



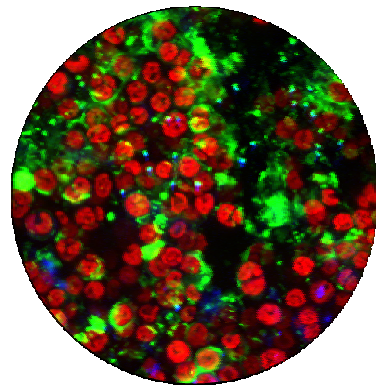
Facultat de Farmàcia
Dept. de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia

Caracterització de biofilms fototròfics d'ambients hipogeus

MÒNICA ROLDÁN MOLINA

2008

Tècniques experimentals



Capítol 3

Tècniques experimentals

3.1. Introducció	57
3.2. Tècniques de microscòpia òptica	58
3.2.1. Microscòpia estereoscòpica	58
3.2.2. Microscòpia de camp clar	58
3.2.3.- Microscopi de rastreig làser confocal (CSLM)	62
3.2.3.1.- <i>Software</i> de processament d'imatge	68
3.2.3.2.- <i>Software</i> de quantificació	72
3.2.3.3.- Determinació de pigments fotosintètics	72
3.3. Microscòpia electrònica	74
3.3.1.- Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)	74
3.3.2.- Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)	76
3.4. Recol·lecció i conservació de biofilms	77
3.5. Referències	81

3.1. Introducció

Les tècniques de microscòpia són un dels pilars en l'estudi de biofilms fototròfics. El conjunt d'aquestes tècniques aporten informació complementària sobre aquestes comunitats i són necessàries per a la identificació dels microorganismes que les formen, l'estudi de la seva distribució en el substrat i el monitoratge del control del seu creixement.

L'estudi dels microorganismes fototròfics d'ambients hipogeus ha requerit l'adaptació de diferents protocols de preparació de mostres per microscòpia segons les característiques del material, així com la posada a punt de noves tècniques. No és l'objectiu d'aquest capítol fer una descripció detallada de les tècniques utilitzades sinó més aviat fer-ne un repàs general que permeti al lector que no hi està familiaritzat entendre'n el principi de funcionament i la seva utilitat. S'han utilitzat les següents tècniques de microscòpia: microscòpia estereoscòpica, microscòpia de camp clar, microscòpia de rastreig làser confocal (CLSM, acrònim de l'anglès), i microscòpia electrònica de rastreig (SEM, acrònim de l'anglès) i de transmissió (TEM, acrònim de l'anglès). Els grans equipaments pertanyen als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

3.2. Tècniques de microscòpia òptica

3.2.1. Microscòpia estereoscòpica

Per obtenir una visió general de les mostres fresques i seleccionar les zones que posteriorment s'estudiarien amb les altres tècniques es va utilitzar el microscopi estereoscòpic Leica MZ FL III (Leica, Deerfield, IL). L'aparell està equipat amb tres jocs de filtres amb longituds d'excitació de 360, 470 i 546 nm, i una làmpada de Hg de 100 W com a sistema d'il·luminació. El conjunt de filtres utilitzats van ser un joc de filtres GFP (excitació 470/40 nm, emissió 525/50 nm BP) i un joc de filtres de fluorescència verd (excitació 546/10 nm, emissió 590 nm LP). Es va utilitzar un filtre d'excitació de 546 nm per captar l'autofluorescència dels pigments i també es van realitzar observacions amb llum transmesa, concretament contrast interferencial (DIC, acrònim de l'anglès). Es va treballar amb augments de 0.8 x fins a 10 x, i amb imatges d'un format de 1272 x 1017 i 893 x 714 píxels.

3.2.2. Microscòpia de camp clar

La microscòpia de camp clar es va utilitzar per estudiar la morfologia i fer la determinació taxonòmica de la majoria de microorganismes fototròfics. Les observacions es van realitzar amb un microscopi òptic Leica DMRB (Leica Microsystems, Frankfurt, Germany) amb els objectius NPLAN 10X / 0.22 PH1, NPLAN 20X / 0.40 PH1, PL APO 63X / 1.32 oil PH3 i PL FLUOTAR 100X / 1.3 oli d'immersió. Les captacions es van fer amb una CCD Princeton i amb el *software* de captació i anàlisi Metamorph (Universal Imaging Corporation Downingtown, PA, USA). També es van fer servir els microscopis òptics Nikon Optiphot-2 (Tokyo, Japan) i Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipats amb una càmera fotogràfica Nikon FX-35DX i una digital Axiocam MRc5, respectivament.

Observació de cianòfits i cloròfits

Les mostres fresques es van observar directament al microscopi. En alguns casos era necessària la descarbonatació del material atès que les mostres presentaven partícules inorgàniques o que algunes espècies estaven englobades en restes de carbonat càlcic, fet que en dificultava l'observació. La descarbonatació del material es realitzava amb àcid acètic glacial diluït en aigua al 10 % o amb àcid clorhídric (0,1 M) segons el tipus de mostra, i després d'alguns minuts es podia procedir a l'observació de la mostra al microscopi òptic.

Una altra part del material era fixat amb glutaraldehid al 2,5 % en tampó cacodilat al 2 %, ajustat a pH= 7,4.

Per conèixer les dimensions cel·lulars es va utilitzar un micròmetre ocular col·locat en el mateix microscopi òptic. Normalment es realitzaven com a mínim entre 15 i 20 mesures d'individus de la mateixa espècie per realitzar-ne una posterior descripció.

Es va utilitzar blau de metilè i lugol per facilitar l'observació de les beines dels cianobacteris i els pirenoids i flagels dels cloròfits, respectivament.

Observació de diatomees

La taxonomia de les diatomees es basa principalment en l'ornamentació del frústul i en la forma dels plasts. Per aquesta raó, es van realitzar observacions de mostres fresques, per tal de recaptar tota la informació possible sobre els plasts de les diatomees i, posteriorment, es va procedir a l'eliminació de carbonats [1] i de la matèria orgànica amb peròxid d'hidrogen per poder observar els frústuls.

