



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Influencia de la topografía del sustrato en la formación de biofilms bacterianos.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Licenciada María Antonela Colonnella

Director de tesis: Dr. Gastón Paris.

Co-Director de tesis: Dr. Leonardo Lizarraga.

Consejera de Estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta.

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Bionanociencias "Elizabeth Jares Erijman".

Buenos Aires, 26 de marzo de 2020.

Resumen:

Los *biofilms* son comunidades complejas de microorganismos que viven embebidos en una matriz polimérica. Ésta les provee resistencia frente a numerosas condiciones de estrés, les proporciona un ambiente estable y facilita la obtención de nutrientes. Las ventajas emergentes frente a la vida de forma libre, dificultan su eliminación y por ende, representan un problema tanto en la industria como en el área de la salud.

Diversos estudios resaltan a la topografía de la superficie como una propiedad relevante en la adhesión bacteriana. Sin embargo, otros factores físico-químicos como la hidrofobicidad, carga o composición química también afectan la adhesión de las bacterias de manera menos clara, lo que conlleva a resultados experimentales conflictivos y a la dificultad de precisar el efecto de la topografía. El objetivo principal de esta Tesis fue variar sistemáticamente la topografía de la superficie de manera controlada para determinar la influencia de ésta en las distintas etapas de formación de *biofilms*.

Con este fin, se elaboraron superficies micro-nano estructuradas con surcos controlados usando el método de oxidación a través de plasma de elastómeros de polidimetilsiloxano bajo estiramiento uniaxial. Se lograron superficies con topografía sinusoidal con λ en el rango de 0,4-5 μm , las cuales se caracterizaron según el tamaño de las ondas, la dureza y el ángulo de contacto.

Posteriormente, se estudió la adhesión bacteriana sobre estas superficies utilizando *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *Bacillus subtilis* 168 como bacterias modelos de bacterias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente. A tiempos cortos para ambas especies, se observa un menor porcentaje de cubrimiento en los sustratos con ondas de 0,4 μm respecto a las superficies lisas.

Sin embargo, luego de 3 horas aumenta significativamente la adhesión de *P. protegens* a esta superficie a diferencia de lo que ocurre con *B. subtilis*, donde se mantiene el efecto de inhibición respecto a la superficie Lisa Tratada con plasma. También, se estimó la viabilidad celular de las bacterias adheridas mediante una tinción con un kit de fluorescencia. Los resultados de este ensayo sugieren que en los tiempos estudiados, los sustratos con ondas de 0,4 μm podrían comprometer la envoltura celular de *P. protegens* pero no la de *B. subtilis*.

Además, se determinaron las fuerzas de adhesión mediante espectroscopía de fuerza utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM) con el fin de evaluar si las variaciones en el porcentaje de cubrimiento se deben a diferencias en la magnitud de las fuerzas de adhesión bacteria-sustrato. Curiosamente, las fuerzas entre las bacterias y el PDMS No Tratado (hidrofóbico) fueron notablemente más grandes que aquellas que actúan entre el PDMS Liso Tratado con plasma (hidrofílico) o con las superficies estructuradas. Por lo tanto, mayores fuerzas de adhesión bacteria-

sustrato no necesariamente favorecerían la colonización bacteriana siendo la topografía un factor clave en las primeras etapas de desarrollo de *biofilms*.

A su vez, se cultivaron *biofilms* maduros mediante sistemas de crecimiento dinámico. Tras distintos tiempos de crecimiento, se visualizaron los *biofilms* mediante AFM en condiciones fisiológicas. Posteriormente, se comparó el módulo de elasticidad de los *biofilms* desarrollados sobre los diferentes sustratos. Los resultados preliminares muestran un aumento en la rigidez de los *biofilms* formados sobre las superficies estructuradas en comparación con aquellos que crecieron sobre los sustratos lisos.

En conjunto, estos resultados ayudan a comprender cómo la topografía del sustrato influye en los distintos estadios de formación de *biofilms* de dos bacterias modelo.

Title: Influence of surface topography on biofilms formation.

Abstract:

Biofilms are complex microbial communities embedded into an extracellular polymeric substance (EPS). EPS provides resistance against varied stress conditions, mechanical stability and facilitates nutrient uptake. These emerging advantages over planktonic life make *biofilms* difficult to eliminate and therefore, they represent a problem both in industry and health area.

Several studies highlight surface topography as a key factor in bacterial adhesion. However, other physicochemical parameters such as surface hydrophobicity, charge or chemical composition also affect the bacterial attachment in a rather unclear way resulting in conflictive experimental outcomes and making a precise determination of the effect of surface topography difficult. In this context, the main objective of this project was to systematically vary a single parameter - the surface topography – in a strongly controlled way to determine the influence of the topography on bacterial attachment and *biofilm* development.

To this end, micro-nano structured surfaces with controlled wrinkles were made using the plasma oxidation method under uniaxial stretching of polydimethylsiloxane (PDMS). Surfaces with sinusoidal topography with λ in the range of 0.4-5 μm were obtained. Wave size, stiffness (Young's modulus) and contact angle were determined.

Subsequently, bacterial adhesion was studied using *Pseudomonas protegens* Pf-5 and *Bacillus subtilis* 168 as Gram negative and Gram-positive bacteria, respectively. For both species after 1 hour, the coverage in substrates with 0.4 μm waves was significantly lower than in smooth surfaces. However, this effect is reverted after 3 hours for *P. protegens* where the highest amount of cells was measured in surfaces with $\lambda=0.4 \mu\text{m}$. In order to determine if structured surfaces have bactericidal activity, adhered cells were stained with LIVE/DEAD fluorescence kit and studied by wide field microscopy. These results suggest that substrates with 0.4 μm waves could compromise *P. protegens* envelope.

In addition, adhesion forces were determined by force spectroscopy using an atomic force microscope (AFM) in order to assess whether changes between surfaces coverage are due to differences in the magnitude of bacterial-substrate adhesion forces. Interestingly, forces between bacteria and untreated PDMS (hydrophobic) were markedly higher than with smooth plasma treated PDMS (hydrophilic) and structured PDMS surfaces, suggesting that higher adhesion forces not necessarily favor bacteria colonization and that indeed topography play a key role on early steps of *biofilms* formation.

In addition, mature *biofilms* were grown using dynamic growth systems and visualized by AFM under physiological conditions. Afterward, elasticity of *biofilms* developed on smooth and structured

PDMS coupons was compared. Preliminary results showed a stiffer *biofilm* when developed on nano-structured surfaces compared to smooth coupons.

These results contribute to elucidate how substrate topography influences the different stages of *biofilm* formation.

AGRADECIMIENTOS.

A la Educación Pública, que me formó con calidad y calidez desde el nivel inicial.

A las Instituciones públicas que financiaron este proyecto.

A Leo, por ser un excelente director y una gran persona. Gracias por la confianza y por compartir tus conocimientos y tiempo conmigo.

A Gastón, por la formación brindada durante estos años.

A los becarios de CIBION les agradezco por haber formado tan lindo grupo de trabajo. Gracias por escucharme, por ayudarme con algunos ensayos y por la paciencia con que cada uno me explicó sus trabajos. Es un placer trabajar entre tantas risas y bueno, tanta comida.

A los demás trabajadores de CIBION, por generar tan lindo clima de trabajo, por aportar conocimientos y experiencia cuando lo necesité.

A mis compañeros de la Facultad, que dejaron de ser compañeros para convertirse en amigos. Gracias por el aguante, los consejos y contención en momentos de desesperación.

A mis amigas de toda la vida, con ustedes todo es mejor y más fácil.

A mi familia, que siempre me impulsaron a hacer lo que me gusta, festejando cada logro. En particular mamá y papá, sin los cuales no hubiera llegado hasta acá. Gracias por demostrarme su amor, orgullo y confianza a lo largo de toda mi vida. No tengo dudas de que papá estaría orgulloso al verme en este punto.

A Leandro, mi amor, mi amigo y mi colega. Creo que no hay palabras para agradecerte. Junto con Rollo me alegran la vida.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Biofilms</i>	3
2. Etapas de formación	4
3. Impacto de los <i>biofilms</i>	5
4. Factores que afectan el desarrollo	6
4.1. Carga superficial	7
4.2. Hidrofobicidad e hidrofiliidad de la superficie.	7
4.3. Rugosidad y topografía del sustrato.	8
4.4. Dureza del sustrato.	8
4.5. Características de la envoltura celular y presencia de apéndices celulares.	9
4.6. Condiciones de flujo.....	10
5. <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	11
6. <i>Bacillus subtilis</i> 168	11
7. Métodos para el estudio de <i>biofilms</i>	11
7.1. Dispositivos para el crecimiento de <i>biofilms</i>	12
7.2. Cuantificación del <i>biofilm</i> y viabilidad.....	12
8. Superficies antimicrobianas	14
8.1. Liberación de un compuesto antimicrobiano.	15
8.2. Muerte por contacto.....	16
8.3. Superficies antiadhesivas o con muerte por contacto debido a la topografía.	17
8.4. Superficies naturales. Superficies bioinspiradas y biomiméticas.....	17
9. Microscopía de Fuerza Atómica	19
9.1. Fundamentos básicos.....	19
9.2. Modos de operación del AFM.....	20
9.2.1. Modo de contacto.....	21
9.2.2. Modo intermitente.....	21
9.3. Microscopía de fuerza atómica para el estudio de sistemas biológicos.....	22
9.4. Mediciones de fuerza.....	24
9.4.1. Propiedades nanomecánicas.....	25
9.4.2. Espectroscopía de fuerzas.....	26
OBJETIVOS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS	27
HIPÓTESIS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Fabricación de sustratos para evaluar la adhesión bacteriana	31

1.1.	Fabricación de superficies con estructura de ondas controladas.....	31
1.2.	Caracterización de los sustratos mediante AFM.....	35
1.3.	Rigidez del sustrato.....	35
1.4.	Ángulo de contacto – Hidrofobicidad	36
2.	Adhesión bacteriana sobre sustratos de PDMS.	36
2.1.	Bacterias y condiciones de cultivo.....	36
2.2.	Adhesión sobre superficies de PDMS.....	36
2.3.	Preparación de la muestra y visualización mediante AFM.....	37
2.4.	Cuantificación del cubrimiento.....	37
2.5.	Análisis estadístico.....	37
2.6.	Ensayo de viabilidad.....	38
2.7.	Espectroscopía de fuerzas: fuerzas de adhesión bacteria-sustrato.....	39
2.7.1.	Cuantificación de las fuerzas de interacción bacteria-sustrato.....	40
2.7.2.	Visualización del cantiléver mediante SEM.....	41
2.7.3.	Análisis estadístico.....	41
3.	Estudio nanomecánico de <i>biofilms</i>.	41
3.1.	Bacterias y condiciones de crecimiento.....	41
3.2.	Celda de flujo.....	41
3.3.	Crecimiento de <i>P. protegens</i> y <i>B. subtilis</i> en el sistema de cultivo dinámico.....	42
3.4.	Tinción con cristal violeta.....	43
3.5.	Visualización y Estudio de las propiedades mecánicas mediante AFM en condiciones fisiológicas.....	43
3.5.1.	Análisis de las curvas de fuerza.	44
3.5.2.	Análisis estadístico.	44
	RESULTADOS	45
	Capítulo I: Fabricación de sustratos para el estudio de formación de <i>biofilms</i>.	47
	RESULTADOS	49
	DISCUSIÓN	57
	CONCLUSIONES	58
	CAPÍTULO II: Influencia de la topografía en la adhesión bacteriana.	59
	RESULTADOS	61
1.	Cubrimiento bacteriano sobre los cupones de PDMS.....	61
1.1.	Adhesión de <i>P. protegens</i> Pf-5.....	61
1.2.	Adhesión de <i>B. subtilis</i> 168.....	65
2.	Ensayo de viabilidad.....	68
2.1.	Recuento de UFC en placa.....	68

2.2. Ensayo de fluorescencia: kit LIVE/DEAD™ BacLight™	69
3. Espectroscopía de fuerzas: fuerzas de adhesión bacteria-sustrato.....	73
DISCUSIÓN.	78
CAPÍTULO III: Estudio nanomecánico de <i>biofilms</i>.	85
RESULTADOS.	87
DISCUSIÓN.	93
DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS A FUTURO.	97
BIBLIOGRAFÍA.	99
APÉNDICE	117

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

1. *Biofilms*.

Los *biofilms* se definen como agregados de microorganismos los cuales se encuentran embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS de su sigla en inglés, *Extracellular polymeric Substances*). El término agregado da cuenta de aquellos casos en los que el *biofilm* está formado por múltiples capas de células y sólo algunas entran en contacto directo con la superficie o bien, los *biofilms* en forma de flóculos, donde sólo existen interacciones célula-célula. La mayoría de los *biofilms* descritos en la literatura están formados por una o múltiples especies de bacterias; sin embargo, otros microorganismos como protozoos, algas y hongos pueden desarrollar *biofilms* [1].

Desde las interacciones célula-célula a las propiedades de la matriz, vuelven a los *biofilms* un sistema complejo con propiedades emergentes respecto a la vida en forma libre. La matriz extracelular está compuesta principalmente por agua (más del 97%) y, embebidos en ella, se hallan los componentes estructurales y funcionales solubles como polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eDNA, de su sigla en inglés *Extracellular DNA*), e insolubles como flagelos, pili, amiloides, fimbriae y celulosa [2]. A pesar de que la producción de la matriz extracelular requiere un gran gasto energético, la matriz extracelular juega un rol fundamental en la aparición de algunas propiedades emergentes que resultan en grandes ventajas para la subsistencia de los microorganismos. A continuación se describen algunas de ellas:

Protección frente a estrés ambiental: Como la matriz extracelular que recubre a las células está compuesta por polímeros hidratados, éstos actúan como un hidrogel que las protege frente a la deshidratación, cambios bruscos de pH, cambios osmóticos y radiación UV. A su vez, la estructura organizada pero no fija, permite la remodelación del *biofilm* frente a fuerzas hidrodinámicas [3-6]

Aumento de la tasa de intercambio de genes: La alta densidad de células en conjunto con la cercanía provista por la matriz, favorece la transferencia horizontal de genes mediante el proceso de conjugación. Entre algunos de los genes que se intercambian se encuentran los de resistencia a antibióticos. De hecho, la matriz actúa como reservorio de genes en la forma de eDNA [7, 8].

Heterogeneidad e Interacciones sociales: La mayoría de los *biofilms* están formados por más de una especie. La proximidad entre células que facilita la matriz permite una cooperación (en algunos casos simbiosis) entre especies en donde los productos secretados, como por ejemplo enzimas,

metabolitos o material genético, pueden intercambiarse dentro de la comunidad. Incluso en *biofilms* de una única especie, la heterogeneidad metabólica ocurre con la variación de la expresión genética de un grupo de células, permitiendo el crecimiento del *biofilm*. Por otro lado, los diferentes metabolismos de las especies/fenotipos presentes pueden evitar la acumulación de elementos tóxicos en el microentorno [9-12].

Disponibilidad de nutrientes: La matriz es capaz de actuar como si fuera una esponja, capturando nutrientes, gases y una gran gama de moléculas que están presentes en el medio acuoso o en el sustrato sólido sobre el que está desarrollado el *biofilm*. Además, existen canales que permiten la circulación de estas moléculas y la expulsión de desechos [13].

2. Etapas de formación.

La formación de *biofilms* se da en cuatro etapas [14, 15]:

En una primera etapa, las células que se encuentran de forma libre o planctónicas se **adhieren** a una superficie blanco utilizando diversas estructuras como flagelos, pilli, fimbriae, proteínas de la membrana externa y extracelulares y lipopolisacáridos (LPS). En medios líquidos, este proceso se inicia con la adhesión de compuestos orgánicos a la superficie, comúnmente llamada capa de acondicionamiento [16]. Esta primera etapa se ve afectada por factores ambientales como la disponibilidad nutricional, temperatura, pH, fuerzas hidrodinámicas y propiedades del sustrato.

A continuación, las interacciones intracelulares mediadas por las estructuras involucradas en la adhesión irreversible genera la formación de **microcolonias**. La tercera etapa es la **maduración** del *biofilm* que se produce cuando las células que forman las microcolonias secretan una matriz compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La matriz recubre a todas las células y genera la estructura tridimensional del *biofilm*, la cual incluye canales que permiten la circulación de agua y nutrientes. La composición y estructura del *biofilm* depende de la bacteria y de las condiciones ambientales.

Finalmente, una cuarta etapa de **dispersión** en la cual algunas bacterias se liberan y colonizan nuevos nichos donde establecer un nuevo *biofilm*. Algunos estudios indican que esta etapa dependería de la disponibilidad de nutrientes, estimulando la producción de flagelos en algunos casos o desorganizando la estructura tridimensional del *biofilm*.

En la Figura 1 se muestran los distintos pasos de formación de *biofilms* y algunos de los factores que afectan su desarrollo.

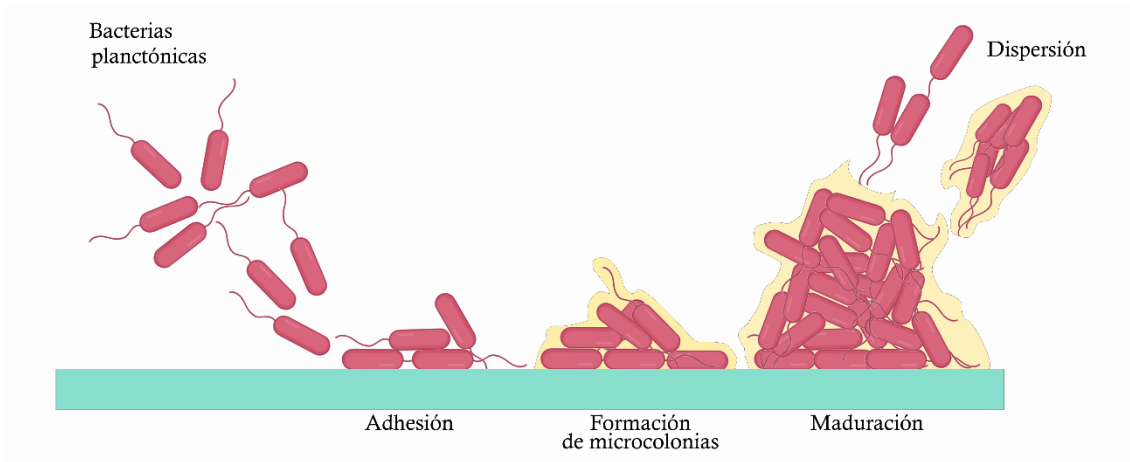


Figura 1. Etapas de formación de un *biofilm* bacteriano.

3. Impacto de los *biofilms*.

Los *biofilms* son capaces de desarrollarse sobre superficies tanto bióticas como abióticas. De hecho, se han observado *biofilms* en sustratos tan variados como rocas sumergidas en ríos, respiraderos oceánicos, en las raíces de las plantas o bien en tuberías industriales o prótesis medicinales. Por ello, el estudio de *biofilms* es de gran interés por su impacto en diversos campos de investigación y aplicación.

En algunos casos los *biofilms* pueden resultar perjudiciales. Todos los organismos más complejos, incluyendo el humano [17], pueden ser colonizados por microorganismos que formen *biofilms* y éstos pueden estar asociados a infecciones persistentes o a la contaminación de dispositivos médicos o implantes [1].

A pesar de los avances en las técnicas de asepsia, la colocación de prótesis médicas sigue siendo un desafío debido a las infecciones asociadas a estos dispositivos [18]. De hecho, en EEUU este tipo de infecciones son la causa más común de revisión de la cirugía (25,2%) y reemplazo de prótesis (79,1%) en las cirugías de reemplazo de rótula de rodilla [19].

Asimismo, se estima que los *biofilms* están involucrados en el 80% de las infecciones nosocomiales [20]. Como se mencionó previamente, las bacterias que viven en *biofilms* se encuentran protegidas frente a agentes antimicrobianos y al sistema inmune del huésped. En efecto, pueden tolerar hasta 1000 veces más la presencia de antibióticos que aquellas que viven de forma libre [21]. En consecuencia, se generan infecciones crónicas difíciles de eliminar o, en el caso de implantes, se

termina removiendo el implante pero con la posibilidad de debilitar al paciente o incluso, con la extirpación de zonas adyacentes a la prótesis [22].

Otro ejemplo del impacto negativo de los *biofilms* es el *biofouling*. El *biofouling* es la acumulación indeseada de moléculas orgánicas, microorganismos, plantas o animales sobre una superficie sumergida. Este es un proceso dinámico que comienza por la absorción de moléculas orgánicas, seguida por la colonización de microorganismos como bacterias y diatomeas y posteriormente, organismos visibles como algas o animales invertebrados. Esta es una problemática que afecta negativamente a, por ejemplo, embarcaciones o tuberías en la industria. En las embarcaciones, como consecuencia del *fouling*, se incrementa la rugosidad y la resistencia hidrodinámica y, por lo tanto, un aumento en el consumo de combustible [23]. Se estima que el gasto generado por el *fouling* en la flota naval de EEUU está entre 180 y 260 millones de dólares por año [24]. A su vez, el *biofouling* en los cascos de los barcos en conjunto con el agua de lastre, son la causa principal de la introducción y dispersión de especies invasoras alrededor del mundo [25-28].

En contraste, los *biofilms* pueden ser beneficiosos en la naturaleza o para varios procesos biotecnológicos, como la biorremediación [29], celdas de combustible microbiológicas [30, 31] o como biofertilizantes [32]. Un uso frecuente de los *biofilms* es el tratamiento de aguas de desecho. En este caso, las bacterias colonizan rápidamente la materia sólida suspendida en el agua para luego descomponerla. Un ejemplo de esto son los filtros por goteo. En este sistema, el agua de desecho se rocía sobre una cama de grava en donde se desarrolla el *biofilm* y las bacterias dentro de la matriz van descomponiendo la materia orgánica presente en el agua [33].

En la naturaleza es común encontrar casos en los cuales el *biofilm* tiene un efecto de protección para otro organismo. Por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis* coloniza la rizósfera de las plantas de trigos y esto las protege de algunas enfermedades generadas por hongos [34].

Por consiguiente, es importante conocer las bases para controlar la formación de *biofilms*, tanto para favorecer su formación para mejorar aplicaciones biotecnológicas como para desorganizar su estructura o evitar su formación y así reducir la aparición de infecciones, *biofouling* y corrosión.

4. Factores que afectan el desarrollo.

Dado que la adhesión es el primer paso en la formación de *biofilms*, entender las interacciones que existen entre las bacterias y la superficie de los sustratos es importante para poder controlar su formación. Este es un proceso complejo en el cual están involucrados tanto factores ambientales

como propios de la bacteria. Algunos de los factores más estudiados que influyen en la adhesión bacteriana se detallan a continuación:

4.1. Carga superficial.

Desde hace tiempo se sabe que la carga superficial juega un rol importante en la adhesión bacteriana y por ende, afecta la formación de *biofilms*. La mayoría de las bacterias tienen una carga neta superficial negativa y por ello, son más propensas a adherirse a superficies con carga positiva por interacción electrostática. Sin embargo, no en todas ellas se favorece el desarrollo de *biofilms* dado que algunas superficies recubiertas con cationes (por ejemplo, catión de amonio cuaternario) tienen efecto bactericida, matando a las células adheridas [35].

Por otro lado, algunos estudios muestran que la carga superficial también afecta la estructura del *biofilm* maduro. En un trabajo realizado por Rzhepishevskaya *et al.* muestran cómo *P. aeruginosa* crece en forma de hongos sobre una superficie de poli(3-sulfopropilmetacrilato) con carga negativa a diferencia del *biofilm* uniforme que se desarrolla sobre un sustrato de poli(2-(metacrilolixi)etil cloruro de trimetilamonio con carga positiva [36].

4.2. Hidrofobicidad e hidrofiliidad de la superficie.

En general, la adhesión bacteriana se puede promover o inhibir al variar la hidrofobicidad de la superficie. La preferencia de una superficie hidrofílica o hidrofóbica varía entre las distintas bacterias y esto se atribuye a las diferencias en las envolturas celulares.

A su vez, algunos estudios sugieren que las superficies superhidrofílicas y superhidrofóbicas podrían prevenir la formación de *biofilms*. Un ejemplo de una superficie superhidrofóbica es la hoja del Lotus, la cual genera un ángulo de contacto con el agua mayor a 160° [37, 38]. Las hojas de esta planta combinan micro y nanoestructuras con la presencia de cera en su superficie, haciéndola una superficie “autolimpiante”. Un modelo aceptado propone que la presencia de estructuras en un cierto rango de tamaños, provoca que el aire quede atrapado en los valles evitando que la superficie se moje, este modelo es conocido como el régimen de Cassie [38-40].

En el caso de las superficies superhidrofílicas, se genera una capa gruesa de agua que cubre a la superficie y por lo tanto, debilita las interacciones entre el sustrato y las células [41].

4.3. Rugosidad y topografía del sustrato.

A pesar de ser uno de los factores más estudiados, se desconoce el efecto exacto que tiene la rugosidad o topografía del sustrato. Si bien en algunos estudios al aumentar la rugosidad del sustrato, se incrementa la adhesión bacteriana debido al aumento de los puntos de contacto entre las bacterias y la superficie [42] o a la protección de las células frente a la fuerza de corte [43], este no es un efecto universal.

En un estudio sobre el impacto de la dimensión de la topografía de la superficie del sustrato en la adhesión bacteriana, se mostró que las estructuras periódicas de tamaño similar a las bacterias, incrementan el pegado de las mismas. Por el contrario, cuando estas estructuras son de menor tamaño que las bacterias, se observó una disminución en la cantidad de bacterias adheridas. Curiosamente, en este caso la adhesión es independiente de la hidrofobicidad de la superficie o el tiempo de contacto [44].

A su vez, está reportado que la amplitud de los valles y los picos no es suficiente para describir las propiedades 3D de una superficie, sino que la distribución de estas estructuras también es relevante [45, 46], es más se necesitan 14 parámetros para describir exhaustivamente una superficie [47]. De hecho, ya existen superficies comerciales como es el caso de Sharklet, inspirada en la piel de tiburón, compuesta por estructuras periódicas que inhiben la adhesión bacteriana. Además, numerosos artículos muestran cómo micro y nanoestructuras de diversas formas y tamaños, organizadas de forma periódica disminuyen la formación de *biofilms* respecto a superficies lisas [48-50].

Si bien se resalta a la topografía como un factor relevante en la adhesión bacteriana, en algunos trabajos no se tienen en cuenta otros factores como la composición química, la hidrofobicidad, la carga del material, la cepa bacteriana o las condiciones de crecimiento usadas en cada caso.

4.4. Dureza del sustrato.

Uno de los factores menos estudiados es la rigidez del sustrato. En el año 2003, Bakker *et.al.* por primera vez atribuía las diferencias que observaba en la adhesión de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a la dureza de las superficies aunque las superficies estudiadas tenían distinta composición química [51]. Posteriormente, en un trabajo de Lichter *et. al.* se muestra que existe una correlación positiva entre la rigidez del sustrato (módulo de Young entre 0,8 y 80 MPa) y la adhesión de *Staphylococcus epidermidis*, usando como sustrato un film polielectrolito compuesto

por polialilamina y ácido poliacrílico, independientemente de la rugosidad y carga del sustrato [52]. De hecho, Song y Ren estudiaron cómo se afectan las primeras etapas de formación de *biofilms* al variar la dureza del polidimetilsiloxano (PDMS) y encontraron que la dureza no sólo reduce la adhesión de *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, sino que también modifica el tamaño de las células y la susceptibilidad a los antibióticos. Estos resultados muestran cómo las células poseen la capacidad de sensor la rigidez del sustrato durante el desarrollo del *biofilm* [53].

Si bien no está claro el mecanismo por el que las bacterias pueden sensor la dureza del material, resulta claro que la rigidez del sustrato afecta la adhesión y la fisiología de las células adheridas.

4.5. Características de la envoltura celular y presencia de apéndices celulares.

Para iniciar la formación de *biofilms*, las bacterias deben acercarse lo suficiente a la superficie. En medio líquido, las bacterias planctónicas pueden acercarse tanto de manera activa como pasiva. Si bien algunas bacterias no tienen mecanismos que les permitan nadar y se acercan sólo por movimientos Brownianos y por fuerzas gravitacionales, la manera más efectiva de acercamiento es mediante movimientos activos. Uno de los apéndices celulares que comúnmente se observa en bacterias es el flagelo, el cual es responsable del movimiento de *swimming* y provee la energía suficiente para alcanzar la superficie. De hecho, el flagelo es crucial en la adhesión de *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Caulobacter crescentus*, ya que sus mutantes sin flagelos fueron incapaces de adherirse a la superficie [54-56]. El flagelo les permite moverse hacia una superficie en respuesta a distintos estímulos ambientales. Un claro ejemplo de movimientos direccionados a través de señales químicas es el caso de *Vibrio spp.* Estas bacterias pueden metabolizar la quitina, el principal componente de la cutícula y exoesqueleto de los crustáceos, moluscos y artrópodos. La degradación de la quitina mediante enzimas solubles secretadas por la bacteria libera productos al medio, generando un gradiente químico que las bacterias utilizan para direccionar sus movimientos y posteriormente, adherirse. Este *feedback* positivo resulta en un mecanismo rápido y efectivo para la colonización de estas superficies de quitina [57].

El flagelo, además de facilitar el acercamiento de las bacterias, también funciona como una adhesina al proveer un contacto físico con la superficie [58].

Otros apéndices como los pili, fimbriae y curli están involucrados en la adhesión inespecífica de las bacterias a la superficie [59]. Aunque algunos pili, como el pili tipo I de *E. coli*, tienen receptores que

se unen a sustratos específicos, la mayoría de los pili puede unirse a una gran cantidad de sustratos de manera inespecífica y mediante un mecanismo desconocido.

Por otro lado, la envoltura celular es altamente heterogénea y en ella se exponen proteínas, lípidos y exopolisacáridos, así como también los apéndices celulares mencionados previamente. La conformación de estos polímeros depende de las condiciones metabólicas y ambientales y, de hecho, una misma bacteria puede exhibir diferentes cargas e hidrofobicidad según el medio de crecimiento que se encuentre [60].

4.6. Condiciones de flujo.

Los ambientes acuáticos pueden dividirse en tres partes: el líquido *bulk* donde las bacterias nadan libremente; la interfaz líquido-superficie, llamada capa límite hidrodinámica, donde las células son sometidas a una gran fuerza hidrodinámica por la presencia de la superficie, y donde las células pueden adherirse y vivir de forma sésil. El tamaño de la capa hidrodinámica depende de la velocidad de flujo del líquido: cuanto mayor es el flujo, más delgada es la capa. Por lo tanto, en condiciones de alto flujo, las células cercanas a la superficie presencian una mayor fuerza de corte (*shear force*). La fuerza de corte y el flujo afectan notablemente la eficiencia con que las bacterias se acercan a la superficie. Si el flujo es muy elevado, las bacterias son arrastradas sin tener la posibilidad de adherirse a la superficie [61].

A su vez, el flujo alrededor de los *biofilms* también puede afectar la morfología del mismo, deformando sus estructuras. La fuerza de corte puede arrastrar los compuestos secretados, afectando la densidad del *biofilm*, limitando su crecimiento y, en consecuencia, resultando en un *biofilm* de menor tamaño [62, 63]. Si la presencia de flujo se da una vez que el *biofilm* se encuentra maduro, la corriente puede arrastrar segmentos del *biofilm* y así favorecer la dispersión en nuevos sitios [64].

