripción detallada de medidas de ángulo de contacto se realizó en el Capítulo 4.

Para obtener las medidas del ángulo de contacto de *P. fluorescens*, se filtró una solución de células previamente enjuagadas con agua bidestilada estéril a través de un filtro de acetato de celulosa, mediante presión negativa, hasta la deposición de una capa de bacterias sobre el filtro. Posteriormente, los filtros fueron secados al aire durante aproximadamente 1 h. Luego, se obtuvieron los resultados de ángulos de contacto mediante la técnica de la gota yacente con agua bidestilada estéril como solvente (esquema de la medida en Figura 5.4). Las medidas de los ángulos de contacto de equilibrio se realizaron con un goniómetro Ramé-Hart Modelo 500 (Ramé-Hart Instruments Co.). Cada valor de ángulo de contacto (θ) obtenido proviene del promedio de 10 medidas tanto en el lado derecho como en el lado izquierdo de la gota de agua sobre la capa de bacterias.

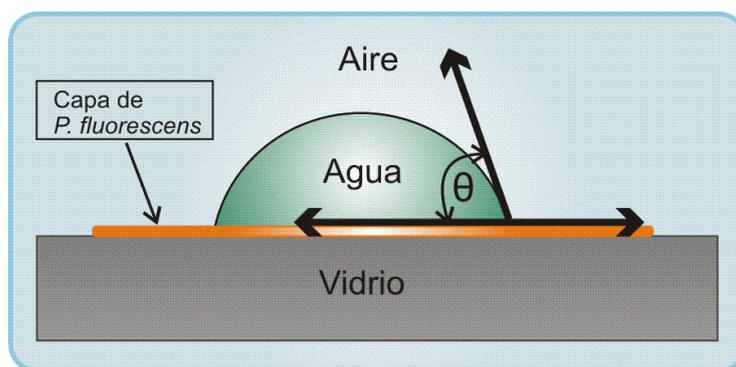


Figura 5.4. Esquema representando la medida del ángulo de contacto

5.6.2.1. Resultados obtenidos mediante medidas de CAM.

El resultado que se obtuvo para el ángulo de contacto es de $32^\circ \pm 0,1$, resultado que está de acuerdo con varios reportes anteriores (36, 45). Las *P. fluorescens* pueden considerarse hidrofílicas ya que se consideran así las que presentan ángulos de contacto de agua cercanos a 30° o menores. El carácter hidrofílico también está confirmado por la experiencia de MATS (Adhesión Microbiana a Solventes), en donde el máximo valor de retención de las bacterias en hexadecano fue, aproximadamente, 35%.

5.7 Determinación del tamaño de *P. fluorescens* planctónicas mediante microscopía de fuerza atómica.

La determinación de la longitud de las bacterias de *P. fluorescens* en estado planctónico se realizó mediante el análisis de imágenes de AFM de las correspondientes bacterias adsorbidas sobre una superficie de vidrio.

Para evitar el mecanismo biológico de adhesión de las bacterias viables a la superficie del vidrio, se debe recurrir a un calentamiento durante 2 h a 70°C del cultivo bacteriano de 24 h. Mediante este procedimiento, los microorganismos pierden viabilidad sin cambios morfológicos de las células. De esta manera, las bacterias presentes en el cultivo luego del calentamiento, presentan la morfología de las células en estado planctónico pero no son viables, con lo cual se evitarán los procesos biológicos activos de adhesión a la superficie de vidrio que podrían ocasionar cambios en el tamaño de las bacterias. Posteriormente, se colocó una gota de este cultivo sobre la superficie de vidrio limpia para que las células se adsorban sobre el sustrato. Luego de 30 min, se limpió el vidrio mediante enjuagues con agua bidestilada estéril. Después del secado del sustrato, se utilizó el AFM para determinar la longitud de las bacterias planctónicas. Este ensayo se realizó por triplicado y por cada muestra se analizaron las medidas longitudinales de 100 bacterias.

De esta manera, se determinó que la longitud promedio de las bacterias de *P. fluorescens* planctónicas es $1,86 \pm 0,60 \mu\text{m}$. Este valor concuerda con el reportado en literatura (46).

Referencias Bibliográficas.

1. Hendricks Bergey D., H. J. G., Krieg N.R., (Ed.) (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
2. 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.
3. Doyle, T. B., Hawkins, A. C., y McCarter, L. L. (2004) The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 186, 6341-6350.
4. 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.
5. Kirisits, M. J., y Parsek, M. R. (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities?, *Cell Microbiol* 8, 1841-1849.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lequette, Y., y Greenberg, E. P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *J Bacteriol* 187, 37-44.
11. 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.
12. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
 13. Ramsey, M. M., y Whiteley, M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments, *Mol Microbiol* 53, 1075-1087.
 14. Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., y Palleroni, N. J. (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *pseudomonads*, *Appl Environ Microbiol* 68, 2745-2753.
 15. Madigan M., M. J., (Ed.) (2005) *Brock Biology of Microorganisms*.
 16. Hoyle, B. D., y Costerton, J. W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog Drug Res* 37, 91-105.
 17. Lazarus, H. M., Magalhaes-Silverman, M., Fox, R. M., Creger, R. J., y Jacobs, M. (1991) Contamination during in vitro processing of bone marrow for transplantation: clinical significance, *Bone Marrow Transplant* 7, 241-246.
 18. Murray, A. E., Bartzokas, C. A., Shepherd, A. J., y Roberts, F. M. (1987) Blood transfusion-associated *Pseudomonas fluorescens* septicaemia: is this an increasing problem?, *J Hosp Infect* 9, 243-248.
 19. Scott, J., Boulton, F. E., Govan, J. R., Miles, R. S., McClelland, D. B., y Prowse, C. V. (1988) A fatal transfusion reaction associated with blood contaminated with *Pseudomonas fluorescens*, *Vox Sang* 54, 201-204.
 20. Carpenter, E. M., y Dicks, D. (1982) Isolation of *Pseudomonas fluorescens* after suprapubic catheterisation, *J Clin Pathol* 35, 581.
 21. Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., y Delacroix-Buchet, A. (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis, *Appl Environ Microbiol* 68, 3691-3701.
 22. Ternstrom, A., Lindberg, A. M., y Molin, G. (1993) Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*, *J Appl Bacteriol* 75, 25-34.
 23. Dogan, B., y Boor, K. J. (2003) Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants, *Appl Environ Microbiol* 69, 130-138.

24. Sørhaug, T., y Stepaniak, L. (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects, *Trends in Food Science & Technology* 8, 35-41.
25. Carpentier, B., y Chassaing, D. (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises, *Int J Food Microbiol* 97, 111-122.
26. An Y.H, F. R. J., (Ed.) (2000) *Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of bacterial adhesion. Principles, mechanisms and applications.* , Springer, New York.
27. Absolom, D. R. (1986) Measurement of surface properties of phagocytes, bacteria, and other particles, *Methods Enzymol* 132, 16-95.
28. Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., van Pelt, A. W., de Jong, H. P., y Arends, J. (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion, *Appl Environ Microbiol* 48, 980-983.
29. Dillon, J. K., Fuerst, J. A., Hayward, A. C., y Davis, G. H. G. (1986) A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity, *Journal of Microbiological Methods* 6, 13-19.
30. Pascual, A., Fler, A., Westerdaal, N. A., y Verhoef, J. (1986) Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro, *Eur J Clin Microbiol* 5, 518-522.
31. Rosenberg, M. (1981) Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 42, 375-377.
32. Rosenberg, M., Gutnick, D., y Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.
33. Verheyen, C. C., Dhert, W. J., de Blicck-Hogervorst, J. M., van der Reijden, T. J., Petit, P. L., y de Groot, K. (1993) Adherence to a metal, polymer and composite by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Biomaterials* 14, 383-391.
34. Gerson, D. F., y Scheer, D. (1980) Cell surface energy, contact angles and phase partition. III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces, *Biochim Biophys Acta* 602, 506-510.
35. van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., y Zehnder, A. J. (1987) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion, *Appl Environ Microbiol* 53, 1898-1901.

36. van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., y Zehnder, A. J. (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion, *Appl Environ Microbiol* 53, 1893-1897.
37. Lindahl, M., Faris, A., Wadstrom, T., y Hjerten, S. (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells, *Biochim Biophys Acta* 677, 471-476.
38. Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., y Savoie, L. (1991) Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces, *Appl Environ Microbiol* 57, 1969-1973.
39. Mozes, N., y Rouxhet, P. G. (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods* 6, 99-112.
40. Lachica, R. V., y Zink, D. L. (1984) Determination of plasmid-associated hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* by a latex particle agglutination test, *J Clin Microbiol* 19, 660-663.
41. Sar, N. (1987) Direction of spreading (DOS): a simple method for measuring the hydrophobicity of bacterial lawns, *Journal of Microbiological Methods* 6, 211-219.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Valcarce, M. B., Busalmen, J. P., y de Sánchez, S. R. (2002) The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass, *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 61-66.

46. 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.

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 físicoquímicas 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.

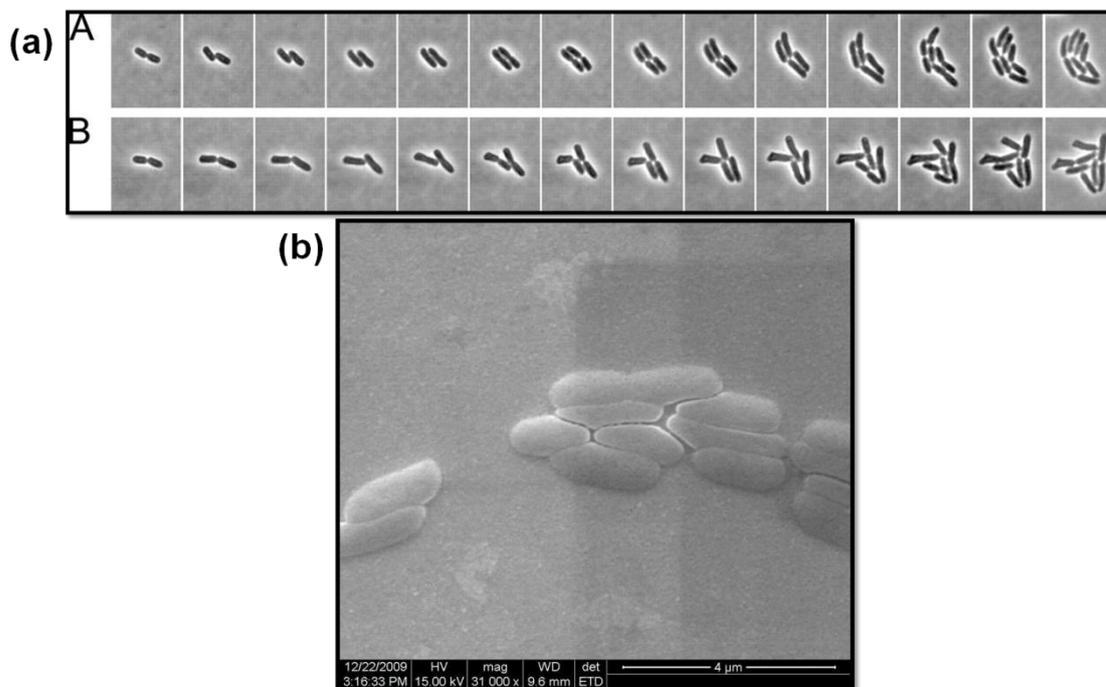


Figura 6.1 (a) Secuencia del proceso de duplicación y desplazamiento de *E. coli* sobre agar nutritivo para dar lugar a la formación de “rafts” (29–30). Las imágenes fueron tomadas cada 10 min mediante microscopía “time lapse” por el grupo de Shapiro y colaboradores (29). La secuencia A corresponde al 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).

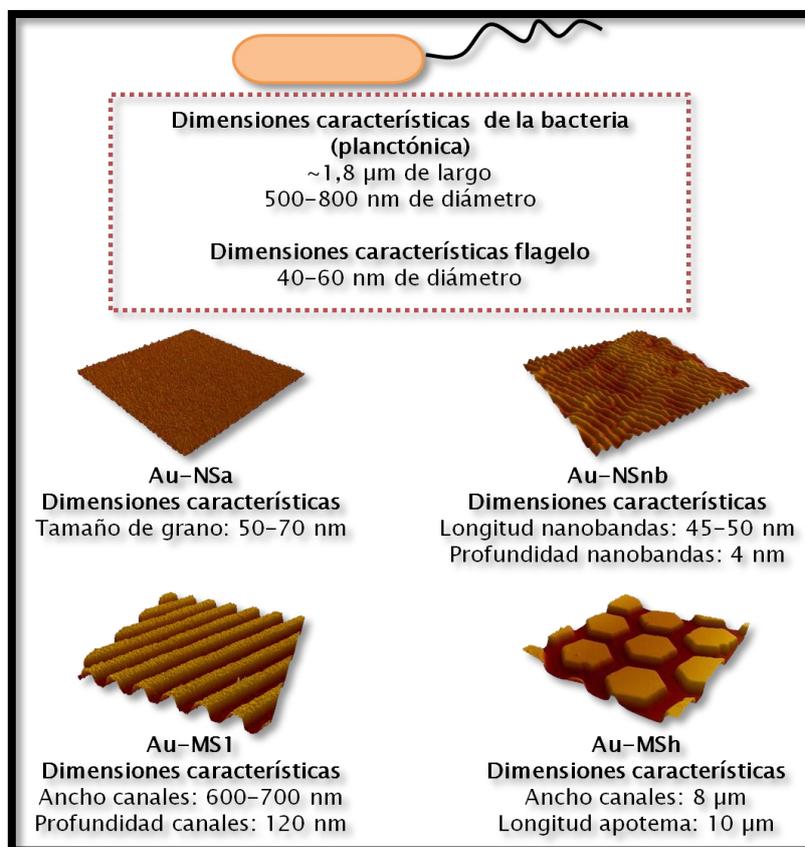


Figura .6.2. Esquema representando las dimensiones características de los sustratos empleados y de *P. fluorescens*.

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.

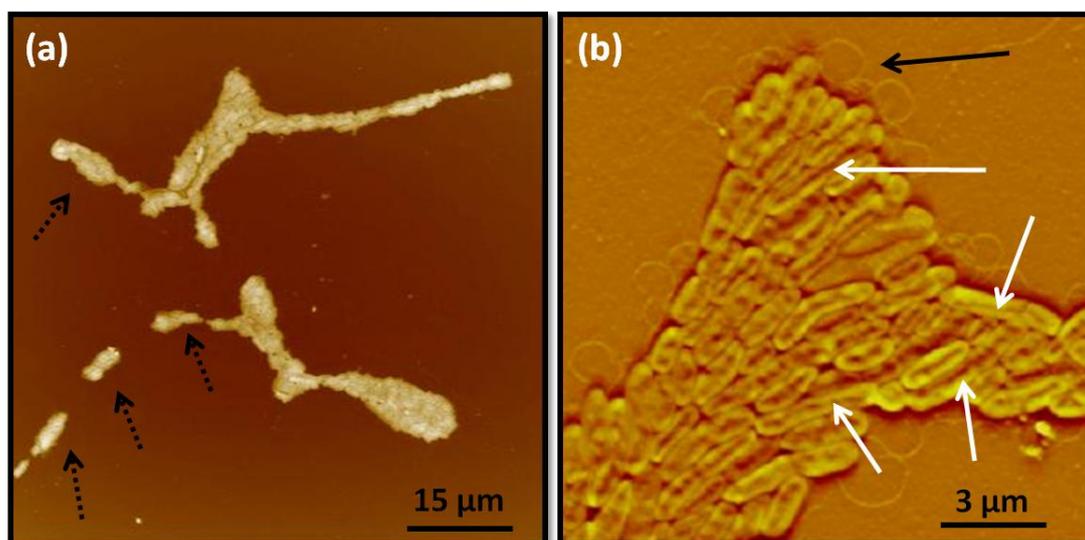


Figura 6.3. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (a) $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ (b) $14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$ (con filtro paso alto). Las flechas negras discontinuas indican los agregados que emergen de la estructura central, las negras sólidas los 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).

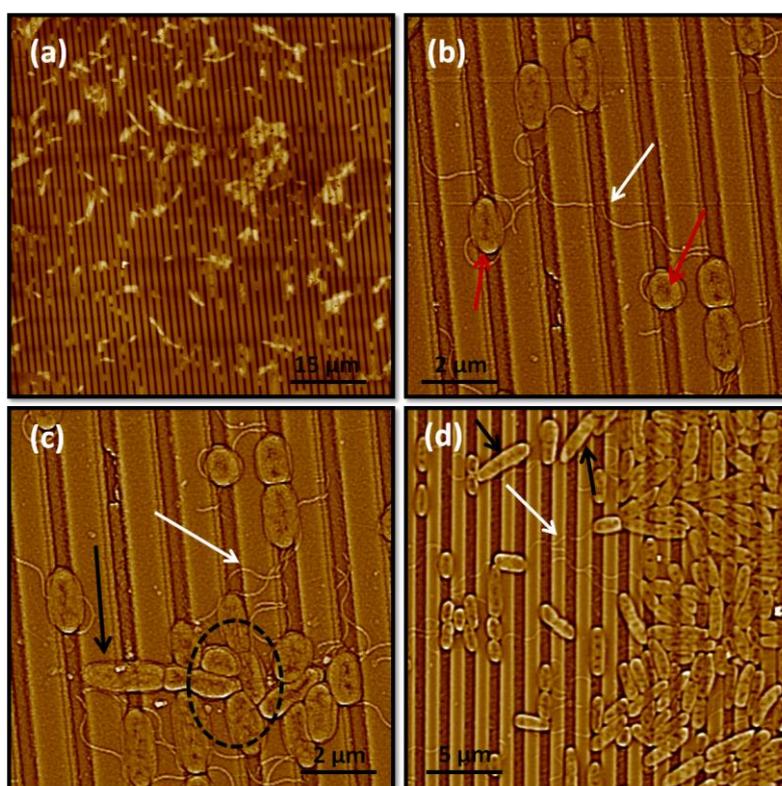


Figura 6.4. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (a) 75 μm x 75 μm (b) 10 μm x 10 μm (con filtro de paso alto) en donde pueden observarse células acortadas dentro de los canales superficiales (flechas rojas), flagelos conectando a las células (flecha blanca) y células oblicuas 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.

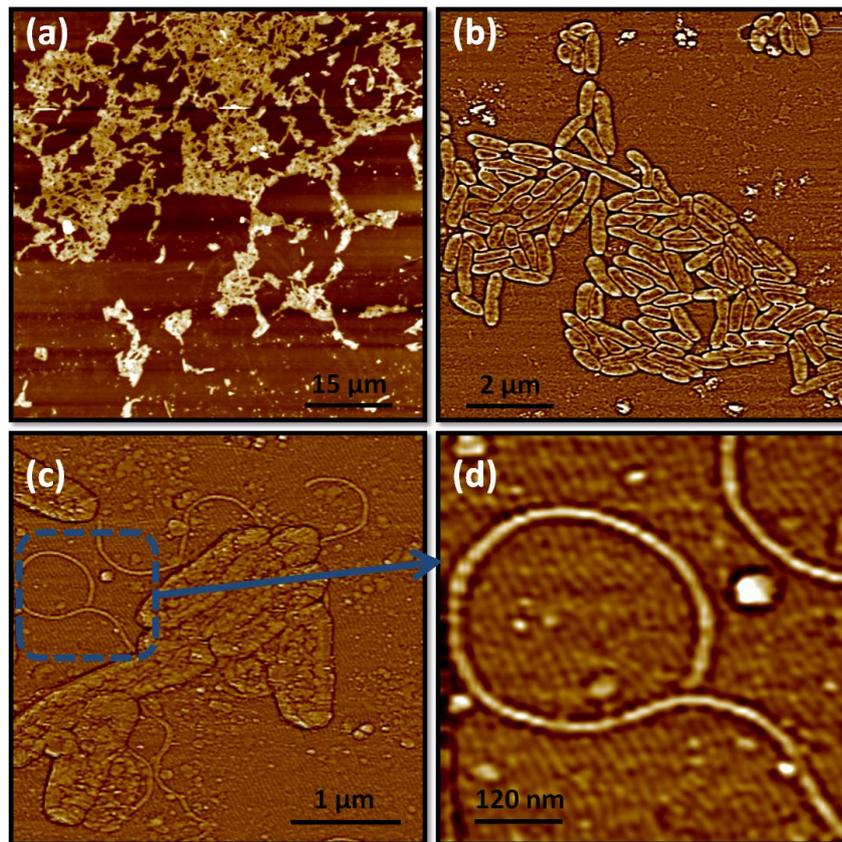


Figura .6.5. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSnb. (a) 75 μm x 75 μm (b) 10 μm x 10 μm (con filtro de paso alto), en donde pueden observarse pequeños grupos de células alineadas. (c) 4 μm x 4 μm (con filtro de paso alto) grupo de células alineadas lateralmente y ubicadas perpendicularmente 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.

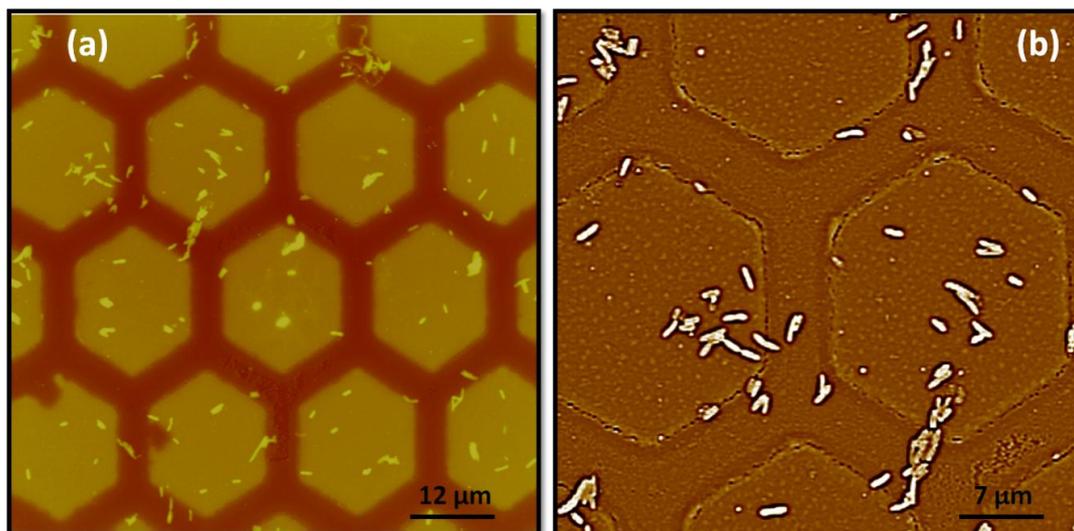


Figura 6.6. Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MSH. (a) 75 µm x 75 µm (b) 45 µm x 45 µm (con filtro paso alto) en donde pueden observarse pequeños grupos de células sin orientación preferencial.

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.

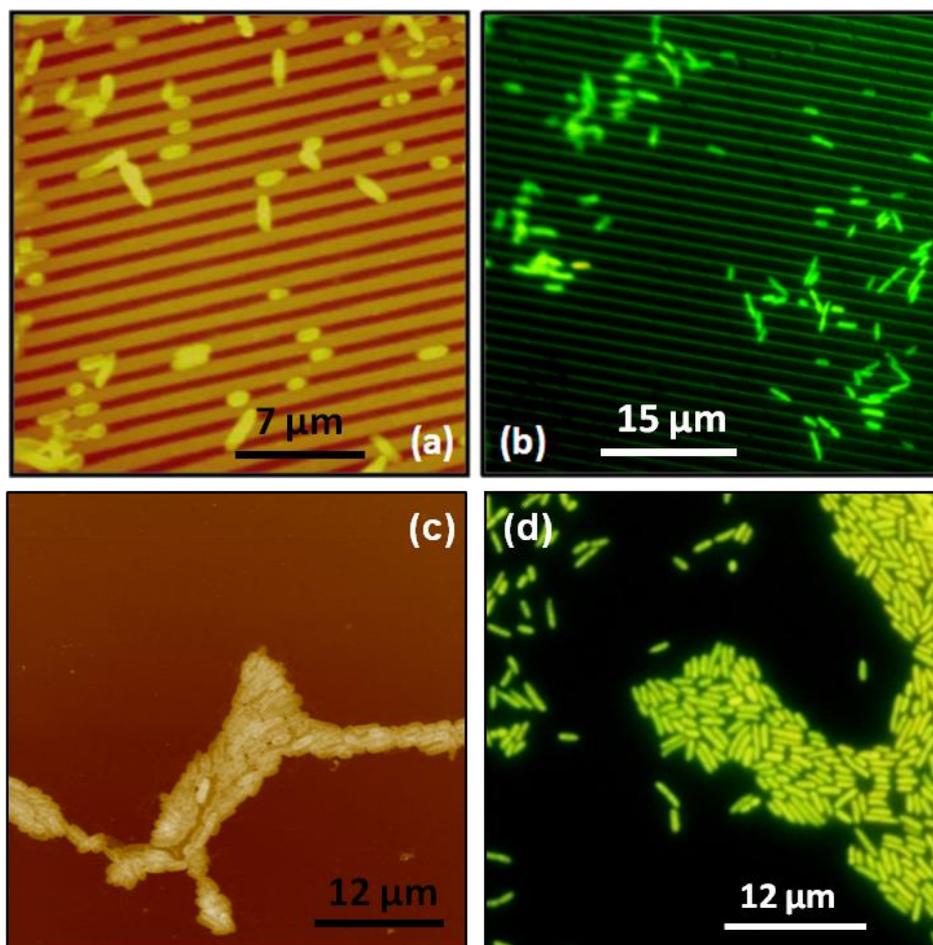


Figura .6.7. (a) Imagen AFM en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-MS1 (25 μm x 25 μm) (b) Imagen de epifluorescencia en medio líquido (50 μm x 50 μm) de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (c) Imagen AFM (45 μm x 45 μm) en modo contacto de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (d) Imagen de epifluorescencia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

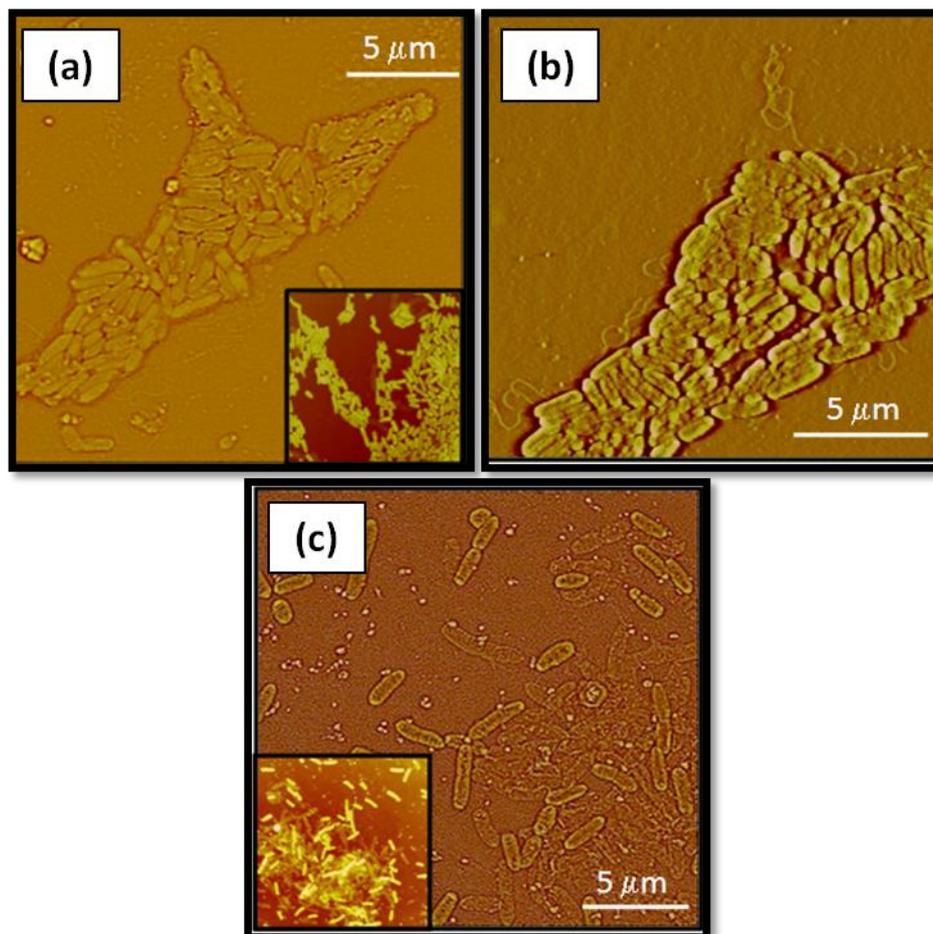


Figura 6.8. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos NSa luego de 2 h de inmersión en el cultivo bacteriano. (a) Au-NSa (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, $20.5 \times 20.5 \mu\text{m}^2$); el recuadro inferior corresponde a una imagen topográfica AFM 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.

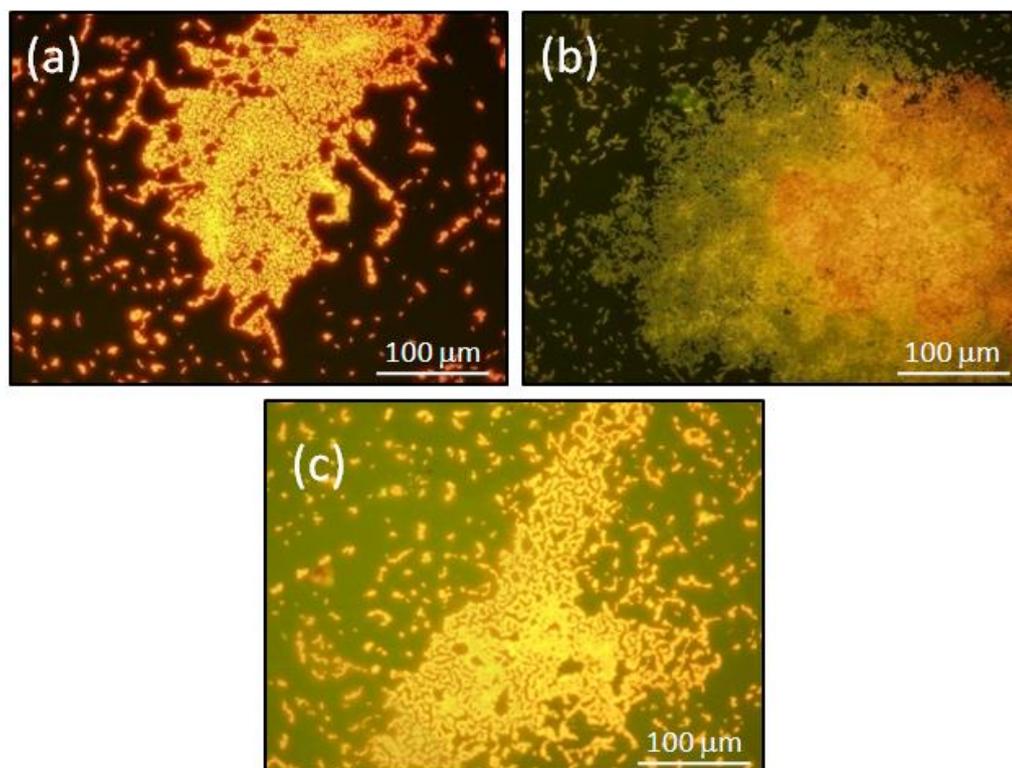


Figura 6.9 . Imágenes ópticas de epifluorescencia de sustratos NSa luego de 2 h de exposición el cultivo de *P. fluorescens*. (a) Au-NSa; (b) Cu-NSa; (c) PBCA-NSa.