Eliminació de carbonats

Els carbonats es dissolen amb àcid clorhídric, que dissol els precipitats de ferro i a la vegada trenca les colònies de diatomees [2].

- Afegir unes gotes d'àcid clorhídric (1N) a concentració 1:1. El material carbonatat es dissoldrà produint escuma. Remenar i deixar reposar fins que l'escuma disminueixi. Afegir més àcid clorhídric fins que no es formi més escuma.
- Eliminació de l'àcid clorhídric. Centrifugar a 3.500 rpm durant 2 minuts, o bé deixar sedimentar un dia sencer.
- Treure el sobrenedant, que ha de ser transparent.
- Afegir aigua destil·lada i remenar-la perquè es barregi bé amb la mostra.
- Repetir dos cops el procediment.

Digestió de la matèria orgànica

- Afegir 1 ml (en el cas d'utilitzar tubs de 120 x 11 mm) de peròxid d'hidrogen al 30 %.
- Afegir unes gotes de NH_3 per canviar de pH àcid a bàsic. Esperar uns minuts abans d'escalfar. La reacció forma escuma i triga una mica a aparèixer.
- Escalfar les mostres al bany maria durant 2-3 h a 85° C.
- Al cap d'una hora, sacsejar una mica les mostres i afegir-hi 1 ml més de H_2O_2 . El volum de H_2O_2 afegit ha de ser unes 10 vegades el volum inicial de la mostra, però cal tenir en compte que quedi bona part del tub d'assaig lliure perquè l'escuma pugi sense sobreixir o arribar al tap. Al final, la mostra ha de quedar blanca; si encara té color s'ha de digerir la mostra fins que agafi aquest aspecte.

- Un cop acabada la digestió, omplir el tub amb aigua destil·lada. Durant el primer dia sacsejar de tant en tant la gradeta amb els tubs per alliberar les bombolles de gas que hagin quedat a les parets.-
- Descartar el sobrenedant.
- Rentar amb aigua MilliQ almenys 4 vegades, una vegada cada dos dies.

Muntatge de les mostres

Quan els frústuls van estar nets de matèria orgànica es van realitzar preparacions permanents amb reïna Naphrax (Biological Supplies, U.K.). El Naphrax és un medi de muntatge d'alt índex de refracció (1,7), força diferent al del vidre i al del sílice, i aquest contrast afavoreix la visualització dels frústuls de les diatomees [3]. La quantitat de Naphrax per preparació és molt important. Si se'n posa massa poc (la preparació pràcticament no té color) es perd resolució i no es distingeixen bé les estries.

El protocol seguit va ser el següent:

- Posar unes gotes de mostra cremada sobre un cobreobjectes rodó ajustant-ne la concentració.
- Deixar evaporar en una superfície sense vibracions.
- Afegir unes gotes de dissolvent (toluè) al cobreobjectes i deixar-ho uns 10 minuts, però evitant que es dessequi (el dissolvent ajuda a penetrar el medi d'inclusió).
- S'afegeixen 2 gotes de reïna Naphrax a sobre del cobreobjectes.
- S'agafa el cobreobjectes amb unes pinces, es gira amb un moviment ràpid per evitar que caigui el Naphrax i es posa al mig del portaobjectes, que es col·loca sobre una placa calefactora.
- Es deixa bullir el Naphrax una estona fins que no apareguin més bombolles.
- Es deixa solidificar la reïna uns dies.

3.2.3. Microscòpia de rastreig làser confocal (CSLM)

El microscopi de rastreig làser confocal és una eina desenvolupada els darrers quinze anys; existeix una activitat investigadora molt intensa a fi d'aconseguir millors prestacions i desenvolupar noves tècniques. La majoria d'estudis sobre biofilms, previs al adveniment del CSLM, han consistit en la quantificació i la identificació dels microorganismes constituents. Aquests estudis requereixen la destrucció del biofilm, amb la qual cosa se'n perd la informació de l'estructura espacial, mentre que el CSLM proporciona informació de l'arquitectura i de les heterogeneïtats en l'interior dels biofilms [4] i s'obvien els inconvenients d'altres processats [5, 6].

El CSLM permet realitzar seccions òptiques horitzontals o sagitals de biofilms intactes, vius i de gran gruix i la caracterització i la reconstrucció de la seva estructura tridimensional [7, 8], així com l'observació de les interaccions entre els organismes i les superfícies a les quals s'adhereixen [5]. A més, la combinació d'aquesta tècnica amb l'anàlisi d'imatge digital ha permès determinar el gruix del biofilm, el material reflectiu, l'autofluorescència, la distribució cel·lular, la distribució de les substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), la viabilitat i diferents paràmetres del microambient [9, 10]. La tècnica aporta informació fonamental per poder resoldre els problemes de biodeteriorament i facilita escollir els mètodes de control més adequats. El CSLM es va utilitzar per observar l'estructura tridimensional dels biofilms i la distribució dels microorganismes i de les EPS al seu interior.

Fonament teòric del confocal

El CSLM capta la fluorescència de la mostra (natural o després de marcar-la amb fluorocroms) i permet examinar-la, tant a la superfície com en la seva estructura interna de forma directa, requerint una mínima preparació prèvia del material biològic [11]. Atès que és una tècnica no invasiva, és molt

adequada per estudiar la distribució i l'estratificació dels organismes que formen els biofilms.

La formació de les imatges es porta a terme focalitzant la mostra punt per punt amb un làser extremadament fi i d'alta intensitat. A cada punt focalitzat, se'n mesura la radiació emesa, i el resultat d'aquestes mesures és integrat per a l'obtenció de la imatge global. D'aquesta manera s'aconsegueixen seccions òptiques en diferents plans de la mostra, que poden ser utilitzades independentment per observar una part interna de la mostra o recopilades per fer la reconstrucció i l'anàlisi tridimensional.

