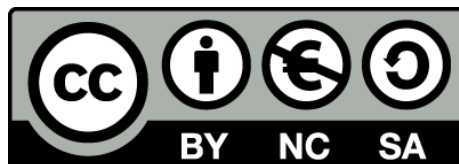




Electric polarization properties of single bacteria measured with electrostatic force microscopy

Theoretical and practical studies of Dielectric constant of single bacteria and smaller elements

Daniel Esteban i Ferrer



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Electric polarization properties of single bacteria measured with electrostatic force microscopy

Theoretical and practical studies of Dielectric
constant of single bacteria and smaller
elements

Daniel Esteban i Ferrer
Barcelona, September 2014

DOCTORAL THESIS

10 Resum en Català

La present tesi està inclosa en l'ampli camp de la nanotecnologia. Aquest terme es refereix a tot tipus de tecnologia (o ciència) que ocupa el rang d'escala nanomètrica (generalment < 200 nm). Aquesta és una definició molt vaga ja que es compon de moltes disciplines científiques, com ara la física, l'enginyeria, la química, la farmacologia, la biologia, la medicina i un llarg etcètera. En particular i reduint una mica l'abast d'aquesta tesi l'he duta a terme en el camp de la nanobiotecnologia, en què els sistemes sota estudi pertanyen al regne de la Biologia, que van des de les biomolècules i virus als bacteris i les cèl·lules eucariotes. I acotant encara una mica més el terme, ja que la majoria d'investigacions s'han realitzat sobre les propietats elèctriques, el terme específic seria: Nanobioelectricitat que defineix el camp de la investigació en la qual se centra aquesta tesi.

Com la majoria dels camps de la nanotecnologia, la nanobioelectricitat és un camp multidisciplinari amb aportacions de la física, la biologia, l'enginyeria elèctrica i, fins i tot, les matemàtiques. Una de les limitacions en molts grups d'investigació biofísica interdisciplinària és que massa sovint passa que la recerca consisteix en que els biòlegs proporcionin als físics o tecnòlegs mostres biològiques simples per a fer proves experimentals conceptuals enlloc d'anar a aplicacions més reals.

La investigació interdisciplinària requereix de la participació de diversos grups de recerca pertanyents a diferents àrees científiques amb l'objectiu de combinar totes dues especialitzacions per tal de resoldre problemes científics que no es poden esbrinar mitjançant l'ús dels coneixements o tècniques pertanyents als grups per separat. Aquesta definició de la interdisciplinarietat ha d'implicar l'ús de tècniques avançades de tots els grups, que combinats junts, proporcionin un valor afegit a la col·laboració.

Això és particularment cert en el cas de les nanotecnologies aplicades a la biologia, en que és realment sorprenent petita la quantitat

de nous coneixements biològicament rellevant generada mitjançant l'aplicació de les nanotecnologies a la biologia, en comparació amb les potencialitats àmpliament esmentades en articles científics.

Una de les finalitats d'aquesta tesi llavors és intentar superar algunes de les limitacions dels treballs anteriorment existents referent a la obtenció d'informació biològicament rellevant amb l'ús de nanotecnologies avançades. Per a aquest propòsit, he centrat els esforços en el desenvolupament de noves nanotecnologies per abordar les propietats elèctriques de les cèl·lules bacterianes individuals, en vista de la manca de tècniques existents per a aquest propòsit.

La investigació en cèl·lules bacterianes individuals, en comparació amb els estudis de colònies amb milions de bacteris, pot proporcionar nous i importants coneixements sobre el seu comportament. Per exemple, les cèl·lules individuals dins dels cultius microbians clonals exhibeixen una notable heterogeneïtat fenotípica, és a dir, tot i tenir el mateix contingut genètic la seva resposta al mateix entorn proporciona diferents característiques observables relacionades amb la morfologia, desenvolupament, propietats bioquímiques i fisiològiques, o comportament. L'heterogeneïtat a nivell unicel·lular és típicament emmascarat en estudis convencionals de poblacions microbianes, que es basen en les dades promitjades a través de milers o milions de cèl·lules en una mostra.

