

**MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL APLICADA AL ESTUDIO TEMPORAL Y ESPACIAL DE BIOFILMS  
DESARROLLADOS SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS**

**Rastelli Silvia E.<sup>1</sup>, Viera Marisa R.<sup>1</sup> y Rosales Blanca M.<sup>2</sup>**

serastelli@hotmail.com; mviera@biotec.org.ar; brosales@fibertel.com.ar

<sup>1</sup>CINDEFI (CCT La Plata-CONICET). <sup>2</sup>CIDEPINT (CCT La Plata-CONICET).

Palabras claves: biopelículas, Microscopio Láser Confocal, hierro, polipropileno.

Los microorganismos presentes en los ambientes acuáticos tienden a fijarse y crecer sobre variadas superficies constituyendo comunidades complejas, multicelulares y tridimensionales denominadas *biopelículas*. Un componente importante que mantiene la integridad estructural de la biopelícula es el material polimérico extracelular (MPE) generado principalmente por los mismos microorganismos. Numerosas técnicas (químicas, bioquímicas, biofísicas, inmunológicas, genéticas, microscopías ópticas y electrónicas) han sido aplicadas al estudio de la formación y desarrollo de las biopelículas. En este trabajo se pretendió estudiar las etapas iniciales de formación de biopelículas a través del Microscopio Láser Confocal (MLC). Con este objetivo se ensayaron dos materiales utilizados en la construcción de redes de agua potable: un acero de bajo carbono ("Fe") y polipropileno ("PP"). Se fijaron 16 cupones de 1x1x0,02 cm de cada material dentro de un circuito experimental, con 50L de agua potable, de circulación cerrada y flujo laminar. Se extrajeron 4 cupones a los 10, 20, 30 y 40 días de exposición. Tres de ellos fueron raspados en 1mL de solución fisiológica, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas, se sembraron 100 µL en agar nutritivo y se incubaron a 25 °C durante 72hs para su posterior recuento. El cupón restante se tiñó con naranja de acridina al 0,01% en PBS y se observó en el MLC, se tomaron fotografías a 100x cada 5µm a lo largo de todo el espesor. Mediante software adecuado se obtuvieron las imágenes 3D individuales de cada una de las fotos, que representan la distribución espacial de los microorganismos a lo largo de la formación de la biopelícula, y una imagen 3D formada por la totalidad de las fotos, reproduciendo el aspecto final de la biopelícula en el momento de la extracción. Si bien la estructura y distribución es muy heterogénea, puede decirse que a medida que pasa el tiempo (10, 20, 30 y 40 días) la biopelícula se hace más compacta sobre ambos sustratos. Asimismo, cabe destacar la formación de una película de mayor espesor total sobre el Fe respecto del PP, ya que el primero es un material metálico con mayor susceptibilidad tanto a la colonización como a la corrosión, por lo que la biopelícula es el conjunto de los microorganismos, el MPE y los productos de corrosión que quedan retenidos en esta compleja matriz. En cambio, el PP es un material menos susceptible a la colonización y, en los tiempos ensayados, no se observaron efectos de biodeterioro. En los recuentos de bacterias heterótrofas sésiles obtenidos a partir de los cupones de PP, se verificó un aumento de UFC en las sucesivas extracciones en el tiempo. Sin embargo no se observó tal correlación sobre el Fe. Esto podría deberse a que, como sabemos, las biopelículas son entidades dinámicas y una vez alcanzado un tamaño crítico se producen desprendimientos y dispersión de partes de ella, por lo que sobre este material, al alcanzar un espesor mayor en menor tiempo, probablemente se desprendan porciones de la biopelícula formada.