

MICROSCOPIA DE EXPANSION EN BACTERIAS Y BIOFILMS

Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (SCIAN-Lab)

Programa de Biología Integrativa; Instituto de Neurociencia Biomédica

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

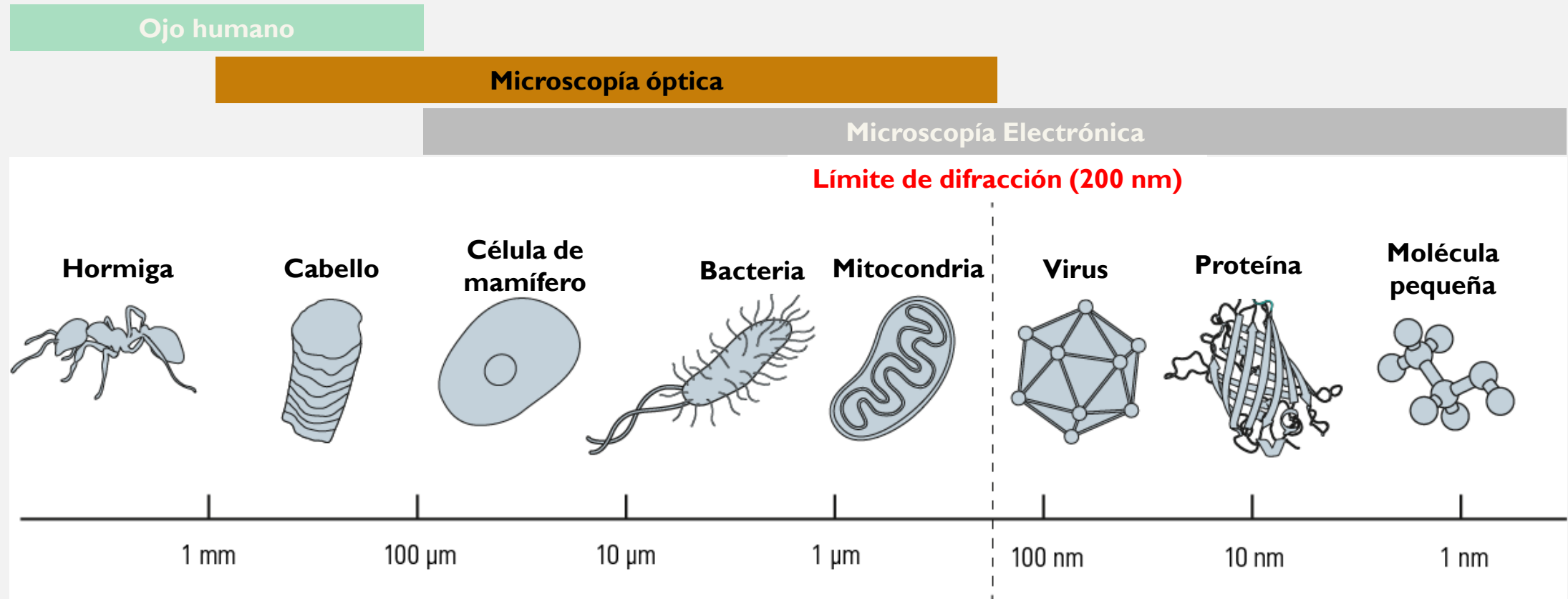
Microscopía para el Estudio de Biofilms Bacterianos, Octubre 2023

Contenidos de la charla

- Definición y relevancia de la técnica
- Fundamento y características generales
- Algunas variantes y aplicaciones
- Ventajas y desventajas
- Aplicación en modelo de *Proteus mirabilis*

La microscopía óptica está limitada por la difracción de la luz

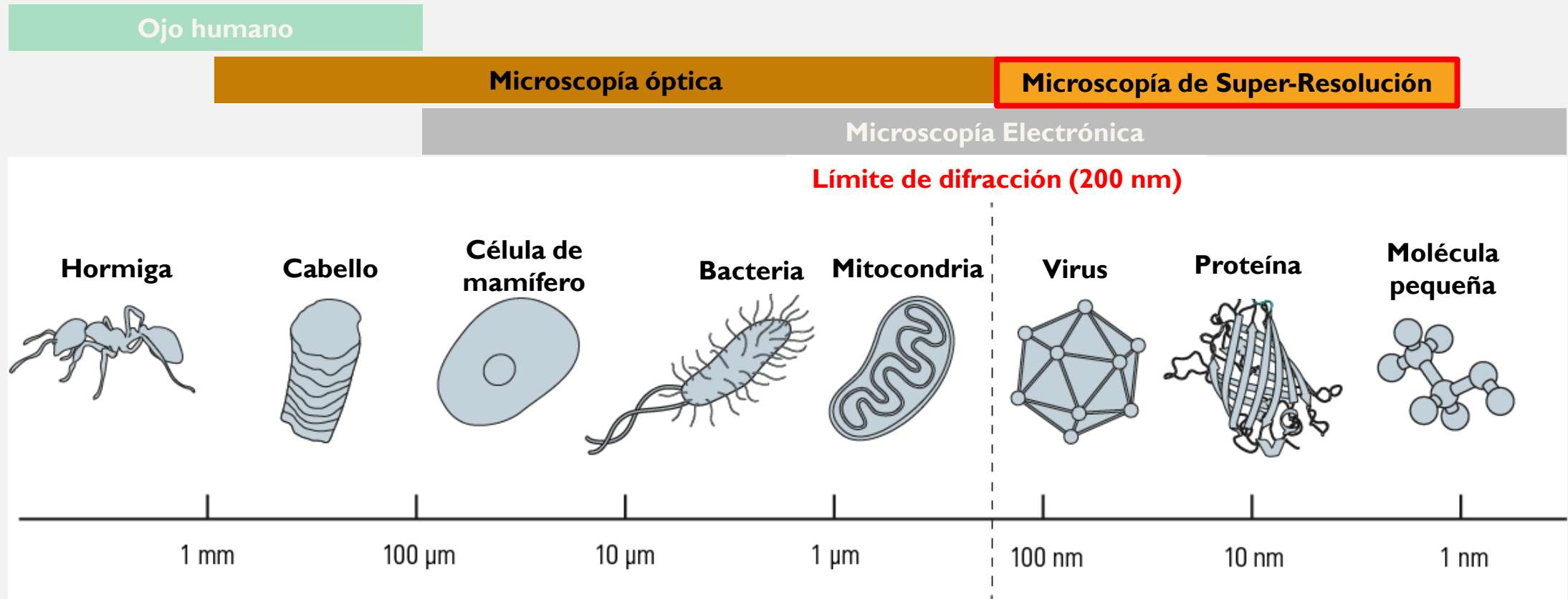
Tamaños de varias entidades biológicas y el límite de difracción:



Modificado de ilustración por Johan Jarnestad / The Royal Swedish Academy of Sciences (2014).

La microscopía óptica está limitada por la difracción de la luz

Tamaños de varias entidades biológicas y el límite de difracción:



Modificado de ilustración por Johan Jarnestad / The Royal Swedish Academy of Sciences (2014).

La microscopía óptica está limitada por la difracción de la luz

Las técnicas de Super-Resolución superan el límite de resolución por difracción, conservando ventajas valiosas de la microscopía óptica, como la especificidad de color y el alto contraste del blanco biológico.

Referentes clásicos:

- Microscopía de iluminación estructurada (**SIM**)
- Microscopía de depleción estimulada de emisión (**STED**)
- Microscopía de localización foto-activada (**PALM**)/ Microscopía de reconstrucción óptica estocástica (**STORM**)

Ho... Peero...

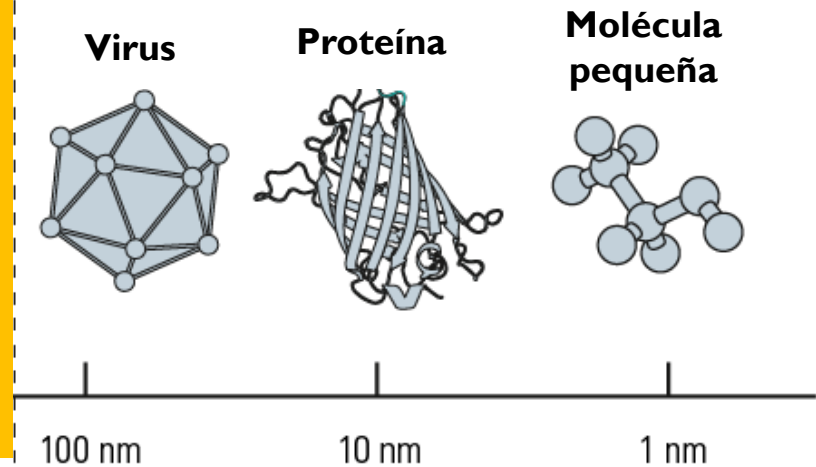
- Altos costos.
- Necesidad de personal/equipo altamente especializado.
- Limitaciones en capacidad multicolor, de visualización en profundidad, largos tiempos de adquisición, etc.

límite de difracción:

Microscopía de Super-Resolución

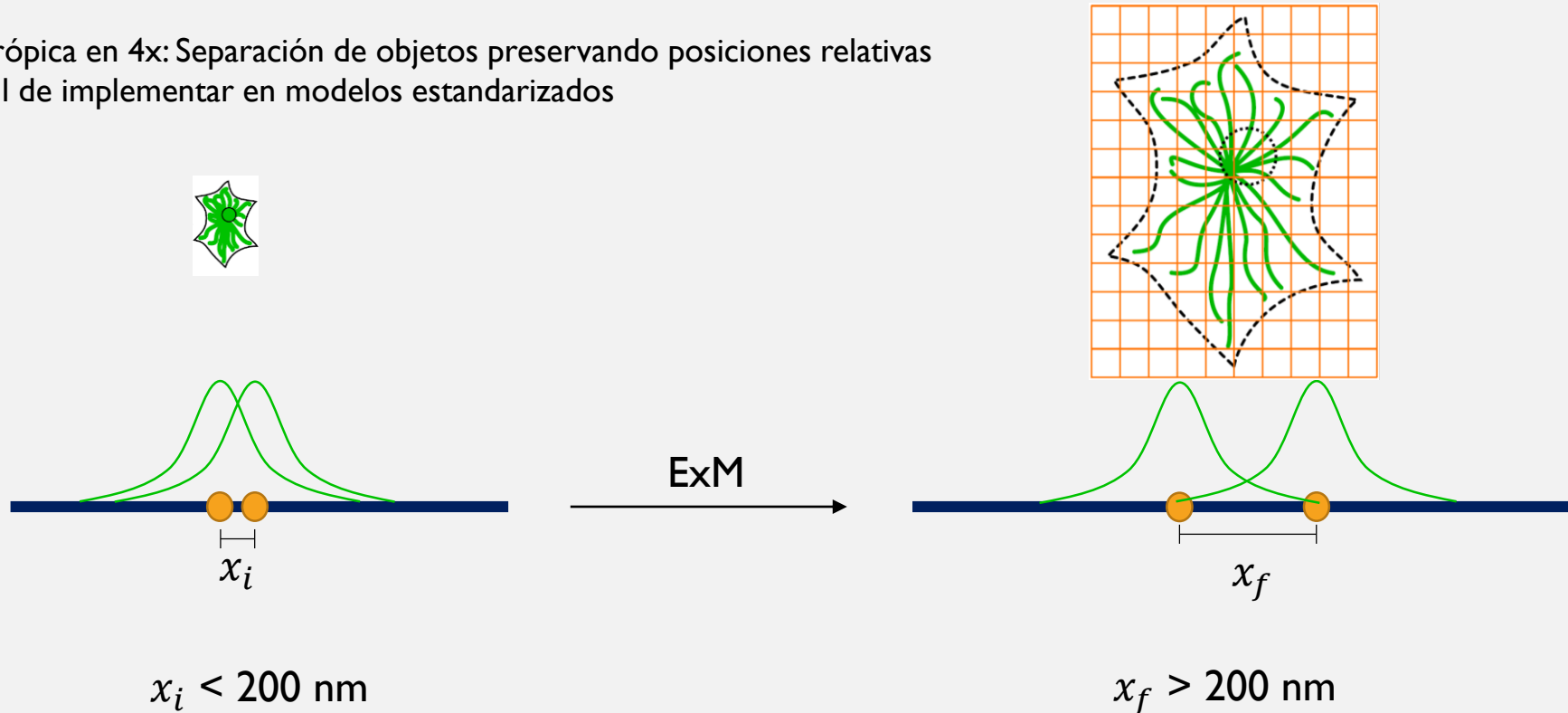
Microscopía Electrónica

límite de difracción (200 nm)



Microscopía de Expansión (ExM)

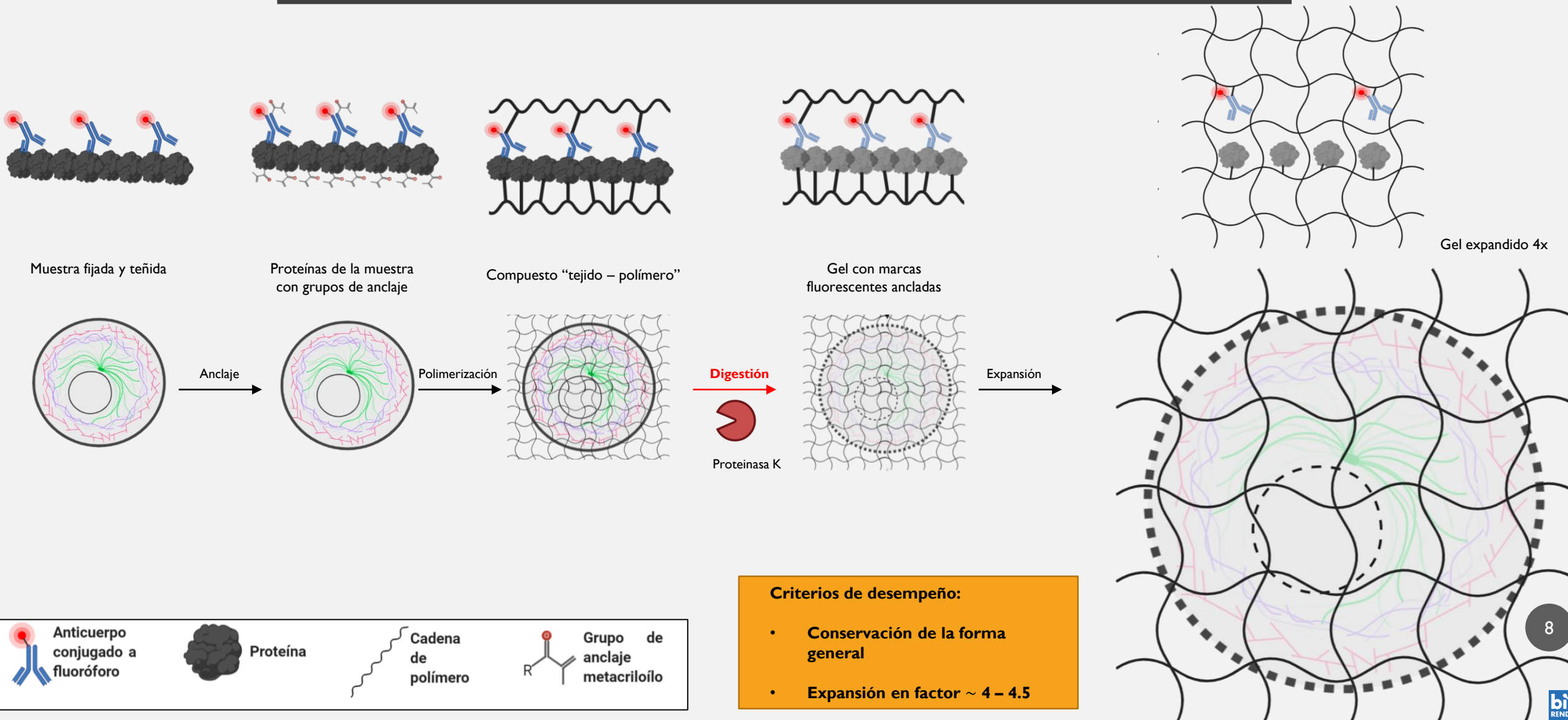
- Expansión isotrópica en 4x: Separación de objetos preservando posiciones relativas
- Accesible y fácil de implementar en modelos estandarizados



