

COSTAMAGNA, SILVINA IRIS

Construcción de copolímeros modificados para inhibición de biofilmes de eub:

75223

2016

75224



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

**Tesis para acceder al título de
Magíster en Inocuidad y Calidad de Alimentos**

**CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES POLIMÉRICAS
MODIFICADAS PARA INHIBICIÓN DE BIOFILMS DE
Staphylococcus aureus EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA**

Mic. Iris Silvana Costamagna

DIRECTORA: Dra. Romina Bellingeri

CODIRECTORA: Dra. Carolina Grosso

12557

Río Cuarto, Junio de 2016

75224

MFN
Clasif:
T_1047

**Caracterización de superficies poliméricas modificadas para inhibición de biofilms de
Staphylococcus aureus en la industria alimenticia**

Por



Costamagna, Iris Silvana




Bellingeri
Romina
Director



Codirectora
GROSSOCORONA



Fabrisio Alustiza



Laura N. Cariddi



Picco NATALIA

Agradecimientos

Durante el tiempo de la cursada de la Maestría y la realización de la tesis he tenido la fortuna y enorme satisfacción de conocer, estudiar y trabajar con muchas personas que me han ayudado de una u otra forma, y a las que estoy profundamente agradecida. Enumerarlas en una lista trae consigo el riesgo de olvidar alguna de ellas, pero aun así, no quisiera dejar de mencionar a aquellas que siempre han estado. Por ello sinceramente agradezco:

En primer lugar a la Dra. Adriana Vivas, por su tutela constante y por su inagotable capacidad de trabajo. Sin su generosidad este trabajo no hubiese sido posible.

Al director de la Maestría, Dr. Rubén Davicino, y a los miembros de la Cátedra de Bromatología de la facultad de Veterinaria de la Universidad, por su apoyo y el tiempo compartido.

A Romi por haber aceptado la dirección de la presente tesis y además por haberme brindado todo su respaldo, paciencia, confianza, tiempo y conocimientos a través del tiempo en que trabajé bajo su dirección.

A Caro, mi codirectora, por haberme brindado también su tiempo y sus conocimientos para la concreción de este trabajo.

A los jurados que corrigieron esta tesis, por sus valiosos aportes: Dra. Natalia Picco, Dra. Noelia Cariddi y Dr. Fabrisio Alustiza.

Al Dr. Rosendo Liboa por sus correcciones, consejos y aliento a terminar la tesis.

A todos mis compañeros del Ex Laboratorio de Radioisótopos, por los gratos momentos compartidos y por haberme hecho sentir parte del equipo.

A Meli y Valen, a mis papás y a toda mi familia y amigos, que de algún otro modo también han sido partícipes de este trabajo.

A todos, gracias.

RESUMEN

Algunos microorganismos como *Staphylococcus aureus* tienen la capacidad de adherirse y crecer en los alimentos y en las superficies de industrias alimentarias formando comunidades complejas denominadas biofilms. Esto es significativamente importante ya que pueden causar serios riesgos tanto para la seguridad de los productos alimenticios como para la salud de los consumidores. Actualmente se están investigando nuevas estrategias para reducir la adhesión bacteriana como por ejemplo la topografía controlada. El método de ablación por Interferencia Láser Directa permite la fabricación de estructuras repetitivas mediante la irradiación directa de la muestra con un haz de luz. El objetivo de este estudio fue caracterizar físico-químicamente las superficies poliméricas modificadas por ablación por Interferencia Láser Directa y evaluar su efecto en la adhesión y el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Las propiedades químicas de los sustratos poliméricos se estudiaron por Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier y el espectro de absorción reveló la presencia de los grupos funcionales característicos del material escogido (poliimida). A su vez, se estudió la hidrofobicidad de las superficies mediante la medición del ángulo de contacto, así como también la topografía lograda por Microscopía de Fuerza Atómica. Los resultados sobre el efecto de la topografía en la adhesión y el crecimiento revelaron que las bacterias poseían un patrón de disposición orientado que respondía a la topografía del sustrato. También se encontró un desarrollo significativamente menor del biofilm en las superficies estructuradas. Estos resultados son importantes para el desarrollo de nuevos materiales como una estrategia innovadora para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la industria de alimentos.

ABSTRACT

Some microorganisms such as *Staphylococcus aureus* have the ability to adhere and grow in food and food industries surfaces forming complex communities called biofilms. This is significantly important because it can cause serious risks to the safety of foodstuffs and the health of consumers. Currently it has been investigating new strategies to reduce bacterial adhesion such as controlled topography. The method of Direct Laser Interference patterning allows the manufacturing of repetitive structures by direct irradiation of the sample with a light beam. The aim of this study was to characterize physico-chemically polymers modified by Direct Laser Interference patterning and to evaluate its effect on the adhesion and growth of *Staphylococcus aureus*. The chemical properties of the polymeric substrates were studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and the absorption spectrum revealed the presence of characteristic functional groups of the material chosen (polyimide). In turn, the hydrophobicity of the surfaces was studied by measuring the contact angle as well as the topography achieved by Atomic Force Microscopy. The results on the effect of the topography on the adhesion and growth revealed that the bacteria had a pattern layout oriented responding to the topography of the substrate. The biofilm development was significantly less in structured surfaces. These results are important for the development of new materials as an innovative strategy for prevention and control of bacterial contamination in the food industry.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	ii
Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv
Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras.....	viii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biofilms bacterianos.....	1
1.2 Biofilms en la industria alimentaria	2
1.3 Intoxicación alimentaria por <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.4 Resistencia de los biofilms.....	4
1.5 Etapas del desarrollo de un biofilm.....	6
1.5.1 Etapa 1: Acondicionamiento de la superficie.....	7
1.5.2 Etapa 2. Adhesión reversible.....	8
1.5.3 Etapa 3. Adhesión irreversible	8
1.5.4 Etapa 4. Maduración del biofilm.....	9
1.5.5 Etapa 5. Desprendimiento de bacterias	9
1.6 Características fisico-químicas del sustrato y adhesión bacteriana	10
1.6.1 Energía superficial e hidrofobicidad	10
1.6.2 Rugosidad.....	11
1.6.3 Carga superficial	12
1.7 Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm	12
1.7.1 <i>Quorum sensing</i>	12
1.7.2 Comunicación de corto alcance.....	13
1.8 Nuevas estrategias para erradicación de biofilms	13

1.9 Impacto de la nanotecnología en sistemas biológicos.....	15
1.10 Nanotecnología/Microtecnología para el diseño de superficies con aplicaciones biológicas	16
1.11 Nanotecnología/Microtecnología en sistemas de células procariotas	18
1.11.1 Inmovilización de bacterias sobre superficies.....	18
1.11.2 Patrones de bacterias utilizando hidrogeles.....	19
1.11.3 Microfluídica.....	19
1.12 Método de ablación por Interferencia Láser Directa.....	20
1.13 Medición del ángulo de contacto	21
1.13 Importancia del problema.....	22
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
2.1 Hipótesis.....	23
2.2 Objetivo general	23
2.3 Objetivos específicos.....	23
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	24
3.1 Materiales.....	24
3.2 Experimentos de Interferencia Láser.....	24
3.3 Caracterización de la estructura química.....	24
3.4 Caracterización física de las superficies.....	24
3.4.1 Microscopía óptica	24
3.4.2 Microscopía de Fuerza Atómica.....	25
3.4.3 Medición del ángulo de contacto.....	25
3.5 Estudio de comportamiento bacteriano frente a las superficies modificadas.....	25
3.5.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo	25
3.5.2 Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.5.3 Cuantificación de bacterias adheridas por recuento de colonias	26

3.5.4 Ensayo de viabilidad bacteriana	27
3.5.5 Cuantificación de la formación del biofilm por Cristal Violeta	27
3.5.6 Análisis del biofilm por Microscopía de Fuerza Atómica.....	28
3.6 Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	29
4.1 Estructura química por Espectrometría Infrarroja Transformada de Fourier	29
4.2 Caracterización física de las superficies.....	30
4.2.1 Microscopía óptica	30
4.2.2 Microscopía de Fuerza Atómica.....	30
4.2.3 Ángulo de contacto.....	31
4.3 Estudio de comportamiento bacteriano frente a las superficies modificadas	33
4.3.1 Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.3.2 Cuantificación de bacterias adheridas por recuento de colonias	34
4.3.3 Ensayo de viabilidad bacteriana por MTT	35
4.3.4 Formación de biofilm por la técnica de cristal violeta	35
4.3.5 Análisis del biofilm por Microscopía de Fuerza Atómica.....	37
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	38
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Medidas geométricas de las gotas en contacto con las superficies estructuradas	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm.	7
2	Esquema del dispositivo para medir el ángulo de contacto en superficies planas.	25
3	Espectro del FTIR de la poliimida comercial utilizada en este estudio.	29
4	Imágenes de las superficies poliméricas tomadas con el microscopio óptico.	30
5	Imágenes de las superficies estructuradas tomadas con el microscopio de fuerza atómica.	31
6	Perfil de la gota de agua sobre las distintas superficies poliméricas.	32
7	Curva de crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	33
8	Cuantificación de bacterias adheridas a las superficies estructuradas.	34
9	Viabilidad de <i>S. aureus</i> en las distintas superficies estructuradas.	35
10	Cuantificación de la formación de biofilm por la técnica de cristal violeta.	36
11	Imágenes de la adhesión de <i>S. aureus</i> en los distintos sustratos tomadas con el microscopio de fuerza atómica.	37

INTRODUCCIÓN

Biofilms bacterianos

Uno de los mayores avances en microbiología que se ha realizado en los últimos 50 años ha sido, sin lugar a dudas, el conocimiento del crecimiento y el desarrollo de microorganismos sobre diferentes superficies formando biofilms (Díaz, 2011).

Las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas: bacterias planctónicas o bacterias sésiles (formadoras de biofilms). Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Sanclement *et al.*, 2005; Ramadan, 2006). Este comportamiento particular tiene profundas consecuencias en el modo de analizar la supervivencia de las células procariotas, tanto en ambientes naturales o industriales como en el organismo humano.

Un biofilm es una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies bacterianas y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, incluyendo superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales (Shapiro, 1998; Costerton *et al.*, 1999).

Los biofilms que se encuentran en la naturaleza, consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por exopolisacáridos (EPS) polianiónicos fijados a la superficie (Chmielewski y Frank, 2003). Los EPS protegen a los microorganismos que forman parte del biofilms contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia del biofilm al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes (Carpentier y Cerf, 1993).

Las células bacterianas, que componen el 15 - 20% del volumen, no se dividen en el interior de los biofilms, lo cual podría atribuirse al hecho de adoptar un fenotipo alterado, diferente al de las mismas bacterias en estado de libre flotación (Chole y Faddis, 2003).

Los biofilms se organizan en patrones espaciales a nivel macroscópico y microscópico. Por ejemplo, algunas células constituyentes participan activamente en el esparcimiento del biofilm, mientras que otras entran en estado de dormitancia y son invulnerables a los antimicrobianos (Stewart y Franklin, 2008).



La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este elemento a representar hasta el 97% de su composición (Donlan, 2002). Además de agua y microorganismos, la matriz está formada por los EPS anteriormente nombrados y otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. En la matriz también pueden hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medioambiente en el cual se desarrolla el biofilm. Además, los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de EPS, lo que les permitiría interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos últimos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Post *et al.*, 2004).

Biofilms en la industria alimentaria

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en conducciones, equipos y materiales, ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Chmielewsky y Frank, 2003). Debido a que estos materiales pueden contener microorganismos patógenos o alterantes que presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud (Carpentier y Cerf, 1993; Fuster i Valls, 2006).

La presencia de biofilms en estas superficies es la causa principal de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas debidas al rechazo del producto como al desarrollo de enfermedades, si intervienen microorganismos patógenos (Serra, 2003).

Los biofilms formados sobre las carnes crudas y en el entorno del manipulador (superficies, utensilios e instrumentos) aumentan considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el procesado. Por este motivo, es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los



contaminen y establezcan un biofilm que les servirá de reservorio (Serra, 2003; Fuster i Valls, 2006).

Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de biofilms puede interferir en diferentes procesos y causar daños en los equipos (Kumar y Anand, 1998; Chmielewski y Frank, 2003). En sistemas de agua potable la formación de biofilms puede obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y su capacidad de transporte originando un incremento en el consumo energético. La formación de biofilms en intercambiadores de calor y torres de refrigeración puede reducir la transferencia de calor y como consecuencia su eficiencia en el proceso. Además, la formación de biofilms persistentes en las superficies metálicas puede causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de las bacterias (Chmielewski y Frank, 2003).

En la industria láctea y en otras industrias alimentarias, se emplean los sistemas de ultrafiltración y de ósmosis inversa durante el fraccionamiento de la leche y otros líquidos, así como para la clarificación de jugos de frutas. Estos filtros y membranas tienen poros de pequeño diámetro y están continuamente en contacto con el alimento; la más mínima adsorción microbiana bloquearía los mismos y provocaría la colmatación del filtro. Esto produciría a su vez una reducción del flujo con las consiguientes pérdidas de rendimiento y de producto (Serra, 2003).

Para la prevención de los riesgos y del coste de los daños que causan los biofilms son necesarios procedimientos de limpieza y desinfección efectivos (Silagyi, 2007).

Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de *Pseudomonas* spp., *Listeria* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Staphylococcus* spp. y *Bacillus* spp. (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992; Lee Wong, 1998).

Si bien son numerosas las especies susceptibles de formar biofilms en la industria de producción de alimentos, a continuación nos referiremos a *Staphylococcus aureus* que fue la cepa utilizada en este estudio.

La denominación *Staphylococcus* fue mencionada por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston, quien en una serie de artículos publicados entre 1979 y 1982 describió la

presencia de este organismo en el humano y demostró que causaba una enfermedad piógena cuando se lo inyectaba en ratones. Dos años más tarde Rosembach describió su crecimiento en un cultivo puro y llamó *Staphylococcus aureus* al coco que formaba colonias de color naranja (Baird-Parker, 1990).

La primer observación documentada que asoció a *Staphylococcus* spp. con la intoxicación alimentaria fue hecha por Vaughan y Stemberg quienes, en 1884, describieron la investigación de un importante brote de enfermedad en Michigan que se creía que había sido causada por comer queso (Hennekinne *et al.*, 2012). Sin embargo, no fue hasta 30 años más tarde cuando Barber demostró claramente la intoxicación alimentaria estafilocócica por beber leche sin refrigerar, procedente de una vaca que padecía una mastitis estafilocócica. Dack *et al.* (1930) descubrieron el papel de los estafilococos en la intoxicación alimentaria. Éstos demostraron que el filtrado estéril de un cultivo de *Staphylococcus aureus* aislado de un bizcochuelo relleno de nata causó síntomas típicos de la intoxicación alimentaria en personas voluntarias (ICMSF, 1998).

