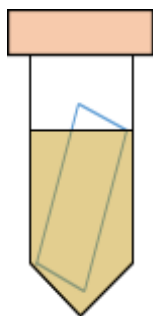


Evaluación de biofilms estáticos sobre cubreobjeto



Microorganismos a estudiar:

Se evaluará el efecto antibiofilm de nanopartículas de policianoacrilato de n-butilo (PBCA) y de nanopartículas de óxido de zinc dopadas con magnesio funcionalizadas con cefuroxima (ZnO:MgO-CXM) sobre las cepas *Escherichia coli* 144, *Proteus mirabilis* 2921, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1902). Estas nanopartículas se encontrarán adheridas a una superficie de vidrio (cubreobjeto) de acuerdo a la siguiente tabla:

Bacteria	Nanopartícula
<i>E. coli</i>	PBCA
<i>P. mirabilis</i>	PBCA
<i>A. baumannii</i>	PBCA
<i>S. aureus</i>	ZnO:MgO-CXM
<i>P. aeruginosa</i>	ZnO:MgO-CXM

Procedimiento:

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 horas a la temperatura de crecimiento (Ej: 37°C).
2. Preparar pre-inóculo de cada microorganismo a ensayar en un tubo Falcon estéril de 15 mL o 50 mL e incubar por 24 horas a la temperatura de crecimiento.
3. Medir la DO 600 nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria.
4. En un tubo Falcon estéril de 50 mL posicionar con cuidado el cubreobjeto (control y tratado) y adicionar 18 mL de medio líquido. Tomar de los pre-inóculos 2 mL y colocarlos en cada tubo (control y tratamiento).
5. Incubar 24 horas (día 1) y 120 horas (5 días) a 37°C sin agitación.
6. Remover las bacterias planctónicas.

7. Realizar 3 lavados con PBS.
8. Realizar tinción por inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia:

Solución de tinción 1:

Fluoróforo	Volumen (μL)
Syto 9	4
Ioduro de propidio	4
Hoechst	1.6
PBS	790

Solución de tinción 2:

Fluoróforo	Volumen (μL)
WGA TxR	8
PBS	792

1. Secar con cuidado los cubreobjetos.
2. Marcar una de las caras del cubreobjeto y limpiar la cara opuesta con un algodón con etanol 95%.
3. Teñir cada cubreobjeto con 50 μL de solución de tinción 1 e incubar 15 minutos en oscuridad.
4. Lavar 3 veces con PBS.
5. Fijar con 50 μL de PFA 4% e incubar por 15 minutos.
6. Lavar 3 veces con PBS.
7. Teñir cada cubreobjeto con 50 μL de solución de tinción 2 e incubar 15 minutos en oscuridad.
8. Lavar 3 veces con PBS.
9. Montar los cubreobjetos con 20 μL de medio de montaje.