Microscopía de Expansión (ExM)

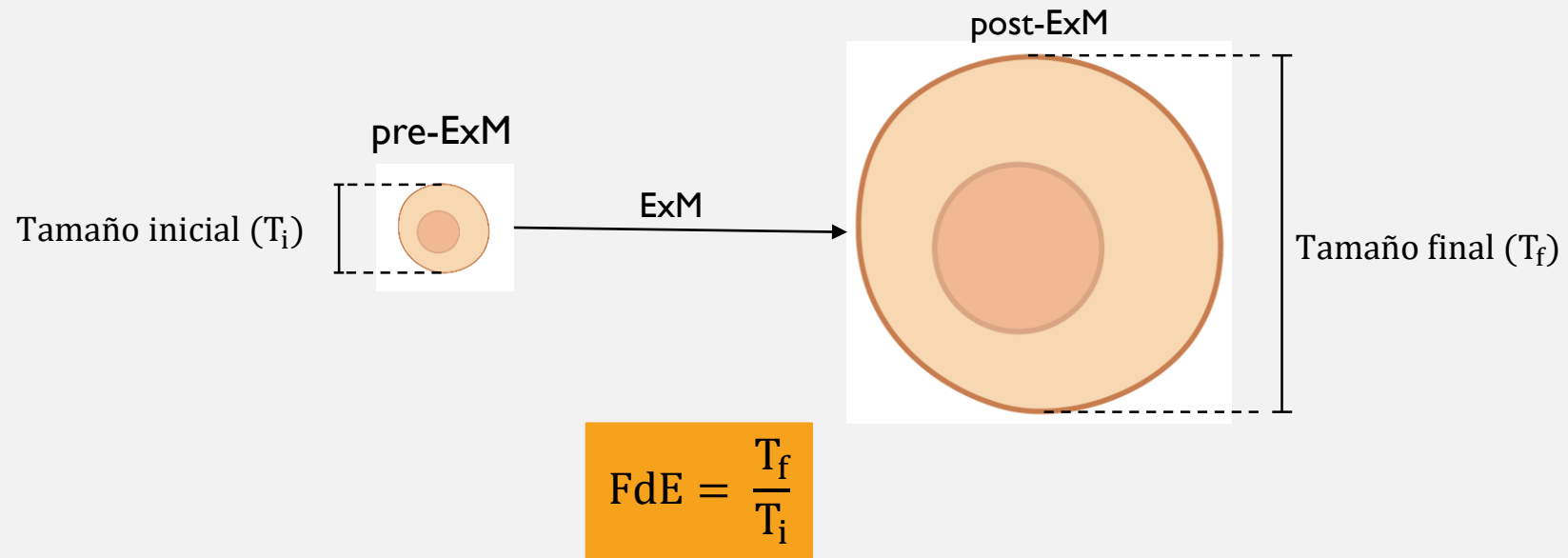
En términos generales, la técnica parte por la etiquetación fluorescente de una muestra mediante métodos tradicionales, luego estas etiquetas se anclan a un hidrogel iónico hinchable que se polimeriza a través y alrededor de la muestra. Luego se degrada todo el material biológico que no es de interés, y finalmente, mediante diálisis en agua, el gel se expande, arrastrando consigo las marcas fluorescentes que habían en la muestra.

Procedimiento de ExM “estándar” (Chozinski *et al.* 2016)



Cómo se calcula el factor de expansión (FdE)

El desempeño de un experimento de ExM se puede evaluar parcialmente* por el FdE obtenido



- Razón entre tamaño post-ExM (T_f) y pre-ExM (T_i).
- Se requiere medir un descriptor morfológico de tamaño (longitud, perímetro, área, volumen u otro).
- Si se miden descriptores con unidades de área o de volumen, hay que contemplar las raíces cuadradas o cúbicas, respectivamente.

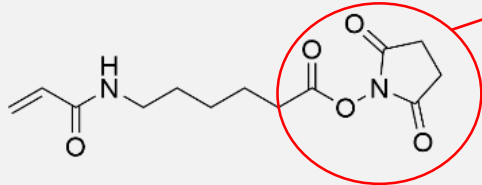
¿Cómo se conservan los blancos de interés en la muestra?

- En el paso de anclaje, a los blancos de interés se les confiere un grupo funcional capaz de participar de la polimerización vía radicalaria de la red de polímero iónico, uniéndolos covalentemente al hidrogel expansible.
- Los métodos más comunes hoy en día son el anclaje de proteínas y de ácidos nucleicos
- Con el tiempo se han ido desarrollando métodos para permitir la visualización de lípidos. También se han desarrollado métodos de anclaje más sofisticados que son compatibles con varios tipos de biomoléculas.

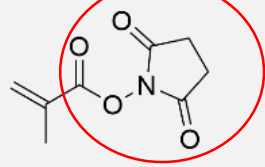
ExM con anticuerpos comunes y proteínas fluorescentes / ExM de retención de proteínas (proExM): anclaje de proteínas

Moléculas de anclaje de proteínas:

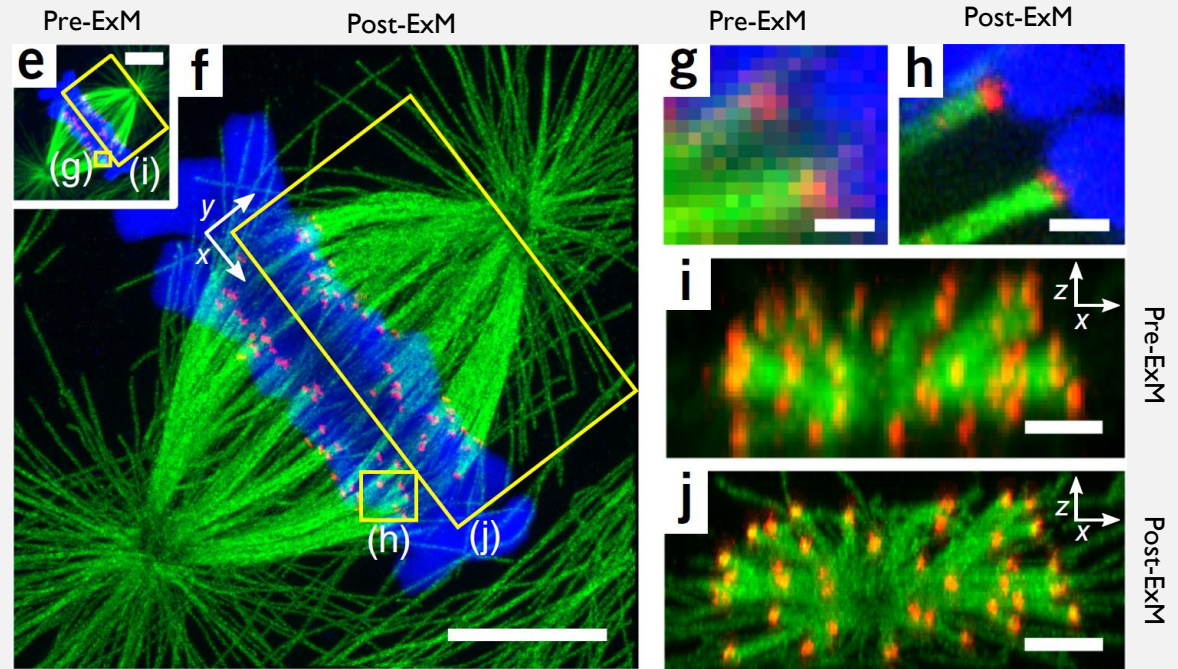
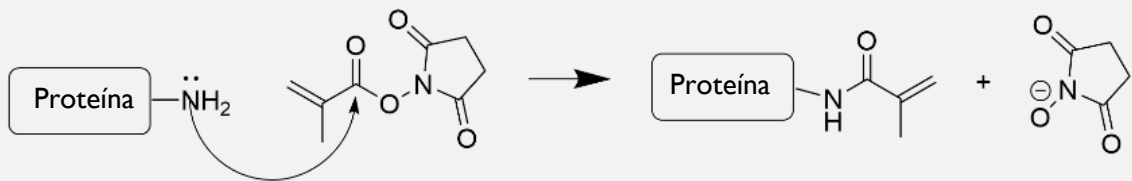
Éster activado frente a sustitución nucleofílica



Ester succinimídico de ácido 6-((acrilil)amino) hexanoico
Acriloilo-X, SE
AcX



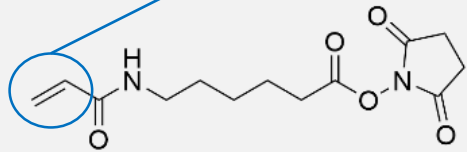
N-(Metacrililoiloxi)succinimida
Ester succinimídico de ácido metacrílico
MA-NHS



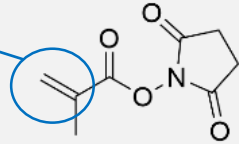
Modificado de Chozinski *et al.* (2016). Barras de escala: 5 μm (e, f); 0.5 μm (g, h); 2 μm (i, j)

ExM con anticuerpos comunes y proteínas fluorescentes / ExM de retención de proteínas (proExM): anclaje de proteínas

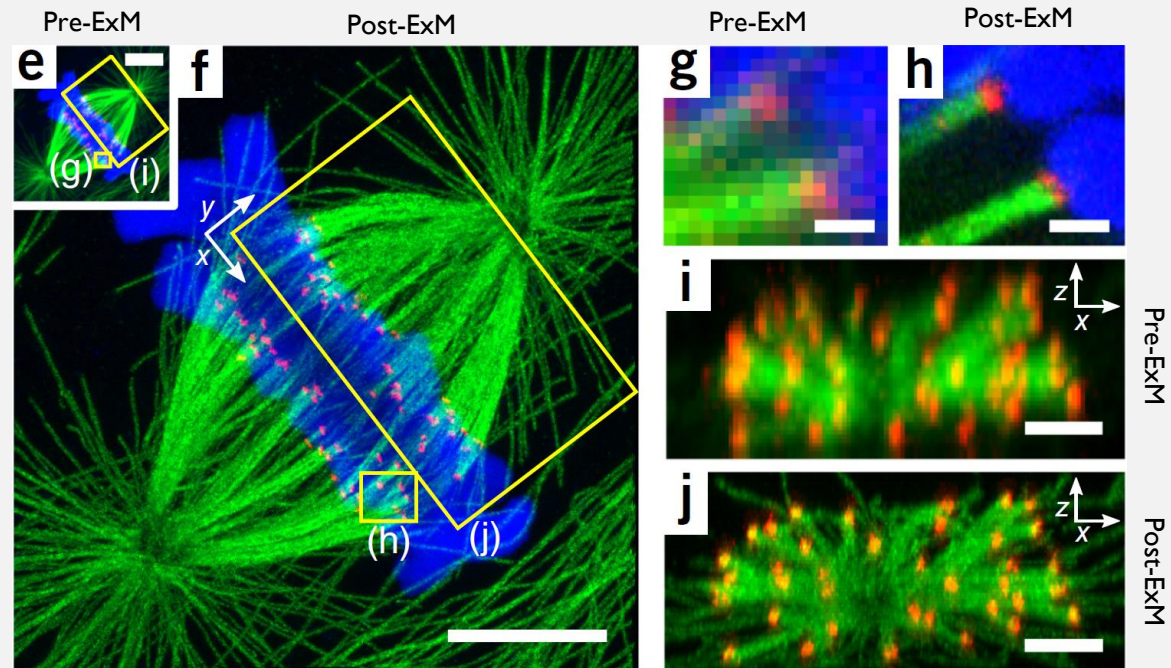
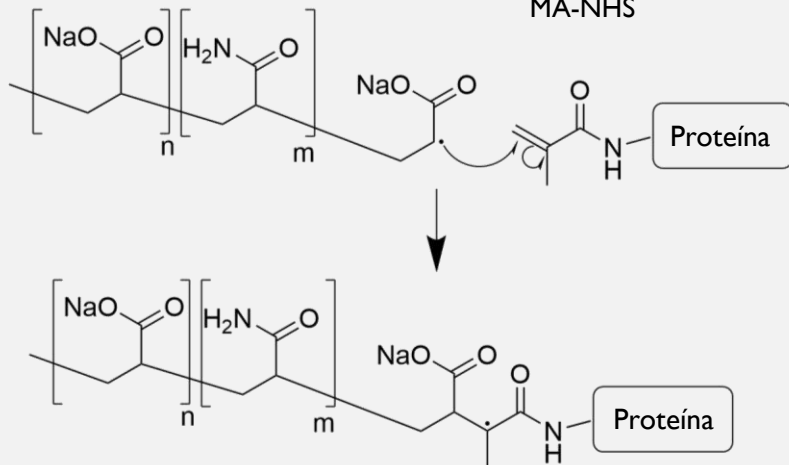
Doble enlace reactivo frente a ataque de radical libre



Ester succinimídico de ácido 6-((acrililoil)amino) hexanoico
Acriloilo-X, SE
AcX



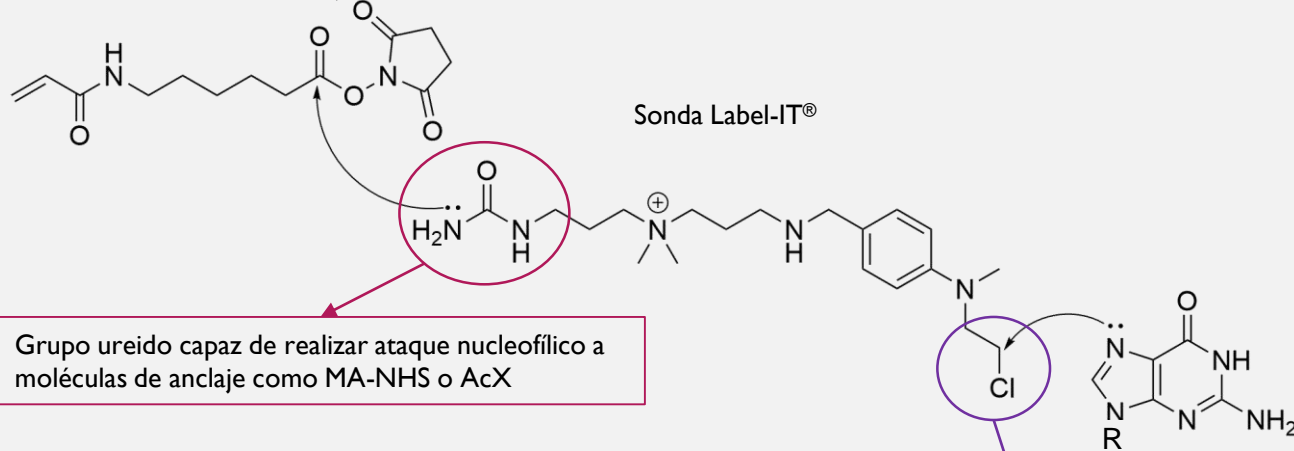
N-(Metacrililoiloxi)succinimida
Ester succinimídico de ácido metacrílico
MA-NHS



Modificado de Chozinski *et al.* (2016). Barras de escala: 5 μm (e, f); 0.5 μm (g, h); 2 μm (i, j)

