

CAPÍTOL 4

CARACTERITZACIÓ DE BIOFILMS MITJANÇANT TÈCNiques DE MICROSCÒPIA

Capítol 4 | Caracterització de biofilms mitjançant tècniques de microscòpia

4.1.	INTRODUCCIÓ	176
4.1.1.	TÈCNIQUES DE MONITORITZACIÓ DE BIOFILMS	176
4.2.	MATERIAL I MÈTODES	178
4.2.1.	TINCIÓ DIRECTA DE BIOFILMS	178
4.2.2.	MICROSCÒPIA DE LES MOSTRES	180
4.2.3.	ANÀLISI DE L'ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DELS BIOFILMS	184
4.3.	RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG I: SANT MARTÍ (BESÓS)	185
4.3.1.	MICROSCÒPIA DELS BIOFILMS	185
4.3.2.	VIABILITAT DE LES POBLACIONS ALS BIOFILMS	192
4.3.3.	ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DELS BIOFILMS: GRUIX.	195
4.4.	RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG II: SABADELL	196
4.4.1.	MICROSCÒPIA DELS BIOFILMS	196
4.4.2.	VIABILITAT DE LES POBLACIONS ALS BIOFILMS	202
4.4.3.	ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DELS BIOFILMS: GRUIX.	203
4.5.	RESULTATS A LA ZONA DE MOSTREIG III: XARXA DE DISTRIBUCIÓ D'AIGUA POTABLE (LAB. MICROBIOLOGIA EUOOT-UPC)	203
4.5.1.	MICROSCÒPIA DELS BIOFILMS	203
4.5.2.	VIABILITAT DE LES POBLACIONS ALS BIOFILMS	205
4.5.3.	ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DELS BIOFILMS: GRUIX.	206
4.6.	DISCUSSIÓ	207
4.6.1.	IDONEÏTAT DE LES TÈCNIQUES MICROSCÒPIQUES UTILITZADES	207
4.6.2.	ARQUITECTURA DELS BIOFILMS DESENVOLUPATS ALS REACTORS	208
4.6.3.	VIABILITAT DE LES POBLACIONS ALS BIOFILMS	211
4.7.	BIBLIOGRAFIA	213

4.1. Introducció

Gran part de les limitacions en la comprensió dels biofilms s'han produït per la manca de tècniques adequades per al seu estudi. Històricament, l'anàlisi dels biofilms ha necessitat de l'evolució de reactors pel seu cultiu sota condicions controlades, així com del desenvolupament de mètodes analítics per avaluar la presència microbiana. Gran part de la metodologia utilitzada ha requerit el mostreig destructiu del biofilm, sense proporcionar informació de l'estructura espacial i de les heterogeneïtats fisiològiques dins dels biofilms. D'altra banda, els mètodes microbiològics clàssics no poden obviar el fet que molts dels bacteris poden entrar en un estat fisiològic viable però no cultivable (Rozak & Colwell 1987). A més, els mètodes clàssics són especialment inadequats per a l'estudi dels biofilms sotmesos a desinfecció, perquè els recomptes de viables en placa sobreestimen l'eficàcia de l'activitat biocida (McFeters et al. 1995b).

L'estudi dels biofilms requereix un sistema adequat per al seu desenvolupament. Un dels primers sistemes utilitzats amb aquesta finalitat va ser l'aparell de Robbins (Lappin-Scott & Costerton 1989), un reactor tubular amb una sèrie de mostrejadors on és possible situar diferents superfícies exposades a un medi de cultiu circulant amb algun organisme. Aquest aparell es va utilitzar per establir l'eficàcia de tractaments amb biocides en el control de la colonització microbiana de superfícies. L'èxit de l'aparell de Robbins va estimular el desenvolupament de diferents dissenys i variants de reactors per al desenvolupament dels biofilms. Entre d'altres, s'han utilitzat reactors de llit empaquetat i filtres de percolació, reactors de llit fluiditzat, reactors de flux continu en agitació (Peyton & Characklis 1995), reactors de flux radial i reactors de rotació anular o roto-torque (Gjaltema & Griebel, 1996), reactors de canal obert (Peyton & Characklis 1995) i contactors biològics rotacionals (Gilbert & Allison 1993).