Desde entonces, está muy bien documentada la implicancia de este microorganismo y su enterotoxina como causantes de intoxicación alimentaria (Bryan, 1976; Bergdoll, 1979, 1989). *Staphylococcus aureus* se encuentra en la piel y la mucosa de la mayoría de los animales de sangre caliente, así como también en los alimentos de origen animal. Las fosas nasales del hombre constituyen el reservorio principal de este microorganismo, desde donde se disemina a piel, rostro, manos, y superficies en contacto con las mismas (Eifert *et al.*, 1996). De este modo, los alimentos expuestos a la manipulación humana tienen la posibilidad de contaminarse con esta bacteria, destacándose como factores que contribuyen a ello las inapropiadas temperaturas de conservación y el no cumplimiento de medidas higiénicas (Pascual y Calderon, 2000).

Resistencia de los biofilms

Se ha podido demostrar que las células de los biofilms pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y a biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono (Stewart y Costerton, 2001).

Se han descrito dos tipos de resistencia bacteriana, la correspondiente a las bacterias planctónicas que son resistentes a los medicamentos y que está asociada a alguna mutación de genes y la de las bacterias que crecen dentro de biofilms presentando una mayor barrera frente a biocidas, desinfectantes o agentes antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica (Mah y O'Toole, 2001; Olson *et al.*, 2002). En el caso de las bacterias planctónicas o pequeños grupos de cepas, la resistencia se entiende como la habilidad de los microorganismos para crecer en presencia de una elevada concentración de biocida o al incremento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dicho agente antimicrobiano, necesaria para detener el crecimiento celular (Gilbert 2003).

Para intentar explicar la resistencia dentro del biofilm se han planteado diversas hipótesis. Una de ellas es que la penetración lenta o incompleta del antibiótico en el biofilm es generada por la matriz de EPS que constituye una barrera limitando la difusión de sustancias (Singh *et al.*, 2010). Otra de las hipótesis está relacionada a una baja actividad metabólica de las bacterias en el biofilm por limitación de oxígeno y nutrientes que puede causar que ingresen en un estado de lentificación o cese de su mitosis, especialmente aquellas situadas más profundamente, con lo cual dejan de ser susceptibles a los antimicrobianos (Stewart y Costerton, 2001). Otra hipótesis tiene que ver con modificaciones genéticas que impactan en la fisiología de las bacterias del biofilm. Las bacterias expresan genes en respuesta a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno y daños en el ADN, los cuales se transfieren entre ellas logrando un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes (Thomas y Nakaishi, 2006). Entre ellos pueden mencionarse la galactosidasa, la cual es expresada en respuesta al Imipenen y la Piperamicina, así como las bombas de difusión de multiresistencia a los medicamentos como la expresada por *Escherichia coli* en respuesta al Cloramfenicol (Kohler *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2005). La última hipótesis es la de formación de esporas. Esta hipótesis plantea la posibilidad de génesis de una subpoblación de bacterias en el biofilm con un estado fenotípico muy especial y altamente protegido, con una diferenciación símil esporas (Stewart y Costerton, 2001).



Etapas del desarrollo de un biofilm

En la mayor parte de la literatura, se describe la formación de biofilms sobre superficies a través de una serie de etapas (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000; Dunne, 2002). Tradicionalmente, se aceptaba que la formación del biofilm comenzaba con el transporte de los microorganismos hacia una superficie pero, en la mayoría de los ecosistemas estudiados, el transporte de masa está precedido por la adsorción de una fina película orgánica sobre dicho sustrato (Schneider y Marshall, 1994).

Esta película puede cambiar drásticamente las características físico-químicas del sustrato dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas sobre la superficie (Etapa 1, Figura 1). La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de microorganismos (Etapa 2, Figura 1). La repulsión neta entre la superficie celular y el sustrato puede ser superada por las interacciones moleculares específicas mediadas por apéndices extracelulares (por ejemplo, pilis, fimbrias y flagelos). Muchas de estas células son capaces de moverse independientemente mediante los apéndices celulares llamados pilis con movimientos de contracción y deslizamiento (O'Toole y Kolter, 1998). Estas células todavía no se encuentran en proceso de diferenciación y pueden abandonar la superficie para volver al estado planctónico. Durante esta etapa reversible (Etapa 2, Figura 1), las bacterias presentan ciertos comportamientos específicos como por ejemplo: rodar, reptar, formar agregados e hileras bacterianas, antes de comenzar a exudar EPS y adherirse irreversiblemente (Etapa 3, Figura 1) (Marshall *et al.*, 1971; Lappin-Scott y Costerton, 1995). A medida que el biofilm madura, se desarrolla la estructura típica de las microcolonias con los espacios intercelulares o canales (Etapa 4, Figura 1) y muchas células alteran sus procesos fisiológicos en respuesta a las condiciones particulares del ambiente dentro del biofilm. Posteriormente, algunas microcolonias pueden desprenderse de la superficie o pueden liberarse células individuales revirtiendo su estado a bacterias planctónicas que se desprenden de la matriz extracelular dejando espacios entre las microcolonias que pueden actuar como canales dentro de la estructura del biofilm (Etapa 5, Figura 1).

Estos procesos no necesariamente se encuentran sincronizados a través de todo el biofilm sino que generalmente ocurren de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por biofilm en distintos estadios del desarrollo.

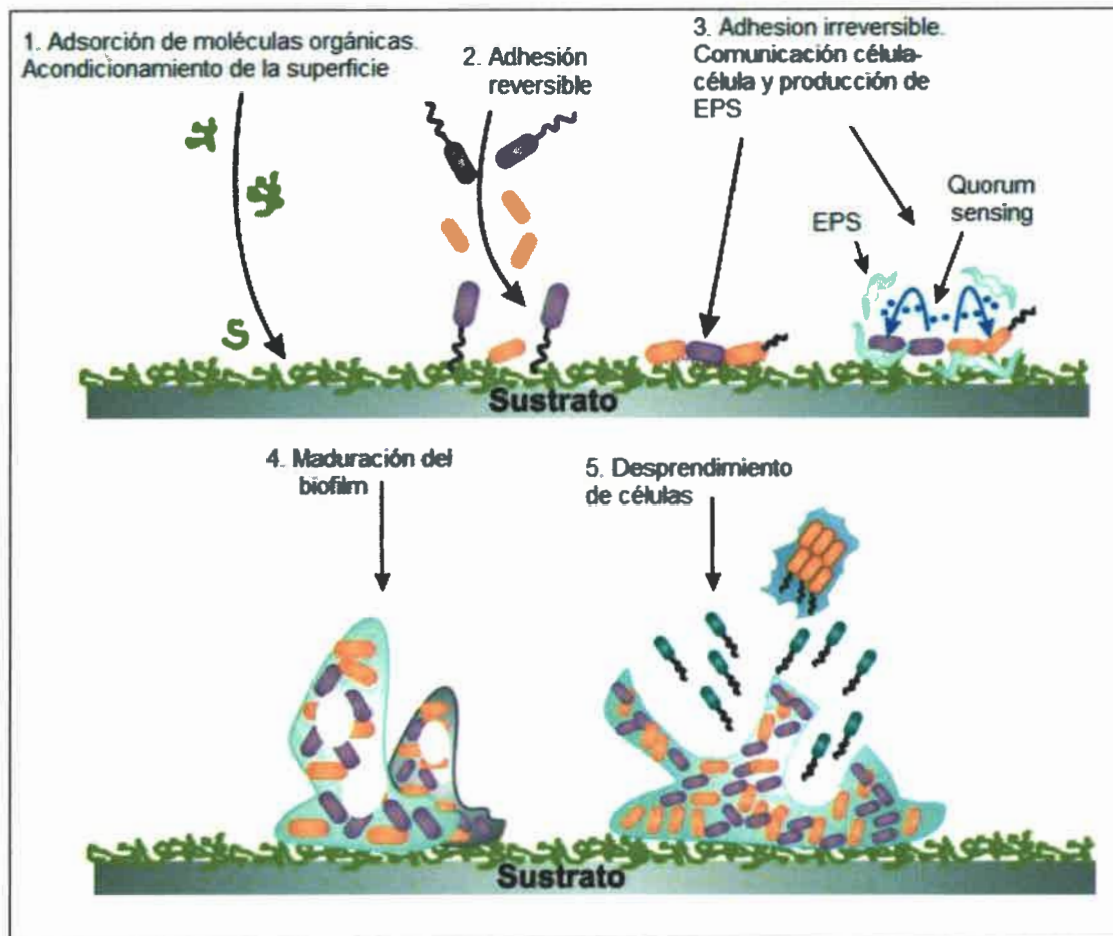


Figura 1: Esquema de las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm. Tomado de Svensäter y Bergenholtz (2004).

Etapa 1: Acondicionamiento de la superficie

Existen factores externos físicos y químicos que afectan la adhesión de las bacterias. Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, el desprendimiento y las reacciones en la interfase (Characklis, 1981). Los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son: la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH y el oxígeno disuelto (Characklis, 1981).

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

Etapa 2. Adhesión reversible

La adhesión reversible de bacterias a una superficie puede ser de dos maneras:

- **Activa:** La motilidad ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente.
- **Pasiva:** Factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos pueden favorecer la adhesión. Las propiedades físico-químicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión.

También pueden influir variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua, y concentración de nutrientes. Se ha encontrado que la variación en la concentración de diversos cationes (sodio, calcio, hierro) afecta la adhesión de *Pseudomonas* spp. a superficies de vidrio (Fletcher, 1988).

Etapa 3. Adhesión irreversible

El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Investigaciones recientes han sugerido que la transición hasta la adhesión permanente a una superficie está acompañada por cambios fisiológicos profundos (Stoodley *et al.*, 2002).

La adhesión irreversible específica puede ser definida como la unión específica entre las adhesinas bacterianas (un componente específico molecular de la superficie bacteriana) y un receptor del sustrato (un componente específico de la superficie del material o tejido superficial) estando menos afectada por factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura). En diferentes trabajos se ha reportado que los polisacáridos y proteínas de la superficie celular pueden actuar como adhesinas bacterianas (Hogt *et al.*, 1986; Kroncke *et al.*, 1990).



El sello distintivo que diferencia a los biofilms de las bacterias simplemente adheridas a una superficie es que los biofilms contienen EPS que rodea a las bacterias residentes. El EPS microbiano consiste en polímeros biosintéticos que pueden variar su composición química y también polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Wingender *et al.*, 1999). Otros estudios han puesto de manifiesto que una misma bacteria puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre (Uhlinger y White, 1983).

Etapa 4. Maduración del biofilm

La siguiente etapa del desarrollo del biofilm corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato (Davies *et al.*, 1998). El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.

Etapa 5. Desprendimiento de bacterias

El término desprendimiento se utiliza para describir la liberación de células de un biofilm o sustrato. El desprendimiento activo es un evento fisiológicamente regulado, pero sólo pocos estudios han demostrado la base biológica para este proceso (Stoodley *et al.*, 2001).

Allison *et al.*, (1998) han reportado que luego de una extensa incubación, los biofilms de *P. fluorescens* pueden desprenderse y al mismo tiempo reducir la producción de EPS. Se ha sugerido que la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas pueden conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos mediante un mecanismo aún desconocido (O'Toole *et al.*, 2000).

Las células del biofilm dispersas pueden revertir su estado al crecimiento planctónico, por lo que, el desarrollo de vida del biofilm se transforma en un ciclo completo (Sauer *et al.*, 2002).



Características físico-químicas del sustrato y adhesión bacteriana

Por su impacto en las etapas iniciales de crecimiento del biofilm es importante analizar en detalle la influencia de las características superficiales del sustrato sobre las mismas. En los párrafos siguientes se analizarán características fisicoquímicas tales como energía superficial, hidrofobicidad, rugosidad y carga superficial y su relación con la adsorción de compuestos orgánicos sobre el sustrato y la adherencia bacteriana.

Energía superficial e hidrofobicidad

Con el término hidrofobicidad se suele hacer referencia a la tendencia que muestran ciertas moléculas o superficies a evitar el contacto con el agua. El origen está en el propio comportamiento del agua debido a la fuerte afinidad que presentan entre sí sus moléculas como consecuencia de la intensidad y coordinación que introducen los puentes de hidrógeno entre ellas. En el caso de superficies hidrófobas la interacción entre éstas y las moléculas de agua es menos favorable que entre las moléculas de agua, debido al reordenamiento que sufren las moléculas de agua para mantener sus enlaces de puente de hidrógeno, provocando una disminución de la entropía. Las moléculas o superficies hidrófilas, es decir, aquellas en las que su interacción con las moléculas de agua es al menos similar a la de las moléculas de agua entre sí, permiten aumentar la entropía del conjunto, por lo que estas moléculas pueden disolverse en agua o, en el caso de las superficies, el agua puede esparcirse sobre ellas (Israelachvili 2011). El método más directo que permite establecer escalas de hidrofobicidad entre superficies lo constituye la medida del ángulo que se forma en la línea de contacto entre una gota de agua y la superficie, denominado ángulo de contacto, y que puede variar entre 0° para superficies completamente hidrófilas hasta prácticamente 180° para las superficies completamente hidrófobas y que se describe con más detalle en otro apartado.

Además, existen superficies con alta energía superficial, como el acero inoxidable o el oro, y otras como las resinas, con baja energía superficial. Una alta energía superficial del sustrato favorecería condiciones de hidrofilia y una baja energía superficial favorecería a su vez a la hidrofobia. Si la energía superficial de la bacteria es superior que la del medio, la adhesión se ve favorecida por la hidrofilia. Por el contrario, en condiciones de hidrofobia, la energía superficial de la bacteria debe ser menor que la del medio circundante para favorecer la



adhesión. De forma general, las bacterias con mayor energía superficial tendrán mayor afinidad por sustratos con mayor energía superficial y viceversa. Sin embargo, cuando el sustrato es revestido por el film proteico, éste tiene la cualidad de bajar la energía superficial de aquellos sustratos con alta energía superficial y subir la de los sustratos con baja energía superficial. Es decir, tiene un efecto amortiguador que puede enmascarar los efectos del material. Otros estudios confirman que sólo pequeñas diferencias en la películas, pero importantes, dependen de la cepa bacteriana. Por ejemplo, una capa rica en mucinas, favorece la adhesión de *Streptococcus mutants* y disminuye la adhesión de *Streptococcus sanguis* (Gibbons *et al.*, 1986). Estas observaciones confirmarían que algunas propiedades fisicoquímicas del sustrato pueden ser transferidas a la película acondicionante alterando la composición, la densidad y la configuración de la película adquirida en cuanto al tipo de proteínas, y en consecuencia, tener una influencia en las etapas iniciales de adhesión.