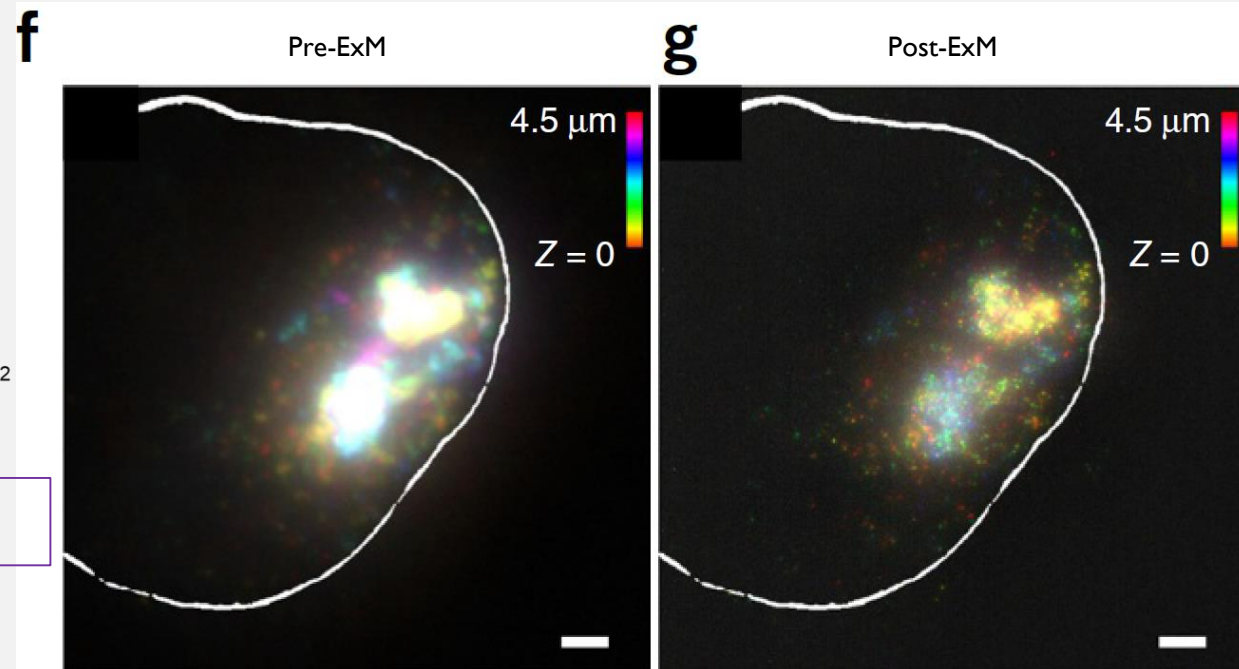
ExM de hibridación fluorescente *in situ* (ExFISH): anclaje de ARN y ADN

Molécula de anclaje de ácidos nucleicos:



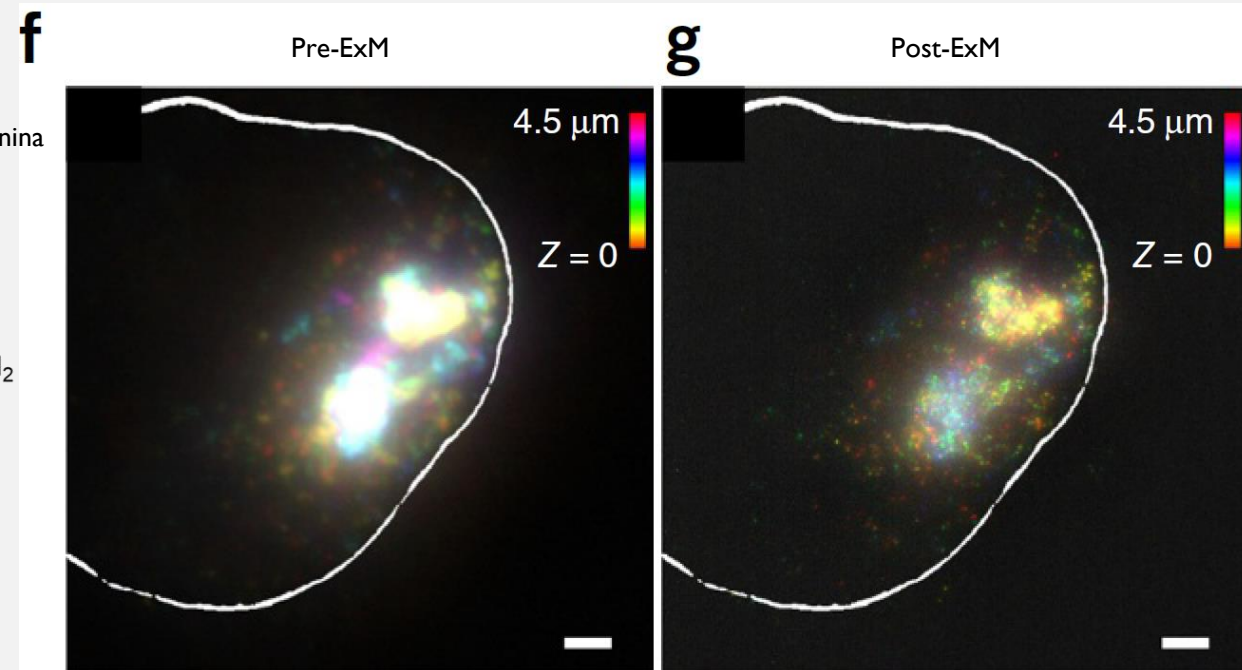
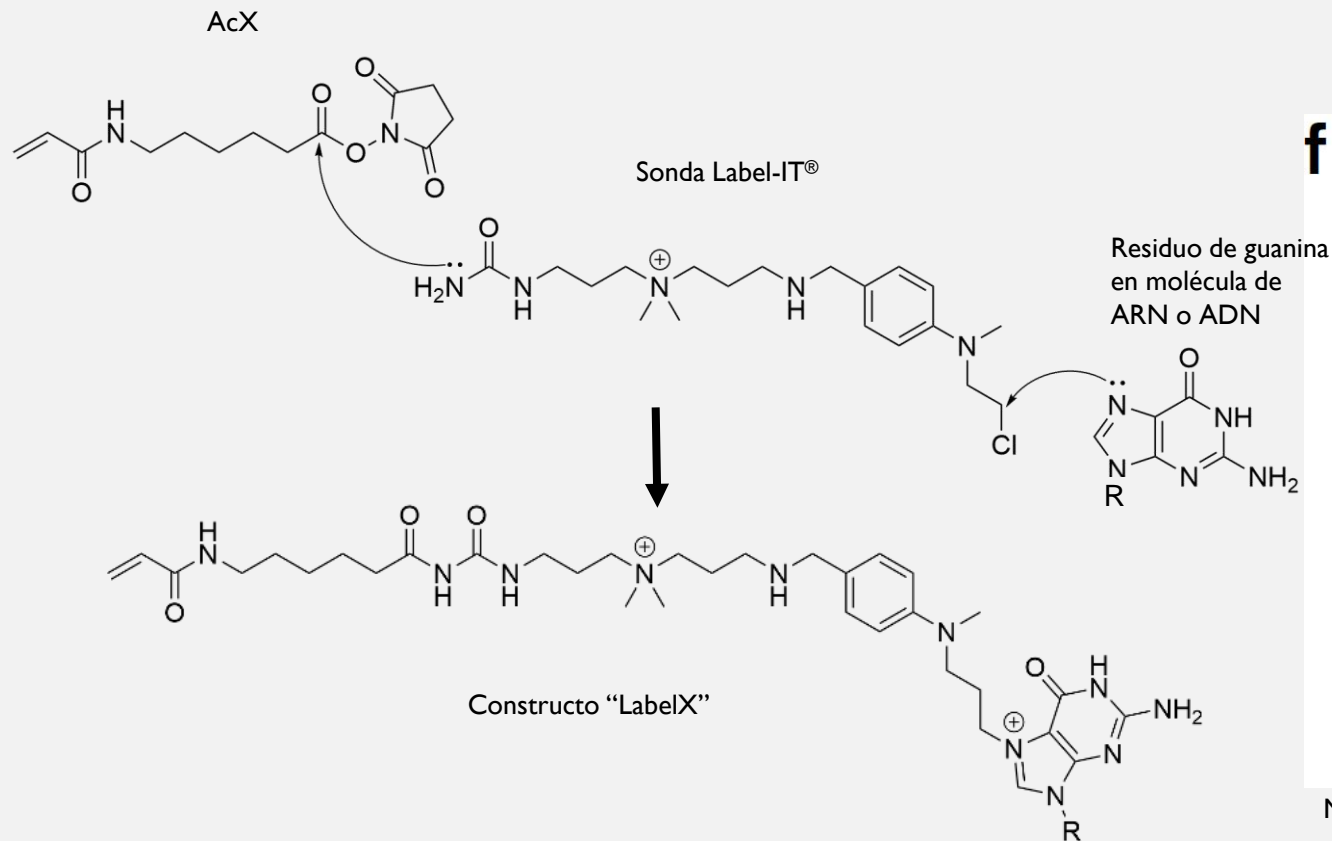
Grupo ureido capaz de realizar ataque nucleofílico a moléculas de anclaje como MA-NHS o AcX

Grupo alquilo reactivo frente a ataque nucleofílico por bases nitrogenadas



Modificado de Chen *et al.* (2016). Barras de escala: 2 μm

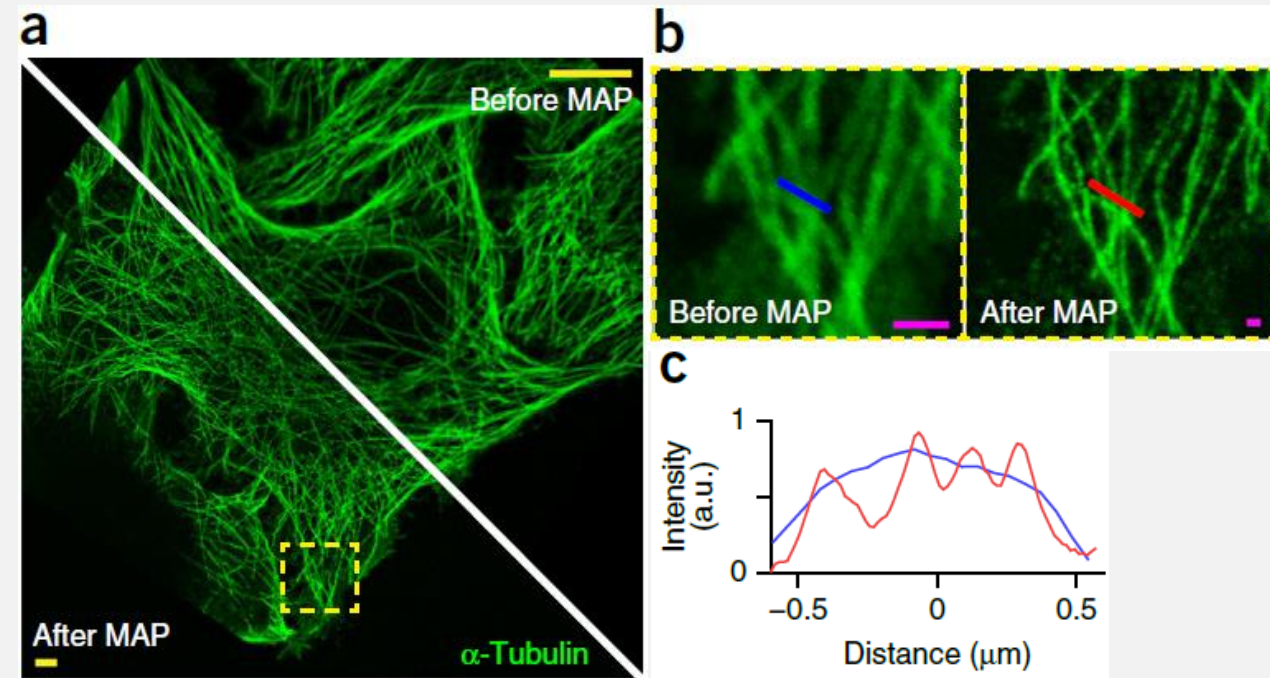
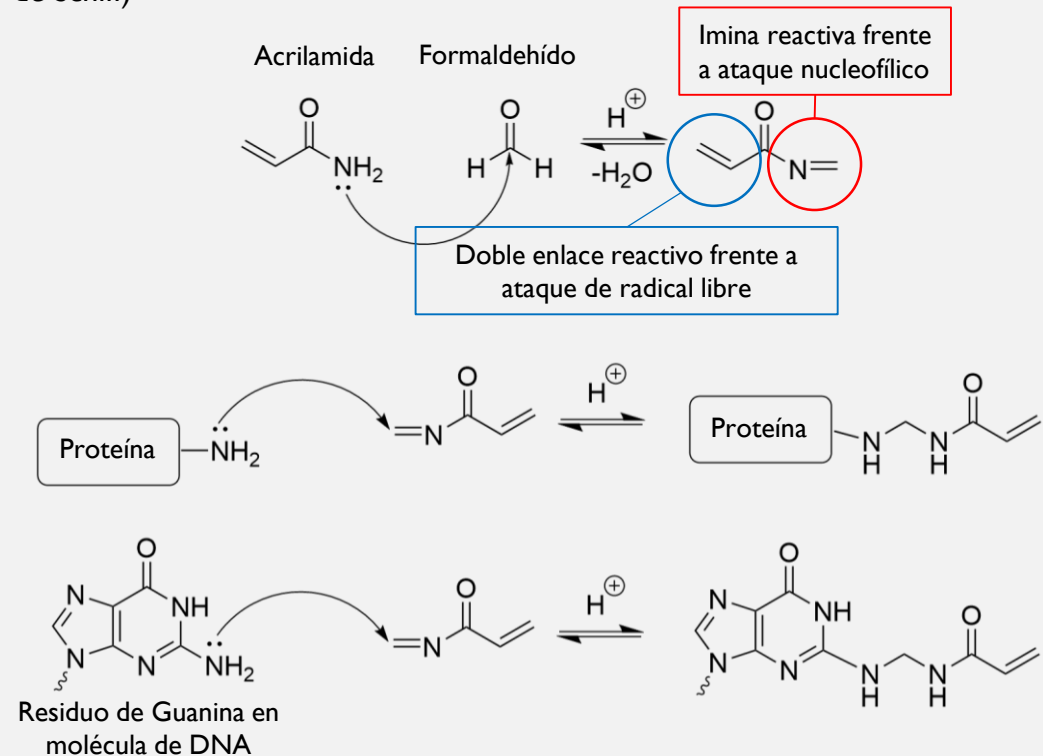
ExM de hibridación fluorescente *in situ* (ExFISH): anclaje de ARN y ADN



Modificado de Chen *et al.* (2016). Barras de escala: 2 μm

Análisis Magnificado del Proteoma (MAP): anclaje simultáneo de proteínas y ácidos nucleicos