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.

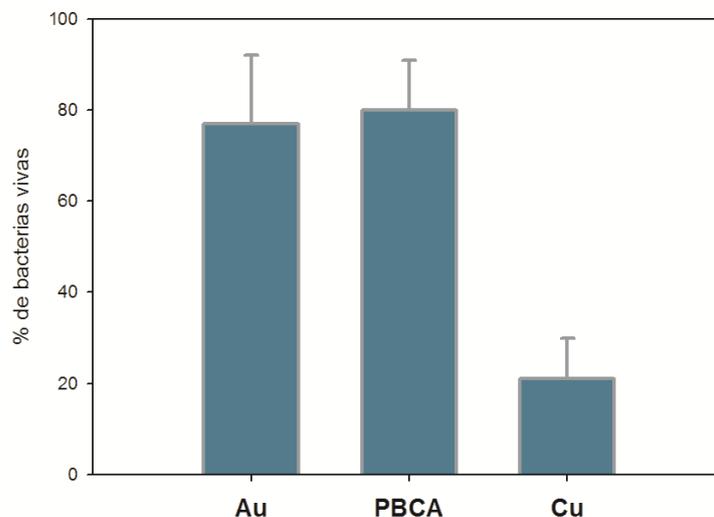


Figura 6.10. Porcentajes de bacterias vivas obtenidos a partir de imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de sustratos NSa luego de 2 h de exposición el cultivo de *P. fluorescens*. (a) Au-NSa; (b) PBCA-NSa; (c) Cu-NSa.

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).

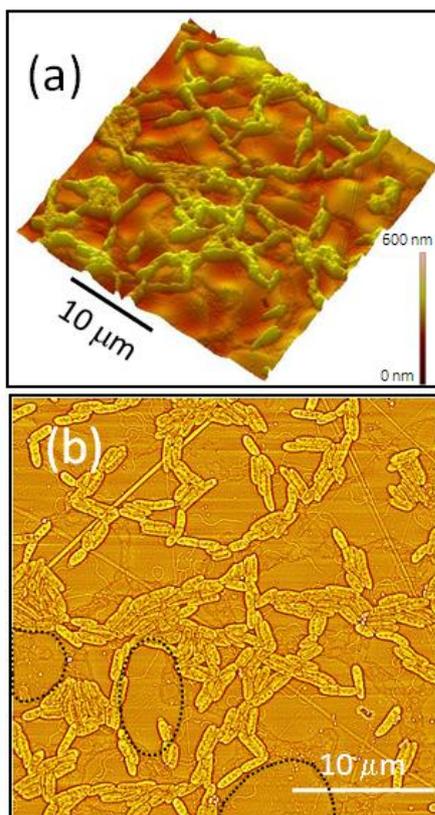


Figura 6.11. (a) Imagen AFM topográfica en modo contacto ($60 \times 60 \mu\text{m}^2$ tridimensional) de *P. fluorescens* sobre PBCA-MSg. (b) Imagen AFM en modo contacto con filtro paso alto correspondiente a la imagen (a). Algunos de los glóbulos superficiales están marcados con curvas punteadas.

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).

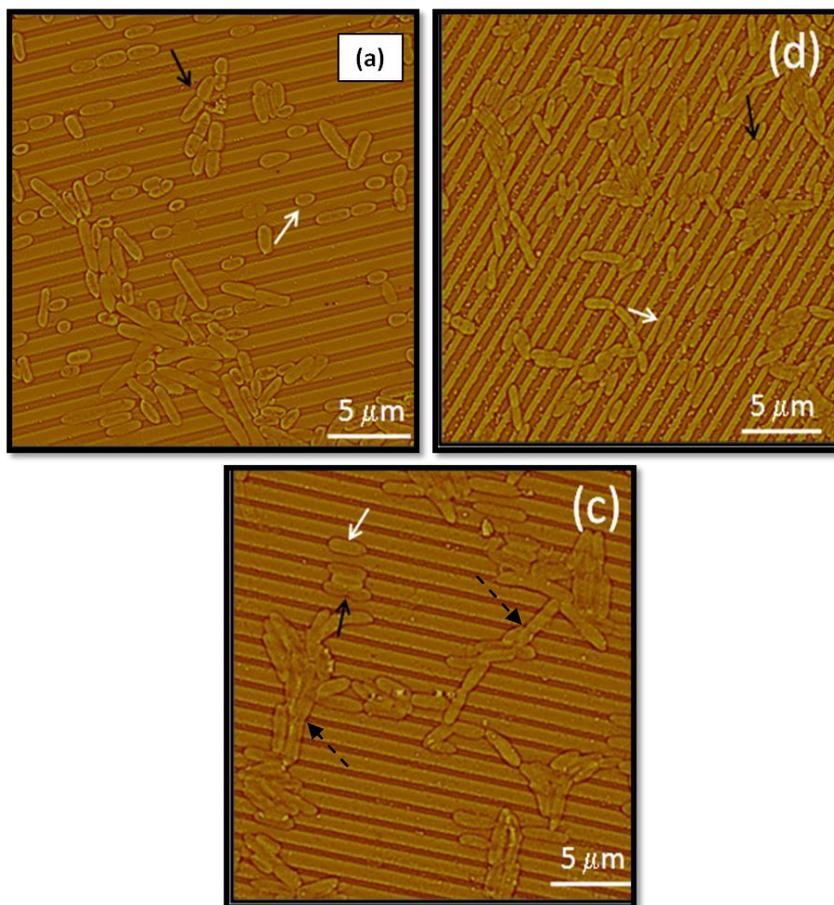


Figura 6.12. Imágenes de *P. fluorescens* sobre sustratos MS1. **(a)** Au-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 25x25 μm²); **(b)** PBCA-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 25x25 μm²). **(c)** Cu-MS1 (Imagen topográfica AFM en modo contacto con filtro paso alto, 24.3x24.3 μm²) 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.

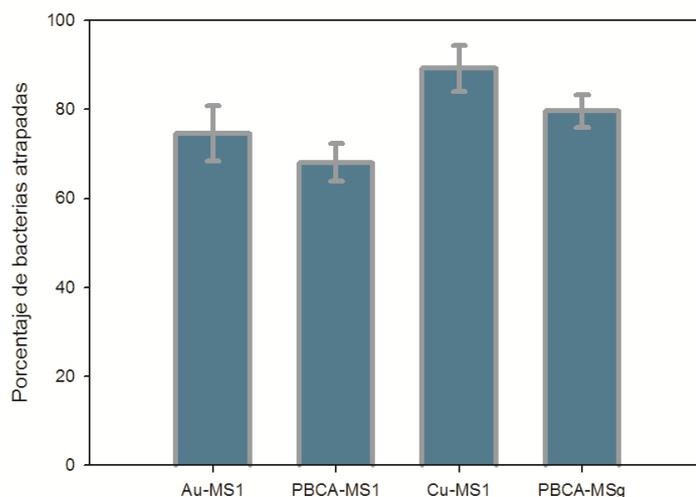


Figura 6.13. Porcentaje de bacterias aisladas que se encuentran dentro de los canales topográficos superficiales de los sustratos MS1 y MSg.

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.

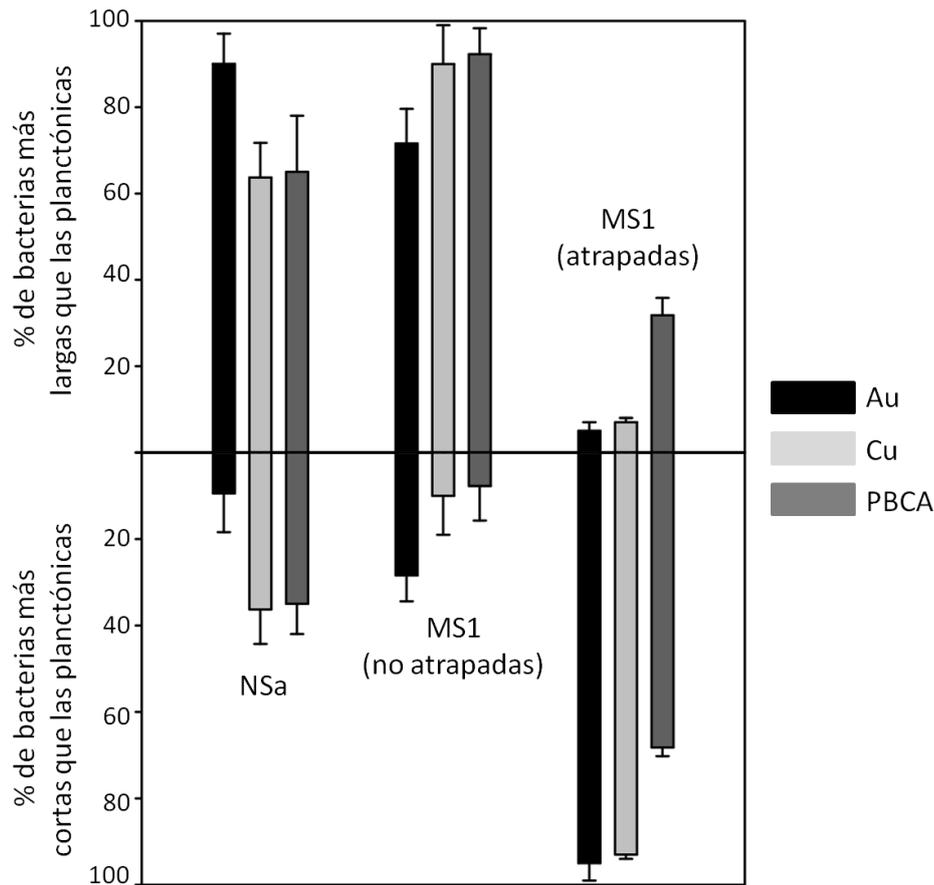


Figura 6.14. Histograma mostrando el porcentaje de bacterias adheridas sobre los diferentes sustratos y que presentan largos mayores o menores a los correspondientes de las bacterias planctónicas, representados como la línea 0.

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.

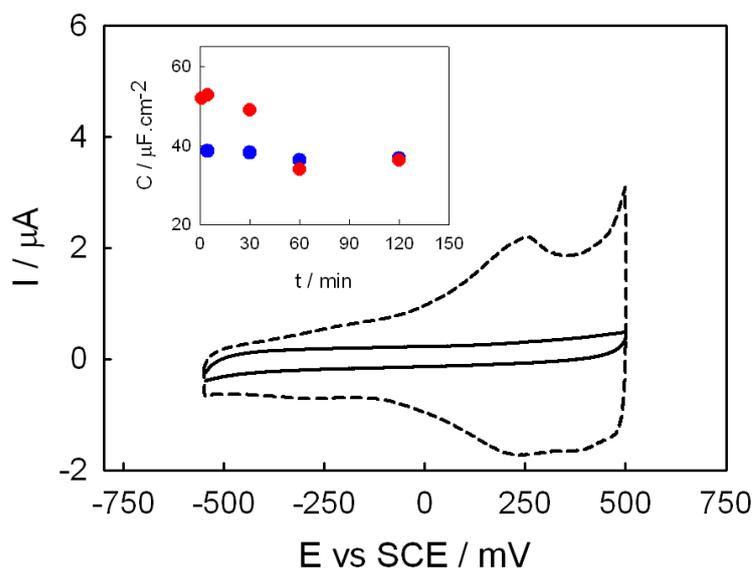


Figura 6.15. Voltaamperometría cíclica de un sustrato de Au en NaCl 0.5 % p/v con una velocidad de barrido de 0.1 V/s. La línea punteada corresponde al sustrato de Au limpio; la línea sólida corresponde al sustrato de Au luego de 2 h de inmersión en caldo nutritivo estéril. El recuadro superior corresponde 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.

Capítulo 7

Evaluación del rol de los flagelos en las primeras etapas de formación del biofilm mediante microscopía de fuerza atómica.

7.1. Introducción.

Como ya se mencionó en el Capítulo 1, la segunda y tercera etapa del desarrollo del biofilm involucra la adhesión de bacterias “pioneras” a una superficie. Para el caso de bacterias con movilidad propia como *P. fluorescens*, en esta etapa primero de adhesión reversible y luego irreversible, se produce el cambio de la movilidad en medio líquido (*swimming*) generalmente facilitada por los flagelos, a movi­lidades típicas sobre superficies (*swarming* o *twitching*) o a la inmovilización o fijación a sustratos a través de

sustancias poliméricas extracelulares (1). Debe tenerse en cuenta que la movilidad microbiana sobre una superficie puede ser un factor de gran incidencia en el tipo de estructura que adquirirá posteriormente el biofilm (2). Aparentemente, en ciertos períodos del desarrollo del biofilm los microorganismos podrían seleccionar entre dos posibilidades: la movilidad o la situación estática en el biofilm (3).

En un principio, la función que se le asignaba a los flagelos sólo se asociaba con la movilidad en medio líquido (*swimming*) de las bacterias planctónicas. Posteriormente, se ha considerado que la expresión de los flagelos podría estar relacionada con la regulación de diversas propiedades bacterianas tales como la producción de polisacáridos y la formación de biofilms (4-7). Por ejemplo, bacterias mutantes del género *Aeromonas* que no tienen el flagelo polar de las bacterias en estado salvaje, han demostrado ser deficientes en la formación de biofilms (8). El papel de los flagelos en la formación de biofilms para las bacterias del género *Pseudomonas* ha sido intensamente evaluado y estas bacterias se han tomado como modelo para dichos estudios, pero aún se encuentran controversias al respecto. Los autores Sauer, Camper y colaboradores (9) encontraron que sólo se podían asignar funciones al flagelo en dos períodos durante la formación del biofilm: en el inicio del contacto con la superficie y en el proceso de desprendimiento de la bacteria del biofilm, ya que se ha detectado la presencia de flagelos en biofilms maduros. Por otro lado, Klausen y colaboradores (10) han reportado que la formación de microcolonias de *P. aeruginosa* ocurre a partir del crecimiento clonal y luego por la migración sobre la superficie utilizando flagelos y pilis tipo IV. Desde el punto de vista genético, se ha demostrado que un regulón (grupo de genes regulados por el mismo factor de transcripción) que se localiza en la membrana, el *MorA*, parece controlar el momento en que se desarrolla el flagelo y afecta la movilidad, la quimiotaxis (*quorum sensing*) y la formación de biofilm en varias especies de *Pseudomonas* (11). Teniendo en cuenta estos resultados, podría plantearse como hipótesis que si los apéndices celulares participan en el desarrollo inicial de un biofilm, su disposición espacial sobre la superficie podría modificarse por la percepción de la presencia de otras bacterias y consecuentemente debería encontrarse una cierta orientación preferencial de los mismos. Surge entonces la siguiente pregunta: ¿juegan los flagelos algún otro papel, aparte de conferir movilidad, durante las primeras etapas del contacto del microorganismo con la superficie?. La respuesta a esta pregunta se podría encontrar utilizando como estrategia la inmovilización de bacterias mediante el empleo de “trampas” topográficas presentes en la superficie de los sustratos. De esta forma, la

movilidad bacteriana estaría parcialmente restringida sin la necesidad de utilizar tratamientos químicos que podrían alterar el mecanismo de formación del biofilm.

Se han ensayado diversos métodos mecánicos para atrapar microorganismos sobre superficies de distinta naturaleza, entre ellos pueden mencionarse las membranas de policarbonato para filtrado (se han utilizado para atrapar células individuales sin la utilización de compuestos químicos) (12) y las superficies topográficamente modificadas mediante litografía (para atrapar células cocoides) (13). En el caso de *Pseudomonas*, se necesita una superficie con características estructurales dimensionalmente similares al tamaño de la bacteria para lograr atraparlas, sin impedir su reproducción. En el presente Capítulo se describe la utilización de sustratos microestructurados (MS1) como un método novedoso para impedir temporalmente la movilización de *P. fluorescens* sobre superficies sólidas inertes y permitir el análisis del comportamiento de los flagelos en esta situación.

Entre los métodos tradicionales que permiten la visualización de los flagelos está la microscopía de fluorescencia y las microscopías TEM y SEM. Cada uno de ellos involucra diversos tratamientos invasivos (14) como por ejemplo la fijación con glutaraldehído y la marcación con fluoróforos (15-16). La microscopía AFM, en cambio, permite estudiar las primeras etapas de la formación de biofilms (17-20) con resolución en la nanoescala y con mínimos o incluso ningún pretratamiento de la muestra. La ausencia de tratamientos químicos permite analizar la disposición espacial de los flagelos sobre las distintas superficies sin interferencias.

Por lo antes expuesto, el objetivo de los siguientes ensayos fue investigar, mediante el uso de AFM y sustratos microestructurados Au-MS1 y PBCA-MS1, sin tratamiento previo de la muestra, si existe otra función, aparte de la movilidad, del flagelo de *P. fluorescens* durante las primeras etapas de formación de biofilms. En particular, se han analizado las interacciones entre bacterias vecinas sobre dichas superficies evaluando estadísticamente la posibilidad de una orientación preferencial de los flagelos. Las conclusiones obtenidas fueron comparadas con los resultados encontrados utilizando superficies de Au-NSa y PBCA-NSa en donde la movilidad bacteriana no se encuentra restringida. Por otra parte, también se analizó la disposición espacial de flagelos sobre una superficie de Cu-NSa (de características tóxicas).

La cepa utilizada para todos los ensayos fue *P. fluorescens* cuyas características fueron descritas en forma detallada en el Capítulo 5. La formación del biofilm se desarrolló según la metodología descrita en el Capítulo 5. Después de 24 h de crecimiento

del cultivo de *P. fluorescens*, los diferentes sustratos fueron colocados en el cultivo para que se formara un biofilm sobre la superficie. Los mismos fueron sumergidos durante diferentes tiempos (30 min y 2 h). Durante los ensayos, los sustratos NSa y MS1 fueron sumergidos simultáneamente (en el mismo medio de cultivo y bajo idénticas condiciones) de manera de obtener resultados comparables y se compararon las respuestas biológicas a las variaciones topográficas de las superficies. Después del período de inmersión, los sustratos fueron removidos, se realizaron varios enjuagues con agua bidestilada estéril y por último fueron secados al aire (70% de humedad relativa). Los ensayos se realizaron por duplicado y fueron repetidos tres veces en forma independiente y las longitudes de las células fueron analizadas estadísticamente en las imágenes microscópicas.

Como ya se ha mencionado, la caracterización del proceso de adhesión bacteriana se realizó principalmente mediante AFM. También se empleó un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200, operado bajo condiciones de alto vacío, a 15 kV. En este caso las muestras fueron secadas bajo atmósfera de nitrógeno y cubiertas por una capa de Au (Sputter Coater Edwards S150B) antes de ser analizadas.

Ocasionalmente, las células fueron teñidas con naranja de acridina y analizadas mediante epifluorescencia.

Las características topográficas de los sustratos empleados en este capítulo de la tesis fueron detalladas extensamente en el Capítulo 3.

7.2. Análisis de ubicación y orientación de flagelos en superficies MS1.

El análisis de las imágenes AFM confirma que, tal como se observó previamente en ensayos con este tipo de sustratos, hay un número significativo de células atrapadas en los canales de las superficies MS1. En las imágenes correspondientes a las Figuras 7.1a y 7.1b se observan bacterias aisladas (las bacterias más próximas están a más de 10 μm) cuyos flagelos son curvos, sin ninguna orientación preferencial, sobre superficies Au-MS1 y PBCA-MS1 respectivamente. Los gráficos que se encuentran en los recuadros blancos de la Figura 7.1 corresponden a las secciones transversales de las imágenes AFM en las cuales puede observarse claramente (flechas negras discontinuas) que las bacterias se encuentran confinadas dentro de los canales.

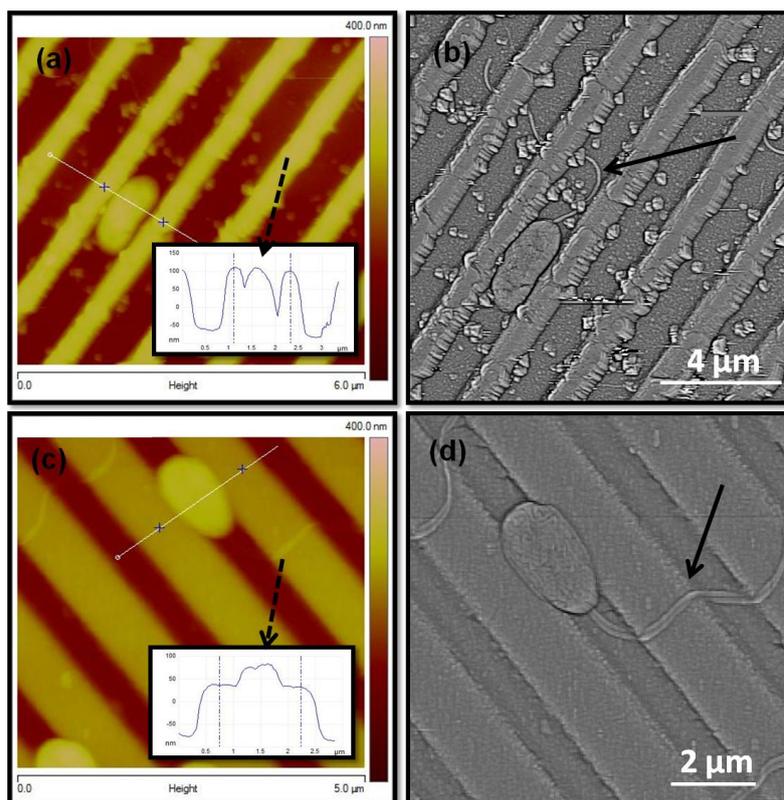


Figura 7.1. Imágenes AFM en modo contacto de sustratos de Au-MS1 y PBCA-MS1 expuestos a un cultivo de *P. fluorescens* durante 30 min. **(a)** Bacteria aislada atrapada en una superficie de PBCA-MS1. El gráfico insertado muestra el corte transversal de la imagen. La flecha negra discontinua indica la posición de las bacterias dentro del canal. **(b)** Imagen AFM (con filtro de paso alto). La flecha negra indica un flagelo sin orientación preferencial. **(c)** Bacteria aislada atrapada en una superficie de Au-MS1. El gráfico insertado muestra el corte transversal de la imagen. **(d)** Correspondiente imagen con filtro de paso alto de la Figura (c). La flecha negra muestra también la presencia de un flagelo sin orientación preferencial.

En la Figura 7.2a pueden observarse algunas bacterias que se encuentran atrapadas en los canales topográficos de Au rodeadas por otras bacterias a distancias menores de 5 μm . Es importante destacar que el largo promedio de estas bacterias ($1,35 \pm 0,31 \mu\text{m}$) es menor que el de las bacterias planctónicas ($1,86 \pm 0,60 \mu\text{m}$). En la Figura 7.2b (flechas blancas), puede observarse que aquellas bacterias que no se ubican dentro de los canales son más largas ($\geq 2 \mu\text{m}$) que los microorganismos atrapados y que las correspondientes planctónicas. Otro punto interesante que vale la pena considerar es el hecho de que el contacto lateral entre células que se necesita para formar agregados más numerosos de bacterias sólo puede lograrse si las bacterias se ubican en dirección oblicua o perpendicular a la dirección de los canales. A partir de las imágenes de sección transversal (2 en la Figura 7.2c) es evidente que los grupos de bacterias ubicados perpendicularmente a la dirección de los canales se encuentran por encima de las crestas de la superficie, mientras que las células ubicadas en la dirección de los canales están dentro de los mismos.

Cabe destacar también, que los flagelos parecen percibir la presencia de las bacterias que se encuentran próximas debido a que los mismos se orientan preferencialmente en dichas direcciones (flechas negras en las Figuras 7.2a y 7.2b). La Figura 7.2a es una imagen tridimensional en donde se evidencia la posición confinada de la bacteria en la superficie MS1 y la direccionalidad de los flagelos. Es importante destacar que el mismo tipo de distribución de flagelos y bacterias se observa en las superficies PBCA-MS1.

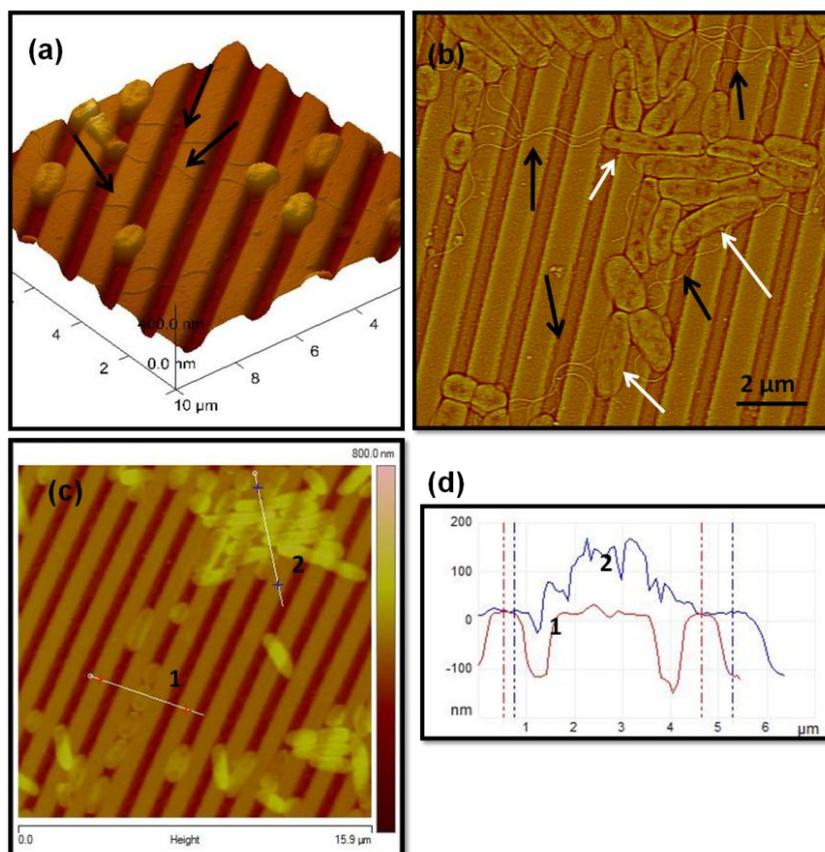


Figura 7.2 Imágenes AFM en modo contacto de *P. fluorescens* adheridas a un sustrato de Au-MS1. **(a)** Imagen tridimensional mostrando bacterias atrapadas en el canal superficial y la direccionalidad de los flagelos (flechas negras) (30 min de exposición en un cultivo de *P. fluorescens*). **(b)** La imagen AFM (con filtro de paso alto) muestra algunas bacterias aisladas, atrapadas en diferentes canales de la superficie de Au y grupos de células ubicadas perpendicularmente a la dirección de la microestructura. Los flagelos se encuentran orientados hacia las células vecinas (flechas negras). Las flechas blancas muestran la elongación de ciertas bacterias (2 h de exposición a un cultivo de *P. fluorescens*). **(c)** Bacterias confinadas dentro de los canales de la superficie (1) y un grupo de bacterias que se ubica en dirección perpendicular a la dirección de los canales superficiales sobre la superficie (2) (2 h de exposición a un cultivo de *P. fluorescens*). **(d)** Cortes transversales de la Figura (c).

Cuando los flagelos se encuentran cercanos a una bacteria (Figura 7.3), estos son capaces de hacer contacto con los microorganismos cercanos y rodearlos (flechas negras). Los flagelos parecen quedar pegados a la superficie microbiana a través de EPS. Esta posición fija alrededor de las células podría favorecer el movimiento bacteriano para

abandonar el canal del sustrato y unirse a los grupos de bacterias vecinos (bacterias atrapadas ubicadas en forma ligeramente oblicua al canal en la Figura 7.3).

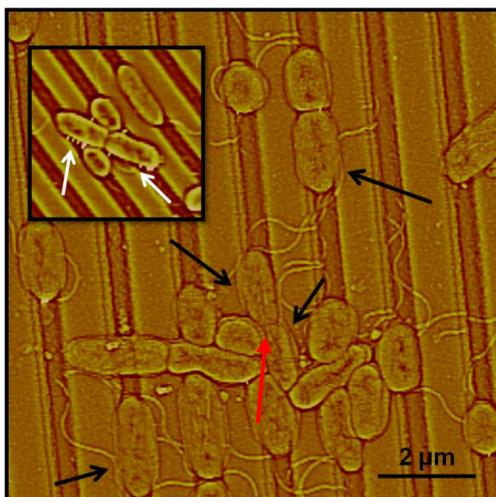


Figura 7.3 Imagen AFM en modo contacto (con filtro de paso alto) de una superficie de Au-MS1 (30 min de exposición a un cultivo de *P. fluorescens*). Las flechas negras señalan los flagelos que rodean a las bacterias. El recuadro superior muestra la presencia de pilis (puntos brillantes alrededor de las bacterias). La flecha roja muestra una bacteria atrapada, ligeramente inclinada, como si tratara de salir del canal.

En el recuadro superior de la Figura 7.3 puede observarse la presencia de algunos pilis. Se ha sugerido que los pilis tipo IV (21) pueden extenderse y contraerse haciendo que la bacteria se desplace sobre la superficie. En el caso de las superficies MS1, parece que estos apéndices (figura inserta en la Figura 7.3) capaces de efectuar movimientos de extensión y contracción para impulsar al microorganismo a través de la superficie, tienen un papel importante cuando las bacterias tratan de salir de los canales superficiales y cuando las bacterias no atrapadas se desplazan sobre la superficie microestructurada.