5. *Pseudomonas protegens* Pf-5.

Las bacterias *Pseudomonas* spp. son bacilos Gram negativos que están presentes en diversos ambientes como agua, suelo o rizósfera. En particular, *Pseudomonas protegens* Pf-5 (antiguamente llamada *Pseudomonas fluorescens*) es conocida por sus propiedades de protección en plantas frente a diversos patógenos del suelo [65-67]. Tal como se muestra en distintos trabajos, es una bacteria capaz de formar *biofilms* sobre superficies bióticas (como las raíces de algunas plantas [68-70]) y abióticas (placas de poliestireno [71, 72]) así como también en la interfaz líquido-aire de algunos medios de cultivo [71].

6. *Bacillus subtilis* 168.

Bacillus subtilis 168 es una bacteria Gram positiva, atractiva para investigaciones con intereses académicos o industriales. El interés se debe en gran parte a su fácil manejo en el laboratorio, a que no es un organismo patógeno y a la cantidad de información disponible sobre su genoma y fisiología. Por este motivo, suele utilizarse como organismo modelo para el estudio de las bases de formación de *biofilm* dentro de las bacterias Gram positivas. Se ha demostrado la capacidad de *B. subtilis* de formar *biofilms* sobre sustratos abióticos o naturalmente, en la superficie de algunas raíces [73, 74].

7. Métodos para el estudio de *biofilms*.

Hoy en día está aceptada la idea de que la mayoría de los microorganismos en la naturaleza se encuentran en forma de *biofilms* y no de manera planctónica. Por ello, en las últimas décadas se ha avanzado en el desarrollo de herramientas para su observación y caracterización. Del mismo modo, también se ha avanzado en la fabricación de dispositivos que asemejen las condiciones ambientales reales para el estudio de microorganismos. Elegir qué metodología utilizar dependerá de la información que se desee extraer. A continuación se describen algunas de las técnicas de estudio existentes junto con sus ventajas y desventajas, haciendo énfasis en las técnicas utilizadas en este trabajo de Tesis.

7.1. Dispositivos para el crecimiento de *biofilms*.

Sin dudas el método más difundido es el crecimiento en placas multipocillo. En el procedimiento clásico, las bacterias se crecen en pocillos de poliestireno. Luego de distintos tiempos de incubación, se retiran las bacterias planctónicas para teñir las células adheridas [75]. Es ideal para realizar *screenings* dado que es un método económico y rápido. Sin embargo, suele ser poco reproducible, no es útil para evaluar las primeras etapas de formación del *biofilm* y como es un método en *batch* en general suele utilizarse para experimentos de poca duración debido a la escasez de nutrientes.

Otro tipo de estudios involucra la utilización de dispositivos que renuevan el medio de cultivo. La forma más simple consiste en una celda de flujo hermética por la cual se hace circular medio de cultivo fresco. Dentro de ésta se colocan los cupones sobre los que se desea estudiar la formación de *biofilms*, los cuales se pueden retirar de manera independiente en condiciones de esterilidad. Los cupones pueden variar su tamaño y composición, por lo que resultan útiles en numerosos estudios. Otro ejemplo es el dispositivo de Robbins, el cual se basa en un tubo en el que se montan cupones del material de interés. Los cupones permanecen sumergidos en el medio de cultivo hasta el momento de su extracción. A partir de este modelo han surgido modificaciones que permiten variar las condiciones hidrodinámicas [76] y mantener el crecimiento del *biofilm* durante semanas [77, 78]. Una desventaja de estos métodos es que es necesario remover los cupones para su observación, lo que puede llevar a la aparición de artefactos debido a su manipulación. Para evitar este problema, existen otras cámaras de flujo con su base de vidrio o plástico sobre las que se desarrolla el *biofilm* y permiten la observación directa del *biofilm*, incluso a distintos tiempos [79, 80].

7.2. Cuantificación del *biofilm* y viabilidad.

La biomasa y viabilidad del *biofilm* pueden ser descritas mediante distintos métodos según el objetivo de estudio.

La técnica más utilizada es el recuento en placa de unidades formadoras de colonias (CFU). Esta es una técnica simple que permite la cuantificación de las bacterias y puede realizarse en cualquier laboratorio. Sin embargo, entre las limitaciones que presenta este método está la posibilidad de que las bacterias que se desprenden de la superficie no sean representativas de la población en el *biofilm* y además, no permite cuantificar bacterias viables pero no cultivables [81].

La utilización de colorantes o fluoróforos es otra de las metodologías más extendidas. Estos son métodos indirectos, que pueden utilizarse para marcar componentes específicos, como aquellos que componen la matriz extracelular. El cristal violeta (CV) es el colorante más utilizado para este propósito, sobretudo en el método de cuantificación en placa multipocillo. El CV tiñe bacterias vivas y muertas, así como componentes de la matriz extracelular, resultando útil para la cuantificación de la biomasa total [82]. No obstante, durante los pasos de lavado pueden desprenderse algunas bacterias sésiles y por ende subestimar la biomasa. Además, el lavado depende de la técnica que se utilice e incluso del operario, lo que puede llevar a resultados poco reproducibles [83-85]. A pesar de ello, sigue siendo una de las técnicas más utilizadas debido a que se pueden estudiar múltiples especies y cepas, es un método económico y rápido (ideal para realizar *screenings*) y no hace falta desprender las bacterias del sustrato, lo que podría llevar a una subestimación. Otros métodos colorimétricos, que se utilizan para estudiar el estado metabólico de las células dentro del *biofilm*, emplean la capacidad de las bacterias de transformar de forma activa algún sustrato en un producto coloreado. A partir de la cuantificación del producto mediante un espectrofotómetro se puede estimar el estado metabólico de las células. Los colorantes que más se utilizan son las sales de tetrazolio como el XTT o TTC o el indicador redox, rezasurin.

A su vez, la utilización de colorantes permite la observación de los *biofilms* mediante microscopía óptica convencional. Este método es conveniente ya que la preparación y observación de la muestra es simple y no se requieren grandes recursos. Sin embargo, algunas interacciones o detalles en la organización espacial del *biofilm* no se pueden observar debido a su escasa resolución. Por ello, es necesario complementar la microscopía óptica convencional con otros tipos de microscopía. La microscopía de fluorescencia es una herramienta de gran valor que permite la observación específica de células o componentes de la matriz. En particular, la microscopía láser confocal también permite la construcción 3D de la estructura del *biofilm* y la estimación de parámetros como el espesor, rugosidad y volumen [86-88]. Los fluoróforos más comunes son el SYBR-green y el SYTO-9, los cuales se unen al DNA y permiten la observación de las bacterias [89, 90]. Otra posibilidad que ofrece la microscopía de fluorescencia es el análisis de muerte celular dentro del *biofilm*. La técnica más utilizada se basa en la tinción con dos fluoróforos: SYTO 9 penetra todas las células, uniéndose a los ácidos nucleicos y emite en la región del verde ($\lambda = 510-540$ nm). En cambio, el Ioduro de Propidio (IP) solamente ingresa a células con apreciable daño en la membrana celular, que pueden considerarse células muertas, y se une a los ácidos nucleicos con mayor afinidad que el SYTO 9. La sonda Ioduro de Propidio emite en el rojo ($\lambda = 620-650$ nm). Esta tinción puede utilizarse por ejemplo, para observar la distribución de las bacterias viables dentro del *biofilm* [91] o para analizar el efecto bactericida de un agente o superficie antimicrobiana [92, 93]. Pese a que la observación

mediante microscopios de fluorescencia requiere la utilización de fluoróforos, resulta útil para la caracterización y cuantificación de *biofilms*.

De forma alternativa, el microscopio electrónico de barrido (SEM, de su sigla en inglés *Scanning Electron Microscopy*) provee información de la estructura 3D del *biofilm* (con resolución de 50-100 nm) y es posible detectar la presencia de EPS [94, 95]. La mayor desventaja de este método es que se requiere la fijación, deshidratación y recubrimiento con un material conductor, lo que puede causar la destrucción o colapso de las estructuras del *biofilm* o bien la aparición de artificios [96].

La utilización de AFM para la observación de *biofilms* está creciendo dado que tiene resolución nanométrica y permite trabajar bajo condiciones no destructivas. Principalmente, el AFM se utiliza para obtener información de la estructura del *biofilm* y de los mecanismos involucrados en la adhesión de las células con la superficie [97, 98]. Además, también resulta útil para realizar un análisis cuantitativo como el cálculo del cubrimiento, rugosidad o espesor del *biofilm* [99-101]. Por otro lado, gracias a su alta resolución es posible estudiar la presencia de componentes nanométricos involucrados en la adhesión [102]. A su vez, mediante el AFM es posible caracterizar las propiedades nanomecánicas del *biofilm*. El hecho de entender cómo la adhesión y la viscoelasticidad modulan el desarrollo de *biofilms* puede resultar útil para el diseño de estrategias para controlar su formación. En el interior de los *biofilms*, la viscoelasticidad afecta la penetración de agentes antimicrobianos y la remoción de los *biofilms* de las superficies, por ende, cumple un rol en la protección contra estrés del tipo mecánicos y físicos [103]. En la sección 9 se detallan las ventajas y desventajas de este método.

En resumen, existen muchas técnicas que aportan información valiosa y complementaria sobre distintos aspectos del *biofilm*. Por ello, para obtener una representación más realista de los *biofilms* es necesario combinar distintos enfoques.

8. Superficies antimicrobianas.

El uso de antibióticos revolucionó el campo de la medicina en el último siglo. Sin embargo, el uso continuo ha llevado a la aparición de bacterias multiresistentes a antibióticos, lo que motiva el desarrollo de nuevas alternativas. De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades (CDC, de su nombre en inglés *Center for Disease Control*), las bacterias resistentes a antibióticos afectan al menos dos millones de individuos anualmente. Dado que un gran porcentaje de enfermedades bacterianas se transmiten a través del contacto con una superficie [104], urge la necesidad de

desarrollar superficies con actividad antimicrobiana con bajo riesgo de desarrollar resistencia y además con poco impacto ambiental.

Como se mencionó anteriormente, la colonización de superficies y resistencia a antibióticos no sólo impacta en el campo de la salud. De hecho, los *biofilms* contaminan diversas infraestructuras de la industria alimenticia, oleoductos, cascos de barcos, entre otras.

En esta búsqueda de nuevos materiales, se han desarrollado materiales capaces de repeler o matar diferentes microorganismos. Principalmente, se busca inhibir la formación de *biofilms*, previniendo la adhesión y primeras etapas de crecimiento, dado que una vez que el *biofilm* ha madurado, eliminarlo es considerablemente más costoso.

Teniendo en cuenta la forma de acción de las superficies que inhiben el desarrollo microbiano se las puede clasificar en tres tipos: a) Aquellas que liberan un compuesto antimicrobiano; b) las que provocan muerte celular al entrar en contacto y c) las que inhiben el desarrollo de *biofilms* mediante su topografía (superficies antiadhesivas o repelentes). Los tres tipos presentan ventajas y desventajas que, junto con algunos ejemplos, se detallan a continuación:

8.1. Liberación de un compuesto antimicrobiano.

Estas superficies permiten la liberación controlada de agentes antimicrobianos, por lo tanto son efectivas para combatir tanto las bacterias adheridas así como las planctónicas. Como la mayor concentración de antibiótico está en la proximidad de la superficie, se reduce la posibilidad de que emerjan bacterias resistentes. No obstante, su vida útil está limitada por la cantidad de antimicrobiano inicial [105] y es necesario controlar la velocidad en que se libera, dado que una liberación en muy corto plazo podría resultar tóxica si se tratará por ejemplo de un implante.

En algunas superficies, se utilizan metales con efecto bactericida, como plata [106], cobre [107] o molibdeno [108], siendo la plata la más frecuente. El efecto antibacteriano de la plata se basa principalmente en los iones de Ag^+ y por ende, depende del grado de disolución de la plata. Por lo tanto al disolverse completamente, se acaba el efecto antibacteriano. Incluso, se han desarrollado superficies que liberan más de un compuesto, con lo cual se reduce la posibilidad de aparición de bacterias resistentes y en algunos casos, ocurre una sinergia entre los agentes antimicrobianos. Por ejemplo, en un trabajo de Storm *et. al.* combinan la acción del óxido nítrico con la de la plata y observan una reducción en la adhesión y un aumento en el efecto biocida contra *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* [109].

Sin embargo, este tipo de sustratos genera preocupación sobre su inocuidad para la salud humana y el medio ambiente [110, 111].

8.2. Muerte por contacto.

Una alternativa para evitar la pérdida de acción a largo plazo son las superficies que provocan la muerte celular por contacto. El método de acción depende de las interacciones físicas que ocurren entre el sustrato con moléculas ancladas en su superficie y las membranas bacterianas. Algunas de las moléculas comúnmente utilizadas son sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, péptidos antimicrobianos, enzimas, biguanidas poliméricas o zwitteriones [112-114].

Desde su introducción en 1972 [115], los compuestos de amonio cuaternario son hasta el momento los más utilizados para la construcción de superficies de muerte por contacto. Existen numerosos trabajos que utilizan estos compuestos anclados a distintas superficies. Por ejemplo, en un estudio realizado por Correia *et. al.* demuestran cómo *E. coli* y *S. aureus* mueren al entrar en contacto con una superficie formada por un compuesto cuaternario de amonio ligado a una estructura de quitosano [116].

Otro abordaje es la utilización de polímeros con acción biocida, los cuales en general tienen carga positiva. Por ejemplo, el recubrimiento con quitosano, poli-L-lisina o poli- β -lactama demostró una disminución de la formación de *biofilms* sobre diversas superficies [117, 118].

Una limitación de este tipo de superficies es que su efecto puede ser enmascarado debido a la absorción de macromoléculas y la subsecuente formación de una “capa de acondicionamiento”.

Además, al igual que en el caso de las superficies que liberan agentes antimicrobianos, su acción puede estar limitada a ambientes acuosos.

8.3. Superficies antiadhesivas o con muerte por contacto debido a la topografía.

En función de sortear las desventajas mencionadas para las superficies con agentes antimicrobianos, las superficies antiadhesivas o aquellas con nano y microestructuras que producen la muerte celular han cobrado gran interés en el último tiempo.

Dentro de las superficies antiadhesivas, las superficies superhidrofóbicas son las más populares. Desde la descripción de las estructuras jerárquicas de la hoja del Loto (*Nelumbo* sp.), las cuales además están cubiertas con una capa de cera, han surgido numerosas superficies inspiradas en ella. Este tipo de sustratos se basa en la disminución de los puntos de contacto entre las bacterias y las superficies, al limitarlos sólo a las protrusiones de las micro o nanoestructuras.

En el caso de las superficies antimicrobianas, se necesita la interacción de las bacterias con la superficie estructurada. Hay muchos factores que afectan su efectividad, como el tamaño, distribución y geometría de las estructuras. En general, el mecanismo de acción de estas superficies es de naturaleza física y resultan más efectivas frente a las bacterias con envolturas menos rígidas [50, 119].

En un estudio de Vassallo *et. al.*, por ejemplo, muestran el efecto antibacteriano de una superficie de silicio nanoestructurada. Utilizando *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* como bacterias modelo, observan una disminución en la viabilidad luego de 24 hs. de incubación con las superficies. Además, mediante el empleo de un SEM logran observar la deformación, o incluso lisis, de las células en contacto con las protrusiones de la superficie. Al igual que en trabajos donde evalúan el efecto antimicrobiano de las alas de cícada, en este estudio proponen que la muerte celular ocurre luego de la adhesión de las bacterias gracias al estiramiento y posterior colapso de la membrana celular [120, 121].

8.4. Superficies naturales. Superficies bioinspiradas y biomiméticas.

La naturaleza es una fuente invaluable de inspiración para el diseño y fabricación de nuevos materiales. De hecho existen numerosos organismos que poseen superficies que los protegen de la colonización de microorganismos patógenos. Típicamente, estas superficies consisten en nanopilares de entre 50-250 nm de diámetro, con distintas alturas y densidades. En algunos estudios se relaciona a la humectabilidad con la capacidad de ser *anti-fouling*, considerando antiadherentes a las superficies superhidrofóbicas [122-132]. Otros estudios, consideran que el efecto

antimicrobiano de estas superficies se debe a la ruptura de la pared celular mediante las nanoestructuras. Este mecanismo se denomina muerte por contacto.

Una de las superficies antimicrobianas naturales más estudiadas es la de las alas de cícada. En un trabajo de Ivanova *et. al.* del año 2012 se describe el efecto bactericida de los nano-conos de 200 nm de alto, 60 nm de diámetro en la parte más angosta y distribuidos de manera uniforme a una distancia de 170 nm [93]. A partir de técnicas de microscopía, en este trabajo se muestra que a pesar de ser una superficie hidrofóbica (ángulo de contacto del agua: 158,8°), las células de *Pseudomonas aeruginosa* se adhieren a la superficie pero luego de unos minutos la envoltura celular se deforma ocasionando la muerte de las bacterias. A su vez, realizaron una copia hidrofílica de la arquitectura del ala con un recubrimiento de oro. En este caso observaron que se mantenía la actividad bactericida, confirmando que la muerte ocurre por un mecanismo mecánico/físico.

Sin embargo, la nanoestructura de las alas de cícada sólo sería efectiva frente a bacterias Gram negativas [119]. Esta diferencia en la eficiencia de acción se debería a la gruesa capa de peptidoglicano de las bacterias Gram positivas (4-5 veces más gruesa que la de las Gram negativas), la cual genera rigidez en la membrana y por lo tanto, previene la deformación.

Otra especie estudiada por su piel con superficie antibacteriana es el gecko. En un trabajo realizado por Watson *et. al.* demuestran el efecto bactericida que tiene frente a *Porphyromonas gingivalis*, un patógeno sésil Gram negativo [133]. En este caso, la membrana celular se estiraría y posteriormente rompería al entrar en contacto con las espínulas presentes en la superficie de la piel.

También existen plantas que evitan la colonización de bacterias. Ma *et. al.* reportaron el efecto *anti-fouling* de las hojas de Taro. Cuando evaluaron la adhesión de *P. aeruginosa* sobre las hojas sin tratamiento, vieron que se inhibía la adhesión debido al aire atrapado entre las nanoestructuras. En cambio, cuando previamente trataban las hojas de Taro para volverlas hidrofílicas, atribuyen a que la reducción en la adhesión se daría por la escasa cantidad de puntos de contacto entre las bacterias y la superficie [128].

9. Microscopía de Fuerza Atómica.

9.1. Fundamentos básicos.

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por su nombre en inglés *Atomic Force Microscope*) fue inventado en 1986 como uno de varios microscopios de sonda de barrido (SPM, *Scanning Probe Microscope*), siendo el microscopio de efecto túnel el primero de ellos en el año 1981. Este tipo de microscopios tienen en común que obtienen una imagen topográfica con una resolución nanométrica al detectar interacciones localizadas entre una sonda y la superficie de la muestra. Mediante la utilización de un posicionador piezoeléctrico que permite mover la sonda con respecto a la muestra con una precisión subnanométrica, se logran mapas topográficos con altísima precisión. Estos mapas se obtienen al escanear la muestra pixel por pixel de manera secuencial, fila a fila. Finalmente, la imagen topográfica se reconstruye mediante un programa computacional.

En particular, el AFM se basa en medir las fuerzas atractivas y repulsivas que existen entre una punta afilada (comúnmente llamada *tip*) y la superficie de la muestra durante el barrido de la superficie (en contacto o a una distancia muy pequeña (0,3-10 nm)). La resolución lateral (en el plano XY) está determinada por el tamaño de la punta. Cuanto más aguda sea la punta, mayor será la resolución obtenida. En consecuencia, las puntas se diseñan con radios de curvatura muy pequeños que van entre los 2-20 nm. La punta se encuentra unida a una viga muy flexible (*cantiléver*) la cual se curva hacia o en contra de la muestra cuando las fuerzas presentes son atractivas o repulsivas, respectivamente. Los *cantilévers* son microscópicos, miden entre unas decenas y cientos de micrones de ancho y largo, pueden tener forma rectangular o triangular y están constituidos por antimonio dopado con silicio, nitruro de silicio o silicio y en algunos casos se encuentran recubiertos con films de aluminio en parte posterior para mejorar las propiedades de reflexión de la superficie. Los *cantilévers* se encuentran sujetos en el borde de un *chip* generalmente de silicio o de nitruro de silicio. Como el *chip* mide unos pocos milímetros, se lo puede sujetar a un soporte (*holder*) que posteriormente se une al piezoeléctrico.

La curvatura del cantiléver, comúnmente llamada deflexión, es detectada por medio de un mecanismo óptico. En particular, un haz de láser se enfoca sobre la superficie del cantiléver del lado reverso del cual se encuentra la punta. El cantiléver está recubierto con un material que permita su reflexión. Luego de la reflexión del láser es direccionada mediante un espejo hacia un fotodiodo que posee cuatro cuadrantes. Mientras el cantiléver se encuentra alejado de la muestra o sin deflexión, el fotodiodo se coloca de forma tal que la reflexión del láser se encuentre centrada (Figura 2). En este caso, la diferencia en el fotovoltaje (ΔV) entre los cuadrantes superiores e inferiores y entre los

laterales debería ser cero. Cuando la punta interactúa con la muestra y el cantiléver se deflecta, la luz es reflejada con un ángulo levemente distinto, y por ende detectada en otra sección de los cuadrantes del fotodiodo ($\Delta V \neq 0$). Las variaciones en el fotovoltaje son proporcionales a la deflexión del cantiléver. El signo del voltaje indica si la curvatura es causada por fuerzas atractivas o repulsivas y la magnitud del voltaje se encuentra relacionada con la intensidad de las fuerzas.

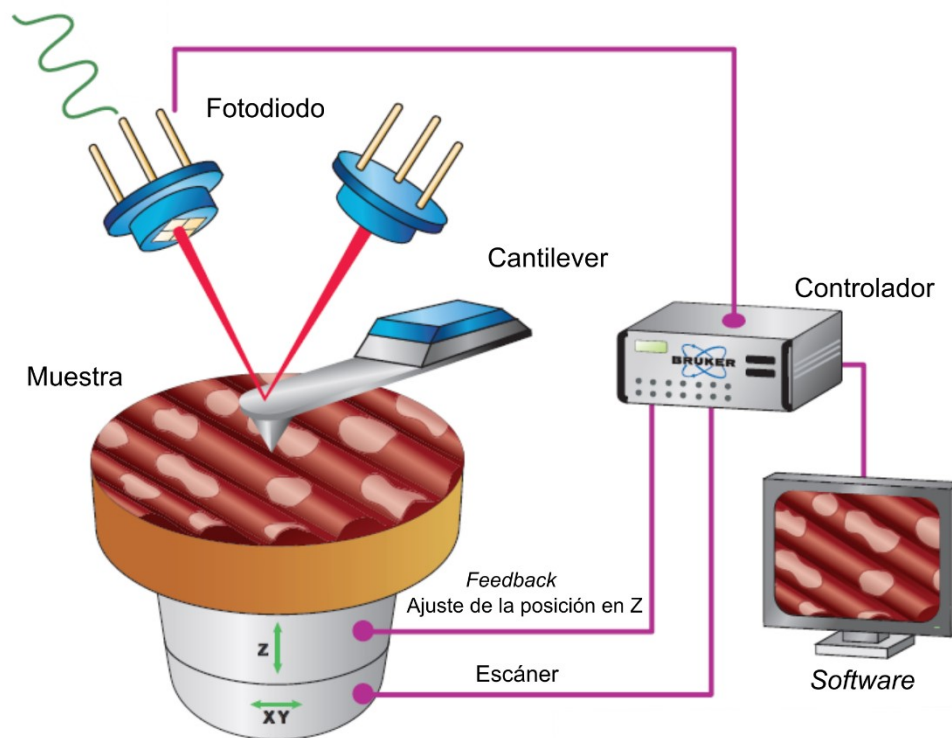


Figura 2. Esquema del funcionamiento del AFM.

9.2. Modos de operación del AFM.

Existen tres métodos distintos para obtener mapas topográficos mediante AFM. El modo contacto, en donde la muestra y la punta se encuentran en contacto a lo largo de todo el barrido; el modo intermitente, en el cual la distancia punta-muestra es mayor y la punta oscila durante el escaneo y el modo de no-contacto en el que la distancia es aún mayor. A continuación se detallan el modo de contacto e intermitente ya que fueron los modos utilizados para la realización de este trabajo.

9.2.1. Modo de contacto.

El primer modo de trabajo desarrollado es el método de contacto. En este método, la punta barre la muestra en XY y la posición de la muestra se va ajustando pixel a pixel de forma tal que la fuerza aplicada sea constante en toda la muestra. En otras palabras, mediante el *software* del equipo, se busca mantener la deflexión del cantiléver en un valor constante. Para que ello ocurra, existe un mecanismo de retroalimentación (*feedback*) que, según los valores detectados en el fotodiodo, va modificando la posición de altura (Z) del piezoeléctrico de manera instantánea. De hecho, es a partir de los valores de corrimiento en Z del piezoeléctrico de los cuales se reconstruye la imagen en 3D punto por punto. Como la deflexión es el parámetro que se utiliza como *feedback*, su valor permanece prácticamente constante, excepto en algunas zonas con cambios bruscos en la altura. En esta situación, el controlador no llega a corregir la posición en Z de forma inmediata y por eso ocurre lo que comúnmente se llama error de deflexión (*deflection error*). Este es un valor que también se colecta y si bien no se puede extraer información cuantitativa, permite la observación de algunas estructuras gracias al contraste de los bordes.

Si bien en algunos estudios de sistemas biológicos se utiliza el modo contacto, realizarlo requiere de cierta experiencia ya que fuerzas mayores a 100 pN pueden causar deformaciones irreversibles en la muestra [134].

9.2.2. Modo intermitente.

En este modo de observación, el cantiléver es forzado a oscilar cerca de su frecuencia de resonancia por un pequeño piezoeléctrico que se encuentra en el *holder* del cantiléver. Cuando la punta se encuentra lo suficientemente cerca de la muestra, la frecuencia de resonancia varía levemente debido a las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra. Este fenómeno se observa de manera indirecta, ya que lo que se monitorea en realidad son los cambios en la amplitud de oscilación a una frecuencia de oscilación fija cercana a la frecuencia de resonancia. Como la amplitud depende de la distancia entre la muestra y la punta, resulta útil utilizar este parámetro como *feedback* al cual ajustar cuando la altura de la muestra de manera que la amplitud sea constante. En resumen, la amplitud funciona del mismo modo en que lo hace el parámetro de deflexión en el modo contacto.

En comparación con el modo contacto, en el modo intermitente se reduce la interacción de la punta con la muestra, tanto en el tiempo de contacto como en la fuerza, por lo que suele utilizarse como un método menos invasivo para la observación de muestras biológicas.

9.3. Microscopía de fuerza atómica para el estudio de sistemas biológicos.

La invención del AFM creó nuevas oportunidades en las áreas de biología, química, física y medicina. Debido a la altísima resolución que se puede alcanzar y a la posibilidad de estudiar los sistemas en condiciones de temperatura y presión ambientales y en medio líquido, permitiendo el análisis de sistemas biológicos en escalas subnanométricas [135-139]. Trabajar con un AFM para el estudio de sistemas biológicos tiene ventajas y desventajas respecto a otro tipo de microscopios de alta resolución (Tabla 1). Una de las ventajas principales es la simpleza en la preparación de la muestra, dado que no se requiere tinción, marcación o recubrimiento de la muestra. A su vez, las imágenes obtenidas tienen un formato tridimensional y con gran precisión. La ventaja más importante es la posibilidad de estudiar células y biomoléculas en ambientes fisiológicamente relevantes. De hecho, incluso es posible la observación de células vivas, permitiendo el estudio de eventos dinámicos en tiempo real. Sin embargo, debido al tiempo que demora la toma de imágenes con un AFM convencional, no resulta útil para algunos eventos que ocurren en fracciones de segundos. Existen AFMs de alta velocidad que intentan mejorar la resolución temporal. Otra desventaja que presenta es que sólo se puede tomar imágenes de la superficie de la muestra, a diferencia de los microscopios ópticos o el microscopio electrónico de transmisión, con los cuales se puede observar el interior de las células. Finalmente, otra limitación del AFM es que el campo de observación está limitado en el plano y en altura. Generalmente, los piezoeléctricos permiten escanear áreas de aproximadamente $100 \times 100 \mu\text{m}$ en XY y unos $10 \mu\text{m}$ de altura (dirección vertical, eje Z).

Tabla 1. Comparación de algunos microscopios de alta resolución útiles para el estudio de sistemas biológicos.

	Microscopio de Fuerza Atómica	Microscopios de super resolución (STORM, PALM, STED)	Microscopio Electrónico de Transmisión	Microscopio Electrónico de Barrido
Resolución	1-50nm	20-50nm	0,2-10nm	2-10nm
Preparación de la muestra/Condiciones ambientales	Muestra sobre soporte. Condiciones fisiológicas.	Marcación de fluorescencia. Condiciones fisiológicas.	Muestra sobre soporte. Deshidratada o vitrificada.	Deshidratación controlada y recubrimiento metálico.
Artificios	<i>Tip</i> , fuerza ejercida.	Toxicidad, fotoblanqueado.	Daño con el haz, deshidratación.	Deshidratación, daño con el haz.
Ventajas	Mediciones en condiciones fisiológicas; sin necesidad de marcación; evaluación de múltiples parámetros.	Imágenes en 3 dimensiones; buena resolución espacio-temporal; permiten monitorear procesos en las células vivas.	Resolución molecular incluso dentro de células.	Adquisición de imágenes a nivel nanométrico.
Desventajas	Limitado a muestras adheridas a un sustrato.	Limitación por los fluoróforos.	No apto para muestras vivas.	No apto para muestras vivas.

La mayoría de los trabajos biológicos que utilizan AFM se centran en el estudio de células de mamíferos. En parte, esto se debe este tipo de células pueden adherirse fuertemente a las superficies en las que crecen y en consecuencia, no se remueven frente a la fuerza ejercida por la punta durante el barrido. En contraposición, las células de bacterias o levaduras requieren algún método de inmovilización. Entre los métodos de inmovilización más frecuentes se halla el uso de filtros, el cual involucra el confinamiento de las células dentro de los poros [140-145], o la modificación de la superficie mediante métodos químicos [146-152].

9.4. Mediciones de fuerza.

Si bien la posibilidad de obtener imágenes topográficas con alta resolución es una gran ventaja del AFM, la mayor ventaja que aporta es la posibilidad de medir ciertas propiedades mecánicas utilizando al cantiléver como un sensor de fuerzas. Dado que los cantilévers son muy flexibles, es posible considerarlos resortes con una constante elástica, k , y su comportamiento puede ser modelado según la Ley de Hook (Ecuación 1):

$$F = k\Delta X \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde F es la fuerza aplicada, k es la constante elástica del cantiléver y X es la deflexión del cantiléver. El valor de la constante elástica del cantiléver depende de su geometría y tamaño, se puede determinar utilizando diferentes métodos, siendo el más empleado el método de fluctuación térmica de Hutter y Bechhoefer[153]. Para la cuantificación de las fuerzas mecánicas, los sustratos se posicionarán sobre el piezoeléctrico del AFM que acercará y separará el sustrato del cantiléver; y el equipo mide el desplazamiento en Z y los cambios en la deflexión del cantiléver de manera simultánea. La curva de deflexión vs desplazamiento, luego se transforma a una curva de Fuerza vs Distancia como se muestra en la Figura 3. En la sección A de la Figura 3 la punta se encuentra alejado de la muestra y por ello la deflexión es nula. Al continuar el acercamiento (parte B), la punta entra en contacto con la muestra y dependiendo de la muestra y del cantiléver utilizado, pueden observarse fuerzas atractivas (pico por debajo de la zona de no contacto). Luego, en la parte C, el cantiléver continúa desplazándose hasta llegar a un máximo de fuerza establecido. Cuando se alcanza este punto el cantiléver comienza a alejarse de la muestra. En algunos casos, durante la separación de la punta y la muestra pueden observarse picos de adhesión (parte D). Al superar las fuerzas de atracción, el cantiléver se despega completamente y nuevamente se llega a un sector de deflexión nula (parte E). Cada ciclo de movimiento en Z del cantiléver se denomina *ramp* y se divide en dos curvas según la dirección del movimiento: curva de acercamiento o aproximación (*extend*) y curva de retracción o alejamiento (*retract*).

