

Trabajo práctico N° 1

Análisis de imágenes de biofilm obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Objetivo:

Método de cultivo de microorganismos

Para la producción de biofilm se utilizaron 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y una bacteria tipo coco) y una levadura (*Gueomyces pullulans*). Las bacterias fueron cultivadas en tubos Eppendorf en medio LB a 37 °C, mientras que la levadura fue cultivada en medio de cultivo sólido YM a temperatura ambiente.

En cajas de petri se colocaron discos de grafito y papel, se los esterilizó en autoclave (121 °C, 15 min) y se los cubrió con medio de cultivo estéril. Se inoculó una dilución 1/1000 de los microorganismos por separado en cada caja de petri. Adicionalmente se preparó un control negativo del soporte de grafito y papel (ídem a los anteriores pero sin inocular). Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C y temperatura ambiente (bacterias y levadura respectivamente) durante 48 hs.

Fijación de las muestras

Luego de las 48 hs. de incubación se retiró el medio de cultivo y se lavaron los soportes con buffer PBS 10X. Se retiró el buffer y se sumergieron los soportes en glutaraldehído 2,5% durante 15 minutos. Se retiró el fijador y se procedió a lavar los soportes con alcohol etílico en concentración de 40%, 60%, 80% durante 1 minuto. Finalmente se adicionó alcohol etílico 100% y se mantuvieron los soportes sumergidos hasta 24 hs. antes de observarlas en el microscopio electrónico de barrido (Phillips 515).

Preparación de la muestra para SEM

Los soportes fueron colocados en el portaobjetos del SEM y rotulados. Se imprimaron todos los soportes con una capa de oro en vacío.

Actividad

- Se dividirá a los participantes del curso en 5 grupos y se les asignará un soporte con biofilm que observarán en el microscopio electrónico de barrido.
- Cada grupo deberá observar la muestra, seleccionar y fotografiar áreas a distintas magnificaciones de modo tal de poder caracterizar y comparar con las otras muestras el biofilm en observación. Se deberá registrar la magnificación y nombrar adecuadamente los archivos de las imágenes.
- Retornar al aula para el análisis grupal de los resultados obtenidos.

Bibliografía

- Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(4):847–867.
- Goodhew PJ, Humphreys J, Beanland R (2001) Electron microscopy and analysis. Third Edition, Taylor & Francis, London UK. 251 pp.
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology* **8**(9):623–633.