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 6, está generalmente aceptado que la deshumectación (*dewetting*) tiene una fuerte influencia sobre la distribución de coloides sobre superficies (22-24). Las bacterias en cambio, debido a la presencia de los apéndices celulares, pueden cambiar su posición y autoorganizarse durante el proceso de adhesión y consecuentemente, sus comportamientos son significativamente diferentes a los de las partículas coloidales (25). Tal como se describe en el Capítulo 6, se realizaron experiencias manteniendo el sustrato siempre sumergido en medio acuoso de modo de evitar el *dewetting* y observando que la distribución de células a través de microscopía de epifluorescencia era similar tanto en condiciones de 70 % de humedad relativa como en sustratos permanentemente mojados.

Si bien se han realizado algunas experiencias utilizando AFM en líquidos para obtener imágenes de flagelos, no fue posible obtener imágenes nítidas bajo dichas condiciones, en concordancia con reportes anteriores (26). Debe destacarse que no se han empleado tratamientos químicos para inmovilizar a las bacterias, evitando afectar el comportamiento de los flagelos. En acuerdo con nuestros resultados, los autores Doktycz y colaboradores (26) han demostrado que los flagelos pudieron visualizarse por microscopía de fuerza atómica en aire pero no así en líquido. Ellos explicaron dichas observaciones considerando que si los flagelos no podían visualizarse era debido a que en medio líquido no se encontraban rígidamente inmovilizados y cambiaban su posición durante la medida debido a fuerzas ejercidas por la punta del AFM. Además, debe considerarse que las alteraciones hidrodinámicas generadas por el barrido de la punta sobre la superficie podrían reposicionar al flagelo. Los flagelos de otros microorganismos, como *Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, tampoco pudieron ser observados en medio líquido con el AFM (27-28). Por lo tanto, podría concluirse que para sistemas biológicos la resolución de AFM en medio líquido es menor que en aire debido a las interacciones de los apéndices bacterianos con la punta del microscopio. Algunos autores han empleado cubrimientos superficiales (poli-L-lisina) que les han permitido inmovilizar y observar pilis y flagelos utilizando microscopía de fuerza atómica en modo tapping (29). Es interesante notar que en las imágenes mostradas en dichos trabajos, los flagelos se encuentran orientados hacia las células próximas, al igual que los resultados que se obtuvieron en este trabajo (sin embargo los autores no han analizado dicho comportamiento diferencial). Consecuentemente, es válido concluir que la deshidratación durante la observación bajo condiciones ambientales no tiene una influencia apreciable en la orientación de los flagelos. Sin embargo, el efecto de los cubrimientos superficiales (utilizados por otros autores) sobre la orientación de los microorganismos y sus apéndices celulares aún no se conoce completamente.

7.3. Análisis de ubicación y orientación de flagelos en superficies NSa.

La influencia de las características microestructurales del sustrato sobre el comportamiento bacteriano individual y grupal y la participación de los flagelos durante el proceso de agregación se puede evaluar a través de la comparación de las Figuras 7.3 (Au-MS1) y 7.4 (Au-NSa). En la Figura 7.4, se observan agregados bacterianos formados durante las primeras etapas de formación de biofilms en superficies NSa de Au y PBCA. Se han observado resultados similares en algunos trabajos de los autores Lawrence y Cadwell utilizando microscopía por contraste de fases y un sustrato liso y transparente (30). Los resultados que aquí se reportan, muestran que el proceso de auto-organización espacial microbiana involucra varias etapas (Figura 7.4): división celular (1); separación de las células y movimiento para conectarse lateralmente (2); deslizamiento de las células para formar pequeños grupos organizados (3). Estos procesos se repiten en el tiempo para formar grupos más grandes y unirse a otros (4). La Figura 7.4b revela el mismo tipo de estrategia para la formación de agregados organizados de microorganismos sobre superficies PBCA-NSa. Las imágenes de epifluorescencia e imágenes SEM (Figura 7.4c y 7.4d) de los sustratos Au-NSa muestran la formación del mismo tipo de estructuras bacterianas que las descritas anteriormente. En el recuadro superior de las Figuras 7.4 d se observa la presencia de pilis que están interconectando a las células, dando cuenta de su participación en los procesos de agregación bacteriana.

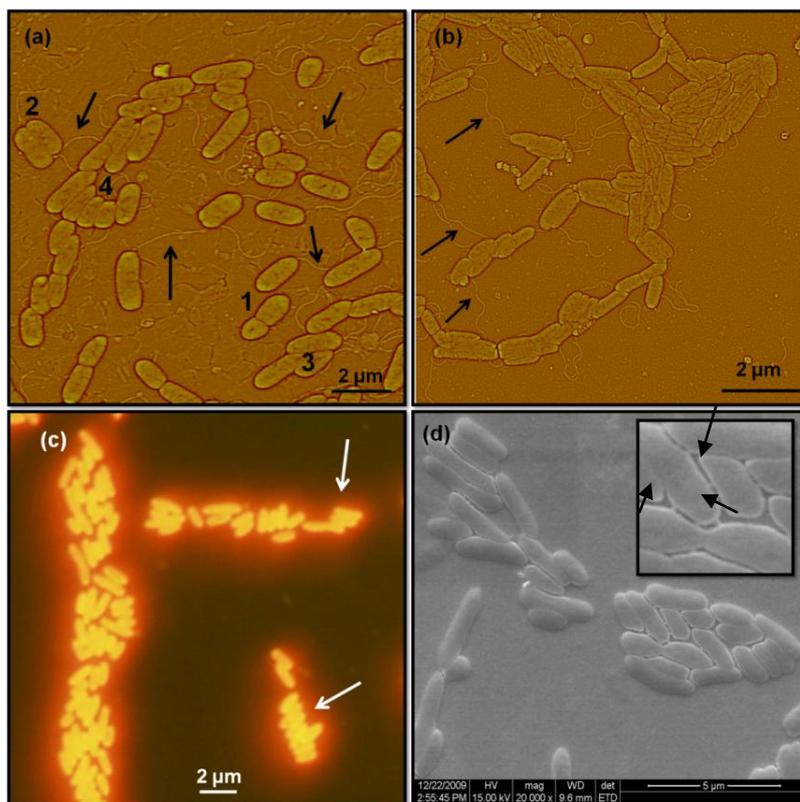


Figura 7.4. (a) Imagen AFM en modo contacto (con filtro paso alto) de una superficie de Au-NSa mostrando las primeras etapas de la organización bacteriana. Las flechas negras indican los flagelos interconectando las células. (b) Imagen AFM en modo contacto (con filtro paso alto) de una superficie de PBCA-NSa en donde se puede observar el mismo tipo de organización microbiana y los flagelos (flechas negras). (c) Imagen de epifluorescencia de *P. fluorescens* teñidas con naranja de acridina sobre una superficie de Au-NSa (Objetivo 100 X). Las flechas blancas indican los grupos de células que se ordenan lateralmente para formar grupos organizados. (d) Imagen SEM de una superficie de Au-NSa mostrando grupos de bacterias ordenados sobre la superficie. En el recuadro superior se observan pilis interconectando a las células (flechas negras). Todos los sustratos estuvieron expuestos durante 30 min a un cultivo de *P. fluorescens*.

Los flagelos que se encuentran conectando a grupos de bacterias son claramente visibles en las imágenes AFM (Figuras 7.4a y 7.4b). No obstante, estos apéndices bacterianos no pudieron ser detectados en las imágenes SEM ni en las imágenes de epifluorescencia (Figura 7.4c y 7.4d).

Se ha realizado un análisis estadístico teniendo en cuenta la orientación de los flagelos sobre superficies de NSa y MS1 de Au y PBCA (Figura 7.5) con el objeto de determinar si la orientación de los mismos es aleatoria o preferencial. Mediante este análisis se observó que sobre todas las superficies de Au y PBCA, tanto las superficies con microestructura como aquellas sin patrón topográfico (MS1 y NSa respectivamente), la mayoría de los flagelos se encuentran orientados en la dirección de alguna bacteria próxima y sólo un bajo porcentaje muestra direcciones aleatorias. Se considera que están

“orientados” hacia la bacteria cuando están dirigidos hacia ella con desviaciones no mayores que 10° .

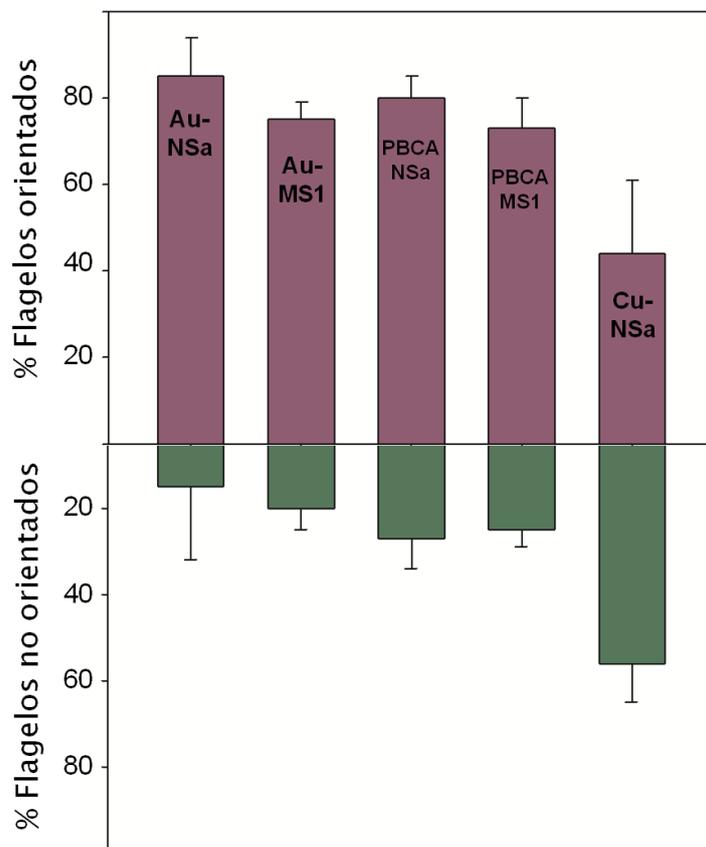


Figura 7.5. Porcentaje de flagelos con una dirección preferencial hacia bacterias próximas (flagelos orientados). Comparación de los resultados obtenidos con las bacterias adheridas a los diferentes sustratos.

Es importante notar que los flagelos no desaparecen cuando los pequeños grupos de bacterias evolucionan hacia grandes estructuras organizadas (Figuras 7.6a y 7.6b), tal como ocurre cuando dejan de tener funciones específicas. Podría suponerse entonces que éstos pueden desempeñar en dicha etapa roles determinados (9) tales como la conexión entre células dentro de los agregados (*rafts*) y el deslizamiento del *raft* sobre la superficie. Las Figuras 7.6a y 7.6b muestran la formación de grandes agregados bacterianos con flagelos curvos, en forma de lazos, alrededor de los mismos, sobre sustratos de Au-NSa y PBCA-NSa. Este tipo de estructuras microbianas no ha sido encontrado en los sustratos MS1, después del mismo tiempo de exposición al cultivo de bacterias.

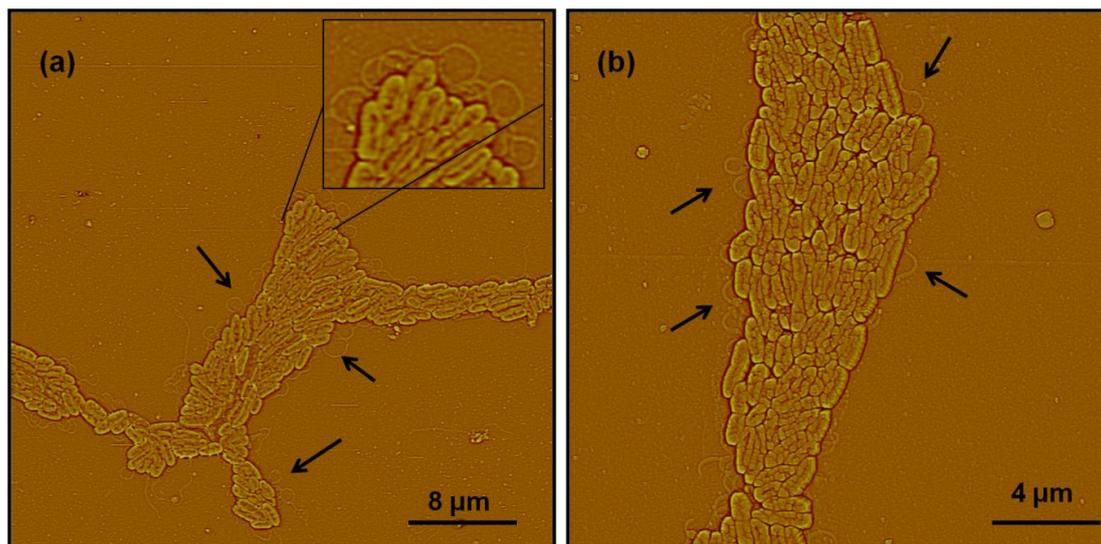


Figura 7. 6 (a) Imagen AFM en modo contacto de una superficie de Au-NSa en donde se pueden observar los agregados bacterianos tipo *raft*. Las flechas negras indican la presencia de flagelos curvos. (b) Imagen AFM en modo contacto de una superficie de PBCA-NSa y el mismo tipo de agregado microbiano. Ambos sustratos fueron expuestos durante 30 min a un cultivo de *P. fluorescens*.

El mismo tipo de distribución de flagelos orientados ha sido encontrada por otros autores al analizar los bordes y el centro de colonias tipo *swarm* de *P. aeruginosa* que crecían sobre agar (16). Por lo tanto, se puede especular que la distribución de flagelos sobre las superficies sólidas podría estar involucrada en la señalización y conexión entre células que facilitan el proceso de agregación. Un punto interesante que vale la pena mencionar es que se ha reportado que la velocidad de traslado de las células que se encuentran muy próximas a otras es siete veces mayor que la de aquellas bacterias que se encuentran aisladas (31). Ésta podría ser una de las motivaciones para la formación de los agregados microbianos. Otros autores también coinciden en señalar que las estructuras bacterianas tipo *raft* similares a las que muestra la Figura 7.6 favorecen el movimiento sobre la superficie (16). En distintas publicaciones se han mostrado también imágenes AFM de flagelos y pilis de *Myxococcus xanthus* y *Salmonella typhimurium* (17, 19) pero sin analizar la orientación de los mismos. Los resultados que se describen en el presente capítulo indican que las células adheridas tanto a las superficies MS1 como a las NSa parecen estar interconectadas a través de los flagelos que a su vez podrían facilitar el contacto y comunicación entre las mismas y la agregación con otras células.

Por otro lado, se ha establecido que las bacterias sésiles utilizan una gran variedad de estrategias para intercambiar información, entre las que se pueden mencionar la liberación de moléculas señalizadoras (*quorum sensing*) y las cascadas de señales durante la regulación genética dependientes del contacto lateral entre células. Las bacterias que se

encuentran dentro de un biofilm pueden utilizar este tipo de señales como estrategia para modular su crecimiento y su comportamiento social (21). En este contexto, también se ha considerado que puede ser factible que los flagelos y pilis puedan participar en comunicaciones inter-bacterianas. Además, se han reportado varias estrategias de transferencia electrónica extracelular mediante pilis conductivos conocidos como *nanowires* (32) tal como se menciona más adelante. Consecuentemente, futuras investigaciones dentro de esta área pueden generar novedosas estrategias para el control de los biofilms.

Nuestros resultados han demostrado que la adhesión bacteriana es diferente durante las primeras etapas de formación de biofilms según el proceso ocurra en una superficie tóxica, como el Cu, o en una superficie inerte como el Au (Capítulo 6). Aunque pueden observarse flagelos durante las primeras etapas de adhesión celular sobre superficies de Cu (Figura 7.7a), los mismos no fueron visibles en etapas posteriores. Los flagelos presentes en esta superficie no parecen estar mayoritariamente orientados (flechas blancas en Figura 7.7a y datos estadísticos de la Figura 7.5) y otros parecen estar direccionados pero no llegan a rodear a las células cercanas (flechas negras). De hecho, sólo el 65 ± 13 % de las bacterias adheridas sobre Cu presenta flagelos, mientras que en Au y PBCA el 83 ± 4 % y el 87 ± 7 % de los microorganismos adheridos presentan flagelos respectivamente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la presencia de los productos de corrosión de Cu pueden dificultar la observación de apéndices celulares tan delgados. Además, cabe mencionar que tampoco se observan las típicas estructuras bacterianas organizadas que se evidenciaron sobre las superficies Au-NSa y PBCA-NSa. Por el contrario, se observó la presencia de agregados tridimensionales sin ningún tipo de organización para el desplazamiento (Figura 7.7b) donde no se pudo distinguir la presencia de flagelos. El proceso de agregación ordenado de bacterias y los movimientos cooperativos parecen estar restringidos debido a la naturaleza tóxica de la superficie.

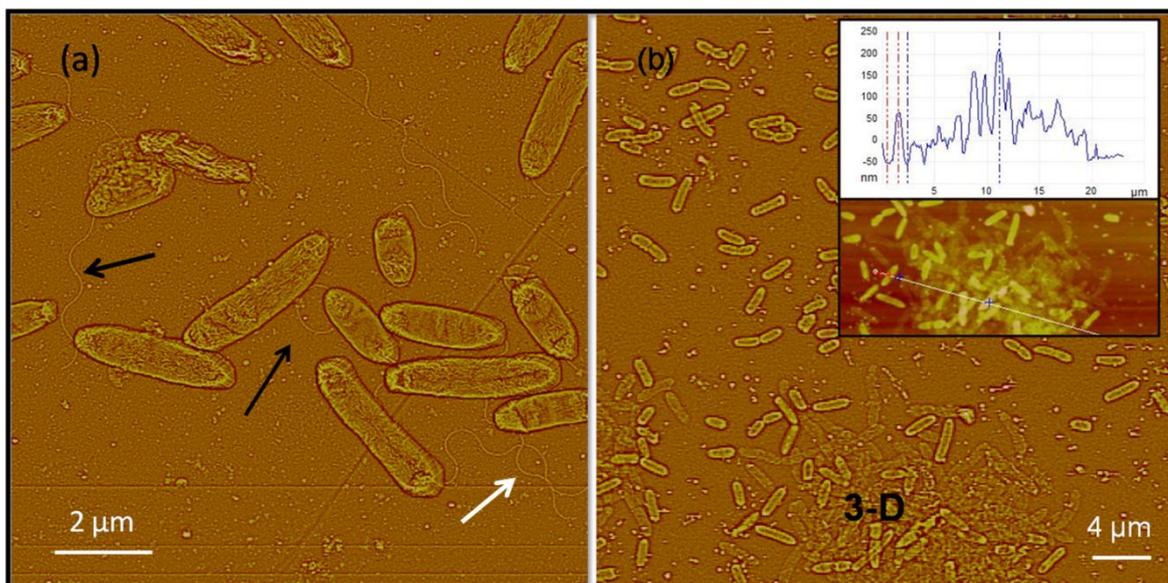


Figura 7.7. Imágenes AFM en modo contacto (con filtro highpass) de *P. fluorescens* adheridas a una superficie Cu-NSa que estuvo expuesta durante 2 h en el cultivo bacteriano. (a) Las flechas negras muestran flagelos conectando a dos células sin rodearlas. La flecha blanca muestra un flagelo que no está orientado hacia ninguna célula vecina. (b) Estructura microbiana 3D de *P. fluorescens*; los agregados bacterianos tipo *raft* no fueron evidentes.

7.4. Transferencia electrónica a través de flagelos (*nanowires*).

En las secciones precedentes, se ha demostrado que los flagelos cumplen cierto rol en el proceso de agregación. Cabe preguntarse qué tipo de interacciones sería capaz de realizar. Al respecto es interesante destacar que en una serie de trabajos recientes se ha reportado la presencia de pilis/flagelos conductores, más conocidos como *nanowires*, primeramente en bacterias de la especie *Geobacter sulfurreducens* (33) (reductores de óxido de hierro) y luego en *Shewanella* y otros microorganismos (34). Para investigar la conductividad eléctrica en los apéndices celulares se utilizó la microscopía c-AFM. En el caso de las bacterias *Geobacter sulfurreducens*, la formación de los *nanowires* depende de las condiciones del cultivo durante el crecimiento. Para el caso de *Shewanella oneidensis MR-1* estos flagelos conductores se forman cuando el crecimiento transcurre en un medio bajo limitación de aceptores de electrones (34). La naturaleza del material conductivo en estos apéndices así como el mecanismo de transferencia electrónica no se conocen en profundidad. Los flagelos conductores se encuentran fijos en el periplasma (región

comprendida entre la membrana citoplasmática y el exterior) y en la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas y tienen un diámetro entre 50-150 nm.

Resulta de interés mencionar que también se han descubierto apéndices celulares conductivos en otros grupos bacterianos que no son reductores de óxido de hierro insoluble, como por ejemplo la bacteria fototrófica *Synechocystis PCC6803* y la bacteria fermentativa *Pelotomaculum thermopropionicum* (34). Estos últimos hallazgos hacen suponer que muchas otras especies de microorganismos podrían ser capaces de producir apéndices conductores. Actualmente, algunos autores también sostienen que estas estructuras extracelulares que conectan a las bacterias forman complejas comunidades integradas y podrían facilitar la transferencia electrónica entre microorganismos (33). Este tipo de conexión electrónica entre bacterias podría funcionar como una nueva estrategia de comunicación (35). Por otra parte, cabe mencionar que se ha reportado que en condiciones de densidades celulares bajas, ciertos *nanowires* forman redes electrónicas que interconectan a las células, haciendo que las mismas se acerquen, mientras que cuando la densidad celular es muy alta el tipo de comunicación que se establece es de tipo químico (*quorum sensing*) (35).

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos resulta de sumo interés evaluar si los flagelos observados por microscopía de fuerza atómica en este trabajo de Tesis presentan características conductoras similares a los *nanowires* de los trabajos mencionados anteriormente (32). Con ese propósito, se realizaron ensayos de c-AFM cuya técnica fue descrita en el Capítulo 2. Para ello se repitieron las condiciones experimentales de los ensayos de adhesión mencionadas anteriormente y se empleó como sustrato una superficie de Au-NSa. En esta sección se muestran resultados preliminares de estos ensayos que por sus posibles implicancias, vale la pena describirlos. Los mismos están siendo completados en la actualidad a través de la cooperación que se mantiene con el laboratorio dirigido por el Dr. A. Hernández Creus, de la Universidad de La Laguna.

En la Figura 7.8a, se observa una imagen AFM en modo deflexión correspondiente a flagelos de *P. fluorescens*. Para conseguir un registro de señal de corriente en c-AFM de alguno de los flagelos, se escaneó una pequeña zona de la imagen (círculo negro en la Figura 7.8a). Posteriormente, se aplicó un voltaje de 50 mV a la punta del microscopio y se registró tanto la imagen topográfica (Figura 7.8b) como también la imagen que registra la señal de corriente correspondiente (Figura 7.8c) frente al voltaje aplicado. Cabe mencionar que en la Figura 7.8b, las zonas brillantes corresponden a zonas

más altas de la imagen mientras que las regiones brillantes en la Figura 7.8c corresponden a zonas con mayor señal de corriente.

En la Figura 7.8b se puede observar la imagen topográfica de uno de los flagelos (flecha negra).

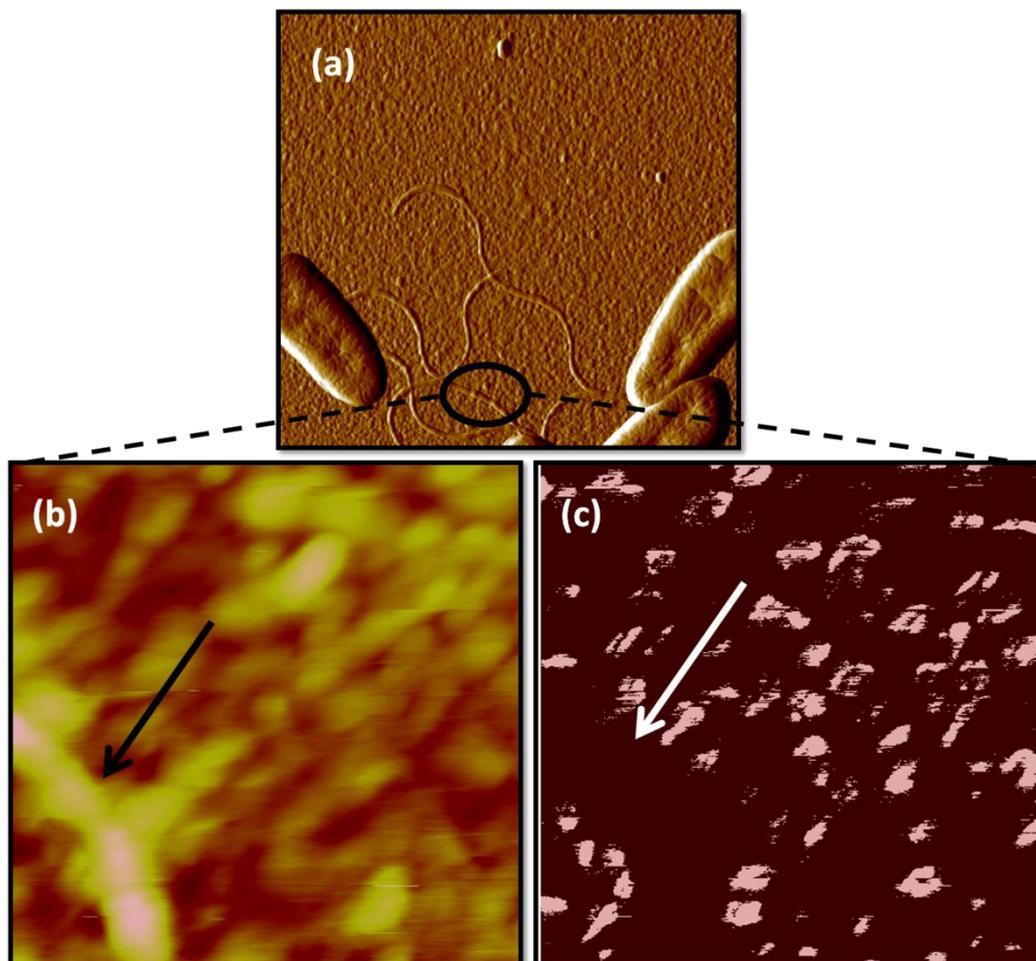


Figure 7.8. (a) Imagen AFM en modo deflexión ($6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$) en donde se observan bacterias con flagelos sobre una superficie de Au-NSa. (b) Imagen AFM en modo contacto ($600\ \text{nm} \times 600\ \text{nm}$) en donde se observa parte de un flagelo (flecha negra) (c) Imagen AFM en donde se observa el registro de corriente relativo a la imagen topográfica. Las zonas brillantes corresponden a las regiones conductoras. La flecha blanca indica la zona en donde se encuentra el flagelo.

Como se puede observar en la Figura 7.8c, no se registra señal de corriente en la zona correspondiente al flagelo. Debido a que el sustrato de Au, sobre el que están adheridos las bacterias y sus flagelos, es un muy buen conductor, podría ocurrir que la pequeña señal eléctrica que eventualmente proviniera del flagelo se encuentre enmascarada por la elevada señal del sustrato.

Por otra parte puede observarse en la imagen de corriente (Figura 7.8c) que sólo algunas zonas del sustrato de Au responden frente al voltaje aplicado. Esto puede explicarse

si se considera que el sustrato se cubre de una capa de material orgánico proveniente del medio de cultivo (Capítulo 1 y Capítulo 4) y de la producción de EPS. De esta manera, sólo los granos de Au que no se encuentran cubiertos por este material orgánico serían capaces de registrar una señal de corriente (zonas brillantes en la Figura 7.8c).

Para eliminar la interferencia de la alta conductividad y topografía del sustrato de Au, se repitieron los experimentos utilizando como sustrato grafito pirolítico altamente orientado (HOPG), que es usualmente utilizado como superficie plana modelo (36-38). En la Figura 7.9 se muestra una imagen AFM topográfica (a) y su correspondiente imagen de deflexión (b). Puede observarse que la superficie está cubierta por una capa discontinua, que por sus características podría atribuirse a materia orgánica proveniente del medio de cultivo y EPS.

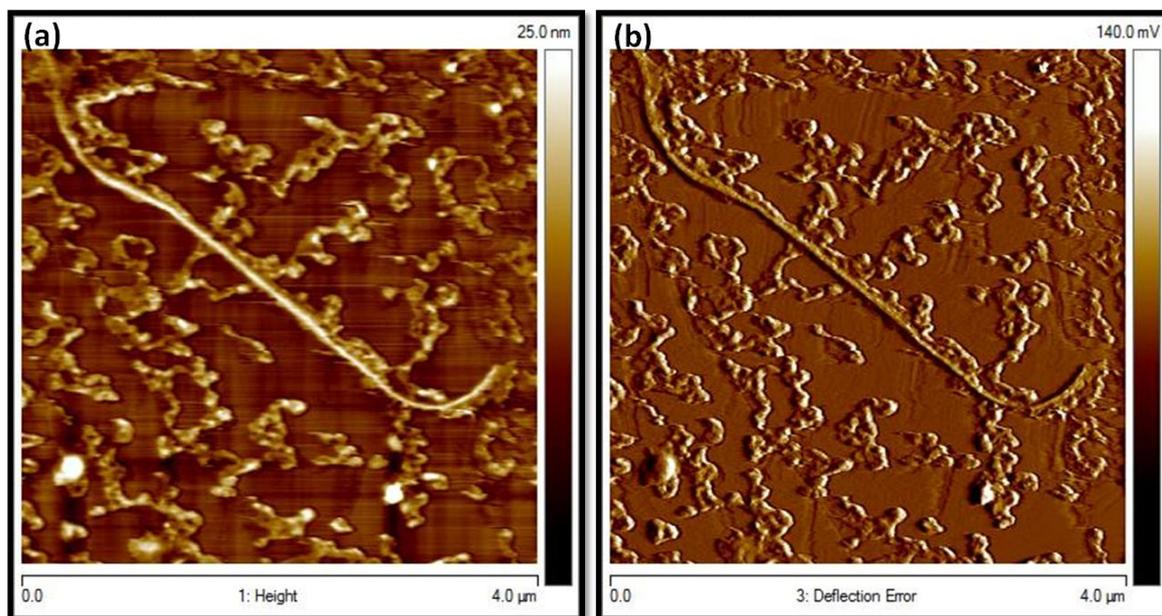


Figure 7.9. (a) Imagen AFM en modo contacto (modo topográfico) ($4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$) en donde se observa parte de un flagelo bacteriano y la superficie de HOPG parcialmente cubierta por material orgánico proveniente del medio de cultivo y EPS. (b) Correspondiente imagen AFM en modo contacto (modo deflexión)

Un detalle de la imagen (Figura 7.10) muestra el flagelo apoyado sobre este material. La imagen de c-AFM (Figura 7.10 c) muestra que no existe señal de corriente en las regiones cubiertas por materia orgánica, demostrando que el material adsorbido sobre la superficie actúa como capa aislante entre el sustrato y el flagelo.