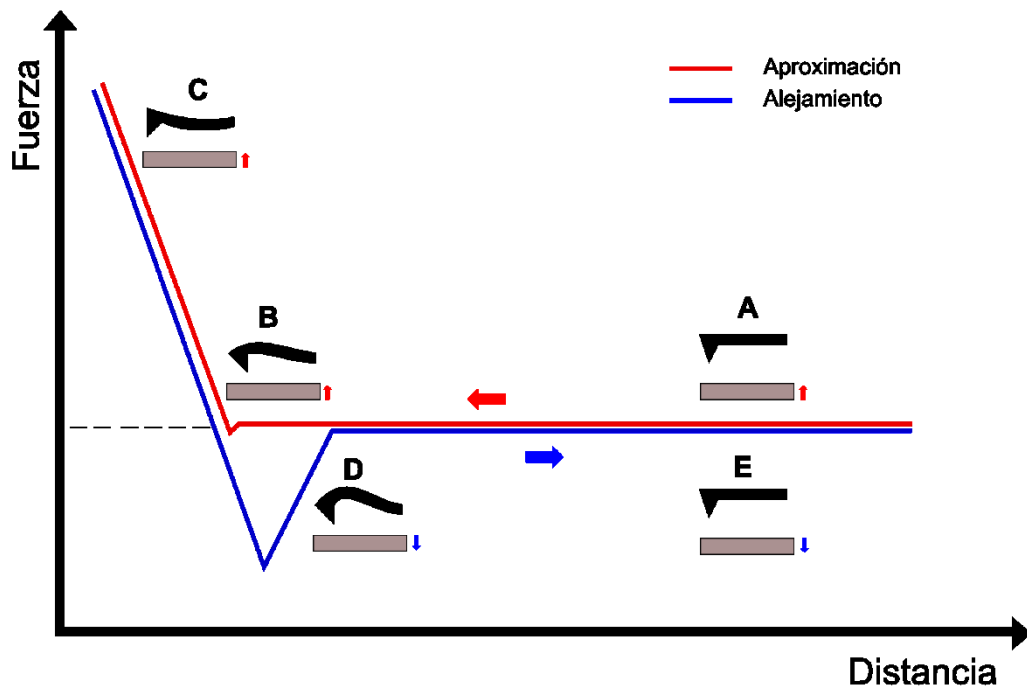


Figura 3. Curva de Fuerza típica adquirida con el AFM.

La utilización de las curvas de Fuerza vs Distancia permitió combinar la observación de sistemas biológicos con el mapeo de interacciones intermoleculares y la caracterización de propiedades nanomecánicas [154-158]. Incluso, la punta puede ser funcionalizada ofreciendo la posibilidad de detectar y mapear interacciones de interés. Por ejemplo, al funcionalizar la punta con un ligando se puede calcular la fuerza necesaria para separarlo de su receptor [159].

9.4.1. Propiedades nanomecánicas.

Algunas propiedades mecánicas como la elasticidad o rigidez de una muestra pueden determinarse mediante la obtención de curvas de Fuerza vs Distancia. La caracterización de las propiedades mecánicas se basa en aplicar una fuerza controlada mediante la punta, mientras se observa la deformación que ésta genera en la muestra. Si la muestra es más blanda que la punta, la misma penetrará la muestra, es decir, actuará como un indentador [160]. Posteriormente, las curvas obtenidas pueden analizarse mediante distintos modelos matemáticos para extraer los parámetros deseados. Uno de los modelos más aceptados para obtener la elasticidad en los términos del Módulo de Young es el modelo de Hertz. En este modelo se asume que el material es enteramente

elástico, que no posee subestructuras y no existen fuerzas de interacción entre la punta y la muestra [160, 161]. El modelo de Hertz describe la deformación de una superficie lisa mediante un indentador esférico y se rige por la Ecuación 2.

$$F = \frac{4E\delta^{3/2}\sqrt{R}}{3(1-\nu^2)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde F es la fuerza aplicada, E es el Módulo de Young, δ es la indentación, R es el radio del indentador y ν es el coeficiente de Poisson, que hace referencia al estrechamiento que sufre un material cuando se lo estira longitudinalmente.

Sobre este modelo se desarrollaron modificaciones, como es el caso del modelo de Sneddon, en el cual se considera un indentador cónico y se describe con la Ecuación 3.

$$F = \frac{2 \tan \alpha E}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde F es la fuerza aplicada, α es el ángulo del indentador, E es el módulo de Young, ν es el coeficiente de Poisson y δ es la indentación.

9.4.2. Espectroscopía de fuerzas.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos en donde se utiliza al cantiléver como un sensor de fuerzas a escala pico y nanonewton. Si existen fuerzas de interacción (específicas o no específicas) entre la punta y la muestra, éstas pueden observarse en las curvas de Fuerza vs Distancia cuando el cantiléver se aleja de la muestra.

Es posible modificar la punta con grupos químicos, moléculas o células para luego evaluar su interacción con la muestra de interés. Por ejemplo, mediante esta técnica fue posible determinar la fuerza necesaria para romper las uniones entre dos oligonucleótidos complementarios al adherir una hebra simple cadena en el cantiléver y su hebra complementaria en la superficie [162, 163]. Por otro lado, la modificación de la punta con células permite estudiar interacciones entre células [164] o bien la interacción de las células con una superficie [165, 166].

OBEJTIVOS GENERALES DEL TRABAJO DE TESIS:

- 1) Fabricar sustratos con topografía controlada en su superficie.
- 2) Evaluar la adhesión de *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *Bacillus subtilis* 168 sobre los sustratos con diferente topografía.
- 3) Caracterizar las propiedades nanomecánicas del *biofilm* desarrollado sobre los sustratos de PDMS.

HIPÓTESIS:

La topografía del sustrato influye en las etapas temprana y tardía de la formación de *biofilms*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Fabricación de sustratos para evaluar la adhesión bacteriana.

1.1. Fabricación de superficies con estructura de ondas controladas.

Con el objetivo de estudiar el rol que ejerce la topografía del sustrato en el desarrollo de *biofilms*, se fabricaron superficies de polidimetilsiloxano (PDMS) con nano y microondas de forma regular. El PDMS se preparó mezclando el pre-polímero (dimetilsiloxano dimetil vinilo-terminado) y el *crosslinker* (agente de curado, dimetil-hidrogeno-siloxano; catalizador, hexacloro platinato) en relación 10:1 m/m (Sylgard 184, Dow Corning). Para obtener bloques lisos, esta mezcla se colocó en placas de Petri de vidrio, a las que previamente se las enjuagó cuidadosamente usando una solución de agua: peróxido de hidrógeno: amoníaco en relación 5:1:1. Para eliminar las burbujas de aire presentes en la mezcla, la placa de Petri con la mezcla se colocó en una estufa de vacío durante 1 hora a 20°C a baja presión (50 mbar). Posteriormente, se incubó a 60°C durante 3 horas para completar la polimerización. Los fragmentos rectangulares de PDMS de aproximadamente 0,2x4x1 cm de alto, largo y ancho, respectivamente, se montaron en un dispositivo fabricado en el laboratorio que utiliza un tornillo micrométrico de precisión para estirar uniaxialmente el elastómero de manera controlada como indica el protocolo descrito por Chiche y colaboradores [167] (Figura 4). Manteniendo el estiramiento, el PDMS se sometió a oxidación por plasma de aire (Diener, FEMTO) durante diferentes tiempos, lo que produce una delgada capa vítrea superficial de diferente espesor según el tiempo de exposición al plasma de aire. Al liberar la tensión del pre-estiramiento, el sustrato desarrolla un patrón de ondas sinusoidales orientadas en dirección transversal al estiramiento. La oxidación del PDMS por exposición al plasma se produce por el clivaje de los grupos Si-CH₃ y la formación de una capa vítrea, más densa y rica en SiO_x, produciendo una bicapa en “*sándwich*” con un alto contraste de módulo de elasticidad entre las capas vítrea (~ 220-790 MPa, dependiendo tiempo de oxidación) y polimérica (~ 4MPa) [168], tal como se requiere para la generación de arrugas. En la Figura 5 se muestra un resumen del protocolo utilizado.

Al variar el pre-estiramiento y la dosis (D) de oxidación de la superficie, es decir, el tiempo de exposición y la potencia del plasma ($D \equiv P \times t$) es posible manipular de forma controlada tanto la longitud de onda (λ) de la onda sinusoidal como su amplitud (A) (Figura 6). Otro parámetro que se varió durante el tratamiento de plasma fue el flujo de aire a la celda donde se genera el plasma en

condiciones de baja presión, este flujo permite modificar las condiciones de presión en la celda de exposiciones de plasma.

Existen modelos teóricos que proveen una predicción de cómo λ y A dependen del espesor de la capa vítrea, del porcentaje de pre-estiramiento y del estiramiento crítico (este último parámetro está directamente relacionado con la relación entre la rigidez del PDMS y la capa vítrea) [169].

Un artefacto menor e inevitable del proceso de fabricación de ondas sinusoidales es la generación de pequeñas rajaduras longitudinales a las ondas regulares sinusoidales. Sin embargo, este hecho solo afecta a una pequeña fracción del área superficial de las muestras. En la Tabla 2 se muestran los tratamientos que se realizaron sobre los fragmentos de PDMS para obtener ondas de distinto tamaño.

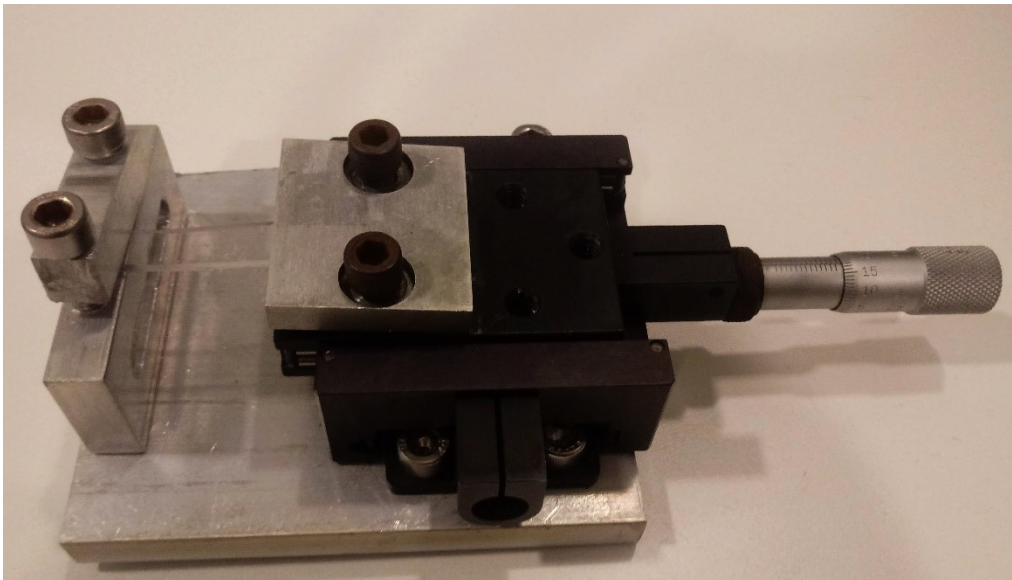


Figura 4. Dispositivo utilizado para estirar de manera controlada los fragmentos de PDMS.

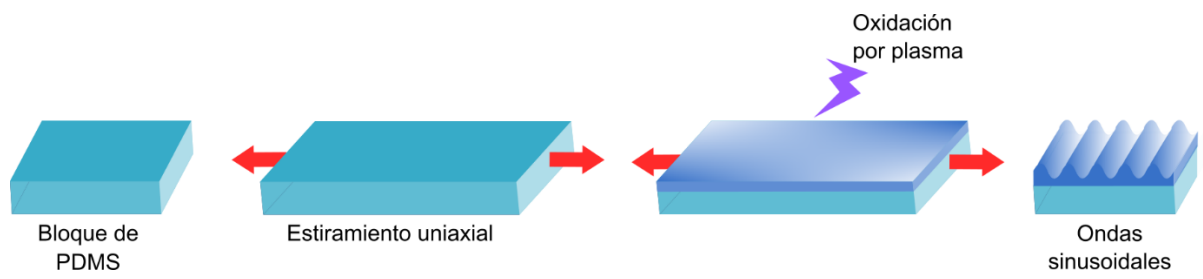


Figura 5. Esquema del protocolo de generación de arrugas mediante oxidación por plasma.

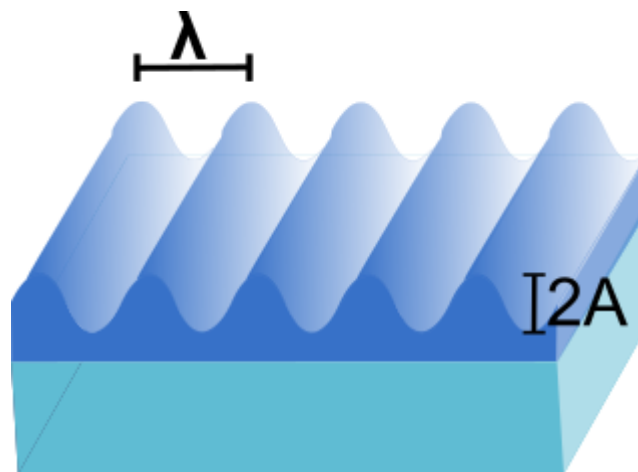


Figura 6. Esquema de los parámetros A y λ que definen las ondas de las superficies de PDMS.

Tabla 2. Tratamientos aplicados a los fragmentos de PDMS para obtener ondas de λ y A variadas.

Tiempo en el plasma (min)	Estiramiento (%)	Potencia (W)	Aire (L/h a CNPT)	Dosis (kJ)
5	0	30	0,2	9
5	15	100	0,2	30
5	30	100	0,2	30
5	15	30	0,2	9
5	30	100	0,5	30
5	30	50	0,2	15
5	10	50	0,2	15
5	30	100	0,5	30
5	30	50	0,5	15
5	30	100	0,5	30
10	0	30	0,2	18
10	15	100	0,2	60
10	10	100	0,2	60
10	30	50	0,2	30
15	10	100	0,2	90
15	15	100	0,2	90
15	30	50	0,2	45
30	15	100	0,2	180
30	20	100	0,2	180
30	20	30	0,2	54
30	15	50	0,2	90
30	10	50	0,2	90
30	30	50	0,2	90
30	15	100	0,5	180
30	15	50	0,2	90
60	15	100	0,5	360
60	10	30	0,5	108

1.2. Caracterización de los sustratos mediante AFM.

La topografía de las superficies de PDMS se analizó mediante AFM. Para ello, se cortaron cupones de aproximadamente 1x1 cm de los bloques de PDMS estructurados. Las mediciones se realizaron en aire a temperatura ambiente, mediante un microscopio de fuerza atómica Multimode 8 con un controlador Nanoscope V, Bruker. Se trabajó en método de contacto usando cantilévers de nitruro de silicio con una constante elástica de 0,05 N/m y un radio nominal de entre 20 y 60nm (MLCT, Bruker, Santa Barbara, CA). Para estimar el tamaño y comprobar la regularidad de las ondas, se tomaron 4 imágenes de 30x30 μm y 512 píxeles en cada superficie escaneada a una frecuencia de línea de 1 Hz. Las imágenes se analizaron mediante el software Gwyddion [170]. Las imágenes se aplanaron aplicando las herramientas de Gwyddion: 1) Alinear filas, 2) Eliminar rajaduras y 3) Aplanar fondo.

1.3. Rigidez del sustrato.

Según el modelo propuesto por Bayley y colaboradores [169], dependiendo de la dosis de oxidación por plasma varía el espesor de la capa vítrea superficial y por ende, la rigidez del sustrato. Frente a esto nos propusimos analizar la dureza de las superficies utilizando una técnica de nanoindentación por AFM. Para ello, se utilizaron cantilévers de nitruro de silicio con constantes elásticas nominales de 40 N/m (NCHV, Santa Barbaba, CA). Como esta constante es la que provee el fabricante y puede diferir levemente con la constante real de cada cantiléver, se realizó una calibración mediante la función *Thermal tune* presente en el software Nanoscope 9.1, que se basa en el método de fluctuación térmica de Hutter y Bechhoefer [153]. Como sustrato sólido para realizar la calibración del fotodiodo se utilizó un cupón de vidrio. Las mediciones se realizaron en aire a temperatura ambiente.

Para poder realizar un análisis estadístico de los valores de dureza, se tomaron curvas de Fuerza vs Distancia en al menos 25 sectores diferentes de los cupones de PDMS. La adquisición de las curvas de Fuerza se realizó a una velocidad de 500 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ aplicando un *trigger* para la fuerza de 50nN y un movimiento del piezoeléctrico de una distancia de 500 nm.

1.4. Ángulo de contacto – Hidrofobicidad

Para determinar el ángulo de contacto se depositó una gota de agua de 5 μ L sobre la superficie de un cupón de PDMS utilizando un equipo Ramé-Hart 190 CA. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software Ramé-Hart DROP. Sobre cada superficie se realizaron 5 mediciones con distintas gotas.

El valor del ángulo utilizado para caracterizar cada superficie es el promedio de las 5 mediciones con su respectivo desvío estándar.

2. Adhesión bacteriana sobre sustratos de PDMS.

2.1. Bacterias y condiciones de cultivo.

Para evaluar la adhesión sobre las superficies de PDMS se utilizaron dos bacterias modelo: *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *Bacillus subtilis* 168, Gram negativa y Gram positiva respectivamente. Ambas bacterias se conservaron a -80°C en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Britania) con un 20% de glicerol hasta el momento de utilizarlas. Antes de ser utilizadas en los distintos estudios, se cultivaron en placas de LB agar durante 24 hs a 30°C en el caso de *Pseudomonas* y a 37°C en el caso de *Bacillus*.

2.2. Adhesión sobre superficies de PDMS.

Para los ensayos de adhesión, las colonias aisladas se utilizaron para inocular caldo LB estéril y se incubaron en agitación (250 rpm) a la temperatura óptima de cada especie, durante 18 horas. Estos cultivos se usaron para inocular medio fresco líquido LB con una $\text{DO}_{i\ 600\text{nm}}=0,05$, el cual nuevamente se incubó durante toda la noche en las mismas condiciones que antes. Los cultivos obtenidos se aplicaron sobre las superficies como se detalla a continuación.

En el caso de *Pseudomonas*, los cultivos se diluyeron hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,04. Para ello, una fracción de los cultivos crecidos durante la noche, se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Utilizando el sobrenadante como medio condicionado, se realizó una dilución (aproximadamente 1/100 en la mayoría de los casos) para ajustar la DO hasta el valor deseado, 0,04.

A continuación, se colocó 1 mL de cultivo bacteriano en pocillos de placas de 24 pocillos. Los cupones de PDMS de 0,5x0,5 cm aproximadamente esterilizados previamente con etanol 70 % (v/v) se

colocaron sobre la suspensión bacteriana y se incubaron durante 1 o 3 horas a 30 o 37°C de forma estática.

Cada experimento se realizó por duplicado, conteniendo cada uno 3 réplicas independientes para cada superficie.

2.3. Preparación de la muestra y visualización mediante AFM.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los cupones en condiciones de esterilidad. Los cupones se enjuagaron suavemente con agua estéril 3 veces para eliminar aquellas bacterias que no estuviesen fuertemente adheridas. .

Para poder visualizarlas mediante AFM, las muestras se secaron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso.

Posteriormente, los cupones se adhirieron a los portamuestras de AFM, que son soportes metálicos imantados, mediante cinta adhesiva bifásica.

La visualización de las bacterias adheridas sobre las superficies de PDMS se realizó mediante AFM. Para ello, se utilizó un AFM MultiMode 8 con un controlador Nanoscope V (Bruker). Todas las imágenes se tomaron en aire a temperatura ambiente mediante el método de contacto intermitente (Scan Asyst®). Se utilizaron cantilévers con una constante elástica nominal de 0,4 N/m (ScanAsyst-air cantilévers, Bruker, Santa Barbara, CA).

Por cada cupón de PDMS, se tomaron 10 imágenes de 30x30 μm de 512 píxeles en sitios al azar.

2.4. Cuantificación del cubrimiento.

Para cuantificar el grado de adhesión se estimó el porcentaje de cobertura bacteriano sobre las diferentes superficies.

Para ello, mediante el software Gwyddion se realizaron máscaras de umbrales de altura en las regiones donde se encuentran las bacterias. El porcentaje de cobertura se estimó midiendo el área cubierta por bacterias y refiriéndola al total del área de cada imagen (30x30 μm) .

2.5. Análisis estadístico.

En primera instancia se realizó un test de Levene para determinar la heterocedasticidad de las muestras. A continuación, se realizó el test de Kruskal-Wallis para establecer si existe al menos una

población diferente. Por último, se aplicó el test de Tuckey *post-hoc* para comparar las poblaciones de a pares. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

2.6. Ensayo de viabilidad.

Con el objetivo de determinar si las superficies tienen un efecto bactericida, se utilizó el test de fluorescencia *LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit* (Invitrogen). Este kit está compuesto por dos sondas fluorescentes: SYTO9 que interacciona con todas las células y emite fluorescencia en la región del verde ($\lambda_{em\ máx}=498\text{nm}$) e Ioduro de propidio (IP), el cual se considera que tiñe a las bacterias muertas dado que sólo es capaz de penetrar las células con la membrana celular dañada. Este último, emite en la región del rojo ($\lambda_{em\ máx}=636\text{nm}$) y posee mayor afinidad por el DNA que SYTO9.

El ensayo de adhesión se realizó tal como se describe previamente en las muestras que se visualizaron por AFM. Luego del tiempo de incubación, los cupones se enjuagaron con agua estéril. Para teñir las células, se colocaron 10 μL de una dilución 1/200 de una mezcla de fluoróforos en agua destilada estéril. La mezcla de colorantes IP y SYTO9 se preparó en relación 1:1, con una concentración final de 20 μM de SYTO9 y 100 μM de IP.

Los sustratos se mantuvieron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, luego se enjuagaron cuidadosamente con agua estéril.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia. Para excitar ambos fluoróforos se utilizó un láser de 473nm (Laser Quantum Ventus 473nm). La emisión de los fluoróforos se colectó con un filtro ET700/75m (Chroma) para el IP y con un filtro ET535/50m (Chroma) para el SYTO9.

Para comparar la viabilidad de las bacterias sobre los distintos sustratos se calculó la relación entre bacterias intactas teñidas con SYTO 9 sobre el total de bacterias (teñidas con ambos colorantes).

Se realizaron 3 réplicas por cada superficie, partiendo de 3 colonias aisladas para cada cultivo.

Se analizaron al menos 20 imágenes de cada muestra utilizando el software libre ImageJ.

2.7. Espectroscopía de fuerzas: fuerzas de adhesión bacteria-sustrato.

Se empleó la técnica de espectroscopia de fuerzas usando un AFM para evaluar las fuerzas de adhesión entre las diferentes topografías analizadas y las bacterias. La finalidad de estos estudios fue correlacionar los grados de cobertura (bacterias) que se observaron para los distintos sustratos y las fuerzas de adhesión entre los sustratos y las bacterias.

Para ello, cantilévers de nitruro de silicio con una constante nominal de 0,07N/m (MLCT, Santa Barbara, Bruker) se cubrieron con una gota de polietilenimina (PEI) 0,1% (m/V), que se emplea para inmovilizar a las bacterias sobre la punta del cantiléver. Se incubaron durante 18 horas (ON) a 4°C y pasado este tiempo se enjuagaron con agua bidestilada estéril. Luego, se los dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secos, se los cubrió con una gota de 5 μ L de suspensión bacteriana y se los incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos dentro de una placa de Petri estéril. Posteriormente, se enjuagaron con agua estéril para eliminar las bacterias que no estuviesen adheridas y se mantuvieron en solución salina (NaCl 0,45g/100mL) hasta su uso.

La suspensión bacteriana consistió en cultivos de *B. subtilis* o *P. protegens* crecidos en caldo LB (Britania) durante 18 horas en agitación a 250 rpm, a la temperatura óptima de crecimiento de cada especie. Al cabo del tiempo de incubación, las bacterias se lavaron tres veces con agua estéril mediante centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm a 20°C y resuspensión del pellet bacteriano en 1 mL de agua estéril.

Durante este ensayo se trabajó en Modo de Contacto en líquido utilizando un Microscopio MultiMode 8 con un controlador Nanoscope V (Bruker). Para la obtención de las curvas de Fuerza vs Distancia se utilizó la función *Point and Shoot* del software Nanoscope 9.1 (Bruker). La calibración del fotodiodo se realizó utilizando un vidrio limpio inmerso en solución salina como sustrato rígido. Se requiere de una superficie rígida tal como el vidrio para que no ocurran fenómenos de indentación y de esta manera, la deflexión del *cantiléver* que se detecta en el fotodetector se corresponda con la distancia de movimiento del piezoeléctrico. La constante elástica del cantiléver se calculó mediante la función Thermal Tune del software Nanoscope 9.1. En todos los casos, la constante del cantiléver resultó entre 0,04-0,07 N/m.

Todas las mediciones fueron realizadas en solución salina de NaCl 0,45% de modo que las bacterias adheridas a la punta del cantilever, se encuentren en condiciones fisiológicas. El recorrido total del piezoeléctrico fue una distancia de 1 μ m para lograr que la punta se desprege totalmente del sustrato a una velocidad de 500nm.s⁻¹. La fuerza máxima aplicada fue de 1 nN, empleado como “*trigger*” del estudio y se adquirieron 2048 puntos por curva de fuerza. Se descartaron para los análisis posteriores las curvas en las que la punta no se despega completamente. Por cada superficie se tomaron al menos 100 curvas de retracción manteniendo en contacto durante 5 segundos el

cantiléver y el sustrato una vez que se alcanzó la fuerza máxima (1nN) antes de retraer el piezoeléctrico.

Este experimento se realizó por duplicado, utilizando 2 cantilévers funcionalizados con bacterias de cultivos independientes.

2.7.1. Cuantificación de las fuerzas de interacción bacteria-sustrato.

Una vez obtenidas las curvas de Fuerza vs Distancia, se analizaron los eventos de adhesión mediante el programa MATLAB. El código utilizado se encuentra en el Apéndice. Las curvas se analizaron de manera individual para determinar el valor de las fuerzas de interacción y el largo de las uniones, es decir, la distancia entre el punto de unión y el punto de ruptura de la interacción. En la Figura 7 se ejemplifican curvas con uno o múltiples eventos de adhesión y cómo se obtuvieron los parámetros mencionados. Los resultados de este análisis se graficaron en histogramas.

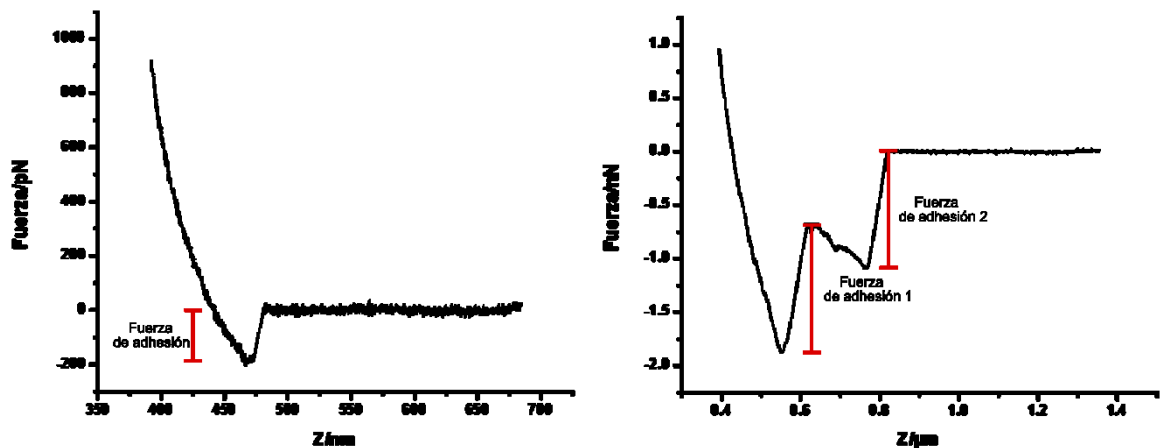


Figura 7. Curvas de fuerza típicas con uno (A) o múltiples eventos de adhesión (B). El valor de fuerza se obtiene restando el valor mínimo del pico de adhesión en el eje Y y el valor en que se rompe el evento de adhesión.

2.7.2. Visualización del cantiléver mediante SEM.

Al finalizar las mediciones de fuerza, los cantilévers se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM Carl Zeiss NTS SUPRA 40, Centro de Microscopias Avanzadas, FCEN, UBA) para verificar la presencia de bacterias en la punta del cantiléver. Para ello, previamente los cantilévers se cubrieron e incubaron durante 1 hora con una solución de paraformaldehído 4% (4g/100mL buffer PBS). Pasado ese tiempo, se retiró el exceso de solución de PFA y se los enjuagó cuidadosamente con buffer PBS. A continuación, las bacterias se deshidrataron mediante una serie de incubaciones de 15 minutos en soluciones de concentración creciente de etanol (30, 50, 70 y 100%) y se las conservó a 4°C hasta su observación.

2.7.3. Análisis estadístico.

Para determinar la normalidad de las poblaciones, se realizó el test de Lilliefors. Dado que los datos no tuvieron distribución normal, para comprobar si existían diferencias significativas se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue $<0,05$.

3. Estudio nanomecánico de *biofilms*.

3.1. Bacterias y condiciones de crecimiento.

Para evaluar la formación de *biofilms* maduros sobre las superficies de PDMS se utilizaron nuevamente *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *Bacillus subtilis* 168. Se conservaron y crecieron tal como se describió previamente.

Los cultivos líquidos para inocular la celda de flujo se crecieron en caldo LB a 250 rpm y a la temperatura óptima de cada especie durante 18 hs.

3.2. Celda de flujo.

Se utilizó un sistema de crecimiento en flujo bajo la configuración que se muestra en la Figura 8. Básicamente, este sistema consiste en una celda de vidrio con un volumen de 300 mL que cuenta con una entrada y una salida de flujo, dispuestas de manera enfrentada. Dentro de la celda se depositan los soportes sobre los cuales se desea evaluar la formación de *biofilms* y se hace circular

medio de cultivo fresco mediante una bomba peristáltica conectada a los orificios de entrada y salida por mangueras de silicona. La celda se mantiene sellada de manera hermética por un O-ring de goma y tornillos que mantienen presionadas la tapa y base de la celda.

Para estos experimentos, los cupones de PDMS se adherieron mediante cinta bifaz a la base de la celda para mantenerlos fijos y con la superficie de interés hacia arriba.

