

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES NANOMECAÑICAS DE LAS MEMBRANAS BACTERIANAS CON ALTA RESOLUCIÓN ESPACIAL MEDIANTE PEAK FORCE QNM

Micaela Bianchi (1), Carolina Diaz (1,2,3), Alejandro Miñan (2,3), Diego Pissinis (2,3), Patricia Schilardi (2,3), Lía Pietrasanta (1,3,4)

(1) Centro de Microscopías Avanzadas, FECyN, UBA, Buenos Aires, Argentina. (2) Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CONICET-UNLP, La Plata, Argentina. (3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. (4) Departamento de Física & Instituto de Física de Buenos Aires, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina. Email: mbianchi@df.uba.ar, cdiaz@df.uba.ar, lia@df.uba.ar

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), desde sus inicios, ha sido una herramienta fundamental de diagnóstico e investigación. Ha permitido el estudio de sistemas biológicos complejos mediante el análisis topográfico y el mapeo de las características físicas, químicas y biológicas en ambientes pseudo-fisiológicos. Peak Force QNM es una técnica novedosa, un modo de operación avanzado de AFM, que permite el mapeo cuantitativo de las propiedades nanomecánicas (elasticidad, adhesión, disipación de la energía y deformación) de una muestra con alta resolución espacial. El Peak Force QNM adquiere y analiza las curvas de fuerza individuales que ocurren durante el proceso de adquisición de la imagen [1]. Las curvas son posteriormente analizadas para obtener las propiedades nanomecánicas de la muestra analizada (Figura 1).

En los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de agentes anti-microbianos no convencionales debido al aumento de la resistencia de estos microorganismos a antibióticos usualmente utilizados. Los compuestos de Ag, tanto aquellos que contienen iones Ag⁺ como las nanopartículas de Ag son una buena alternativa frente a este objetivo. En este sentido, se ha propuesto que existe una fuerte interacción de estos compuestos con la pared bacteriana, conduciendo a la muerte celular [2]. En el presente trabajo se analiza el efecto de dos tratamientos (iones Ag⁺ y nanopartículas de Ag (NPs de Ag)) sobre las propiedades mecánicas de la membrana de dos tipos de bacterias (*Pseudomonas aeruginosa* –Gram(–)– y *Staphylococcus aureus* –Gram(+)-). Las NPs de Ag se sintetizaron mediante la técnica desarrollada por Kitaev *et al.* [3]. Mediante esta técnica se obtuvo una dispersión de nanopartículas que consistía en una población con nanoprismas de 30 nm y 60 nm. Para los experimentos se formaron biofilms en estadios temprano (2 horas) sobre vidrio para posteriormente ser sometidos al tratamiento con iones Ag⁺ y con nanopartículas de Ag.

Tanto las imágenes topográficas de las células como los mapas de fuerza resueltos en el espacio revelan variaciones locales significativas en la elasticidad y propiedades nanomecánicas de las células cuando las mismas fueron sometidas a los dos tratamientos anteriormente descriptos (Figura 2 y 3). Tanto el tratamiento con iones Ag como el correspondiente a las NPs de Ag, resultaron en una disminución del módulo de elasticidad de las membranas bacterianas, indicando una pérdida de rigidez en la pared bacteriana. Además pudo observarse que la elasticidad no es homogénea en toda la membrana bacteriana. Este hecho es evidente sobre todo en las bacterias Gram (-). Por otra parte, pudo observarse que la producción de material polimérico extracelular se encuentra parcialmente inhibida cuando el biofilm se encuentra expuesto a los tratamientos con Ag.

Mediante la técnica Peak Force QNM, pudimos realizar el análisis cuantitativo de las propiedades nanomecánicas de células bacterianas con resolución espacial sin utilizar técnicas de inmovilización y en condiciones pseudo-fisiológicas.