4.1.1. Tècniques de monitorització de biofilms

Una vegada es disposa de la quantitat de biofilm necessària s'imposa l'elecció d'un mètode per portar a terme el seu seguiment. En principi, la gran varietat de tècniques i sistemes experimentals utilitzats i la manca d'estandardització han dificultat el poder extreure conclusions i comparar entre els diferents resultats obtinguts.

El desenvolupament dels biofilms en les seves etapes inicials s'ha estudiat utilitzant cel·les de flux (Mittelman et al. 1992), les quals permeten l'observació microscòpica directa del substrat. Aquests aparells proporcionen la fàcil visualització de la formació dels biofilms controlant alhora les condicions hidrodinàmiques del medi (Bryers 1993).

Alguns mètodes impliquen l'extracció del biofilm de la superfície per monitoritzar diferents paràmetres específics. Així s'ha analitzat l'heterogeneïtat, determinant l'existència de gradients en la concentració de cèl·lules totals, la concentració d'espècies individuals i la concentració local de diferents nutrients dissolts (Bryers 1993).

Un dels mètodes més utilitzats actualment és la tinció dels components del biofilm amb fluorocroms específics (Kepner & Pratt 1994, McFeters et al. 1995a). S'han utilitzat diferents colorants pel recompte de cèl·lules totals i cèl·lules viables (McFeters et al. 1995a) i observació amb microscòpia d'epifluorescència (Schaule et al. 1993, Yu & McFeters 1994, Huang et al. 1998), citometria de flux (Porter et al. 1996, Nebe-von Caron et al. 1998) i determinació de l'activitat enzimàtica (Yamaguchi & Nasu 1997). L'aplicació de colorants fluorogènics específics conjuntament amb la microscòpia d'epifluorescència es pot utilitzar per visualitzar els biofilms directament sobre el substrat i analitzar l'heterogeneïtat fisiològica (Yu & McFeters 1994), especialment quan es tracta de biofilms prims. Per biofilms més gruixuts es pot recórrer a la seva congelació (crioinclusió) i a la posterior realització de seccions fines dels mateixos (criosecció), fet que permet mantenir la seva integritat estructural (Huang et al. 1996) alhora que s'utilitzen les tincions habituals.

Entre les diferents tècniques immunològiques cal destacar la tinció amb anticossos monoclonals marcats amb isotiocianat de fluoresceïna o FITC (Stewart et al. 1997). Malgrat la gran especificitat d'aquesta tècnica, la preparació dels anticossos monoclonals requereix l'aïllament previ del microorganisme, el seu cultiu pur i la immunització d'un animal.

La utilització de **tècniques invasores però no destructives** s'ha centrat en les proves químiques amb microsensors, les quals permeten analitzar els perfils de concentració de diferents soluts dins del biofilm (Lewandowski et al. 1991). S'han desenvolupat microsensors (grandària de la punta < 10 µm) per a l'oxigen dissolt, glucosa, pH, amoni, etc.

Altres mètodes no requereixen la destrucció de l'estructura dels biofilms, com en el cas de la conductància de Malthus (Flint et al. 1997), el marcatge amb substractes radioactius i posterior visualització amb microautoradiografia, tècnica que permet determinar els grups de cèl·lules que creixen activament (Pollard et al. 1995) i el recompte directe de viables in situ (in situ DVC). Aquest últim mètode determina la viabilitat dels bacteris individuals en base a l'elongació cel·lular en un medi de creixement adequat que conté un antibiòtic del grup de les quinolones, generalment l'àcid nalidíxic (Kogure et al. 1979, Yu et al. 1993).

No obstant, els avenços més importants en l'estudi dels biofilms s'han realitzat en l'àrea de la **diagnosi no invasora i no destructiva**. La ressonància magnètica nuclear i la velocimetria d'imatges de partícules (PIV) han permès visualitzar el perfil de velocitats d'un flux laminar en un sistema artificial on s'havia desenvolupat un biofilm, estimant les velocitats locals del fluid (Lewandowski et al. 1992). Les determinacions realitzades mostren com la velocitat no arriba a zero a la superfície del biofilm i, a més, es pot detectar flux convectiu a l'interior dels propis biofilms, dins dels canals d'aigua (Lewandowski et al. 1992, 1994).