Tanto el reservorio de medio de cultivo como las mangueras de silicona se esterilizaron en autoclave. Para esterilizar la celda de cultivo con las superficies adheridas se realizaron lavados sucesivos con hipoclorito de sodio seguido por lavados con agua estéril hasta eliminar completamente los restos de hipoclorito.

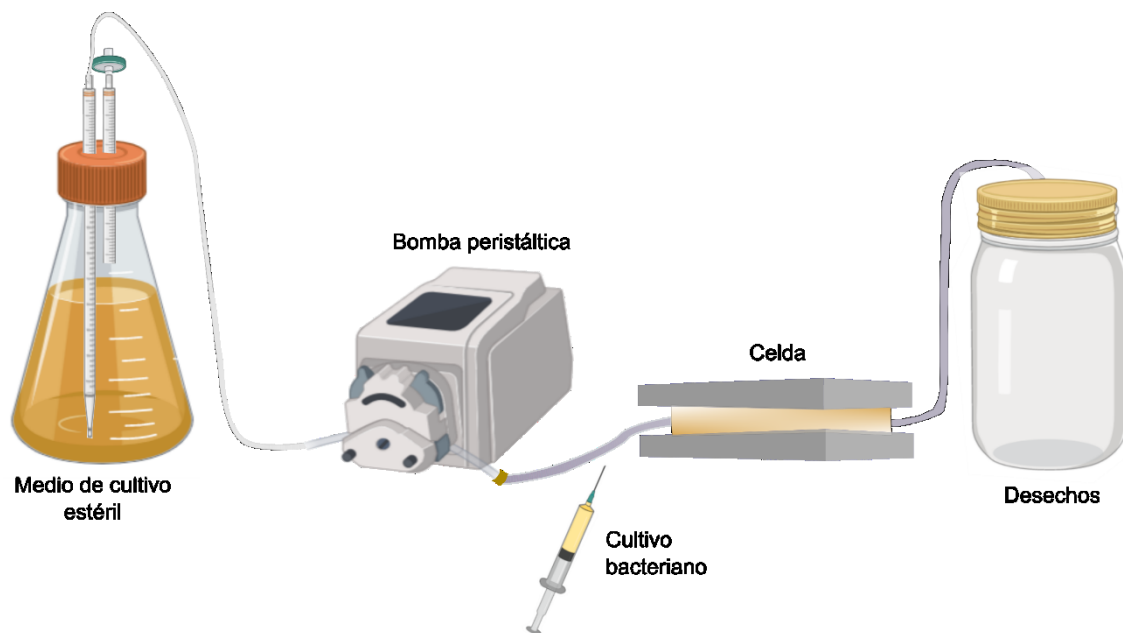


Figura 8. Esquema del sistema de crecimiento en flujo y sus componentes.

3.3. Crecimiento de *P. protegens* y *B. subtilis* en el sistema de cultivo dinámico.

A fin de evaluar la formación de *biofilm* sobre las distintas superficies, el sistema de flujo continuo fue inoculado en condiciones de esterilidad inyectando en la manguera de entrada 5 mL de cultivo bacteriano crecido durante 18 hs. Para permitir la adhesión bacteriana a los cupones de PDMS, no se circuló medio fresco durante la primera hora de incubación. Al cabo de la primer hora se

comenzó a circular medio LB o medio mínimo M9 a un caudal constante de 0,25 mL/min de manera de renovar el volumen de la celda cada 24 hs. El reservorio de medio de cultivo estéril se mantuvo en condiciones de aireación sin agitación.

Finalmente, para analizar el desarrollo de *biofilm* sobre los distintos cupones, éstos se removieron cuidadosamente en condiciones de esterilidad, se enjuagaron suavemente y mantuvieron en solución fisiológica (0,9g NaCl/100 mL) hasta su visualización.

3.4. Tinción con cristal violeta.

La tinción con cristal violeta (CV) permite una visualización rápida y sencilla de los *biofilms*. Por ello, los *biofilms* formados sobre los cupones de PDMS se cubrieron con 200 µL de una solución acuosa de CV 0,1%. Se los incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se los enjuagó cuidadosamente con agua estéril. Para su observación se utilizó un microscopio óptico con distintos objetivos (40X, 100x y 400X) (Olympus).

3.5. Visualización y Estudio de las propiedades mecánicas mediante AFM en condiciones fisiológicas.

Las mediciones se realizaron con un AFM MultiMode 8 conectado a un controlador Nanoscope V (Bruker) a temperatura ambiente mediante el método de contacto intermitente (Scan Asyst®). Los cupones de PDMS con *biofilm* se mantuvieron sumergidos en solución fisiológica durante toda la medición. Se utilizaron cantilévers de nitruro de silicio con una constante nominal de 0,7 N/m (SCANASYT-FLUID, Santa Barbara, Bruker). Al comenzar las mediciones, se calibró la sensibilidad del fotodetector utilizando un disco de mica cubierto en solución fisiológica como sustrato rígido y se estableció la constante del resorte del cantiléver mediante la función *Thermal Tune del software Nanoscope 9.1*. En todas las mediciones la constante presentó valores entre 0,02 y 0,05 N/m.

La adquisición de imágenes se realizó a una frecuencia de escaneo por línea de 0,8 Hz ($31\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) y con una fuerza máxima de entre 800 pN-1,5nN. Se tomaron 10 imágenes de 30x30 µm con una resolución 512 píxeles, tomando aproximadamente 7 min la captura de cada imagen.

A continuación, se obtuvieron las curvas de fuerzas para la determinación de las propiedades nanomecánicas de los *biofilms* mediante la función *Point and Shoot* presente en el software Nanoscope 9.1. Estas curvas sólo se tomaron en zonas cubiertas con microorganismos aplicando

una fuerza máxima de 3 nN, con una distancia de desplazamiento del piezoeléctrico de 1 μ m y una velocidad de 2 μ m.s⁻¹.

3.5.1. Análisis de las curvas de fuerza.

Para la estimación del Módulo de Young de los *biofilms*, se exportaron individualmente las curvas de acercamiento (Fuerza vs Indentación) en formato *txt* y se analizaron mediante el software Origin 8.0. Una vez graficadas, se determinó manualmente el punto de contacto entre la punta y el *biofilm*. A partir de ese punto las curvas se ajustaron al Modelo de Sneddon (Ecuación 1) del cual se extrae el Módulo de Young. Este modelo es una variación del modelo de Hertz, que considera un indentador cónico en lugar de esférico.

$$F = \frac{2Etan\alpha}{\pi(1-\nu)^2} \delta^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde F es la fuerza aplicada a la muestra; α es el ángulo de apertura de la punta (dato del fabricante); ν es el coeficiente de Poisson, que suele ser 0,5 para materiales biológicos; δ es la distancia de indentación en la muestra y E el Módulo de Young.

Los valores de E obtenidos se graficaron como *Box plots*, donde las cajas contienen el 50% de los datos y el 80% entre los bigotes.

3.5.2. Análisis estadístico.

Para determinar la normalidad de las poblaciones, se realizó el test de Lilliefors. Dado que los datos no tuvieron distribución normal, para comprobar si existían diferencias significativas se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue <0,05.

RESULTADOS

Capítulo I:

Fabricación de sustratos para el estudio de formación de *biofilms*.

RESULTADOS.

Siguiendo el protocolo propuesto por Chiche y colaboradores se fabricaron bloques de PDMS con ondas regulares en su superficie [167]. En la Figura 9 se muestra a modo de ejemplo una de las superficies de PDMS donde puede observarse la topografía y regularidad obtenidas. En todos los casos, el tamaño de las ondas se determinó mediante el análisis de las imágenes obtenidas por AFM. Al variar el porcentaje de pre-estiramiento y la dosis de plasma al que fueron sometidos los bloques de PDMS, se lograron superficies con ondas de amplitud y periodicidad variada (Tabla 3 y Figura 10). En las condiciones estudiadas, el rango de las ondas varió entre $0,4\mu\text{m}$ - $3,3\mu\text{m}$ de periodicidad y 60 - 430 nm de amplitud. A su vez, para un dado porcentaje de pre-estiramiento, se observó una correlación positiva entre la longitud de onda y la dosis de plasma (Figura 11).

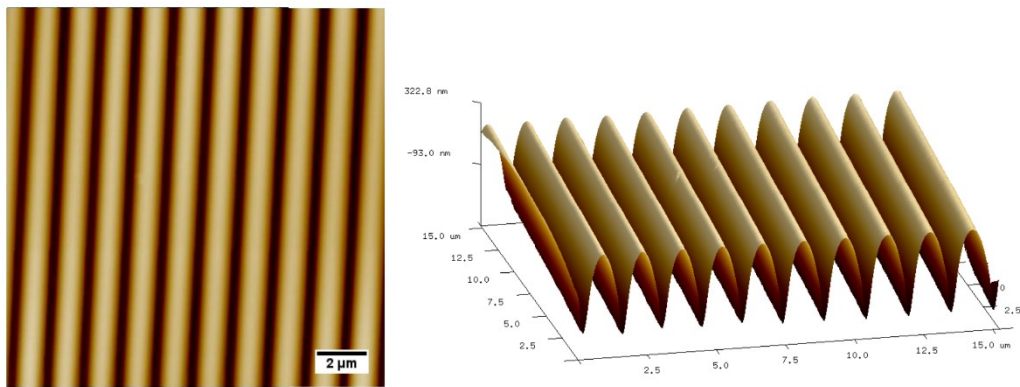


Figura 9. Imagen representativa de una de las superficies de PDMS con ondas regulares obtenida mediante AFM.

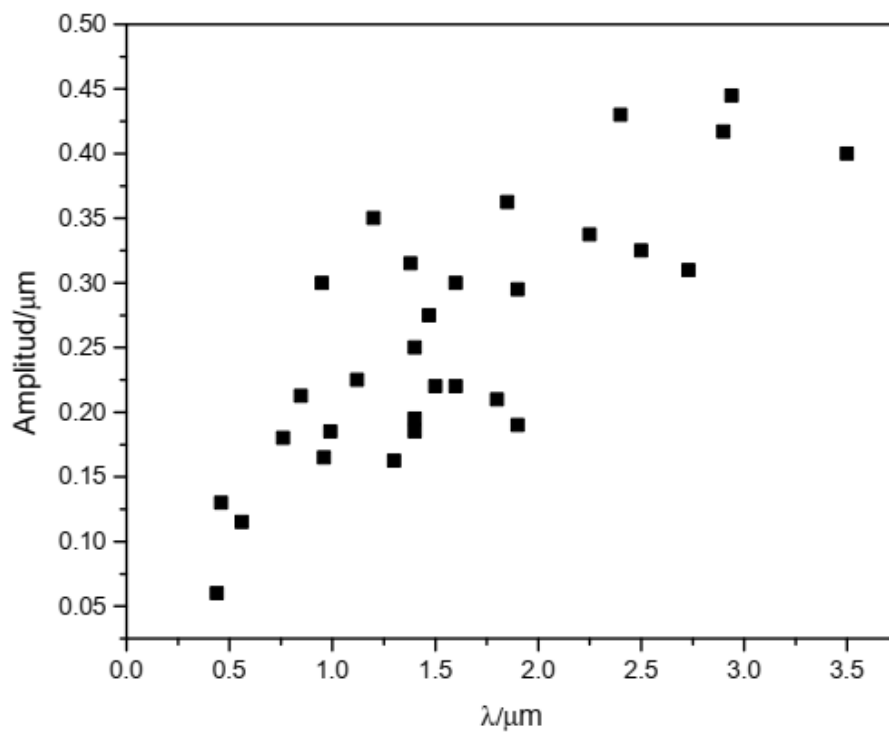


Figura 10. Amplitud (A) vs Longitud de onda (λ) de las ondas generadas sobre las superficies de PDMS.

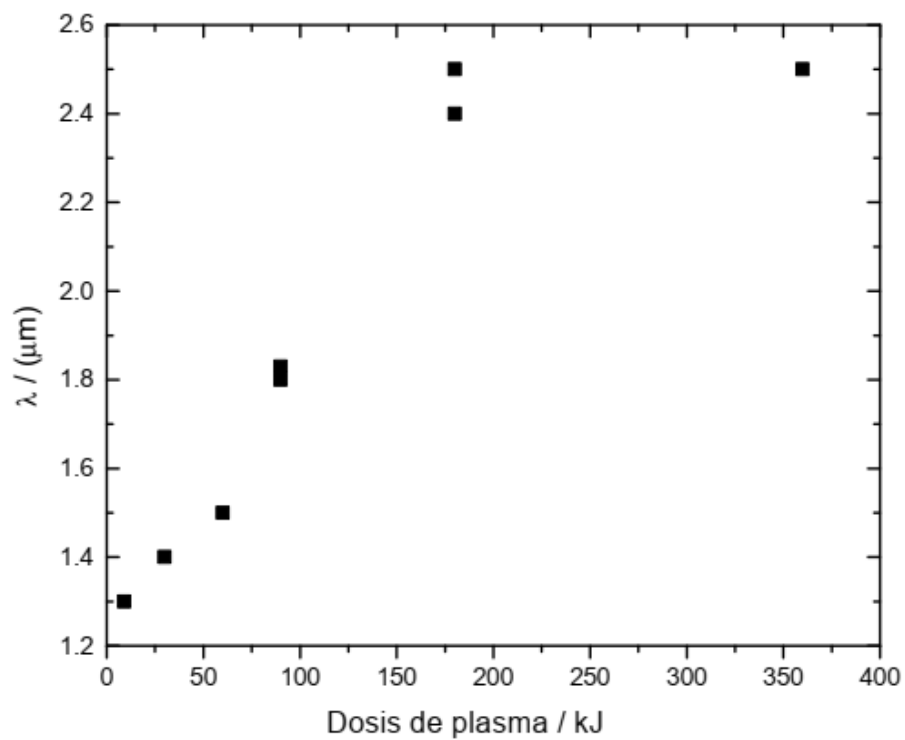


Figura 11. Longitud de onda vs Dosis de plasma para un pre-estiramiento del 15%.

Como se mencionó anteriormente, la hidrofobicidad de la superficie es uno de los factores que afectan la adhesión bacteriana. Por ello, se midió el ángulo de contacto entre una gota de agua y algunas de las superficies como estimador de la hidrofobicidad. Cuando el ángulo resultante es mayor a 90° , la superficie se considera hidrofóbica, y por el contrario, cuando el ángulo es menor a 90° se especifica que la superficie es hidrofílica. Además, como los estudios de adhesión bacteriana y formación de *biofilm* se desarrollan en medio acuoso, se estimó el ángulo de contacto de las superficies sin previo contacto con agua y otras a las cuales se las incubó en agua bidestilada estéril durante 18 hs. Por otro lado, se comparó la hidrofobicidad del PDMS sin pre-estiramiento ni tratamiento con plasma (Lisa No Tratada) y PDMS sin pre-estiramiento, pero que fue tratado con plasma durante 5 y 10 minutos (Lisa Tratada). Los resultados se muestran en la Figura 12 y se detallan en la Tabla 3.

Por un lado, no se vieron diferencias significativas en el ángulo de contacto entre la gota de agua y las superficies de PDMS incubadas o no con agua. A su vez, tal como se esperaba, el PDMS Liso No Tratado resultó hidrofóbico con un ángulo de contacto con la gota de agua de $107^\circ \pm 8^\circ$. Al oxidarlo el PDMS mediante plasma, se genera una capa vítrea superficial que resulta en un sustrato hidrofílico con un ángulo de contacto con el agua de $82^\circ \pm 11^\circ$. Por otro lado, si bien las superficies con nano y microondas presentan la misma composición química que la superficie lisa tratada, todas resultaron hidrofóbicas. Esto coincide con el modelo de Cassie, donde se propone que gracias a la topografía el aire queda atrapado entre las estructuras, inhibiendo el mojado de la superficie [38].

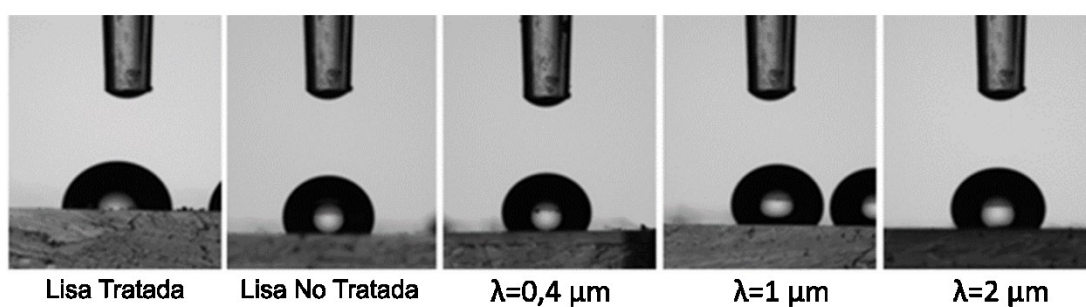


Figura 12. Mediciones de ángulo de contacto entre el agua y A) PDMS Liso No Tratado; B) PDMS Liso Tratado con plasma; C) PDMS con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$; D) PDMS con ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$ y E) PDMS con ondas de $\lambda=2\mu\text{m}$.

Tabla 3. Caracterización de las superficies en cuanto a tamaño de los patrones de topográficos de ondas y ángulo de contacto para las diferentes condiciones superficies topográficas producidas.

Tiempo en el plasma (min)	Estiramiento (%)	Potencia(W)	Aire(L /h a CNPT)	λ (nm)	2A (nm)	Dosis de plasma (kJ)	Ángulo de contacto sup. incubada en agua (°)	Ángulo de contacto (°)
0	0	0				0	113±1	107±8
5	0	30	0,2			9	95±3	82±11
10	0	30	0,2			18	86±10	90±8
5	30	100	0,5	440	120	30	123±6	115±4
5	15	100	0,2	1400	390	30		
5	30	100	0,2	847	347	30	131±4	
5	15	30	0,2	1300	300	9		
5	30	50	0,2	925	320	15	125±6	122±3
5	10	50	0,2	1270	343	15	117±4	118±4
5	30	50	0,5	430	190	15	117±5	118±7
10	30	100	0,2	560	230	60	120±5	121±4
10	15	100	0,2	1500	395	60		
10	10	100	0,2	1700	430	60		
10	30	50	0,2	1350	500	30		
15	30	100	0,2	980	460	90	122±6	125±4
15	10	100	0,2	1900	380	90		
15	15	100	0,2	1800	530	90		
15	30	50	0,2	1450	525	45	127±3	128±5
30	30	100	0,2	960	330	180		
30	40	100	0,2	1200	700	180		
30	20	100	0,5	1800	420	180		
30	15	100	0,5	2500	650	180		
30	15	100	0,2	2400	860	180		
30	20	100	0,2	2600	777	180	121±5	117±3
30	20	30	0,2	1470	535	54		
30	20	30	0,5	1480	475	54		
30	15	50	0,2	2200	675	90	120±3	121±3
30	10	50	0,2	2700	590	90	115±6	114±2
30	30	50	0,2	1725	660	90		
30	15	50	0,5	1830	470	90	110±6	114±2
60	30	100		1120	450	360		
60	15	100	0,5	2500	630	360		
60	10	30	0,5	3300	675	108		

A partir de estos resultados, para los ensayos posteriores se seleccionaron cinco superficies. Dos superficies lisas, una que ha sido tratada con plasma (Lisa Tratada) y otra que no se ha expuesto a oxidación con plasma (Lisa No Tratada) y tres superficies con topografía de patrones de ondas de: $\lambda=0,44 \mu\text{m}$, $\lambda= 0,98 \mu\text{m}$ y $\lambda= 2,2 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 4). En la Figura 13 se muestran imágenes de estas superficies que fueron adquiridas mediante AFM con sus respectivos perfiles topográficos. La elección de estas superficies se realizó teniendo en cuenta el tamaño promedio de las bacterias utilizadas en este trabajo, el cual ronda entre 1-2 μm de largo y aproximadamente 1 μm de diámetro. De manera que las ondas de las tres superficies seleccionadas sean: i) menor al diámetro de las bacterias, ii) una con ondas de tamaño semejante al de las bacterias y ii) de tamaño mayor al diámetro de las bacterias.

Tabla 4. Superficies elegidas para evaluar el desarrollo de *biofilms*.

	λ (nm)	Amplitud (nm)
Lisa No Tratada	---	---
Lisa Tratada	---	---
$\lambda =0,4 \mu\text{m}$	440	60
$\lambda =1 \mu\text{m}$	980	230
$\lambda =2 \mu\text{m}$	2200	335

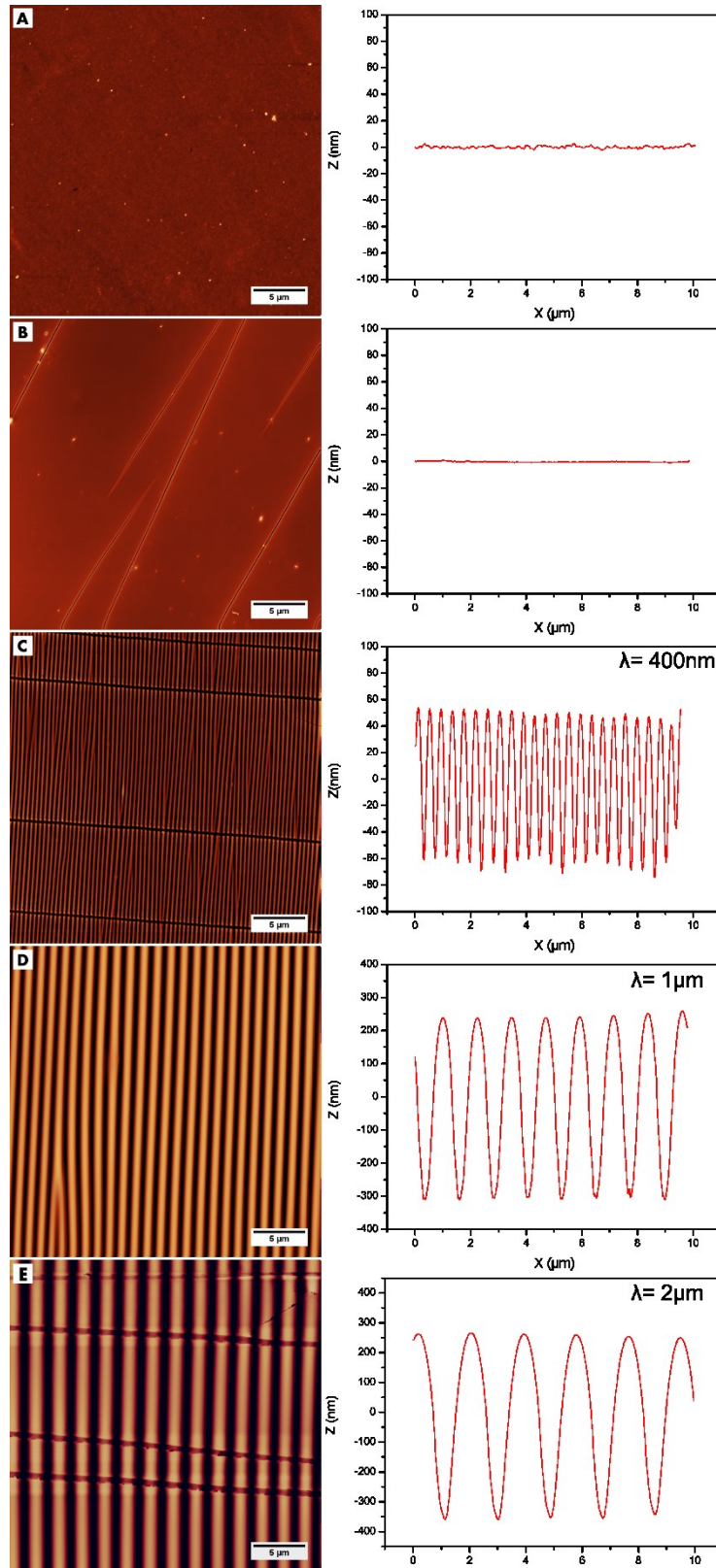


Figura 13. Imágenes de AFM representativas de las superficies seleccionadas para estudiar adhesión bacteriana y desarrollo de biofilms y sus respectivos perfiles topográficos.

Como se mencionó en la introducción, un factor que influye en la adhesión bacteriana es la rigidez del sustrato. Por ello, dado que el espesor de la capa vítrea superficial del PDMS depende de la dosis de exposición al plasma y las superficies seleccionadas fueron sometidas a distintos tratamientos, nos propusimos estudiar la rigidez de las superficies. Para ello, mediante nanoindentación por AFM y posterior ajuste de las curvas de fuerza al modelo de Sneddon (Ecuación 3), se estimó el Módulo de Young. El módulo de Young o módulo de elasticidad es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico y su valor se define como el cociente entre la tensión aplicada y la deformación del material obtenida por dicha tensión. El módulo de Young indica la rigidez de un material, cuanto más rígido es un material mayor es su módulo de Young. Tal como se muestra en la Tabla 5, la superficie menos rígida es la superficie de PDMS sin tratar, con un Módulo de Young de 8 MPa. Por otro lado, se observa una correlación entre el tiempo de exposición al plasma y la rigidez de las superficies. En las superficies que fueron sometidas a la oxidación con plasma durante 5 minutos (Lisa Tratada y $\lambda=0,4\ \mu\text{m}$), no se observan diferencias en la rigidez de la superficie. En cambio, al aumentar el tiempo del tratamiento, se nota un incremento en el valor del Módulo de Young. Cabe destacar que si bien en las superficies con $\lambda=1\ \mu\text{m}$ y $\lambda=2\ \mu\text{m}$ la dosis de plasma fue la misma (es decir el tiempo x potencia de exposición al plasma), la presión de aire utilizada fue diferente en ambas superficies y por ello quizás no poseen un mismo valor de dureza. Igualmente ambas superficies ($\lambda=1\ \mu\text{m}$ y $\lambda=2\ \mu\text{m}$) poseen un Módulo de Young aproximadamente 1 orden de magnitud mayor que la Lisa Tratada y la superficie con topografía de ondas de $\lambda=0,4\ \mu\text{m}$.

Tabla 5. Módulo de Young de las superficies con diferente topografía elegidas para estudiar el desarrollo de *biofilms*.

Superficie	Módulo de Young
Lisa No Tratada	8
Lisa Tratada	21
$\lambda=0,4\ \mu\text{m}$	15
$\lambda=1\ \mu\text{m}$	118
$\lambda=2\ \mu\text{m}$	213

Con la finalidad de aumentar la hidrofobicidad de los sustratos, y posteriormente, generar nanopostes, se comenzó con la fabricación de superficies estructuradas de poliestireno utilizando como moldes las superficies de PDMS descritas previamente.

Si bien se lograron visualizar ondas en la superficie de poliestireno, éstas no se distribuían de manera homogénea sobre toda la superficie y además, tanto la longitud de onda como la amplitud eran notablemente más pequeñas que las de la superficie molde (Figura 14).

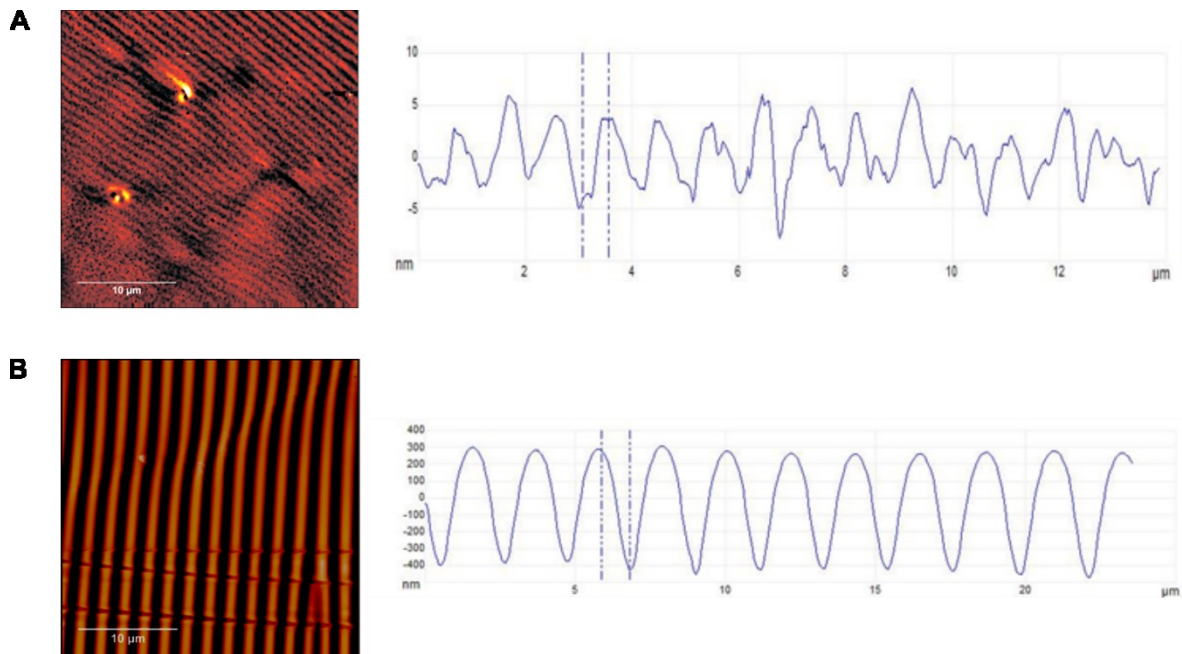


Figura 14. Imágenes adquiridas mediante AFM de las superficies con ondas de poliestireno (A) y de la superficie molde de PDMS (B) con sus respectivos perfiles topográficos.

DISCUSIÓN.

En la búsqueda de nuevos materiales que controlen la formación de *biofilms*, se han desarrollado superficies capaces de repeler o matar distintos microorganismos. En particular, las superficies que regulan el desarrollo de *biofilms* gracias a la topografía de su superficie han ganado particular interés dado que su acción podría perdurar en el tiempo. Su efectividad depende de parámetros como la geometría, distribución y tamaño de las estructuras superficiales. En este sentido, nos propusimos variar sistemáticamente un solo parámetro: el tamaño de las estructuras. Para ello, siguiendo el protocolo propuesto por Chiche y colaboradores realizamos sustratos con ondas regulares [167]. Al modificar las condiciones de pre-estiramiento, dosis de plasma y flujo de aire logramos obtener ondas en el rango de los 0,4-3,3 μm de longitud de onda y 60-430 nm de amplitud. Observamos que existe una correlación entre la amplitud y longitud de onda. Esto concuerda con el hecho de que ambos parámetros dependen del espesor de la capa vítrea superficial, y por ello no pueden modificarse de manera independiente. Además, al igual que un trabajo realizado por Bayley [169], observamos una correlación entre el tamaño de las ondas (en particular, la longitud de onda) y la dosis de exposición al plasma de los cupones de PDMS. Al medir el ángulo de contacto entre una gota de agua y las superficies de PDMS, vimos un aumento en la hidrofobicidad en las superficies con ondas respecto a la superficie Lisa Tratada (igual composición en la superficie). Esto coincide con el modelo conocido como régimen de Cassie, el cual propone que estructuras de cierto tamaño y distribución, provocan que el aire quede atrapado entre éstas, generando así una superficie hidrofóbica.

Este es un método sencillo, no litográfico, de bajo costo, que nos permitió obtener superficies con topografías de patrón de ondas uniformes en áreas grandes (centímetros) en poco tiempo y utilizando un material biocompatible como el PDMS.

CONCLUSIONES.