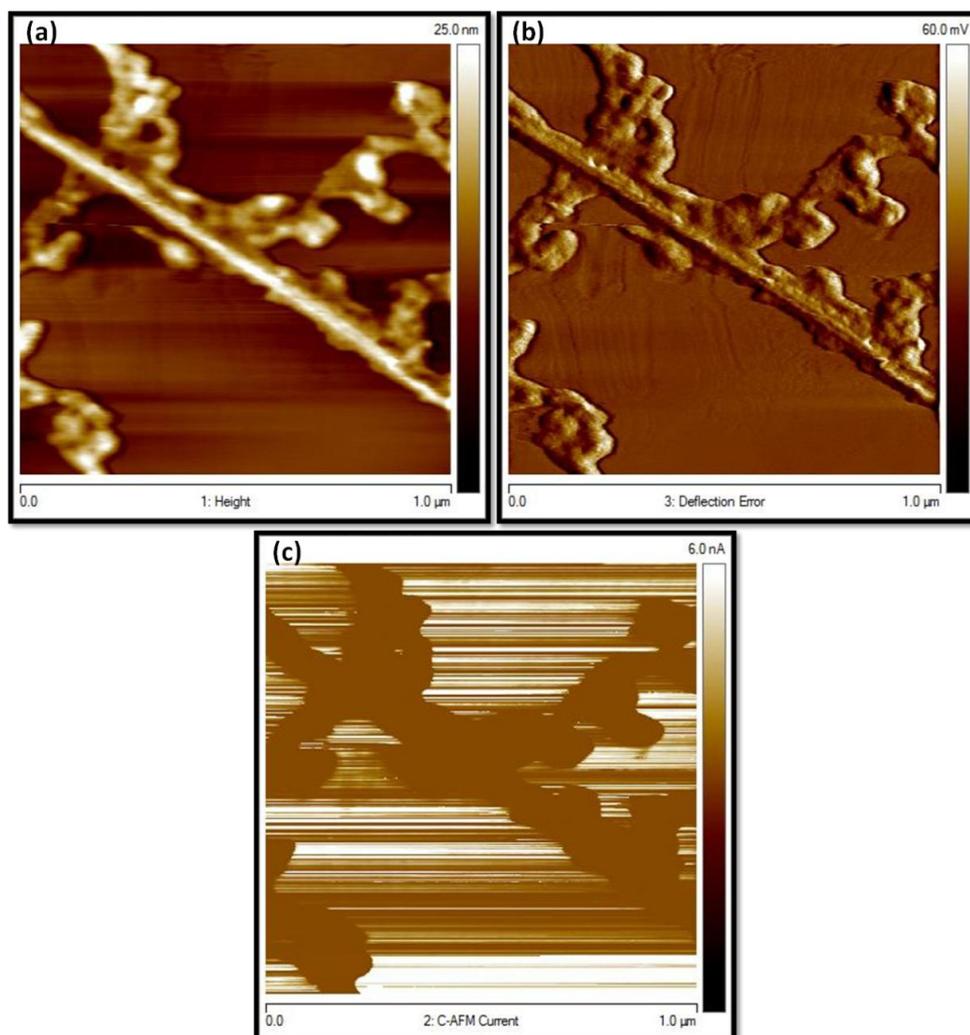


Figure 7.10. (a) Imagen AFM en modo contacto (modo topográfico) ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) en donde se observa en detalle parte de un flagelo bacteriano y la superficie de HOPG cubierta por cúmulos de material orgánico. (b) Correspondiente imagen AFM en modo contacto (modo deflexión). (c) Correspondiente imagen c-AFM que registra la señal de corriente de la muestra. Puede observarse que la señal de corriente es nula sobre la zona correspondiente al cúmulo de material orgánico y al flagelo.

Cabe destacar que en las imágenes correspondientes a la superficie Au-Nsa (Figura 7.8), no se evidencia la presencia de cúmulos de material orgánico sobre la superficie, tal como se observa para el HOPG (Figuras 7.9 y 7.10). Esto podría deberse a que sobre el Au se forma una capa más uniforme de material orgánico. De hecho, la afinidad de las proteínas por Au es mucho mayor que por el HOPG (39). Estos resultados demuestran la dificultad en el registro de la posible señal de corriente proveniente del flagelo debido a la adsorción de material orgánico sobre la superficie.

Con el objetivo de registrar alguna posible señal de corriente proveniente del flagelo (es decir comprobar si se comporta como un *nanowire*) sin la interferencia de la alta señal de corriente de los granos de Au, se deshabilitó el barrido de la punta del

microscopio sobre el eje Y de la imagen en una región en la que parece no haber materia orgánica entre el flagelo y el sustrato. De esta manera, el registro que se obtiene proviene del barrido consecutivo sobre una misma línea del eje X, es decir, sobre una misma porción del flagelo (Figura 7.11). La Figura 7.11a corresponde a la imagen topográfica, mientras que la Figura 7.11b corresponde al registro de corriente. Mediante el empleo de esta técnica de escaneo pudo registrarse una pequeña señal de corriente proveniente del flagelo. En la imagen topográfica se observa que la altura del flagelo (flecha azul en la Figura 7.11a) es mayor que la correspondiente a uno de los granos de Au (flecha verde en la Figura 7.11b). Sin embargo, la señal de corriente es mucho mayor para el pequeño grano de Au que para el flagelo. Esto explica la dificultad en el registro de la señal de conductividad eléctrica cuando el sustrato empleado es de Au.

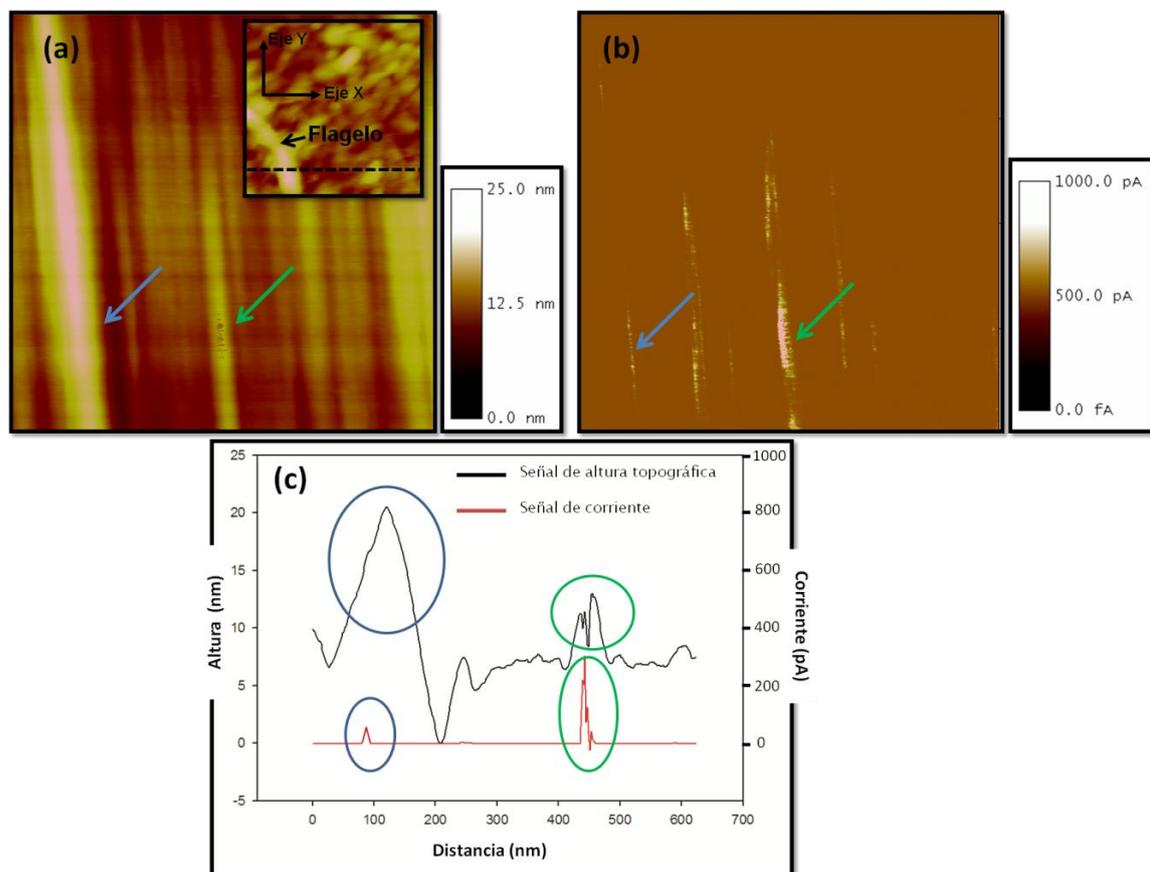


Figure 7.11. (a) Imagen c-AFM topográfica de Au-NSa en donde se deshabilitó el barrido sobre el eje Y. La flecha azul indica el flagelo, mientras que la flecha verde indica uno de los granos de Au de la superficie. (b) Imagen que registró la señal de corriente correspondiente a la imagen (a). (c) Gráfico en donde se observan los perfiles topográficos y de corriente. Los círculos azules indican la zona donde se encuentra el flagelo mientras que los círculos verdes la zona donde se encuentra el grano de Au.

En el gráfico de la Figura 7.11c se comparan los perfiles topográficos (línea negra) con los perfiles de corriente eléctrica (línea roja) para la imagen AFM obtenida.

Puede observarse claramente la diferencia de tamaño entre la señal topográfica y la de corriente para el flagelo (círculos azules) y para el caso del grano de Au (círculos verdes). Si bien es pequeña, la señal del flagelo indicaría cierta conductividad.

En la Tabla 7.1, se muestran los datos cuantitativos relacionados con estas marcadas diferencias.

Tabla 7.1. Altura y corriente del flagelo y del grano de Au frente a un voltaje aplicado

Voltaje aplicado	
50 mV	
Corriente Au	Corriente flagelo
456 ± 12 pA	83 ± 5 pA
Altura de grano de Au	Altura flagelo
3,8 ± 2,0 nm	12,6 ± 3,1 nm

Los datos de la Tabla 7.1 indican que a pesar de que la intensidad de la señal de corriente para el grano de Au es muy grande, el flagelo también generó una señal de corriente frente al voltaje aplicado demostrando su capacidad de conducir corriente (*nanowire*). Además, cabe resaltar que la magnitud de la corriente medida para los flagelos de *P. fluorescens* (83 ± 5 pA, con un voltaje aplicado de 50 mV) es coherente con los valores obtenidos en trabajos anteriores (33).

Los resultados preliminares descritos arriba serán completados con experimentos en los que se evite la interferencia de materia orgánica. Para ello se han preparado sustratos en los que las bacterias se adhieren a partir de una resuspensión de las mismas desde PBS, los que serán analizados en un futuro próximo.

7.5. Conclusiones del presente capítulo.

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la utilización de AFM y el uso de sustratos microestructurados (con dimensiones topográficas que coincidan con el tamaño de las bacterias) son técnicas muy poderosas para investigar los posibles roles de los flagelos sobre los sustratos durante las primeras etapas de formación de biofilms sin recurrir al empleo de tratamientos químicos. Resulta importante destacar que las respuestas

obtenidas sobre materiales inertes fueron independientes del sustrato empleado ya que se han utilizado dos tipos de materiales (metal noble y polímero) para preparar las superficies microestructuradas y se observaron respuestas biológicas similares.

Los resultados indican que los flagelos no se encuentran orientados al azar sobre las superficies en ninguno de los sustratos de Au y PBCA empleados (MS1 y NSa). Por el contrario, éstos se encuentran mayoritariamente direccionados hacia las células más próximas, haciendo contacto, rodeándolas y, probablemente, participando en la señalización y facilitando el proceso de agregación durante las primeras etapas de adhesión bacteriana. Esto indicaría un rol específico, aparte de la movilidad individual, durante las primeras etapas de formación de la biopelícula.

Cuando se forman estructuras microbianas tipo *rafts* sobre los sustratos NSa, se ha observado alrededor de las mismas, la presencia de flagelos curvos que forman lazos. Estos flagelos podrían facilitar la conexión de células dentro del *raft* y/o el desplazamiento del agregado sobre la superficie.

Por el contrario, sobre la superficie tóxica de Cu, la presencia de apéndices celulares y la formación de agregados tipo *raft* es menos evidente. En general, aquellos flagelos que se encuentran sobre la superficie no presentan una orientación preferencial, indicando que sobre este sustrato no puede asignarse a los flagelos una función relacionada con la agrupación de bacterias en estructuras bidimensionales.

Por último, experiencias preliminares mostraron que algunos de los flagelos que conectan a las células serían capaces conducir la corriente eléctrica en la escala nanométrica (*nanowire*), tal como se ha demostrado a través del registro de una señal de corriente eléctrica medida mediante c-AFM. De confirmarse este resultado a través de experiencias en curso podrían asignarse distintos roles a los flagelos que implicarían el uso de esta capacidad.

Referencias Bibliográficas

1. Katsikogianni, M., Missirlis, Y. F., Harris, L., y Douglas, J. (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions, *European Cells and Materials* 8, 37-57.
2. Parsek, M. R., y Tolker-Nielsen, T. (2008) Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Curr Opin Microbiol* 11, 560-566.
3. Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., y Michiels, J. (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation, *Trends Microbiol* 16, 496-506.
4. Kirov, S. M. (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis, *FEMS Microbiology Letters* 224, 151-159.
5. Li, Y. Q., Wan, D. S., Huang, S. S., Leng, F. F., Yan, L., Ni, Y. Q., y Li, H. Y. (2010) Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence, *Curr Microbiol* 60, 17-24.
6. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
7. Rosenau, F., Isenhardt, S., Gdynia, A., Tielker, D., Schmidt, E., Tielen, P., Schobert, M., Jahn, D., Wilhelm, S., y Jaeger, K. E. (2010) Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol Lett* 309, 25-34.
8. Kirov, S. M., Castrisios, M., y Shaw, J. G. (2004) *Aeromonas* flagella (Polar and Lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces, *Infect. Immun.* 72, 1939-1945.
9. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., y Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154.
10. Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Molecular Microbiology* 50, 61-68.

11. Choy, W. K., Zhou, L., Syn, C. K., Zhang, L. H., y Swarup, S. (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species, *J Bacteriol* 186, 7221-7228.
12. Touhami, A., Jericho, M. H., y Beveridge, T. J. (2004) Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*, *J Bacteriol* 186, 3286-3295.
13. Kailas, L., Ratcliffe, E. C., Hayhurst, E. J., Walker, M. G., Foster, S. J., y Hobbs, J. K. (2009) Immobilizing live bacteria for AFM imaging of cellular processes, *Ultramicroscopy* 109, 775-780.
14. Costello, J., Blaize, J., L' Amoreaux, W., McCoy, E.. (2006) Ultrastructure of the pathogenic bacteria *Mobiluncus mulieris*, *Microscopy and Microanalysis* 12, 324-325
15. Hesse, W. R., y Kim, M. J. (2009) Visualization of flagellar interactions on bacterial carpets, *J Microsc* 233, 302-308.
16. 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.
17. Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Romling, U., Belova, L. M., y Melefors, O. (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy, *BMC Microbiol* 7, 70.
18. Oh, Y. J., Lee, N. R., Jo, W., Jung, W. K., y Lim, J. S. (2009) Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy, *Ultramicroscopy* 109, 874-880.
19. Pelling, A. E., Li, Y., Shi, W., y Gimzewski, J. K. (2005) Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6484-6489.
20. Whitehead, K. A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C., y Verran, J. (2006) Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal, *Colloids Surf B Biointerfaces* 51, 44-53.
21. Blango, M. G., y Mulvey, M. A. (2009) Bacterial landlines: contact-dependent signaling in bacterial populations, *Curr Opin Microbiol* 12, 177-181.
22. Celio, H., Barton, E., y Stevenson, K. J. (2006) Patterned assembly of colloidal particles by confined dewetting lithography, *Langmuir* 22, 11426-11435.

23. Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., y Witten, T. A. (2000) Contact line deposits in an evaporating drop, *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62, 756-765.
24. Tull, E. J., Bartlett, P. N., y Ryan, K. R. (2007) Controlled assembly of micrometer-sized spheres: theory and application, *Langmuir* 23, 7859-7873.
25. Olsson, A. L. J., 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.
26. Doktycz, M. J., Sullivan, C. J., Hoyt, P. R., Pelletier, D. A., Wu, S., y Allison, D. P. (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces, *Ultramicroscopy* 97, 209-216.
27. Greif, D., Wesner, D., Regtmeier, J., y Anselmetti, D. (2010) High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells, *Ultramicroscopy* 110, 1290-1296.
28. Louise Meyer, R., Zhou, X., Tang, L., Arpanaei, A., Kingshott, P., y Besenbacher, F. (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions, *Ultramicroscopy* 110, 1349-1357.
29. Fantner, G. E., Barbero, R. J., Gray, D. S., y Belcher, A. M. (2010) Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy, *Nat Nanotechnol* 5, 280-285.
30. Lawrence, J. R., y Caldwell, D. E. (1987) Behavior of bacterial stream populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments, *Microbial Ecology* 14, 15-27.
31. Spormann, A. M. (1999) Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 621-641.
32. El-Naggar, M. Y., Gorby, Y. A., Xia, W., y Nealon, K. H. (2008) The molecular density of states in bacterial nanowires, *Biophys J* 95, L10-12.
33. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435, 1098-1101.
34. Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D.

- W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H., y Fredrickson, J. K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11358-11363.
35. Reguera, G. (2009) Are microbial conversations being lost in translation?, *Microbe* 4, 506-512.
36. Bottani, E. J., y Tasco, J. M. D. (2008) *Adsorption by carbons*, Elsevier, Amsterdam ; London.
37. Kramer, B. E. (2003) *Advances in solid state physics*, Vieweg.
38. Zoski, C. G. (2007) *Handbook of electrochemistry*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam ; Boston.
39. McGee, W., Djuricic, D., Lorimer, K., Wong, L.-L., y Hill, H. A. O. (2002) The electrochemistry and scanning tunnelling microscopy of the flavoprotein, putidaredoxin reductase from *Pseudomonas putida*, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 538-539, 261-265.

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).

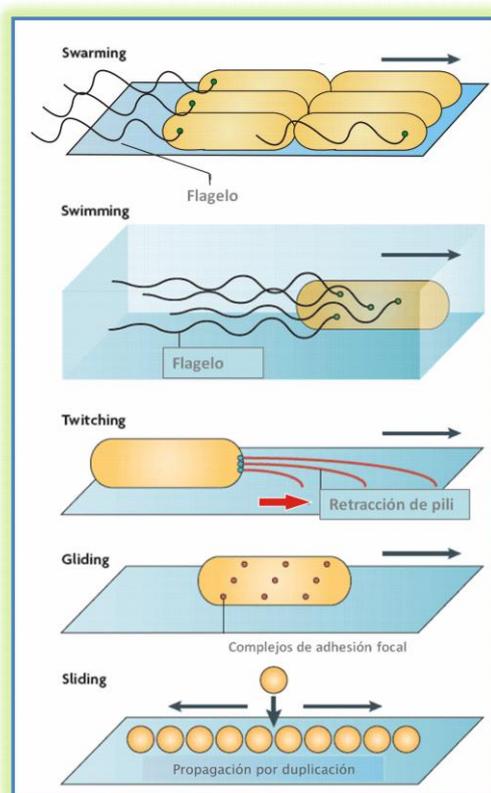


Figura 8.1 Esquema representado los tipos de movilidad que pueden realizar las bacterias sobre superficies. **Swarming** es el movimiento multicelular de bacterias sobre una superficie y está impulsado por el flagelo rotando helicoidalmente. **Swimming** es el movimiento de las bacterias individuales 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.

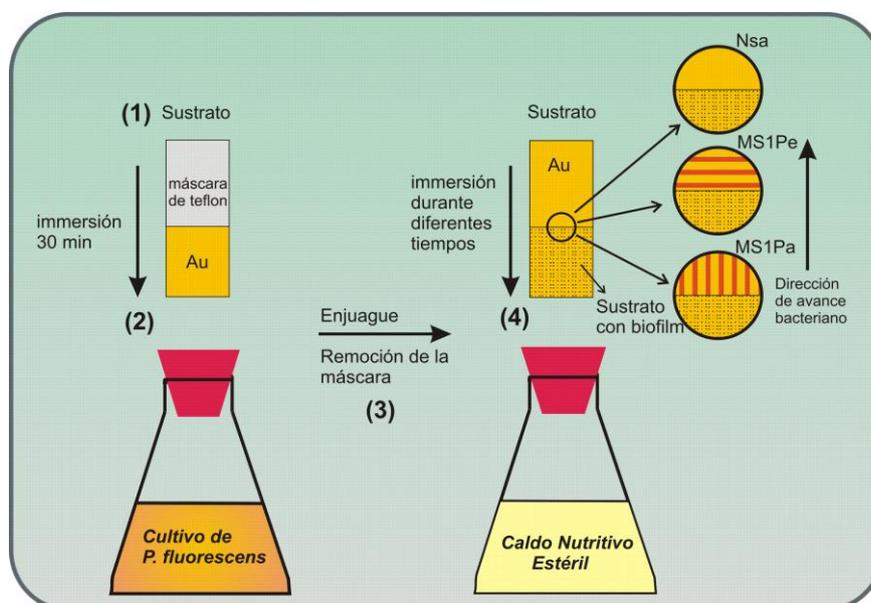


Figura 8.3 Esquema experimental de los ensayos de movilidad bacteriana sobre sustratos sólidos.

- (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.

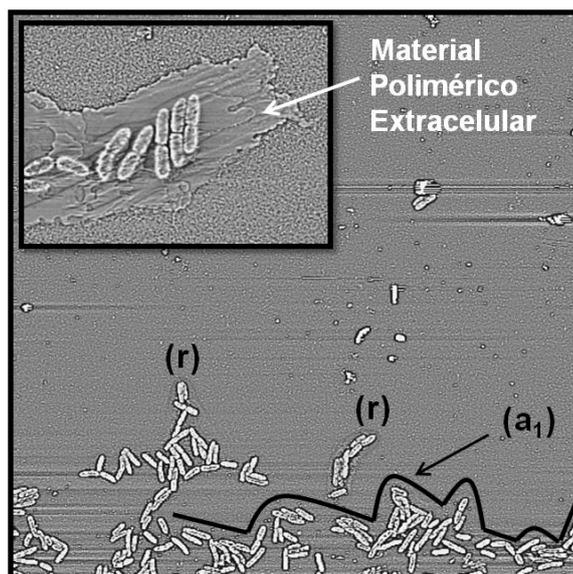


Figura 8.4 Imagen AFM topográfica (con filtro de paso alto) en modo contacto ($75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$) correspondiente al frente bacteriano formado sobre una superficie Au-NSa después de 10 min de inmersión en medio nutritivo estéril. Las líneas negras muestran el límite correspondiente 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).

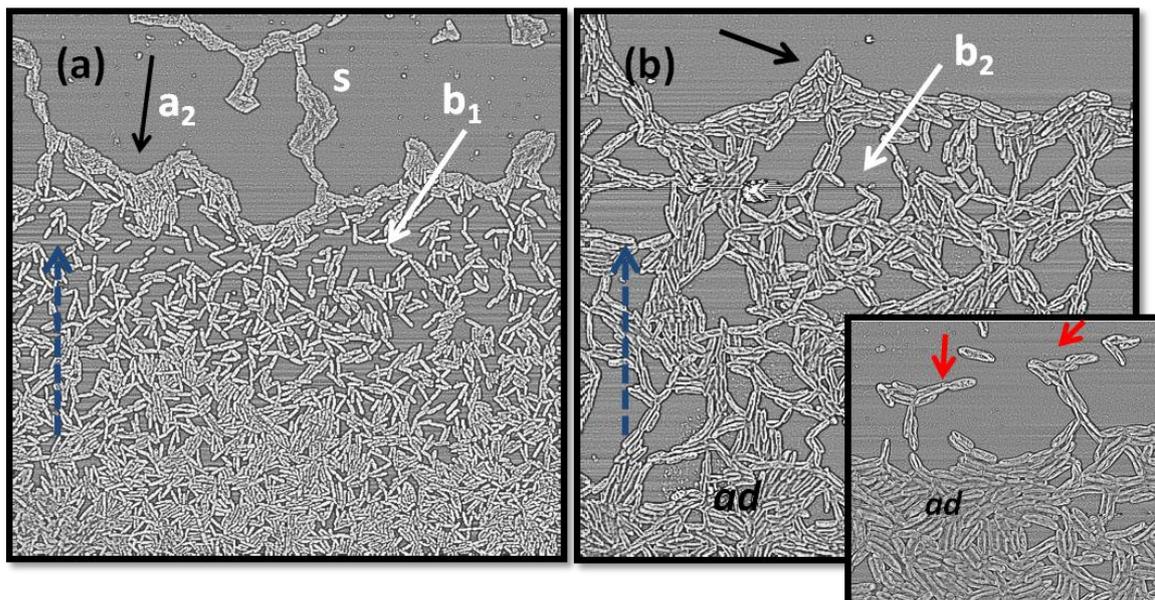


Figura 8.5 Imágenes de AFM en modo contacto (filtro paso alto). Las flechas discontinuas de color azul indican la dirección de avance. **(a)** Imagen AFM de 100 μm x 100 μm luego de 30 min de desplazamiento bacteriano. Se observa un frente bacteriano (a_2) y grupos menos densos de bacterias (b_1). **(b)** 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.

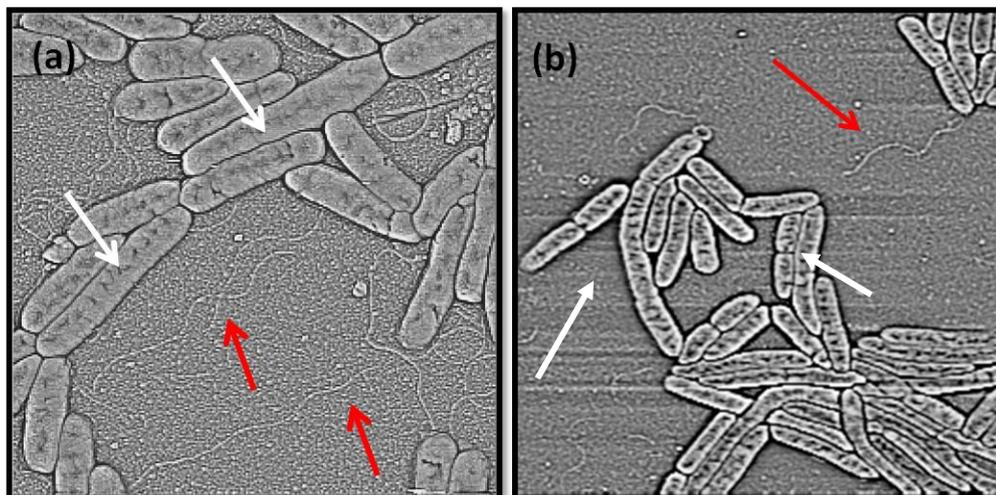


Figura 8.6 (a) Imagen AFM (10 μm x 10 μm), organización espacial bacteriana detrás del frente de avance. Las flechas blancas indican bacterias alargadas y las flechas rojas señalan la presencia de flagelos conectando microorganismos (b) Imagen AFM (15 μm x 15 μm) en donde puede observarse la presencia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

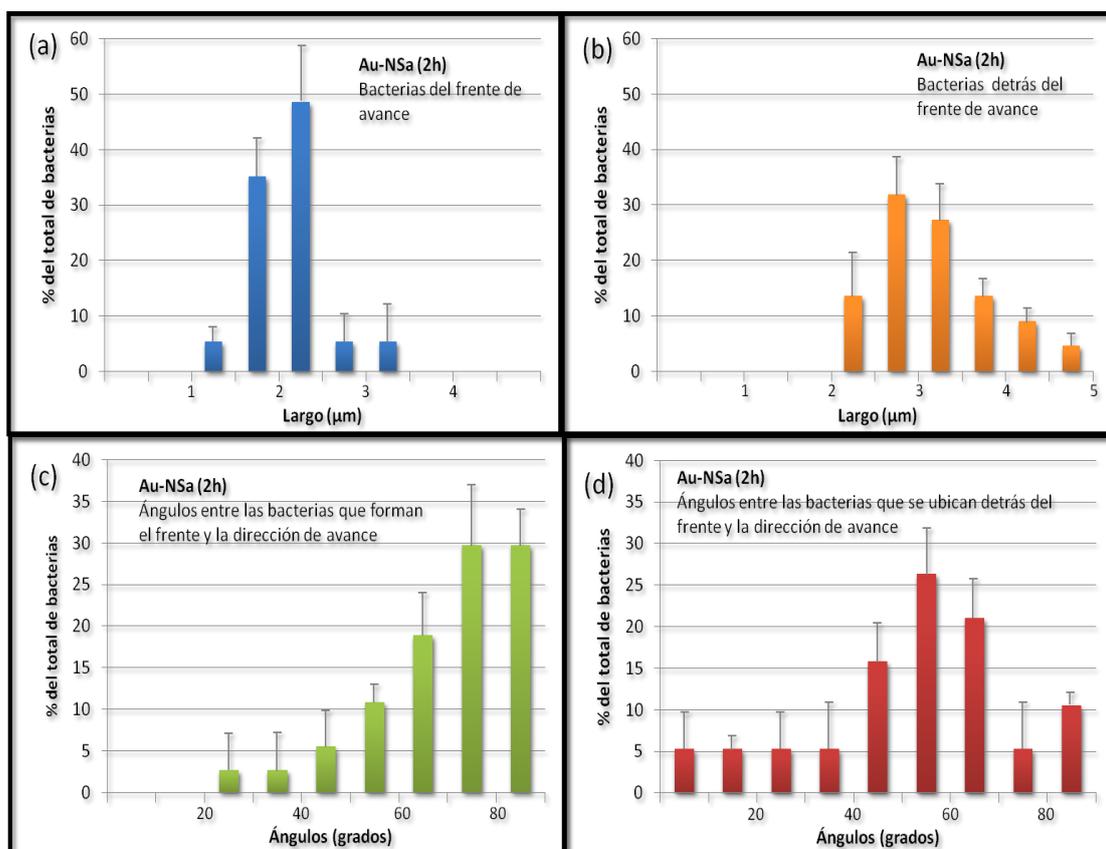


Figura 8.7 Histogramas que muestran la distribución de las longitudes de las bacterias (a y b) y las orientaciones (c y d) luego de 30 min de inmersión en medio nutritivo estéril. Los histogramas (a) y (c) corresponden a las bacterias que forman el frente de avance mientras que los histogramas (b) y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

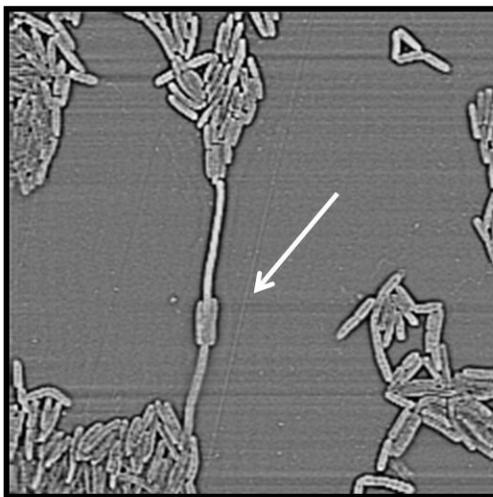


Figura 8.8. Imagen AFM (30 μm x 30 μm) en donde se observa el alargamiento de una bacteria para conectar dos grupos de células próximos.