La capacitat de captació d'imatges en més d'una longitud d'ona ha fet possible la visualització d'imatges complementàries d'unes mateixes estructures cel·lulars [12].

Aquesta eina també ofereix la possibilitat de captar la llum reflectida per la mostra, amb la qual cosa es poden obtenir imatges de superfícies sense necessitat de marcatge.

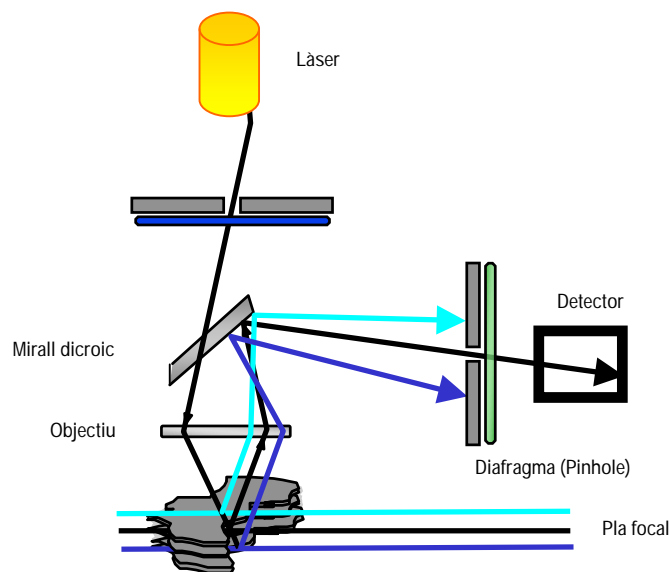


Fig. 3.2.3. Esquema del principi de la microscòpia confocal. La llum procedent dels punts fora del pla focal és eliminada pel diafragma o pinhole.

Preparació de les mostres i protocol d'immunocitoquímica

El material es va observar preferiblement fresc, però atès el gran volum de mostres, una part es va fixar per preservar la integritat i arquitectura del material biològic amb una solució de paraformaldehid al 3 % en tampó fosfat (PB) 0,1 M i es van mantenir en el fixador en tubs de plàstic a 4 °C. El procés va ser el següent:

- Rentat de la mostra amb tampó fosfat salí (PBS) 0,1 M ajustat a pH de 7.4.
- Fixació amb paraformaldehid (PF 3 % en PBS).

Es van fixar un total de dues rèpliques de cada punt i època de l'any. Paral·lelament es van observar les mateixes mostres en fresc.

Els polisacàrids extracel·lulars (EPS o mucíl·lag) que formen part de la matriu del biofilm van ser marcats amb la lectina Concanavalina A (Con-A), una proteïna d'origen no immune que procedeix de *Canavalia ensiformis*, unida al fluorocrom Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) a una concentració final de 0,8 mM. Aquesta lectina s'uneix específicament a polisacàrids que continguin residus de α -D-mannosa i/o α -D-glucosa [13].

El procediment de marcatge amb Con-A és el següent:

- Eliminació del paraformaldehid per aspiració i rentat amb PBS, 3 vegades.
 - Preparació de la solució de Con-A 0,8 mM a partir d'una solució stock 40 mM i PBS (s'ha de fer una dilució 1/50).
 - Eliminació del PBS per aspiració.
 - Tinció de les mostres amb Con-A 0,8 mM durant 1 hora a temperatura ambient i fosc, per conservar millor la fluorescència dels fluorocroms.
- Es van utilitzar 200 μ l aproximadament per a cada mostra. La tinció

d'aquests fragments es va fer en plaques de 8 pous Nunc Lab Teck™ (Nunc Inc., Naperville, IL).

- Eliminació de la solució de Con-A per aspiració i tres rentats amb PBS (10 min. entre els rentats).
- Manteniment de les mostres amb PBS en plaques de Petri cobertes amb paper d'alumini, a 4 °C, fins a la seva observació.

Els àcids nucleics van ser marcats específicament amb el fluorocrom Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que és selectiu del DNA (marca les unions adenina-timina). Tan el DNA com el RNA es van marcar amb el fluorocrom SYTOX Green-S-7020 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR). El SYTOX-Green-S-7020 té la particularitat que només actua sobre les cèl·lules danyades tenyint-ne els àcids nucleics, ja que li és impossible de travessar les membranes de les cèl·lules vives. La utilització d'aquests fluorocroms ha estat més estesa en l'àmbit de la microbiologia que no pas en estudis de cianobacteris i microalgues, on la seva aplicació és de recent aparició [12-16].

Les mostres van ser incubades simultàniament en Con-A i Hoechst 33258, o només en SYTOX-Green atès el solapament del seu espectre d'emissió amb el de la Con-A.

Muntatge de les mostres

El tipus de mostra del qual disposàvem presentava una problemàtica intrínseca per a la seva observació al confocal. Com que es tractaven de substrats rígids, opacs i gruixuts, no sempre es va poder realitzar el muntatge convencional entre porta i cobreobjectes. A més, es volia preservar de forma òptima l'estructura tridimensional de la mostra. Per aquesta raó, les mostres es van muntar en plaques de vuit pous Nunc Lab-Teck™ (Nunc Inc., Naperville, IL) o bé en portaobjectes excavats. En el cas de les mostres vives muntades en portaobjectes, s'utilitzava cera o parafina per segellar la mostra. En el cas de les mostres muntades en plaques Nunc Lab-Teck, s'afegeixen petites

quantitats de PBS sobre la mostra o agar al costat d'aquesta per evitar la dessecació durant l'observació al microscopi.

En el cas de les mostres fixades, es va utilitzar Mowiol amb *antifading* (DABCO) (Sigma, St. Louis, Mo) com a medi de muntatge, per tal de preservar la fluorescència.