- 1) Logramos obtener superficies con patrones de ondas regulares de manera rápida y sencilla.
- 2) La topografía modifica el ángulo de contacto del agua con las superficies, tornándolas hidrofóbicas.
- 3) La dosis de plasma incrementa la rigidez del sustrato.

CAPÍTULO II

Influencia de la topografía en la adhesión bacteriana.

RESULTADOS.

1. Cubrimiento bacteriano sobre los cupones de PDMS.

El primer paso para la formación de *biofilms* consiste en la adhesión de las bacterias planctónicas a una superficie. En numerosos trabajos se menciona a la topografía como un factor determinante en esta etapa [39, 171, 172]. Por ello, nos propusimos estudiar la adhesión de dos bacterias modelos sobre las superficies de PDMS con topografía de ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$, $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$. Además, para descartar el efecto que pueda tener la hidrofobicidad o composición de la superficie, se utilizaron cupones de PDMS Liso No Tratado y PDMS Liso Tratado con plasma durante 5 minutos.

Para ello, los cupones de PDMS se incubaron sobre los cultivos de *P. protegens* Pf-5 o *B. subtilis* 168 durante 1 o 3 horas a la temperatura óptima de cada bacteria y sin agitación; para evaluar la adhesión bacteriana a cortos (1h) e intermedio (3h) lapso de tiempo. Pasado este tiempo, los cupones se retiraron y enjuagaron cuidadosamente con agua estéril. Para cuantificar el porcentaje de adhesión, los cupones se secaron con un flujo de nitrógeno gaseoso y se observaron mediante AFM.

1.1. Adhesión de *P. protegens* Pf-5.

Al estudiar la adhesión de *P. protegens* sobre los diferentes cupones de PDMS se observaron diferencias marcadas entre las diferentes topografías, tanto en el porcentaje de cubrimiento como en la forma en que se encontraban adheridas las células. Para cuantificar la adhesión, se estimó el cubrimiento como el porcentaje del área de la superficie geométrica cubierto por bacterias. Por un lado, en las superficies lisas o con ondas nanométricas ($\lambda=0,4\mu\text{m}$), las bacterias se encuentran adheridas mayormente en forma de aglomerados o balsas (Figura 15). Además, el área cubierta por bacterias de estos sustratos resulta significativamente menor al área colonizada en las superficies con ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$. En éstas últimas, el porcentaje de cubrimiento que se observa en las imágenes llega aproximadamente al 80% en algunas zonas del cupón, mientras que en las superficies lisas o con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ el cubrimiento máximo es inferior al 10% (Figura 16.A).

Por otro lado, en las superficies con topografía con patrones que poseen longitud de onda de 1 y 2 μm puede distinguirse bacterias individuales confinadas entre los valles.

Transcurridas las 3 horas de incubación, en todas las superficies estudiadas se observan zonas completamente cubiertas con bacterias, aunque en las superficies con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$ existen zonas sin colonizar o con poca cantidad de bacterias (Figuras 15 y 16.B).

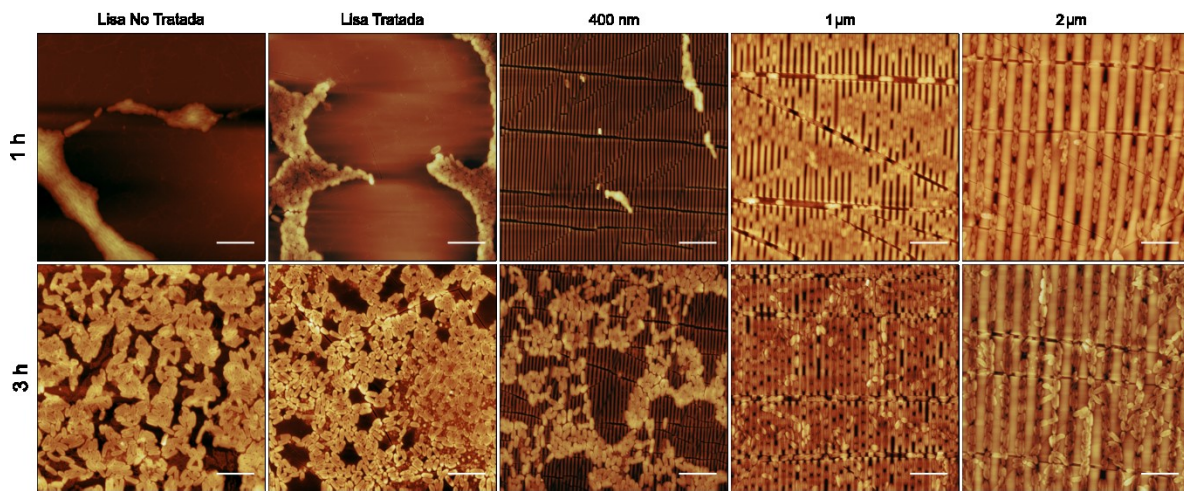


Figura 15. Imágenes representativas de las superficies de PDMS incubadas sobre cultivos de *P. protegens* Pf-5 ($\text{DO}_{600\text{nm}}\approx 4$) durante 1 o 3 horas adquiridas mediante AFM. Barra de escala= 5 μm .

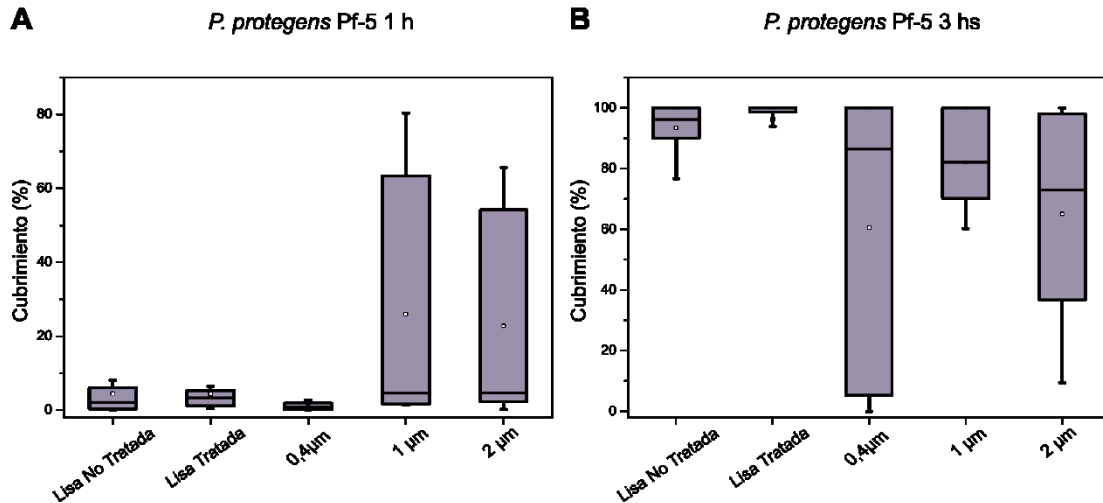


Figura 16. Porcentaje de cubrimiento de los cupones de PDMS luego de A) 1 hora y B) 3 horas de incubación con *P. protegens* Pf-5 ($DO_{600nm} \approx 4$). Las cajas contienen el 50% de los datos y el 80% de los datos se encuentra entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (\square) representan la mediana y la media, respectivamente.

Con el objetivo de determinar si los aglomerados se forman debido al *crowding* celular, se repitió el ensayo de adhesión pero realizando diluciones 1/100 de los cultivos en medio condicionado para no alterar el estado metabólico de las bacterias ($DO_{600nm} = 0,04$). Luego de 1 y 3 horas de incubación, se observan bacterias adheridas distribuidas de forma heterogénea, con campos de observación mayormente cubiertos por bacterias y otros donde no se observa ninguna célula. Por otro lado, como se observa en la Figura 17 tanto en las superficies lisas como en la superficie con ondas de $\lambda = 0,4 \mu m$, la mayoría de las bacterias continúan adheridas en forma de aglomerados al igual que al incubarlas con cultivos sin diluir. En cambio, en los cupones con topografía de ondas de mayor longitud de onda, las células permanecen confinadas de manera individual entre los valles de las superficies.

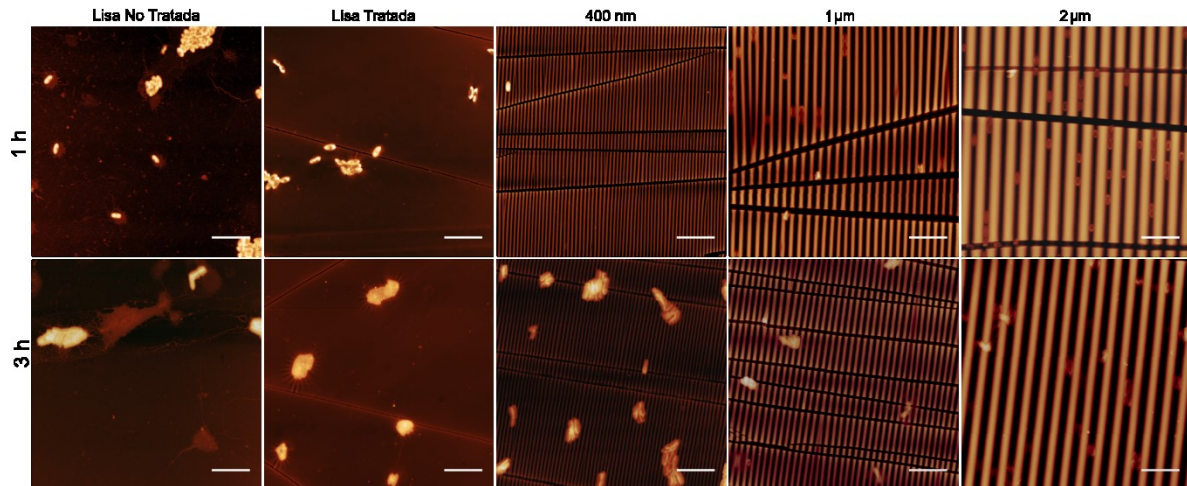


Figura 17. Imágenes representativas de las superficies de PDMS incubadas sobre cultivos de *P. protegens* PF-5 diluidos en medio condicionado ($DO_{600nm}=0,04$) durante 1 o 3 horas adquiridas mediante AFM.

Luego de 1 hora de incubación, el porcentaje de cubrimiento de *P. protegens* sobre las superficies Lisas Tratada o No tratadas con plasma fue similar (Figura 18.A). Sin embargo, en las imágenes que corresponden a los cupones de PDMS Liso No Tratado se observan “parches”, posiblemente de EPS, aunque mediante este método no es posible determinar la naturaleza de éstos. Por otro lado, el porcentaje de cubrimiento en las superficies con ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ es significativamente menor al observado en la superficie Lisa Tratada y a las superficies con patrones de ondas mayores (Figura 18.A). En cambio, luego de 3 horas de incubación, la mayor cobertura con células se presenta en las superficies con las ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ (Figura 18.B). Entre las superficies con ondas mayores y las superficies lisas, las diferencias en el porcentaje de cobertura no son significativas.

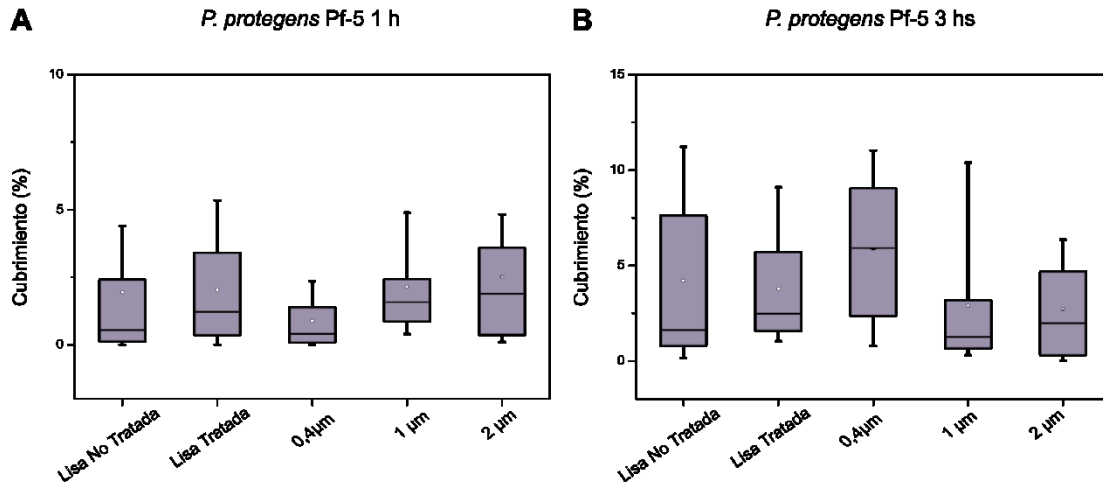


Figura 18. Porcentaje de cubrimiento de los cupones de PDMS luego de A) 1 hora y B) 3 horas de incubación con cultivos de *P. protegens* Pf-5 diluidos en medio condicionado ($DO_{600nm}=0,04$). Las cajas contienen el 50% de los datos y el 80% de los datos se encuentra entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (\square) representan la mediana y la media, respectivamente.

1.2. Adhesión de *B. subtilis* 168.

Como primera observación al evaluar la adhesión en *B. subtilis* sobre las superficies de PDMS, se notó que el porcentaje de cubrimiento fue considerablemente menor que para *P. protegens*. Por otro lado, al igual que con *Pseudomonas*, en las superficies lisas o con ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ las bacterias se encontraban mayormente en forma de aglomerados y de forma individual en las superficies con patrón topográfico de longitud de onda de 1 y 2 μm (Figura 19). A su vez, en las superficies Lisas No Tratadas con plasma, se observan parches en forma de fibras adheridos a la superficie.

Comparando el porcentaje de cubrimiento entre las superficies, luego de 1 hora de incubación en las superficies Lisas No Tratadas y la superficie con ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ se hallaban muy pocas bacterias adheridas. En la superficie Lisa Tratada con plasma se observó el mayor porcentaje de área de cubrimiento y no se observaron diferencias significativas entre los cupones con ondas de $\lambda=1 \mu\text{m}$ y $\lambda=2 \mu\text{m}$ (Figura 20.A).

Luego de 3 horas de incubación, el porcentaje de cubrimiento en cada imagen fue muy heterogéneo, con algunas zonas sin bacterias y otras casi cubiertas en su totalidad. Sólo se observó un aumento

significativo del cubrimiento en las superficies con ondas de $\lambda=2 \mu\text{m}$ respecto a las superficies Lisa No Tratadas y de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ (Figura 20.A).

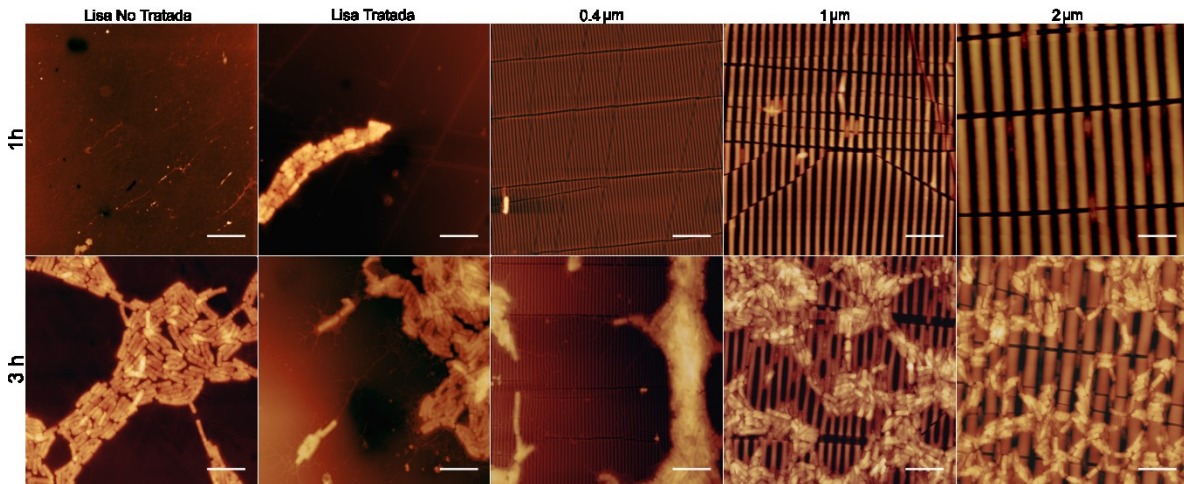


Figura 19. Imágenes representativas de las superficies de PDMS incubadas con *B. subtilis* 168 durante 1 o 3 horas adquiridas mediante AFM.

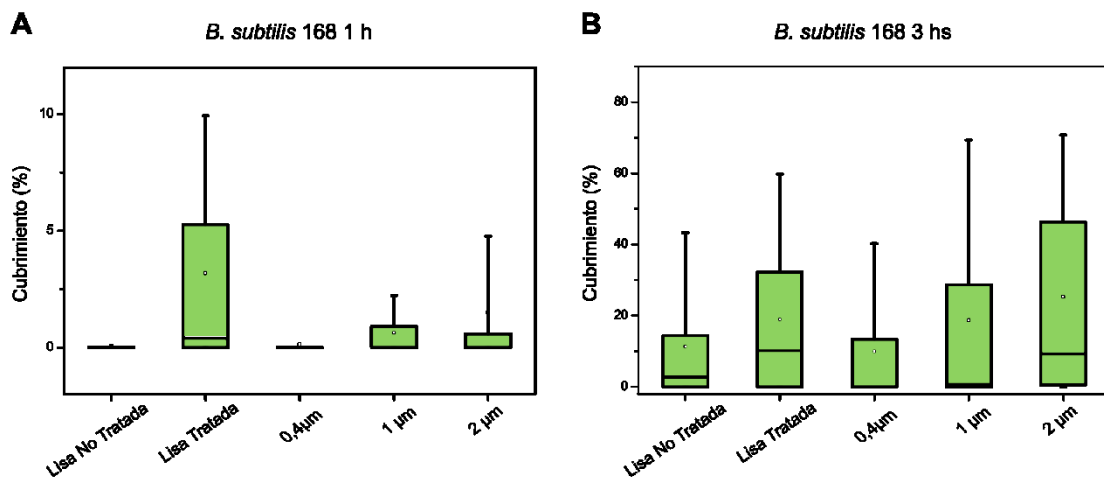


Figura 20. Porcentaje de cubrimiento de *B. subtilis* 168 luego de A) 1 hora y B) 3 horas de incubación en los cupones de PDMS. Las cajas contienen el 50% de los datos y el 80% de los datos se encuentra entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (□) representan la mediana y la media, respectivamente.

Al diluir el cultivo de *B. subtilis* en medio condicionado, luego de 1 hora la adhesión en las superficies con ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ y Lisas No Tratadas fue menor respecto a las demás superficies. Las superficies con mayor cobertura bacteriana fueron la superficie Lisa Tratada con plasma y la superficie con ondas de $2 \mu\text{m}$ (Figura 21). Pasadas 3 horas de incubación, las superficies de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ y Lisa No Tratadas siguen siendo las superficies menos cubiertas con bacterias y en la superficie de $\lambda=2 \mu\text{m}$ es donde se observa la mayor cantidad de células adheridas.

Cabe destacar que utilizando esta menor concentración de células en conjunto con la baja adherencia de *B. subtilis* 168, en la mayoría de las imágenes adquiridas por AFM no se observaban células. Por este motivo, para los ensayos posteriores se decidió trabajar con el cultivo sin diluir con medio condicionado.

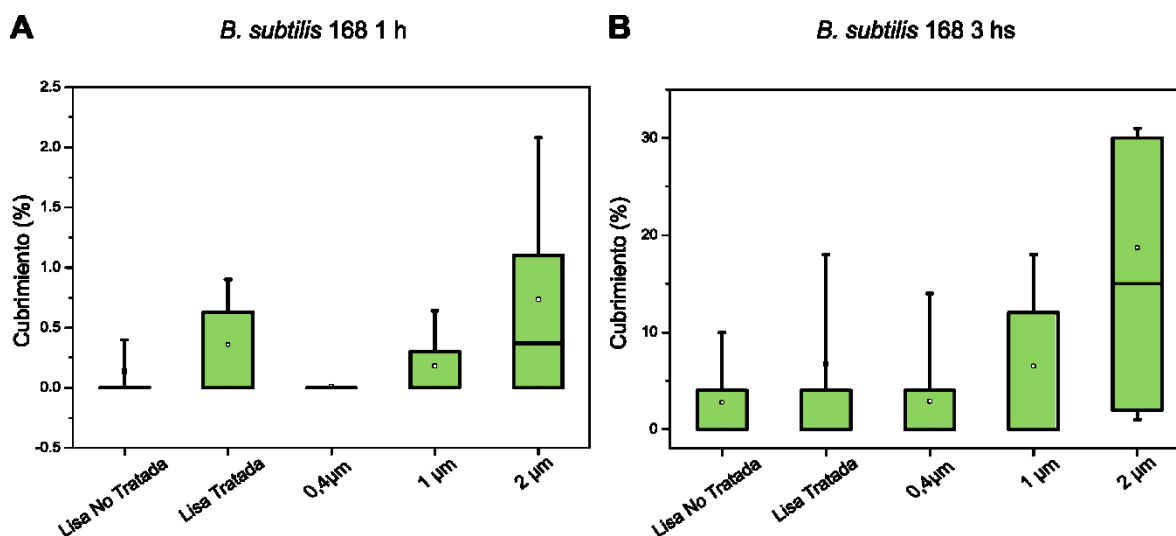


Figura 21. Porcentaje de cubrimiento en los cupones de PDMS luego de A) 1 hora y B) 3 horas de incubación con *B. subtilis* 168 en medio condicionado. Las cajas contienen el 50% de los datos y el 80% de los datos se encuentra entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (□) representan la mediana y la media, respectivamente.

2. Ensayo de viabilidad.

Está reportado que el PDMS es biocompatible [173, 174]. Sin embargo, existen numerosas superficies que tienen efecto biocida gracias a su topografía. Por ello, se decidió estudiar la viabilidad de las células adheridas a los distintos cupones de PDMS.

2.1. Recuento de UFC en placa.

Para estimar la viabilidad de las bacterias adheridas, los cupones de PDMS se incubaron sobre cultivos de *P. protegens* durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, los cupones se enjuagaron suavemente y se colocaron en un *ependorff* con solución fisiológica. Luego, se sonicaron durante 1 o 5 minutos para desprender las células adheridas. Distintas diluciones de una alícuota de la solución fisiológica se colocaron en placas de ágar LB y se incubaron hasta observar colonias individuales. La cantidad de bacterias se expresa como el promedio de las UFC/mL de 3 réplicas y 3 experimentos independientes. Como puede verse en la Tabla 6, se observó una gran variabilidad entre cupones de un mismo tipo de superficie. Por este motivo, no fue posible obtener resultados reproducibles y confiables. Posiblemente, la topografía y composición del sustrato modifican la fuerza con que las bacterias se adhieren o bien, las ondas ejercen una protección frente al estrés mecánico generado por la sonicación y por ende, el recuento podría estar sesgado.

Tabla 6. Número de bacterias viables (expresadas como UFC/mL) desprendidas de las distintas superficie topográficas s de PDMS mediante 1 y 5 minutos de sonicación.

	UFC/mL	
	1 minuto	5 minutos
Lisa No Tratada	$5 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2$	$5 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2$
Lisa Tratada con plasma	$3 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2$	$2 \times 10^3 \pm 7 \times 10^2$
$\lambda = 0,4 \mu\text{m}$	$5 \times 10^2 \pm 3 \times 10^2$	$8 \times 10^2 \pm 5 \times 10^2$
$\lambda = 1 \mu\text{m}$	$4 \times 10^2 \pm 2 \times 10^2$	$9 \times 10^2 \pm 1 \times 10^3$
$\lambda = 2 \mu\text{m}$	$2 \times 10^2 \pm 3 \times 10^2$	$70 \pm 1 \times 10^2$

2.2. Ensayo de fluorescencia: kit LIVE/DEAD™ BacLight™

Debido a que los resultados del recuento en placa no resultaron confiables, se estudió la viabilidad mediante una tinción con el kit de fluorescencia LIVE/DEAD™ BacLight™. Esta metodología tiene la ventaja de que es posible cuantificar las bacterias adheridas vivas y muertas sin la necesidad de desprender las células.

Para este ensayo se partió de la incubación de los cupones de PDMS durante 1 y 3 horas sobre cultivos de *B. subtilis* o sobre una dilución en medio condicionado del cultivo bacteriano en el caso de *P. protegens*. Posteriormente, los cupones se enjuagaron y tiñeron con el kit de fluorescencia. Para cuantificar la viabilidad celular, las células verdes se consideraron viables y las células rojas, muertas o dañadas. Aquellas bacterias que se observaron en ambos canales (con mayor intensidad de fluorescencia que el ocasionado por el *crosstalk*) no se tuvieron en cuenta para el análisis.

En el caso de *P. protegens* luego de 1 hora de incubación, aproximadamente la mitad de las células adheridas en todas las superficies, excepto en la superficie de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$, se tiñeron con SYTO9, es decir que su envoltura celular no se encuentra comprometida (Figura 22 y Figura 23.A). En cambio, en la superficie con ondas de 400 nm, la mayoría de las bacterias observadas estaban teñidas con IP y por ende, su envoltura celular estaría dañada.

Curiosamente, luego de 3 horas de incubación se observó que la mayoría de las células adheridas sobre las distintas superficies eran viables (Figura 23.B).

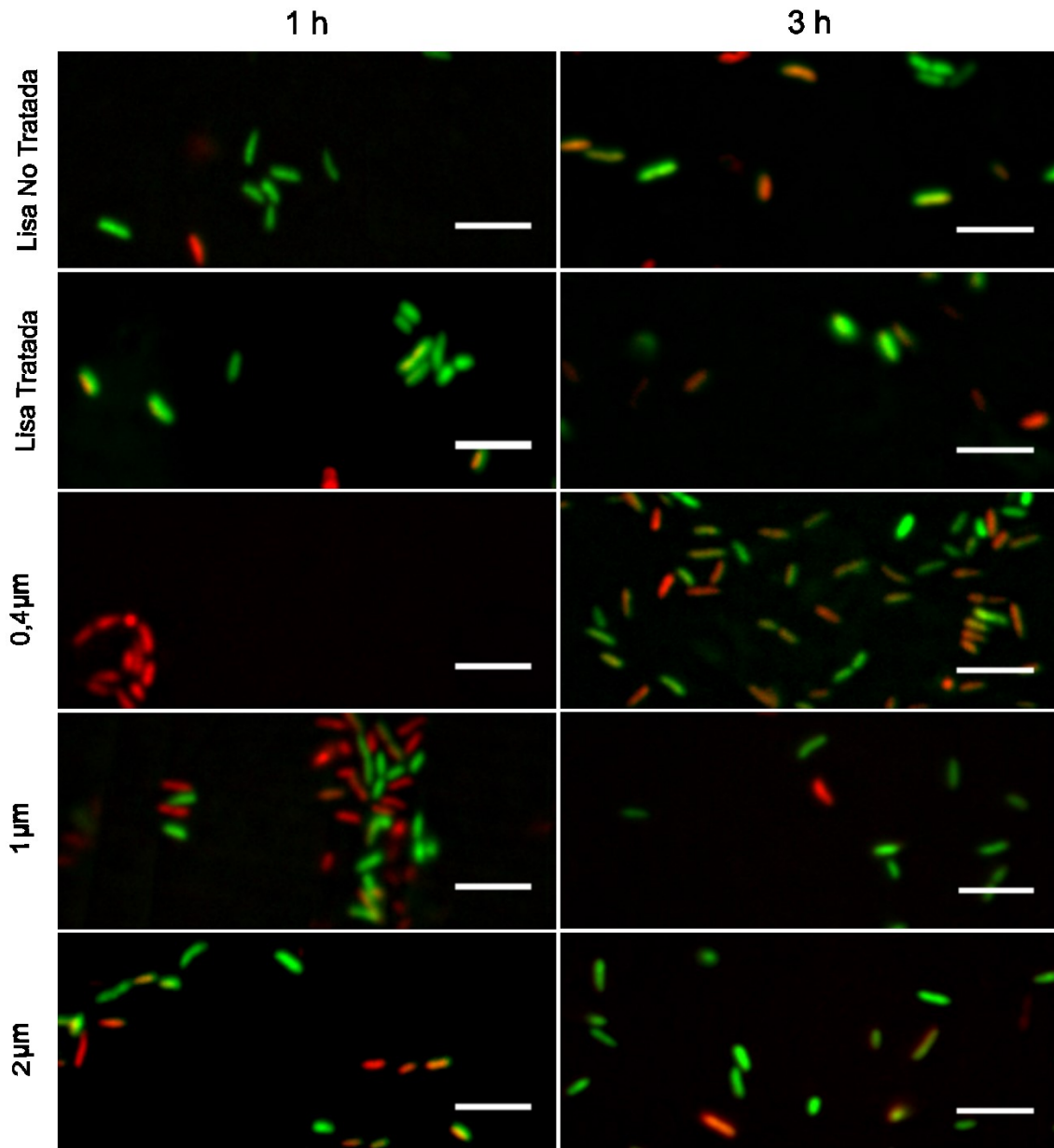


Figura 22. Imágenes representativas de la tinción de *P. protegens* con el kit LIVE/DEAD™ BacLight™ luego de 1 y 3 horas de incubación con los cupones de PDMS. Barra de escala: 5μm.

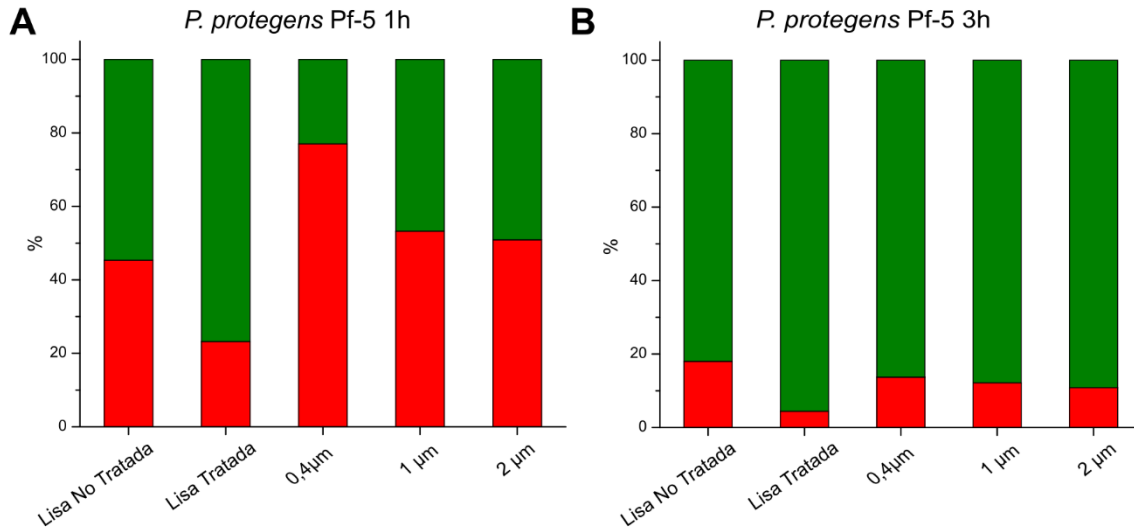


Figura 23. Porcentaje de bacterias vivas y muertas de la especie *P. protegens* luego de (A) 1 hora y (B) 3 horas de incubación en las superficies de PDMS. En verde se grafica el porcentaje de bacterias vivas (SYTO9) y en rojo las bacterias con daño en su envoltura (IP). Barra de escala: 5 μm.