D'altra banda, les característiques químiques a nivell molecular de la interfase entre les cèl·lules i el substrat s'han pogut determinar amb la tècnica de la reflectància atenuada total (ATR) i espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FT-IR) (Bremer & Geesey 1991). A més, mesures electroquímiques amb un elèctrode vibrador de rastreig (SVE) han permès mapejar l'electroquímica de certes superfícies metàl·liques. Els primers estudis semblen indicar que les zones colonitzades són anòdiques, mentre que les zones lliures correspondrien a zones catòdiques. Aquestes diferències poden constituir un mecanisme que facilitaria la corrosió influïda per microorganismes (Costerton et al. 1995).

Sens dubte, la tècnica més utilitzada actualment és l'observació directe dels biofilms amb microscòpia confocal làser de rastreig (CSLM) i tinció amb fluorocroms (Lawrence et al. 1991). Amb aquest microscopi es poden realitzar seccions òptiques – horitzontals o sagitals – de biofilms vius plenament hidratats i intactes, les quals permeten reconstruir l'estructura en 3D dels mateixos biofilms. A la naturalesa episcòpica de la microscòpia confocal que permet examinar biofilms cultivats en diferents materials, s'ha d'afegir la seva capacitat per eliminar les àrees fora de focus de cada pla. Utilitzat conjuntament amb les diferents sondes fluorescents moleculars pot proporcionar informació detallada de la morfologia, filogènia i metabolisme cel·lular, així com de l'arquitectura física i química de la matriu del biofilm i dels polímers associats (Costerton et al. 1995).

L'adveniment de diferents sondes cel·lulars i moleculars han completat la versatilitat de la microscòpia confocal, fet que està suposant un impacte considerable en el coneixement de l'ecologia dels biofilms. Cal destacar la hibridació fluorescent in situ (FISH) amb 16S rRNA, que permet la identificació filogenètica de les cèl·lules que formen el biofilm (Amann et al. 1992, 1995, Robinson et al. 1995, Boye et al. 1995). Aquestes sondes moleculars, en conjunció amb la microscòpia confocal es poden utilitzar per catalogar – en alguns casos fins a nivell de subespècie –, la biodiversitat genètica que existeix als biofilms.

4.2. Material i Mètodes

4.2.1. Tinció directa de biofilms

S'han realitzat diferents proves per tal d'optimitzar la tinció directa dels biofilms amb microscòpia de fluorescència. S'han escollit, provat i optimitzat tres tipus de tincions diferents per aplicar en biofilms desenvolupats a la superfície d'esferes de vidre (5 mm de diàmetre). A la dificultat intrínseca de la tinció i l'observació microscòpica dels biofilms naturals, en aquest cas s'ha afegit la laboriositat del treball amb la superfície de colonització escollida. La Taula 4.1 resumeix les principals tincions utilitzades per a l'observació de mostres de biofilm.

Taula 4.1. Principals tincions utilitzades per l'observació directa de biofilms.

Tinció	Concentració	Màxim Excitació/emissió	Mètode	Referència
<i>Taronja d'acridina</i>	0,01%	503 /530-640 nm	Nº cel. total	Hobbie et al. 1977 Eaton et al. 1995
<i>CTC/Dapi</i>	0,05% CTC	365/602 nm	Nº cel. viables	Yu & McFeters 1994
	1 µg/mL DAPI	347/ 456 nm	Nº cel. total	Huang et al. 1996
<i>Live/Dead</i>	6 µM Syto 9	480/500 nm	Nº cel. viables	Korber et al. 1996
	30 µM iodur de propidi	490/635 nm	Nº cel. total	Molecular Probes 1998a