Observació de les mostres i captació d'imatges

Per a l'observació de les mostres s'han utilitzat tres tipus de microscopis confocals:

- 1) Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany), equipat amb quatre làsers i tres canals de detecció. Les longituds d'ona d'excitació van ser UV Ar (351 i 364 nm), blau Ar (458, 476 i 488 nm), verd Ar (514 nm), taronja HeNe (543 nm) i vermell HeNe (633 nm). Vam utilitzar objectius d'oli d'immersió Plan Achromat: x10 (0.4 AN), x40 (1.25-0.75 AN), x63 (1.32 AN) i x100 (1.4-0.7 AN).
- 2) Leica TCS-4D (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), equipat amb tres làsers ArKr 75 mV i 2 canals de detecció. Les longituds d'ona d'excitació van ser 488 nm i 568 nm.
- 3) Olympus FW500 (Olympus, Tokyo, Japan), equipat amb tres làsers Ar 488, HeNe 543, HeNe 633-nm, dos canals de fluorescència i un canal DIC. Es van utilitzar els objectius UPLAN APO 20x/0.70, UPLAN APO 40x/0.85 i PLAN APO 60x/1.40 oli d'immersió.

Es van observar la localització dels EPS i dels àcids nucleics, els pigments fotosintètics i les restes inorgàniques. Els pigments fotosintètics presenten autofluorescència natural que ens permet visualitzar la morfologia de l'organisme. La fluorescència natural dels pigments (clorofil·les i ficobiliproteïnes) va ser utilitzada com a marcador per conèixer la distribució de

les microalgues i els cianobacteris dins del biofilm. Es va observar aquesta autofluorescència en el canal vermell (590-800 nm d'emissió) utilitzant les línies de làser HeNe 543- i 633-nm.

Les línies 351- i 364 nm de làser UV Ar es van utilitzar per visualitzar els àcids nucleics marcats amb Hoechst 33258 (emissió = 400-480 nm). La línia 488 nm de làser Ar va ser utilitzada per observar els EPS marcats amb Con-A i els àcids nucleics marcats amb Sytox-Green (emissió = 490-530 nm).

Atesa la riquesa dels diferents substrats sobre els quals es desenvolupen aquests biofilms, es van detectar altres substàncies fluorescentes, com el carbonat càlcic. Per aquesta raó, en alguns casos es va utilitzar el canal de reflexió (excitació = 488 nm i emissió = 480-490 nm) per visualitzar superfícies externes, partícules minerals i/o beines calcificades.

L'observació de l'autofluorescència dels pigments fotosintètics permet visualitzar la morfologia i l'estat dels microorganismes. El marcatge amb Con-A dóna una idea dels mecanismes d'adhesió entre els mateixos microorganismes i entre aquests i el substrat.

Per determinar la relació espacial dels pigments fotosintètics, els EPS i/o els àcids nucleics, les imatges en els diferents canals van ser adquirides de la mateixa zona de forma seqüencial per evitar el solapament dels espectres. Les mostres es van analitzar mitjançant la captació de seccions òptiques horitzontals (x - y) al llarg de l'eix z de la mostra (Fig. 3.2.3), de tal manera que, posteriorment, aquestes seccions podien ser recopilades per fer la reconstrucció xyz de la mostra. Els límits superior i inferior de la captació es van establir utilitzant l'autofluorescència dels pigments (i en alguns casos la fluorescència de la Con-A) com a marcador, prenent com a límits les seccions de la primera a l'última que mostraven fluorescència. D'aquesta manera va ser possible mesurar el gruix de la capa de creixement desenvolupada sobre el substrat analitzat. El nombre de seccions que s'havien de captar, així com la distància entre secció i secció, es van escollir en funció de cada mostra complint el criteri de Nyquist, que determina la densitat mínima de la mostra necessària per capturar tota la informació de la imatge des del microscopi.

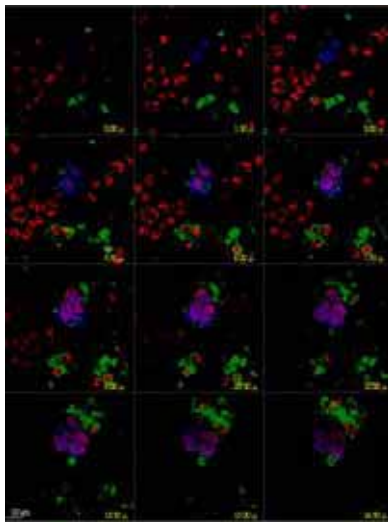
Posteriorment, es recopilaven totes les seccions obtingudes per fer una reconstrucció tridimensional de la mostra. En alguns casos es van fer seccions xz.

Les imatges es van obtenir a 512 x 512 píxels i a 1.024 x 1.024 píxels per captacions on s'utilitzava zoom òptic (1,5 a 3 augments) i era necessària més resolució. Les imatges van ser captades amb un rang dinàmic de 8 bits (256 nivells de grisos).

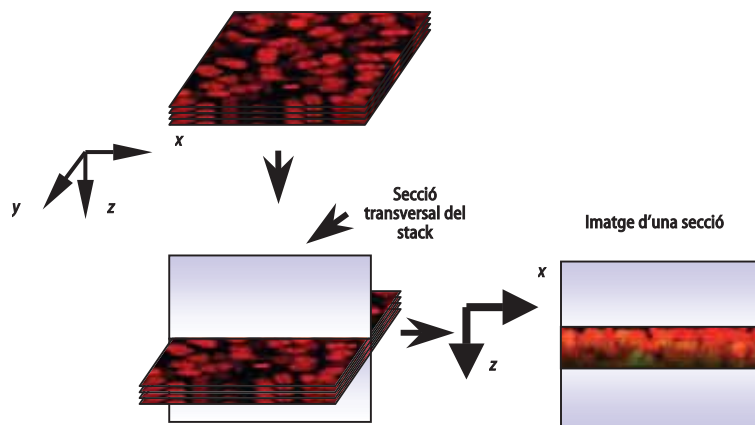
3.2.3.1. Software de processament d'imatge

El processament d'imatges es va realitzar amb el programa informàtic Imaris versió 2.7 (Bitplane AG Zürich, Switzerland) i el de Leica (LCS). El conjunt de seccions òptiques a cada captació amb el CSLM van ser processades mitjançant diferents algorismes per obtenir una única imatge composta [16].

