

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