Tinció amb taronja d'acridina. Aquesta tinció s'ha utilitzat tant per a l'observació directa dels biofilms amb el microscopi d'epifluorescència com amb el microscopi confocal. Les esferes prèviament colonitzades i amb biofilm a la seva superfície, s'han tenyit directament durant 2 minuts amb una solució al 0,01% de taronja d'acridina (Hobbie et al. 1977, Eaton et al. 1995, veure PNT-10 a l'annex). Després de treure l'excés de colorant es fan dos rentats amb tampó fosfat (250 mL d'aigua destil·lada estèril + 3,4 g de KH_2PO_4), i finalment un rentat amb aigua destil·lada estèril. Per poder observar al microscopi la mostra es posava dins d'una cel·la de policarbonat (veure Figura 4.2), s'afegia oli d'immersió i un cobreobjectes al seu damunt. L'observació es realitzava per microscòpia d'epifluorescència, utilitzant un microscopi Nikon Labophot (Izasa-Rego, Barcelona) equipat amb un filtre groc (Nikon B-2A, veure Taula 4.2) i una làmpada de mercuri de 100-w.

Crioinclusió, Tinció amb DAPI/CTC i Crio-secció. Una de les tècniques utilitzades per a l'estudi i observació de biofilms ha estat la crioinclusió i crio-secció, tenyint de forma simultània amb DAPI i CTC (Rodríguez et al. 1992, Yu & McFeters 1994, Huang et al. 1995, 1996, 1998). En primer lloc, es procedia a tenyir la mostra amb CTC al 0,05% durant 2 hores a temperatura ambient, agitant suaument a la foscor (Huang et al. 1996) i després es fixava amb formaldehid al 5% durant 5 min. Les esferes tractades després de la tinció amb CTC i la fixació, es posaven a sobre d'un bloc de neu carbònica i es realitzava la seva inclusió amb medi Tissue-Tek OCT (Miles Incorporated 4583, Elkhart, USA), procurant cobrir només una meitat de l'esfera.

Quan l'agent OCT es tornava completament blanc – senyal de que s'havia congelat –, es treia la mostra sencera i, amb l'ajuda d'un punxó – amb molta paciència i alguns renecs - s'aconseguia separar l'esfera del medi d'inclusió. D'aquesta forma el biofilm quedava separat del medi de suport i només quedava afegir més medi Tissue-Tek OCT a la part exposada del biofilm (veure Figura 4.1) i esperar a la seva congelació. Després de marcar la mostra per saber l'orientació del biofilm i la cara més propera a la superfície del substracte, es podien guardar a -70°C , o es podia procedir a la seva crio-secció.