- 1) Galeria: és la presentació més senzilla. Es poden fer per diferents tipus d'*stacks* (*xyz*, *xyλ*, *xyt*, etc).

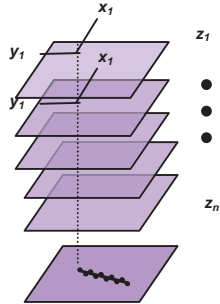


- 2) Seccions ortogonals en diferents eixos: una característica interessant del microscopi confocal és la possibilitat de realitzar seccions transversals de la mostra, que ens permet observar com és l'estructura interna de la mostra sense necessitat de realitzar preparacions complexes. Per realitzar seccions transversals de qualitat necessitem comptar amb una platina motoritzada d'alta precisió que ens permeti realitzar desplaçaments verticals en intervals molt petits, de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$. Fixem el feix de rastreig del làser en un punt en el qual volem realitzar la secció i desplaçant la mostra verticalment n'obtidrem un tall transversal.



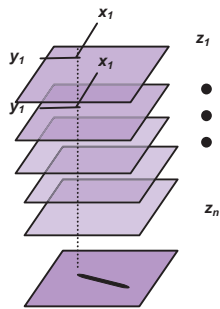
- 3) Projeccions en un sol pla: Existeixen diferents algorismes:

a) Projecció d'intensitat mitjana: suma els valors de grisos de tots els voxels (V) -la paraula prové de la contracció del terme en anglès "volume element" i constitueix la unitat cúbica mínima d'una matriu tridimensional, sent l'equivalent del píxel en un objecte 2D-, amb idèntiques coordenades x - y al llarg de l'eix z i dividit pel nombre de seccions òptiques (N). Aquest tipus de projecció acostuma a produir més soroll de fons a la imatge i, per aquesta raó, ha estat poc utilitzada en el nostre estudi.



$$lp = \frac{\sum_{n=0}^{N-1} V_n}{N}$$

b) Projectió de màxima intensitat: només es projecta a la imatge el voxel (V) en el z-stack que té el valor de grisos més alt.



$$lp = \text{Max}(Vn)$$

c) “*Simulated fluorescence processing*” (SFP): se simula mitjançant algorismes el procés utilitzat en microscòpia de fluorescència d’absorció de la llum del làser i emissió de llum fluorescent a la mostra. El resultat final és una imatge amb una sensació tridimensional molt acusada, però el relleu representat no correspon amb una realitat volumètrica sinó que dependrà dels valors d’intensitat i de la direcció de la llum incident [17, 18].

4) "*Extended projection*": la imatge es divideix en tres marcs, que representen la projecció d'intensitat màxima de fluorescència per als plans x - y , x - z i y - z . Integrant les imatges preses en els diferents plans focals és possible obtenir una imatge de la informació tridimensional en focus.

5) Imatge en perspectiva (*Volume Rendering*): un mètode millor per analitzar i estudiar complexes relacions espacials és la realització de reconstruccions tridimensionals on es pot visualitzar el volum de dades des de diferents angles. N'hi ha també de diferents tipus i és necessari realitzar càlculs matemàtics més complexos. La tècnica *Volume Rendering* va ser la més utilitzada i va permetre la visualització de l'objecte partint d'imatges transversals. Cada imatge transversal està composta per una matriu bidimensional de píxels, cadascú amb una posició (x, y) . Si es col·loquen les imatges una sobre de l'altra, els píxels de cada imatge estan alineats amb els seus corresponents píxels de la mateixa posició (x, y) a dalt i a baix. Així doncs, es poden etiquetar els píxels amb coordenades tridimensionals. Aquests mantenen les seves coordenades originals (x, y) i en prenen una de nova, z . La coordenada z és simplement el nombre de talls amb què estan associats els píxels. D'aquesta manera, es representen tots els píxels de totes les imatges de talls de l'objecte en una imatge tridimensional única.

3.2.3.1. Software de quantificació

Aquests programes quantifiquen imatges a partir d'una sèrie de paràmetres donant suport a la posterior caracterització de l'estructura i la morfologia dels biofilms. S'ha implementat un *software* per calcular funcions específiques referents als biofilms (biovolum, distribució de biomassa, gruix mitjà, distribució del gruix, rugositat, porositat i distribució de la porositat i cobertura de la superfície) que s'adaptés a les característiques informàtiques que presentaven els z-stacks captats amb el confocal (Annex). També s'ha utilitzat un altre *software*, anomenat Metamorph (Universal Imaging Corporation Downingtown, PA, USA) per fer comparacions en intensitat de fluorescència entre diferents condicions.

3.2.3.3. Determinació de pigments fotosintètics

Hem treballat amb un confocal amb un detector espectral que permet obtenir un espectre real de l'emissió del fluorocrom. Hem utilitzat aquesta funció per obtenir els espectres dels pigments fotosintètics de les diferents espècies de cianobacteris i microalgues que es troben en els biofilms [19] i, a més, hem pogut analitzar les diferències en els espectres quan aquestes es trobaven sotmeses a diferents condicions [20].

Per obtenir l'espectre d'emissió es defineix un rang de valors de longituds d'ona dins de les quals prendrem imatges, a continuació es defineix el nombre d'imatges i finalment l'interval per a cada imatge. Com a resultat tindrem una sèrie d'imatges ($x-y-\lambda$ stack) que ens mostren la intensitat de fluorescència per a cada interval. La variació d'intensitat va ser representada amb una escala pseudocolor. Els colors càlids, com el blanc i el vermell, representaven les intensitats màximes, mentre que els colors freds, com el blau, representaven les intensitats més baixes. Per a l'anàlisi de la fluorescència es van escollir regions d'interès (ROIs) d' $1\mu\text{m}^2$ de la zona dels tilacoids a cada $x-y-\lambda$ stack d'imatges. Si realitzem un gràfic de les intensitats

obtindrem l'espectre real d'emissió d'aquesta mostra i/o fluorocrom (Fig. 3.2.3.3).