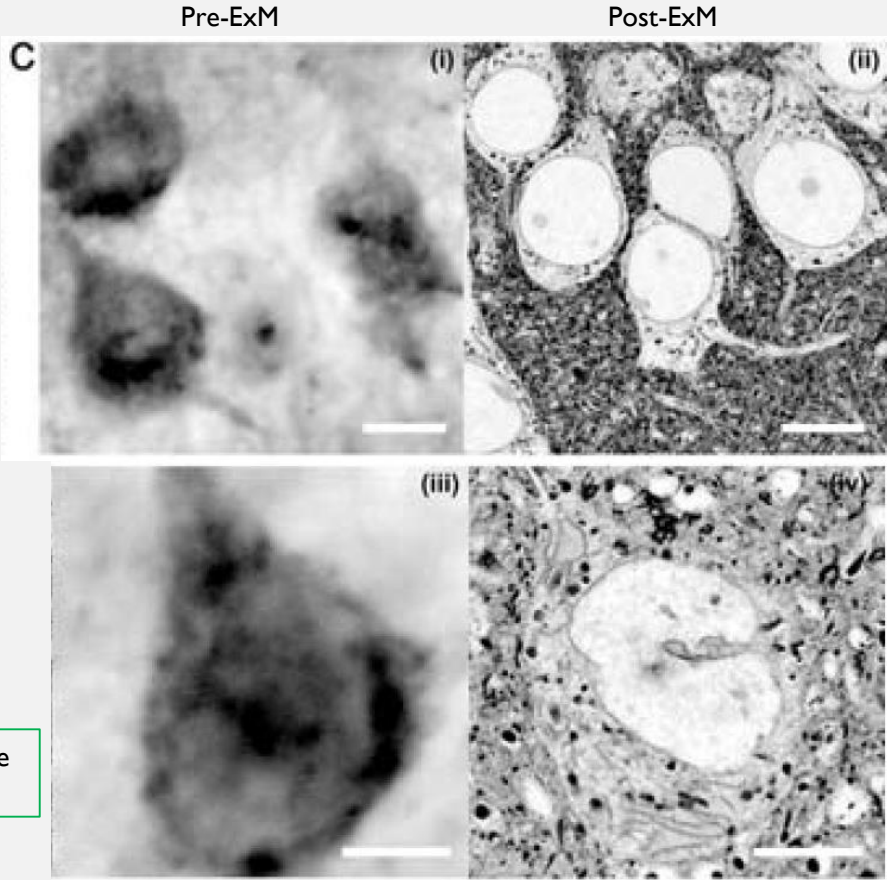
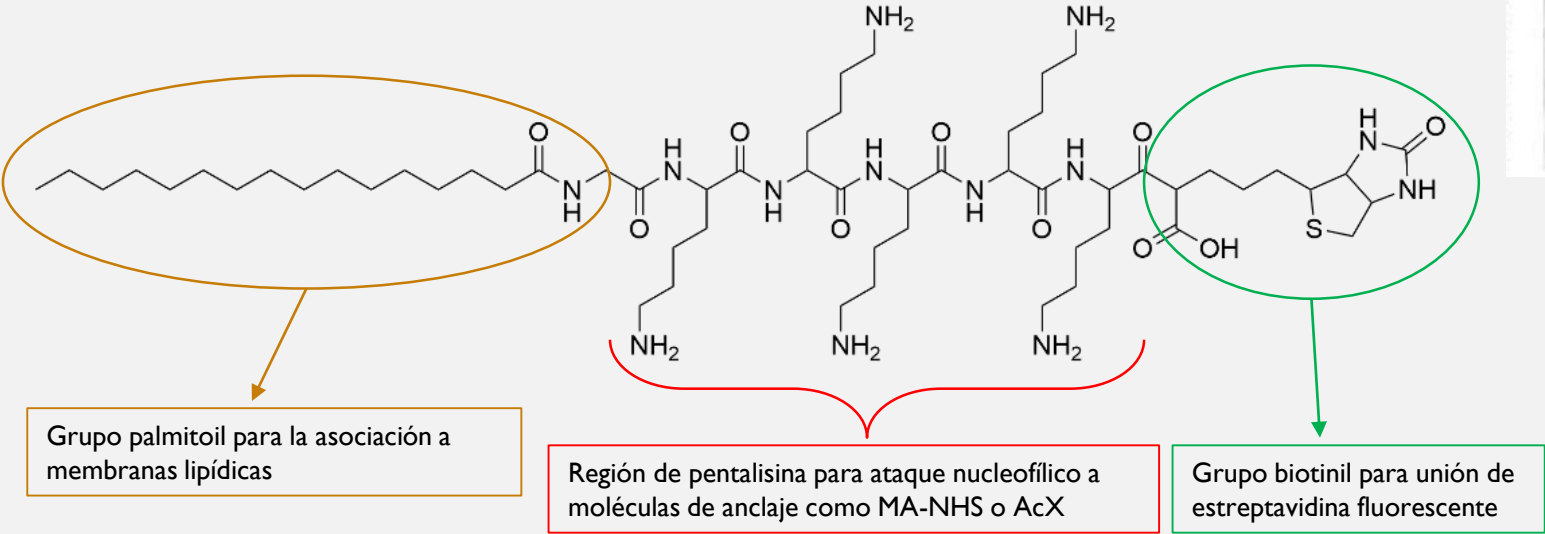
Anclaje simultáneo de proteínas y ácidos nucleicos mediante reacción con imina (base de Schiff)



Modificado de Ku *et al.* (2016). Barras de escala: 10 μm (a); 1 μm (b).

membraneExM (mExM): visualización de membranas lipídicas

Sonda anfipática "pGk5b" (palmitoyl-glicina-pentilisina-biotina):

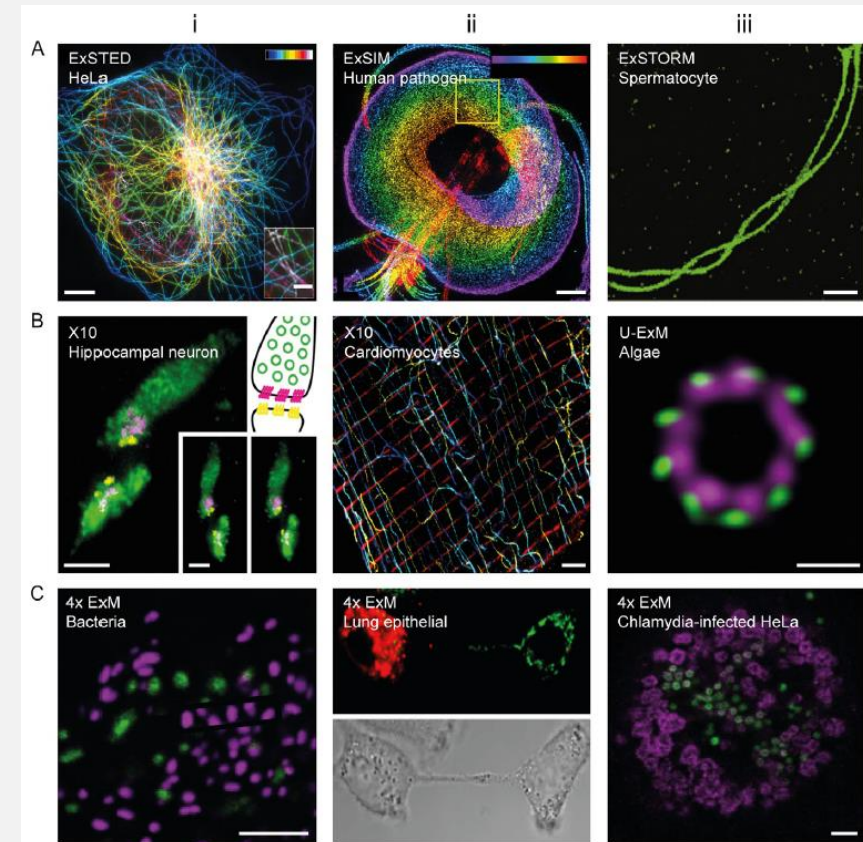


Modificado de Kariagiannis et al. (2019). Barras de escala: 10 μm (i y ii); 5 μm (iii y iv)

Existen múltiples variantes de ExM

Según...

- **Tipo de biomoléculas que permiten visualizar:** ExM estándar (con MA-NHS o AcX); Protein retention ExM (proExM); Expansion FISH (ExFISH); Membrane ExM (mExM); Magnified Analysis of the Proteome (MAP), Bulk proteome labelling ExM (pan-ExM); Chromatine ExM (chromExM); etc.
- **Naturaleza del proceso de homogeneización de las propiedades mecánicas del material biológico:** Uso de digestión proteolítica con proteasa K (como ExM estándar y otros) vs denaturación de proteínas con detergentes iónicos, agentes caotrópicos y/o temperatura (proExM; MAP; pan-ExM; etc).
- **Factor de expansión (y resolución) alcanzable:** Iterative ExM (iExM, alcanza expansión 20x); X10 ExM (alcanza expansión 10x); pan-ExM (alcanza expansión 16x).
- **Estructura molecular del polímero expansible (nivel de isotropidad de expansión):** Ultrastructure ExM (U-ExM); Tetra-gel ExM.
- **Combinación de ExM con otras técnicas de microscopía óptica:** Structured illumination ExM (ExSIM); Stimulated emission depletion ExM (ExSTED); Single molecule localization ExM (ExSMLM); Enhanced ExM (EExM); etc.
- **Naturaleza del espécimen que se desea estudiar mediante ExM:** ExM for microbes (μ ExM); ExM in plants.



En este review metodológico sobre EExM se registran todas las variantes de ExM existentes hasta el 2021: Sheard, T., & Jayasinghe, I. (2021). Enhanced expansion microscopy to measure nanoscale structural and biochemical remodeling in single cells. *Methods in cell biology*, 161, 147–180. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.04.019>

Modificado de Sheard & Jayasinghe (2021). Barras de escala: 4 μ m, inserto 1 μ m (A-i); 1 μ m (A-ii); 0.5 μ m (A-iii, B-i); 10 μ m (B-ii); 0.45 μ m (B-iii); 5 μ m (C-i, C-iii)

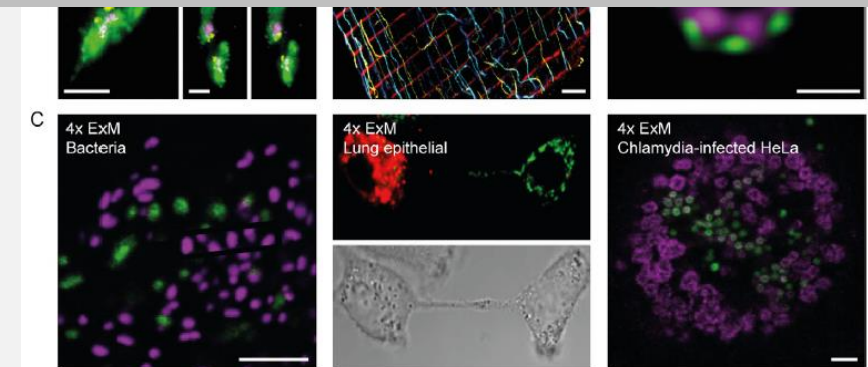
Existen múltiples variantes de ExM

Según...

- **Tipo de biomoléculas que permiten visualizar:** ExM estándar (con MA-NHS o AcX); Protein retention ExM (proExM); Expansion FISH (ExFISH); Membrane ExM (mExM); Magnified Analysis of the Proteome (MAP), Bulk proteome labelling ExM (pan-ExM); Chromatine ExM (chromExM); etc.
- **Naturaleza del proceso de homogeneización de las propiedades mecánicas del material biológico:** Uso de digestión proteolítica con proteasa K (como ExM estándar y otros) vs denaturación de proteínas con detergentes iónicos, agentes caotrópicos y/o temperatura (proExM; MAP; pan-ExM; etc).
- **Factor de expansión (y resolución) alcanzable:** Iterative ExM (iExM, alcanza expansión 20x); X10 ExM (alcanza expansión 10x); pan-ExM (alcanza expansión 16x).
- **Estructura molecular del polímero expansible (nivel de isotropía de expansión):** Ultrastructure ExM (U-ExM); Tetra-gel ExM.
- **Combinación de ExM con otras técnicas de microscopía óptica:** Structured illumination ExM (ExSIM); Stimulated emission depletion ExM (ExSTED); Single molecule localization ExM (ExSMLM); Enhanced ExM (EExM); etc.
- **Naturaleza del espécimen que se desea estudiar mediante ExM:** ExM for microbes (μ ExM); ExM in plants.



No usar tratamientos proteolíticos para homogeneizar las propiedades mecánicas de la muestra trae consigo una ventaja muy importante: permitir una tinción post-expansión que evite pérdidas de fluorescencia causadas por el deterioro de los fluoróforos a causa de la polimerización vía radicales libres del hidrogel. También evita la pérdida de fluorescencia por la degradación de proteínas conjugadas a fluoróforos (como ocurre en técnicas de inmunofluorescencia).



En este review metodológico sobre EExM se registran todas las variantes de ExM existentes hasta el 2021: Sheard, T., & Jayasinghe, I. (2021). Enhanced expansion microscopy to measure nanoscale structural and biochemical remodeling in single cells. *Methods in cell biology*, 161, 147–180. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.04.019>

Modificado de Sheard & Jayasinghe (2021). Barras de escala: 4 μ m, inserto 1 μ m (A-i); 1 μ m (A-ii); 0.5 μ m (A-iii, B-i); 10 μ m (B-ii); 0.45 μ m (B-iii); 5 μ m (C-i, C-iii)

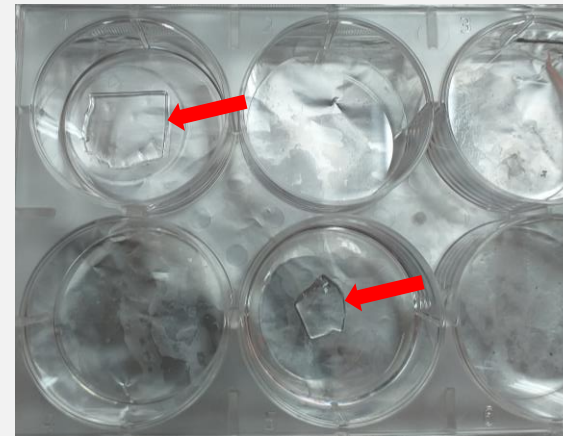
Algunas aplicaciones generales de ExM

- Detección y localización a nanoescala de diferentes biomoléculas
- Descripción a nanoescala de organización espacial de estructuras celulares y subcelulares
- Mapeo de estructuras nanoscópicas a lo largo de grandes volúmenes de tejido (Ej.: mapeo de circuitos neuronales)
- Mejorar aun más la resolución de otras metodologías de microscopía óptica (Ej.: combinación con técnicas clásicas de súper-resolución como SIM, STED y PALM/STORM)
- Facilitar diagnósticos clínicos que empleen metodologías de análisis de morfología celular (Ej.: uso en patología para detección de fenotipos alterados)

Ventajas de la técnica

- Permite visualización en súper-resolución (SR) usando microscopios de fluorescencia limitados por difracción
- Algunas de sus variantes como ExM estándar (con MA-NHS o AcX) o MAP son fáciles de implementar en modelos estandarizados y pueden tener bajo costo ya que requieren de materiales y reactivos comúnmente disponibles en laboratorios de biología molecular.
- Su compatibilidad con visualización en profundidad (al combinarse con microscopía confocal o de sábana de luz) permite estudio en SR de muestras gruesas (ej. Cortes de tejido de varios cientos de micrómetros de grosor o hasta especímenes completos)
- Disminuye considerablemente incidencia de aberraciones ópticas causadas por diferencias entre índices de refracción de medio de montaje y medio de inmersión (solo aplica si la muestra se visualiza con objetivos de inmersión en agua)
- Disminuye considerablemente incidencia de fenómenos de dispersión de la luz (*light scattering*) que la misma muestra causa sobre el laser de excitación, gracias a la aclaración del tejido al que se somete la muestra

Geles sin sumergir

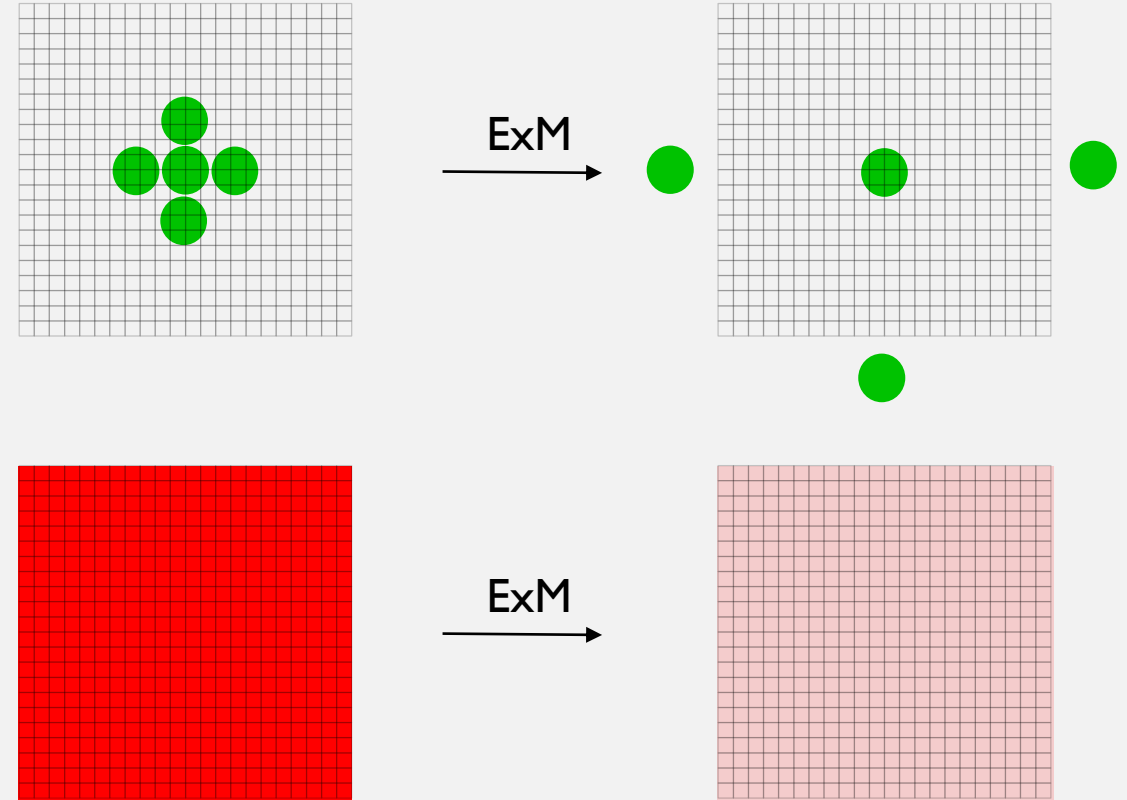


Geles sumergidos en agua



Consideraciones (desventajas) relevantes

- **Disminución de la fluorescencia por *bleaching* de los fluoróforos (a causa de reacción con radicales libres*), por digestión excesiva de moléculas fluorescentes (solo en las variantes que emplean digestión proteolítica) y por disminución de la densidad de tinción (menor cantidad de moléculas de fluoróforo por unidad de espacio 3D)**
- **Requiere chequeo de conservación de morfología o que la isotropía de la expansión alcance los estándares.**
- La magnificación de la muestra puede traer dificultades para la visualización con objetivos que no tengan suficiente espacio o distancia de trabajo** (*objective working distance*): parte (o gran parte) de la muestra expandida puede quedar fuera de foco.
- Muestras expandidas son de compleja manipulación. Los geles hidratados pueden romperse con facilidad en los procesos de montaje y traslado.