REFERENCIAS

- [1] Pittenger, B., *et al.* Application Note #128 (2011).
 [2] Eckhardt, S., Brunetto, P.S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K.M. (2013) “Nanobio silver: its interaction with peptides and bacteria, and its uses in medicine”. *Chem. Rev.* 113(7):4708-4754.
 [3] Frank, A.J., Cathcart, N., Kenneth, E.M., Kitaev, V. (2010) “Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties”. *J. Chem. Ed.* 87(10):1089-1101.

AGRADECIMIENTOS

UBA, ANPCyT, UNLP, CONICET. M.B. es becaria doctoral CONICET.

FIGURAS

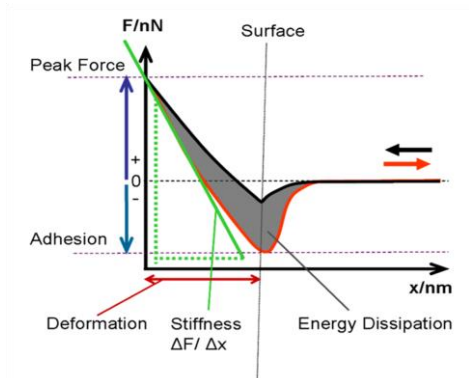


Figura 1. Curva de fuerza obtenida mediante Peak Force QNM en donde pueden observarse las principales propiedades mecánicas.

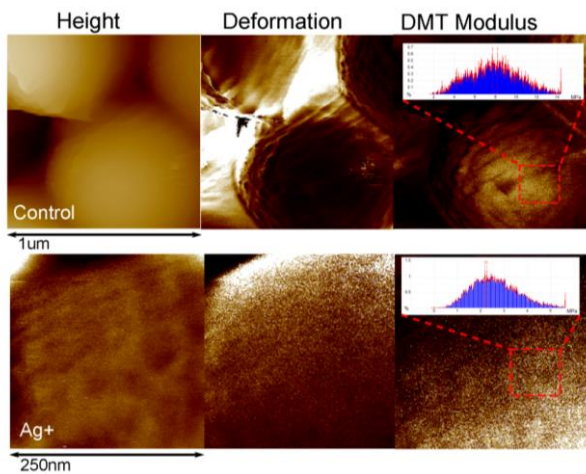


Figura 2. Imágenes obtenidas mediante Peak Force QNM de *Staphylococcus aureus* en medio líquido con y sin tratamiento de iones Ag^+ .

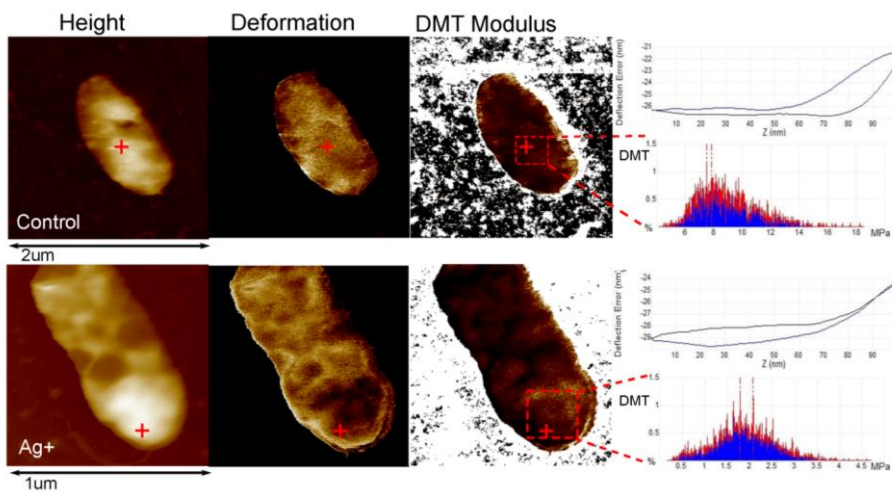


Figura 3. Imágenes obtenidas mediante Peak Force QNM de *Pseudomonas aeruginosa* en medio líquido con y sin tratamiento de iones Ag^+ . También pueden observarse las curvas de fuerza asociadas.