Rugosidad

En general, una gran diversidad de trabajos reportan que aquellas superficies más rugosas tienen la capacidad de retener mayor cantidad de microorganismos. Por ejemplo, la microtopografía de sustratos de acero inoxidable examinada por técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) ha revelado que la existencia de grietas superficiales podría proveer mayor área para la adhesión celular y, posiblemente, protección frente a la limpieza y la fuerza de corte del fluido (Zoltai *et al.*, 1981; Arnold y Bailey, 2000).

Los autores Verran y Whitehead (2006) han determinado que las superficies con rayas y grietas de tamaño similar al tamaño de las bacterias adheridas retienen mayor cantidad de células que las superficies con características topográficas de dimensiones algo mayores. Varios grupos han observado una adhesión bacteriana superior en superficies rugosas y por lo tanto concluyeron que la rugosidad superficial es un factor importante durante la adhesión bacteriana (Pedersen, 1990; Leclercq-Perlat y Lalande, 1994). Por el contrario, otros autores han propuesto que no existe una correlación entre la rugosidad del sustrato y la adhesión microbiana sobre superficies inertes (Mafu *et al.*, 1990; Vanhaecke *et al.*, 1990; Flint *et al.*, 2000). Por lo tanto, no se ha encontrado aún una clara correlación entre la rugosidad, topografía y la adhesión microbiana.



Carga superficial

Las células bacterianas tienen, en general, una carga negativa neta en su pared celular a pH 7 (Rijnaarts *et al.*, 1999). Sin embargo, la magnitud de esta carga varía entre especies y está influenciada generalmente por las condiciones de cultivo, la etapa del cultivo, la fuerza iónica y el pH (Gilbert *et al.*, 1991; Kim y Frank, 1995; Walker *et al.*, 2005; Dan, 2003; Husmark y Ronner, 1990).

La carga de la superficie celular se determina generalmente mediante la evaluación del potencial zeta, calculado a partir de la movilidad de la célula bacteriana en presencia de un campo eléctrico bajo concentraciones definidas de sales y pH. La mayoría de las bacterias tienen potenciales zeta negativos a un pH fisiológico (Gilbert *et al.*, 1991; Millsap *et al.*, 1997; Lerebour *et al.*, 2004).

La carga superficial de los sustratos inertes sobre los que las bacterias se adhieren probablemente tenga también un rol en la adhesión microbiana. Narenan (2003) ha reportado que la adhesión bacteriana no puede ser explicada sólo por la influencia de la carga superficial celular y sugiere que la adherencia de microorganismos es un mecanismo complejo con muchos factores involucrados. La interacción entre una superficie y una célula bacteriana parece estar mediada por un arreglo complejo de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encuentra afectada por las características físicas y químicas del ambiente al cual están expuestos tanto el sustrato como la bacteria.

Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm

La comunicación célula-célula ejerce también un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo del biofilm. Existen varios tipos de mecanismos de comunicación que se describirán a continuación.

Quorum sensing

Se ha sugerido que ciertas bacterias utilizan la producción, liberación, intercambio y detección de moléculas señalizadoras para medir la densidad poblacional y controlar su comportamiento en respuesta a las variaciones en el número de células (Tomasz, 1965; Nealson *et al.*, 1970). Actualmente, se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional, sino que es una

norma en el ecosistema bacteriano y este proceso, conocido como *quorum sensing* (QS), es fundamental en la formación de biofilms (Bassler y Losick, 2006). Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad, los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios (Donlan, 2002; Singh *et al.*, 2002; Post *et al.*, 2004).

Comunicación de corto alcance

En el extremo opuesto del QS se encuentran las señales de corto alcance que requieren el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información. Este tipo de comunicación promueve un movimiento cooperativo celular de deslizamiento sobre la superficie (gliding) que finalmente culmina en un cúmulo de células en el cual se lleva a cabo el proceso de formación de esporas. Durante este tipo de comunicación es esencial el contacto y la alineación entre bacterias (Kim y Kaiser, 1990).

Uno de los primeros mecanismos de comunicación contacto-dependiente celular conocidos es la conjugación mediada por los pilis sexuales encargados principalmente de las interacciones bacteria-huésped. Sin embargo, es posible que algunos de estos apéndices celulares denominados nanowires también estén involucrados en la comunicación interbacteriana (Reguera *et al.*, 2005; Gorby *et al.*, 2006). Los nanowires, como cualquier otro pili, podrían también facilitar la formación de biofilms (Reguera *et al.*, 2007).

Nuevas estrategias para erradicación de biofilms

A través del conocimiento de las características y etapas de desarrollo de los biofilms se posibilita la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y prevención tanto en el ámbito médico como el industrial. Así, por ejemplo, una posible alternativa química para disminuir la fijación de *Pseudomonas* spp. a superficies incluye el uso de agentes quelantes, que limitan el hierro soluble, el cual es necesario para la adhesión de los pili (Singh *et al.*, 2002).

El xilitol, un alcohol natural del azúcar administrado bajo la forma de jarabe o goma de mascar, ha mostrado una efectividad clínica significativa en prevenir caries y disminuir la



incidencia de otitis media en niños, posiblemente vía reducción de mecanismos de adhesión bacteriana (Uhari *et al.* 1998).

Debido a que la persistencia que presenta el biofilm depende de la agregación de bacterias en comunidades multicelulares, una alternativa puede ser desarrollar estrategias para impedir la formación de su estructura compleja. Si la multicelularidad del biofilm es inhibida, es posible que las defensas del huésped sean capaces de resolver la infección logrando, de esta manera, restituir la eficacia de los antibióticos. Otras terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz del biofilm y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula-célula, indispensables para la formación de un biofilm (Stewart y Costerton, 2001).

Se ha demostrado que los antibióticos pertenecientes al grupo de los macrólidos parecen inhibir la síntesis de polisacáridos y, de esta manera, reducirían la protección de la matriz del biofilm. Estos antimicrobianos podrían tener un efecto inmunomodulador logrando impedir señales bacterianas. El tratamiento de biofilms con claritromicina reduce la matriz que cubre el biofilm, tanto de *Pseudomona aeruginosa* como de *Staphylococcus epidermidis*, aunque las bacterias mismas sean resistentes al antibiótico (Saiman *et al.*, 2003).

Finalmente, otras dos estrategias promisorias son aquellas que involucran cambios en el medioambiente a través de la inhibición competitiva por otras bacterias (Kreth *et al.*, 2008; Christopher *et al.*, 2010). Por ejemplo, microorganismos competidores como *Streptococcus gordonii* dificultan la formación de biofilm de *Streptococcus mutans* reduciendo su acción como agente productor de caries o el incremento de la presión de oxígeno en pacientes con tubos de timpanostomía (Manning, 2003).

Se ha identificado una molécula denominada “furanona”, producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acil-homoserinalactonas. Estas moléculas bloquean el sistema *quorum sensing* y la consiguiente formación de biofilm. En la actualidad se intenta desarrollar inhibidores de la formación de biofilms basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica (Hentzer *et al.*, 2002).

La biomedicina y otras nuevas disciplinas, como la biotecnología, la genómica o la proteómica, persiguen también la creación de nuevos materiales que puedan dar lugar al desarrollo, por ejemplo, de tejidos y órganos artificiales biocompatibles, células madre,



contenedores de tamaño molecular e inteligentes para la dosificación controlada de fármacos, proteínas bioactivas y genes, chips de ADN, dispositivos de bombeo, válvulas altamente miniaturizadas, los polímeros, altamente biodegradables y medioambientalmente limpios, a partir de microorganismos para evitar la utilización de derivados del petróleo como materia prima, y un sinfín de posibilidades (Bibel, 2004). Por último, un campo muy promisorio para desarrollar materiales y planificar estrategias para la erradicación de biofilms es la nanotecnología.

Impacto de nanotecnología en sistemas biológicos

La nanotecnología, es uno de los campos que promete grandes cambios en la fabricación de nuevos materiales. Esta disciplina consiste en fabricar y controlar estructuras y máquinas a nivel molecular. La utilidad de la nanotecnología en las ciencias biomédicas reside en la posibilidad de crear materiales y diseñar dispositivos capaces de interactuar con el cuerpo a escalas celular y sub-celular con un alto grado de especificidad. La nanotecnología ofrece muchas oportunidades revolucionarias en la lucha contra todo tipo de enfermedades cancerígenas, trastornos cardíacos, enfermedades neurodegenerativas, infecciones, etc. Otras aplicaciones que contemplan el desarrollo de pequeños laboratorios en forma de circuito integrado, en los cuales se realiza una secuencia de reacciones químicas y de pruebas analíticas, permitirían realizar análisis *in situ*, obtener los resultados inmediatamente y facilitar el diagnóstico y la terapia. Muchas sustancias biológicamente relevantes necesitan ser detectadas o actuar ellas mismas como sensores. Un biosensor es un sistema que convierte una señal biológica en una señal eléctrica generalmente. Algunos ejemplos de biosensores pueden ser los sensores para moléculas pequeñas (oxígeno, H^+ y glucosa) o grandes moléculas (inmunosensores). El campo de los biosensores se encuentra ampliamente desarrollado y ha sido estudiado durante los últimos 30 años. Los nanotubos de carbono pueden ser utilizados para monitorear la actividad enzimática. Actualmente, algunos grupos de investigación ya han conseguido inmovilizar proteínas sobre las paredes de los nanotubos de carbono (Nagaraju *et al.*, 2015).

Asimismo, durante los últimos años, ha sido muy importante la investigación en el desarrollo de materiales especialmente diseñados para que puedan ser implantados en el cuerpo humano



y provocar respuestas biológicas específicas para la regeneración de los tejidos. Los materiales utilizados en el cuerpo humano deben poder adaptarse continuamente a los cambios dinámicos que ocurren dentro de él. Los materiales nanoestructurados y bioactivos tienen la habilidad de interactuar con el tejido vivo y son los más promisorios para la formación de una interfaz fuerte y perdurable entre el implante y el tejido vivo que lo rodea. Nuevos materiales nanoestructurados podrían ser empleados para fabricar huesos, cartílagos y pieles artificiales que, además de no ser rechazados por el organismo, facilitarían la regeneración de ciertos tejidos (Zhang *et al.*, 2008, 2010).

En el futuro próximo, una de las aplicaciones clínicas más importante de la nanotecnología será probablemente el desarrollo farmacéutico. Estas aplicaciones aprovechan las propiedades de las nanopartículas o nanocápsulas para diseñar nuevas estrategias de liberación controlada, direccionalidad de fármacos, y resguardo de aquellas drogas con baja disponibilidad (Brigger *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2003). Estas estructuras podrían ser utilizadas para almacenar y transportar medicinas al lugar exacto donde se necesite ya que de esta manera se podrían atenuar los efectos secundarios de los actuales medicamentos.

El desarrollo de nuevos antimicrobianos más eficaces con alto poder bactericida es muy importante debido al reciente aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. En la actualidad las nanopartículas de plata se utilizan como agentes bactericidas en la instrumentación médica (Thomas *et al.*, 2009; Juan *et al.*, 2010). También como agentes cicatrizantes y bactericidas en vendajes, cremas y geles o en la fabricación de productos textiles con propiedades antimicrobianas que reducen la proliferación de hongos y bacterias en la ropa (Leung *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2009).

Nanotecnología/Microtecnología aplicadas al diseño de superficies con aplicaciones biológicas

Recientemente, una gran variedad de técnicas nanotecnológicas han sido utilizadas para el diseño superficial de materiales que permitan regular funciones celulares. Esta tecnología es una herramienta muy importante para estudiar diferentes factores, como la adhesión y el crecimiento celular y para producir cultivos de células organizadas para su aplicación en ingeniería de tejidos.

Aunque los sustratos con patrones topográficos definidos se utilizan principalmente en el cultivo celular, este tipo de estructuras ha despertado interés en áreas tecnológicas relacionadas con los implantes médicos, ya que la interacción entre las células y la superficie de los materiales es muy importante durante la integración o rechazo del implante. Los factores topográficos de la superficie juegan un rol muy importante no sólo en la orientación de células y biocompatibilidad, sino también en factores como la expresión de proteínas y diferenciación celular (Motlagh *et al.*, 2003; Charest *et al.*, 2007).

Existen numerosas técnicas que permiten crear patrones superficiales, tanto topográficos como químicos, en la micro/nanoescala (Gates *et al.*, 2005).

Entre estas técnicas se pueden mencionar:

1. **Fotolitografía:** que consiste en cubrir el sustrato de interés con un material sensible a la luz ultravioleta (UV); luego se coloca sobre éste una máscara perforada en la que se encuentra el diseño a transferir y se irradia con luz UV. Las zonas de interés se tratan con un revelador adecuado, que disuelve selectivamente ya sea las zonas irradiadas o las zonas enmascaradas.
2. **Impresión por microcontacto:** que consiste en la utilización de un sello que contiene en relieve el patrón micrométrico a transferir. Luego se sumerge el sello en una solución conteniendo la molécula a transferir y se apoya sobre la superficie del sustrato. De esta manera las moléculas son transferidas a la superficie del sustrato siguiendo el patrón del sello.
3. **Moldeo y replicación:** que consiste en generar un molde polimérico del patrón a transferir y luego depositar el material de interés sobre este molde, de modo de obtener una réplica de la estructura original. Un estudio *in vivo* realizado por Chehroudi *et al.*, 1997 con materiales microtexturados ha demostrado que dichos materiales implantables inducen el crecimiento y la invaginación epitelial alrededor del implante. También, la respuesta de los fibroblastos se encuentra significativamente afectada por las dimensiones de la microestructura superficial del sustrato. La migración celular (velocidad y orientación del movimiento) también se encuentra afectada por la topografía superficial. Tan y Saltzman (2002) han demostrado que la velocidad del movimiento de neutrófilos depende de la microestructura y dimensiones de los canales superficiales diseñados sobre el sustrato. Los patrones topográficos superficiales tanto en la micro como en la nanoescala presentan una marcada influencia en las interacciones celulares con el sustrato. La regulación de diferentes actividades celulares como la proliferación,

adhesión y apoptosis resultaría útil para el diseño de dispositivos médicos, implantes y biomateriales.

Algunas técnicas de microfabricación permiten la modificación química de las superficies. Los patrones químicos han sido ampliamente utilizados para estudiar la interacción de las células con sustratos (Ito *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001). Estas técnicas han sido aplicadas en la producción de patrones de biomoléculas para el estudio y la manipulación de las interacciones celulares con diferentes sustratos. Por ejemplo, el diseño de microestructuras con factores de crecimiento celular ha resultado muy interesante, ya que se ha demostrado que las proteínas de factor de crecimiento inmovilizadas pueden regular funciones celulares sin la internalización de las células (Chen *et al.*, 1997).