Contrariamente, al estudiar la viabilidad de *B. subtilis* se observó que tanto luego de 1 y 3 horas de incubación con las superficies, la mayor proporción de células adheridas estaban teñidas con el fluoróforo verde, es decir, se encontraban vivas (Figuras 24 y 25).

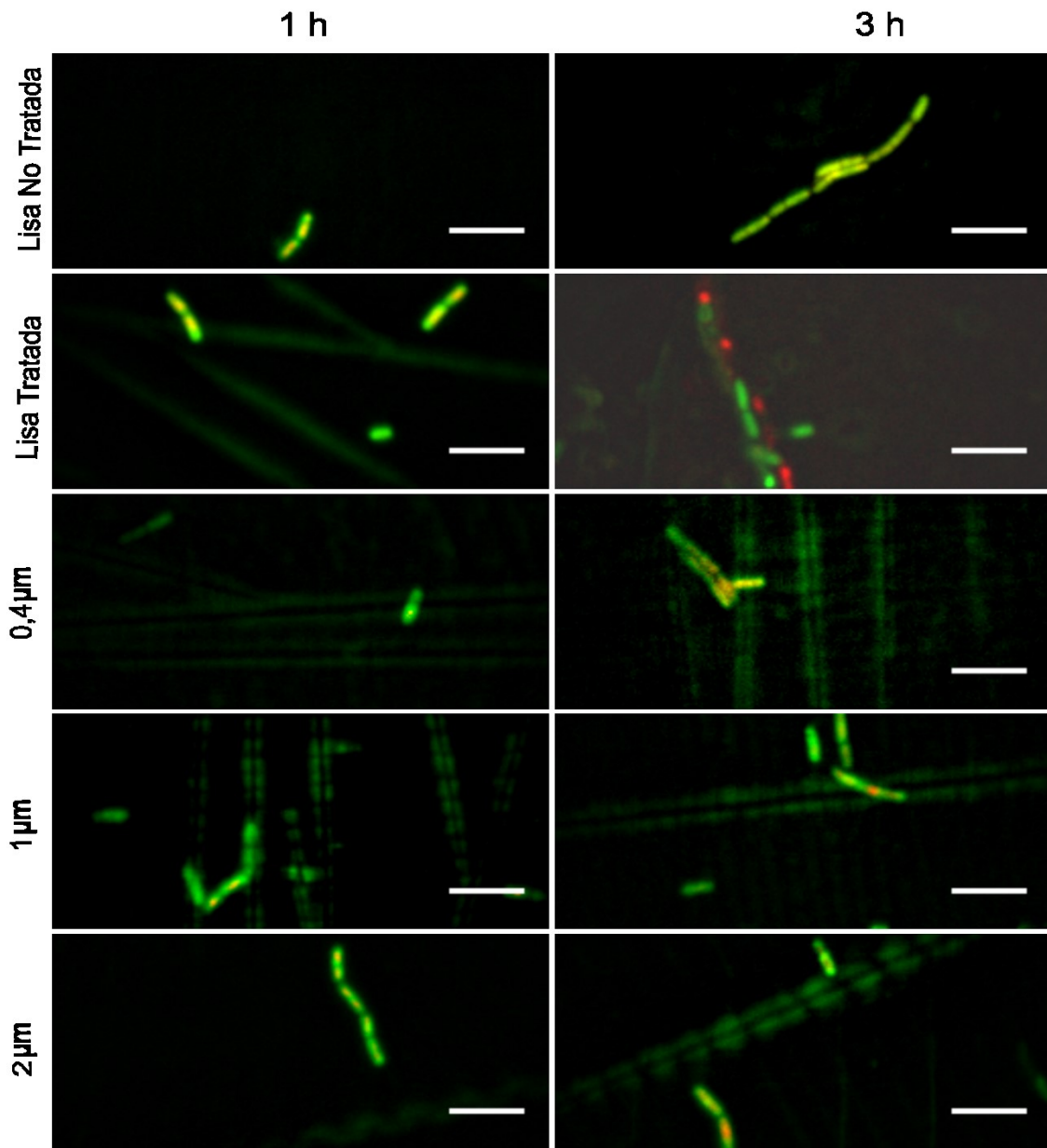


Figura 24. Imágenes representativas de la tinción de *B. subtilis* con el kit LIVE/DEAD™ BacLight™ luego de 1 y 3 horas de incubación con los cupones de PDMS. Barra de escala: 5μm.

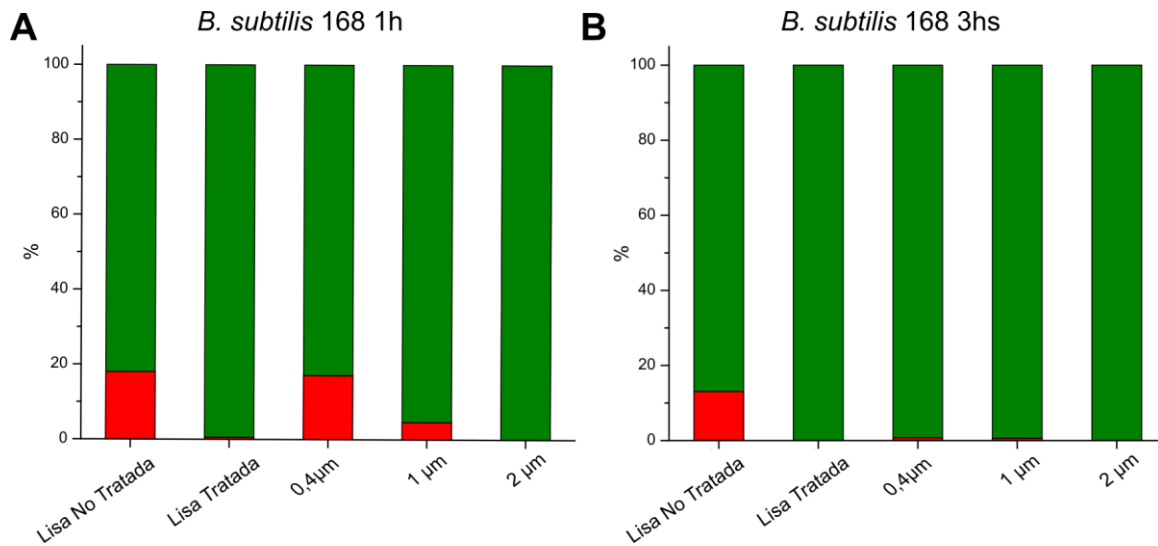


Figura 25. Porcentaje de bacterias vivas y muertas de la especie *B. subtilis* luego de (A) 1 hora y (B) 3 horas de incubación en las superficies de PDMS. En verde se grafica el porcentaje de bacterias vivas (SYTO9) y en rojo el porcentaje de bacterias con daño en su envoltura (IP).

Es preciso mencionar que no es posible comparar los porcentajes de cubrimiento de las imágenes de este experimento con las imágenes obtenidas mediante AFM. Con el microscopio de fluorescencia sólo se registraron aquellas regiones de la muestra donde había fluorescencia y por ende, bacterias. Por lo tanto, si se utilizaran las áreas de la superficie cubiertas por bacterias, a través de la técnica de microscopía de fluorescencia se estaría sobreestimando la adhesión bacteriana.

3. Espectroscopía de fuerzas: fuerzas de adhesión bacteria-sustrato.

Con la intención de determinar si las variaciones en el porcentaje de cubrimiento bacteriano entre superficies de PDMS se corresponden a diferencias en la intensidad de las fuerzas de adhesión bacteria-sustrato, se realizaron experimentos de espectroscopía de fuerzas mediante AFM. Para ello, se adhirieron bacterias vivas sobre cantilévers recubiertos con PEI. Luego, se adquirieron curvas de Fuerza vs Distancia en condiciones similares a las fisiológicas.

Una vez obtenidas las curvas se utilizó el *software* Matlab para registrar los eventos de adhesión en las curvas de retracción. A modo de ejemplo, en la Figura 26 se muestran dos curvas de Fuerza obtenidas durante las mediciones. La curva de la Figura 26.A presenta un solo evento de adhesión y en el caso de la Figura 26.B, existen dos eventos de adhesión. La magnitud de estas fuerzas se

obtiene restando el valor del mínimo del pico de adhesión en el eje Y a la línea de base (Fuerza=0 nN) o bien, en el caso de múltiples eventos, restando el valor del mínimo del pico de adhesión al valor del pico máximo siguiente.

Al finalizar las mediciones, los cantilévers se observaron mediante SEM para corroborar la presencia de bacterias adheridas en la punta. Como se puede observar en la Figura 27, los cantilévers se encuentran totalmente cubiertos por bacterias, incluida la punta que es la región que efectivamente entra en contacto con las distintas superficies que fueron estudiadas.

Cada curva fue analizada individualmente para determinar los valores de fuerzas de adhesión observadas. Luego, a partir de los valores obtenidos se construyeron histogramas de fuerza para *B. subtilis* y *P. protegens* como se muestra en las Figuras 28 y 29, respectivamente.

Al evaluar las fuerzas de interacción de *Bacillus* se observa que las distribuciones de fuerza son distintas entre las diferentes superficies topográficas de PDMS ($p < 0,05$). La superficie Lisa Tratada con plasma fue el sustrato en el que se registraron menores fuerzas de interacción con las bacterias, con fuerzas de adhesión que van desde los 0,02nN hasta los 0,2nN, con un valor de mediana de 0,08 nN. En la superficie Lisa No tratada, a pesar de observarse menor cantidad de eventos de adhesión, las fuerzas resultaron aproximadamente del doble de intensidad que las registradas en la superficie Lisa Tratadas, con una mediana de 0,14nN. A su vez, las fuerzas se incrementaron aún más en la superficie con ondas de 0,4 μ m siendo éstas de 0,34 nN. Por último, en la superficie de $\lambda = 2 \mu$ m el rango de valores de adhesión abarca fuerzas entre los 0,035 hasta los 2,5 nN, aunque la mayor cantidad de eventos resulta menor a 0,6nN (mediana: 0,57 nN).

Respecto a la distribución de los eventos de adhesión para *P. protegens*, también se observan diferencias entre las distintas superficies de PDMS ($p < 0,05$). En primer lugar, al comparar las superficies lisas, las fuerzas de adhesión fueron 4 veces menores en las superficies Lisas Tratadas con plasma que en las Lisas No Tratadas (valores de mediana de distribución igual a 0,4 nN y 1,9 nN para superficies Lisas Tratadas y Lisas No Tratadas, respectivamente). Además, en el histograma correspondiente a las fuerzas entre las superficies Lisas No Tratadas y las bacterias se registraron dos poblaciones de eventos: una de fuerzas menores, en donde se encuentra la mayor cantidad de eventos que varían entre 0,3 nN y 5 nN y otra población con fuerzas de adhesión entre 6 y 12 nN. Esta última población de fuerzas sólo se registró en los cupones de PDMS No Tratado y podría corresponderse a interacciones del tipo hidrofóbicas. Por otro lado, en los cupones con superficies con topografías de ondas las fuerzas de adhesión resultaron mayores que en las superficies Lisas

Tratadas. Además, las fuerzas de adhesión son de mayor intensidad cuanto mayor es el tamaño del patrón de ondas de la superficie. Las medianas para estas superficies fueron de 0,4 nN; 0,6 nN y 1,4 nN para las superficies con ondas de 0,4 μm ; 1 μm y 2 μm , respectivamente.

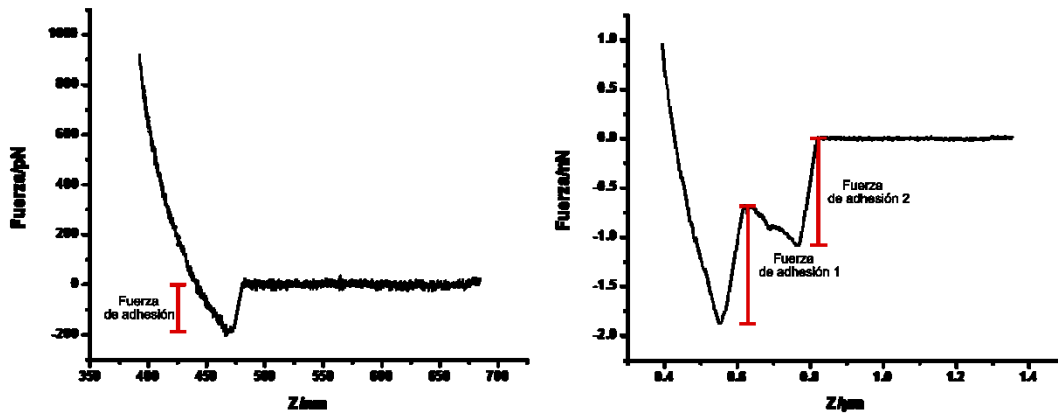


Figura 26. Curvas de Fuerza representativas de las obtenidas para las interacciones bacteria-sustrato con A) uno o B) múltiples eventos de adhesión. La magnitud de la fuerza de adhesión se calcula como la distancia en el eje Y entre el mínimo del pico y el máximo siguiente o la línea de base (resaltada en rojo).

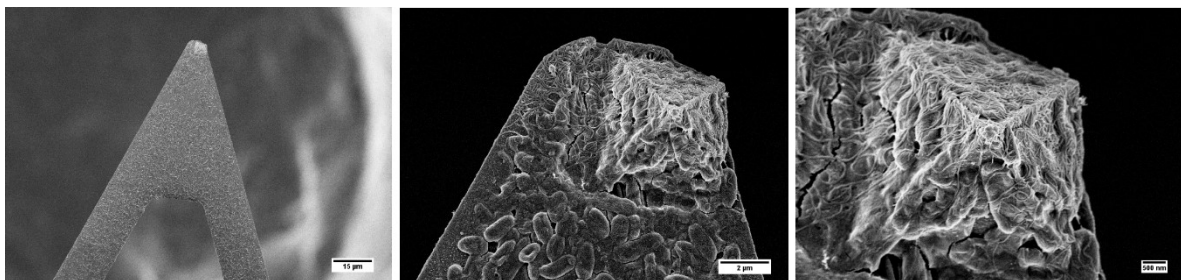


Figura 27. Imagen SEM del cantilévver funcionalizado con *P. protegens* Pf-5 al finalizar la adquisición de curvas de Fuerza vs. Distancia.

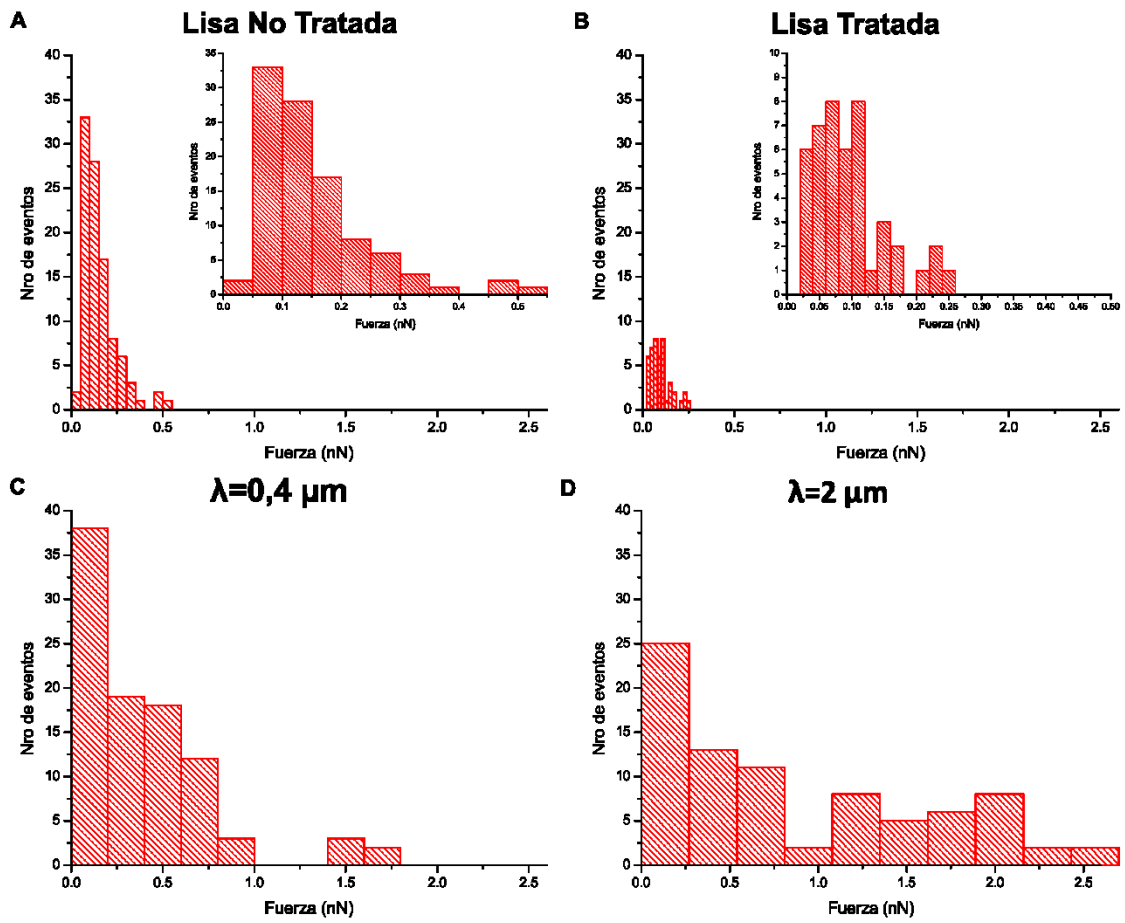


Figura 28. Histograma correspondiente a los valores de fuerzas de adhesión entre *B. subtilis 168* y A) PDMS Liso No Tratado, N=101; B) PDMS Liso Tratado, N=45; C) PDMS con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$, N=93 y D) PDMS con ondas de $\lambda=2\mu\text{m}$ N=82. N indica el número total de eventos de adhesión que se utilizaron para realizar cada histograma.

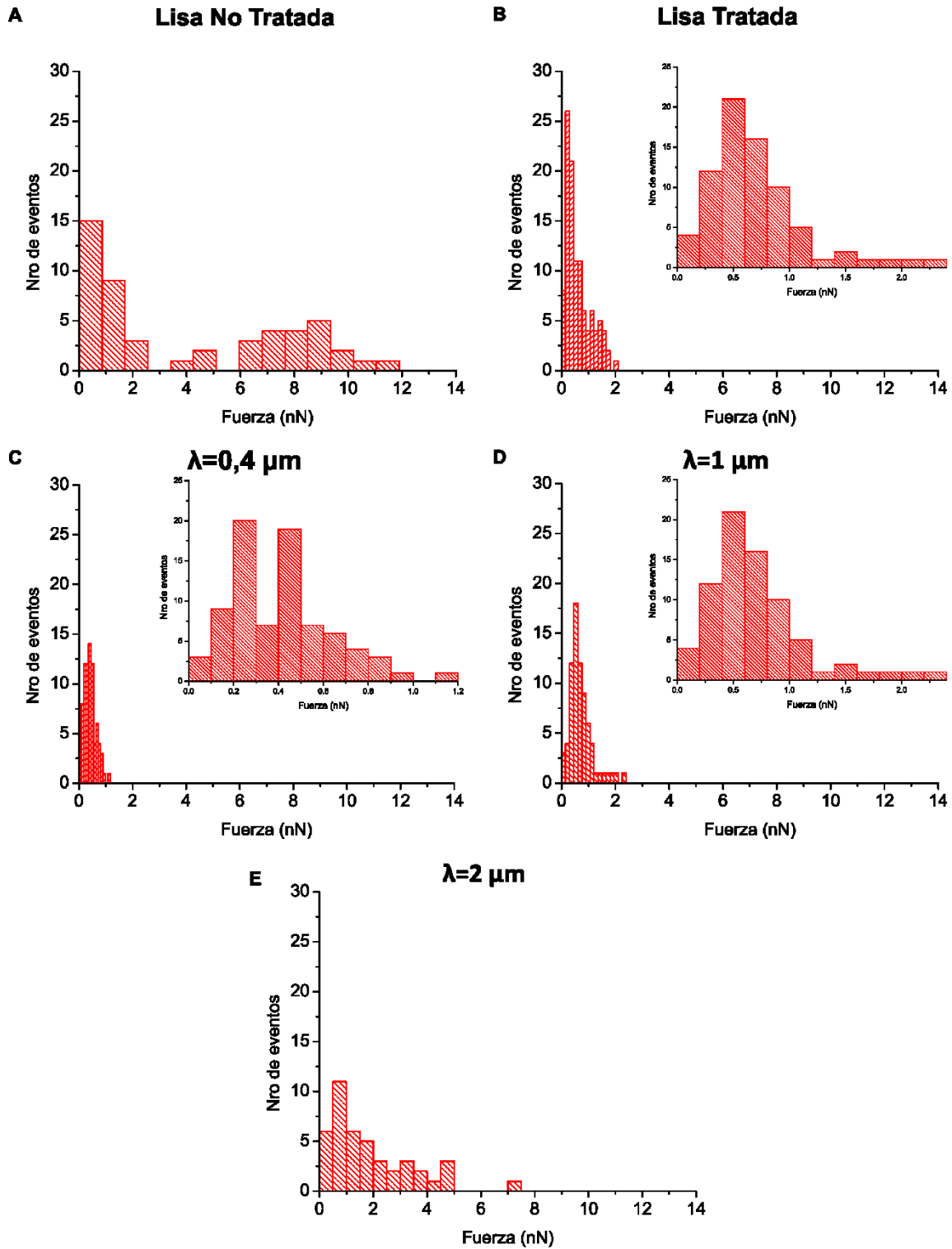


Figura 29. Histograma correspondiente a los valores de fuerzas de adhesión entre *P. protegens Pf-5* y A) PDMS Liso No Tratado, N=50; B) PDMS Liso Tratado, N=110; C) PDMS con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$, N=80 y D) PDMS con ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$, N=75 y E) PDMS con ondas de $\lambda=2\mu\text{m}$, N=45. N indica el número total de eventos de adhesión que se utilizaron para realizar cada histograma.

DISCUSIÓN.

Una de las estrategias utilizadas para evitar la formación de *biofilms* es el desarrollo de superficies antimicrobianas. Comúnmente, este tipo de superficies se basa en la modificación química del sustrato con algún agente que inhiba la adhesión bacteriana o que presente acción bactericida. Sin embargo, estas estrategias son transitorias dado que su efecto puede verse enmascarado con la adhesión inespecífica de proteínas u otras moléculas liberadas por las células o bien, su acción se encuentra limitada por la concentración del agente antimicrobiano. En este marco, el desarrollo de superficies que controlan la formación de *biofilms* gracias a sus propiedades físicas, podría proveer un efecto a largo plazo.

Numerosos trabajos mencionan a la topografía del sustrato como un factor determinante en las primeras etapas de formación de *biofilms* [39, 171, 172]. Sin embargo, existen otros factores involucrados en la adhesión bacteriana que no siempre se tienen en cuenta. Comprender la importancia de la topografía del sustrato constituye un desafío para desarrollar nuevas estrategias para el control de *biofilms*. En este sentido, nos propusimos variar la topografía del sustrato de manera controlada para evaluar su rol en las primeras etapas de formación de *biofilms*. Los resultados de este capítulo muestran cómo varía la adhesión de *P. protegens* y *B. subtilis* sobre cupones de PDMS con superficies de distinta composición química o patrón topográfico de ondas.

Por un lado, se observó que en el caso de *P. protegens* la topografía juega un rol crítico a tiempos cortos de incubación (1 hora), dado que el porcentaje de cubrimiento varía según el tamaño de las ondas del sustrato. De hecho, no se vieron diferencias en el porcentaje de cubrimiento entre las superficies Lisa Tratada y Lisa No tratada, a pesar de exponer diferente composición e hidrofobicidad en su superficie. Sin embargo, si bien el cubrimiento resulta similar, quizás las estrategias utilizadas en cada caso sean diferentes. En el caso de la superficie Lisa No Tratada, se observaron parches de, posiblemente, EPS adheridos al sustrato o incluso debajo de las bacterias, los cuales no se vieron en las demás superficies. A tiempos mayores (3horas), sólo se observó un aumento en el cubrimiento en la superficie con patrones de ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ mientras que en las otras superficies no se observaron cambios relevantes.

Al estudiar a *B. subtilis*, las variaciones en el cubrimiento entre las superficies fue diferente al descrito para *P. protegens*. Por un lado, tanto luego de 1 como 3 horas de incubación, se vieron diferencias entre las superficies Lisa Tratada (hidrofílica) y Lisa No tratada (hidrofóbica), siendo ésta

última la que presentó menor cubrimiento. Por otro lado, la superficie con patrones de ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ también mostró una baja cobertura con bacterias respecto a las demás superficies. Si bien las superficies con patrones de ondas tienen igual composición química que la superficie Lisa Tratada, probablemente la baja adherencia en la superficie de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ se deba a una menor cantidad de puntos de contacto bacteria-superficie. Al incrementar el tamaño de las ondas, las bacterias quedan confinadas entre los valles y probablemente, protegidas frente a los lavados, lo que resulta en un mayor porcentaje de cubrimiento. Para esta bacteria, la topografía sería un factor determinante en la adhesión, sino que la hidrofobicidad también influye a tiempos cortos de incubación.

Por otro lado, tanto con *B. subtilis* como con *P. protegens* la presencia de ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$ modifica la forma de colonización o bien inhibe el desarrollo de aglomerados. En este sentido, se ha demostrado que ondas de $\lambda=1,3\mu\text{m}$ alteran algunas estrategias de movilidad, entre ellas, la formación de agregados en formas de balsas [175]. La producción de EPS y la asociación de las bacterias en forma de aglomerados pueden facilitar el movimiento de las bacterias y en consecuencia, reducir el tiempo de colonización. Por lo tanto, utilizar ondas con este rango de tamaños podría resultar útil para el diseño de superficies que disminuyan la colonización bacteriana.

En cuanto a la dureza de los sustratos, no observamos una correlación entre el Módulo de Young y el porcentaje de cubrimiento con ambas bacterias. Por lo tanto, en este rango de elasticidad y con las bacterias ensayadas, la rigidez no parece afectar la colonización bacteriana.

Al analizar la viabilidad de las células de *P. protegens* adheridas sobre los cupones de PDMS se mostró el efecto bactericida de la superficie de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ en tiempos cortos de incubación (1 hora), siendo el 80% de células no viables sobre la superficie. Este efecto se revirtió pasada las 3 horas, donde la mayoría de las bacterias eran viables (15 % de células no viables). Por el contrario, en el caso de *B. subtilis* tanto a 1 como 3 horas de incubación sobre superficies de $\lambda=0,4\mu\text{m}$, la mayoría de las bacterias adheridas resultaron viables. Estos resultados son consistentes con trabajos realizados con alas de cícada, donde muestran que las nanoestructuras de la superficie provocan un estiramiento de la membrana celular de las bacterias, lo que ocasiona daños irreversibles en la membrana y posterior muerte celular. Incluso, demuestran que la capacidad bactericida resulta efectiva para bacterias Gram negativas (*Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*) pero no así para bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Pseudococcus maritimus* y *Staphylococcus aureus*) [93, 119, 120].

La pared celular es la responsable de la rigidez y forma de la envoltura celular. En particular, las capas de peptidoglicano son las que determinan la rigidez de la pared. La pared de las bacterias Gram negativas consiste en una fina capa de peptidoglicano, en general de unos pocos nanómetros, y que, a pesar de poseer una doble membrana, resulta en una envoltura débil y susceptible a la ruptura por nanoestructuras. En contraposición, la pared de las bacterias Gram positivas contiene varias capas de peptidoglicano, llegando a un espesor entre 20-100 nm que las protege frente a algunas nanoestructuras de la superficie de los sustratos a colonizar [176].

La adhesión bacteriana está dado por la combinación de fuerzas fisicoquímicas que pueden ser específicas (interacciones entre receptor-ligando) o inespecíficas (fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas, ácido-base y electrostáticas)[177]. Hasta este punto describimos ensayos que permiten analizar la adhesión bacteriana de manera general, aunque este tipo de enfoque no provee información sobre las fuerzas que llevan a la adhesión. En el último tiempo, el AFM ha dejado de utilizarse sólo como un microscopio de alta resolución para el estudio de sistemas biológicos. Una de las aplicaciones que se está explorando en el último tiempo es la cuantificación de interacciones de sistemas biológicos, desde interacciones entre moléculas únicas o células enteras [138, 139, 178]. De esta manera, realizamos experimentos de espectroscopía de fuerzas para medir la magnitud de las fuerzas involucradas entre las bacterias y los sustratos y determinar si existe una correlación con los experimentos anteriores.

Contrariamente a lo observado en el porcentaje de cubrimiento, en el caso de *B. subtilis* las fuerzas de adhesión fueron significativamente menores con la superficie Lisa Tratada (Mediana: 0,08nN, valor 2 veces menor que en la superficie Lisa y 7 veces menor que los valores registrados en la superficie $\lambda=2\mu\text{m}$) que con el resto de las superficies. Lo que podría ser indicio de la existencia de interacciones del tipo hidrofóbicas entre *Bacillus* y la superficie Lisa No Tratada que, sin embargo, no son estas interacciones las responsables de las primeras etapas de formación de *biofilms* y por ello el cubrimiento es mayor en la superficie Lisa Tratada. Por otro lado, como se mencionó previamente, el tratamiento del PDMS con plasma produce una capa vítrea superficial y que, en consecuencia, resulta en una superficie más rígida. A pesar de que la fuerza aplicada para medir los eventos de adhesión es baja (1nN), no se puede descartar que el cantiléver podría estar deformando la superficie del PDMS Liso No Tratado y por ende, aumentando los puntos de contacto entre la punta y el sustrato. En el caso de la superficie Lisa Tratada con plasma, la capa vítrea evitaría la deformación de la superficie y por ello las fuerzas de adhesión podrían resultar menores.

Al comparar las superficies Lisa Tratada con plasma o las superficies con ondas, las cuales poseen la misma composición química en su superficie, también se mostraron diferencias en las fuerzas de adhesión. Por un lado, en la superficie con patrones de ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ las fuerzas son mayores respecto a la superficie Lisa Tratada (más de 2 veces mayor, medianas de 0,34nN y 0,14nN, respectivamente), y esto podría deberse a la deformación de la envoltura de *B. subtilis* al presionarla sobre las ondas del sustrato, provocando un incremento en la cantidad de puntos de contacto bacteria-sustrato. Por último, en la superficie con ondas de $\lambda=2\mu\text{m}$ donde se observaron fuerzas aún mayores (mediana: 0,57nN), posiblemente no sólo se registraron las fuerzas de interacción entre la punta y los sustratos, sino que también entre aquellas bacterias adheridas a los laterales de la pirámide del cantiléver. Existen metodologías que podrían evitar este artificio como funcionalizar cantilévers sin punta (*tipless*) con microesferas con bacterias individuales adheridas a ella [165].