En els últims anys s'ha reconegut que els estudis de cèl·lules individuals en microbiologia poden oferir respostes a algunes preguntes científiques sense resoldre [1]. En mirar en detall els avenços aconseguits fins al moment i les tècniques utilitzades per assolir-los [2], un s'adona que la majoria dels avenços s'han produït en microorganismes amb mides relativament grans (cèl·lules de llevat, algues, amebes, etc.) d'uns 5 μm de diàmetre i per tant accessible per tècniques òptiques i tecnologies de micromanipulació convencionals a nivell de cèl·lules individuals.

Molt menys s'ha fet amb els bacteris més petits al voltant d'1 μm que es troben a la frontera de tècniques convencionals i per tant requereixen les tècniques (nanotecnològiques) més avançades. En aquest cas, la major part de les investigacions s'han dut a terme per mitjà de la Microscòpia de Força Atòmica (AFM) [3], [4], [5]. Aquesta

tècnica ha permès l'obtenció d'imatges tridimensionals de les superfícies de les cèl·lules bacterianes vives amb alta resolució espacial, així com la quantificació de l'adhesió a molècules i superfícies, l'estudi de l'efecte antibacterià de diferents compostos, proves de la transferència genètica horitzontal a través de pili conjugatiu, interaccions proteiques-ADN, etc.

Malgrat aquests resultats, encara queda molt per explorar amb la finalitat d'ajudar als biòlegs a comprendre millor les propietats de les cèl·lules bacterianes individuals. En particular, pràcticament no se sap res sobre les propietats elèctriques de les cèl·lules bacterianes amb mesures a nivell unicel·lular. Les propietats elèctriques de les cèl·lules bacterianes poden contenir informació sobre propietats cel·lulars que no es poden aconseguir mitjançant altres tècniques (per exemple, tècniques mecàniques o òptiques). Per exemple, alguns resultats han suggerit que els petits canvis en l'estructura dels bacteris (per exemple, l'expressió o no d'una determinada proteïna) poden conduir a canvis en la resposta dels bacteris a camps elèctrics alterns (dielectroforesi) [6].

L'objectiu del nostre treball és la implementació d'una metodologia basada en AFM elèctric capaç d'assignar a escala nanomètrica les propietats elèctriques intrínseques de les cèl·lules bacterianes individuals (per exemple, constant dielèctrica), la qual cosa ens permet resoldre les característiques subcel·lulars sense necessitat de marcadors biològics.

Ser capaç de mesurar la polaritzabilitat elèctrica - que indica la forma en què reacciona a un camp elèctric extern - d'una sola cèl·lula bacteriana pot donar molta informació sobre els components bioquímics del bacteri, així com sobre la seva estructura interna, obrint així noves possibilitats per als estudis analítics i noves exploracions per avaluar les seves propietats biològiques crítiques, com l'adherència, virulència o viabilitat.

Per arribar a aquesta fi he anat des d'aprendre certs fonaments de la microbiologia (per conèixer la composició (bàsica) dels bacteris, la distribució bioquímica, estructura, morfologia i metabolisme) fins exploració de tècniques avançades de microscòpia de sonda.

A partir de la meua experiència inicial en la microscòpia de força atòmica (AFM) (principalment imatges topogràfiques i algunes mesures elèctriques, bàsicament AFM en conducció), m'he especialitzat en

microscòpia de força electrostàtica (EFM), la tècnica que finalment ha estat triada ja que era la més adequada per als fins desitjats.

En particular, he contribuït a la tasca de recerca del grup per establir una nova metodologia (teòrica i experimental) sobre la base d' EFM que ens va permetre obtenir la permitivitat dielèctrica intrínseca d'objectes tridimensionals (de nanòmetres a micres). Anteriorment, la metodologia s'utilitzava principalment en pel·lícules planes (fines i gruixudes). Amb la nova tecnologia desenvolupada, i després de la seva validació amb mostres inorgàniques (amb certa similitud amb les cèl·lules bacterianes) vaig dedicar la major part dels meus esforços per adaptar l'estudi a cèl·lules bacterianes individuals.

Durant la tesi, he aplicat la metodologia desenvolupada a quatre tipus diferents de bacteris - *Lactobacillus sakei*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Listeria innocua*, tots ells de rellevància clínica o industrial. Volíem veure si les seves constants dielèctriques eren diferents i la forma en què es relacionaven. Per casualitat vam veure una gran dependència d'aquesta constant en funció de la hidratació de les cèl·lules. Així que es va proposar una explicació per relacionar els bacteris gram positius i gram negatius amb l'estat d'hidratació. La hipòtesi era que la paret cel·lular i les membranes cel·lulars podrien tenir una gran influència i nous models de nucli-escorça van ser estudiats.