Nanotecnología/Microtecnología en sistemas de células procariotas

La micro/nanotecnología también ha comenzado a impactar significativamente en la microbiología. Su escala de tamaños coincide perfectamente bien con las dimensiones de la mayoría de los microorganismos y las herramientas disponibles en la microescala hacen posible la manipulación y exploración de células individuales, su ambiente inmediato extracelular así como su forma y organización interna. Se cree que el desarrollo de técnicas físicas, incluyendo aquellas basadas en las microestructuras, serán un complemento esencial para la genética y la genómica, incluyendo nuevas técnicas para aislar, manipular, crecer y estudiar células aisladas y estructuras multicelulares como los biofilms (Martín Sánchez 2006).

Como ya se ha mencionado, varias técnicas nanotecnológicas permiten la fabricación de materiales biocompatibles con características topográficas coincidentes con las dimensiones celulares. Estas herramientas ofrecen nuevas capacidades para la microbiología y especialmente para el entendimiento de la fisiología y comportamiento de los microorganismos. Algunas de las aplicaciones en microbiología se describen a continuación.

Inmovilización de bacterias sobre superficies

La inmovilización y el diseño de patrones de bacterias sobre superficies ofrecen nuevas oportunidades para la detección de biomoléculas utilizando las células completas y para el



estudio de las interacciones célula-célula y las interacciones entre las células y sus alrededores. Las monocapas autoensambladas (SAMs) han sido utilizadas para inmovilizar células sobre superficies en el estudio de interacciones huésped-patógeno. La unión covalente de los ligandos biológicos a las regiones terminales de las SAMs permite controlar la densidad del ligando sobre la superficie y lo más importante es que estos ligandos mantienen su actividad biológica. Un estudio describe la aplicación de las SAMs con manosa como grupo terminal para medir las fuerzas de adhesión de bacterias patógenas de *E. coli* con pilis tipo IV (Liang *et al.*, 2000).

La combinación de técnicas de impresión por microcontacto y las SAMs han sido empleadas para inmovilizar células bacterianas selectivamente sobre superficies. Rowan *et al.*, (2002) han utilizado films poliméricos para generar patrones de SAMs hidrofóbicos con sitios específicos que atrapan a las células de *E. coli*. En otros estudios también se han empleado la impresión por microcontacto para capturar y detectar organismos patógenos (St John *et al.*, 1998).

Patrones de bacterias utilizando hidrogeles

El agar y la agarosa forman hidrogeles. Este tipo de polímeros tiene dos características específicas que son particularmente útiles en microbiología. Por un lado, las células que crecen en estas superficies permanecen hidratadas y por otro lado, los nutrientes, gases y productos secundarios del metabolismo difunden a través de la red polimérica del gel. Existen también muchos otros hidrogeles con diversas aplicaciones en microbiología. Por ejemplo, ciertos autores han generados hidrogeles con microcanales mediante la utilización de una solución fotoreactiva de polietilenglicol (PEG) que contenía células de *E. coli*. La exposición a la luz UV produjo la fotopolimerización, haciendo que las células queden atrapadas dentro de los microcanales de PEG (Heo *et al.*, 2003).

Microfluídica

La microfluídica presenta muchas características interesantes para su empleo en el estudio de las células (Beebe *et al.*, 2002; Whitesides, 2006). Se trata del diseño y la fabricación de dispositivos que puedan canalizar los flujos muy pequeños (nano/microlitros) de fluidos.



Mao *et al.*, (2003) han empleado un flujo laminar de moléculas atractivas y repelentes dentro de microcanales como medio para estudiar la quimiotaxis bacteriana. Los autores encontraron que los sistemas microfluídicos son tres órdenes de magnitud más sensibles que los ensayos capilares de quimiotaxis tradicionales. Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias pueden alterar colectivamente la expresión genética cuando la densidad de células alcanza un cierto nivel (quorum sensing). Como parte de este proceso, las células se comunican mediante la liberación de pequeñas moléculas dentro del medio circundante. Park *et al.*, (2003) estudiaron el crecimiento de *E. coli* en dispositivos microfluídicos y encontraron que las células se acumulaban en áreas cerradas, concluyendo que la quimiotaxis entre células permite alcanzar la densidad de bacterias requerida para el proceso de quorum sensing.

Los sistemas microfluídicos también tienen aplicaciones en el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas. En un estudio reciente, se fabricó un ambiente microestructurado para generar heterogeneidades en los hábitats bacterianos y permitió estudiar cómo las bacterias se adaptan a distintas regiones del ambiente (Keymer *et al.*, 2006). También se han utilizado este tipo de dispositivos para el crecimiento de células con diferentes formas mediante el confinamiento de las bacterias en microcámaras de agarosa (Takeuchi *et al.*, 2005). Asimismo se ha utilizado la microfluídica para estudios genéticos y para la detección específica de células bacterianas (Cady *et al.*, 2003; Nagamine *et al.*, 2005, Jong Wook *et al.*, 2006). Las plataformas microfluídicas presentan varias características interesantes para la investigación genética, como por ejemplo, el empleo de pequeños volúmenes de reactivos, la producción de pequeñas cantidades de residuos, bajo costo, cortos tiempos de reacción y la capacidad de análisis de células individuales.

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

Método de Ablación por Interferencia Láser Directa

En los últimos años, la fabricación de superficies poliméricas funcionalizadas ha recibido considerable atención en virtud de su uso en las áreas de las ciencias químicas, biología, física y la ciencia de los materiales. Los polímeros tienen un papel importante para estas



aplicaciones debido a su rápida y fácil preparación, la alta resistencia a la corrosión y productos químicos, buenas propiedades eléctricas y excelentes características superficiales (Langheinrich *et al.*, 2012).

Una de las maneras de modificar la topografía de estos, es utilizando el método de Ablación por Interferencia Láser Directa (DLIP). El método DLIP consiste en irradiar la muestra con dos o más haces de láser de una longitud de onda dada, de forma de producir interferencia constructiva y destructiva sobre la superficie polimérica. De esta forma en los lugares donde la energía de los haces se incrementa se produce la ablación y la remoción del material (Acevedo *et al.*, 2007). Para que se produzca la ablación es necesario que el material absorba en la longitud del láser con el cual es irradiado y que supere un umbral de energía. Una de las características más distintivas de este método es que no es necesario realizar pasos adicionales para obtener la estructura final, además, es aplicable en distintas superficies como metales, polímeros, carbón, etc. Este método involucra la formación de diversos patrones de luz creados por la interacción de dos o más haces de luz. De esta manera, se obtiene una anisotropía superficial, es decir, diferente topología y regiones regulares químicamente diferenciadas (Lasagni *et al.*, 2007).

Medición del ángulo de contacto

El ángulo de contacto (θ) es aquel que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfase común. La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para formar interfases con los líquidos (Savov, 1997). Por convenio, cuando $\theta < 90^\circ$ se dice que el líquido moja al sólido o que el sistema moja. El sistema no moja cuando $\theta > 90^\circ$; en este caso, el líquido no moja al sólido (Delannay *et al.*, 1987).

IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

Los biofilms son una causa común de contaminación alimentaria con bacterias patógenas. *Staphylococcus aureus*, microorganismo que puede desarrollarse en forma planctónica o formando biofilms, es una de las principales bacterias causante de enfermedades transmitidas por alimentos y constituye un importante problema de salud a nivel mundial (Gutierrez *et al.*, 2012).

Estudios recientes han demostrado que la formación de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus* en los alimentos es muy diferente a las que se producen en cultivos líquidos puros.

La mayoría de las bacterias en los alimentos aparentan estar asociadas a superficies o tejidos, e interaccionan con otras bacterias a través de señales moleculares (Schelin *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que un gran número de industrias son afectadas por la formación de biofilms, y con el objetivo de mejorar la producción de alimentos de alta calidad y microbiológicamente seguros, es necesario el desarrollo de estrategias de prevención.

Se han propuesto un amplio rango de superficies resistentes a bacterias para inhibir el crecimiento del biofilm *a priori* con estrategias que generalmente implican una liberación de compuestos bactericidas. Sin embargo, es complicado lograr una superficie química que persistentemente inhiba el crecimiento bacteriano (Banerjee *et al.*, 2010).

Además, la emergencia de cepas patógenas resistentes a antimicrobianos ha generado nuevas restricciones sobre el uso de coberturas liberadoras de biocidas.

Se sabe poco sobre el efecto de la topografía en la adhesión bacteriana y la formación del biofilm. La estructuración física de superficies podría proveer una forma más persistente de inhibir la interacción entre la superficie y la bacteria. El presente trabajo pretende aportar conocimientos para poder comprender de qué manera la estructuración física del sustrato afecta el crecimiento y la adhesión de *Staphylococcus aureus* y así poder formular nuevas estrategias para mejorar la seguridad alimentaria.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las propiedades fisicoquímicas de las superficies poliméricas estructuradas inhiben el crecimiento y la adhesión de *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar superficies poliméricas estructuradas y evaluar su efecto en la adhesión y el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos

- Caracterizar física y químicamente las superficies poliméricas microestructuradas.
- Estudiar la adhesión y el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* frente a las superficies modificadas.

METODOLOGÍA

Materiales

Para la realización de este trabajo se utilizaron films comerciales de poliimida (PI, Kapton® Goodfellow GmbH Bad Nauheim, Germany). Los films fueron lavados numerosas veces en detergente y agua y posteriormente rociados con etanol para remover cualquier contaminante que pudiera estar presente en la superficie. Los films tenían un espesor de al menos 1000 veces más que la profundidad de la estructura formada en la superficie.

Experimentos de Interferencia Láser

Para la estructuración de las superficies se utilizó un láser pulsado de Nd:YAG (acrónimo del inglés neodymium-doped yttrium aluminium garnet) de alto poder (Spectra Physics Quanta-Ray Pro-290) con una longitud de onda de 266-533 nm, una frecuencia de 10 Hz y una duración de pulso de 10 ns. La intensidad de los rayos individuales se controló escogiendo diferentes lentes y espejos para generar canales de 1, 5 y 10 μm de profundidad (Acevedo *et al.*, 2007).

Caracterización de la estructura química

Las estructuras químicas de todas las muestras se determinaron por Espectrometría Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR). Se recogieron los espectros en un espectrómetro Nicolet 410 en el modo de transmisión en el aire del polímero. Los espectros UV-visible se registraron en un espectrómetro Shimadzu UV-2401PC en el rango de longitud de onda de 250 a 1000 nm.

Caracterización física de las superficies

Microscopia Óptica

Se observaron y fotografiaron los films estructurados con un microscopio óptico Zeiss trinocular modelo axiostar Plus, con sistema de captura de imágenes con cámara de fotos Canon PC1089.



Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se hicieron mediciones con un microscopio Agilent 5420/STM. Se utilizó un cantiléver comercial (Probe® PPP NCL) en modo Tapping No-Contacto, con una fuerza constante de 6 m/N y una frecuencia de resonancia de 156 Hz.

Medición del ángulo de contacto

Para la medición del ángulo de contacto se empleó un equipo fabricado en el laboratorio de Nanotecnología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, para ello se utilizó una base posicionadora, la cual permite mover la muestra en los tres ejes cartesianos (x, y, z) y una microjeringa la cual hace posible colocar gotas de líquido de volumen conocido en sitios predeterminados de la superficie. Se utilizó agua bidestilada como líquido. La hidrofobicidad de la superficie determinó la extensión de la gota en la superficie. Por lo tanto, una foto digital de la superficie permitió seleccionar aquellos materiales funcionales con la máxima hidrofobicidad o hidrofiliabilidad (Figura 2). Las fotografías emitidas por el microscopio fueron analizadas mediante el software Image J (plugins DROP ANALYSIS).

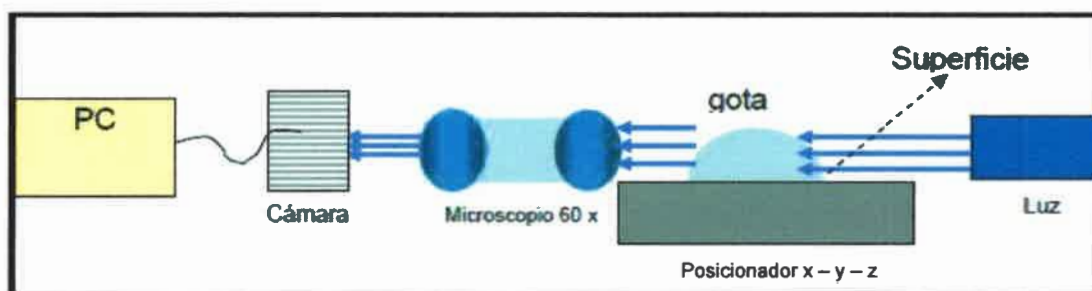


Figura 2: Esquema del dispositivo para medir el ángulo de contacto en superficies planas.

Estudio de comportamiento bacteriano frente a las superficies modificadas

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Para la realización de los estudios de adhesión se empleó la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach la cual fue obtenida del American Type Culture Collection, USA (ATCC® 29213™). Esta cepa es un aislamiento clínico designada Wichita y es utilizada

como una cepa estándar en numerosas pruebas de laboratorio. Es sensible a numerosos antimicrobianos incluyendo la meticilina.

Caracterización de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Se empleó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 productora de biofilms. Las curvas de crecimiento control se construyeron por triplicado. Para la construcción del inóculo inicial, los microorganismos en fase de crecimiento logarítmico fueron suspendidos en solución fisiológica estéril a una concentración que resultó en una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland, el cual equivale aproximadamente a una densidad bacteriana de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Posteriormente se realizaron diluciones del inóculo inicial en caldo Mueller Hinton (MHB) hasta lograr una concentración de bacterias equivalente a 1×10^6 UFC/ml. Los inóculos finales fueron incubados en estufa a 35°C durante 10 horas.

Durante ese período se tomaron alícuotas de 100 μl de cada inóculo al tiempo cero y cada media hora. Con cada alícuota se midió la absorbancia y se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril con el objetivo de reducir la densidad bacteriana. Posteriormente alícuotas de 100 μl de la última dilución se extendieron sobre placas de agar Trypticase Soya con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de las UFC/placa. El número de UFC/ml se obtuvo multiplicando el número de UFC/placa por un factor de corrección originado a partir del número de diluciones seriadas realizadas (Giacomino *et al.*, 2011).

Cuantificación de bacterias adheridas al polímero por recuento de colonias

Para la cuantificación de bacterias adheridas al polímero por recuento de colonias se empleó un frasco erlenmeyer conteniendo 200 ml de caldo nutritivo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en fase exponencial de crecimiento con una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 600 nm corresponda a 0,10 ($4,9 \times 10^6$ UFC/ml). Posteriormente, sobre cada superficie polimérica se colocaron microgotas de 25 μl y se dejaron durante 30 min para que se adhirieran las primeras bacterias. Los sustratos se enjuagaron con agua bidestilada estéril para retirar los

microorganismos débilmente adheridos y luego, se mantuvieron inmersos en caldo nutritivo estéril para que las células adheridas crezcan sobre la superficie del mismo.