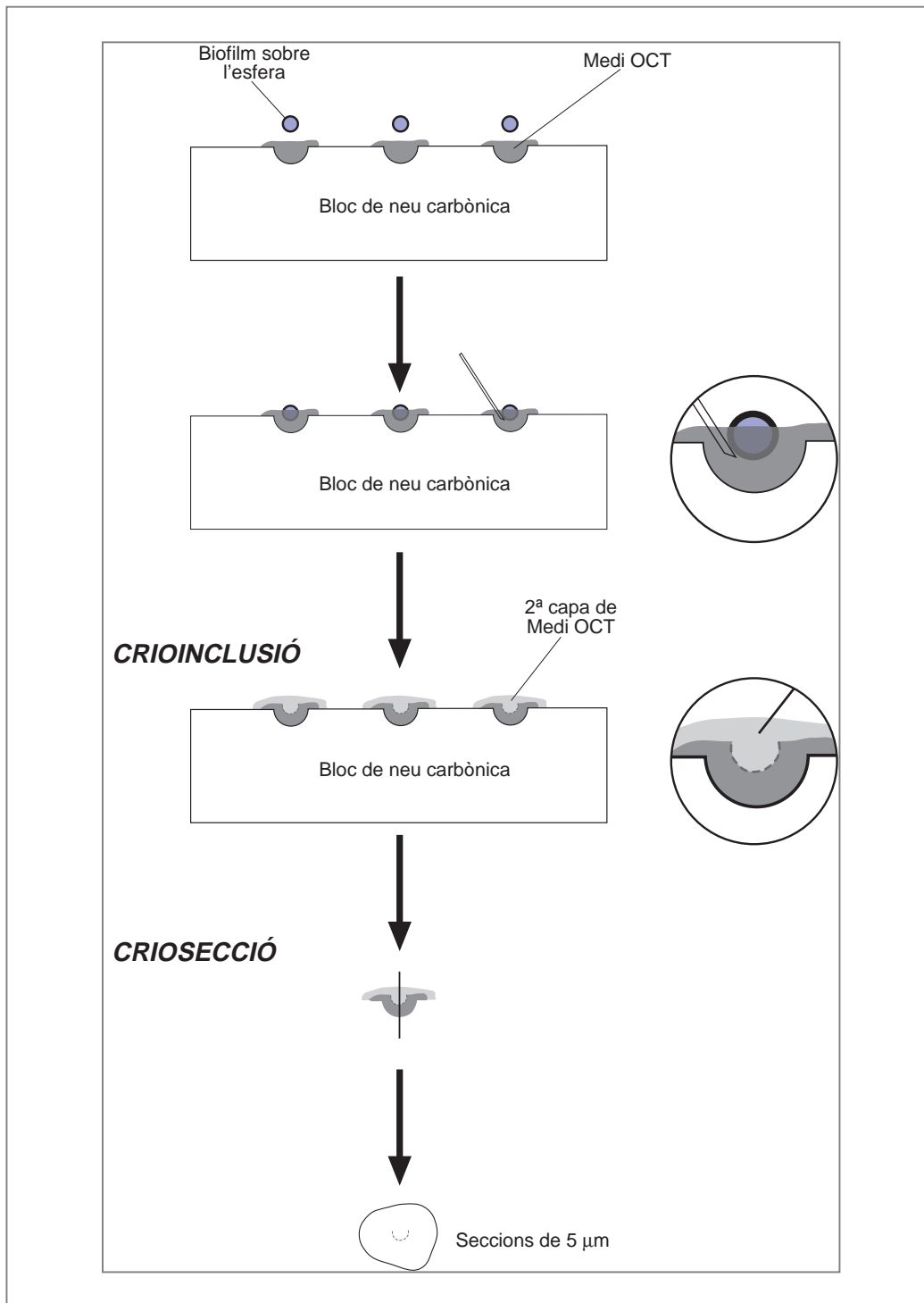


Figura 4.1. Crioinclusió i criosecció de biofilms presents a la superfície d'esferes de vidre.

Els biofilms inclosos dins del medi OCT es tallaven en seccions de 5 µm de gruix amb l'ajuda d'un criotom Leica CM 1800 (Leica Microsystems, Deerfield, USA), i es realitzava el seu muntatge en portes de vidre amb la superfície tractada (Superfrost-Plus Microscope Slides, Fisherbrand 12-550-15, USA). Finalment, s'afegia DAPI a la concentració habitual (1 µg/mL) durant 3 min, es treia l'excés de colorant i s'assecaven les mostres a l'aire. L'observació es va realitzar amb l'ajuda d'un microscopi Nikon Eclipse E-800 amb un cos de filtres pel CTC i un altre pel DAPI (veure Taula 4.2).

Tinció amb Live/Dead. Per a l'observació directa dels biofilms amb el microscopi confocal s'ha utilitzat bàsicament la tinció Live/Dead BacLight (Korber et al. 1996). Després de varies proves s'ha modificat lleugerament el protocol utilitzat per mostres planctòniques (veure 3.2.6 i PNT-13 a l'annex). Les esferes prèviament colonitzades i amb biofilm a la seva superfície, es tenyien directament amb la suficient quantitat de la solució stock de colorant. Després de 15 min d'incubació a temperatura ambient i a la foscor, es treia l'excés de colorant (realitzant un rentat amb tampó fosfat), posant la mostra dins d'una cel·la de policarbonat (veure Figura 4.2). Per poder observar al microscopi s'afegia oli d'immersió a la mostra i un cobreobjectes al seu damunt. L'observació es realitzava utilitzant microscòpia confocal (veure 4.2.2).

4.2.2. Microscòpia de les mostres

La realització de part del treball experimental en tres centres ben diferents, el Center for Biofilm Engineering de la Montana State University, el Laboratori de Microbiologia del Dept. d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya i, finalment, el Laboratori de Fisiologia Ambiental del Dept. de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, ha obligat a utilitzar diferent equipament microscòpic. Per aquest motiu, es detallen a continuació les principals característiques, la utilització donada i la configuració principal per a cada un d'aquests aparells utilitzats.