*Referencia para fluoróforos compatibles con ExM: Faulkner, E. L., Thomas, S. G., & Neely, R. K. (2020). An introduction to the methodology of expansion microscopy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 124, 105764. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105764>

**Distancia de trabajo: distancia entre el elemento de la lente frontal del objetivo y la superficie más cercana del cubreobjetos cuando la muestra está bien enfocada. En el caso de los objetivos diseñados para ser utilizados sin cubreobjetos, la distancia de trabajo se determina mediante la medición lineal de la lente frontal del objetivo a la superficie de la muestra (<https://www.microscopyu.com/tutorials/workingdistance>).

ExM en bacterias y biopelículas bacterianas

ExM se ha implementado en diferentes modelos de estudio

Modelos “estándar”:

Cultivos celulares



PK

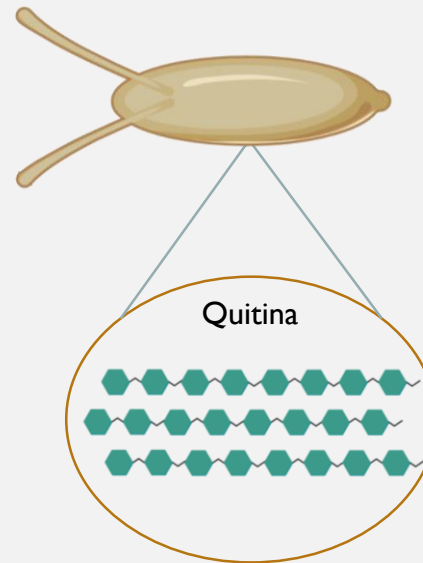
Cortes de tejidos



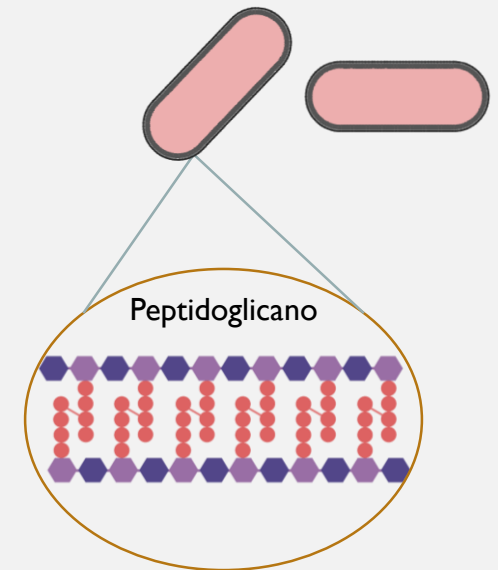
PK

Otros modelos:

Embriones de *Drosophila*



Bacterias (planctónicas)



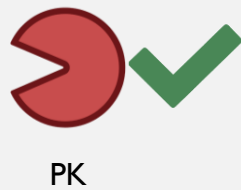
PK = proteinasa K

ExM en bacterias y biopelículas bacterianas

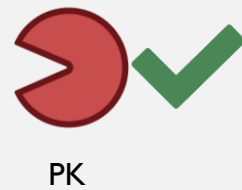
ExM se ha implementado en diferentes modelos de estudio

Modelos “estándar”:

Cultivos celulares

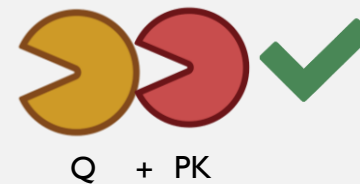
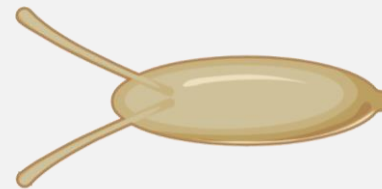


Cortes de tejidos



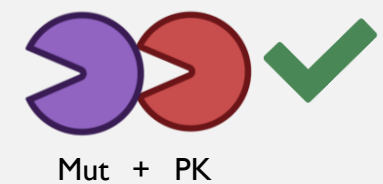
Otros modelos:

Embriones de *Drosophila*

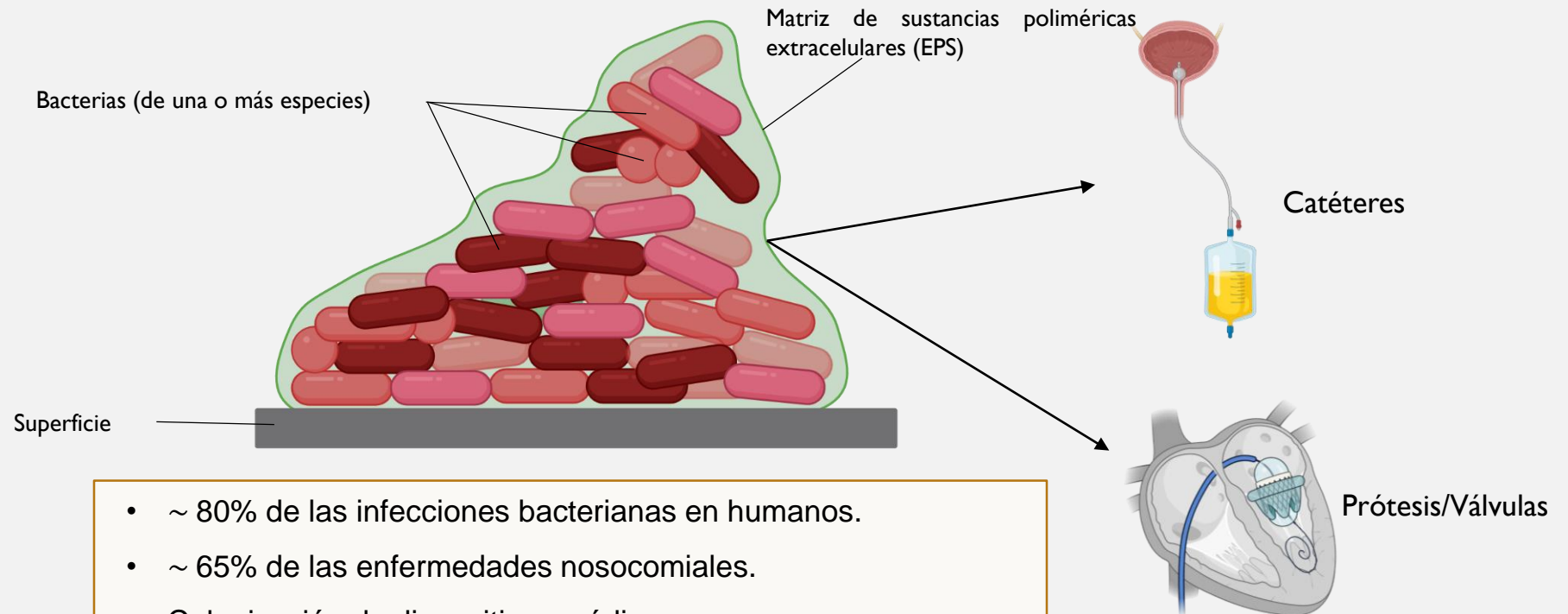


“ μ ExM”

Bacterias (planctónicas)



Biopelículas bacterianas: definición y relevancia



- ~ 80% de las infecciones bacterianas en humanos.
- ~ 65% de las enfermedades nosocomiales.
- Colonización de dispositivos médicos.
- Resistentes a antibióticos y a la respuesta del sistema inmune.

Las biopelículas se estudian desde múltiples puntos de vista

Nuevos conocimientos sobre la estructura, la función y la fisiología de las biopelículas, se obtienen mediante combinación de métodos moleculares, analíticos, espectroscópicos, colorimétricos, físicos y de imagen (ej. Microscopía)

Es importante conocer la organización espacial de los modelos:

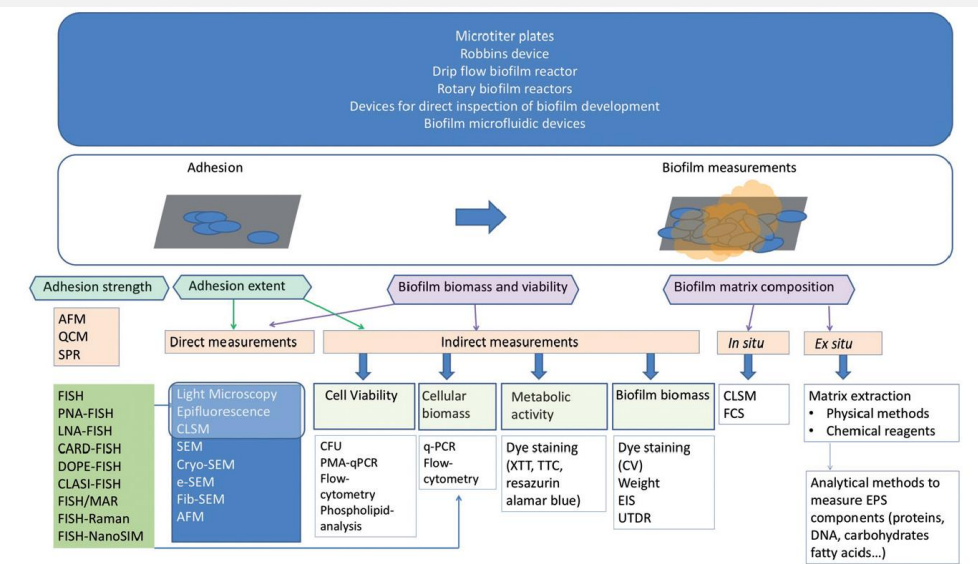
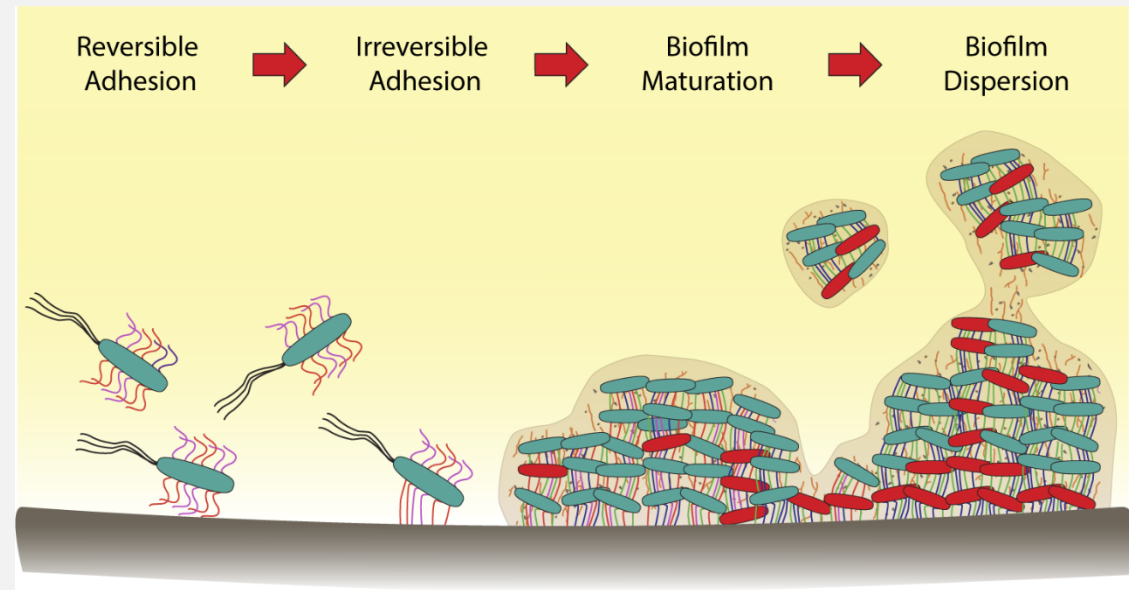


Figure 1. Overview of methods to grow and characterize biofilms, which includes different biofilm devices, methods to assess adhesion extent and strength, and techniques to measure biofilm biomass, viability and matrix composition. © Joana Azeredo.

Extraído de Azeredo et al., (2017)



Las biopelículas se estudian desde múltiples puntos de vista

Nuevos conocimientos sobre la estructura, la función y la fisiología de las biopelículas, se obtienen mediante combinación de métodos moleculares, analíticos, espectroscópicos, colorimétricos, físicos y de imagen (ej. Microscopía)

Es importante conocer la organización espacial de los modelos:

Reversible

Irreversible

Biofilm

Biofilm

Las biopelículas son sistemas complejos y por ende, su estudio se ha tenido que abordar desde múltiples aproximaciones experimentales. El conocimiento que se tiene hasta hoy sobre la estructura, función y fisiología de biopelículas se ha generado a través de la combinación de diferentes métodos, ya sean moleculares, analíticos, espectroscópicos, etc.. Y entre ellos, está la imagenología, como puede ser a través de microscopía, especialmente para estudiar la organización espacial de las biopelículas, la cual puede llegar a ser bastante intrincada.

La arquitectura de las biopelículas varía a lo largo de su proceso de formación y maduración, y guarda mucha importancia respecto a características relevantes de las biopelículas, como es la alta resistencia a antibióticos, por ejemplo. Por esto, es importante conocer en detalle la organización espacial de los moldes.