Al estudiar las fuerzas de adhesión entre *P. protegens* y el PDMS con diferentes topografías, al igual que para *B. subtilis*, la interacción bacteria-Superficie Lisa Tratada fue significativamente menor (mediana: 0,4nN) que con el resto de los sustratos. En la superficie Lisa No Tratada se distinguen dos poblaciones de fuerzas: una de fuerzas menores, entre 0,3 nN y 5 nN y otro grupo, que varía entre los 6-12 nN. La distribución de la población de fuerzas de menor magnitud se asemeja a las registradas en la superficie Lisa Tratada y podría corresponder a fuerzas del tipo electrostáticas. En cambio, la población de fuerzas mayores, sólo presentes en las superficies Lisas No Tratadas, posiblemente se trate de fuerzas del tipo hidrofóbico. En un trabajo realizado por Dufrêne muestran resultados similares a los nuestros al estudiar cómo varía la intensidad de las fuerzas de interacción entre *LactoBacillus plantarum* frente a un sustrato hidrofílico o hidrofóbico [179]. Al igual que en nuestros experimentos, las fuerzas del tipo hidrofóbicas son de mayor magnitud que las presentes con un sustrato hidrofílico. Además, proponen que las fuerzas de adhesión reflejan interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y las proteínas de la envoltura. Uno de los motivos con el que justifican esta afirmación, es la presencia de múltiples picos en la curva de Fuerza, lo cual podría corresponder al estiramiento y desplegado de las proteínas de la superficie celular que se encontraban en contacto con la superficie. A su vez, en las curvas de Fuerza de las superficies hidrofílicas observan eventos únicos, mejor definidos y menor intensidad, los cuales adjudican a la interacción entre glicopolímeros (naturalmente hidrofílicos) y el sustrato. Por último, al igual que para *B. subtilis*, la magnitud de las interacciones aumenta al incrementar el tamaño de las ondas. Nuevamente, creemos que la presión ejercida sobre *P. protegens* podría deformar su envoltura generando mayor cantidad de puntos de contacto bacteria-sustrato. En el caso de las ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$, la

punta del cantiléver y por ende, las bacterias, pueden colocarse entre las ondas, aumentando así la cantidad de puntos de contacto entre la punta con bacterias y el sustrato.

CONCLUSIONES.

Los resultados de este Capítulo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) La topografía del sustrato modifica las estrategias de colonización de *P. protegens* Pf-5 y *B. subtilis* 168.
- 2) La hidrofobicidad de la superficie no afecta la adhesión de *P. protegens* Pf-5 a nivel macroescala, aunque sí modifica el tipo de fuerzas de adhesión involucradas.
- 3) La hidrofobicidad de la superficie influye fuertemente en la adhesión de *B. subtilis* 168 aunque no se correlaciona con la magnitud o tipo de fuerzas involucradas.
- 4) La superficie con ondas de $\lambda=0,4 \mu\text{m}$ presenta actividad bactericida, resultando efectiva sólo con la bacteria Gram negativa *P. protegens* Pf-5.

CAPÍTULO III

Estudio nanomecánico de *biofilms*.

RESULTADOS.

La visualización de bacterias adheridas a distintos sustratos mediante AFM en medio líquido requiere de algún método de inmovilización de las mismas ya que la punta del cantiléver produce un corrimiento y/o despegado de las bacterias débilmente adheridas. Existen numerosos métodos de inmovilización que incluyen la inmovilización mecánica, como el uso de geles o filtros [140, 180, 181]; adsorción sobre polímeros con carga [181-185] o bien mediante uniones covalentes con agentes fijativos [182, 186]. Estas técnicas resultan útiles en muchas aplicaciones pero en este trabajo de Tesis, modificar la superficie para inmovilizar las bacterias no permitiría analizar la influencia del sustrato en el desarrollo de *biofilms*. Por esa razón, se buscaron tanto el ambiente de crecimiento que favorezca la adhesión bacteria-sustrato, así como las condiciones de medición mediante AFM que permitan la visualización y caracterización de las propiedades mecánicas del *biofilm* en condiciones fisiológicas.

Los *biofilms* se desarrollaron utilizando una celda de flujo continuo que permitió la renovación del medio de cultivo cada 24 horas. Para continuar con los ensayos de adhesión realizados previamente, en un primer experimento se utilizó caldo LB como medio de cultivo. Los cupones de PDMS Liso No Tratado y Tratado se incubaron sumergidos en el cultivo de *P. protegens* durante 3 y 5 días. Pasado este tiempo, los sustratos se retiraron de la celda y se enjuagaron cuidadosamente. A algunos de los cupones se les realizó una tinción con CV para confirmar la presencia de *biofilm* mediante un microscopio óptico convencional. A otros, se los mantuvo sumergidos en solución fisiológica para su observación mediante AFM.

Si bien en ambos tiempos de incubación el *biofilm* se desarrolló sobre ambos tipos de superficies (Figura 30), no fue posible adquirir imágenes del *biofilm* mediante AFM. Posiblemente, el *biofilm* no se encontraba lo suficientemente adherido como para soportar el estrés mecánico provocado por la punta del cantiléver.

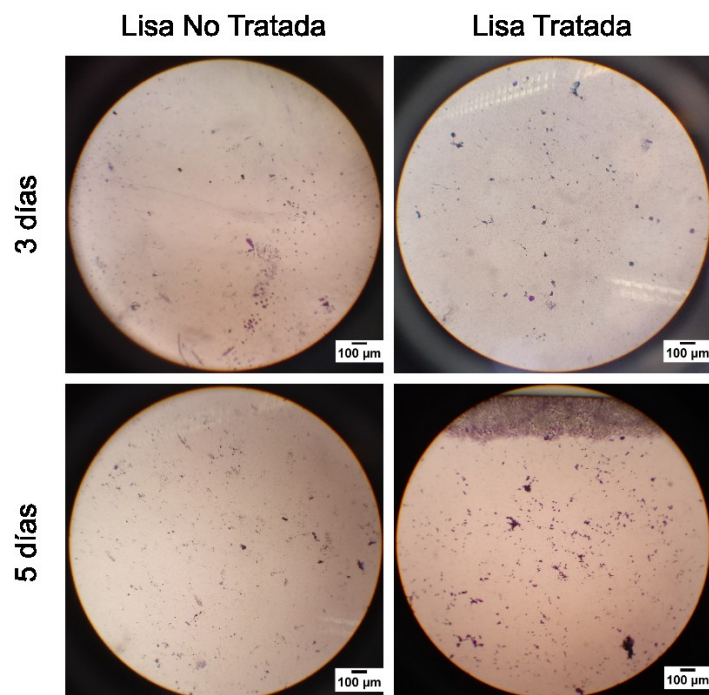


Figura 30. *Biofilm* de *P. protegens* PF-5 utilizando caldo LB. Imágenes representativas del *biofilm* desarrollado sobre cupones de PDMS Lisa No Tratada y Lisa Tratada luego de 3 y 5 días de crecimiento. Para su visualización mediante microscopía óptica se realizó una tinción con CV.

Dado que en muchas especies la utilización de medios mínimos favorece el crecimiento en forma de *biofilms*, nos propusimos estudiar la formación de *biofilms* de *P. protegens* utilizando medio mínimo M9.

Luego de 3 días de incubación en medio mínimo, previo a las mediciones mediante AFM, se realizó la tinción con CV. En la Figura 31 se puede observar que todas las superficies se cubrieron parcialmente con *P. protegens*. La superficie Lisa Tratada con plasma fue el sustrato con mayor grado de cubrimiento, aunque se observaban zonas sin colonizar. Cabe recordar que el CV tiñe tanto bacterias como otros polímeros, con lo cual a través de esta tinción no es posible distinguir si los grandes cúmulos contienen bacterias o sólo son aglomerados de EPS.

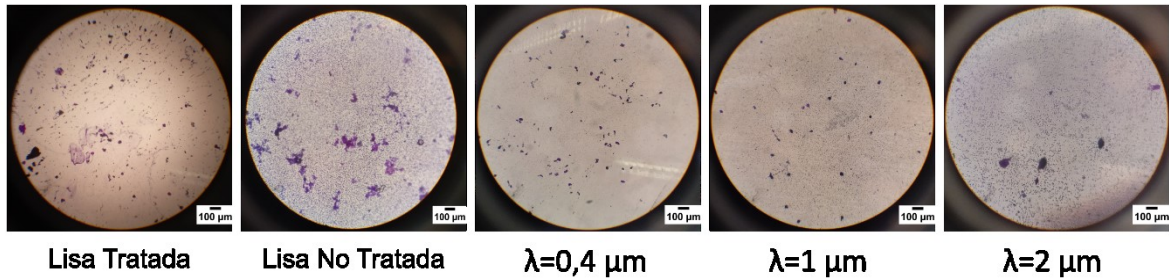


Figura 31. *Biofilm* de *P. protegens* PF-5 utilizando medio mínimo M9 luego de 3 días de incubación. Imágenes representativas del *biofilm* desarrollado sobre las superficies: Lisa Tratada; Lisa No Tratada; $\lambda=0,4\mu\text{m}$; $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$. Para su visualización mediante microscopía óptica se realizó una tinción con CV.

Al observar los cupones mediante AFM fue posible visualizar el *biofilm* en condiciones similares a las fisiológicas: hidratado en solución salina, a temperatura ambiente y sin utilizar ningún método de inmovilización. Aplicando la menor fuerza posible (rango 0,8-1,5nN), se tomaron 5 imágenes por cupón de $30\mu\text{m}\times 30\mu\text{m}$ en las cuales se observa presencia de bacterias (Figura 32). Si bien las imágenes obtenidas en este ensayo tienen menor definición en los bordes que las obtenidas con las bacterias deshidratadas y se observan algunas zonas en donde la punta del cantiléver arrastra o se adhiere al *biofilm*, este resultado es novedoso y alentador dado que existen pocos trabajos previos en los que se obtengan imágenes de *biofilm* bacteriano en estas condiciones. Por un lado, al igual que en los ensayos realizados previamente para tiempos cortos, en las superficies con patrones de ondas de $\lambda=1\mu\text{m}$ y $\lambda=2\mu\text{m}$ gran parte de las bacterias se encuentran confinadas entre los valles de las ondas, aunque en este experimento también se observaron bacterias aisladas en las superficies lisas. Por otro lado, en todas las superficies se observaron microcolonias de tamaños que varían entre 0,5-2 μm de alto. Es preciso mencionar que el piezoeléctrico utilizado en el AFM (scanner J) sólo permite escanear alturas menores a los 5 μm , y por lo tanto sólo se adquirieron imágenes de las microcolonias de menor tamaño.

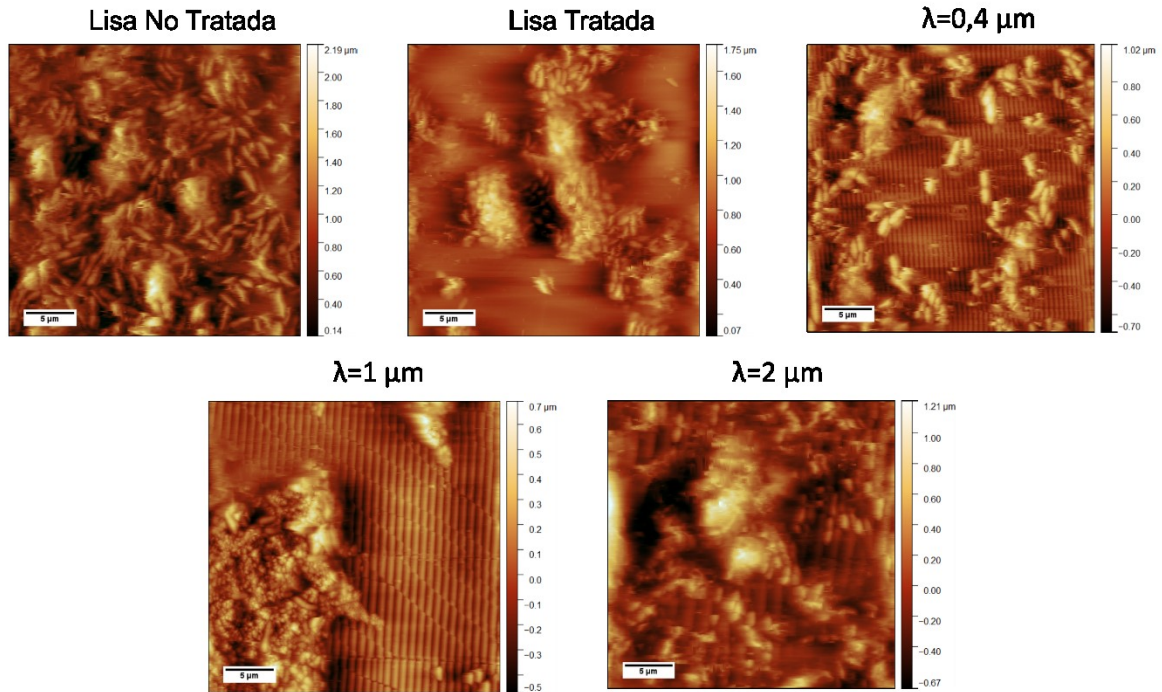


Figura 32. Imágenes representativas del *biofilm* de *P. protegens* adquiridas mediante AFM en condiciones fisiológicas.

Las microcolonias se nanoindentaron usando la herramienta *Point and Shoot* del software *Nanoscope 9.1* que controla el AFM, aplicando una fuerza máxima de 2nN como *trigger*. Esta herramienta permite seleccionar con precisión nanométrica los sitios en los que se desea nanoindentar (en este caso las microcolonias) y con ello, adquirir curvas de Fuerza vs Distancia. Se adquirieron al menos 50 curvas por cada sustrato topográfico. A partir de las curvas de Fuerza vs Distancia se obtuvieron las curvas de Fuerza vs Indentación que se ajustaron al modelo de Sneddon (Ecuación 3), el cual permite estimar la elasticidad de la microcolonia en términos del Módulo de Young (E). Cuanto más rígido es la microcolonia, mayor es el valor de E.

Como se muestra en la Figura 33.A, no se vieron diferencias significativas en los valores de Módulo de Young de los *biofilms* de *P. protegens* formados sobre las superficies con ondas (0,4 μm; 1 μm y 2 μm), con valores de E entre 0,07-1 MPa y valores de medianas entre los 0,15-0,30 MPa ($p < 0,05$). A su vez, estos *biofilms* resultaron más rígidos que los desarrollados sobre las superficies Lisas ($p < 0,05$), con una distribución de E que poseen valores de medianas de 0,07 MPa y 0,03 MPa en la superficie Lisa Tratada y No Tratada, respectivamente. A modo de ejemplo, en la Figura 33.B se

muestran curvas de Fuerza vs Indentación para cada una de las superficies, donde se observa claramente la diferencia en las pendientes de las curvas.

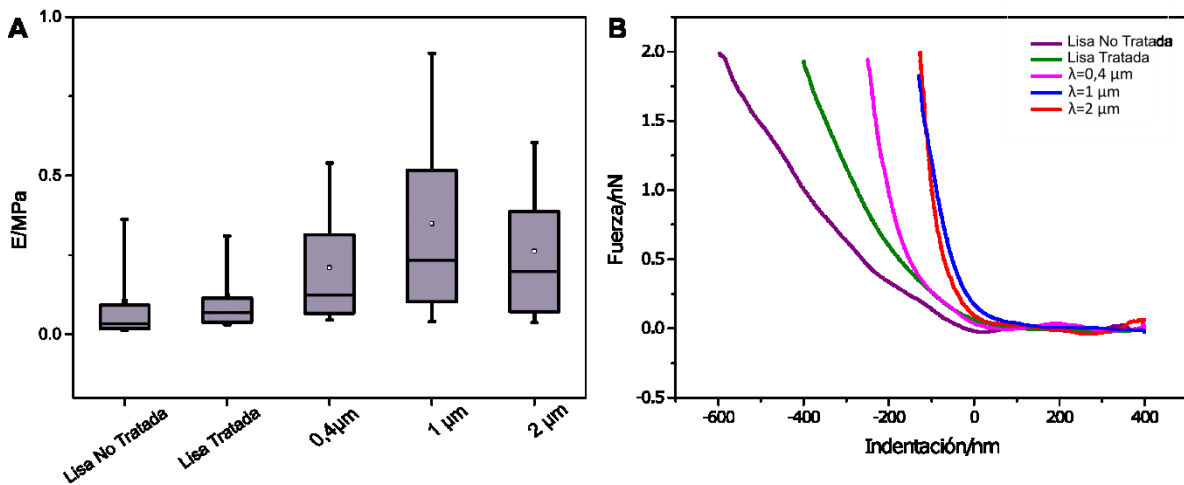


Figura 33. Módulo de Young (MPa) del *biofilm* de *P. protegens Pf-5* desarrollado sobre los cupones de PDMS. A) Diagrama de Box Plot de E: Las cajas contienen el 50% de los valores y el 80% entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (□) representan la mediana y la media, respectivamente. B) Curvas de Fuerzas vs indentación representativas para la nanoindentación del *biofilm* desarrollado sobre cada una de las superficies.

Para estudiar las propiedades mecánicas del *biofilm* de *B. subtilis* se utilizó el mismo protocolo que para *P. protegens*. Sin embargo, si bien mediante la tinción con CV se observó *biofilm* formado sobre todas las superficies, sólo fue posible visualizarlo en las superficies Lisas mediante AFM, tal como se muestra en la Figura 34. Al comparar las propiedades nanomecánicas de los *biofilms* sobre estas superficies, se vio una marcada diferencia en la rigidez de ambos, siendo 100 veces mayor la rigidez del *biofilm* formado sobre la superficie Lisa No Tratada (Figura 35).

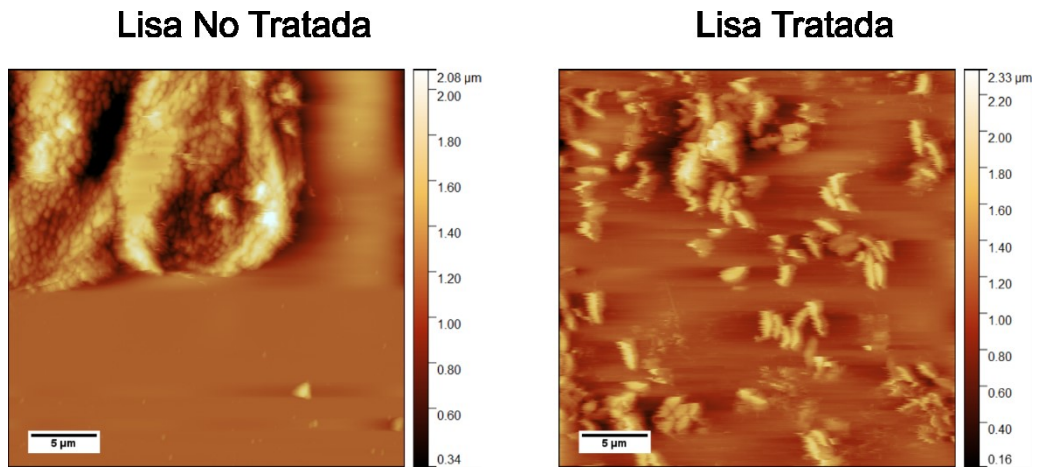


Figura 34. Imágenes representativas del *biofilm* de *B. subtilis* adquiridas mediante AFM en condiciones fisiológicas.

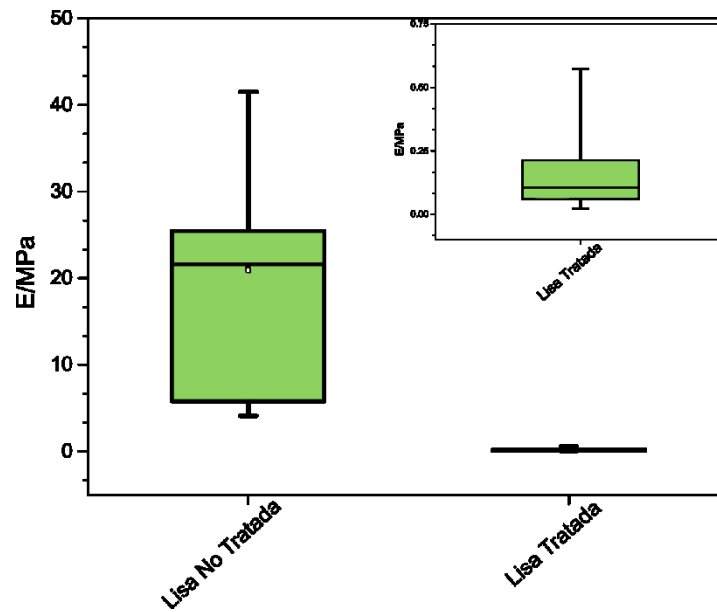


Figura 35. Módulo de Young (MPa) del *biofilm* de *B. subtilis* desarrollado sobre los cupones de PDMS Liso No Tratado y Tratado con plasma. Las cajas contienen el 50% de los valores de E y el 80% entre los bigotes. La línea continua y el cuadrado hueco (\square) representan la mediana y la media, respectivamente.

DISCUSIÓN.

Actualmente, el AFM ha ganado interés para el estudio de sistemas biológicos ya que es una técnica no destructiva y que puede ser utilizado en aplicaciones variadas como la descripción de la morfología celular, localización de estructuras nanométricas en la superficie de las células, caracterización de las propiedades nanomecánicas de la envoltura celular o bien, tal como se realizó en el Capítulo II, para la medición de fuerzas de interacción entre diferentes sistemas [155]. Este tipo de mediciones requiere que las células se encuentren fuertemente adheridas a una superficie sin afectar su viabilidad o fisiología. De hecho, la calidad y reproducibilidad de las mediciones depende en gran parte de la calidad de la inmovilización. Generalmente se prefiere realizar este tipo de caracterizaciones con las células sumergidas en líquido y de manera de simular las condiciones fisiológicas. En particular, la inmovilización de microorganismos sobre sustratos lisos resulta poco eficiente debido a la rigidez de la membrana y al menor tamaño comparado con células animales. Por este motivo, las complicaciones más frecuentes al realizar mediciones en medio líquido son el despegado de las bacterias del sustrato o el corrimiento de las células durante el escaneo con la punta del cantiléver. En este sentido, se han desarrollado numerosos métodos para la inmovilización de microorganismos como la utilización de filtros que retienen a las células [180, 181]; adsorción mediante polímeros con carga [184, 187, 188]; adhesión mediante uniones covalentes [182, 186] o a través de interacciones con proteínas o lectinas [189]. Otra alternativa es realizar las determinaciones en aire o bien deshidratar para asegurar la adhesión y luego re-hidratar durante las mediciones [145, 190]. Esta estrategia puede resultar útil para visualizar algunas estructuras celulares o como en nuestro caso, para cuantificar el cubrimiento de las superficies de PDMS. Sin embargo, la deshidratación de los microorganismos puede alterar su morfología y modificar drásticamente sus propiedades mecánicas.

Para comparar las propiedades mecánicas de los *biofilms* sobre los cupones de PDMS estudiados, resulta imposible utilizar alguna de las metodologías mencionadas. Por este motivo nos propusimos encontrar las condiciones de crecimiento que favorezcan la adhesión de las bacterias a los sustratos. Como primera aproximación, los cupones de PDMS se incubaron sobre cultivos de *P. protegens* Pf-5 de forma estática utilizando caldo LB como medio de cultivo. En este caso no fue posible visualizar el *biofilm* mediante AFM (Resultados no mostrados). A continuación, utilizando una celda de flujo para cultivo y medio LB, los cupones se incubaron con el cultivo de *P. protegens*, renovando el medio

cada 24 horas con un flujo de 0,25mL/min. En algunos trabajos utilizan celdas de flujo abiertas que permiten la visualización *in situ* del *biofilm* y resultan útiles para comparar diferencias en la velocidad de flujo o condiciones de crecimiento [191]. En este trabajo necesitábamos variar el sustrato y por ello utilizamos una celda que permita sumergir todas las superficies al mismo tiempo. Si bien se desarrolló *biofilm* sobre todas las superficies, nuevamente el *biofilm* se desprendía durante el escaneo con el cantiléver. Finalmente, con el propósito de favorecer la formación de *biofilm* utilizamos caldo M9, un medio mínimo de cultivo salino. Mediante la tinción con CV, se observó que sobre la superficie Lisa Tratada se desarrolló la mayor cantidad de *biofilm*. Para la visualización mediante AFM, todos los cupones se mantuvieron sumergidos en solución fisiológica hasta finalizar las mediciones. En todos los casos se minimizó la fuerza aplicada por el cantiléver para escanear, tratando de encontrar un punto en el cual no se despegue o deforme el *biofilm* y a su vez se distingan los bordes de las bacterias aisladas y microcolonias. Si bien las imágenes adquiridas presentan algunos artificios ocasionados por la adhesión indeseada entre la punta del cantiléver y las bacterias, estos resultados resultan novedosos dado que sólo existen unos pocos trabajos similares en la literatura científica [191-193]. A su vez, logramos obtener valores de elasticidad en términos del Módulo de Young que nos permiten comparar la estructura de los *biofilms* desarrollados sobre superficies con diferente topografía. Algunos trabajos previos han demostrado que la reología del *biofilm* puede influir en algunas propiedades del *biofilm* como en la migración de las microcolonias, la tolerancia a antibióticos y el efecto que producen cambios en el pH, estrés osmótico o temperatura [13, 194, 195]. Por ello, comprender cómo se modifican las propiedades mecánicas a escala nanométrica del *biofilm* es crítico para el desarrollo de nuevas metodologías que permitan favorecer el desarrollo de *biofilms* o la eliminación de los mismos.

Por un lado, se mostró que el Módulo de Young de los *biofilms* formados sobre las superficies con patrones de ondas fue mayor que el registrado en las superficies Lisas. Hay que tener en cuenta que las microcolonias se indentaron sin tener en cuenta el tamaño de éstas. De hecho, las microcolonias formadas en las superficies con patrones de ondas, en general, fueron de menor tamaño que las desarrolladas sobre las superficies lisas (entre 0,75-1,3 μ m en las superficies con ondas respecto a 0,9-1,6 μ m en las superficies Lisas). Por ende, probablemente se trate de microcolonias con diferente grado de maduración. En un trabajo realizado con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 muestran que el *biofilm* en las primeras etapas de maduración resulta más rígido que el *biofilm* maduro [196]. Esta diferencia puede atribuirse a la mayor cantidad de EPS en las colonias maduras, siendo más flexible que la estructura celular, lo cual permite mantener su estructura. Dado que este trabajo también

tenemos la variabilidad del sustrato, no podemos descartar que, si las colonias formadas en las superficies Lisas contienen mayor cantidad de EPS, se trate de algún mecanismo para facilitar la adhesión y sostener su arquitectura. Este puede ser también uno de los motivos por los cuales también se observaron diferencias en la rigidez de los *biofilms* formados sobre las superficies Lisa Tratada y Lisa No tratada.

Al estudiar el *biofilm* de *Bacillus subtilis* 168 notamos que la adhesión a los sustratos era débil, y por ello sólo fue posible adquirir imágenes del *biofilm* desarrollado sobre ambas superficies Lisas: Tratada y No Tratada. *B. subtilis* es uno de los organismos modelo utilizados para el estudio de *biofilms*. La cepa 168 es una de las más conocidas y extensamente utilizada en los laboratorios gracias a su fácil manejo y manipulación. Sin embargo, se la ha considerado una cepa domesticada defectuosa en la formación de *biofilms* robustos [197]. En particular, se ha resaltado su deficiencia en la producción de exopolisacáridos y que ello afectaría su capacidad de formar *biofilms* [198, 199].

Por otro lado, al comparar el Módulo de Young de los *biofilms*, notamos un notable incremento en la rigidez del *biofilm* formado sobre la superficie Lisa No Tratada. En este caso, creemos que la diferencia en la rigidez puede deberse a diferencias en la composición de la matriz que facilitarían su adhesión y mantendrían una estructura más rígida en el caso de que el sustrato posea una superficie hidrofílica.

CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados expuestos en este capítulo nos permite arribar a las siguientes conclusiones:

- 1) Fue posible observar el *biofilm* en su estado nativo, desarrollado sobre cupones de PDMS con diferente topografía en su superficie.
- 2) Existen diferencias significativas en los valores de Módulo de Young para los *biofilms* de *P. protegens* Pf-5 desarrollados sobre superficies con ondas en comparación con los *biofilms* formados sobre superficies Lisas, siendo éstos últimos los menos rígidos.
- 3) Se observaron diferencias significativas en los valores de Módulo de Young entre el *biofilm* de *P. protegens* Pf-5 formado sobre una superficie Lisa hidrofóbica (No Tratada) y una superficie Lisa hidrofílica (Tratada).
- 4) El *biofilm* de *B. subtilis* 168 desarrollado sobre la superficie Lisa Tratada resultó significativamente más rígido en términos del Módulo de Young respecto al *biofilm* formado sobre la superficie Lisa No Tratada.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS A FUTURO.

El trabajo de Tesis aquí presentado buscó comprender la importancia de la topografía en las distintas etapas de formación de *biofilms* bacterianos. Utilizando *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *Bacillus subtilis* 168 como bacterias modelos Gram negativa y Gram positiva, respectivamente, se realizaron ensayos que permitieron estudiar ambos *biofilms* desde distintos enfoques. Mediante la incubación de los cupones de PDMS con cultivos bacterianos, logramos ver que la topografía afecta los primeros pasos en la formación de *biofilms*. En el caso de *P. protegens*, el efecto que tiene la topografía en la adhesión bacteriana es aún más notorio que para *B. subtilis*, donde la hidrofobicidad también juega un rol determinante.

A través de un ensayo de fluorescencia, se mostró la acción bactericida de la superficie con ondas de $\lambda=0,4\mu\text{m}$ luego de 1 hora de incubación, aunque sólo fue efectiva contra la bacteria Gram negativa. Si bien luego de 3 horas este efecto se revierte, estos resultados resultan promisorios para el desarrollo de nuevas superficies antimicrobianas.

Entender las fuerzas que gobiernan las primeras etapas de formación de *biofilms* podría permitir un mejor control de su desarrollo. Realizando experimentos de espectroscopía de fuerzas logramos cuantificar las fuerzas de adhesión entre las bacterias y los sustratos de PDMS. Si bien no observamos una correlación entre la magnitud de las fuerzas de interacción y el grado de cubrimiento, en el caso de *P. protegens* pudimos determinar la presencia de distintas poblaciones de fuerzas, que podrían corresponder a diferentes mecanismos de adhesión al entrar en contacto las bacterias con distintos sustratos.

Para estudiar la influencia de la topografía en las propiedades nanomecánicas del *biofilm*, logramos desarrollar una metodología que nos permite estudiar el *biofilm* en condiciones similares a las fisiológicas. Observamos que la rigidez del *biofilm* en términos del Módulo de Young varía dependiendo el sustrato sobre el que se desarrollen. Posiblemente, la proporción y/o composición de la matriz extracelular varíe en función de la hidrofobicidad del sustrato y en consecuencia, se modifica la elasticidad del *biofilm*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para el análisis no se tuvo en cuenta el tamaño de las microcolonias, y por ende podríamos estar comparando *biofilms* con distinto grado de maduración. El distinto grado de maduración se debe a la distinta cinética de colonización que poseen las cepas de estudio en relación con las propiedades fisicoquímicas y topografía del sustrato a colonizar.

Con estos ensayos, hemos logrado estudiar a distintas escalas la influencia de la topografía en las diferentes etapas de desarrollo de *biofilms* bacterianos.