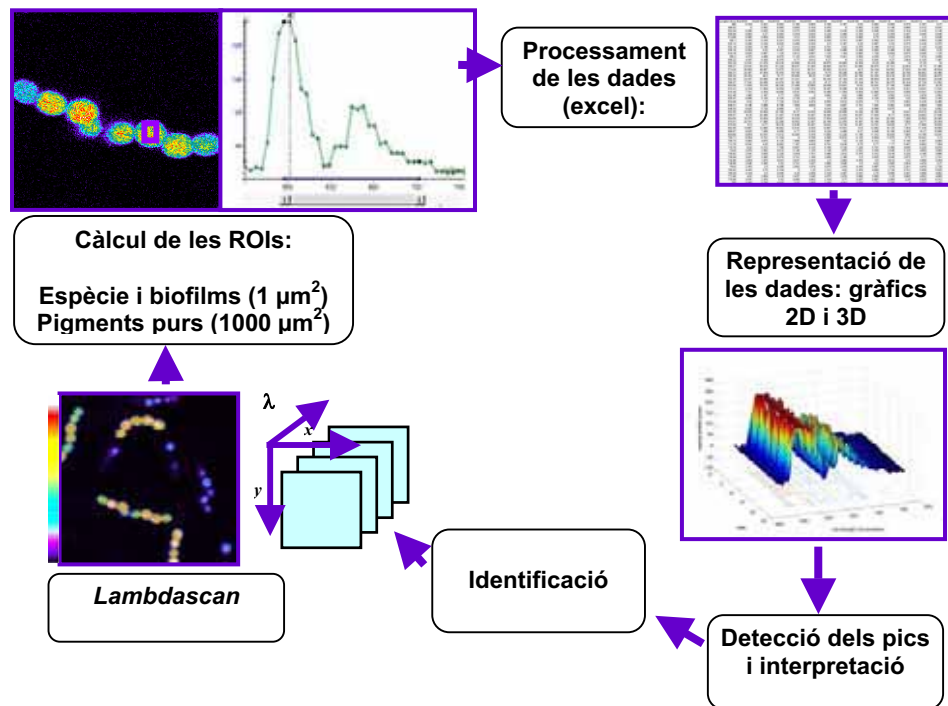


Fig. 3.2.3.3. Esquema dels passos que cal seguir per a la determinació dels espectres dels pigments.

3.3. Microscòpia electrònica

3.3.1. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

Les imatges en microscòpia electrònica de rastreig tenen una gran profunditat de camp, amb la qual cosa produeixen una característica aparença en tres dimensions, que va permetre examinar la topografia de la superfície i la distribució dels microorganismes, així com monitoritzar les interaccions entre el biofilm i el substrat. També es va utilitzar el SEM per a la identificació de les diatomees, ja que les ornamentacions dels frústuls són un caràcter taxonòmic indispensable per a la seva caracterització.

El microscopi utilitzat va ser un HITACHI S-2300 (Hitachi LTD, Tokyo, Japan), que operava a un voltatge entre 5 i 7,5 Kv, segons la natura de la mostra, i a una intensitat de 75 pA.

Per a l'anàlisi dels materials sobre els quals creixien els biofilms es va utilitzar un microscopi de rastreig acoblat a un detector de Raigs-X (Energy Dispersive Spectroscopy EDS, Detector LFD aprox. 1 Torr (EDAX). Oxford INCA), per tal de determinar-ne la composició química.

Preparació i observació de cianobacteris i cloròfits

Per a l'estudi dels microorganismes i l'anàlisi dels substrat al microscopi electrònic de rastreig s'han utilitzat diferents tècniques: impregnació amb vapors d'acroleïna i osmi, deshidratació seguida de punt crític i criodeshidratació.

Per a l'estudi del material al microscopi electrònic de rastreig, inicialment es va utilitzar el mètode d'assecamment en punt crític (CPD). Aquest mètode permet obtenir una mostra anhidra sense distorsionar la forma original. La mostra es fixa i, posteriorment, se substitueix l'aigua per un solvent de tensió superficial més baixa que és el que s'evapora [21].

El protocol és el següent [22]:

- Les mostres es van fixar en glutaraldehid 2 % en tampó cacodilat 0,1 M durant 1-3 hores.
- A continuació es van deshidratar amb un gradient creixent d'etanol (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % i absolut), en el qual es van realitzar els canvis cada 5 minuts aproximadament.
- El següent pas va ser submergir-les dues vegades entre 5 i 10 minuts en acetat d'amil (líquid d'intercanvi), per posteriorment assecar-les a punt crític.
- A continuació les mostres es recobreixen amb una capa de carboni i, finalment, d'or.

El biofilm mostra una estructura arborescent que es col·lapsa perdent la seva arquitectura tridimensional quan se submergeix en fixadors aquosos. Les tècniques de preparació de mostres, com la fixació química seguida d'un assecament per punt crític o la immersió en nitrogen líquid seguida d'una criodeshidratació, causen sovint col·lapse de l'estructura del biofilm. Per evitar artefactes en el procés de fixació es va desenvolupar un nou mètode per estudiar els biofilms secs [23]. Aquest mètode es basava en la impregnació de vapors d'acroleïna i osmi, prèviament descrits per estudis de TEM de fixació química de material sec [24, 25]. L'acroleïna és un fixador que penetra molt ràpid amb una especial afinitat per les proteïnes. El tetraòxid d'osmi fixa específicament les membranes lipídiques, dóna el millor resultat en fixació amb vapors [26] i al mateix temps augmenta la conductivitat de l'espècimen. El biofilm va ser prefixat en vapors d'acroleïna en una cambra tancada amb silicagel durant 10 dies. La postfixació va ser portada a terme per a vapors de tetraòxid osmi a la mateixa cambra durant 5 dies més. Les mostres van ser recobertes amb una capa de carbó i, finalment, després de l'anàlisi dels elements, d'or, utilitzant un portamostres rotatori. Comparant aquesta tècnica amb les altres dues, vàrem observar que els biofilms mostraven una disminució

de les càrregues electrostàtiques i una excel·lent preservació de la seva estructura tridimensional.