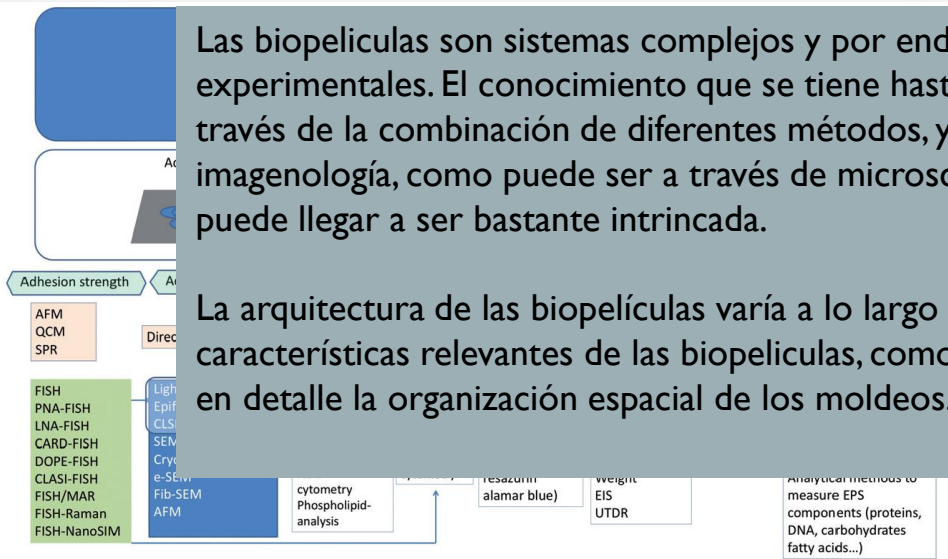
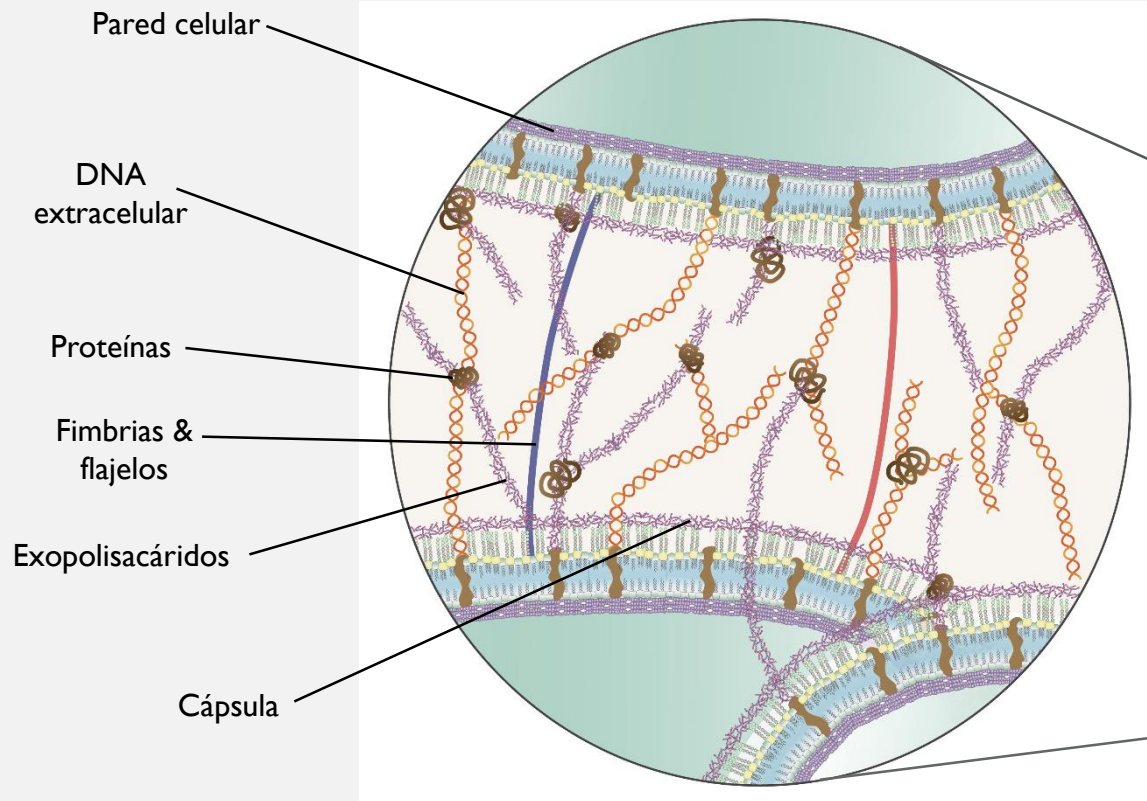


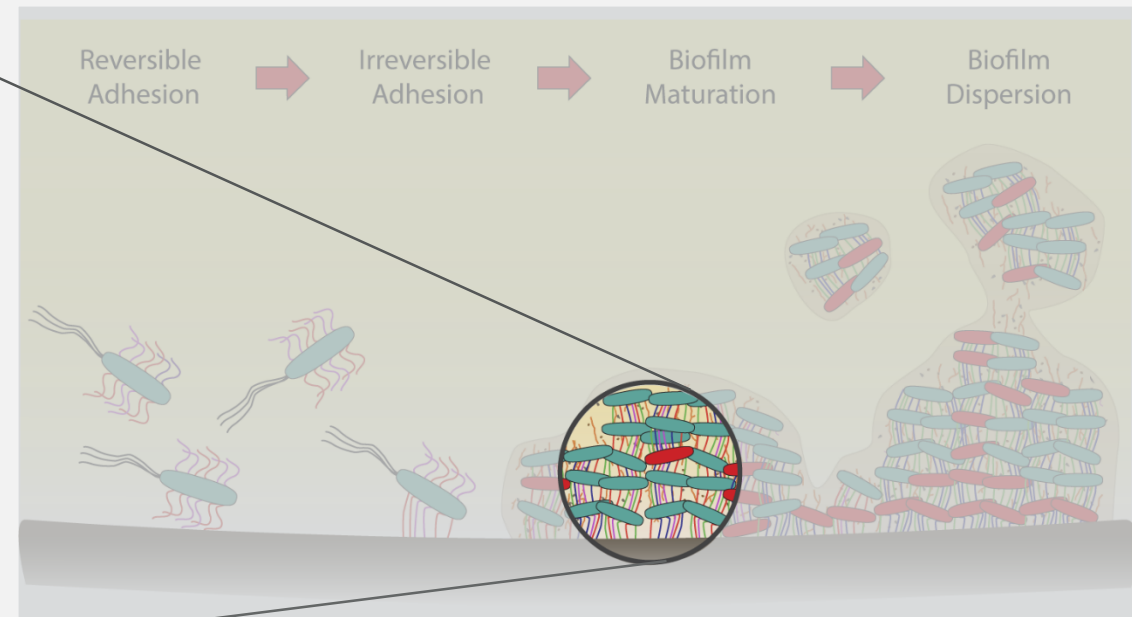
Figure 1. Overview of methods to grow and characterize biofilms, which includes different biofilm devices, methods to assess adhesion extent and strength, and techniques to measure biofilm biomass, viability and matrix composition. © Joana Azeredo.

Extraído de Azeredo *et al.*, (2017)

Las biopelículas se estudian desde múltiples puntos de vista

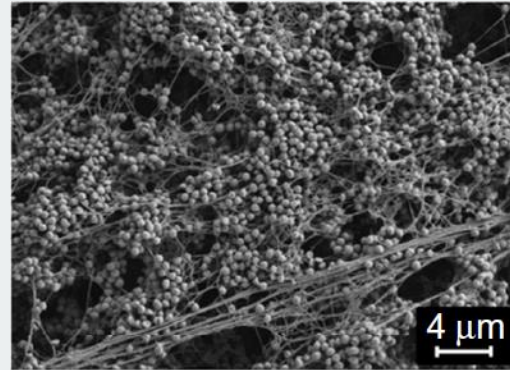


Es importante conocer la organización espacial de los modelos:



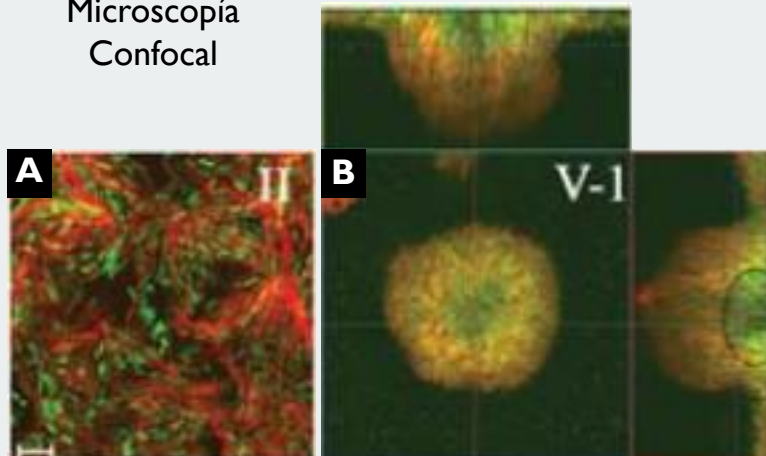
Estudio de estructura y arquitectura de biopelículas con microscopía

Microscopía Electrónica

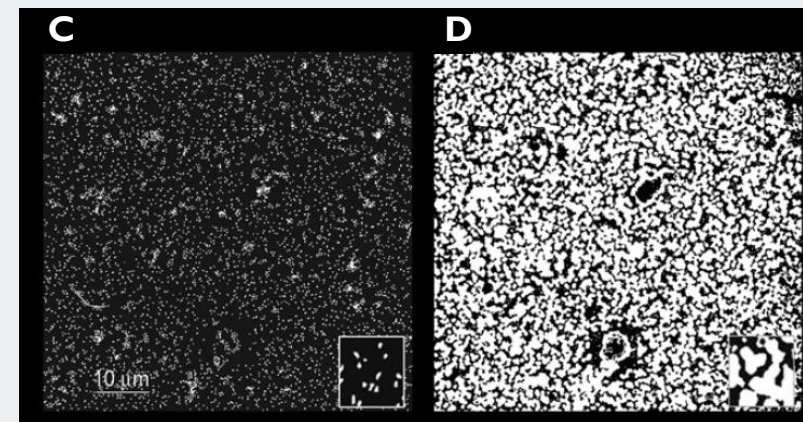


Biopelícula de *Staphylococcus aureus*. Modificado de Watters et al. (2016).

Microscopía Confocal



Visualización de *GFP-Pseudomonas aeruginosa* y *exopolisacáridos* en distintas etapas de formación de la biopelícula. Barra de escala en (A): 5 μm . Modificado de Ma et al. (2009).



(C) Segmentación de bacterias individuales y (D) de bacterias y material extracelular de una biopelícula de *P. mirabilis*. Modificado de Schlapp et al. (2011).

Estudio de estructura y arquitectura de biopelículas con microscopía



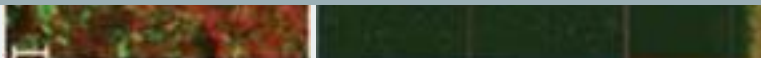
Para estudiar la estructura y arquitectura de las biopelículas se han usado herramientas de microscopía. Principalmente microscopía electrónica (EM) y de fluorescencia, específicamente, confocal.

Si bien la microscopía electrónica nos permite obtener la mejor resolución, como por ejemplo en esta imagen de microscopía electrónica de barrido de una biopelícula de *Staphylococcus aureus*, en donde se pueden resolver fácilmente no solo células individuales sino que hasta estructuras o fascículos de material extracelular, éste tipo de microscopía tiene ciertos inconvenientes que limitan su uso para el estudio de biopelículas, como por ejemplo su dificultad para identificar de manera inequívoca blancos biológicos específicos y la generación de artefactos estructurales debido a los agresivos pretratamientos requeridos para la preparación de las muestras.

Debido a esto, la microscopía confocal se ha empleado vastamente para el estudio de biopelículas debido a que puede suplir dichas limitaciones, debido a su gran facilidad para etiquetar y visualizar de manera inequívoca componentes específicos de las biopelículas para así observar su organización espacial y temporal, como pueden ver en esta imagen de una biopelícula de *Pseudomonas Aeruginosa* con tinción de células y de exopolisacáridos. La microscopía confocal tampoco requiere de pretratamientos tan agresivos como en EM, lo que la hace compatible con la visualización de muestras vivas, También se puede aprovechar la capacidad de seccionamiento óptico de la microscopía confocal para observar la arquitectura de las biopelículas en el plano lateral y axial.

Mas aun, gracias a su compatibilidad con el procesamiento y análisis de imágenes digitales, la microscopía confocal no solo permite estudiar la estructura de biopelículas a un nivel cualitativo sino que también cuantitativo, debido que a través del análisis de imágenes se pueden generar reconstrucciones tridimensionales de los objetos, se pueden calcular parámetros estructurales como el grosor y el volumen de la biopelícula, se pueden hacer análisis morfológicos y topológicos de las células de las biopelículas, etc.

Sin embargo, todo lo anterior mencionado solo se puede realizar a un nivel supracelular. Si se necesita describir con mayor resolución cómo se ensambla o estructura una biopelícula, dónde están localizadas ciertas proteínas o polisacáridos de la matriz de EPS, qué tan separados entre sí se encuentran o cómo interactúan con respecto a otras biomoléculas, la microscopía confocal no nos permitirá responder estas preguntas...



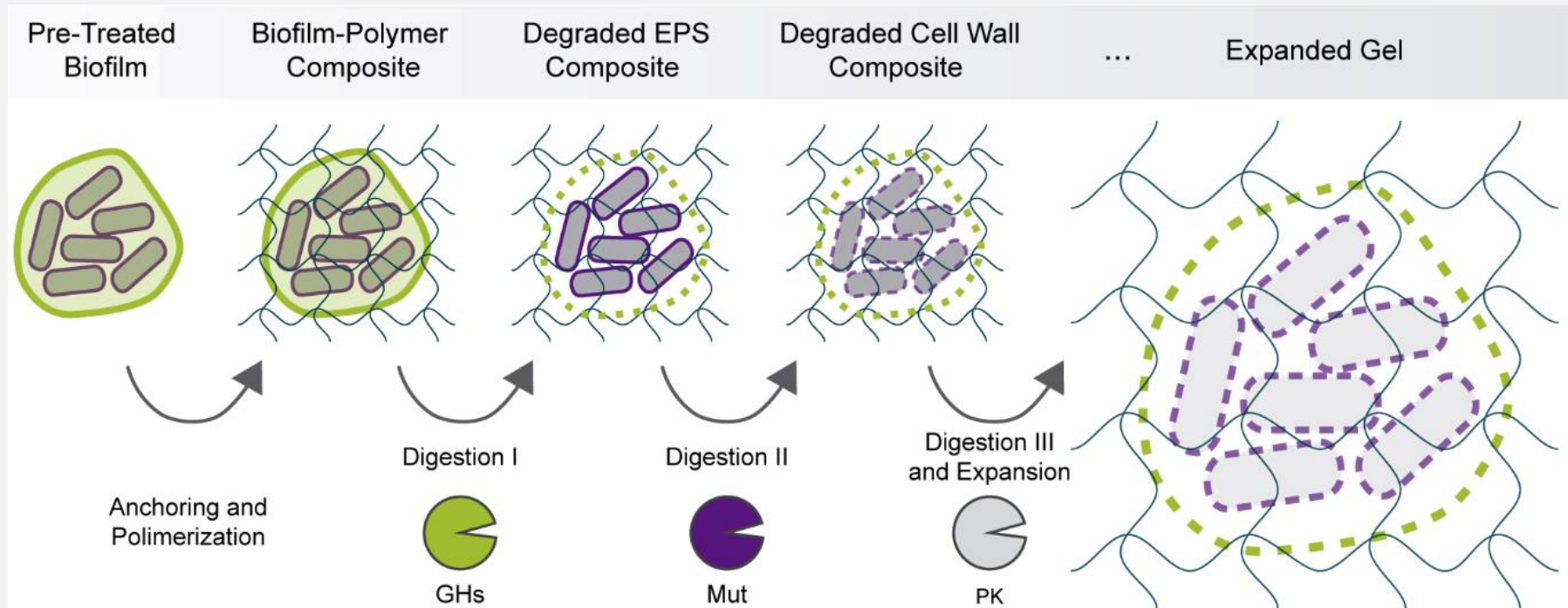
Visualización de *GFP-Pseudomonas aeruginosa* y *exopolisacáridos* en distintas etapas de formación de la biopelícula. Barra de escala en (A): 5 μm . Modificado de Ma et al. (2009).



(C) Segmentación de bacterias individuales y (D) de bacterias y material extracelular de una biopelícula de *P. mirabilis*. Modificado de Schlapp et al. (2011).

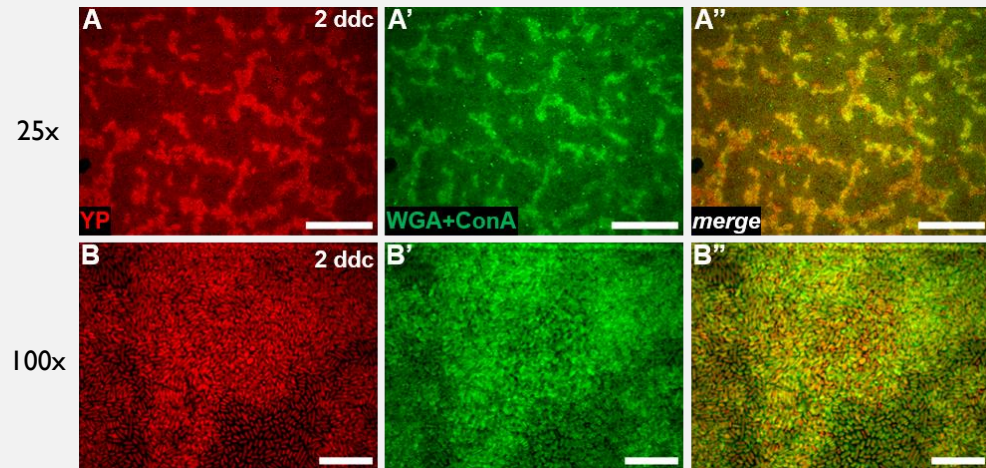
ExM en bacterias y biopelículas bacterianas

Para expandir biopelículas se requiere comprometer estructuralmente componentes no proteicos, que ExM estándar no considera, como la pared celular bacteriana y los exopolisacáridos de la matriz extracelular.