Entendemos la necesidad de ampliar estos estudios. A futuro se continuará estudiando la influencia de la topografía en la formación y estructura del *biofilm*. Los objetivos de esta etapa consisten en modificar los sustratos de PDMS en orden de aumentar la hidrofobicidad de la superficie, así como también realizar nanocompositos de manera de incrementar el efecto bactericida.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Costerton, J.W., et al., *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annual Reviews in Microbiology, 1987. **41**(1): p. 435-464.
2. Flemming, H.-C., et al., *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. Nature Reviews Microbiology, 2016. **14**: p. 563.
3. Flemming, H.-C., *The perfect slime*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011. **86**(2): p. 251-259.
4. Høiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. International journal of antimicrobial agents, 2010. **35**(4): p. 322-332.
5. Whitton, B.A., *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. 2012: Springer Science & Business Media.
6. Weaver, L., et al., *Biofilm resilience to desiccation in groundwater aquifers: a laboratory and field study*. Science of the Total Environment, 2015. **514**: p. 281-289.
7. Mah, T.-F., *Biofilm-specific antibiotic resistance*. Future microbiology, 2012. **7**(9): p. 1061-1072.
8. Fux, C., et al., *Survival strategies of infectious biofilms*. Trends in microbiology, 2005. **13**(1): p. 34-40.
9. West, S.A., et al., *Social evolution theory for microorganisms*. Nature reviews microbiology, 2006. **4**(8): p. 597-607.
10. Fredrickson, J.K., *Ecological communities by design*. Science, 2015. **348**(6242): p. 1425-1427.
11. Elias, S. and E. Banin, *Multi-species biofilms: living with friendly neighbors*. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**(5): p. 990-1004.
12. Breugelmans, P., et al., *Architecture and spatial organization in a triple-species bacterial biofilm synergistically degrading the phenylurea herbicide linuron*. FEMS microbiology ecology, 2008. **64**(2): p. 271-282.
13. Billings, N., et al., *Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics*. Reports on Progress in Physics, 2015. **78**(3): p. 036601.

14. Davey, M.E. and G.A. O'toole, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000. **64**(4): p. 847-867.
15. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*, in *Annual Review of Microbiology*. 2000. p. 49-79.
16. Bazaka, K., R.J. Crawford, and E.P. Ivanova, *Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness?* Biotechnology Journal, 2011. **6**(9): p. 1103-1114.
17. De Vos, W.M., *Microbial biofilms and the human intestinal microbiome*. NPJ biofilms and microbiomes, 2015. **1**(1): p. 1-3.
18. Bratzler, D.W., et al., *Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery*. Surgical infections, 2013. **14**(1): p. 73-156.
19. Bozic, K.J., et al., *The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2010. **468**(1): p. 45-51.
20. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nature reviews Drug discovery, 2003. **2**(2): p. 114-122.
21. Mah, T.-F.C. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends in microbiology, 2001. **9**(1): p. 34-39.
22. Taylor, E., *TJ Webster Reducing infections through nanotechnology and Nanoparticles Int. J. Nanomedicine*, 2011. **6**: p. 1463.
23. Schultz, M.P., *Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering*. Biofouling, 2007. **23**(5): p. 331-341.
24. Schultz, M., et al., *Economic impact of biofouling on a naval surface ship*. Biofouling, 2011. **27**(1): p. 87-98.
25. Otani, M., et al., *Occurrence and diversity of barnacles on international ships visiting Osaka Bay, Japan, and the risk of their introduction*. Biofouling, 2007. **23**(4): p. 277-286.
26. Pettengill, J., et al., *Biofouling likely serves as a major mode of dispersal for the polychaete tubeworm *Hydroides elegans* as inferred from microsatellite loci*. Biofouling, 2007. **23**(3): p. 161-169.
27. Piola, R.F. and E.L. Johnston, *The potential for translocation of marine species via small-scale disruptions to antifouling surfaces*. Biofouling, 2008. **24**(3): p. 145-155.

28. Yamaguchi, T., et al., *The introduction to Japan of the Titan barnacle, Megabalanus coccopoma (Darwin, 1854)(Cirripedia: Balanomorpha) and the role of shipping in its translocation*. Biofouling, 2009. **25**(4): p. 325-333.
29. Hori, K. and S. Matsumoto, *Bacterial adhesion: From mechanism to control*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **48**(3): p. 424-434.
30. Logan, B.E., et al., *Microbial fuel cells: methodology and technology*. Environmental science & technology, 2006. **40**(17): p. 5181-5192.
31. Logan, B.E., *Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**: p. 375.
32. Danhorn, T. and C. Fuqua, *Biofilm formation by plant-associated bacteria*. Annu. Rev. Microbiol., 2007. **61**: p. 401-422.
33. Boyle, M., *Microbial ecology of sewage treatment*. 1993.
34. Maddula, V., E. Pierson, and L. Pierson, *Altering the ratio of phenazines in Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens) strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition*. Journal of bacteriology, 2008. **190**(8): p. 2759-2766.
35. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*. Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8533-8554.
36. Rzhepishevskaya, O., et al., *The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture*. Biomaterials Science, 2013. **1**(6): p. 589-602.
37. Zhang, M., et al., *Lotus effect in wetting and self-cleaning*. Biotribology, 2016. **5**: p. 31-43.
38. Zhang, X., L. Wang, and E. Levänen, *Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion*. Rsc Advances, 2013. **3**(30): p. 12003-12020.
39. Erramilli, S. and J. Genzer, *Influence of surface topography attributes on settlement and adhesion of natural and synthetic species*. Soft matter, 2019. **15**(20): p. 4045-4067.
40. Marmur, A., *Wetting on hydrophobic rough surfaces: To be heterogeneous or not to be?* Langmuir, 2003. **19**(20): p. 8343-8348.
41. Song, F., H. Koo, and D. Ren, *Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation*. Journal of dental research, 2015. **94**(8): p. 1027-1034.

42. Anselme, K., et al., *The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(10): p. 3824-3846.
43. Teughels, W., et al., *Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development*. Clinical oral implants research, 2006. **17**(S2): p. 68-81.
44. Helbig, R., et al., *The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion*. Biomaterials Science, 2016. **4**(7): p. 1074-1078.
45. Poncin-Epaillard, F., et al., *Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface—a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria?* Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(3): p. 1152-1161.
46. Siegismund, D., et al., *Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling*. Acta biomaterialia, 2014. **10**(1): p. 267-275.
47. Crawford, R.J., et al., *Surface topographical factors influencing bacterial attachment*. Advances in colloid and interface science, 2012. **179**: p. 142-149.
48. Epstein, A.K., et al., *Biofilm attachment reduction on bioinspired, dynamic, micro-wrinkling surfaces*. New Journal of Physics, 2013. **15**(9): p. 095018.
49. Perera-Costa, D., et al., *Studying the influence of surface topography on bacterial adhesion using spatially organized microtopographic surface patterns*. Langmuir, 2014. **30**(16): p. 4633-4641.
50. Pogodin, S., et al., *Biophysical model of bacterial cell interactions with nanopatterned cicada wing surfaces*. Biophysical journal, 2013. **104**(4): p. 835-840.
51. Bakker, D.P., et al., *Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **32**(3): p. 179-190.
52. Lichter, J.A., et al., *Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria*. Biomacromolecules, 2008. **9**(6): p. 1571-1578.
53. Song, F. and D. Ren, *Stiffness of Cross-Linked Poly(Dimethylsiloxane) Affects Bacterial Adhesion and Antibiotic Susceptibility of Attached Cells*. Langmuir, 2014. **30**(34): p. 10354-10362.
54. Pratt, L.A. and R. Kolter, *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. Molecular microbiology, 1998. **30**(2): p. 285-293.

55. Vatanyoopaisarn, S., et al., *Effect of flagella on initial attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel*. Appl. Environ. Microbiol., 2000. **66**(2): p. 860-863.
56. Bodenmiller, D., E. Toh, and Y.V. Brun, *Development of surface adhesion in Caulobacter crescentus*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(5): p. 1438-1447.
57. Mandel, M.J., et al., *Squid-derived chitin oligosaccharides are a chemotactic signal during colonization by Vibrio fischeri*. Appl. Environ. Microbiol., 2012. **78**(13): p. 4620-4626.
58. Palmer, J., S. Flint, and J. Brooks, *Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2007. **34**(9): p. 577-588.
59. Berne, C., et al., *Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria*. Microbial Biofilms, 2015: p. 163-199.
60. Dufrêne, Y.F., et al., *Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM*. Nature methods, 2013. **10**(9): p. 847-854.
61. Tuson, H.H. and D.B. Weibel, *Bacteria-surface interactions*. Soft Matter, 2013. **9**(17): p. 4368-4380.
62. Liu, Y. and J.-H. Tay, *The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge*. Water research, 2002. **36**(7): p. 1653-1665.
63. Kostenko, V., et al., *Staphylococcus aureus biofilm formation and tolerance to antibiotics in response to oscillatory shear stresses of physiological levels*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010. **59**(3): p. 421-431.
64. Purevdorj, B., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Appl. Environ. Microbiol., 2002. **68**(9): p. 4457-4464.
65. Howell, C. and R. Stipanovic, *Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium*. Phytopathology, 1979. **69**(5): p. 480-482.
66. Xie, Y., et al., *A rifampicin-resistant (rpoB) mutation in Pseudomonas protegens Pf-5 strain leads to improved antifungal activity and elevated production of secondary metabolites*. Research in microbiology, 2016. **167**(8): p. 625-629.
67. Haas, D. and G. Défago, *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads*. Nature reviews microbiology, 2005. **3**(4): p. 307-319.

68. Paulsen, I.T., et al., *Complete genome sequence of the plant commensal Pseudomonas fluorescens Pf-5*. *Nature biotechnology*, 2005. **23**(7): p. 873-878.
69. Mavrodi, D.V., et al., *Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium Pseudomonas fluorescens Pf-5*. *BMC microbiology*, 2009. **9**(1): p. 8.
70. Setten, L., et al., *Engineering Pseudomonas protegens Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions*. *PLoS One*, 2013. **8**(5).
71. Ueda, A. and H. Saneoka, *Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated Pseudomonas species*. *Current microbiology*, 2015. **70**(4): p. 506-513.
72. Ruiz, J.A., E.M. Bernar, and K. Jung, *Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in Pseudomonas protegens Pf-5*. *PloS one*, 2015. **10**(1).
73. Beauregard, P.B., et al., *Bacillus subtilis biofilm induction by plant polysaccharides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(17): p. E1621-E1630.
74. Gallegos-Monterrosa, R., E. Mhatre, and Á.T. Kovács, *Specific Bacillus subtilis 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium*. *Microbiology*, 2016. **162**(11): p. 1922-1932.
75. Djordjevic, D., M. Wiedmann, and L. McLandsborough, *Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002. **68**(6): p. 2950-2958.
76. Linton, C., A. Sherriff, and M. Millar, *Use of a modified Robbins device to directly compare the adhesion of Staphylococcus epidermidis RP62A to surfaces*. *Journal of applied microbiology*, 1999. **86**(2): p. 194-202.
77. Teodósio, J., et al., *Flow cell hydrodynamics and their effects on E. coli biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow*. *Biofouling*, 2011. **27**(1): p. 1-11.
78. Teodósio, J., M. Simões, and F. Mergulhão, *The influence of nonconjugative Escherichia coli plasmids on biofilm formation and resistance*. *Journal of applied microbiology*, 2012. **113**(2): p. 373-382.
79. Haagenzen, J.A., et al., *Differentiation and distribution of colistin-and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. *Journal of bacteriology*, 2007. **189**(1): p. 28-37.
80. Møller, S., et al., *In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. **64**(2): p. 721-732.

81. Li, L., et al., *The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens*. *Frontiers in microbiology*, 2014. **5**: p. 258.
82. Pitts, B., et al., *A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal*. *Journal of microbiological methods*, 2003. **54**(2): p. 269-276.
83. Gómez-Suárez, C., H.J. Busscher, and H.C. Van Der Mei, *Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67**(6): p. 2531-2537.
84. Arnold, J.W., *Colorimetric assay for biofilms in wet processing conditions*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2008. **35**(11): p. 1475.
85. Peeters, E., H.J. Nelis, and T. Coenye, *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates*. *Journal of microbiological methods*, 2008. **72**(2): p. 157-165.
86. Bridier, A., et al., *The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method*. *Journal of microbiological methods*, 2010. **82**(1): p. 64-70.
87. Reichhardt, C. and M. Parsek, *Confocal laser scanning microscopy for analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm architecture and matrix localization*. *Frontiers in microbiology*, 2019. **10**: p. 677.
88. Díaz-Pascual, F., et al., *Breakdown of Vibrio cholerae biofilm architecture induced by antibiotics disrupts community barrier function*. *Nature microbiology*, 2019. **4**(12): p. 2136-2145.
89. Neu, T.R. and J.R. Lawrence, *Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy*, in *Microbial Biofilms*. 2014, Springer. p. 43-64.
90. Neu, T.R. and J.R. Lawrence, *Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy*, in *Productive Biofilms*. 2014, Springer. p. 1-51.
91. Hope, C., D. Clements, and M. Wilson, *Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling*. *Journal of applied microbiology*, 2002. **93**(3): p. 448-455.
92. Doroshenko, N., et al., *Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in Staphylococcus epidermidis biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014. **58**(12): p. 7273-7282.

93. Ivanova, E.P., et al., *Natural bactericidal surfaces: mechanical rupture of Pseudomonas aeruginosa cells by cicada wings*. Small, 2012. **8**(16): p. 2489-2494.
94. Hung, C., et al., *Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure*. MBio, 2013. **4**(5): p. e00645-13.
95. Rodrigues, D., et al., *Effect of magnetic hyperthermia on the structure of biofilm and cellular viability of a food spoilage bacterium*. Biofouling, 2013. **29**(10): p. 1225-1232.
96. Hannig, C., et al., *Visualization of adherent micro-organisms using different techniques*. Journal of medical microbiology, 2010. **59**(1): p. 1-7.
97. Boyd, C.D., et al., *Structural features of the Pseudomonas fluorescens biofilm adhesin LapA required for LapG-dependent cleavage, biofilm formation, and cell surface localization*. Journal of bacteriology, 2014. **196**(15): p. 2775-2788.
98. Potthoff, E., et al., *Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy*. Nanoscale, 2015. **7**(9): p. 4070-4079.
99. Ansari, M.J., et al., *Effect of jujube honey on Candida albicans growth and biofilm formation*. Archives of medical research, 2013. **44**(5): p. 352-360.
100. Li, Y.F., et al., *Inhibited biofilm formation and improved antibacterial activity of a novel nanoemulsion against cariogenic Streptococcus mutans in vitro and in vivo*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 447.
101. Qin, Z., et al., *Organic compounds inhibiting S. epidermidis adhesion and biofilm formation*. Ultramicroscopy, 2009. **109**(8): p. 881-888.
102. Díaz, C., P. Schilardi, and M.F.L. De Mele, *Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals*. Artificial organs, 2008. **32**(4): p. 292-298.
103. Peterson, B.W., et al., *Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges*. FEMS microbiology reviews, 2015. **39**(2): p. 234-245.
104. Al-Ghamdi, A., et al., *Bacterial contamination of computer keyboards and mice, elevator buttons and shopping carts*. African Journal of Microbiology Research, 2011. **5**(23): p. 3998-4003.
105. Cloutier, M., D. Mantovani, and F. Rosei, *Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities*. Trends in biotechnology, 2015. **33**(11): p. 637-652.
106. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology advances, 2009. **27**(1): p. 76-83.

107. Hsiao, M.-T., et al., *One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂(OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(1): p. 205-210.
108. Yasuyuki, M., et al., *Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Biofouling, 2010. **26**(7): p. 851-858.
109. Storm, W.L., et al., *Dual action antimicrobial surfaces via combined nitric oxide and silver release*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. **103**(6): p. 1974-1984.
110. Marambio-Jones, C. and E.M. Hoek, *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(5): p. 1531-1551.
111. Gupta, A. and S. Silver, *Molecular genetics: silver as a biocide: will resistance become a problem?* Nature biotechnology, 1998. **16**(10): p. 888.
112. Zhang, S., et al., *New insights into synergistic antimicrobial and antifouling cotton fabrics via dually finished with quaternary ammonium salt and zwitterionic sulfobetaine*. Chemical Engineering Journal, 2018. **336**: p. 123-132.
113. Zhu, D., et al., *Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt*. Materials Science and Engineering: C, 2016. **61**: p. 79-84.
114. Wang, Q., et al., *Antibacterial functionalization of wool fabric via immobilizing lysozymes*. Bioprocess and biosystems engineering, 2009. **32**(5): p. 633-639.
115. Isquith, A., E. Abbott, and P. Walters, *Surface-bonded antimicrobial activity of an organosilicon quaternary ammonium chloride*. Appl. Environ. Microbiol., 1972. **24**(6): p. 859-863.
116. Correia, V.G., et al., *Antimicrobial contact-active oligo (2-oxazoline) s-grafted surfaces for fast water disinfection at the point-of-use*. Biomacromolecules, 2015. **16**(12): p. 3904-3915.
117. Tew, G.N., et al., *De novo design of biomimetic antimicrobial polymers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(8): p. 5110-5114.
118. Goldberg, S., R. Doyle, and M. Rosenberg, *Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers*. Journal of Bacteriology, 1990. **172**(10): p. 5650-5654.

119. Hasan, J., et al., *Selective bactericidal activity of nanopatterned superhydrophobic cicada *Psaltoda claripennis* wing surfaces*. Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**(20): p. 9257-9262.
120. Pogodin, S., et al., *Biophysical Model of Bacterial Cell Interactions with Nanopatterned Cicada Wing Surfaces*. Biophysical Journal, 2013. **104**(4): p. 835-840.
121. Vassallo, E., et al., *Bactericidal performance of nanostructured surfaces by fluorocarbon plasma*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **80**: p. 117-121.
122. Banerjee, I., R.C. Pangule, and R.S. Kane, *Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms*. Advanced materials, 2011. **23**(6): p. 690-718.
123. Callow, J.A. and M.E. Callow, *Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings*. Nature communications, 2011. **2**(1): p. 1-10.
124. Schumacher, J.F., et al., *Engineered antifouling microtopographies—effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga *Ulva**. Biofouling, 2007. **23**(1): p. 55-62.
125. Fadeeva, E., et al., *Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation*. Langmuir, 2011. **27**(6): p. 3012-3019.
126. Schaer, T.P., et al., *Hydrophobic polycationic coatings that inhibit biofilms and support bone healing during infection*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1245-1254.
127. Semmler, C. and A. Alexeev, *Designing structured surfaces that repel fluid-borne particles*. Physical Review E, 2011. **84**(6): p. 066303.
128. Ma, J., et al., *Nanostructure on Taro Leaves Resists Fouling by Colloids and Bacteria under Submerged Conditions*. Langmuir, 2011. **27**(16): p. 10035-10040.
129. Hizal, F., et al., *Nanoengineered Superhydrophobic Surfaces of Aluminum with Extremely Low Bacterial Adhesivity*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017. **9**(13): p. 12118-12129.
130. Xu, L.-C. and C.A. Siedlecki, *Staphylococcus epidermidis adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces*. Biomedical materials, 2014. **9**(3): p. 035003.
131. Epstein, A.K., et al., *Liquid-infused structured surfaces with exceptional anti-biofouling performance*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(33): p. 13182-13187.

132. Tang, P., et al., *Effect of Superhydrophobic Surface of Titanium on Staphylococcus aureus Adhesion*. Journal of Nanomaterials, 2011. **2011**: p. 8.
133. Watson, G.S., et al., *A gecko skin micro/nano structure—A low adhesion, superhydrophobic, anti-wetting, self-cleaning, biocompatible, antibacterial surface*. Acta biomaterialia, 2015. **21**: p. 109-122.
134. Engel, A. and D.J. Müller, *Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope*. Nature structural biology, 2000. **7**(9): p. 715-718.
135. Drake, B., et al., *Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope*. Science, 1989. **243**(4898): p. 1586-1589.
136. Radmacher, M., R. Tillmann, and H. Gaub, *Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope*. Biophysical journal, 1993. **64**(3): p. 735-742.
137. Hörber, J. and M. Miles, *Scanning probe evolution in biology*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1002-1005.
138. Müller, D.J. and Y.F. Dufrêne, *Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface*. Trends in cell biology, 2011. **21**(8): p. 461-469.
139. Müller, D.J. and Y.F. Dufrene, *Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology*, in *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*. 2010, World Scientific. p. 269-277.
140. Kasas, S. and A. Ikai, *A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging*. Biophysical Journal, 1995. **68**(5): p. 1678-1680.
141. Dufrêne, Y.F., et al., *Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of phanerochaete chrysosporium*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(17): p. 5350-5354.
142. Francius, G., et al., *Direct observation of Staphylococcus aureus cell wall digestion by lysostaphin*. Journal of bacteriology, 2008. **190**(24): p. 7904-7909.
143. Touhami, A., B. Nysten, and Y.F. Dufrêne, *Nanoscale Mapping of the Elasticity of Microbial Cells by Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 2003. **19**(11): p. 4539-4543.
144. van der Mei, H.C., et al., *Direct probing by atomic force microscopy of the cell surface softness of a fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strain*. Biophysical journal, 2000. **78**(5): p. 2668-2674.

145. Mendez-Vilas, A., A.M. Gallardo-Moreno, and M.L. González-Martín, *Atomic force microscopy of mechanically trapped bacterial cells*. *Microscopy and microanalysis*, 2007. **13**(1): p. 55-64.
146. Beckmann, M., et al., *Measuring cell surface elasticity on enteroaggregative Escherichia coli wild type and dispersin mutant by AFM*. *Ultramicroscopy*, 2006. **106**(8-9): p. 695-702.
147. Mortensen, N.P., et al., *Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of Pseudomonas aeruginosa cells*. *Langmuir*, 2009. **25**(6): p. 3728-3733.
148. Sullivan, C.J., et al., *Comparison of the indentation and elasticity of E. coli and its spheroplasts by AFM*. *Ultramicroscopy*, 2007. **107**(10-11): p. 934-942.
149. Shu, A.-C., et al., *Evidence of DNA transfer through F-pilus channels during Escherichia coli conjugation*. *Langmuir*, 2008. **24**(13): p. 6796-6802.
150. Arce, F.T., et al., *Nanoscale structural and mechanical properties of nontypeable Haemophilus influenzae biofilms*. *Journal of bacteriology*, 2009. **191**(8): p. 2512-2520.
151. Plomp, M., et al., *In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(23): p. 9644-9649.
152. Doktycz, M., et al., *AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces*. *Ultramicroscopy*, 2003. **97**(1-4): p. 209-216.
153. Hutter, J.L. and J. Bechhoefer, *Calibration of atomic-force microscope tips*. *Review of Scientific Instruments*, 1993. **64**(7): p. 1868-1873.
154. Ludwig, M., W. Dettmann, and H. Gaub, *Atomic force microscope imaging contrast based on molecular recognition*. *Biophysical journal*, 1997. **72**(1): p. 445-448.
155. Hinterdorfer, P. and Y.F. Dufrière, *Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy*. *Nature methods*, 2006. **3**(5): p. 347-355.
156. Roos, W., R. Bruinsma, and G. Wuite, *Physical virology*. *Nature physics*, 2010. **6**(10): p. 733-743.
157. Grandbois, M., et al., *Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2000. **48**(5): p. 719-724.
158. Heinz, W.F. and J.H. Hoh, *Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope*. *Trends in biotechnology*, 1999. **17**(4): p. 143-150.

159. Lee, G.U., D.A. Kidwell, and R.J. Colton, *Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy*. Langmuir, 1994. **10**(2): p. 354-357.
160. Krieg, M., et al., *Atomic force microscopy-based mechanobiology*. Nature Reviews Physics, 2019. **1**(1): p. 41-57.
161. Gavara, N., *A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics*. Microscopy research and technique, 2017. **80**(1): p. 75-84.
162. Boland, T. and B. Ratner, *Direct measurement of hydrogen bonding in DNA nucleotide bases by atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(12): p. 5297-5301.
163. Lee, G.U., L.A. Chrisey, and R.J. Colton, *Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA*. Science, 1994. **266**(5186): p. 771-773.
164. Puech, P.-H., et al., *Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy*. Journal of cell science, 2005. **118**(18): p. 4199-4206.
165. Beaussart, A., et al., *Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy*. Nature protocols, 2014. **9**(5): p. 1049.
166. Preedy, E., et al., *Surface roughness mediated adhesion forces between borosilicate glass and gram-positive bacteria*. Langmuir, 2014. **30**(31): p. 9466-9476.
167. Chiche, A., C.M. Stafford, and J.T. Cabral, *Complex micropatterning of periodic structures on elastomeric surfaces*. Soft Matter, 2008. **4**(12): p. 2360-2364.
168. Park, J.-Y., et al., *Controlled wavelength reduction in surface wrinkling of poly(dimethylsiloxane)*. Soft Matter, 2010. **6**(3): p. 677-684.
169. Bayley, F.A., et al., *Wavefront kinetics of plasma oxidation of polydimethylsiloxane: limits for sub- μm wrinkling*. Soft Matter, 2014. **10**(8): p. 1155-1166.
170. Nečas, D. and P. Klapetek, *Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis*. Open Physics, 2012. **10**(1): p. 181-188.
171. Berne, C., et al., *Bacterial adhesion at the single-cell level*. Nature Reviews Microbiology, 2018. **16**(10): p. 616-627.
172. Wu, S., et al., *Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review (Review)*. Biointerphases, 2018. **13**(6).

173. Lee, J.N., et al., *Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly (dimethylsiloxane)*. *Langmuir*, 2004. **20**(26): p. 11684-11691.
174. Bélanger, M.C. and Y. Marois, *Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review*. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2001. **58**(5): p. 467-477.
175. Díaz, C., et al., *Submicron Trenches Reduce the Pseudomonas fluorescens Colonization Rate on Solid Surfaces*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2009. **1**(1): p. 136-143.
176. Vollmer, W. and J.-V. Höltje, *The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer (s)?* *Journal of bacteriology*, 2004. **186**(18): p. 5978-5987.
177. Busscher, H.J., W. Norde, and H.C. Van Der Mei, *Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008. **74**(9): p. 2559-2564.
178. Müller, D.J. and Y.F. Dufrêne, *Force nanoscopy of living cells*. *Current biology*, 2011. **21**(6): p. R212-R216.
179. Beaussart, A., et al., *Single-cell force spectroscopy of probiotic bacteria*. *Biophysical journal*, 2013. **104**(9): p. 1886-1892.
180. Zhu, L., et al., *Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 2006. **152**(8): p. 2395-2404.
181. Vadillo-Rodríguez, V., et al., *Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. **70**(9): p. 5441-5446.
182. Meyer, R.L., et al., *Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions*. *Ultramicroscopy*, 2010. **110**(11): p. 1349-1357.
183. Bolshakova, A., et al., *Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes*. *Ultramicroscopy*, 2001. **86**(1-2): p. 121-128.
184. Younes, J.A., et al., *Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli*. *PLoS one*, 2012. **7**(5).

185. Burgain, J., et al., *In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **104**: p. 153-162.
186. Tao, Y., et al., *Oral consumption of cranberry juice cocktail inhibits molecular-scale adhesion of clinical uropathogenic Escherichia coli*. Journal of medicinal food, 2011. **14**(7-8): p. 739-745.
187. Zhang, W., J. Hughes, and Y. Chen, *Impacts of hematite nanoparticle exposure on biomechanical, adhesive, and surface electrical properties of Escherichia coli cells*. Appl. Environ. Microbiol., 2012. **78**(11): p. 3905-3915.
188. Francius, G., et al., *Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of Escherichia coli cells subjected to osmotic stress*. PloS one, 2011. **6**(5).
189. Dague, E., et al., *Assembly of live micro-organisms on microstructured PDMS stamps by convective/capillary deposition for AFM bio-experiments*. Nanotechnology, 2011. **22**(39): p. 395102.
190. Volle, C.B., et al., *Quantitative changes in the elasticity and adhesive properties of Escherichia coli ZK1056 prey cells during predation by Bdellovibrio bacteriovorus 109J*. Langmuir, 2008. **24**(15): p. 8102-8110.
191. Kundukad, B., et al., *Mechanical properties of the superficial biofilm layer determine the architecture of biofilms*. Soft matter, 2016. **12**(26): p. 5718-5726.
192. Bremer, P., G. Geese, and B. Drake, *Atomic force microscopy examination of the topography of a hydrated bacterial biofilm on a copper surface*. Current Microbiology, 1992. **24**(4): p. 223-230.
193. Quilès, F., et al., *In situ and real time investigation of the evolution of a Pseudomonas fluorescens nascent biofilm in the presence of an antimicrobial peptide*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2016. **1858**(1): p. 75-84.
194. Stewart, E.J., et al., *Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 1-14.
195. Ehret, A.E. and M. Böl, *Modelling mechanical characteristics of microbial biofilms by network theory*. Journal of The Royal Society Interface, 2013. **10**(78): p. 20120676.
196. Lau, P.C., et al., *Absolute quantitation of bacterial biofilm adhesion and viscoelasticity by microbead force spectroscopy*. Biophysical journal, 2009. **96**(7): p. 2935-2948.

197. Romero, D., *Bacterial determinants of the social behavior of Bacillus subtilis*. Research in microbiology, 2013. **164**(7): p. 788-798.
198. Kearns, D.B., et al., *A master regulator for biofilm formation by Bacillus subtilis*. Molecular microbiology, 2005. **55**(3): p. 739-749.
199. McLoon, A.L., et al., *Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(8): p. 2027-2034.

APÉNDICE

1. Código de Matlab para guardar las fuerzas de adhesión.

```
%%
cell_xf= cell(24,1);
var_str=[10:24];
for i=1:14
sprcf= table2cell(readtable(strcat('cr000',num2str(var_str(i)),'.000 -
NanoScope Analysis.txt')));
cell_xf(i+9)={sprcf};
end

var_str=[10:24];
for i=1:length(var_str)
sprcf= table2cell(readtable(strcat('cr000',num2str(var_str(i)),'.txt')));
cell_xf(i+31)={sprcf};
end

x_fuerza= zeros(length(sprcf),2);
all_cell= cell(length(cell_xf),1);

for i=1:length(cell_xf)

variables_xf= cell_xf{i};

for n=1:length(variables_xf(:,1))
only= strsplit(variables_xf{n});
value=zeros(1,2);

for k=1:2
value_d(k)=str2num(only{k});
end

x_fuerza(n,:)=value_d;
end

all_cell(i)={x_fuerza};
end

%%

for i=1:length(all_cell)
all_cell_inspect= all_cell{i};
figure;
plot(all_cell_inspect(:,1),all_cell_inspect(:,2))
end

%%
% all_peaks=zeros(0,2);
```

```
% %%  
% y= fuerza;  
% figure;  
% plot(x,y);  
%  
%%  
  
a=size(all_peaks, 1);  
for i=(a+1):(size(all_peaks, 1)+size(cursor_info, 2))  
all_peaks(i,:)=cursor_info(i-a).Position  
end  
save('all_peaksctrl.mat','all_peaks');
```

2. Composición de los medios de cultivos utilizados.

2.1. Medio LB (1 Litro).

Extracto de levadura.....	5 gr
Triptona	10gr
NaCl	5gr

2.2. Medio M9 (1 Litro).

Solución de sales, pH 7,2.....	100 mL
Glucosa 20%.....	20mL
MgSO ₄ 1M ..	1mL
CaCl ₂ 1M	0,3mL
Biotina 1mg/mL	1mL
Tiamina 1mg/mL	1mL
Elementos traza.....	10 mL

Solución de sales:

Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O.....	75,2 g/L
KH ₂ PO ₄	30g/L
NaCl	5g/L
NH ₄ Cl	5g/L

Elementos traza:

EDTA.....	5g/L
FeCl ₃ -6H ₂ O.....	0,83g/L
ZnCl ₂	84mg/L
CuCl ₂ -2H ₂ O.....	13mg/L
CoCl ₂ -2H ₂ O	10mg/L
H ₃ BO ₃	10mg/L

MnCl₂·4H₂O..... 1,6mg/L