

Evaluación de biofilms en modelo dinámico

Planificación del ensayo

Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Semana 1	Armado de sistema Inóculos	24 hs tinción Observación al Confocal	48 hs tinción Observación al Confocal	72 hs tinción Observación al Confocal	Análisis de imágenes

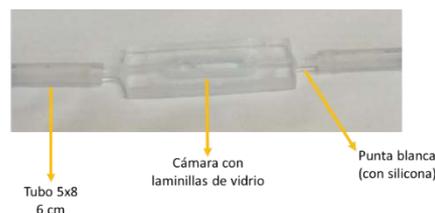
Protocolo de biofilms en sistema de flujo

Materiales estériles

- Caldo LB
- PBS
- 2 Kitasato conectados por el pico inferior a un tubo de 30 cm, conectado a una llave de paso y a un tubo de 7 cm
- Tubos de bomba peristáltica
- Tubos de 6 cm y de 4 cm



- Cámara con laminillas de vidrio pegadas en parte superior e inferior, y puntas blancas en sus extremos. La corona de cada punta se une a un tubo de 6 cm



- Tubos de descarte (60-80 cm de largo)
- Botellas de 1 L para descarte, cerradas con papel aluminio y papel

- Conectores envueltos de forma individual:

- x4: Conector blanco de 4 mm



- x4: Conectores azules con tuerca en el medio

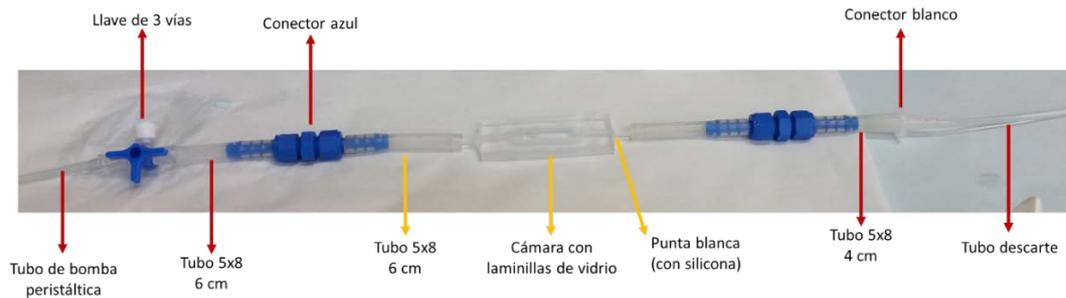


- x4: Conectores azules solos para reconectar la cámara (día 2)

Armado del sistema

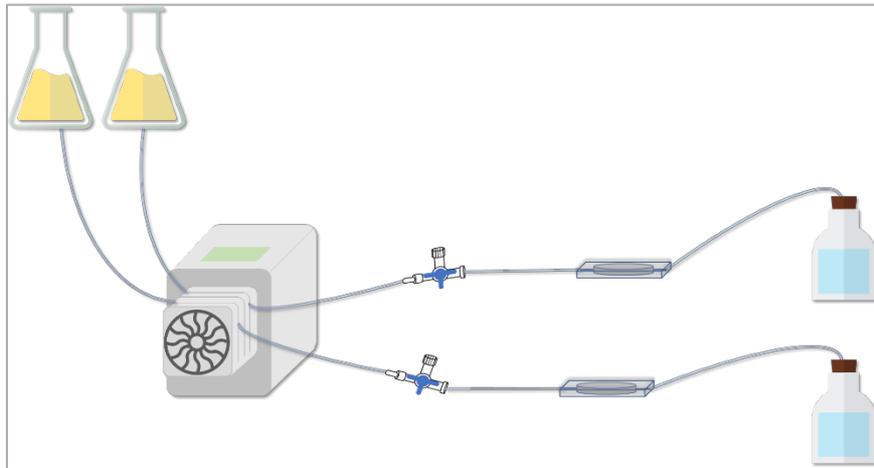
*Trabajar con guantes y en cabina de flujo laminar

1. Desenrollar el tubo del Kitasato, unir el tubo al conector blanco y este al tubo de la bomba peristáltica
2. Colocar en el otro extremo del tubo de la bomba peristáltica una llave de 3 vías nueva (cerrada, no se reutiliza)
3. Desenrollar la cámara, colocar un conector azul junto con un tubo de 5x8 de 6 cm del lado izquierdo. Unir el tubo en la llave de 3 vías
4. En el lado derecho, unir un conector azul a un tubo de 5x8 de 4 cm y a éste un conector blanco al cual se le une luego el tubo de descarte