La bacteria adherida al polímero o biomasa fue cuantificada utilizando un proceso de remoción de células en múltiples pasos, dilución seriada y plaqueo para recuento de células viables. Cada polímero fue colocado en un tubo cónico de 50 ml con 15 ml de D-tirosina en solución salina tamponada a pH 7,5 e incubado con la cepa de *Staphylococcus aureus* a temperatura ambiente por 30 minutos para promover el desarmado del biofilm. Las muestras fueron sonicadas por 10 minutos y se pipetearon 200 µl de cada sonicado dentro de una placa de 96 pocillos y se hicieron diluciones seriadas en base 10. Se plaquearon en agar Tripticasa Soya 100 µl de cada dilución y se incubó por 36 – 48 horas a temperatura ambiente. Se contaron las UFC y los valores se corrigieron según su correspondiente factor de dilución (Swanson *et al.*, 2001).

Ensayo de viabilidad bacteriana

En relación a la cuantificación de biomasa de biofilms, se evaluó la viabilidad celular dentro de los biofilms frente a las superficies modificadas usando un ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Walencka *et al.*, 2005; Krom *et al.*, 2007). Brevemente, los biofilms fueron cultivados en placas de 96 pocillos por 24 horas, en presencia o ausencia de los polímeros modificados. Luego las células planctónicas fueron removidas y el biofilm remanente fue lavado cuidadosamente con 100 µl de PBS. Luego del lavado, se añadió 100 µl de PBS y 10 µl del reactivo MTT y la suspensión se incubó por 4 horas a 37°C. Posteriormente se añadió 100 µl de la solución estabilizadora. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C y se midió la absorbancia a 560 nm (pico de absorbancia para el producto de reducción del formazán) y a 700 nm (longitud de onda de referencia para el colorante intacto) (Denizot y Lang 1986).

Cuantificación de la formación del biofilm por Cristal Violeta

La habilidad de formar biofilms sobre las superficies modificadas fue medida determinando la adhesión a placas de 96 pocillos. El ensayo a utilizar fue adaptado del método de O'Toole y Kolter (1998), basado en la utilización de cristal violeta para teñir biofilms. Brevemente, una



concentración final aproximadamente de 1×10^9 UFC/ml fue mezclada con 200 μ l de caldo Tripticasa Soya (TSB) en cada pocillo (placa de 96-pocillos, Greiner Bio-One, Germany) e incubada durante 48 horas a 37°C. Inmediatamente después de la incubación, los sobrenadantes fueron removidos y la placa se lavó con PBS (pH 7,2) con el fin de eliminar las células plánticas. Luego del secado, las células adheridas se tificaron con solución de cristal violeta al 1% durante 15 minutos. Posteriormente el colorante fue removido, las células se lavaron con 300 μ l de PBS (pH 7,2) y se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó una evaluación semicuantitativa del biofilm formado extrayendo el cristal violeta con 200 μ l/pocillo de una solución de etanol/acetona (70:30). La intensidad de coloración fue determinada a 595 nm usando un lector de ELISA (Model 680 BioRad, Hercules, CA). Se realizaron tres ensayos independientes en días diferentes. El valor de DO a 595 nm fue interpretado según la siguiente escala: positivo ($>0,24$), débil ($>0,12$ y $<0,24$) o negativo ($<0,12$) (Deighton *et al.*, 2001). La unidad de biomasa de biofilm (UBB) fue arbitrariamente definida como $0,1$ DO 595 nm = 1 UBB. Tres pocillos fueron incubados con 200 μ l TSB para servir como control negativo y para obtener un valor de background, que luego fue restado a los valores obtenidos en los tratamientos.

Análisis del biofilm por AFM

Las medidas de AFM se realizaron con un equipo comercial de marca Agilent 5420/STM. Se utilizó un cantiléver comercial, Probe® PPP NCL) en modo Tapping No-Contacto, con una fuerza constante de 6 mN y una frecuencia de resonancia de 156 Hz. Las imágenes se adquirieron y procesaron con el "software" libre WSxM (Beech *et al.*, 2002).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desvío estándar. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010). Los niveles de significancia fueron evaluados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.



RESULTADOS

Estructura química por FTIR

En general, las poliimidas exhiben bandas de vibración características como la vibración del alargamiento C=O asimétrico y simétrico, la vibración del alargamiento C–N, y la vibración correspondiente a la deformación del anillo de cinco imidas. La estructura química de los films de poliimida adquiridos comercialmente fue verificada por FTIR. Como muestra la figura 3, las bandas características de la poliimida se localizaron en 1785.79 cm^{-1} (vibración del alargamiento C=O asimétrico), 1722.15 cm^{-1} (vibración del alargamiento C=O simétrico), 1367.31 cm^{-1} (vibración del alargamiento C–N) y 719.33 cm^{-1} (vibración correspondiente a la deformación del anillo de cinco imidas).

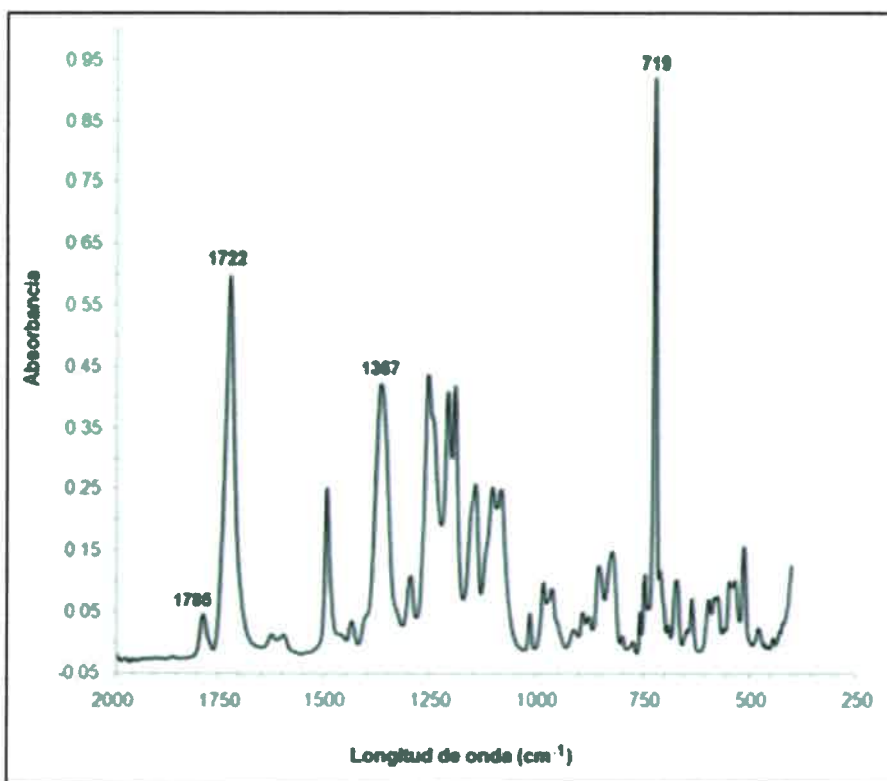


Figura 3: Espectro de absorción de la poliimida comercial utilizada en este estudio.

Caracterización física de las superficies

Microscopía Óptica

En la figura 4 se observan microfotografías de las superficies de poliimida caracterizadas a través del microscopio óptico. Con esta técnica sólo pudo distinguirse la topografía lograda en la figura 4 C y D (canales de 5 y 10 μm respectivamente).

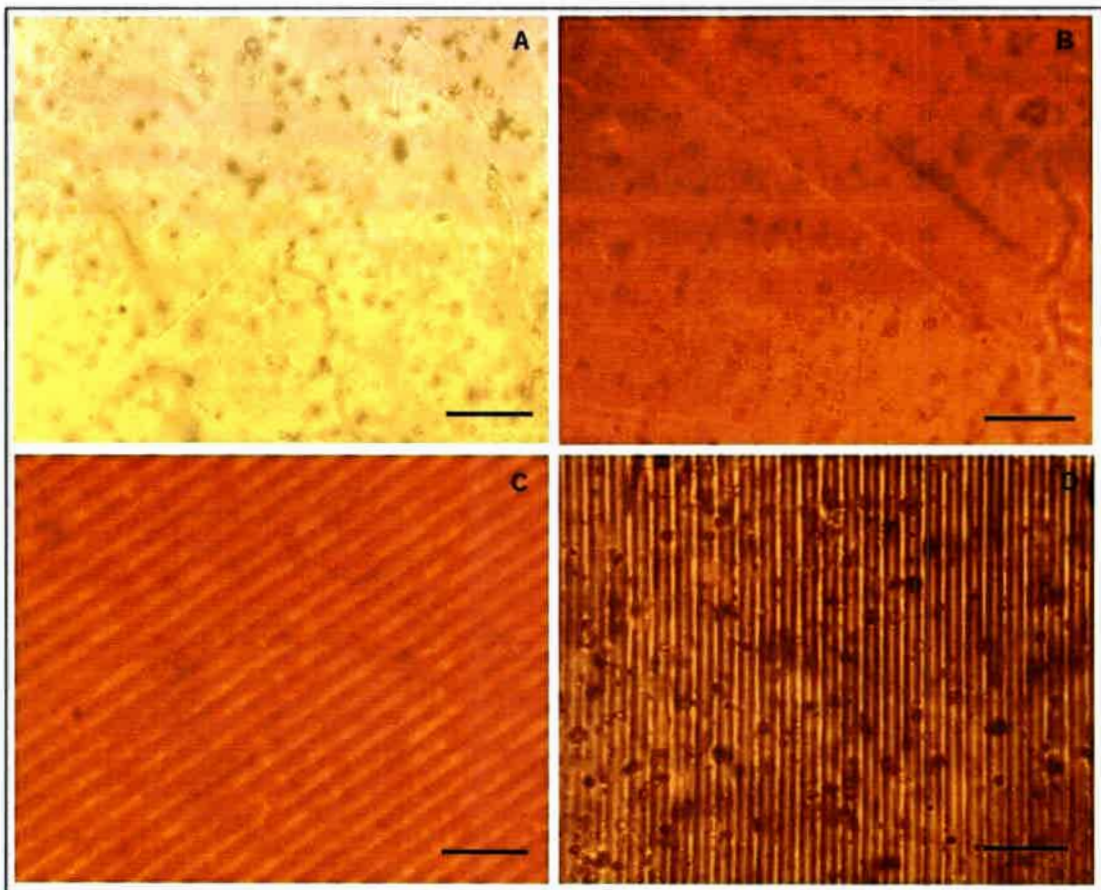


Figura 4: Imágenes de las superficies estructuradas analizadas por microscopía óptica. A) Film de poliimida sin estructurar, B) Film estructurado con canales de 1 μm , C) Film estructurado con canales de 5 μm , D) Film estructurado con canales de 10 μm . Barra de escala = 50 μm .



Microscopía de Fuerza Atómica

Para poder observar con mayor detalle la topografía de las superficies poliméricas estructuradas se utilizó la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica. En la figura 5 se observa una topografía con estructuras típicas obtenidas por ablación por interferencia láser que varían según la potencia de láser utilizada. El período de los micropatrones fue de 3 μm . La profundidad de las líneas ablacionadas fue de 1, 5 y 10 μm . para las potencias de 0,36; 0,91 y 1,81 J/cm^2 respectivamente.

El perfil de los micropatrones puede ser descrito como sinusoidal-trapezoidal para bajas intensidades del láser (0,36 J/cm^2 , Figura 5 A). Para valores de intensidad medios suele obtenerse un perfil sinusoidal (0,91 J/cm^2 , Figura 5 B) y para valores de intensidad altos se observa un perfil en forma de U (1,81 J/cm^2 Figura 5 C).

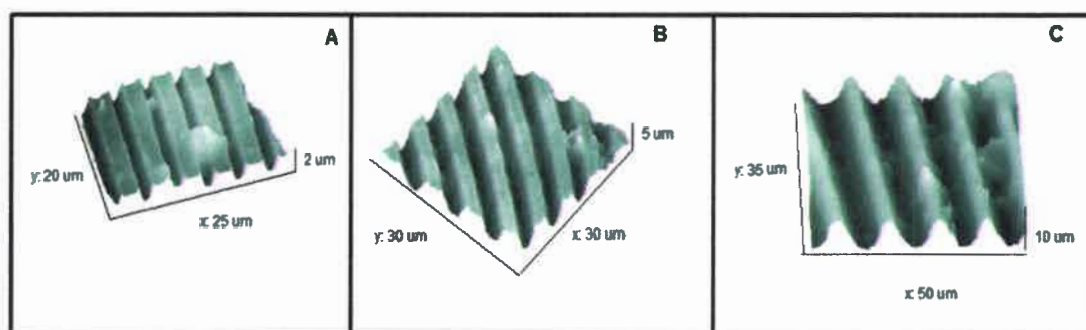


Figura 5: Imágenes de las superficies estructuradas con distintas intensidades de láser: 0,36 J/cm^2 (A); 0,91 J/cm^2 (B) y 1,81 J/cm^2 (C). Las muestras fueron analizadas por Microscopía de Fuerza Atómica.

Ángulo de contacto

Debido a que los sustratos son materiales comercialmente ya caracterizados fueron testados contra el agua bidestilada. En la figura 6 se observan las fotografías tomadas de las gotas sobre las superficies estructuradas. Cuando las superficies son estructuradas, la mojabilidad de las mismas se ve alterada mostrando diferentes respuestas. En este caso, podemos ver como las superficies estructuradas con canales de 1 y 5 μm (figura 6, B y C respectivamente) revelan un comportamiento más hidrofílico. Sin embargo, en las superficies estructuradas con periodos de

10 μm (figura 6 D), el ángulo de contacto arrojó un valor cercano al de los films sin estructurar (figura 6 A).