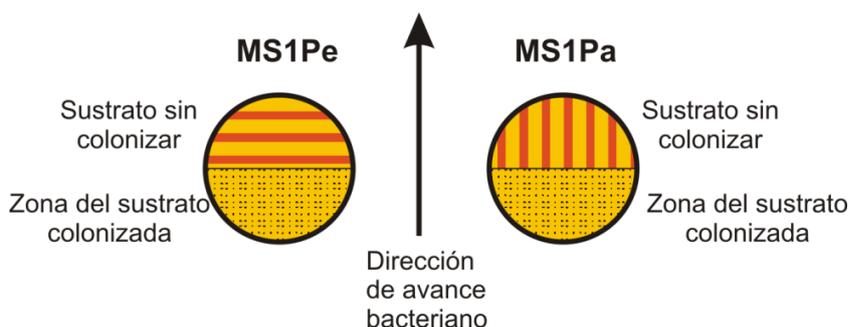
Como ha sido mencionado anteriormente, las bacterias ubicadas en el frente de avance se posicionan perpendicularmente a la dirección de avance. El 60% de las células en esta región se ubican aproximadamente perpendiculares a la dirección de avance (ángulos mayores de 70° con respecto a la misma) (Figura 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).

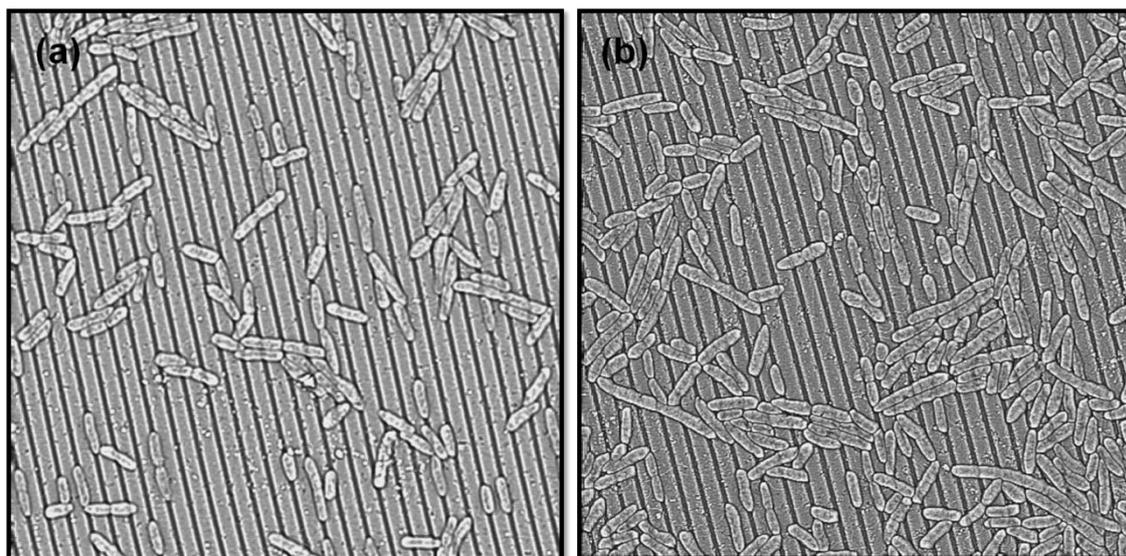


Figura 8.9 Imágenes AFM topográficas (40 μm x 40 μm , filtro de paso alto) de la disposición de bacterias sobre un sustrato MS1Pa: (a) luego de 10 min, (b) luego de 30 min en medio nutritivo estéril.

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).

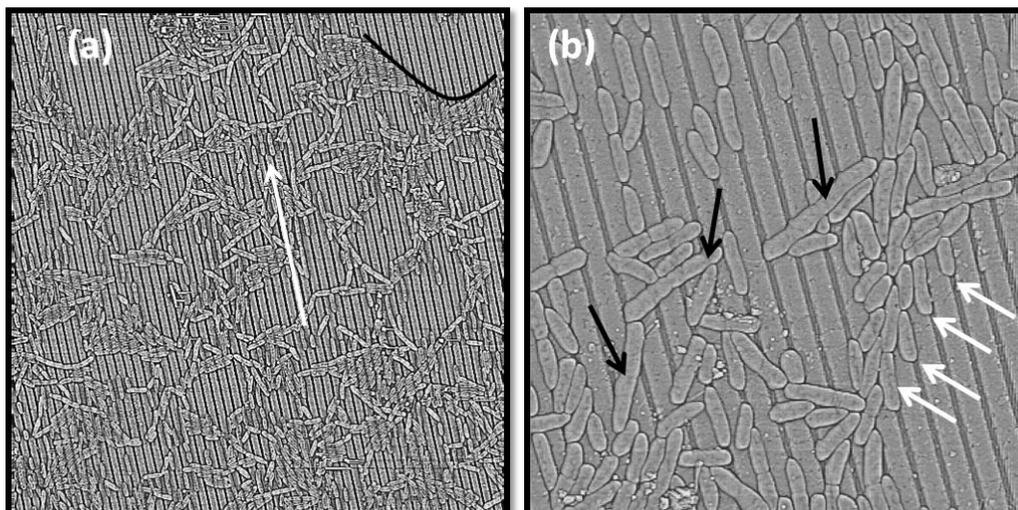


Figura 8.10 (a) Imagen AFM (80 μm x 80 μm) de la disposición de bacterias sobre un sustrato MS1Pa luego de 1 h de inmersión en medio nutritivo estéril. La línea negra indica la formación de un posible frente de avance y la flecha blanca señala la dirección de los canales superficiales. **(b)** Imagen 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).

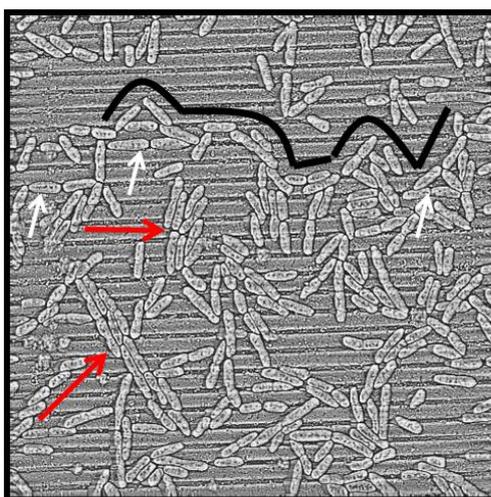


Figura 8.11 Imagen AFM (40 μm x 40 μm) correspondiente a la disposición espacial de *P. fluorescens* luego de 1h sobre un sustrato MS1Pe. La línea negra indica las etapas iniciales de formación de un posible frente de avance. Las flechas rojas señalan grupos de bacterias en contacto lateral ubicados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

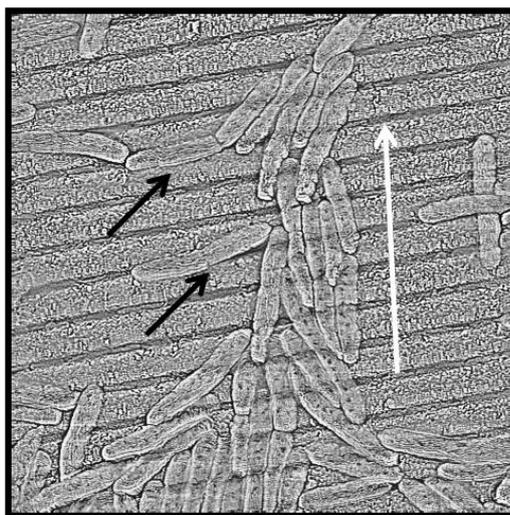


Figura 8.12 Imagen AFM (20 μm x 20 μm) de *P. fluorescens* sobre un sustrato MS1Pe. Se observa un grupo de bacterias ordenadas espacialmente para intentar desplazarse en forma conjunta sobre la superficie evitando quedar inmovilizadas dentro de los canales y arrastrando a las que se encuentran atrapadas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

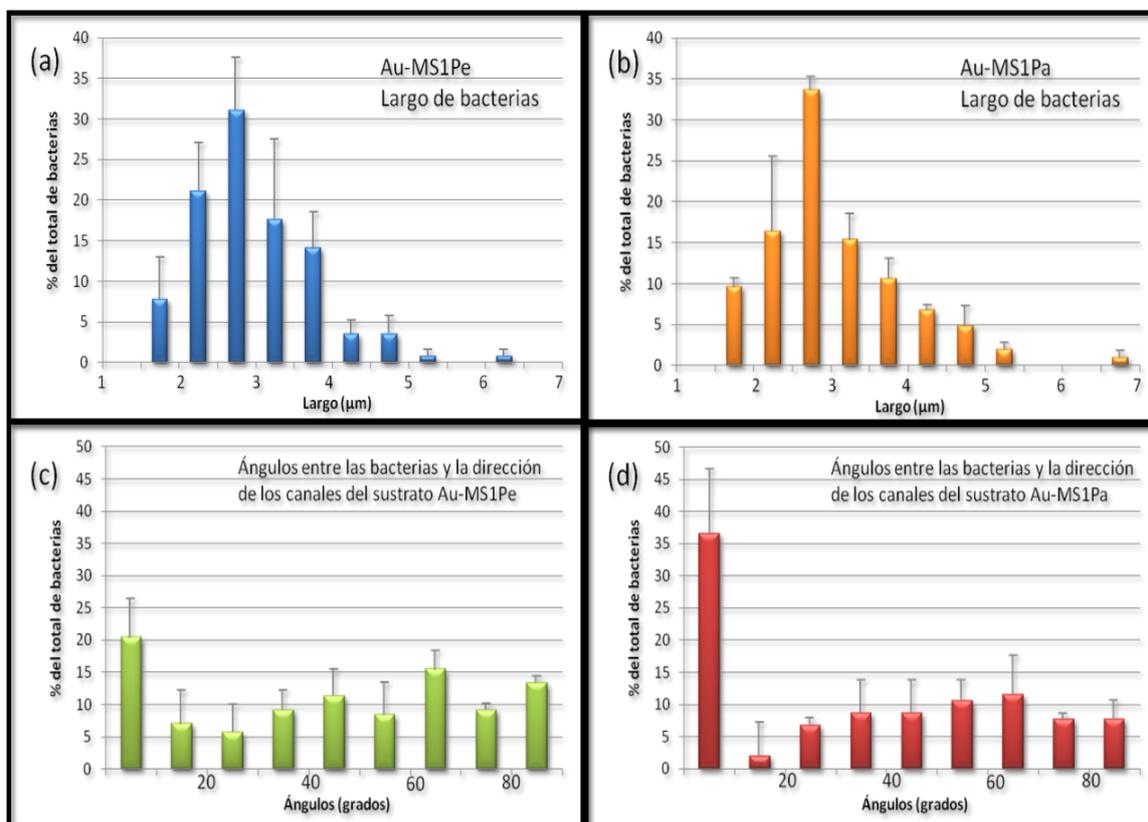


Figura 8.13 Histogramas representando la distribución de la longitud de bacterias (a y b) y la orientación (c y d) (ángulos con respecto a la dirección de los canales micrométricos superficiales) sobre sustratos MS1Pe y MS1Pa. Los datos se obtuvieron a partir de imágenes AFM de 40 μm x 40 μm.

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.

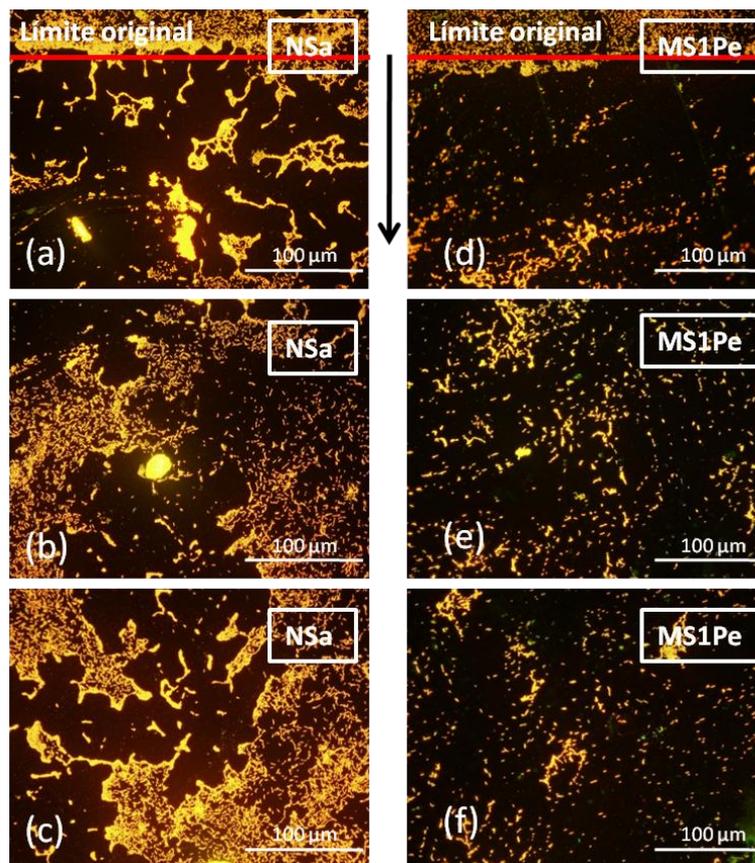


Figura 8.14 Imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia de la colonización bacteriana sobre sustratos NSa (a, b y c) y sustratos MS1Pe (d, e y f) luego de un período de 2 h de inmersión en medio nutritivo estéril. La línea roja en las imágenes (a) y (d) indica el límite del frente bacteriano original (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

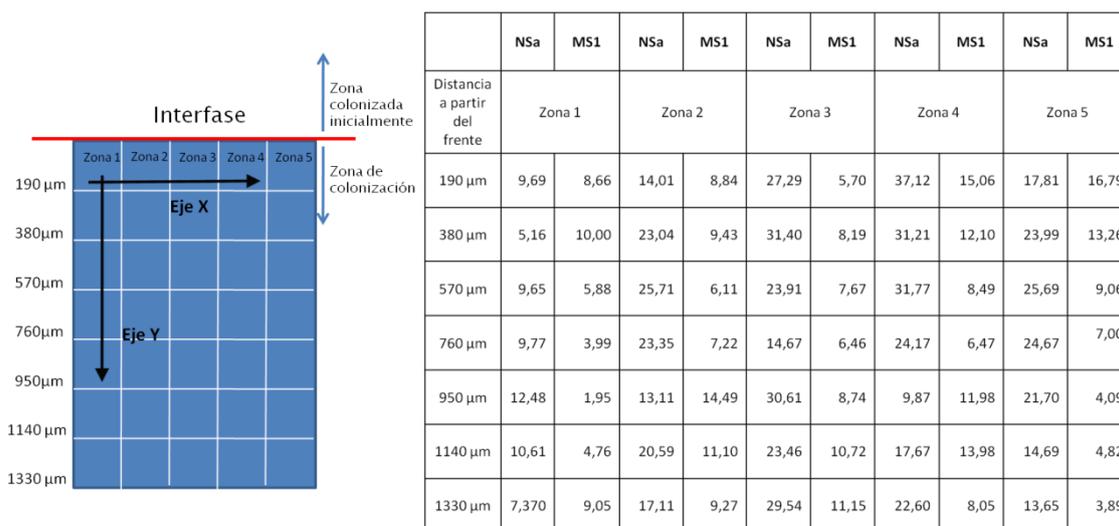


Figura 8.15. División del área total del sustrato en subáreas para evaluar en cada una de ellas el porcentaje de área colonizada (izquierda). Tabla mostrando los diferentes porcentajes de área cubierta por el biofilm de *P. fluorescens* según la zona del sustrato analizada (derecha).

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.

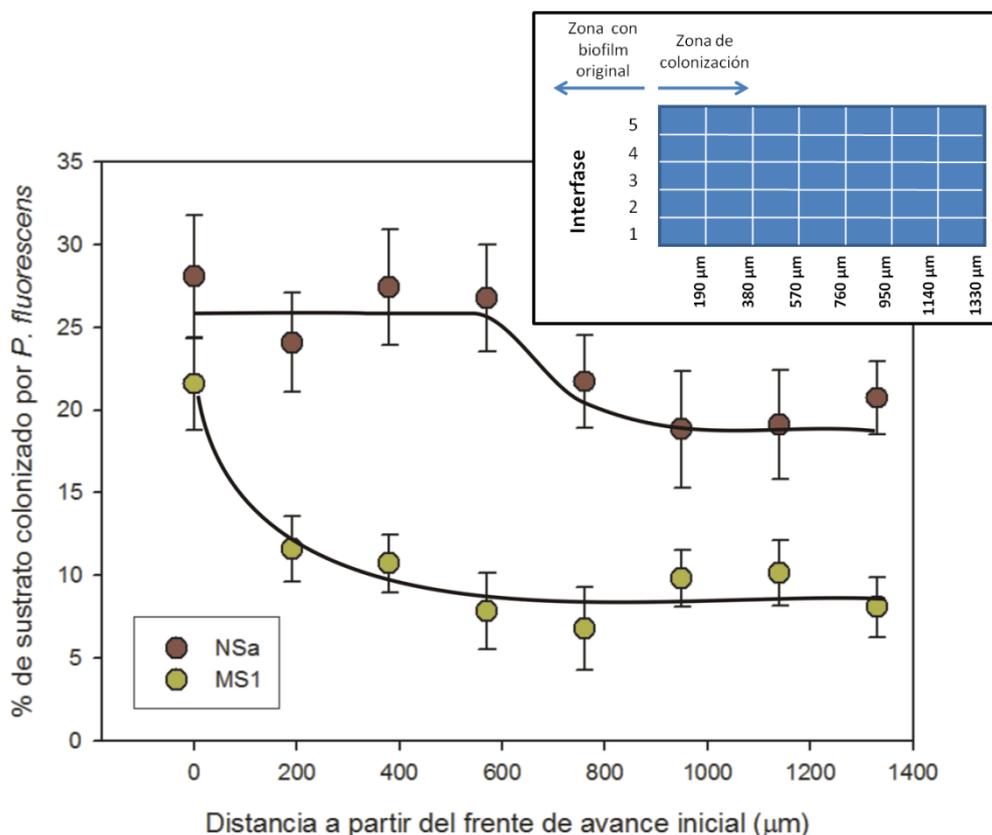


Figura 8.16 Avance del frente bacteriano evaluado a través de la distancia a partir del frente del biofilm de *P. fluorescens* para los sustratos de Au-NSa y Au-MS1. El valor correspondiente a cada distancia es el promedio obtenido del análisis de las zonas 1-5 definida de acuerdo al recuadro superior.

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.

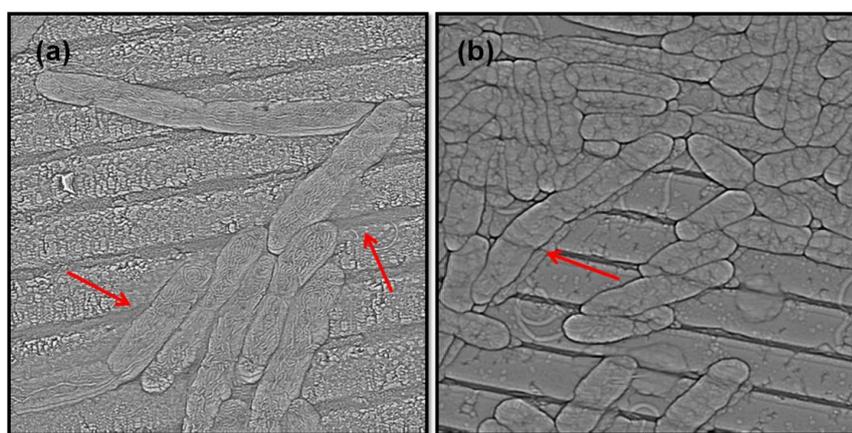


Figura 8.17 Imágenes AFM (filtro de paso alto) en las cuales se observa la presencia de EPS sobre la superficie. **(a)** ($7,5 \times 7,5 \mu\text{m}^2$) Las flechas rojas indican la presencia de material polimérico alrededor de las células. **(b)** ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) Las flechas rojas indican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

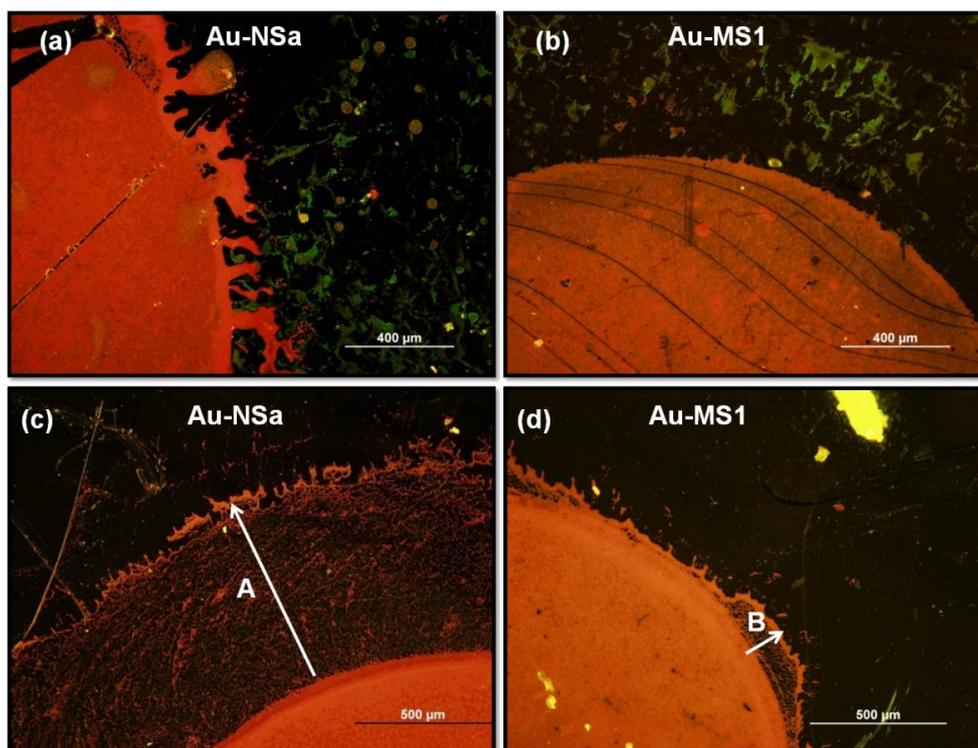


Figura 8.18 Imágenes de epifluorescencia (naranja de acridina). (a) Interfase del inóculo inicial de *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (b) Interfase del inóculo inicial de *P. fluorescens* sobre Au-MS1. (c) Avance de *P. fluorescens* sobre sustrato de Au-NSa luego de 2 h. El segmento A corresponde a la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

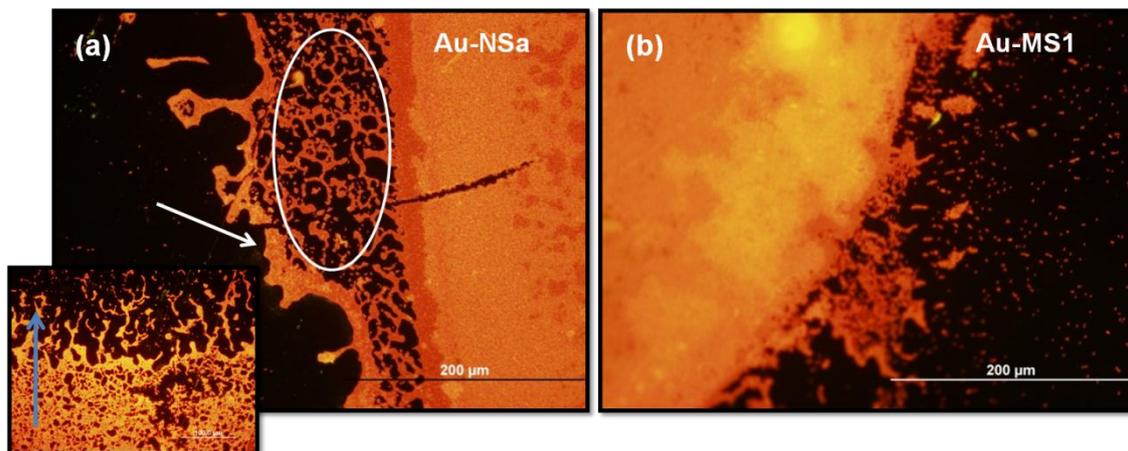


Figura 8.19 (a) Colonización de *P. fluorescens* sobre Au-NSa, la flecha blanca indica el frente de avance, el círculo blanco, las redes de bacterias. (b) Colonización de *P. fluorescens* sobre Au-MS1.

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).

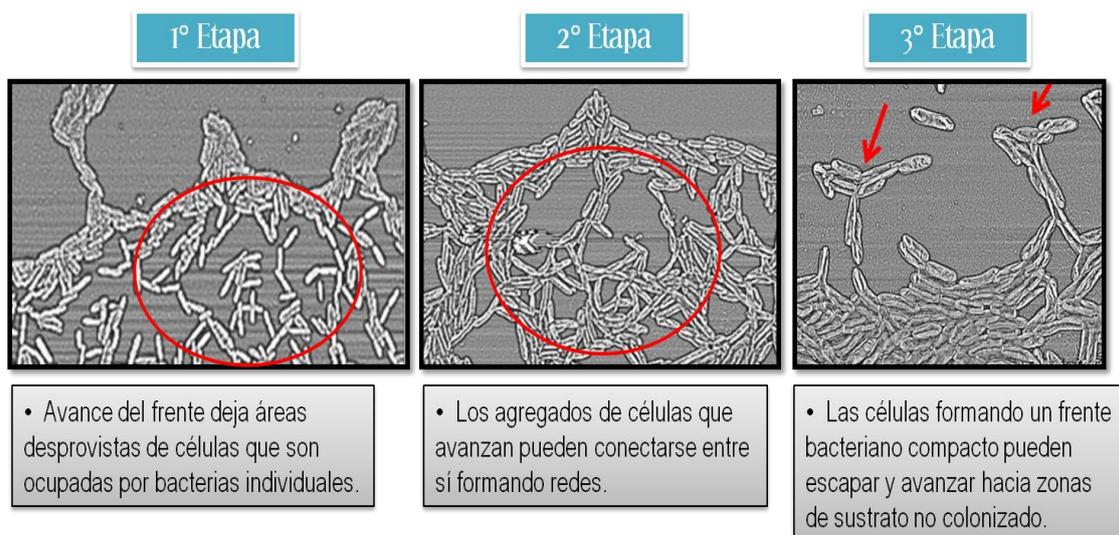


Figura 8.20 Esquema representando las etapas de auto-organización microbiano sobre una superficie de Au-NSa.

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., Cecilian, 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.

Capítulo 9

Efecto de los antibióticos sobre las bacterias adheridas a sustratos con diferente topografía.

9.1. Introducción.

Tal como se describió en el capítulo anterior numerosas enfermedades (otitis, endocarditis, caries, periodontitis y las infecciones crónicas del pulmón de pacientes con fibrosis quística) (1) así como un gran número de infecciones hospitalarias (ligadas a catéteres venosos centrales (2), catéteres urinarios (3), prótesis de válvulas cardíacas (4) y dispositivos ortopédicos (5)) están claramente asociadas a biofilms y son tratadas con antibióticos. Todas estas infecciones comparten características similares a pesar de la gran variedad de microorganismos y sitios huéspedes. Ello es debido a que una de las características más importante de un biofilm es que las bacterias que crecen en él son

capaces de evadir las defensas del huésped y resistir la terapia antimicrobiana con antibióticos.

La matriz de EPS del biofilm, que contiene polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos originados por los mismos microorganismos (6-7), cumple la función de proveer estabilidad estructural y protección al mismo contra condiciones ambientales adversas. Teniendo en cuenta que, el desarrollo de un biofilm se inicia mediante la adhesión irreversible de bacterias planctónicas que se acercan aisladamente a la superficie (8), el éxito de la profilaxis antibiótica durante el período quirúrgico, por ejemplo en las cirugías aloplásticas, ha permitido comprobar que en esta etapa preliminar las células son más susceptibles a los agentes antibióticos. Los siguientes pasos de desarrollo consisten, tal como se discutió en el Capítulo 1, en la adhesión irreversible a la superficie, la colonización superficial en monocapas de bacterias, incluyendo la multiplicación de las mismas, la producción de una matriz polimérica y la posterior formación de microcolonias (8). Posteriormente, el biofilm aumenta su espesor, observándose en los biofilms maduros estructuras tipo hongo o torre conectadas por canales por donde se produce el transporte de nutrientes (9). Durante esta etapa de madurez, la resistencia a los antibióticos es máxima.