Preparació i observació de diatomees

Amb la finalitat de facilitar la identificació de les diatomees (paral·lelament a l'observació amb el microscopi òptic de la morfologia dels cloroplasts en mostres fresques), es va procedir a la digestió de la matèria orgànica que acompanya els frústuls de naturalesa silícica. Es van eliminar els carbonats i la matèria orgànica seguint el mateix procediment que per a la microscòpia òptica.

Les mostres de diatomees cremades en forma de suspensió aquosa es van deixar sedimentar i assecar sobre filtres de policarbonat. Els filtres es van enganxar sobre portaobjectes d'alumini i les mostres van ser metal·litzades amb or mitjançant un portamostres rotatori.

3.3.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

Per últim, el microscopi electrònic de transmissió va ser utilitzat principalment per detectar canvis fisiològics en els diferents microorganismes estudiats i conèixer-ne l seva estructura cel·lular i subcel·lular interna. Les observacions es van portar a terme amb un microscopi Hitachi H800MT operant amb un voltatge de 100 kV.

Es va seguir el següent protocol [27]:

- Les mostres es van fixar amb una mescla de glutaraldehyd (2,5 %) i paraformaldehyd (2 %) en tampó cacodilat 0,1 M (pH= 7,2) durant dues hores.
- Rentats successius de la mostra en tampó cacodilat, per eliminar-hi el fixador.

- Rentat una vegada amb HCl 1M per eliminar el carbonat càlcic en les mostres carbonatades.
- Postfixació en tetròxid d'osmi 1 % en el mateix tampó durant dues hores aproximadament.
- Rentats successius de la mostra en tampó cacodilat, per eliminar-hi l'osmi.
- Deshidratació en un gradient creixent d'acetona.
- Inclusió en reïna Spurr (AG, Fluka).
- Es van fer talls ultrafins de 70 nm amb un ultramicròtom (Reichert-Jung, Nusslach, Germany).
- Les seccions es van contrastar amb 2 % d'acetat d'uranil i citrat de plom, tal com va ésser descrit per Reynolds [28].

3.4. Recol·lecció i conservació de biofilms

Les mostres de biofilms s'han recollit de coves i avencs i de superfícies il·luminades artificialment a diferents ambients hipogeus. Els fragments dels biofilms es van raspar dels diferents substrats o es van mostrejar trossos de substrat colonitzat (Fig. 3.4.a.). Les pedres petites es van col·locar in situ en plaques de Petri estèrils amb una capa de 2 mm de gruix de medi BG11 [29] al 10 % de concentració de nutrients, solidificat amb agar (1 %, Merck) i les mostres més grosses en pots estèrils amb 10 ml de BG11 solidificat amb agar a l'1,2% per mantenir la humitat. També in situ es varen fer raspats de les parets, que es van recollir en plaques de Petri amb medis de cultiu diferents per realitzar cultius d'enriquiment. En el cas de les mostres líquides es varen utilitzar pots de plàstic estèrils.

Una vegada observades les mostres conservades en agar, les espècies que van créixer es van ressemar en el medi adient depenent de si es tractava de cloròfits o cianobacteris, per tal d'identificar-los (Fig. 3.4). Els cianobacteris s'han ressebrat en medi BG11 [30] i els cloròfits han estat sembrats en el medi de cultiu BBM [31].



Fig. 3.4. Cultiu de diferents espècies en medis BG11 o BBM.

Els cultius es van mantenir a la cambra a una temperatura de 19-20 °C i una irradiància aproximada de 5-15 μ Einstein/ m²·s. En el cas de les diatomees, no ha estat necessària la ressebra perquè la microscòpia òptica, tant de material fresc com de fixat, i la microscòpia de rastreig eren suficients per a la identificació de les diferents espècies. Per a la conservació i, la posterior identificació dels cianobacteris trobats als ambients hipogeu, es van realitzar cultius d'enriquiment en medi sòlid.

Medi BG11

*Solucions *stock* de macronutrients (per preparar 250 ml de solució)

NaNO ₃	37,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,87 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,9 g
Na-Citrat	0,15 g
Na ₂ CO ₃	0,5 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,0 g

*Solució *stock* Vitamina B12

5 mg en 250 ml d'aigua MQ

*Solució *stock* de citrat ferro-amoni

0,6 g en 100 ml d'aigua MQ

*Solució de micronutrients (per preparar 100 ml)

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,8 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,39 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,049 g

Per preparar un litre de medi de cultiu es van prendre 10 ml de cadascuna de les solucions *stock* de macronutrients i 937 ml d'aigua Milli-Q. Posteriorment, es va afegir 1 ml de la solució de vitamina B12, citrat ferro-amònic i micronutrients. El litre de medi es va repartir en 4 erlemenyers de 250 ml afegint a cadascun 1,8 g d'agar.

Es va esterilitzar a l'autoclau, a 120 °C, durant 20 min. Quan es va poder manipular, es va emplaçar en una cambra estèril de flux laminar.

Medi BBM

*Solucions *stock* de macronutrients (per preparar 400 ml de solució).