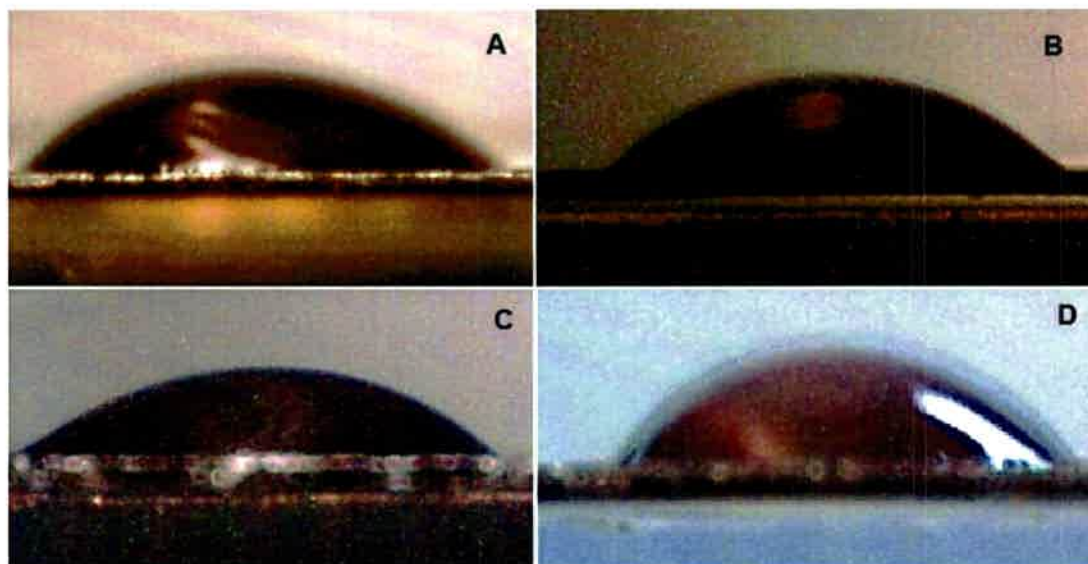


Figura 6: Perfil de la gota de agua sobre superficies de poliimida. (A) Film de poliimida sin estructurar, (B) Film de poliimida estructurado con canales de 1 μm , (C) Film de poliimida estructurado con canales de 5 μm , (D) Film de poliimida estructurado con canales de 10 μm .

Los datos del comportamiento de la gota en las distintas superficies fueron resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 1: Medidas geométricas de las gotas en contacto con las superficies estructuradas

Sustrato	Ángulo de contacto	Altura de la gota (mm)	Radio de base de la gota (mm)
Sin estructurar	$43,79^\circ \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,10$	$2,08 \pm 0,03$
Canales de 1 μm	$37,29^\circ \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,05$	$1,97 \pm 0,05$
Canales de 5 μm	$34,51^\circ \pm 1,01$	$0,76 \pm 0,05$	$2,07 \pm 0,01$
Canales de 10 μm	$44,00^\circ \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,05$	$1,99 \pm 0,05$

Los datos representan la media \pm desvío estándar. Infostat 2010.

Estudio de comportamiento bacteriano frente a las superficies modificadas

Caracterización de la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

La información generada por las curvas de crecimiento bacteriano permite evaluar la mayor o menor velocidad de desarrollo de los microorganismos de manera subjetiva, mediante la inspección visual de las gráficas de UFC/ml en función del tiempo o también estimando la evolución de la masa bacteriana en crecimiento mediante la integral de los valores de UFC/ml en función del tiempo. Se realizó la curva de crecimiento de *S. aureus* evaluando su crecimiento a una longitud de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro cada dos horas, en la que se observó que aproximadamente a las 6 horas se alcanzó la fase estacionaria (Figura 7).

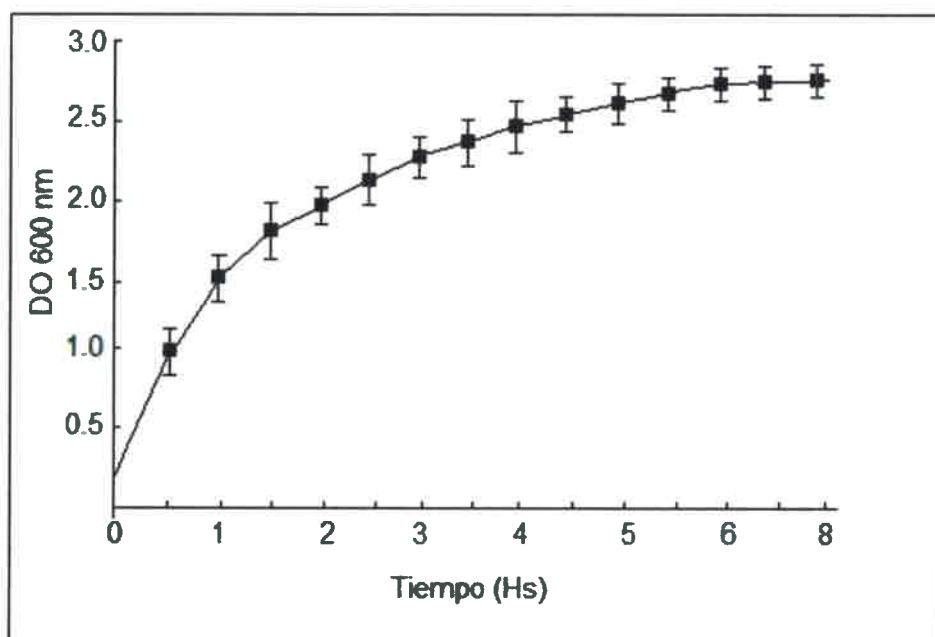


Figura 7: Curva de crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Los datos representan la media \pm desvío estándar.

Cuantificación de bacterias adheridas al polímero por recuento de colonias

En la figura 8 se puede observar que, luego de normalizar los datos de los films estructurados con respecto a los del control sin estructurar, se encontró que el crecimiento bacteriano en los films estructurados con canales de 1 y 5 μm fue significativamente menor ($p < 0,05$).

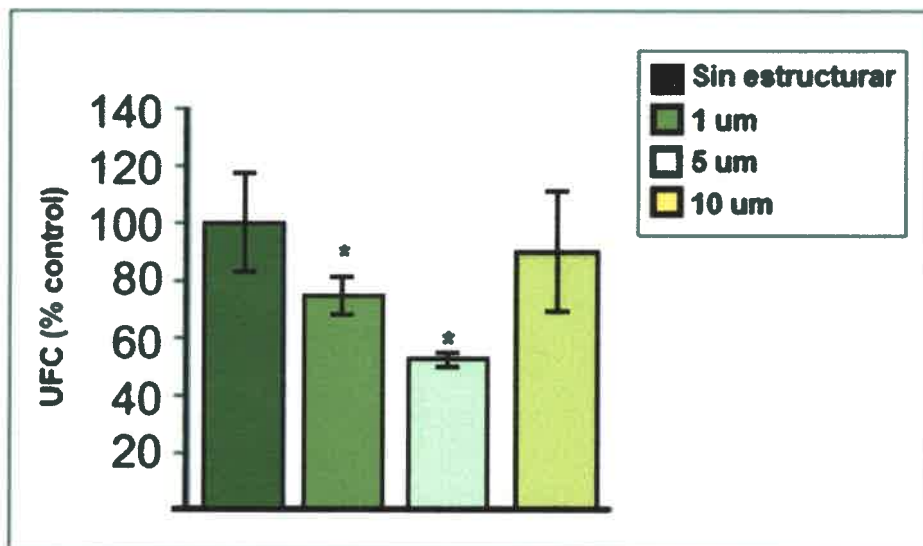


Figura 8: Cuantificación de bacterias adheridas a las superficies estructuradas. UFC: Unidades formadoras de colonias. Los datos representan la media \pm desvío estándar. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$). Prueba de Kruskal-Wallis, Infostat 2010.

Ensayo de viabilidad bacteriana por MTT

Como se puede observar en la figura 9, la actividad metabólica de las bacterias y consecuentemente su viabilidad, fue significativamente menor en las superficies estructuradas con canales de 1 y 5 μm .

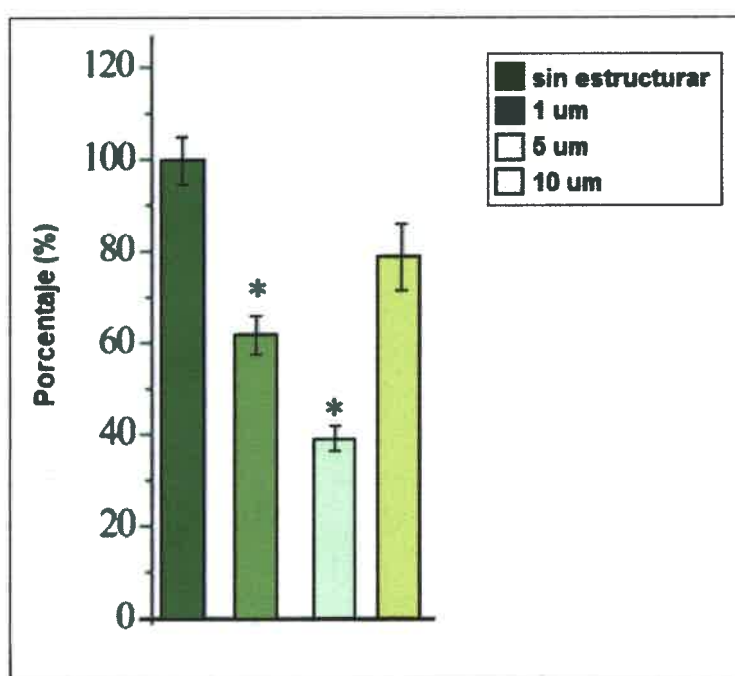


Figura 9: Viabilidad de *S. aureus* mediante la técnica de MTT en superficies estructuradas por la técnica de ablación por Interferencia Láser Directa. Los datos representan la media \pm desvío estándar. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$). Prueba de Kruskal-Wallis, Infostat

Formación de biofilm por la técnica de cristal violeta

Para evaluar la formación de biofilm se incubó la cepa de *S. aureus* durante 24 horas con los sustratos poliméricos estructurados y se utilizó la técnica colorimétrica de Cristal Violeta. El promedio del valor de absorbancia a 595nm fue interpretado según la siguiente escala: negativo ($X < 0,12$), débil ($0,12 < X < 0,24$) y positivo ($X > 0,24$). Se definió arbitrariamente la

unidad de biomasa de biofilm (UBB), una absorbancia 595nm = 0,1 corresponde a 1 UBB. Tanto las superficies nano/microestructurada como la que no fue modificada revelaron un valor de $\lambda_{595\text{nm}}$ positivo para el desarrollo de biofilm (Figura 10). Sin embargo, la superficie estructurada con canales de 5 μm mostró un valor de UBB significativamente menor ($29,02 \pm 1,31$) comparado con la superficie sin estructurar ($39,68 \pm 3,56$).

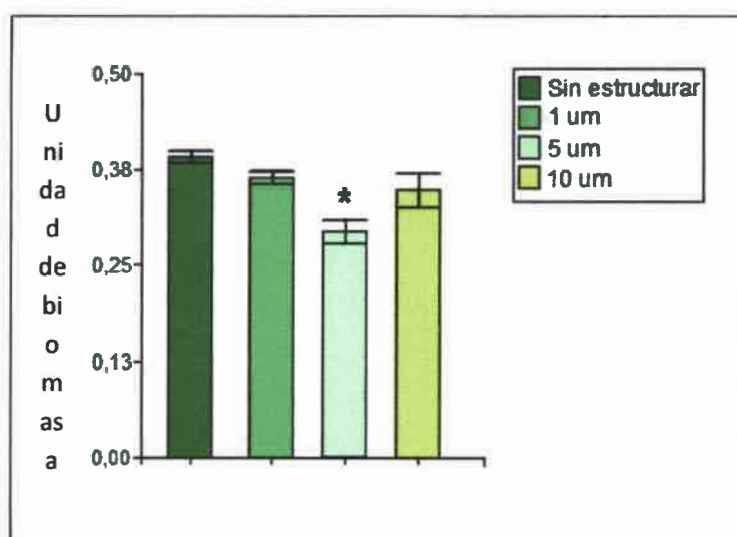


Figura 10: Formación de biofilm de *S. aureus* en superficies estructuradas mediante la técnica de Cristal Violeta. Los datos representan la media \pm desvío estándar. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$). Prueba de Kruskal-Wallis, Infostat 2010.

Análisis del biofilm por AFM

En la figura 11 se puede observar que en las superficies estructuradas hay un patrón ordenado de distribución espacial que está íntimamente relacionado a la topografía generada por la ablación láser.

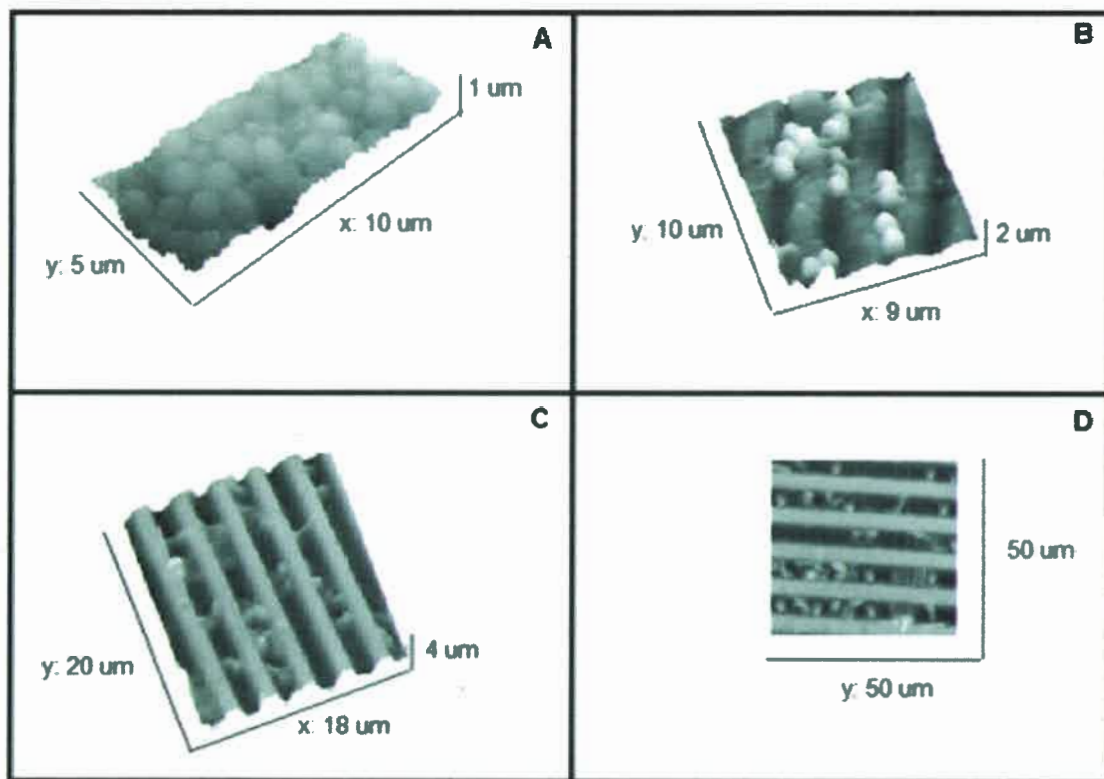


Figura 11: Imágenes del crecimiento de *S. aureus* en los distintos sustratos de poliimida estructurados Microscopio de Fuerza Atómica. (A) sustrato sin estructurar, (B) sustrato estructurado con canales de 1 μm , (C) sustrato estructurado con canales de 5 μm , (D) sustrato estructurado con canales de 10 μm .

