

Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Formación de biofilms	Cultivo de mo en medio sólido	Pre-inóculo	Inóculo	24 hs-CV	48 hs-CV
Inhibición	Pre-inóculo	Inóculo + antimicrobiano	24 hs	48 hs-CV	
Erradicación	Pre-inóculo	Pre-inóculo	24 hs	48 hs-cambio de medio/adición antimicrobiano	24 hs-CV

Evaluación de biofilms estáticos

Planificación del ensayo

- a. Formación de biofilms
- b. Inhibición de la formación de biofilms
- c. Erradicación de la formación de biofilms

Microorganismos a estudiar:

El que uno desee ensayar (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, etc).

Si uno no conoce la capacidad de formación de biofilms de su microorganismo de estudio, lo primero es realizar el ensayo de formación de biofilms, evaluando distintos medios de cultivo así como distintos tiempos de formación de biofilms. Una forma de establecer cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo a su capacidad de formar biofilms lo estableció Villegas et al., 2013.

Experimento 1: Cuantificación de la biomasa de biofilms.

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 hs a la temperatura de crecimiento (37°C por ej.)
2. En una placa de 96 pocillos, colocar 150 µl de medio líquido. A partir del cultivo fresco en medio sólido, tomar de a una colonia y resuspender en cada pocillo. Incubar 24hs a 37°C. 
3. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria. 
4. En otra placa de 96 pocillos, colocar 180 µl de medio líquido, tomar de los pre-inóculos 20 µl y colocarlos en cada pocillo (realizar triplicados de cada

microorganismo a ensayar). Dejar al menos 3 pocillos solo con medio líquido para control negativo. Incubar 24 a 48 hs a 37°C sin agitación.

5. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
6. Remover suavemente las bacterias planctónicas.
7. Realizar 3 lavados con PBS
8. Teñir las bacterias adheridas y el biofilm con una solución de cristal violeta al 0,1 %, poner 200 µl de CV en cada pocillo, incubar 15 minutos.
9. Remover el exceso de colorante mediante lavados con PBS (hasta que no salga más color).
10. Solubilizar el CV agregando etanol 95%. Agitar suavemente. Medir la absorbancia a 590 nm.
11. Si es necesario realizar una dilución 1/10 en etanol y volver a medir.
12. Análisis de datos.

Experimento 2: Inhibición de la formación del biofilms por efecto de antimicrobianos/moléculas/extractos/etc.

Procedimiento para determinar el efecto de distintos antimicrobianos o moléculas sobre el biofilm de 48 hs. Basado en Blango y Mulvey, 2010.

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 hs a la temperatura de crecimiento (37°C por ej.)
2. En una placa de 96 pocillos, colocar 150 µl de medio líquido. A partir del cultivo fresco en medio sólido, tomar de a una colonia y resuspender en cada pocillo. Incubar 24hs a 37°C. 
3. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria.
4. En otra placa de 96 pocillos, adicionar los 180 µl de medio líquido con las moléculas/antimicrobianos/etc que uno quiera ensayar en la concentración a estudiar. Tomar de los pre-inóculos 20 µl y colocarlos en cada pocillo (realizar triplicados). En este caso los blancos sin bacterias tienen que realizarse con las moléculas a evaluar. Se debe además colocar medio sin moléculas para usar como control positivo, ya que en estos pocillos si se va a formar el biofilm. 
5. Incubar 24 a 48 hs a 37°C sin agitación.
6. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
7. Remover suavemente las bacterias planctónicas.
8. Realizar 3 lavados con PBS
9. Teñir las bacterias adheridas y el biofilm con una solución de cristal violeta al 0,1 %, poner 200 µl de CV en cada pocillo, incubar 15 minutos.

10. Remover el exceso de colorante mediante lavados con PBS (hasta que no salga más color). 
11. Solubilizar el CV agregando etanol 95%. Agitar suavemente. Medir la absorbancia a 590 nm.
12. Si es necesario realizar una dilución 1/10 en etanol y volver a medir.
12. Análisis de datos.

Experimento 3: Erradicación de biofilms por efecto de antimicrobianos/moléculas/extractos/etc.

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 hs a la temperatura de crecimiento (37°C por ej.)
2. En una placa de 96 pocillos, colocar 150 µl de medio líquido. A partir del cultivo fresco en medio sólido, tomar de a una colonia y resuspender en cada pocillo. Incubar 24hs a 37°C. 
3. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria.
4. En otra placa de 96 pocillos, colocar 180 µl de medio líquido, tomar de los pre-inóculos 20 µl y colocarlos en cada pocillo (realizar triplicados de cada microorganismo a ensayar). Dejar al menos 3 pocillos solo con medio líquido para control negativo. Incubar 24 hs a 37°C sin agitación.
5. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
6. Remover las bacterias planctónicas , realizar 3 lavados con PBS
7. Adicionar los 180 µl de medio líquido con las moléculas/antimicrobianos/etc que uno quiera ensayar en la concentración a estudiar.
8. Incubar 24 hs a 37°C.
9. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
10. Remover suavemente las bacterias planctónicas.
11. Realizar 3 lavados con PBS
12. Teñir las bacterias adheridas y el biofilm con una solución de cristal violeta al 0,1 %, poner 200 µl de CV en cada pocillo, incubar 15 minutos.
13. Remover el exceso de colorante mediante lavados con PBS (hasta que no salga más color). 
14. Solubilizar el CV agregando etanol 95%. Agitar suavemente. Medir la absorbancia a 590 nm.
15. Si es necesario realizar una dilución 1/10 en etanol y volver a medir.
16. Análisis de datos.

Formato de placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Formato de placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												