Es importante recordar que el metabolismo y la velocidad de reproducción de los microorganismos varían de acuerdo a su posición en el biofilm y al ambiente donde se desarrolla, y que la estructura y composición del biofilm varían según el tipo de bacteria. Estas características tienen importantes consecuencias tanto diagnósticas como terapéuticas. Con respecto al diagnóstico, debe considerarse que en los biofilms infecciosos, las bacterias se encuentran densamente empaquetadas y cubiertas por una matriz polimérica. Este tipo de estructura dificulta el cultivo, la cuantificación e identificación de los microorganismos a través de las técnicas tradicionales de cultivo desarrolladas en el laboratorio (10). También trae como consecuencia la posibilidad de obtener resultados erróneos en la determinación de la susceptibilidad antibiótica, ya que la resistencia puede diferir notablemente si las células previamente se dispersan por ultrasonido o si se trabaja directamente con el biofilm. Estas células dispersas obtenidas en el laboratorio son en general más susceptibles a la terapia con antibióticos que las del biofilm real que se desarrolla en el paciente.

9.2. Mecanismos de resistencia de los biofilms a la acción de los antibióticos.

La resistencia de los biofilms a los antibióticos contribuye a la cronicidad de las infecciones (11). Debido a la complejidad de esta estructura biológica, los mecanismos de resistencia de los biofilms no se limitan a los ya conocidos mecanismos de transferencia de plásmidos, transposones y mutaciones que le confieren resistencia a las bacterias individuales (12). Existen cuatro formas básicas de defensa que podrían explicar el comportamiento más resistente del biofilm. La primera considera la baja penetración del biocida asociada tanto a la resistencia a la difusión como a la desactivación o adsorción del antibiótico por la matriz polimérica, que reducen la actividad e interacción del biocida con las células. Así por ejemplo, microorganismos como las cepas salvajes de *Klebsiella pneumoniae* logran desactivar al antibiótico sobre la superficie del biofilm retardando su penetración (13). La obstaculización de la difusión es probablemente efectiva contra pequeños péptidos antimicrobianos de numerosas defensinas (proteínas de cisteína ricas en iones y que funcionan como antibióticos naturales que se hallan en la superficie de la piel). También se ha reportado (14) que la barrera difusional generada en las biopelículas juega un rol importante en la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*, debido a la sobreproducción de enzimas β -lactamasas en la matriz del biofilm que hidroliza a los antibióticos β -lactámicos antes de alcanzar a las células bacterianas (15-16). Además se ha descrito que, de forma similar, se puede aumentar la producción de matriz polimérica en algunos estafilococos de coagulasa negativa (17-18). Se ha sugerido que las β -lactamasas dentro de los biofilms provienen de capas de bacterias lisadas debido a la exposición a antibióticos mediante la liberación de enzimas defensivas dentro del espacio extracelular. Por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglicosídeos, por presentar restricción de la permeabilidad durante toda la unión.

La segunda hipótesis se basa en la alteración de los microambientes (diferencias en concentración de nutrientes, oxígeno, etc.) que contribuyen a crear zonas metabólicamente inactivas, donde la velocidad de crecimiento es casi nula. Se sabe que ciertos antibióticos como la penicilina matan únicamente a las bacterias en crecimiento (19) y, por lo tanto, serían inefectivos contra células vivas pero no viables. De hecho, la penicilina y la ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y la tasa de ataque

es proporcional a la tasa de crecimiento. Algunos de los más avanzados lactámicos, como cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas pueden atacar células en fase estacionaria, sin embargo son más efectivos en el ataque rápido de células en división. Por otra parte, se han medido gradientes de oxígeno que indican concentraciones casi nulas en ciertos sitios interiores del biofilm y se ha reportado (20) que algunos biocidas son menos efectivos en ambientes anaeróbicos que en los aeróbicos. Así por ejemplo el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente la eficiencia de ciertos antibióticos.

La tercera hipótesis, considerada la más fuerte y genérica, se basa en la comprobación de que existe alteración fenotípica de algunas bacterias constituyendo formas altamente resistentes comparables a esporas. Se sabe de la persistencia de un 1% de bacterias como sobrevivientes, aún después de prolongados tratamientos con antibióticos. Ella explicaría por qué los agregados de bacterias recientemente formados muestran resistencia a los antibióticos de diferente composición, aún cuando no existan todavía barrera difusional y/o microambientes alterados.

El último factor recientemente considerado es la persistencia bacteriana, que se relaciona con la capacidad de un cierto número de células del biofilm de resistir frente a la presencia de ambientes agresivos (21). Estudios señalan que existe una cierta población microbiana dentro de la biopelícula que forma un único y altamente protegido estado fenotípico (22). Esta población recibe el nombre de células persistentes. La persistencia de una población de células puede deberse a:

- La dimensión bifásica de la biopelícula, en la cual gran parte de la población es atacada rápidamente pero una pequeña fracción de células del interior no es afectada aún con un prolongado tratamiento con antibióticos.
- Los genes que contribuyen a la persistencia codifican proteínas que actúan como circuitos reguladores que condicionan la entrada y el éxito de este estado como la buena y específica respuesta protectora.
- Los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento de microorganismos paradójicamente contribuyen a la persistencia y a la preservación de la biopelícula; la persistencia es dependiente de la dosis del agente bacteriostático y del tiempo de duración del ataque.

Se ha comprobado que la frecuencia de mutaciones en bacterias desarrollándose en biofilms es significativamente mayor que la correspondiente a las células planctónicas

(23), siendo también mayor la transmisión genética horizontal (24). Estas condiciones fisiológicas podrían explicar por qué las bacterias en biofilms se transforman más fácilmente en resistentes por medio de los mecanismos de resistencia tradicionales (betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas) observados en las bacterias planctónicas. Por otra parte, la elevada producción de especies endógenas oxígeno reactivas (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y un sistema antioxidante deficiente (25-26) generan un desbalance entre la carga oxidativa y las defensas antioxidativas dando lugar a estrés oxidativo en biofilms. Se considera que este estrés oxidativo causa mutabilidad elevada en las bacterias sésiles (23, 27) y que el estrés oxidativo endógeno promueve la resistencia antibiótica (28). Algunas investigaciones recientes también demuestran que la estructura de las microcolonias en los biofilms, debido al estrés oxidativo endógeno, son ambientes propicios para generar una adaptación genética elevada y cambio evolutivo (27).

La existencia de ciertos mecanismos de comunicación de las bacterias, mediante la síntesis y reacción de moléculas señalizadoras (29-31), también podría estar ligado a su mecanismo de resistencia a los biocidas (Capítulo 1, Sección 1.6). Se conoce como *quorum sensing* (QS) al mecanismo mediante el cual bacterias independientes perciben la presencia de otras y mediante la generación de señales extracelulares son capaces de desarrollar comportamientos sociales coordinados. La bacteria advierte la presencia de un número crítico de células en un espacio limitado y responde mediante la activación de ciertos genes que producen, por ejemplo, factores de virulencia como enzimas o toxinas. Para el caso de *P. aeruginosa*, QS regula la producción de factores de virulencia como enzimas extracelulares y lisinas celulares (por ejemplo, ramnolípidos), que son importantes en la patogenicidad de las infecciones en donde funcionan como agentes protectores frente a los fagocitos (32-33).

Teniendo en cuenta que las bacterias que se desprenden de los biofilms pierden paulatinamente sus propiedades resistivas, puede inferirse que los mecanismos previamente mencionados que interpreten las distintas formas de resistencia del biofilm a los tratamientos con biocidas deberían estar relacionados con la naturaleza multicelular del biofilm.

9.3. Nuevas terapias para la erradicación de biofilms.

Aunque aún no se conocen en profundidad todos los mecanismos involucrados en la resistencia de los biofilms frente a los antibióticos, se sabe, tal como se describe en la sección previa que existen múltiples mecanismos de resistencia que pueden actuar simultáneamente.

La heterogeneidad de estructuras, composiciones y estados fisiológicos microbianos dentro de los biofilms dificulta la acción biocida. De acuerdo a lo analizado anteriormente, es posible inferir que las células pueden estar expuestas a distintas concentraciones de antibióticos dependiendo de su ubicación espacial. Por otra parte, los gradientes de concentración de nutrientes y compuestos tóxicos existentes dentro del biofilm pueden alterar los ambientes locales generando diferentes velocidades de crecimiento de las células microbianas. Asimismo, una pequeña proporción de células dentro del biofilm pueden diferenciarse en un estado fenotípico altamente protector y coexistir con bacterias vecinas que son sensibles a los antibióticos. Como consecuencia, frecuentemente un antibiótico sólo es capaz de eliminar a algunas de las células dentro del biofilm, pero no a todas. Por este motivo, frecuentemente las terapias anti-biofilm deben impedir más de un mecanismo a la vez para que sean efectivas.

Debido a que la resistencia antibiótica del biofilm dependería de la agregación de las bacterias en comunidades multicelulares, puede especularse sobre estrategias alternativas donde se dificulte la agregación de las bacterias. Si se logra impedir la agrupación de los microorganismos la situación sería más ventajosa por dos motivos: por un lado, las defensas del huésped podrían resolver mejor la infección y por otro se mejoraría la eficacia de los antibióticos en esas condiciones.

Las estrategias de tratamiento más promisorias se enfocan en impedir el desarrollo de las estructuras multicelulares en vez de apuntar a las funciones esenciales de las células individuales. Entre las potenciales quimioterapias para impedir o destruir los agregados de bacterias se incluyen enzimas que disuelven la matriz polimérica extracelular (34), reacciones químicas que bloquean la síntesis de la matriz del biofilm (35) y análogos de las moléculas señalizadoras microbianas que interfieren con la comunicación célula-célula, indispensable para el desarrollo normal del biofilm (36). A medida que la base genética para el desarrollo del biofilm se conozca en profundidad, los productos de los genes que se

identifiquen como esenciales para la formación de colonias multicelulares se transformarán en el blanco ideal para potenciales quimioterapias.

Las potenciales estrategias que involucran cambios físicoquímicos se basan en el desarrollo de mejores materiales y métodos para el tratamiento de los biofilms (37). Por ejemplo, la estimulación eléctrica, ultrasónica, y fotodinámica puede perturbar a los biofilms y aumentar la eficacia de ciertos agentes antibióticos (38). Además, el cubrimiento de superficies con compuestos antimicrobianos ha demostrado cierta eficacia en la prevención de la formación de biofilms (39-43).

De acuerdo a lo analizado previamente, las estrategias para combatir biofilms evolucionan constantemente y existen variadas posibilidades que podrían favorecer la acción de ciertos antibióticos. En el presente capítulo se evaluará la acción combinada de un efecto físico, el efecto de la topografía, como coadyuvante a la acción biocida de los antibióticos. Teniendo en cuenta que la formación de agregados bacterianos durante las primeras etapas de la formación del biofilm está significativamente afectada por la microtopografía superficial (Capítulo 6), es posible especular que este tipo de estructuras superficiales podría mejorar la eficacia de los antibióticos. En este capítulo se analizará particularmente el efecto de topografías superficiales de tipo Au-MS1 que asisten a la terapia de dos antibióticos, penicilina y estreptomicina, sobre biofilms de *P. fluorescens*.

9.4. Características de los antibióticos utilizados.

9.4.1. Penicilina.

Las penicilinas pertenecen a una familia de compuestos químicos con una estructura química peculiar que le confiere una actividad característica contra un grupo determinado de bacterias (44). La mayoría de las penicilinas poseen como núcleo químico el anillo 6-aminopenicilánico (Figura 9.1) y difieren entre sí según la cadena lateral anclada a su grupo amino. Este núcleo 6-aminopenicilánico consta a su vez de un anillo tiazolidínico enlazado a un anillo betalactámico, éste último aparentemente esencial para la actividad antimicrobiana de este compuesto. Además del nitrógeno y del azufre del anillo tiazolidínico y betalactámico, la penicilina tiene un grupo carboxilo en la posición 2, un radical 2-metil en la posición 3 y un grupo amino en la posición 6, con distintos derivados

del grupo acilo como posibles sustituyentes, responsables de las diversas características de las diferentes penicilinas.

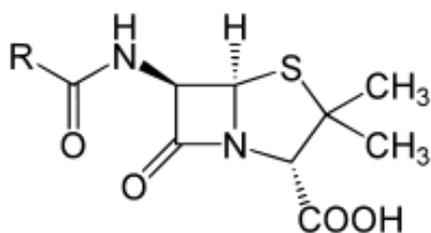


FIGURA 9.1. Estructura química de la penicilina

La penicilina, como el resto de los β -lactámicos, ejerce una acción bactericida mediante la alteración de la pared celular bacteriana, estructura que no existe en las células humanas. La pared bacteriana se encuentra por fuera de la membrana plasmática (44-45) y confiere a las bacterias la resistencia necesaria para soportar, sin romperse, la elevada presión osmótica que existe en su interior. Además de esto, la pared bacteriana es indispensable para la división celular, los procesos de transporte de sustancias, a los que limita por sus características de permeabilidad y la capacidad patógena y antigénica de las bacterias, ya que contiene endotoxinas bacterianas (45-46).

La acción de la penicilina, y en general de los β -lactámicos, se desarrolla principalmente en la última fase de la síntesis de peptidoglicano de la pared celular, al unirse a una enzima transpeptidasa llamada proteína fijadora de penicilina, responsable de producir una serie de enlaces cruzados entre las cadenas de los péptidos. La formación de estos enlaces o puentes es la que confiere la mayor rigidez a la pared bacteriana. Por lo tanto, los β -lactámicos como la penicilina, al inhibir la síntesis de peptidoglicano, interfieren en la formación de la pared celular bacteriana. Las bacterias sin su pared celular estallan o son más fácilmente fagocitadas por los granulocitos. Esta inhibición produce una acumulación de los precursores del peptidoglicano, los cuales producen una activación de enzimas como las hidrolasas y autolisinas que digieren el remanente de peptidoglicano en la bacteria (47). Por otra parte, la penicilina favorece la lisis osmótica de la bacteria durante el proceso de multiplicación.

9.4.1. Estreptomicina.

La estreptomicina es un antibiótico que pertenece a la familia de los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos constituyen una clase de antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica (48). A pesar de que existen diversos mecanismos de resistencia, continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos Gram-negativos aerobios. En la actualidad se utilizan fundamentalmente en combinación con β -lactámicos en infecciones graves. Su estructura química (Figura 9.2) se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos aminos (aminociclitol). Cuando el componente aminociclitol es la estreptidina, el antibiótico correspondiente es la estreptomicina (49).

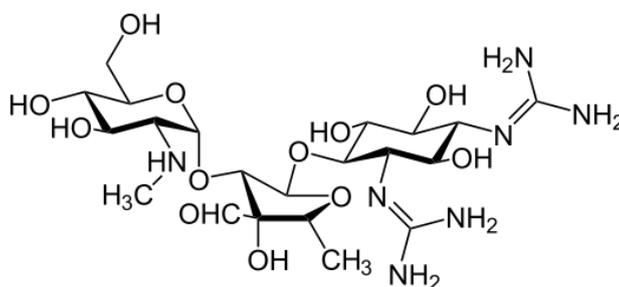


FIGURA 9.2. Estructura química de la estreptomicina

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (45) (50).

9.4.3. Combinación de antibióticos: Efecto sinérgico.

Para los ensayos realizados en el presente trabajo se utilizaron dos antibióticos: la penicilina y la estreptomicina debido al efecto sinérgico que presentan los mismos. La inhibición de la síntesis del peptidoglicano debido a la acción de la penicilina permite que los aminoglucósidos (estreptomicina) penetren la pared celular con mayor facilidad, modificando la síntesis de proteínas dentro de la célula bacteriana.

9.5. Estudio de la eficacia de los antibióticos en bacterias planctónicas.

Se sabe que la eficacia biocida de un antibiótico puede variar hasta mil veces cuando se compara su efecto sobre bacterias planctónicas y sésiles (51-52). Con el objetivo de evaluar la acción antimicrobiana de los compuestos utilizados (penicilina y estreptomicina) sobre *P. fluorescens* se realizaron, en primera instancia, ensayos con bacterias planctónicas con el propósito de comprobar su grado de sensibilidad a los antibióticos. Con ese fin, se colocó en varios tubos eppendorf 1 ml de cultivo de *P. fluorescens* (en fase exponencial, 1×10^7 UFC/ml). A la mitad de los tubos se les agregó además 5 μ l de una mezcla de antibióticos consistente en 50 unidades de penicilina/ml y 50 μ g de estreptomicina/ml. Después de un período de incubación de 2 h, se tomaron alícuotas de cultivos con y sin antibióticos. La determinación de la cantidad de células vivas y muertas anterior y posterior a la exposición a los biocidas se realizó mediante el uso del *kit Live/Dead BacLight*® (los detalles acerca del mecanismo de acción del colorante se informaron en el Capítulo 2) utilizando la metodología reportada en bibliografía (52). Cada alícuota (5 μ l) se colocó sobre un vidrio portaobjeto y se cubrió con un vidrio cubreobjeto para su posterior evaluación. Las imágenes tomadas a través de microscopía óptica de epifluorescencia permitieron obtener los resultados que se muestran en la Figura 9.3. Sobre diez imágenes ópticas obtenidas al azar (ensayo realizado por triplicado) y mediante el empleo del software IMAGE J, se cuantificó el porcentaje de área fluorescente obtenida con el filtro U-MWG2 que permite visualizar el total de bacterias. Posteriormente, se realizó el análisis del porcentaje de área fluorescente de las imágenes ópticas obtenidas con el filtro U-MWB2, con el cual sólo pueden observarse las células muertas (rojas). La diferencia entre estas dos áreas cubiertas representa la cantidad de células vivas.

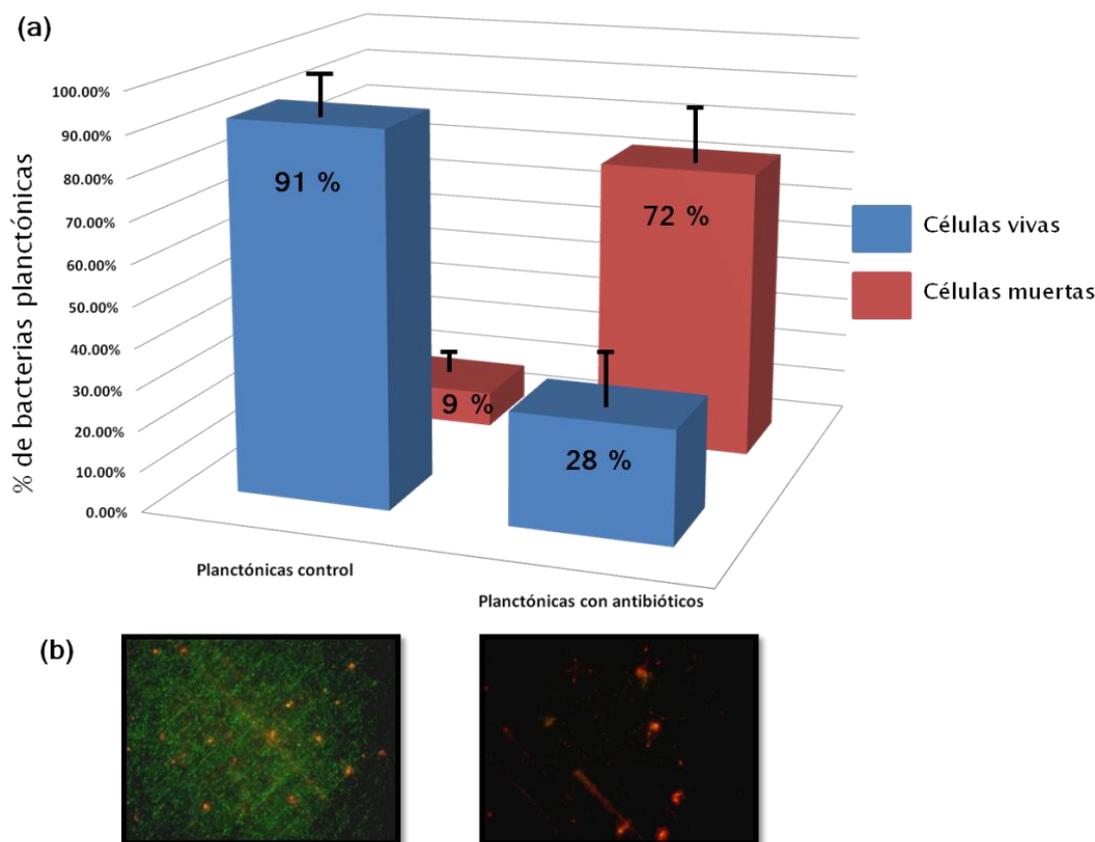


FIGURA 9.3. (a) Gráfico representando el porcentaje de bacterias planctónicas vivas (azul) y muertas (rojo) para un cultivo sin antibióticos (control) y para otro expuesto a antibióticos. (b) Imágenes de microscopía de epifluorescencia (*Kit Live/Dead BacLight*®) de un cultivo control, en donde se observa una mayoría de células verdes (izquierda), y de un cultivo con antibióticos, con bacterias fluorescentes principalmente de color rojo (derecha).

En la Figura 9.3 se grafica el porcentaje de bacterias planctónicas vivas (calculada en función del número de píxeles de coloración verde respecto del número total de píxeles). En la alícuota que no contenía antibióticos este valor fue de 91% mientras que el porcentaje luego de la exposición a los bactericidas durante 2 h fue de 28%. Mediante un análisis estadístico de Test t-Student ($p < 0.05$), pudo concluirse que las *P. fluorescens* planctónicas son sensibles a los antibióticos luego de un breve período de exposición a los mismos y que las cantidades de antibióticos empleadas son efectivas para eliminar un gran porcentaje de bacterias planctónicas.

9.6. Evaluación de la eficacia de los antibióticos sobre biofilms de *P. fluorescens* sobre superficies nano y microestructuradas.

Los ensayos experimentales que se describirán a continuación tienen como objetivo evaluar la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias sésiles adheridas sobre dos superficies con características topográficas diferentes (Au-NSa y Au-MS1). En el presente capítulo, se evaluará si la susceptibilidad a la acción de agentes antimicrobianos de los microorganismos sésiles se ve afectada por la distribución y densidad superficial de bacterias sobre dichos sustratos.

Los biofilms se formaron a partir de un cultivo de *P. fluorescens* preparado a base de un inóculo inicial de 2 ml, como ya se ha detallado anteriormente (Capítulo 5). En un ambiente estéril se colocaron los sustratos empleados para la formación de los biofilms (Au-NSa y Au-MS1) sobre una placa de Petri también estéril. Con el fin de ensayar los antibióticos sobre biofilms crecidos en condiciones similares se depositó una microgota de cultivo bacteriano (25 μ l) sobre cada sustrato durante 1 h con el objetivo de formar un biofilm primitivo (53). Transcurrido este período de tiempo, las muestras se enjuagaron con agua bidestilada estéril para remover de la superficie aquellos microorganismos que no se encontraban irreversiblemente adheridos al sustrato. Algunas de las muestras se secaron y fueron teñidas con el *kit Live/Dead BacLight*®. Las mismas fueron utilizadas como controles de la formación de biofilm. Por otro lado, se ubicó al resto de las muestras en una placa de Petri con medio de cultivo estéril al que se adicionaron penicilina y estreptomicina. Las concentraciones finales de los antibióticos fueron, al igual que en el caso de las bacterias planctónicas, de 50 unidades/ml y 50 μ g/ml de penicilina y estreptomicina, respectivamente. Los sustratos se retiraron de la solución conteniendo caldo nutritivo y antibióticos luego de diferentes tiempos de exposición: 1 h, 2 h y 24 h. Se repitió el procedimiento de secado y coloración de las muestras y se evaluó el desarrollo del biofilm sobre las diferentes superficies en presencia de antibióticos.

El efecto de diversos biocidas sobre el desarrollo de un biofilm bacteriano se ha estudiado con muchos y variados métodos, como por ejemplo mediante la remoción de la capa de biofilm de la superficie para luego determinar el número de células viables mediante el conteo de unidades formadoras de colonias. Este método tiene varios

inconvenientes, entre los que se puede mencionar: la incompleta remoción de bacterias de la superficie, la falta de disgregación de algunos agregados de células que conducen al menor número de unidades formadoras de colonias, la ruptura de algunos microorganismos al someterlos a ultrasonido para su separación y la posibilidad de que existan células vivas pero no viables que no se detectarían en los conteos de colonias. Estos inconvenientes traerían como consecuencia inexactitud en el proceso de conteo de las células. Para evitar estos inconvenientes, en este trabajo se realizó la determinación de bacterias vivas sin la necesidad remover el biofilm formado sobre la superficie. La utilización de la mezcla de colorantes (ioduro de propidio y Syto-9 del *kit Live/Dead BacLight*®) permite la detección por epifluorescencia de las células vivas y muertas dentro del biofilm intacto. Este tipo de ensayo ha sido utilizado exitosamente en varios trabajos para evaluar el efecto de agentes antimicrobianos sobre una gran variedad de microorganismos (54-56).

Primeramente se realizó el análisis del biofilm sobre aquellas superficies que no fueron expuestas a antibióticos (biofilm control). Esto permitió conocer el estado inicial de la formación de biofilms sobre las diferentes superficies.

En la Figura 9.4 se pueden observar imágenes de epifluorescencia tomadas con un microscopio óptico. La imagen de la Figura 9.4a muestra una superficie de Au-NSa mucho más cubierta de bacterias y con una densidad de células significativamente mayor que la correspondiente a la superficie de Au-MS1 (Figura 9.4b).

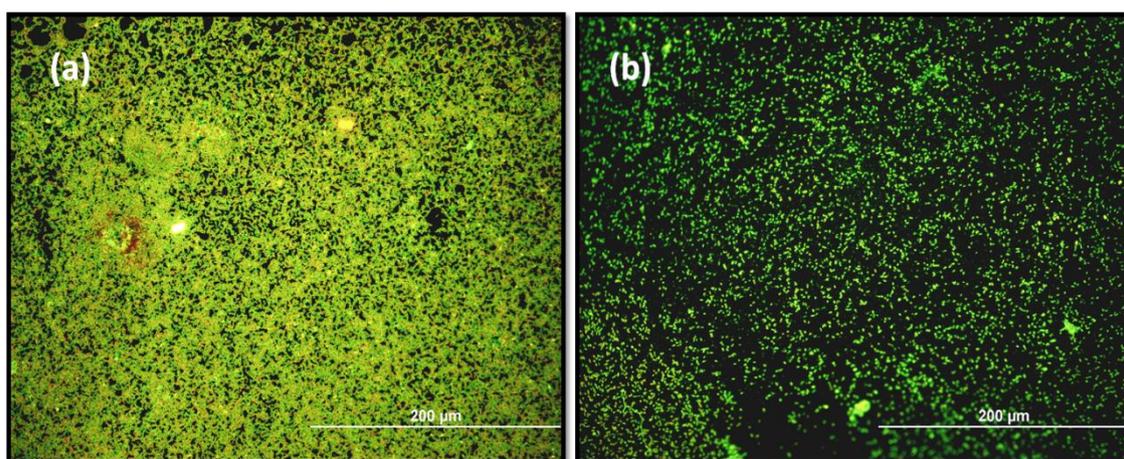


Figura 9.4. Imágenes de epifluorescencia de biofilms formados inicialmente sin la presencia de antibióticos (muestras control). (a) Bacterias adheridas a sustrato de Au-NSa. (b) Bacterias adheridas a sustrato de Au-MS1.

Tal como se describió anteriormente, la formación de agregados bidimensionales de bacterias sobre una superficie constituye una etapa fundamental durante el proceso de desarrollo de un biofilm. Sobre la superficie nanoestructurada, sin patrón topográfico

ordenado, las células pueden agruparse formando agregados ordenados y organizados y fundamentalmente permitiendo el contacto lateral entre ellas hasta formar una capa bidimensional de bacterias. Por el contrario, sobre la superficie microestructurada (MS1) no fue evidente la formación, en los estadios iniciales, de una capa bidimensional densa y poblada de bacterias en contacto entre sí. La Figura 9.5 corresponde a imágenes AFM en modo contacto de las primeras etapas de adhesión bacteriana (período de exposición: 1h) sobre las dos superficies de Au con diferente topografía en donde nuevamente pueden observarse claramente las diferencias en el número de bacterias sésiles durante estas primeras etapas en ambos sustratos.

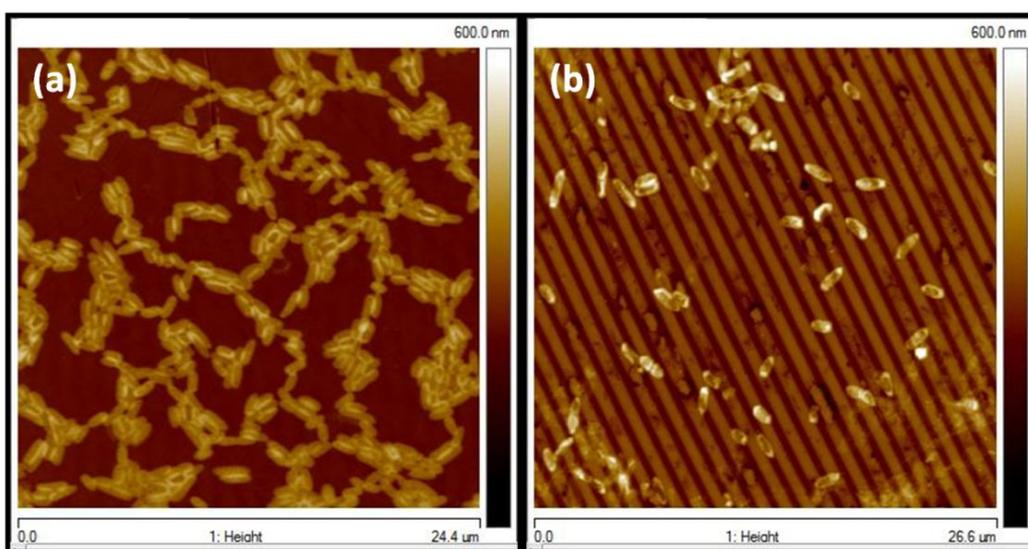


Figura 9.5. Imágenes de AFM en modo contacto ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$). (a) *P. fluorescens* sobre Au-NSa. (b) *P. fluorescens* sobre Au-MS1, formados inicialmente sin la presencia de antibióticos (muestras control).