DISCUSIÓN

La presencia de biofilms es común en la industria de los alimentos y pueden adecuarse a distintas superficies, lo que puede apreciarse en la contaminación y pérdida de la calidad de los alimentos. Los alimentos contaminados con *S. aureus* pueden llegar a ser altamente tóxicos ya que algunas cepas poseen la habilidad de producir enterotoxinas (Le Loir *et al.*, 2003). La resistencia de estas cepas a antimicrobianos se ha convertido en un problema emergente en el ambiente alimentario lo cual genera una gran preocupación en el área de salud Pública (Lee, 2003). La adhesión y formación del biofilm son también factores de virulencia importantes en *S. aureus* debido a que promueven la colonización de ambientes alimentarios (Brooks y Flint, 2008). Los biofilms formados en superficies de procesamiento de alimentos han mejorado su tolerancia a los desinfectantes aumentando el riesgo de contaminación cruzada de los alimentos. La formación del biofilm de *S. aureus* puede verse favorecida por algunas condiciones de procesamiento presentes en la industria alimentaria, como una temperatura óptima de crecimiento o la presencia combinada de sal y glucosa. Estos biofilms pueden constituir una fuente potencial de contaminación alimentaria, principalmente debido al efecto insatisfactorio de la aplicación de algunos desinfectantes (Rode *et al.*, 2007; Van der Veen y Abee, 2011).

Por lo anteriormente expuesto, es necesario encontrar opciones que reduzcan o no favorezcan la adhesión de los biofilms a superficies que estén en contacto con alimentos. Las condiciones de la superficie y su topografía constituyen un factor importante para el desarrollo y el crecimiento del biofilm. Sin embargo, la información relacionada al efecto de la topografía sobre la formación del biofilm es todavía limitada. Este trabajo fue diseñado para evaluar el efecto de las superficies poliméricas estructuradas por la técnica de ablación por Interferencia Láser Directa sobre la adhesión y crecimiento de *S. aureus*.

La poliimidas son polímeros formados por monómeros de imida. Las poliimidas aromáticas comerciales como las de Kapton® pueden exhibir propiedades mecánicas y térmicas excepcionales. La Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de análisis práctica que permite determinar la composición molecular y química de una variedad de materiales. La poliimida contiene grupos carbonílicos conjugados a anillos aromáticos. Como efecto de esta conjugación en el presente estudio se observó una disminución en la energía de transición (menor longitud de onda) y un aumento en la absorbancia. En este



trabajo, los picos presentes en el espectro FTIR fueron los característicos del grupo imida y se relacionan con los grupos funcionales particulares encontrados en la poliimida como son los estiramientos simétricos y asimétricos del grupo carbonilo de la imida, los ácidos carboxílicos, cetonas, enlaces C=C y C-N aromáticos (Toker Öztürk *et al.*, 2013).

La topografía superficial de los films de poliimida fue caracterizada por Microscopía Óptica, Microscopía de Fuerza Atómica y determinación del ángulo de contacto. La Microscopía Óptica pudo revelar la presencia de patrones regulares en las superficies estructuradas. El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewtons. Al sensar una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda que va acoplada a un cantilever microscópico muy flexible de sólo unos 200 μm (López y Solares, 2014). En este trabajo, las superficies caracterizadas mediante AFM mostraron perfiles de los micropatrones en forma sinusoidal, trapezoidal y en forma de U.

La ablación láser ocurre cuando la intensidad del láser supera un umbral necesario para lograr remover materia del material (Salas *et al.*, 2010). En lo que se refiere a la topografía y en concordancia con Lasagni *et al.*, (2008), se encontró que a bajas intensidades, solo una pequeña área del polímero utilizado en el presente estudio es ablacionada en las posiciones de máxima interferencia produciendo un perfil senoide-trapezoidal. Cuando la intensidad del láser aumenta, una porción más grande de la figura de interferencia supera el umbral de energía necesaria para realizar la ablación del polímero resultando en regiones más amplias ablación con una forma sinusoidal. Para intensidades de láser aún más altas se observa un perfil en forma de "U". Esto ya fue observado en otros estudios, donde se obtuvieron resultados análogos en los cuales la respuesta material a los patrones de interferencia láser era dependiente de la intensidad del láser (Acevedo *et al.*, 2009).

La mojabilidad es una propiedad superficial que depende de las interacciones intermoleculares de un líquido en contacto con una superficie sólida. La misma puede ser determinada a partir de la medición del ángulo de contacto; que es el ángulo que el líquido forma en la superficie de contacto con un sólido. En este trabajo la medición de los ángulos de contacto reveló características hidrofílicas con diferencias mínimas entre las diferentes superficies analizadas. Estudios previos han reportado resultados similares, en los que se ha encontrado que los

espacios generados por la ablación laser no llegan a formar burbujas de aire lo suficientemente grandes para afectar la mojabilidad de la superficie (Hitchcock *et al.*, 1981).

Los materiales de los instrumentos y maquinaria usados en la industria alimenticia son variados, dentro de ellos se incluyen acero inoxidable, vidrio, goma, poliuretano, teflón y madera. Se ha registrado que *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* tienen alta capacidad para producir biopelículas en superficies plásticas. Superficies hidrofóbicas apolares como teflón y madera permiten una adhesión bacteriana más rápida que materiales hidrofílicos como vidrio y metales (Zapata Jaña, 2015).

Se ha encontrado que las interacciones entre el material y la célula no sólo son gobernadas por el carácter hidrofílico de la superficie del material. Otras propiedades como la rugosidad, la carga de la superficie y características propias de la célula influyen su comportamiento frente a la superficie (Ma *et al.*, 2007).

La interacción inicial entre la bacteria y la superficie inerte implica fuerzas fisico-químicas no específicas tales como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y polaridad. La superficie bacteriana es compleja y en ella se encuentran tanto residuos cargados como residuos hidrofóbicos. Sin embargo, los materiales inertes pueden quedar rápidamente recubiertos por proteínas o glucoproteínas procedentes de su alrededor (Yu *et al.*, 1994).

La presencia de biopelículas es común en la industria de los alimentos y pueden adecuarse a distintas superficies. En *S. aureus* la adherencia es, en parte, mediada por una serie de adhesinas pertenecientes a la familia de las proteínas MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Foster y Hook, 1998). Se ha reportado que células de los biofilms pueden interactuar con proteínas de la carne (fibrina, laminina y colágeno) y lograr una adecuada adhesión a su superficie; esto, puede llevar a serios problemas higiénicos y pérdidas económicas debidas al deterioro del alimento. Finalmente, proteínas que son excretadas al medio como la proteína de adherencia extracelular (EAP), pueden actuar como puente entre un ligando de la superficie y la bacteria (Vila *et al.*, 2008).

Una vez caracterizadas las diferentes superficies en el presente trabajo se evaluó el comportamiento de *S. aureus* en términos de adhesión, crecimiento y formación de biofilm. Para ello se realizó una curva de crecimiento. La información generada por la curva de crecimiento bacteriano se utiliza como referencia para evaluar la respuesta de la bacteria a distintos tratamientos, pero estas pruebas son laboriosas y requieren mucho tiempo (Gloede *et*



al., 2009). En estos ensayos es necesario caracterizar el crecimiento bacteriano en ausencia del tratamiento, a fin de obtener información de referencia para comparar el número de bacterias viables que se obtienen en ausencia (crecimiento) y en presencia de diferentes tratamientos (Firsov, 2012).

Para evaluar si la adhesión de *S. aureus* fue diferente en las distintas superficies poliméricas, se realizó una incubación de una suspensión bacteriana con los distintos sustratos poliméricos modificados y luego de la incubación las muestras se sonicaron y plaquearon para recuento de UFC. Los resultados obtenidos mostraron que la adhesión fue menor en las superficies estructuradas con canales de 1 y 5 μm . Verran y Whitehead, (2006) han determinado que las superficies con rayas y grietas de tamaño similar al tamaño de las bacterias adheridas retienen mayor cantidad de células que las superficies con características topográficas de dimensiones mucho mayores.

En los últimos años se han propuesto metodologías para reemplazar al método clásico de recuento de UFC/placa por técnicas indirectas. Una de estas técnicas se basa en cuantificar la actividad metabólica de los microorganismos como una medida de la viabilidad bacteriana (McCluskey *et al.*, 2005; Amal *et al.*, 2007). El método colorimétrico basado en la reducción del cloruro de tetrazolio (XTT) a formazán por los sistemas de transporte de electrones (STE) bacterianos propuesto por Tuney *et al.*, (2004) y Moriarty *et al.*, (2005), presenta dos ventajas: la primera es la de evitar los errores humanos asociados a los procedimientos de dilución, siembra en placa y conteo de UFC/placa, y la segunda en acortar la duración del ensayo. En el presente trabajo se utilizó el método de MTT cuyo fundamento es similar. La viabilidad fue mayor en superficies estructuradas con canales de 10 μm de ancho.

Luego de observar los polímeros nano/microestructurados al AFM se encontró que la topografía generó un ordenamiento bacteriano, reduciendo significativamente ($p < 0,05$) la adhesión y viabilidad en las superficies estructuradas con canales de 1 y 5 μm de ancho. Esta disminución en la adhesión bacteriana generada por una reducción del área de contacto superficial por el patrón de estructuración puede considerarse una respuesta primaria de las células a la topografía. En concordancia con Xu y Siedlecki (2014) podríamos sugerir que una reducción en el área de contacto puede considerarse un factor determinante en superficies con tendencia hidrofílicas. Otros estudios realizados con superficies de poliimida estructuradas han



revelado que la fotolitografía afectó la disposición y migración de leucocitos (Fujisawa *et al.*, 1999).

En cuanto a la formación de biofilm determinada por la técnica de cristal violeta, los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que la formación de biofilm solo fue diferente en las superficies estructuradas con canales de 5 μm . Estos resultados fueron corroborados con la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica donde se encontró un patrón adhesión que dependía del tamaño de los canales ablacionados. De este modo se busca controlar la topografía, ya que diferentes estudios han demostrado que dicha propiedad, tanto a escala micrométrica como nanométrica, tiene efectos relevantes en el comportamiento microbiano y celular en general (Jäger *et al.*, 2007).



CONCLUSIONES

- La caracterización química realizada por la técnica de FTIR reveló la presencia de los grupos funcionales característicos de la poliimida.
- La potencia utilizada para irradiar las superficies generó diferentes topografías, sin embargo no se encontró una diferencia significativa con respecto a la hidrofobicidad de las superficies evaluadas. Esto nos indicaría que, para este caso en particular, no hay una relación directa entre esta propiedad y la adhesión de *S. aureus*.
- Las superficies estructuradas con canales de 5 μm lograron una disminución significativa de la adhesión, viabilidad y de la unidad de biomasa de biofilm comparado con el control sin estructurar.
- La Nanotecnología es una disciplina innovadora que permite la creación de nuevos materiales con propiedades prometedoras. La técnica de DLIP permite crear patrones superficiales en la micro/nanoescala que influyan en el desarrollo del biofilm, permitiendo el diseño y fabricación de materiales que puedan garantizar productos alimentarios más seguros y de mayor calidad, dando lugar a nuevos enfoques para la prevención y control de enfermedades en el futuro.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo DF, Lasagni AF, Barbero C, Mücklich F (2007). Simple fabrication method of conductive polymeric arrays using Direct Laser Interference micro/nano patterning. *Advanced Materials*: 19:1272-1275.
- Acevedo DF, Lasagni AF, Cornejo M, Politano M, Barbero C, Mücklich F (2009). Large Area Fabrication of Tuned Polystyrene/Poly(methylmethacrylate) Periodic Structures Using Laser Interference Patterning. *Langmuir*: 25:9624.
- Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A y Gilbert P (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*: 167:1a79-184.
- Amal G, Al-Bakri A, Afifi F (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*: 68(1):19-25
- Arnold JW y Bailey GW (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science*: 79:1839-1845.
- Baird-Parker AC (1990) The Staphilococci –an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*. Symposium Supplements:1S -8S.
- Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*: 4:261-286.
- Banerjee I, Pangule R y Kane R (2010). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials*: 23:690-718.
- Bergdoll MS (1979). Staphylococcal intoxications. En Riemann H, Bryan FL (eds.). Food-borne infections and intoxications (2nd ed.), New York: *Academic Press* 444-90.
- Bergdoll MS (1989). *Staphylococcus aureus*. En Doyle MP (ed) *Food.borne Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker. 464-525.
- Bassler BL, Losick R (2006). Bacterially speaking. *Cell*: 125:237-246.

- Beech IB, Smith JR, Steele AA, Penegar I, Campbell SA (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 23:231-247.
- Bibel W (2004). Converging Technologies and the Natural, Social and Cultural World. Special Interest Group Report for the European Commission via an Expert Group on Foresighting the New Technology Wave.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*: 54:631-651.
- Brooks JD, Flint SH (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*: 43:2163-2176.
- Bryan FL (1976). *Staphylococcus aureus*. En Difigueiro, M. P. y Splittstoesser D F (eds) *Food Microbiology: Public Health Aspects*, Westport: AVI Publishing Co. p. 12-128.
- Cady NC, Stelick S, Batt CA (2003). Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosens Bioelectron*: 19:59-66.
- Carpentier B, Cerf O (1993). Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*: 75: 499-511.
- Characklis WG (1981). Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*: 23:1923-1960.
- Charest JL, Garcia AJ, King WP (2007). Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials*: 28: 2202-2210.
- Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM (1997). The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *Journal of Biomedical Materials Research*: 34:279-290.
- Chen G, Ito Y, Imanishi Y, Magnani A, Lamponi S, Barbucci R (1997). Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity. *Bioconjugate Chemistry*: 8:730-734.
- Chmielewsky RAN, Frank JF (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*: 2:22-32.



- Chole RA, Faddis BT (2003). Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*: 129:634-6.
- Christopher AB, Arndt A, Cugini C, Davey ME (2010). A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiology*: 156:3469-3477.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*: 284:1318-1322.
- Dack GM, Cary WE, Woolper O, Wiggers H (1930). An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic *Staphylococcus*. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*: 4:167-175.
- Dan N (2003). The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 27:41-47.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW y Greenberg, EP (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*: 280:295-298.
- Deighton MA, Capstick J, Domalewski E, Van Nguyen T (2001). Methods for Studying Biofilms Produced by *Staphylococcus epidermidis*. In: Doyle RJ, editor. *Methods in enzymology*. Vol 336. San Diego (California): (177-195). *Academic Press*.
- Delannay F, Mater J (1987). *Science*: 22: 1 1.
- Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal Immunology Methods* 89:271-277.
- Di Rienzo JA, Macchiavelli R, Casanoves F (2010). Modelos Mixtos en InfoStat. Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Díaz C (2011). Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Donlan, RM (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases journal*: 8:881-890.