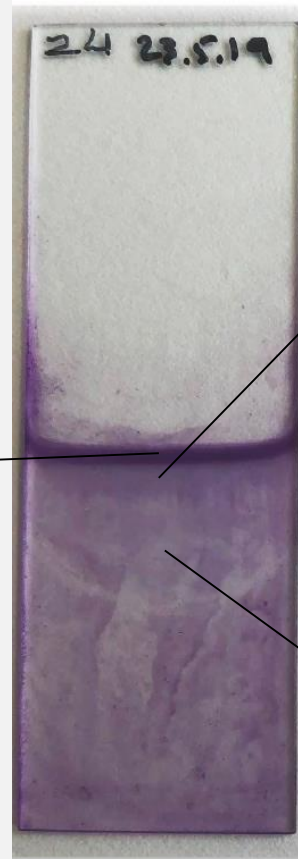


Modelo de estudio: biopelícula de *Proteus mirabilis*

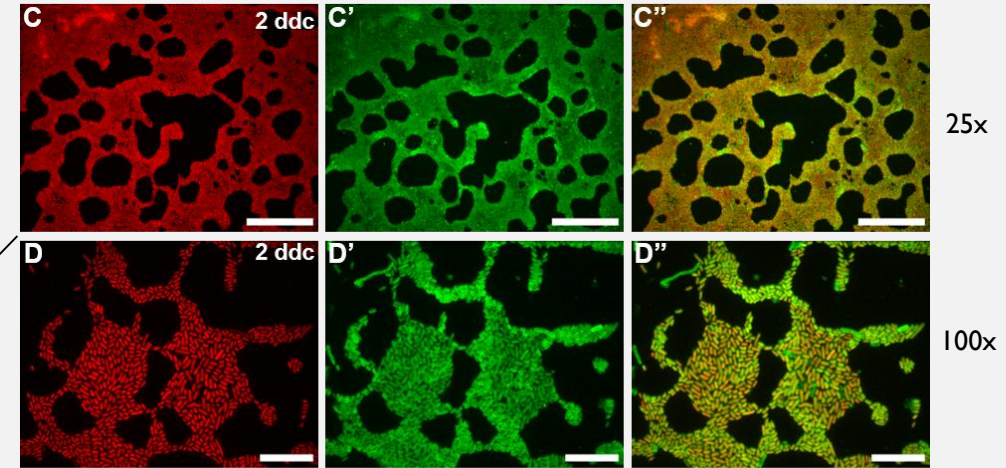
Visualización de la biopelícula de *P. mirabilis* (cepa wild-type D1)



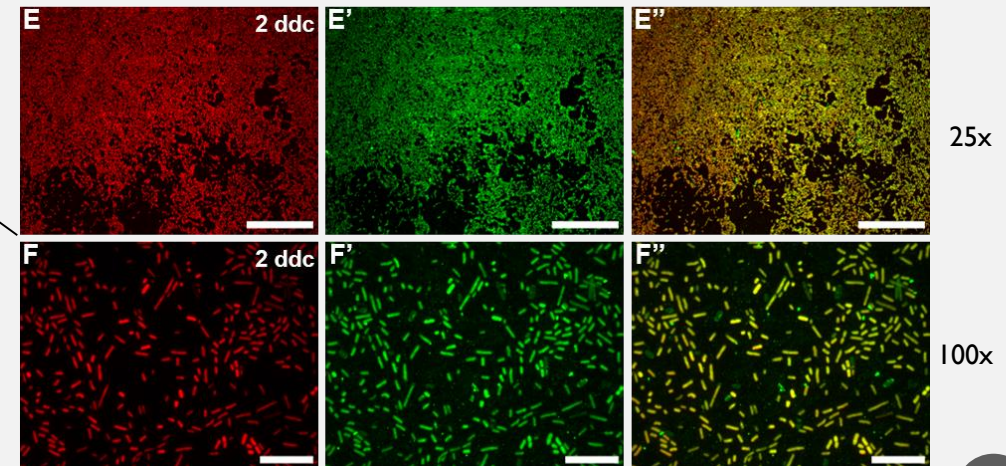
Tinción de ADN y pared celular/cápsula/polisacáridos extracelulares. Barras de escala: 50 μm (A, A', A''); 10 μm (B, B', B'').



Biopelícula de *P. mirabilis* formada sobre un portaobjetos, teñida con cristal violeta. Cortesía de Mg.(c) Nicole Canales, SCIAN.



Barras de escala: 50 μm (C, C', C''); 10 μm (D, D', D'').

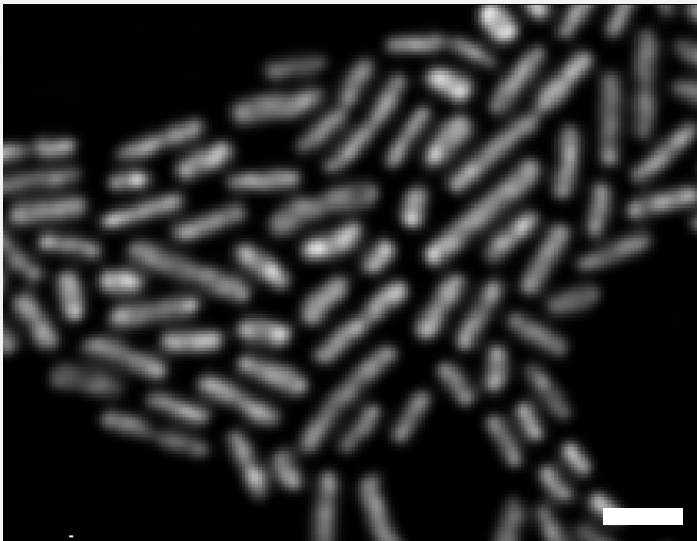


Barras de escala: 50 μm (E, E', E''); 10 μm (F, F', F'').

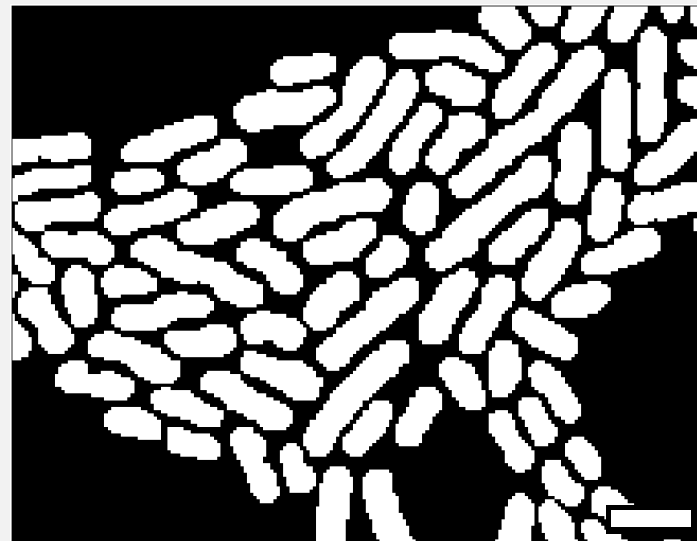
Diseño de un método para calcular el factor de expansión en *P. mirabilis*

Segmentación de bacterias individuales

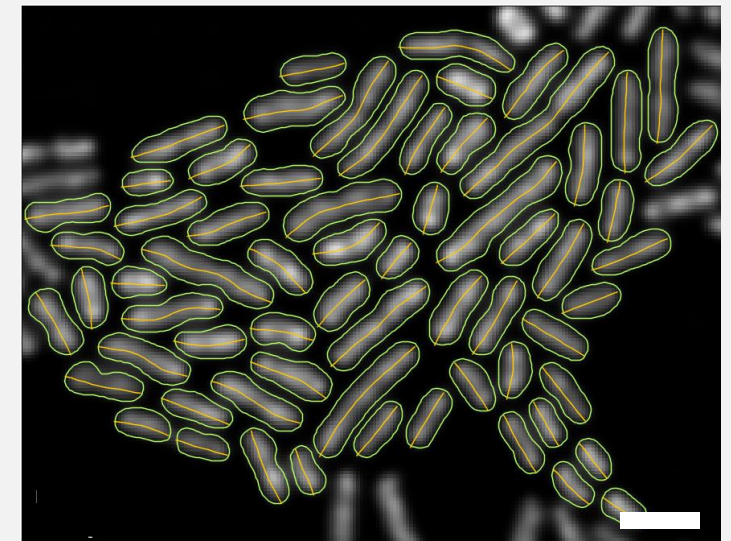
Imágenes deconvolucionadas



Imágenes binarias, segmentadas



Imágenes con sobreposición de contornos suavizados y ejes mediales



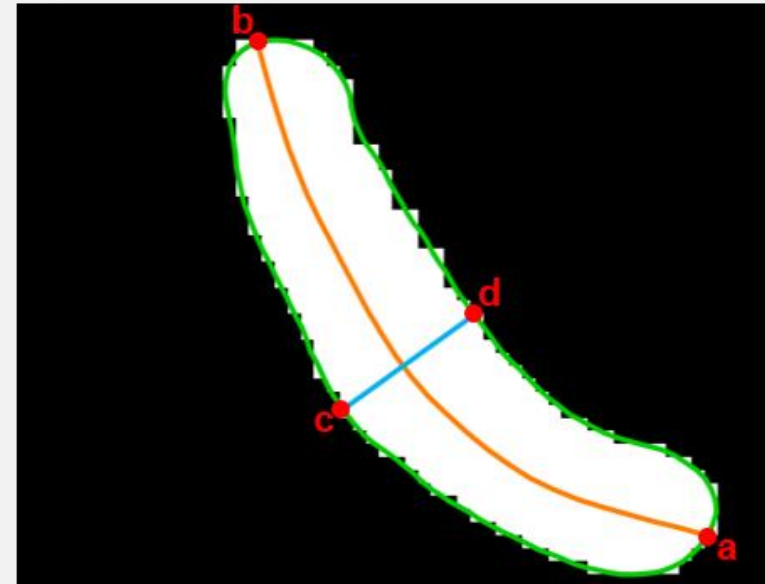
- Segmentación inicial basada en un algoritmo entrenable
- Segmentación refinada (operaciones semi-automáticas y manuales)

Generación de contornos suavizados y de ejes mediales

Diseño de un método para calcular el factor de expansión en *P. mirabilis*

Extracción de descriptores morfológicos

- Área
- Perímetro
- Longitud
- Ancho máximo

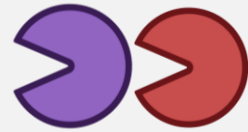


	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Longitud (μm)	Ancho máximo (μm)
Media	0.83	3.9	1.7	0.59
DE	0.40	1.4	0.68	0.070
EEM	0.0035	0.012	0.0060	0.00061
CdV	48%	35%	40%	12%
Error de medición	0.42%	0.31%	0.35%	0.10%
n	13153	13153	13153	13153

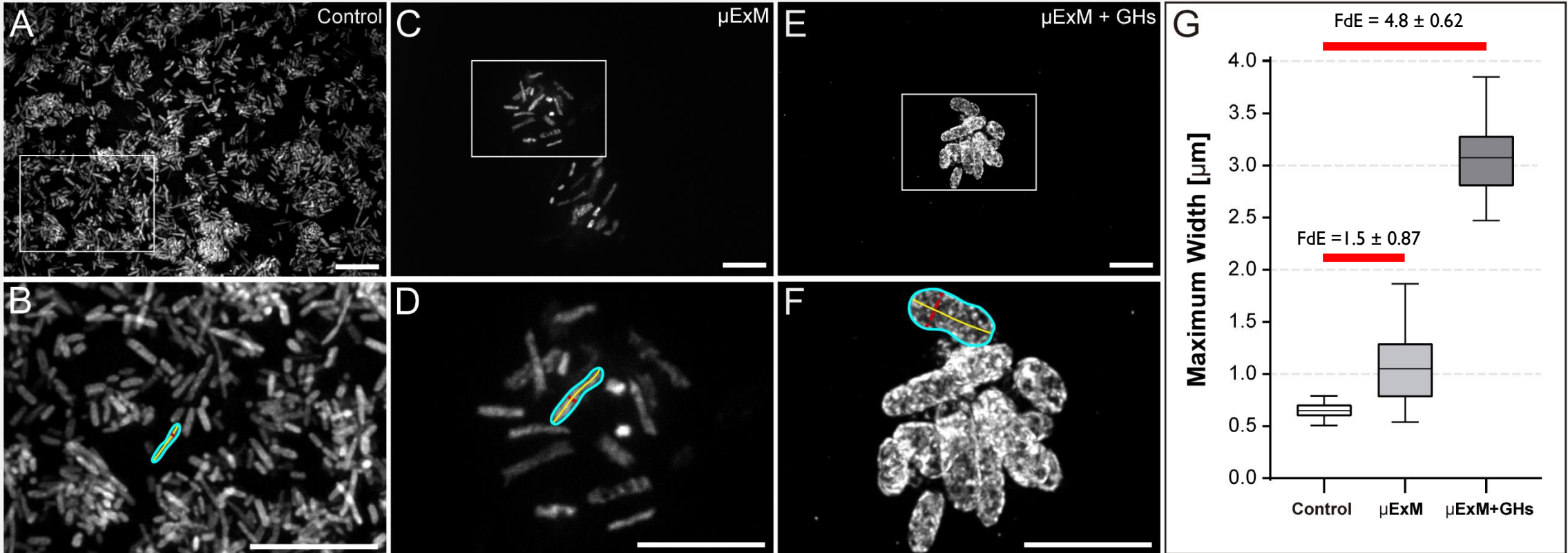
Media, desviación estándar (DE), error estándar de la media (EEM), coeficiente de variación (CdV), porcentaje que representa el EEM con respecto a la media (Error de medición) y número de bacterias analizadas (n).