5. Con las llaves de paso cerradas, colocar el medio de cultivo en el Kitasato (1 L en cada uno)
6. Llevar a la mesada y colocar los Kitasato elevados
7. Colocar el tubo de la bomba en uno de los carretes de la bomba peristáltica
8. Colocar el extremo libre de los tubos de descarte en la botella de descarte correspondiente
9. Numerar las cámaras

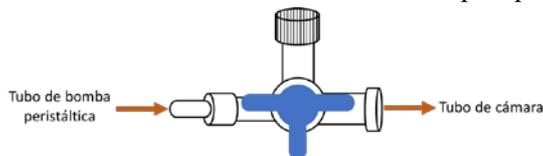




Esquema del sistema armado

Inicio del flujo y preparación del inóculo

1. Abrir las llaves de paso de los Kitasato
2. Abrir también la llave de 3 vías, ver que quede abierta solo en un sentido



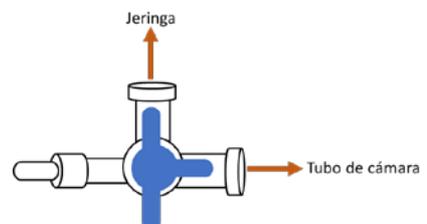
3. Prender la bomba peristáltica, poner el carretel en el 4^{to} tope y setearla en 1,5
4. Asegurarse que las cámaras se llenen de medio de cultivo y que comience el descarte. El sistema tiene que quedar completamente lleno, sin burbujas

5. Inóculo

- Microorganismo bacteriano

- Preparar una suspensión de la cepa con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland en PBS.
- Volumen: Al menos 6 mL para cada cámara
- Preparar en la cabina de flujo laminar y ahí mismo colocar la suspensión en una jeringa

6. Inocular cada cámara a través de la llave de 3 vías con una jeringa estéril. Asegurarse que la llave esté abierta hacia la entrada y hacia la cámara, y cerrada hacia la bomba (para que vaya solo en dirección de la cámara). Llenar completamente la cámara con el inóculo e **incubar 1 hora**. No quitar la jeringa ni mover la llave



7. Pasado el tiempo de incubación, poner a funcionar nuevamente el sistema, con la bomba en el 4^{to} tope y seteada en 1,5.
Medir el flujo durante 15 minutos. El flujo debería ser de 0,5 - 0,6 mL/min.

Dejar el sistema funcionando durante 24 horas.

Sabiendo que el flujo debe ser de 0,5 - 0,6 mL/min, calcular el volumen de medio de cultivo necesario para 12, 24, 48 y 72 horas:

Tiempo (h)	Tiempo (min)	Volumen (mL)
12 h		
24 h		
48 h		
72 h		

Tinción y visualización

1. Detener la bomba y cerrar la llave de paso
2. Registrar el volumen de los descartes: **calcular el flujo**
3. Pasar lentamente por cada cámara con una jeringa 6 - 8 mL de PBS para eliminar las células planctónicas
4. Pasar por cada cámara una solución de 6 - 7 mL de naranja de acridina 1/100 de 1 mg/mL e incubar 30 minutos
5. Desconectar las cámaras, y cerrarlas por los extremos con una punta sellada con silicona, sin que se escape la solución de naranja de acridina
6. Observar en **microscopio laser confocal**
 - Settings: Paola Biofilm (Zeiss). Canal verde AF514

Reconexión de las cámaras

1. Quitar las puntas de cada cámara
2. Desconectar los tubos de 6 cm de los lados de las cámaras y el conector azul al que están unidos
3. Conectar a la cámara un tubo nuevo y estéril con punta blanca, pegar con silicona
4. Conectar con un conector azul estéril
5. Cambiar las botellas de descarte
6. Al lado del mechero, rellenar uno de los Kitasato con medio LB fresco y al otro quitarle todo el volumen y ponerle medio LB con antibiótico
7. Reiniciar el flujo, cuidando que quede el sistema completamente lleno y sin burbujas