Microscòpia d'epifluorescència de mostres planctòniques i de biofilm. Gran part del treball experimental ha consistit en l'observació i quantificació de mostres planctòniques, provinents de mostres d'aigua o de biofilms separats del material de suport i disgregats. Part dels experiments i, especialment, la gran majoria de recomptes de mostres planctòniques amb taronja d'acridina – tant de biofilm com d'aigua - s'han realitzat al Laboratori de Microbiologia del Dept. d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya, amb un microscopi d'epifluorescència Nikon Labophot (Izasa-Rego, Barcelona) equipat amb un filtre groc (Nikon B-2A, veure Taula 4.2) i una làmpada de mercuri de 100-w. El mateix microscopi s'ha utilitzat per recomptes amb la tinció Live/Dead (Molecular Probes 1998a) i Live BacLight (Molecular Probes 1998b). Quan ha calgut utilitzar oli d'immersió s'ha utilitzat l'oli Olympus per fluorescència ($n_d=1,516/23^\circ\text{C}$).

Als laboratoris del Center for Biofilm Engineering (Montana State University) es va realitzar gran part del treball de posta a punt i optimització de les tècniques de tinció directa de biofilms, així com també recomptes de mostres planctòniques amb diferents fluorocroms. En aquest centre es va utilitzar el microscopi Olympus BH-2, equipat amb filtres Olympus tipus U, B i G pels recomptes amb DAPI, Live/Dead i Live BacLight, mentre que el microscopi Nikon Eclipse E-800 amb 4 tipus de filtres diferents, per fluoresceïna, CTC, DAPI i taronja d'acridina es va utilitzar per les observacions de crioseccions de biofilms tenyits amb DAPI/CTC (veure Taula 4.2).

Taula 4.2. Configuració dels microscopis d'epifluorescència utilitzats.

Microscopi	Tipus de filtre	Filtre Excitació	Mirall dicroic	Filtre Barrera
<i>Nikon Labophot</i>	Nikon B-2A	450-490	DM-505	BA 520
<i>Nikon Eclipse E-800</i>	Nikon B-2A (AO)	450-490	DM-505	BA 520
	Nikon B-2E/C (FITC)	465-495	DM-505	BA 515-555
	Nikon UV-2E/C (DAPI)	340-380	DM-400	BA 435-485
	CTC	425-475	DM-575	615-645
<i>Olympus BH-2</i>	Olympus U	UG-1	DM-400	L-420
	Olympus B	BP-490	DM-500	AFC + O-515
	Olympus G	BP-545	DM-570	O-590

Observació i Anàlisi de biofilms per microscòpia confocal (CLSM). S'han realitzat observacions al microscopi confocal de diferents mostres de biofilms obtingudes a cada estació experimental. A partir de les seccions òptiques dels biofilms presents a la superfície del material de suport, s'ha obtingut informació tridimensional de l'estructura dels mateixos. En aquest sentit, s'han reconstruït imatges estereoscòpiques, imatges en 3-D i s'han caracteritzat els principals paràmetres de la topografia de la superfície, com es detallarà més endavant.

Les mostres escollides per a l'observació es processaven de la forma habitual. En primer lloc, es procedia a separar els microorganismes planctònics que no estaven adherits de forma irreversible al material de suport, i després es tenyien amb el colorant adequat. Després de realitzar diverses proves amb colorants com el taronja d'acridina, es va optar per utilitzar de forma rutinària la tinció Live/Dead Baclight (veure 3.2.6). S'ha considerat una bona alternativa malgrat la poca informació existent, especialment pel que fa a la seva utilització en la microscòpia confocal de biofilms. Tot i tenir present que es tracta d'una tinció dissenyada originalment per a mostres planctòniques, ha presentat pocs problemes de tinció inespecífica del fons de la mostra i, a més, ha permès realitzar alhora el recompte del total de cèl·lules i de les cèl·lules viables.

L'observació del material de suport emprat, les esferes de vidre plantejava una problemàtica específica, que s'ha hagut de resoldre dissenyant una cel·la de policarbonat transparent de les dimensions d'un portaobjectes però amb 7 mm de gruix i un forat a la seva part central (veure Figura 4.2). Aquest orifici permet aguantar i mantenir cada una de les esferes de vidre seleccionades amb la seva superfície colonitzada pel biofilm, llesta per a la seva observació al microscopi.