Expansión de *P. mirabilis* planctónico

Mutanolisina+proteínasa K

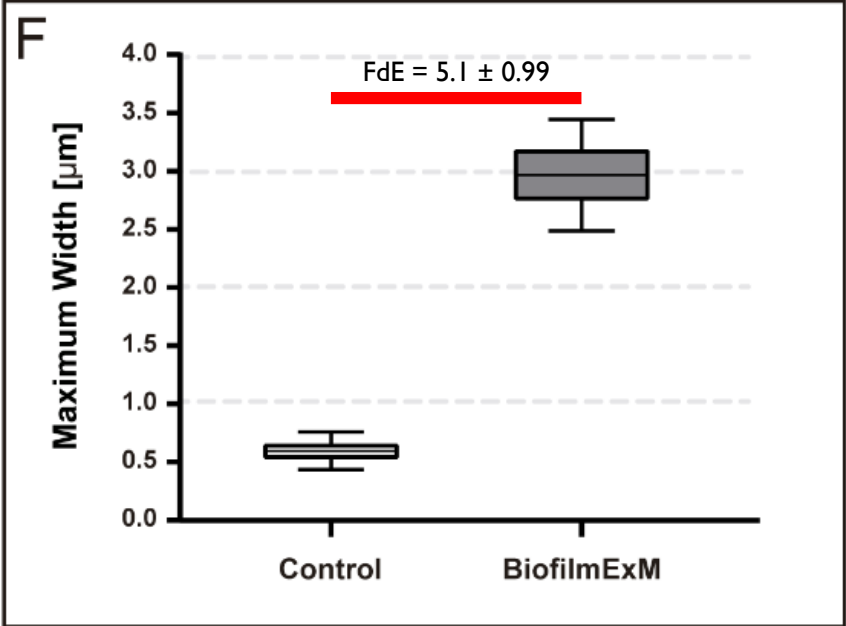
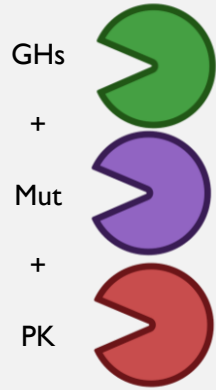
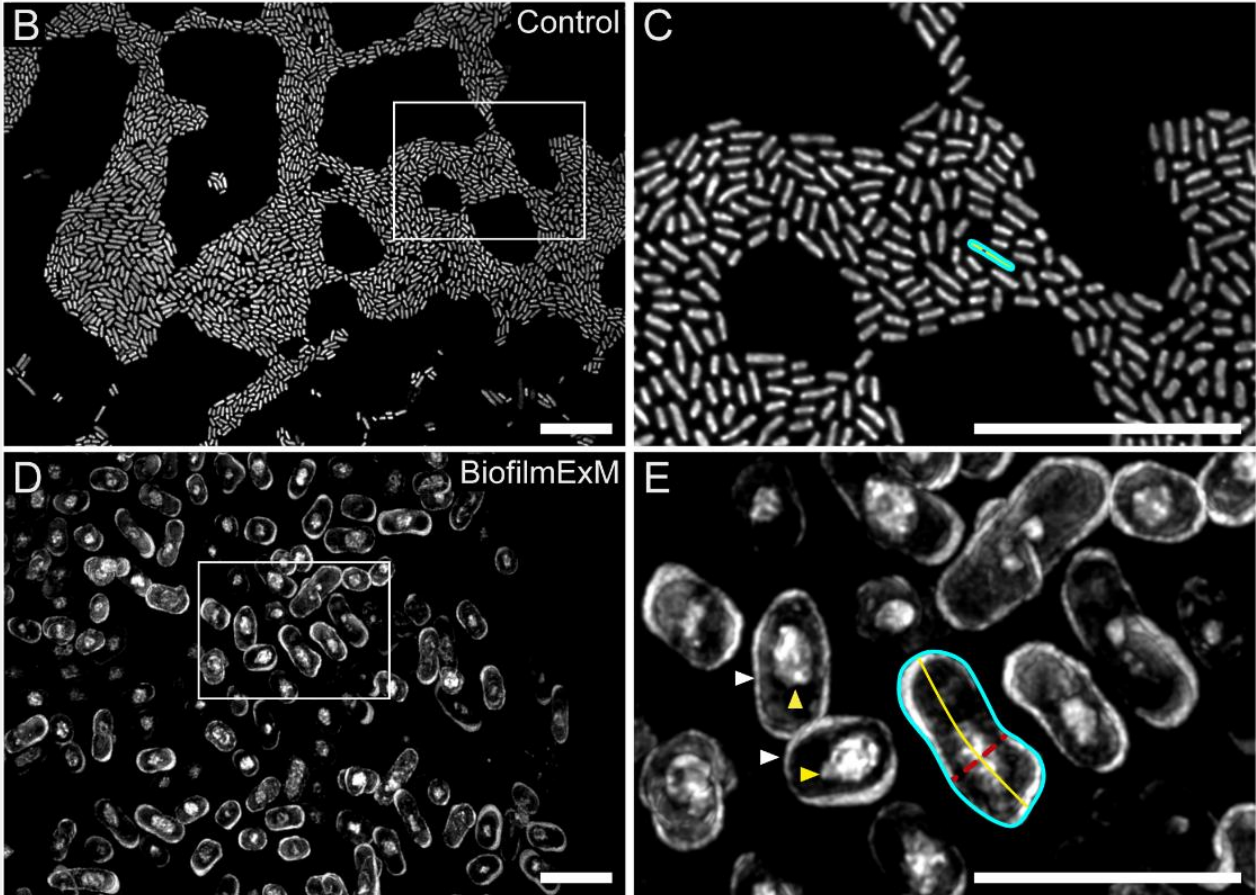


Glicósido-hidrolasas+mutanolisina+proteínasa K



Tinción de ADN con yoduro de propidio. Barras de escala: 10 μ m; FdE = factor de expansión.

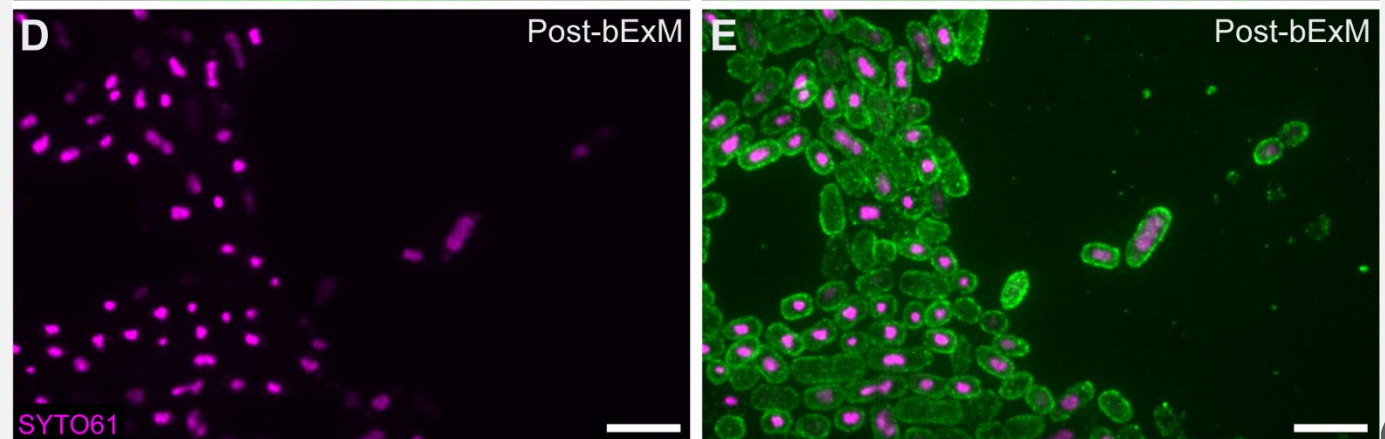
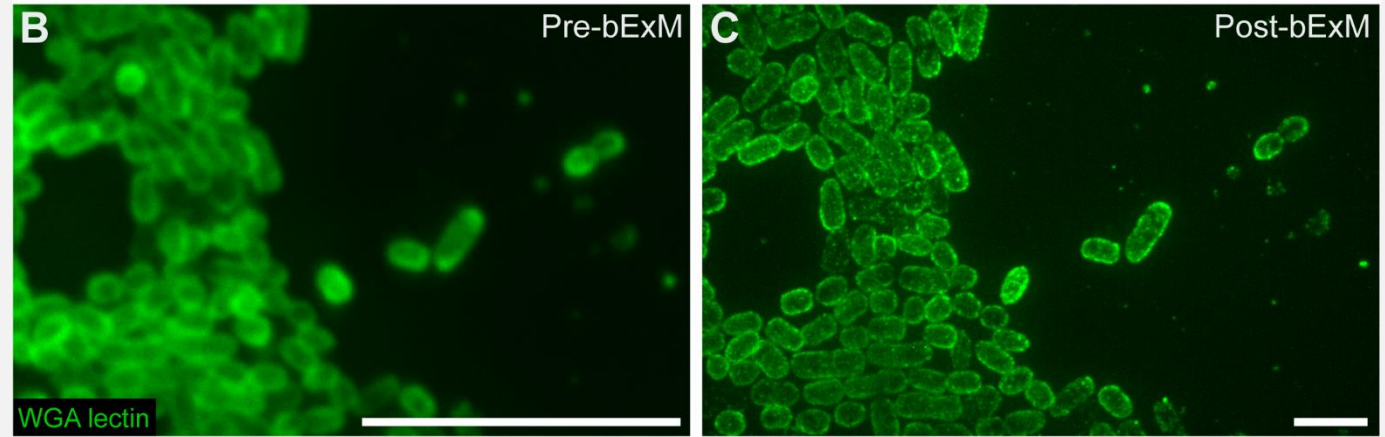
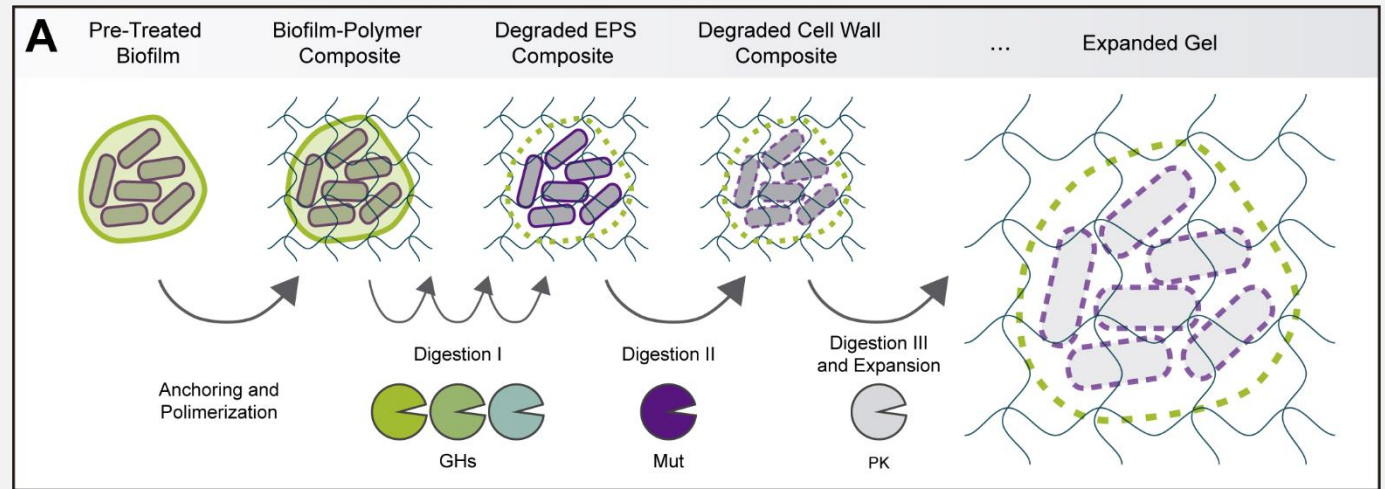
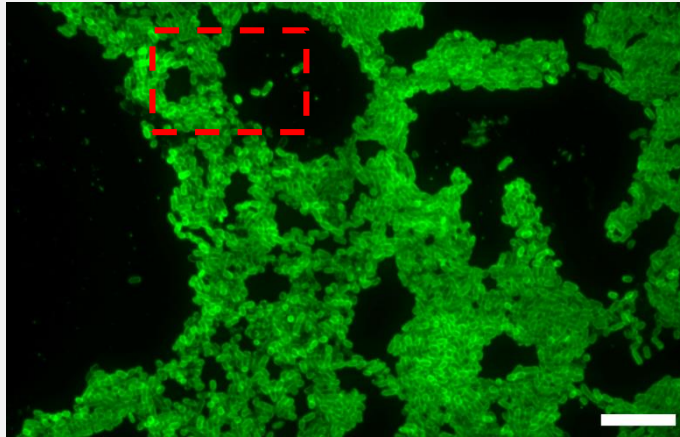
Expansión de bacterias de biofilm de *P. mirabilis*



Tinción de ADN con yoduro de propidio. Barras de escala: 10 µm; GHs = glicósido-hidrolasas; Mut = mutanolisina; PK = proteinasa K; FdE = factor de expansión.

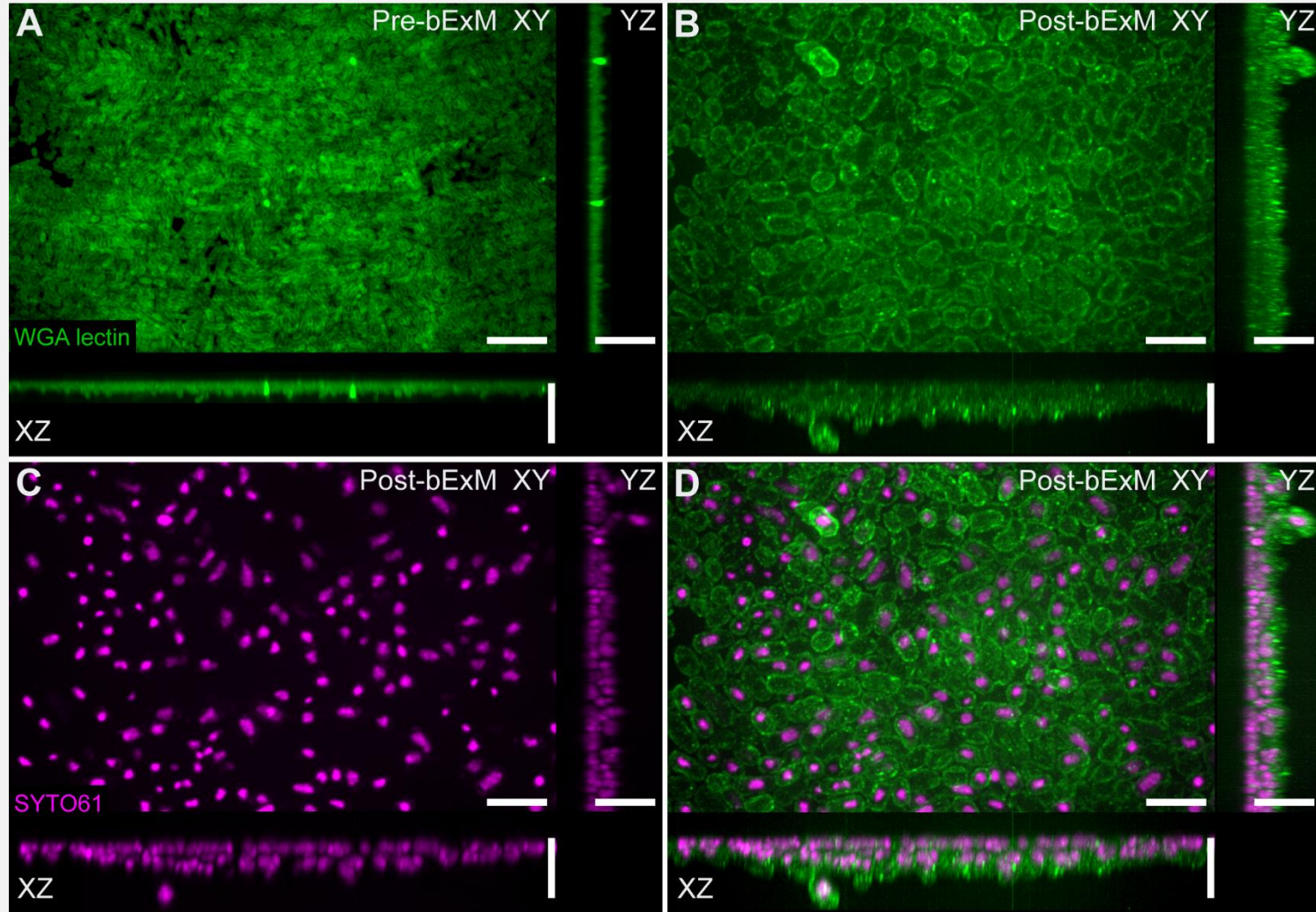
Expansión de biofilms de *P. mirabilis*

(Importancia de la optimización de tratamientos enzimáticos)



Capturas hechas en microscopio confocal de disco giratorio. Objetivo de 63x W AN = 1.2 con aumento extra de optovar 1.6x. Muestras de biofilm de *P. mirabilis* de 2 días de cultivo (2ddc). Tinción de pared celular/cápsula/exopolisacáridos (WGA-Alexa488; Ex/Em 488/520 nm) y ADN (SYTO61; Ex/Em 647/650 nm). Barras de escala: 10 μ m

Expansión de biofilms de *P. mirabilis*



Capturas hechas en microscopio confocal de disco giratorio. Objetivo de 63x W AN = 1.2 con aumento extra de optovar 1.6x.

Muestras de biofilm de *P. mirabilis* de 2 días de cultivo (2ddc).

Tinción de pared celular/cápsula/exopolisacáridos (WGA-Alexa488; Ex/Em 488/520 nm) y ADN (SYTO61; Ex/Em 647/650 nm).

Barras de escala: 10 μ m

MICROSCOPIA DE EXPANSION

Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (SCIAN-Lab)

Programa de Biología Integrativa; Instituto de Neurociencia Biomédica

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Microscopía para el Estudio de Biofilms Bacterianos, Octubre 2023