Mediante el empleo del programa de análisis de imágenes IMAGE J y las imágenes de microscopía óptica de epifluorescencia se calculó el porcentaje de área del sustrato cubierta por bacterias a través de la cuantificación de la fluorescencia sobre las muestras. Se realizaron medidas sobre 10 áreas diferentes. El porcentaje de área cubierto por bacterias sobre la muestra de Au-NSa fue $38,01 \pm 7,30 \%$, mientras que el correspondiente a la superficie de Au-MS1 fue $10,03 \pm 6,20 \%$ (Tabla 9.1).

Tabla 9.1. Porcentaje de área cubierta con bacterias antes del tratamiento con antibióticos

% Área cubierta por <i>P. fluorescens</i>	
Au-NSa	38,01 ± 7,30
Au-MS1	10,03 ± 6,20

Luego del análisis de los biofilms formados sobre las diferentes superficies en un medio nutritivo sin la presencia de antibióticos, se procedió a evaluar el desarrollo del biofilm sobre los distintos sustratos en un medio nutritivo con 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina.

La evaluación del porcentaje de bacterias viables sobre los diferentes sustratos también se realizó utilizando el kit *Live/Dead BacLight*®. En la Figura 9.6 se pueden observar imágenes de epifluorescencia de bacterias adheridas a los sustratos de Au NSa (Figuras 9.6a y 9.6b) y Au MS1 (Figuras 9.6c y 9.6d) luego de estar en contacto durante 1 h con el medio nutritivo suplementado con antibióticos. Debe tenerse en cuenta que la comparación de los resultados porcentuales del área fluorescente obtenidos a partir de las experiencias con bacterias planctónicas y sésiles no es directa, ya que las primeras corresponden a una alícuota de medio de cultivo líquido, mientras que las sésiles corresponden a las adheridas a la superficie metálica.

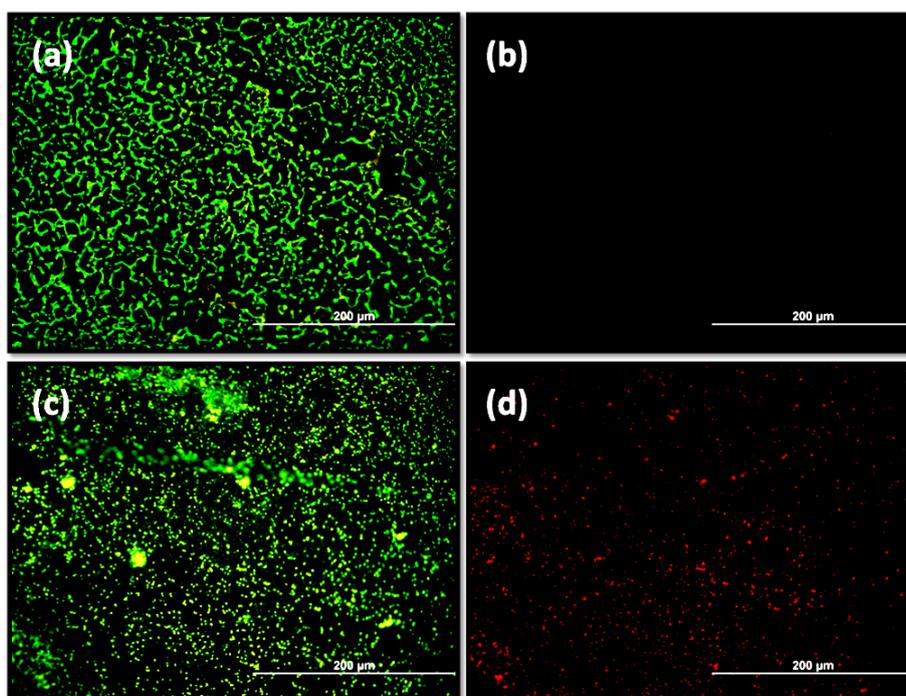


Figura 9.6. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa ((a) y (b)) y sobre sustratos de Au-MS1 ((c) y (d)) después de 1 h de tratamiento con los antibióticos. En las imágenes (a) y (c) puede observarse el total de las bacterias (vivas + muertas) mientras que en las imágenes (b) y (d) sólo se observan las bacterias muertas (rojas).

Las imágenes (a) y (c) de la Figura 9.6 fueron tomadas utilizando el filtro U-MWG2 que permite visualizar el total de los microorganismos adheridos a la superficie del metal. Mientras que las imágenes (b) y (d) corresponden al filtro U-MWB2 que permite observar únicamente la fluorescencia de las células muertas (fluorescencia roja). Puede notarse que, la cantidad de células muertas fue mayor en el caso del sustrato Au-MS1 que en el caso de Au-NSa, a pesar de que la cantidad de bacterias totales adheridas al sustrato nanoestructurado es mayor.

El mismo tipo de análisis se llevó a cabo para las muestras que fueron retiradas 2 h después de haber estado en contacto con los antibióticos. La Figura 9.7 representa imágenes de microscopía óptica correspondiente a estas muestras, distinguiéndose las células vivas como verdes (Figuras 9.7(a) y 9.7(c)) y las muertas como rojas (Figuras 9.7(b) y 9.7(d)). En la misma puede observarse la disminución del área cubierta por microorganismos, indicando, ya sea el desprendimiento de muchos de ellos o la lisis total de las células que impide la acción del colorante.

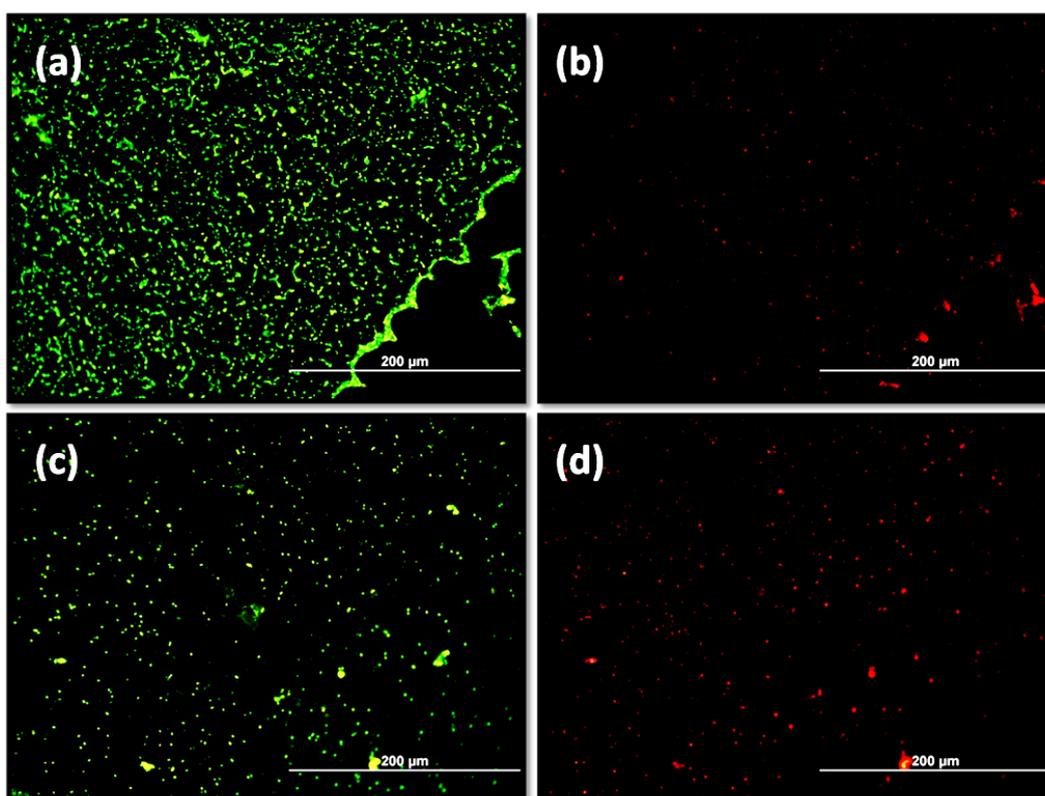


Figura 9.7. Imágenes de epifluorescencia (*Kit Live/Dead BacLight*®) de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a y b) y sobre sustratos de Au-MS1 (c y d) después de 2 h de tratamiento con los antibióticos. Las imágenes a y c permiten visualizar el total de las bacterias (vivas más muertas) mientras que las imágenes b y d corresponden a las bacterias muertas (rojas).

Sobre el sustrato Au-MS1, luego de 2 h de exposición al antibiótico, hay un gran porcentaje de células muertas (Figura 9.7d). Con respecto a la superficie de Au-NSa, recién a partir de las 2 h de inmersión en un medio nutritivo con antibióticos, comienza a ser notoria la presencia de algunas células muertas (Figura 9.7b) dando cuenta de la dificultad de acción del antibiótico sobre los biofilms más densos formados sobre estas superficies.

Para evaluar el efecto de un tiempo de exposición del biofilm al medio que contiene antibióticos marcadamente mayor se realizaron ensayos en los que las muestras con biofilms permanecieron durante 24 h en contacto con el medio nutritivo estéril suplementado con los compuestos bactericidas. La Figura 9.8 corresponde a imágenes ópticas de epifluorescencia representativas de dichas muestras.

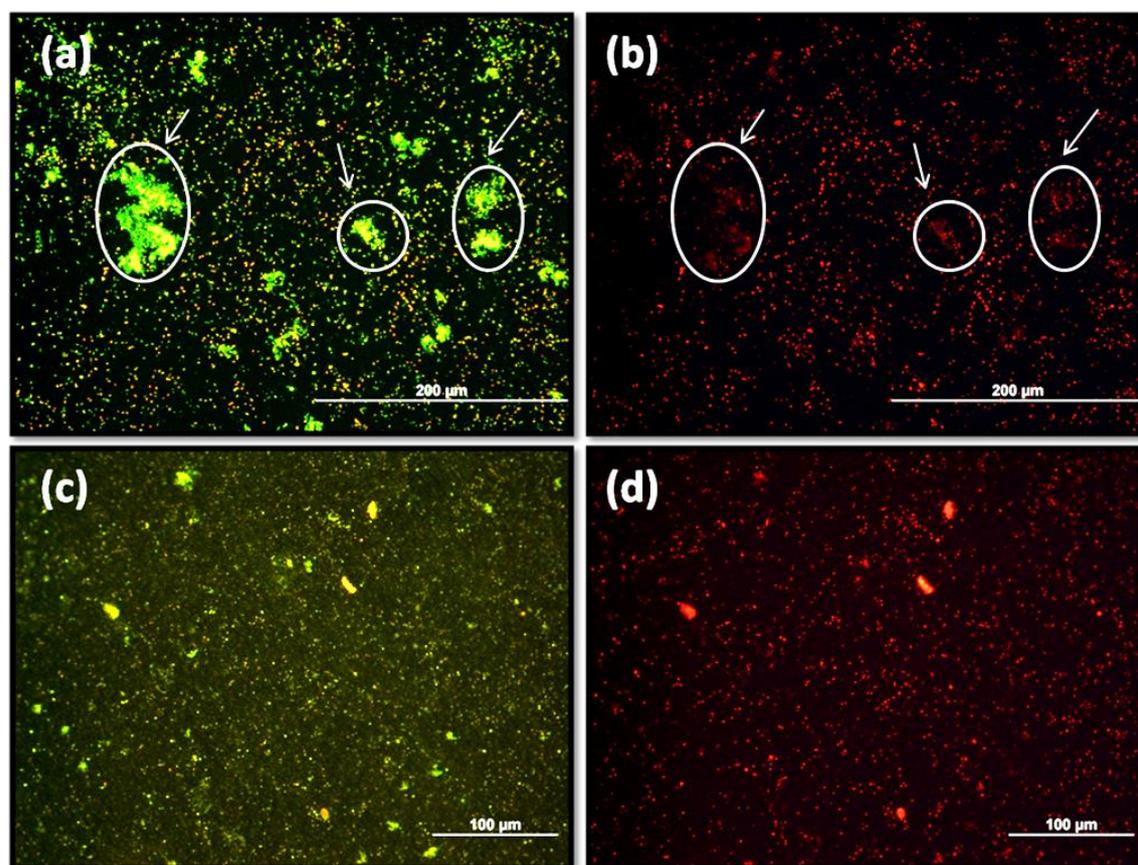


Figura 9.8. Imágenes de epifluorescencia de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a y b) y sobre sustratos de Au-MS1 (c y d) después de 24 h de tratamiento con los antibióticos. Las imágenes a y c fueron tomadas con el filtro U-MWG2 mientras que las imágenes b y d se obtuvieron con el filtro U-MWB2. Los círculos blancos en la figura (a) indican la presencia de microcolonias de *P. fluorescens* formadas, en su mayoría, por bacterias vivas, mientras que los de la figura (b) muestran que en dichas zonas han muerto pocas bacterias de las microcolonias.

En la Figura 9.8 se muestran efectos muy interesantes detectados en relación con la actividad bactericida. Por un lado, se observó que la cantidad de células muertas siguió

siendo mayor sobre la superficie de Au-MS1 que sobre el sustrato de Au-NSa. Por lo tanto, las bacterias adheridas al sustrato microestructurado han mostrado mayor sensibilidad a los antibióticos que aquellas células adheridas al sustrato nanoestructurado. Es decir, los sustratos de Au-MS1 no sólo inhiben la adherencia inicial de bacterias sino que también inducen una distribución espacial de microorganismos más abierta que favorece la acción bactericida del antibiótico.

Por otra parte, también puede advertirse la formación de varias microcolonias de *P. fluorescens* sobre la superficie NSa (círculos blancos en la Figura 9.8a). Las bacterias que forman parte de dichas microcolonias muestran una intensa fluorescencia verde y muy débil fluorescencia roja, sugiriendo que las mismas son más resistentes a los efectos de la penicilina y la estreptomicina. Cabe destacar que la aparición de este tipo de cúmulos o microcolonias bacterianas sobre la superficie de Au microestructurada es mucho menos frecuente, estando las bacterias mayoritariamente aisladas, y siendo por lo tanto más sensibles a los antibióticos.

Con el objetivo de cuantificar los resultados obtenidos en los ensayos presentados se ha realizado el análisis estadístico de los datos correspondientes a las áreas fluorescentes de todas las muestras. Para cada una de ellas se analizaron 10 imágenes, correspondientes a 10 regiones tomadas al azar. El mismo procedimiento se realizó por triplicado. La significación estadística de los resultados fue evaluada a través del test t-de Student con una probabilidad del 95%.

La cuantificación del total de bacterias adheridas a los diferentes sustratos (Au-NSa y Au-MS1) se llevó a cabo en las muestras sin tratamiento con antibióticos (Figura 9.9a) y en aquellas que estuvieron expuestas al tratamiento con antibióticos (Figura 9.9b). Este cálculo se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes IMAGE J, teniendo en cuenta el área ocupada por las bacterias (áreas fluorescentes) en las imágenes de epifluorescencia (Figura 9.9).

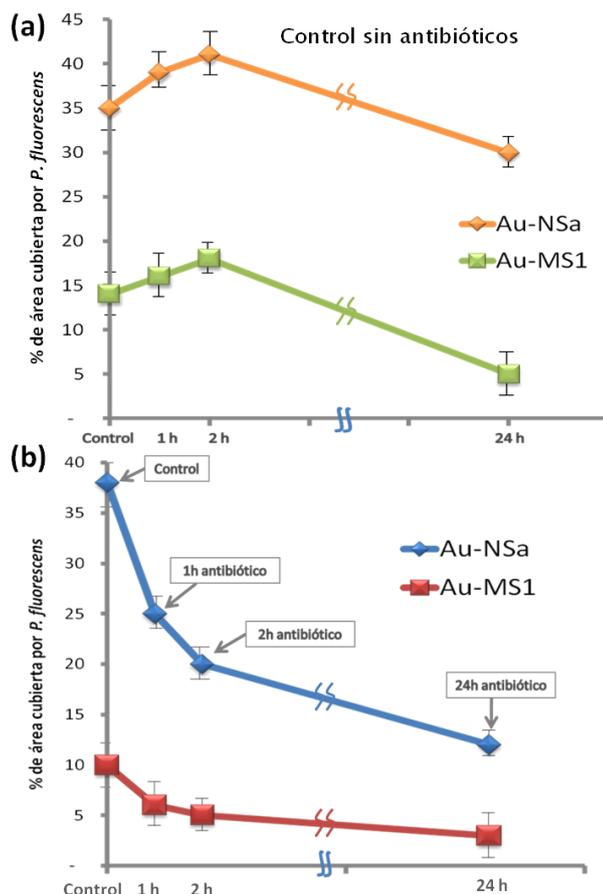


Figura 9.9. (a) Gráfico representando % de área de los sustratos Au-NSa y Au-MS1 cubierto por bacterias para muestras sin exposición a compuestos antibióticos. **(b)** Gráfico representando % de área de los sustratos Au-NSa y Au-MS1 cubierto por bacterias para la muestra inicial sin antibióticos (control), y para las muestras expuestas a antibióticos durante 1 h, 2 h y 24 h.

Se puede observar (Figura 9.9a) que durante las primeras horas, el área del sustrato cubierto por microorganismos aumenta, pero decrece a tiempos más prolongados. Sin embargo, en el caso de los sustratos expuestos a antibióticos (Fig 9.9b), el área cubierta disminuye con el tiempo de exposición durante todo el período evaluado. La Figura 9.9b, muestra que antes de la exposición al antibiótico (tiempo=0) el porcentaje de área cubierta relacionada con las bacterias adheridas al sustrato Au-NSa es mucho mayor (38 %) que para el sustrato Au-MS1 (10 %). Luego de 1 h de contacto con los antibióticos, el área ocupada por bacterias sobre el sustrato Au-NSa disminuye hasta el 25%. Esta disminución puede deberse a diferentes factores: desprendimiento de microorganismos inducido por la ausencia de células planctónicas en el medio, lisis total de las células que impediría la combinación del colorante con el ADN (que ya no se encuentra dentro de la célula) o la agrupación de células en microcolonias. Para formar dichas microcolonias los microorganismos se desplazan sobre la superficie y se apilan para formar colonias 3D (tal

como pudo observarse en la muestras después de 24 h) y por lo tanto el área ocupada por las bacterias sería menor. Cabe destacar que el porcentaje de bacterias disminuye a tiempos más prolongados (24 h), aún en ausencia de antibióticos, probablemente debido al desprendimiento de bacterias ocasionado por la falta de bacterias planctónicas en el medio líquido, tal como se sugirió anteriormente.

Es interesante notar que, en el caso de las muestras que no estuvieron en contacto con el antibiótico, el área cubierta inicialmente aumenta con el tiempo debido a la duplicación de las mismas, mientras en aquellas expuestas a los biocidas disminuye. Podría concluirse que las bacterias son sensibles a los agentes biocidas y que una parte de las células se desprenden de la superficie, ya que no se detectan ni como vivas, ni como muertas. Por otra parte el menor número de bacterias adheridas (vivas + muertas) a los sustratos Au-MS1 y el mayor aislamiento de las células parecería favorecer la mayor efectividad de los antibióticos en esta superficie. Para comprobar la eficacia del biocida se evaluó el porcentaje de células muertas en cada uno de los casos anteriores. La Figura 9.10 representa el porcentaje de células muertas sobre Au-NSa (barras en color verde) y sobre Au-MS1 (barras en color naranja) para las muestras control (sin antibióticos) y para las muestras expuestas durante 1 h, 2 h y 24 h a penicilina y estreptomycin. Puede observarse que a medida que aumenta el tiempo de exposición a los antibióticos, la cantidad de microorganismos muertos aumenta en cada una de las superficies alcanzando, después de 24 h, un valor de 59% del total de células adheridas en el caso del sustrato de Au-NSa y 82% sobre la superficie de Au-MS1

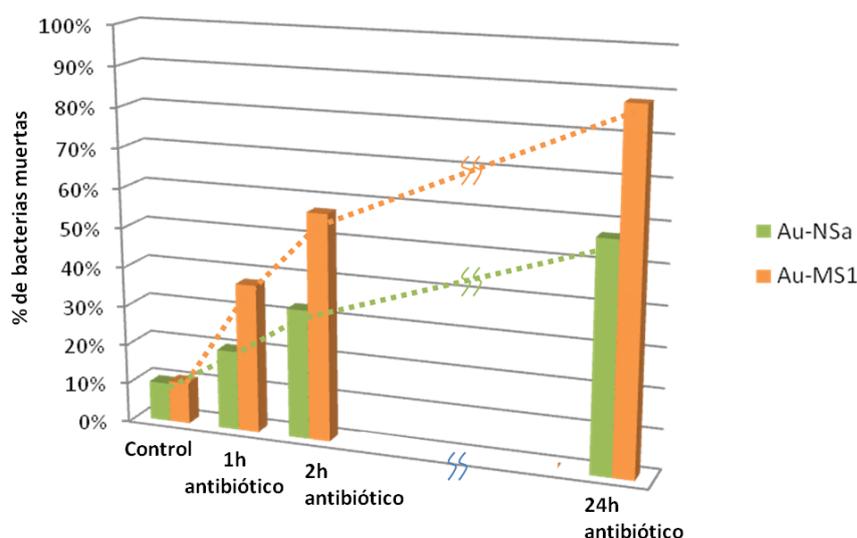


Figura 9.10. Gráfico del % de células muertas respecto del número total de células adheridas sobre sustratos de Au-NSa (barras verdes) y Au-MS1 (barras naranjas) luego de diferentes tiempos de exposición a los antibióticos.

Se puede definir un parámetro de eficacia biocida (EFB) de la mezcla de antibióticos para cada una de las superficies estudiadas como:

$$EFB \% = \left(1 - \frac{N^{\circ} \text{ Bacterias Vivas Adheridas después del Tratamiento}}{N^{\circ} \text{ Bacterias Vivas Adheridas antes del Tratamiento}} \right) \times 100$$

Mediante el empleo de los datos obtenidos anteriormente, se calculó el porcentaje de EFB-NSa y EFB-MS1, es decir, la eficacia del antibiótico sobre bacterias adheridas a Au-NSa y a Au-MS1, respectivamente, después de 24 h de tratamiento.

También fue posible evaluar el porcentaje de bacterias muertas después de cada tratamiento (% BM), respecto de la cantidad de bacterias vivas iniciales. De la Tabla 9.2 puede inferirse que EFB-NSa (54 % ± 11 %) es significativamente menor que el EFB-MS1 (87 % ± 14 %). y que el porcentaje de bacterias muertas respecto de las bacterias vivas iniciales es también inferior (63% vs. 89%, respectivamente).

Tabla. 9.2. Porcentaje de eficacia biocida (%EFB) y porcentaje bacterias muertas/ bacterias vivas adheridas inicialmente (%BM).

Sustrato	%EFB	%BM
Au-NSa	54 ± 11	63 ± 12
Au-MS1	87 ± 14	89 ± 10

Por todo lo analizado anteriormente, se puede concluir que la utilización de superficies microestructuradas permite no sólo disminuir el número de bacterias adheridas y la velocidad de colonización inicial sino también aumentar la eficacia de los antibióticos sobre el biofilm. Por otra parte, se confirma que la estructura multicelular del biofilm le confiere comparativamente una mayor resistencia a los agentes agresivos que la que presentan las células aisladas o en grupos pequeños.

9.7. Efecto de los antibióticos sobre la estructura de la membrana bacteriana.

Con el fin de analizar el efecto de los antibióticos sobre las membranas de las bacterias adheridas a los sustratos de Au-NSa y Au-MS1 se realizaron observaciones mediante AFM.

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de la penicilina consiste en la ruptura de la membrana de la bacteria (44-45), se observó mediante AFM la membrana celular, antes y después del tratamiento con el antibiótico, con el objeto de identificar posibles cambios en la misma. Las imágenes de la Figura 9.11 revelan que las membranas de las bacterias pertenecientes a los agregados formados sobre la superficie de Au-NSa no exhiben diferencias significativas en la estructura de la membrana celular (Figura 9.11a y 9.11b) a pesar de haber estado en contacto con los antibióticos durante 24 h. Sin embargo, las bacterias adheridas al sustrato de Au microestructurado (Au-MS1), más aisladas, presentan membranas altamente rugosas y fragmentadas luego de 24 h de exposición a la mezcla de penicilina y estreptomycin. A la izquierda de las imágenes magnificadas de las bacterias, puede observarse la disposición espacial de las células sobre los dos tipos de sustratos. Sobre el Au-NSa las bacterias forman redes de agregados celulares muy densos (Figura 9.11, izquierda superior) mientras que sobre la superficie de Au-MS1 las células se encuentran aisladas.

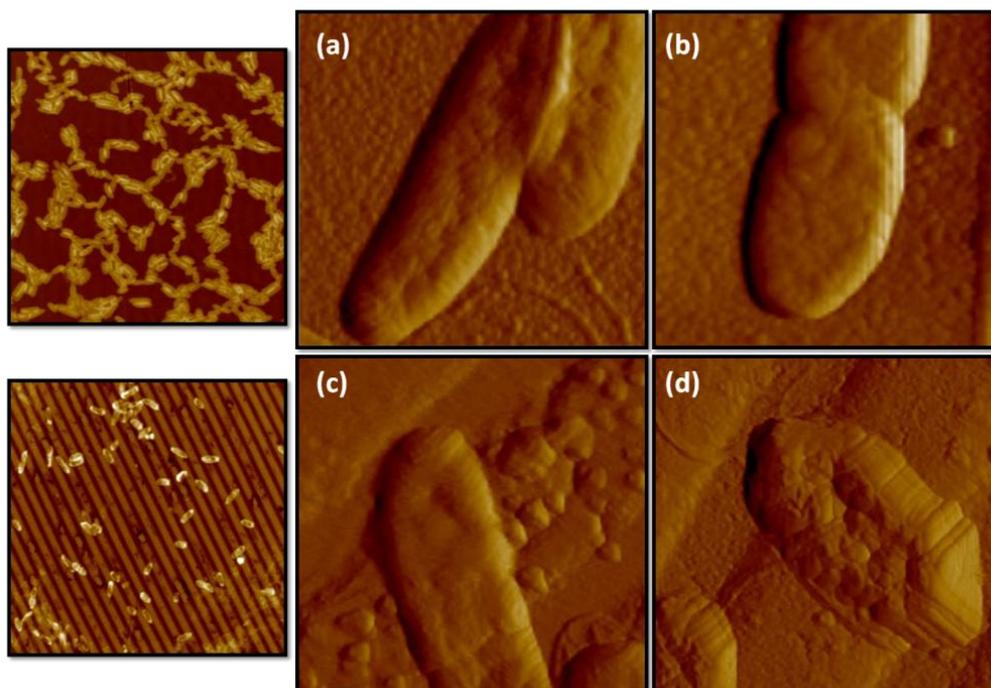


Figura 9.11. Imágenes de AFM en modo contacto ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$, imágenes de deflexión) de *P. fluorescens* sobre diferentes sustratos con y sin antibióticos. (a) Au-NSa después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. (b) Au-NSa después de 24 h con antibióticos. (c) Au-MS1 después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. (d) Au-MS1 después de 24 h de crecimiento con antibióticos. Las imágenes AFM que se encuentran a la izquierda corresponden a *P. fluorescens* sobre Au-NSa (arriba) y Au-MS1 (abajo) respectivamente, indicando la diferente organización espacial microbiana.

Se evaluó la rugosidad (RMS) de la pared de las bacterias adheridas a los diferentes sustratos en distintas áreas de las células luego de la exposición al medio de cultivo sin y con antibióticos tal como se describió en el Capítulo 2. En la Tabla 9.3 se encuentran los datos de las rugosidades de las membranas celulares de *P. fluorescens*. Se puede observar que las membranas de las células adheridas al sustrato de Au-MS1 tienen más altos valores de rugosidad (Au-NSa= $7,19 \pm 0,67$ y Au-MS1= $18,97 \pm 1,76$) y se encuentran altamente fragmentadas, indicando ruptura parcial o total de la membrana bacteriana.

TABLA 9.3. Rugosidad de la membrana de las bacterias *P. fluorescens* adheridas a superficies Au-NSa y Au-MS1 antes y después del tratamiento con antibióticos.

Sustrato	Rugosidad de la membrana de <i>P. fluorescens</i> (nm)
Au-NSa sin antibiótico	$7,19 \pm 0,67$
Au-NSa con antibiótico	$7,35 \pm 2,43$
Au-MS1 sin antibiótico	$9,41 \pm 1,37$
Au-MS1 con antibiótico	$18,97 \pm 1,76$

Las evaluaciones realizadas permiten inferir que la actividad de los antibióticos afecta más a las membranas de las bacterias aisladas, adheridas a los sustratos Au-MS1, que a las de las bacterias que forman parte de grupos sobre los sustratos Au-NSa.

9.8. Efecto de los antibióticos sobre la formación de microcolonias.

En esta sección se estudiará el efecto de la presencia de antibióticos luego de tiempos de exposición de 24 h, que implican una redistribución de las bacterias dando lugar a la formación de microcolonias. Asimismo, se evaluará cómo influye la presencia de antibióticos sobre el tamaño y la forma de los agregados microbianos y de las bacterias.

En la Figura 9.12 se muestran imágenes de microscopía óptica (técnica de tinción con naranja de acridina) de las microcolonias formadas sobre los diferentes sustratos después de 24 h de exposición al medio de cultivo sin antibiótico sobre las superficies Au-NSa (Figura 9.12a) y Au-MS1 (Figuras 9.12b). Las tres imágenes que se encuentran a la derecha de las figuras a y b corresponden a zonas magnificadas de las mismas: (1) Centro de la microcolonia; (2) Borde de la microcolonia; (3) Zona alejada de la microcolonia. Las mismas muestran menos densidad de bacterias a medida que la distancia al centro de la colonia es mayor.