- Dunne, WM Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*: 15:155-166.
- Eifert GH, Hodson SE, Tracey DR, Seville JL, Gunawardane K (1996). Cardiac anxiety, illness beliefs, psychological impairment: comparing healthy heart-anxious patients with cardiac and surgical patients. *Journal of Behavioral Medicine*: 19:385-399.
- Fletcher M (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*: 170: 2027-2030.
- Flint SH, Brooks JD, Bremer PJ (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*: 43:235-242.
- Firsov A, Gilbert D; Greer K, Portnoy Y y Zinner S (2012). Comparative pharmacodynamics and antimutant potentials of doripenem and imipenem with ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 56(3):1223-1228.
- Foster TJ, Hook M (1998). Surface protein adhesines of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology*: 6:484-8.
- Fujisawa N, Poole-Warren LA, Woodard JC, Bertram CD, Schindhelm K (1999). A novel textured surface for blood-contact. *Biomaterials*: 20:955-62.
- Fuster i Valls N (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Tesis para optar por el título de Doctor. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra.
- Gates BD, Xu Q, Stewart M, Ryan D, Willson CG, Whitesides GM (2005). New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques. *Chemical Reviews*: 105:1171-1196.
- Giacomino N, Cerra M, Stiefel S, Gumiy D, Notaro U, Buffa E, Baroni E, Picco E y Formentini E (2011). Actividad bactericida intrínseca de suero bovino sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista FAVE. Ciencias Veterinarias*: 10(2):45-57.

- Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI (1986). Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infection and Immunity*: 52:555-561.
- Gilbert P (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*: 16:190-191.
- Gilbert P, Evans DJ, Evans E, Duguid IG, Brown MR (1991). Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology*: 71:72-77.
- Gloede J, Scheerans C, Derendorf H y Kloft C (2009). In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 65(2):186-201.
- Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealon KH, Fredrickson JK (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 103:11358-11363.
- Gutiérrez D, Delgado S, Vázquez-Sánchez D, Martínez B, López Cabo M, Rodríguez A, Herrera JJ, García P (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*: 78 no. 248547-8554.
- Hennekinne JA, de Buyser ML, Dragacci S (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*: 36:815-836.
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Kjelleberg S, Givskov M (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*: 148:87-102.
- Heo J, Thomas KJ, Seong GH, Crooks RM (2003). A microfluidic bioreactor based on hydrogel-entrapped *E. coli*: cell viability, lysis, and intracellular enzyme reactions. *Analytical Chemistry*: 75:22-26. S.J.



- Hitchcock SJ, Carroll NT, Nicholas MG (1981). Some effects of substrate roughness on wettability. *Journal of Materials Science*: 16. 3:714.
- Hogt AH, Dankert J, Hulstaert CE y Feijen J (1986). Cell surface characteristics of coagulase-negative *staphylococci* and their adherence to fluorinated poly (ethylenepropylene). *Infection and Immunity*: 51:294-301.
- Husmark U, Ronner U (1990). Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Bacteriology*: 69:557-562.
- ICMSF (1998). Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, S. A.
- Israelachvili JN (2001). *Intermolecular and surface forces*. (3ra ed.). California, USA: Elsevier.
- Ito Y, Chen G, Imanishi Y (1998). Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. *Bioconjugate Chemistry*: 9:277-282.
- Jäger M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R (2007). Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *Journal Biomedics Biotechnology*: 2007:69036-69055.
- Jong HW, Chen Y, Anderson WF, Quake SR (2006). Molecular biology on a microfluidic chip. *Journal of Physics: Condensed Matter*: 18, S691.
- Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z (2010). Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *International Journal of Nanomedicine*: 5:261-267.
- Katsikogianni M, Missirlis YF, Katsikogianni M, Missirlis YF (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*: 8:37-57.
- Keymer JE, Galajda P, Muldoon C, Park S, Austin RH (2006). Bacterial metapopulations in nanofabricated landscapes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 103:17290-17295.
- Kim KY, Frank JF (1995). Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *Journal of Food Protection*: 58:24-28.

- Kim SK, Kaiser D (1990). Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science*: 249:926-928.
- Kohler T, van Delden C, Curty LK, Hamzhepour MM, Pechere JC (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*: 183:5213-5222.
- Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*: 190:4632-4640.
- Krom BP, Cohen JB, McElhaney Feser GE, Cihlar RL (2007). Optimized candidal biofilm microtiter assay. *Journal of Microbiology Methods*: 68:421-423.
- Kroncke KD, Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K (1990). Electron microscopic study of coexpression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsules in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*: 58:2710-2714.
- Kumar CG, Anand SK (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*: 42:9-27.
- Langheinrich D, Yslas E, Broglia M, Rivarola V, Acevedo D, Lasagni A (2012). Control of Cell Growth Direction by Direct Fabrication of Periodic Micro- and Submicrometer Arrays on Polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*: 50:415-422.
- Lappin-Scott HM, Costerton JW (1995). *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Lasagni AF, Acevedo DF, Barbero CA, Mucklich F (2007). One-step production of organized surface architectures on polymeric materials by direct laser interference patterning. *Advanced Engineering Material*: 9:99-104
- Lasagni F, Lasagni A, Engstler M, Degischer HP, Mücklich F (2008). Nano-characterization of cast structures by FIB-tomography. *Advanced Engineering Materials* 10: 62-66.
- Leclercq-Perlat MN, Lalande M (1994). Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *Journal of Food Engineering*: 23:501-517.

- Lee JH (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology*: 69:6489–6494.
- Lee Wong AC (1998). Biofilms in Food Processing Enviroments. *Journal of Dairy Science*: 81:2765-2770.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*: 2:63–76.
- Lerebour G, Cupferman S, Bellon-Fontaine MN (2004). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *Journal of Applied Microbiology*: 97:7-16.
- Leung P, Li Y, Yao L, Song QW, Newton E (2006). Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *Journal of Hospital Infection*: 62:58-63.
- Liang MN, Smith SP, Metallo SJ, Choi IS, Prentiss M, Whitesides GM (2000). Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 97:13092-13096.
- López EA, Solares SD (2014). El microscopio de fuerzas atómicas: Métodos y aplicaciones. *Revista de la Universidad Del Valle de Guatemala*: 28:14-23.
- Lu L, Nyalakonda K, Kam L, Bizios R, Gopferich A, Mikos AG (2001). Retinal pigment epithelial cell adhesion on novel micropatterned surfaces fabricated from synthetic biodegradable polymers. *Biomaterials*: 22:291-297.
- Ma WJ, Ruys AJ, Mason RS, Martin PJ, Bendavi A, Liu Z, Ionescu M, Zreiqat H (2007). Effects of physical and chemical properties on biological response. *Biomaterials*: 289:1620–1628.
- MacCluskey C, Quinn J, McGrath J (2005). An evaluation of activity of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganism. *Microbial Ecology*: 49:379-387.
- Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R (1990). Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. *J Dairy Sci*: 73:3428-3432.
- Mah TF, O'Toole GA (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*: 9:34-39.



- Manning SC (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear, Nose and Throat Journal*: 82:18-20.
- Marshall KC, Stout R, Mitchell R (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*: 68337-348.
- Martín Sanchez F (2006). Convergencia de Tecnologías: Nuevas Oportunidades para el Avance de la Informática y de las Ciencias Biomédicas. *Revista Salud.com*, Vol.2, N°6, II Trimestre.
- Mao H, Cremer PS, Manson MD (2003). A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 100:5449-5454.
- Mattila-Sandholm T, Wirtanen G (1992). Biofilm formation in the food industry: a review. *Food Reviews International*: 8:573-603.
- Millsap KW, Reid G, van der Mei HC, Busscher HJ (1997). Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. *Canadian Journal of Microbiology*: 43:284-291.
- Moreira MA, Oliveira JA, Teixeira LM, Moraes CA (2005). Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. *Veterinary Microbiology*: 109:75-81
- Moriarty F, Elborn S, Tunney M (2005). Development of a rapid colorimetric time-kill assay for determining the *in vitro* activity of ceftazidime and tobramycin in combination against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*: 61(2):171-179.
- Motlagh D, Senyo SE, Desai TA, Russell B (2003). Microtextured substrata alter gene expression, protein localization and the shape of cardiac myocytes. *Biomaterials*: 24:2463-2476.
- Nagamine K, Onodera S, Torisawa YS, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T (2005). On-chip transformation of bacteria. *Analytical Chemistry*: 77:4278-4281.
- Nagaraju K, Reddy R, Reddy N (2015). A review on protein functionalized carbon nanotubes. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*: 13(4):301 - 312.
- Nair AS, Binoy NP, Ramakrishna S, Kurup TR, Chan LW, Goh CH, Islam MR, Utschig T, Pradeep T (2009). Organic-soluble antimicrobial silver nanoparticle-polymer

composites in gram scale by one-pot synthesis. *ACS Applied Materials & Interfaces*: 1:2413-2419.

- Narenan V (2003). Bacterial attachment to meat surfaces. Tesis para optar por el título de Doctor en Tecnología de los Alimentos. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Nealsen KH, Platt T, Hastings JW (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*: 104:313-322.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*: 66: 86-92.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*: 54:49-79.
- O'Toole GA, Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*: 30:295-304.
- Park S, Wolanin PM, Yuzbashyan EA, Lin H, Darnton NC, Stock JB, Silberzan P, Austin R (2003). Influence of topology on bacterial social interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 100:13910-13915.
- Pascual M, Calderón V (2000). Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ª ed. España: Díaz de Santos S. A.
- Pedersen, K (1990). Biofilm development on stainless steel and pvc surfaces in drinking water. *Water Research*: 24:239-243.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*: 12:185-90.
- Ramadan HH (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*: 14:183-186.
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*: 435:1098-1101.
- Reguera G, Pollina RB, Nicoll JS, Lovley DR (2007). Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*: 189:2125-2127.

- Rijnaarts HHM, Norde W, Lyklema J, Zehnder AJB (1999). DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 14:179-195.
- Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretø T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*: 116:372–383.
- Roy I, Ohulchanskyy TY, Pudavar HE, Bergey EJ, Oseroff AR, Morgan J, Dougherty TJ, Prasad PN (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*: 125:7860-7865.
- Rowan B, Wheeler MA, Crooks RM (2002). Patterning bacteria within hyperbranched polymer film templates. *Langmuir*: 18:9914-9917.
- Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N (2003). Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*: 290: 1749-56.
- Salas P, Keyffer J, Garica Víctor J, Fernández-Rojas F, Fernández-Rojas C (2010). Regímenes de ablación láser en la elaboración de películas delgadas. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*: 25(4):121-126.
- Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*: 115:578-582.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*: 184:1140-1154.
- Savov L (1997). Wettability of solids by molten metals and alloys. *Metall*: 51(9): 475-485.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*: 2(6):580-592.
- Schneider RP, Marshall KC (1994). Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*: 2:387-396.



- Serra GP (2003). Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencias. Escola de Previsió I Seguretat Integral. <http://www.adiveter.com/ftp/articles/A1070308.pdf> [citado 1 de Noviembre de 2010].
- Svensäter G, Bergenholtz G (2004) Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*: 4, 9:27-36
- Shapiro J (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*: 52:81–104.
- Silagyi KS (2007). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. Tesis de Maestría. Universidad de Maryland. <http://drum.lib.umd.edu/bitstream/handle/1903/7806/umi-umd-5089.pdf;jsessionid=6C958B85B7AF61DCD7F411FA94570134?sequence=1>.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*: 417:552-555.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 65:1955-1958. Doi: 10.1093/jac/dkq257.
- Stewart PS, Costerton JW (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*: 358:135-138.
- Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Review Microbiology Mar*; 6(3):199-210. doi: 10.1038/nrmicro1838.
- St John PM, Davis R, Cady N, Czajka J, Batt CA, Craighead HG (1998). Diffraction-based cell detection using a microcontact printed antibody grating, *Analytical Chemistry*: 70:1108-1111.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review Microbiology*: 56:187-209.
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied Environmental Microbiology*: 67:5608-5613.
- Swanson KM, Petran RL, Hanlin JH (2001). Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. En: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 53-67.

- Takeuchi S, DiLuzio WR, Weibel DB, Whitesides GM (2005). Controlling the shape of filamentous cells of *Escherichia coli*. *Nano Letters*: 5:1819-1823.
- Tan J, Saltzman WM (2002). Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. *Biomaterials*: 23:3215-3225.
- Thomas JG, Nakaishi LA (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal of the American Dental Association*: 137:10-15.
- Thomas V, Yallapu MM, Sreedhar B, Bajpai SK (2009). Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*: 20:2129-2144.
- Toker Öztürk RD, Kayaman-Apohan N, Gungor A (2013) Synthesis and Characterization of Novel Polyimides Based on 2,6-bis(m-Amino Phenoxy) Benzoyl Naphthalene. *Chemical Engineering Transactions Vol. 32*.
- Tomasz A (1965). Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature*: 208:155-159.
- Tunney M, Ramage G, Field T, Moriarty T, Storey D (2004). Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*: 48(5):1879-81.
- Uhari M, Kontiokari T, Niemela M (1998). A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics*: 102 (Pt 1): 879-84.
- Uhlinger DJ y White DC (1983). Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*, *Applied Environmental Microbiology*: 45:64-70.
- Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De Rudder D, Van Peteghem A (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied Environmental Microbiology*: 56:788-795.
- Van der Veen S, Abee T (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*: 144:421-431.
- Verran J y Whitehead KA (2006). Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. *Food and Bioproducts Processing*: 84:260-264.

- Vila J, Soriano A y Mensa J (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica*: 26(1):48-55
- Walencka E, Sadowska B, Rozalska S, Hryniewicz W, Rozalska B (2005) Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. *Polish Journal of Microbiology*: 54:191-200.
- Walker SL, Hill JE, Redman JA, Elimelech M (2005). Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Applied Environmental Microbiology*: 71: 3093-3099.
- Whitesides GM (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*: 442:368-373.
- Wingender J, Neu TR y Flemming HC (1999). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. *Springer*, New York.
- Xu LC1, Siedlecki CA (2014) *Staphylococcus epidermidis* adhesion on hydrophobic and hydrophilic textured biomaterial surfaces. *Biomedical Materials*: 10.1088/1748-6041/9/3/035003.
- Yu FP, Suci PA, Mittelman MW, Geesey GG (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*: 38:2125-2133.
- Zhang L, Hemraz UD, Fenniri H, Webster TJ (2010). Tuning cell adhesion on titanium with osteogenic rosette nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 95: 550-563.
- Zhang Y, Kreth J, Herzberg MC (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*: 190:4632-4640.
- Zapata-Jaña Y (2015).
<https://lacienciadelosalimentos.wordpress.com/2015/05/17/biopelículas-en-la-industria-de-la-carne/>.
- Zoltai PT, Zottola EA y McKay LL (1981). Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surface. *Journal of Food Protection*: 44:204-208.