He utilitzat la microscòpia de força electrostàtica quantitativa (EFM) en la meua recerca, una tècnica que el nostre grup ha desenvolupat recentment i aplicat amb èxit per mesurar les propietats elèctriques de d'objectes nanomètrics 3D com ara nanopartícules i virus. L'EFM detecta les propietats elèctriques de la cèl·lula bacteriana, incloent tota la seva regió citoplasmàtica, i així és capaç de proporcionar una gran quantitat d'informació sobre la resposta elèctrica d'un bacteri.

He estès la metodologia existent per poder-la aplicar a l'estudi dels bacteris individuals, tot tenint present el fet que els bacteris es troben en un altre rang topogràfic (al voltant del μm) respecte a capes fines, gruixudes, nanopartícules, virus, etc. Un dels principals reptes a superar durant aquesta tesi va ser en la modelització teòrica de la interacció bacteri-punta, un problema intrínsecament 3D a gran escala. Després d'una anàlisi sistemàtica de moltes configuracions diferents,

incloent algunes analíticament viables, he arribat a la conclusió que el sistema de bacteri-punta pot ser modelat amb precisió mitjançant un model 2D bastant simple que consisteix en un con truncat a una esfera tangent sobre una semi-esferoide aplanada. Aquest enfocament teòric simplificat ha estat clau per aconseguir molts dels resultats d'aquest treball de tesi.

Les noves metodologies experimentals i teòriques van ser validades primer amb una mostra dielèctrica coneguda amb altura similar als bacteris (200 nm) i de mida lateral gran (per evitar els efectes de grandària finita). El valor nominal de la constant dielèctrica del material estudiat (Si₃N₄) és de $\epsilon_r = 6-8$, que està en perfecte acord amb el valor obtingut, $\epsilon_r = 7.65$, validant així la metodologia. Aquest estudi també va servir per demostrar que dues metodologies de mesura utilitzats fins ara dins el grup, és a dir, la d'alçada constant i la basada en corbes de força - distància, donen exactament els mateixos resultats i es poden utilitzar indistintament a la nostra conveniència.

D'aquesta manera, hem quantificat la resposta de polarització elèctrica de quatre tipus de bacteris –*L. sakei*, *S. typhimurium*, *E. coli* i *L. innocua*– i s'han fet paleses diferències importants entre bacteris Gram-negatius (G-) i Gram-positius (G+). Hem obtingut constants dielèctriques de $\epsilon_r = 3-5$ (per a ambdós tipus de Gram) en ambients secs i de $\epsilon_r = 6-7$ (G-) i $\epsilon_r = 15-20$ (G+) en ambients humits. Hem proposat un model de nucli-escorça que podria explicar aquesta situació.

Com a treball complementari, hem investigat també les diferències en la modelització teòrica del EFM quantitatiu per sistemes bacterians i objectes més petits (nanopartícules, virus, ...). Hem vist que per que per a aquests últims es pot derivar una equació fenomenològica, encara que en els rangs establerts no és possible ser aplicat al cas bacteris. Una cosa similar va ocórrer amb el model de nucli-escorça, on els objectes petits poden ser aproximats per una fórmula analítica a causa que el camp elèctric generat per la sonda és aproximadament homogènia en la part que contribueix principalment a la força. És una cosa que no succeeix en els objectes més grans, com els bacteris (en el rang micromètric). Finalment arribem a la conclusió que per als petits objectes la excentricitat té un paper molt important per tant la topografia ha de ser mesurada amb precisió, mentre que en els

bacteris no és tan important , sempre que les mesures es realitzin en el seu centre. Aquesta és la raó per la qual una simetria axial d'un con truncat a una esfera tangent damunt d'una semi-esferoide aplatada pot ser utilitzada.

En conjunt els resultats obtinguts en aquest treball de tesi demostren l'enorme potencial de l'exploració elèctrica mitjançant tècniques de Microscòpia de sonda aplicades a l'estudi de cèl·lules bacterianes individuals.