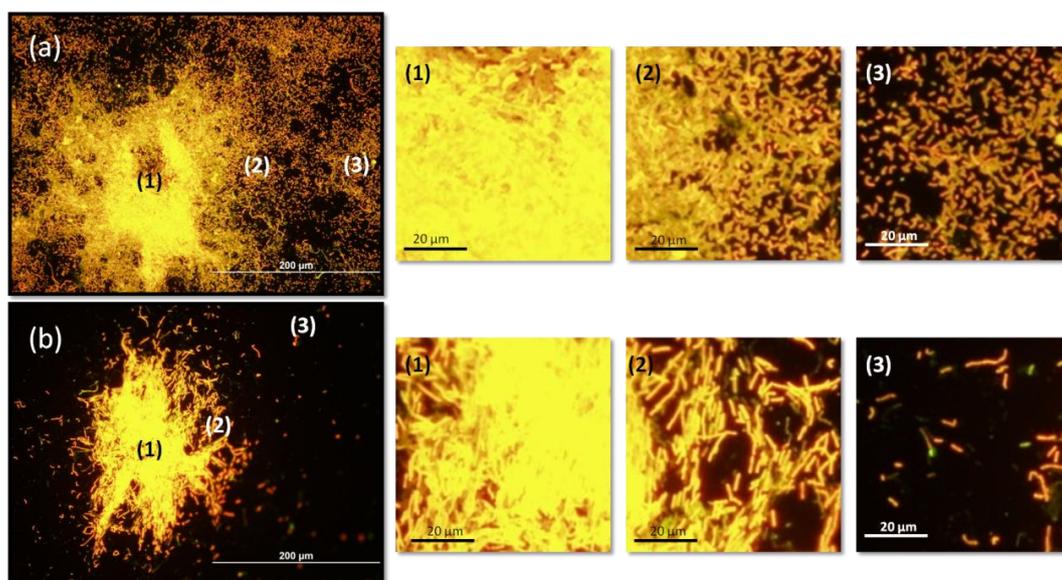


Figura 9.12. Imágenes de epifluorescencia (naranja de acridina) de *P. fluorescens* sobre sustratos de Au-NSa (a) y sobre sustratos de Au-MS1 (b) después de 24 h de crecimiento sin antibióticos. Las imágenes magnificadas corresponden a: (1) Centro de la microcolonia, (2) Borde la microcolonia y (c) Zona alejada de la microcolonia.

Las imágenes de la Figura 9.12 permiten distinguir la diferencia en la estructura de las microcolonias formadas sobre los diferentes sustratos. Sobre el sustrato Au-NSa las bacterias son capaces de formar agregados celulares grandes y densamente poblados. Además se puede observar una gran cantidad de microorganismos alrededor de las estas microcolonias. Por el contrario, las microcolonias que se desarrollan sobre el sustrato microestructurado son más pequeñas y abiertas con pocas bacterias alrededor.

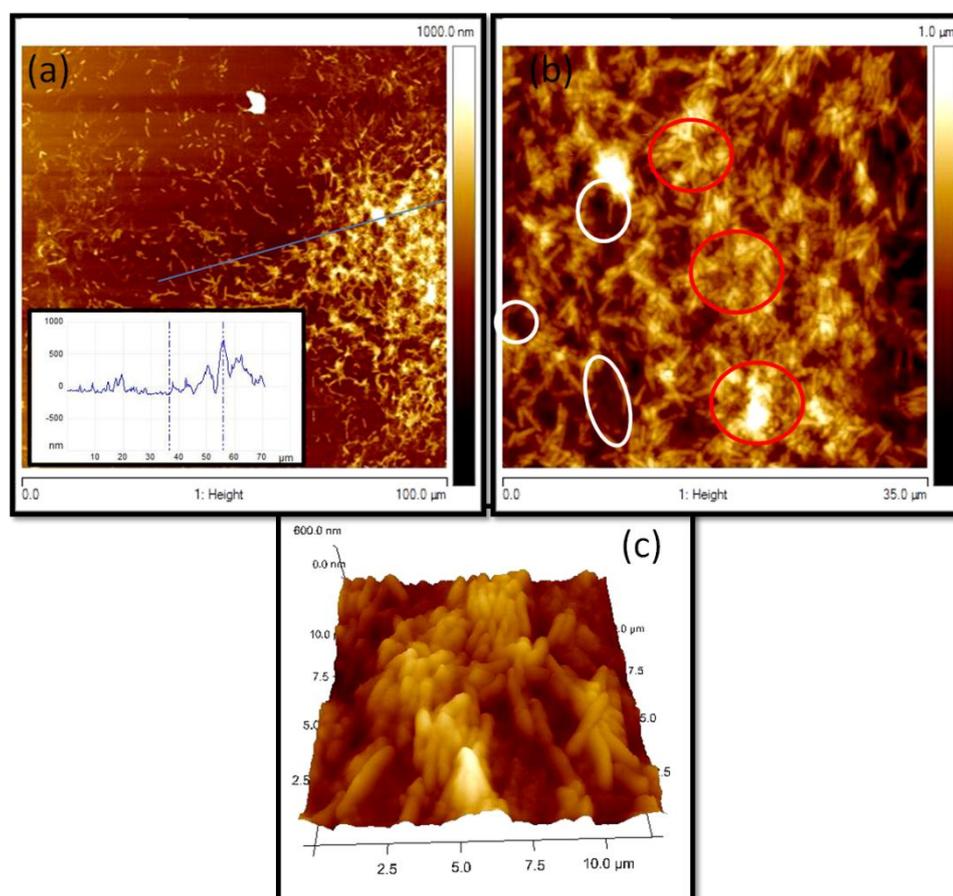


Figura 9.13. (a) Imagen AFM en modo contacto de una microcolonia de *P. fluorescens* sobre Au-NSa (24 h de crecimiento sin antibióticos). Gráfico insertado: sección transversal tomada a lo largo de la línea azul. (b) Imagen AFM de una zona dentro de la microcolonia. Los círculos rojos indican zonas densas de la colonia mientras que los círculos blancos indican huecos o poros dentro del cúmulo. (c) Imagen AFM tridimensional de parte de la microcolonia sobre Au-NSa.

En la Figura 9.13 se muestran imágenes AFM de una microcolonia densa formada sobre un sustrato de Au-NSa. El gráfico insertado muestra la sección transversal del agregado celular. En la imagen AFM correspondiente a la Figura 9.13b se observa que la estructura de la microcolonia consiste en un agregado denso de microorganismos (marcados con círculos rojos) con algunos huecos o canales en su interior (marcados con

círculos blancos). Esta estructura con poros y canales coincide con la descrita anteriormente para biofilms de *Pseudomonas* sobre sustratos lisos (51). La Figura 9.13c es una representación en tres dimensiones de una zona interior de la microcolonia en donde se evidencia claramente cómo se empaquetan las células en este tipo de cúmulo.

La imagen AFM de la Figura 9.14 es de mayor magnificación y corresponde también al sustrato Au-NSa. El gráfico de la sección transversal (1) corresponde a la zona densa del cúmulo bacteriano, mientras que el corte transversal (2) a un poro o hueco dentro de la microcolonia, con un desnivel negativo.

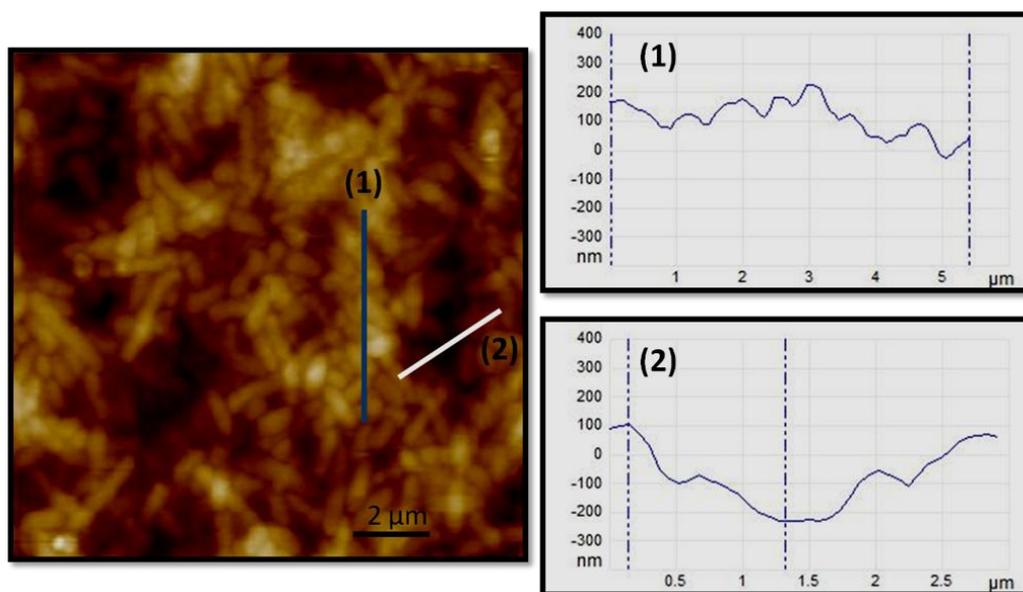


Figura 9.14. Imagen AFM en modo contacto de una zona de una microcolonia formada sobre Au-NSa. (1) Corte transversal realizado sobre una zona celular densa. (2) Corte transversal realizado sobre un poro de la colonia.

En la Figura 9.15 se observan imágenes AFM de una microcolonia de *P. fluorescens* formada sobre una superficie de Au-MS1. La estructura de los cúmulos microbianos formados sobre este sustrato difiere significativamente de aquéllos que se desarrollan sobre un sustrato de Au-NSa (Figura 9.13 y 9.14). En la Figura 9.15a puede evidenciarse que la estructura de la colonia es abierta, poco densa y ramificada.

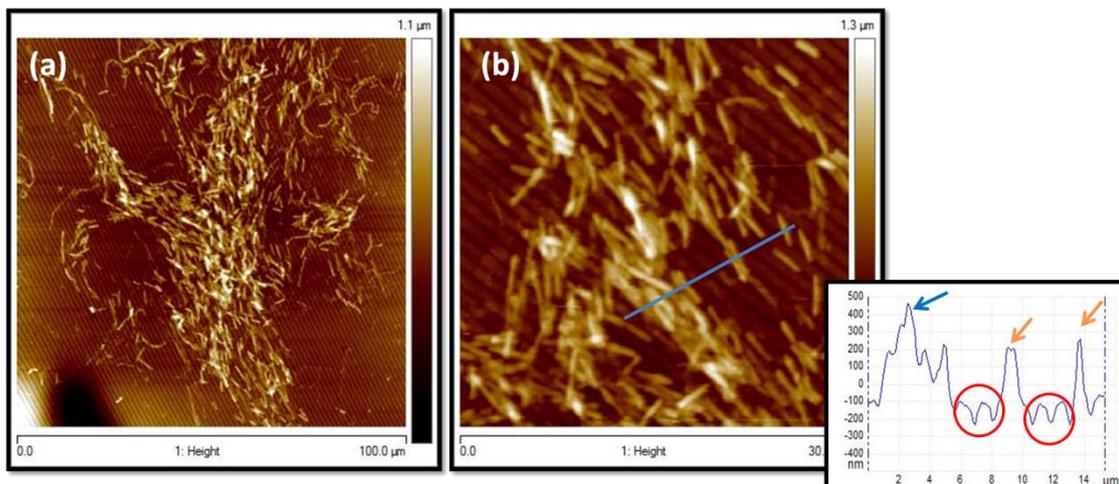


Figura 9.15. (a) Imagen AFM de una microcolonia formada sobre un sustrato de Au-MS1. (b) Imagen AFM de una zona de la microcolonia formada sobre Au-MS1. El corte transversal muestra la altura de la microcolonia (flecha azul), la altura de bacterias individuales (flechas naranjas) y zonas en donde es posible observar la presencia del sustrato microestructurado (círculos rojos).

En el gráfico del corte transversal correspondiente a la Figura 9.15b, se puede también verificar la baja densidad de bacterias en las colonias formadas sobre este sustrato. Este tipo de microcolonia, debido a su estructura más abierta, ha demostrado ser más sensible frente a la acción de antibióticos. El análisis de las microcolonias desarrolladas sobre los diferentes sustratos expuestos durante 24 h a un medio nutritivo suplementado con la mezcla de penicilina y estreptomicina se muestran en las Figuras 9.16, 9.17 y 9.18.

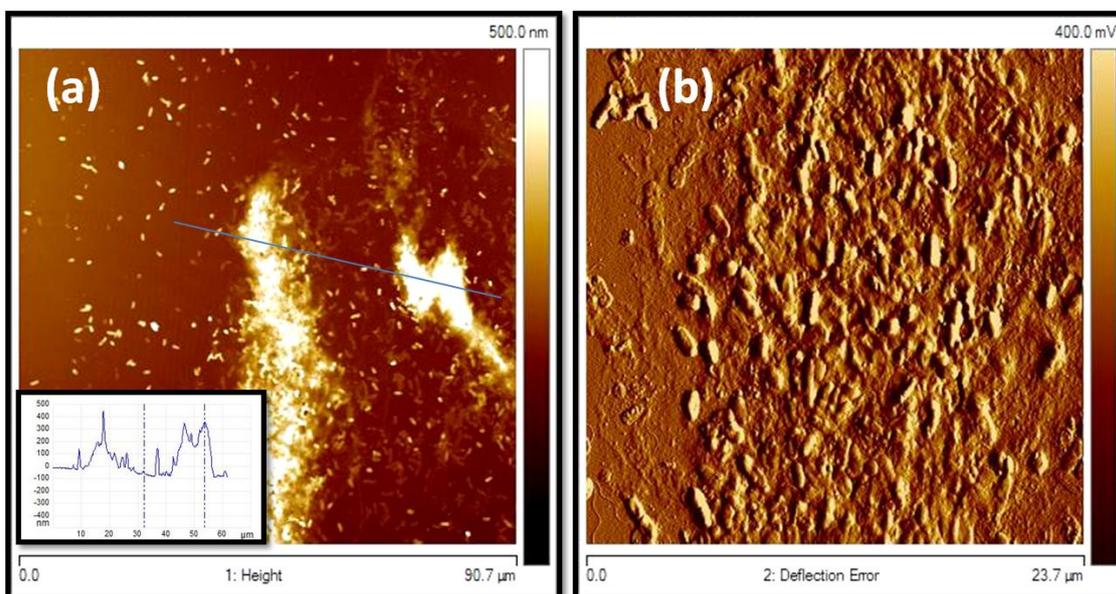


Figura 9.16. Imágenes AFM en modo contacto de microcolonias formadas sobre un sustrato de Au-NSa después de 24 h de tratamiento con la mezcla de antibióticos. (a) Imagen topográfica. El gráfico del recuadro blanco muestra la sección transversal tomada a lo largo de la línea azul. (b) Imagen de deflexión.

En la Figura 9.16 se observan imágenes AFM de algunas microcolonias formadas sobre un sustrato de Au-NSa. Estas microcolonias están densamente pobladas pero son más pequeñas que las correspondientes a las muestras sin antibióticos. Mediante el análisis de la rugosidad en los cortes transversales realizados sobre la imagen, pudieron obtenerse las alturas características más importantes. En el gráfico insertado en la Figura 9.16 se muestra la sección transversal del cúmulo de células. Las alturas de estos agregados son inferiores a los correspondientes de las colonias sin tratamiento de antibióticos (comparar las Figuras 9.13a y 9.16a).

Cabe mencionar, además, que se observó la presencia de mayor cantidad de material polimérico exudado por los microorganismos (Figura 9.17) luego del tratamiento con antibióticos. Asimismo pudo notarse que hubo una significativa cantidad de células que se desprendieron de la superficie dejando huellas que indican sus posiciones anteriores al desprendimiento o bien restos de sus membranas (círculos verdes, Figura 9.17).

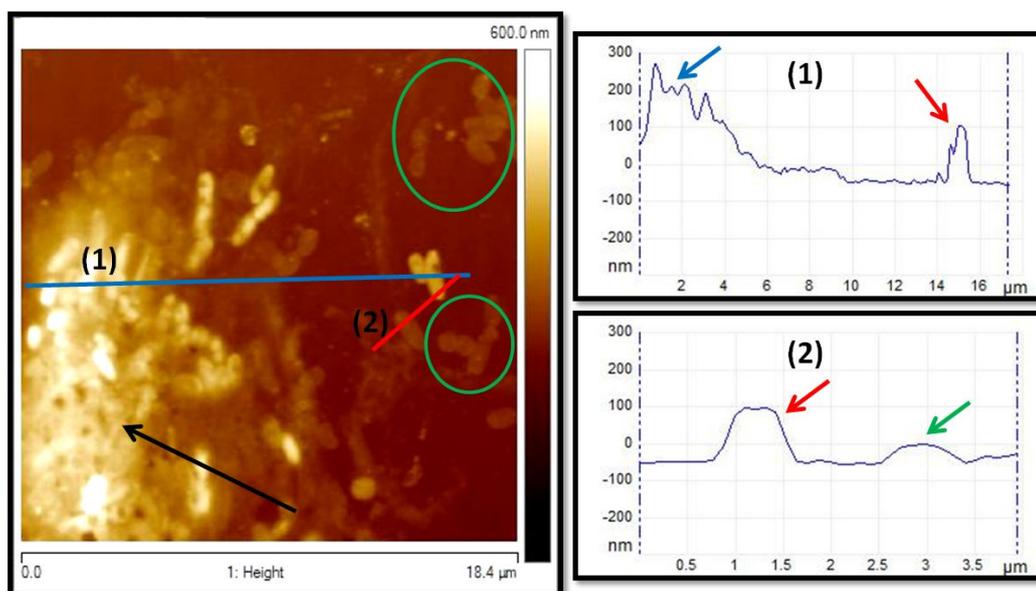


Figura 9.17. Imagen AFM de una zona de la microcolonia sobre Au-NSa luego de 24 h con antibióticos. La flecha negra indica la presencia de gran cantidad de EPS. Los círculos verdes indican “huellas” de EPS que dejaron células que se desprendieron de la superficie. Los cortes transversales (1) y (2) permiten determinar las alturas del cúmulo bacteriano (flecha azul), las células aisladas (flecha roja) y las “huellas”, probablemente de material polimérico (flecha verde).

Sobre los sustratos de Au-MS1 luego del tratamiento con antibióticos (Figura 9.18) no pudo evidenciarse la presencia de las microcolonias similares a las encontradas sobre la superficie sin tratamiento con antibióticos (Figura 9.12b). Puede concluirse entonces que hubo inhibición de la agregación y desprendimiento de células o colonias debido al tratamiento.

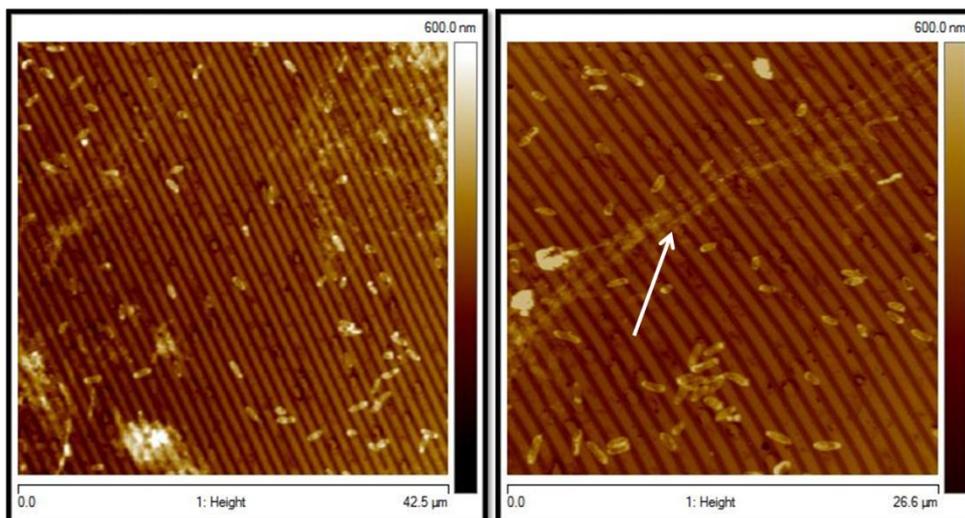


Figura 9.18. Imagen AFM de *P. fluorescens* sobre un sustrato de Au-MS1 luego del tratamiento con antibióticos. La flecha blanca indica EPS sobre la superficie.

9.9. Efecto de los antibióticos sobre el tamaño y la morfología bacteriana.

Con respecto al tamaño y morfología bacterianos, mediciones realizadas sobre bacterias sésiles permitieron detectar una mayor longitud en aquéllas que no habían sido expuestas a antibióticos tanto en los sustratos Au-NSa como en las superficies Au-MS1. (Figura 9.19 y Tabla 9.4).

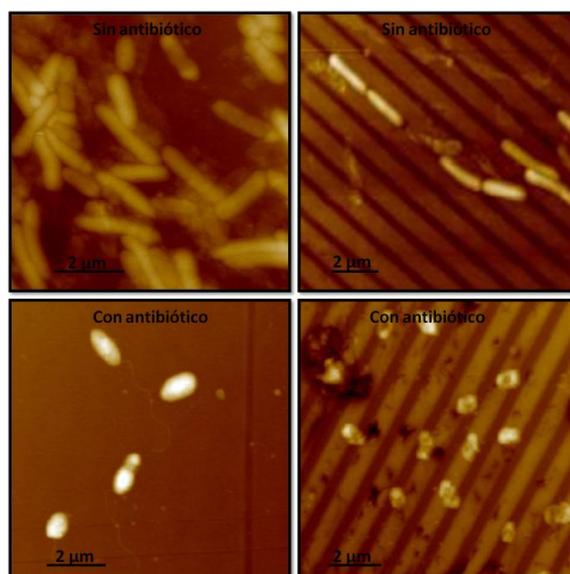


Figura 9.19. Imágenes AFM de bacterias sobre sustratos de Au-NSa (izquierda) y Au-MS1 (derecha) con y sin antibióticos dando cuenta de la diferencia de tamaños después de 24 h de crecimiento.

En la Tabla 9.4, se presentan las longitudes promedio de las bacterias adheridas a los diferentes sustratos con y sin exposición a agentes antimicrobianos. Pudo comprobarse que la longitud de los microorganismos adheridos a las superficies Au-NSa y Au-MS1 se reduce al 62% y 48% respectivamente, luego de la exposición a los agentes bactericidas dando cuenta de una respuesta de defensa del microorganismo ante un ambiente agresivo.

TABLA 9.4. Longitud de las bacterias adheridas sobre los sustratos Au-NSa y Au-MS1 con y sin tratamiento con antibióticos.

Sustrato	Largo de <i>P. fluorescens</i> (µm)
Au-NSa sin antibiótico	2,12 ± 0,68
Au-NSa con antibiótico	1,33 ± 0,25
Au-MS1 sin antibiótico	2,21 ± 0,43
Au-MS1 con antibiótico	1,06 ± 0,15

9.10. Conclusiones del presente capítulo.

Los resultados del presente capítulo permiten llegar a conclusiones interesantes con respecto al efecto de los antibióticos sobre las bacterias adheridas a dos superficies con diferente topografía superficial.

La presencia de antibióticos induce la formación de microcolonias y agregados celulares más densos luego de 24 h de exposición.

Se han observado diferencias en el tamaño y en la morfología de las bacterias adheridas luego de la exposición a los antibióticos como una respuesta de las mismas a la presencia de agentes agresivos. Las células adheridas a los sustratos de Au reducen su longitud hasta un 48 % en el caso de los adheridos a las superficies Au-MS1 y 62 % en el caso de los adheridos al Au-NSa.

Los microorganismos aislados adheridos a las superficies Au-MS1 son más susceptibles a la acción de los antibióticos que los correspondientes a las superficies Au-NSa que forman grupos densos de bacterias. La mayor susceptibilidad de las bacterias adheridas a las superficies Au-MS1 a la mezcla de penicilina y estreptomicina se ve reflejada en el mayor número de microorganismos muertos y en la estructura altamente rugosa y fragmentada de las membranas de dichas bacterias luego del tratamiento.

La estructura menos densa de las microcolonias formadas a tiempos de exposición de 24 h sobre las superficies Au-MS1 parece favorecer la acción de los antibióticos aumentando su eficacia respecto a las más compactas, formadas sobre superficies Au-NSa.

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

En los patrones superficiales tipo MS1 la erradicación de infecciones por biofilms se vería facilitada por la acción más eficaz tanto del antibiótico como de las defensas del huésped.

Referencias Bibliográficas.

1. Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., y Greenberg, E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms, *Nature* 407, 762-764.
2. Passerini, L., Lam, K., Costerton, J. W., y King, E. G. (1992) Biofilms on indwelling vascular catheters, *Crit Care Med* 20, 665-673.
3. Morris, N. S., Stickler, D. J., y McLean, R. J. (1999) The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters, *World J Urol* 17, 345-350.
4. Hyde, J. A., Darouiche, R. O., y Costerton, J. W. (1998) Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article, *J Heart Valve Dis* 7, 316-326.
5. Gristina, A. G., Shibata, Y., Giridhar, G., Kreger, A., y Myrvik, Q. N. (1994) The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection, *Semin Arthroplasty* 5, 160-170.
6. Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., y Flemming, H. C. (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*, *Methods Enzymol* 336, 302-314.
7. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., y Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science* 295, 1487.
8. Marshall, K. C., y Characklis, W. G. (1990) *Biofilms*, Wiley.
9. Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., y Kjelleberg, S. (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J Bacteriol* 185, 4585-4592.
10. Kobayashi, N., Bauer, T. W., Tuohy, M. J., Fujishiro, T., y Procop, G. W. (2007) Brief ultrasonication improves detection of biofilm-formative bacteria around a metal implant, *Clin Orthop Relat Res* 457, 210-213.
11. Darveau, R. P., Tanner, A., y Page, R. C. (1997) The microbial challenge in periodontitis, *Periodontol* 2000 14, 12-32.
12. O'Toole, G., Kaplan, H. B., y Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.

13. Anderl, J. N., Franklin, M. J., y Stewart, P. S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824.
14. de Beer, D., Stoodley, P., y Lewandowski, Z. (1997) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy, *Biotechnol Bioeng* 53, 151-158.
15. Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., y Hoiby, N. (2000) Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antimicrob Chemother* 45, 9-13.
16. Dibdin, G. H., Assinder, S. J., Nichols, W. W., y Lambert, P. A. (1996) Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases, *J Antimicrob Chemother* 38, 757-769.
17. Dunne, W. M., Jr. (1990) Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother* 34, 390-393.
18. Permin, H., Koch, C., Hoiby, N., Christensen, H. O., Moller, A. F., y Moller, S. (1983) Ceftazidime treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection in cystic fibrosis, *J Antimicrob Chemother* 12 Suppl A, 313-323.
19. Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., y Tomasz, A. (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth, *J Gen Microbiol* 132, 1297-1304.
20. Tack, K. J., y Sabath, L. D. (1985) Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin, *Chemotherapy* 31, 204-210.
21. Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease, *Nat Rev Microbiol* 5, 48-56.
22. Dhar, N., y McKinney, J. D. (2007) Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance, *Curr Opin Microbiol* 10, 30-38.
23. Driffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O'Neill, A. J., y Chopra, I. (2008) Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, *J Antimicrob Chemother* 61, 1053-1056.

24. Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Curr Opin Biotechnol* 14, 255-261.
25. Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., Huang, C. T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., y Iglewski, B. H. (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide, *Mol Microbiol* 34, 1082-1093.
26. Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J. S., Sanchez-Amat, A., y Kjelleberg, S. (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria, *J Bacteriol* 190, 5493-5501.
27. Conibear, T. C., Collins, S. L., y Webb, J. S. (2009) Role of mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *PLoS One* 4, e6289.
28. Boles, B. R., y Singh, P. K. (2008) Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12503-12508.
29. Bjarnsholt, T., y Givskov, M. (2007) The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*, *Anal Bioanal Chem* 387, 409-414.
30. Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., y Givskov, M. (1998) N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1, *J Bacteriol* 180, 6384-6388.
31. Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., y Salmond, G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.
32. Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Phipps, R. K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L. D., van Gennip, M., Parsek, M., Hoiby, N., Rasmussen, T. B., y Givskov, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes, *Microbiology* 155, 3500-3508.

33. Jensen, P. O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T. B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., y Hoiby, N. (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 153, 1329-1338.
34. Nemoto, K., Hirota, K., Ono, T., Murakami, K., Nagao, D., y Miyake, Y. (2000) Effect of Varidase (streptokinase) on biofilm formed by *Staphylococcus aureus*, *Chemotherapy* 46, 111-115.
35. Yasuda, H., Ajiki, Y., Koga, T., Kawada, H., y Yokota, T. (1993) Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin, *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1749-1755.
36. Parsek, M. R., y Greenberg, E. P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8789-8793.
37. Smith, A. W. (2005) Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?, *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1539-1550.
38. Pitt, W. G., McBride, M. O., Lunceford, J. K., Roper, R. J., y Sagers, R. D. (1994) Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2577-2582.
39. Gottenbos, B., van der Mei, H. C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P., y Busscher, H. J. (2002) In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber, *Biomaterials* 23, 1417-1423.
40. Ewald, A., Gluckermann, S. K., Thull, R., y Gbureck, U. (2006) Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium, *Biomed Eng Online* 5, 22.
41. Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L., y Evans, S. M. (2003) Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30, 102-106.
42. Nepal, D., Balasubramanian, S., Simonian, A. L., y Davis, V. A. (2008) Strong antimicrobial coatings: single-walled carbon nanotubes armored with biopolymers, *Nano Lett* 8, 1896-1901.

43. de Saravia, S. G. G., de Mele, M. F. L., Videla, H. A., y Edyvean, R. G. J. (1997) Bacterial biofilms on cathodically protected stainless steel, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 11, 1 - 17.
44. Bud, R. (2007) *Penicillin : triumph and tragedy*, Oxford University Press, Oxford.
45. Lorian, V. (2005) *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th ed. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
46. White, D. G. P. D., Alekshun, M. N., McDermott, P. F., y Levy, S. B. (2005) *Frontiers in antimicrobial resistance : a tribute to Stuart B. Levy*, ASM Press ; Oxford : Blackwell [distributor], Washington, D.C.
47. Walsh, C. (2003) *Antibiotics : actions, origins, resistance*, ASM Press; [Oxford : Enfield, distributor], Washington, D.C.
48. Scott, G. M., y Kyi, M. S. (2001) *Handbook of essential antibiotics*, Harwood Academic, Australia ; [Great Britain].
49. Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., y Tulkens, P. M. (1999) Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 43, 727-737.
50. Franklin, T. J., Snow, G. A., y Franklin, T. J. B. o. a. a. (2005) *Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action*, 6th ed. ed., Springer, New York.
51. Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284, 1318-1322.
52. Smith, K., y Hunter, I. S. (2008) Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates, *J Med Microbiol* 57, 966-973.
53. Krsko, P., Kaplan, J. B., y Libera, M. (2009) Spatially controlled bacterial adhesion using surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels, *Acta Biomater* 5, 589-596.
54. Cerca, N., Martins, S., Cerca, F., Jefferson, K. K., Pier, G. B., Oliveira, R., y Azeredo, J. (2005) Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry, *J Antimicrob Chemother* 56, 331-336.
55. Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B. L., y Lopez-Ribot, J. L. (2001) Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2475-2479.

56. Tunney, M. M., Ramage, G., Field, T. R., Moriarty, T. F., y Storey, D. G. (2004) Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1879-1881.

Capítulo 10

Conclusiones Generales

10.1. Conclusiones Generales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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