NaNO ₃	10 g
KH ₂ PO ₄	7 g
K ₂ HPO ₄	3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 g
NaCl	1 g

*Solució *stock* EDTA

50 g EDTA + 31 g KOH + Aigua destil·lada fins a 1000 ml

*Solució *stock* Fe

4,98 g FeSO₄ · 7 H₂O en 1000 ml aigua bidestil·lada acidificada

*Solució *stock* B

11,42 g H₃BO₄ en 1000 ml d'aigua bidestil·lada acidificada

*Solució *stock* de micronutrients (per preparar 100 ml)

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,882g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,144g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,118g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,157g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,49 g

*Aigua bidestil·lada acidificada

999 ml + 1 ml H₂SO₄ concentrat

Es van prendre 10 ml de cadascuna de les solucions de macronutrients per 935 ml d'aigua destil·lada i 1 ml de cadascuna de les solucions restants. Es va barrejar amb 12 g d'agar i es va esterilitzar a l'autoclau durant 20 minuts a 120 °C.

3.5. Referències

- [1] Sterrenburg, F. A. S. 2000. Cleaning primer 1. In *DIATOM-L*. Research on the diatom algae. [on line], 2000/31/01. Last Access: [02/11/2003]. Available at <http://listserv.indiana.edu/archives/diatom-l.html>.
- [2] Renberg, I. 1990. A procedure for preparing large sets of diatoms slides from sediment cores. *J. Paleolimnol.* 4:87-90.
- [3] Round, F. E. 1990. Morphology, ecology and taxonomoy, two examples of their interaction in diatoms. In Ricard, M. (Ed.) *Ouvrage dédié à la Mémoire du Professeur Henry Germain (1903-1989)*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, pp. 223-234.
- [4] Davey, M. E. & O'Toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847.
- [5] Lawrence, J. R. & Neu, T. R. 1999. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol.* 310:131-44.
- [6] Neu, T. R. & Lawrence, J. R. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24:11-25.
- [7] Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lawrence, J. R. 1992. Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Meth.* 15:249-261.
- [8] Roldán, M., Clavero, E. & Hernández-Mariné, M. 2003. Aerophytic biofilms in dim habitats. In C. Saiz-Jiménez (Ed.), *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Swets & Zeitlinger, Lisse. pp. 163-169.
- [9] Neu, T. R, Kuhlicke, U. 2001. Anwendungen der 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie in der Mikrobiologie. *BIOspectrum* 7:379-382.
- [10] Neu, T. R, Kuhlicke, U. & Lawrence, J. R. 2002. Assessment of fluorochromes for twophoton laser scanning microscopy of biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:901-909.

- [11] Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., Caldwell, S. J. & Caldwell, D. E. 1994. Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2):434-446.
- [12] Porta, D., Rippka, R. & Hernández-Mariné, M. 2000. Unusual ultrastructural features in three strains of *Cyanothece* (Cyanobacteria). *Arch. Microbiol.* 173:154-163.
- [13] Schüßler, A., Meyer, T., Gehrig, H. & Kluge, M. 1997. Variations of lectin binding sites in extracellular glycoconjugates during the life cycle of *Nostoc punctiforme*, a potentially endosymbiotic cyanobacterium. *Eur. J. Phycol.* 32:233-239.
- [14] Hernández-Mariné, M. 1996. Electron microscopic characterization of *Microcoleus chthonoplastes* Thur. (Cyanobacteria). *Arch. Hydrobiol. / Algological Studies* 83:347-365.
- [15] Norton, T. A., Thompson, R. C., Pope, J., Veltkamp, C. J., Banks, B., Howard, C. V., Hawkins, S. J. 1998. Using confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy and phase contrast light microscopy to examine marine biofilms. *Aquat. Microb. Ecol.* 16:199-204.
- [16] Roldán, M., Clavero, E., Castel, S. & Hernández-Mariné, M. 2004. Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* 111:127-143.
- [17] Van Der Voot, H. T. M., Brakenhoff G. J. & Baarslag, M. W. 1989. Three-visualization methods. *J. Microsc.* 153:123-132.
- [18] Messerli, J. M.; Van Der Voort, H. T. M.; Rungger-Brändle, E. & Perriard, J. C. 1993. Three-Dimensional Visualization of Multi-Channel Volume Data: The am SFP Algorithm. *Cytometry* 14:725-735.
- [19] Roldán, M., Thomas, F., Castel, S., Quesada, A. & Hernández-Mariné, M. 2004. Non invasive pigment identification in living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrophotometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6):3745-3750.

-
- [20] Roldán, M., Oliva, F., González del Valle, M. A., Saiz-Jiménez, C., Hernández-Mariné, M. 2006. Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 3026-3031.
- [21] Mercer, E. H., Birbeck, M. S. C. 1974. Manual de microscopía electrónica para biólogos. Ed Blume, Madrid.
- [22] Ariño, X. 1996. Estudio de la colonización, distribución e interacción de líquenes, algas y cianobacterias con materiales pétreos de los conjuntos arqueológicos de Baelo Claudia y Carmona. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona-Sevilla, 255 pp.
- [23] Hernández-Mariné, M., Martínez, G., Domínguez, A., Fontarnau, R., Cortadellas, N. SEM studies of arborescent aerophytic biofilms. Use of acrolein and osmium vapour impregnation. *Microscopy*. pp. 334-335.
- [24] Öpik, H., 1985. The fine structure of some dry seed tissues observed after completely anhydrous chemical fixation. *Ann. Bot.* 56, pp. 453–466.
- [25] Thomson W. W, Platt K. A. 1997. Conservation of cell order in desiccated mesophyll of *Selaginella lepidophylla*. *Ann. Bot.* 79:439–447.
- [26] Hayat, M. A. 1989. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 469.
- [27] Hernández-Mariné, M. 1992. A simple way to encapsulate small samples for processing for TEM. *J. Microsc.* 168: 203-206.
- [28] Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212.
- [29] Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:3-28.
- [30] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- [31] Chantanachat, S. & Bold, H. C. 1962. Phycological studies II. Some algae from arid soils. Publication nº 6218. University of Texas, Austin, Texas.