La majoria d'objectius utilitzats a la microscòpia confocal són objectius d'immersió amb oli. Per això, s'afegia oli d'immersió a sobre de la mostra, després es posava un cobreobjectes a la part superior i, finalment, s'afegia més oli d'immersió a la part superior del cobreobjectes (veure Figura 4.2), mantenint el mateix líquid ($n_d=1,516$) a totes les parts del muntatge.

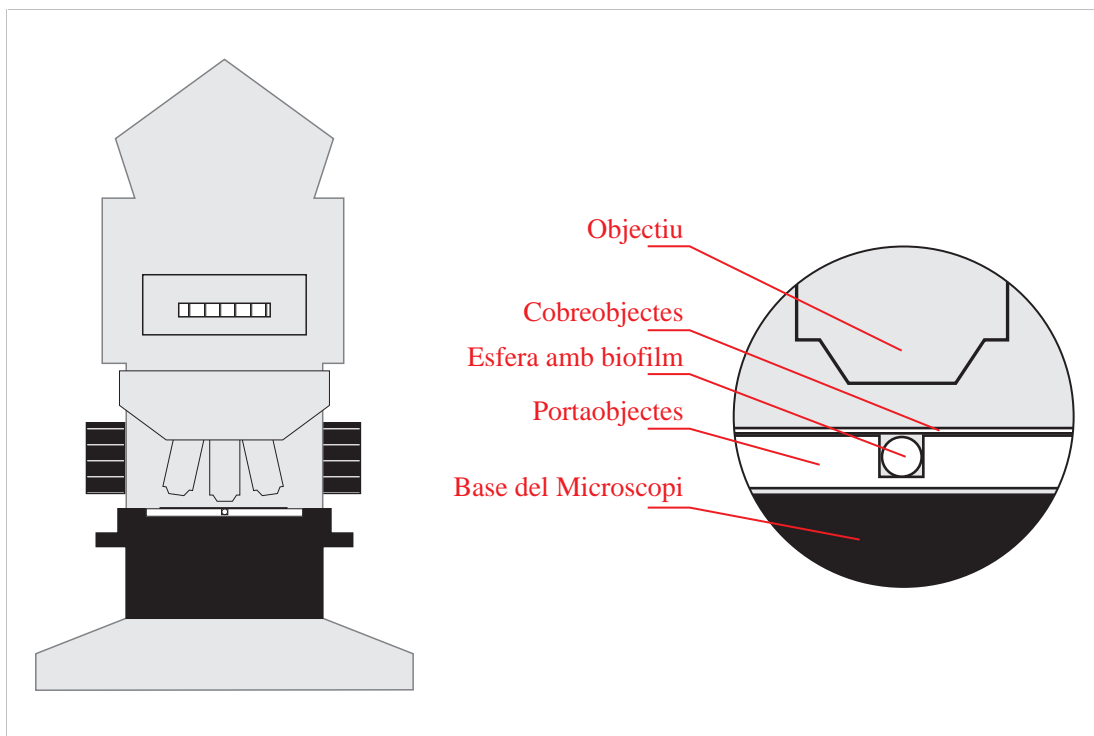


Figura 4.2. Esquema del muntatge per facilitar l'observació al microscopi confocal dels biofilms desenvolupats en esferes de vidre, on cal destacar el portaobjectes de policarbonat, dissenyat per subjectar el material de suport (esferes de vidre) colonitzat pel biofilm.

L'optimització de la metodologia i l'estudi d'algunes de les mostres (enviades per missatgeria urgent) es va realitzar al Center for Biofilm Engineering de la Montana State University. En aquest centre es disposava d'un microscopi confocal Leica TCS-NT (Leica Microsystems, Deerfield, USA), format per un microscopi Leica DMR, amb els objectius HC PL Fluotar 10 x (AN=0,30), HC PL APO 10 x (AN= 0,40), N Plan 20 x (AN= 0,40), PL Fluotar 40 x (AN= 0,40), PL Fluotar L 63 x (AN= 0,70), PL APO 63 x (AN=1,4 OIL) i PL APO 100 x (AN=1,4 OIL). El sistema estava controlat per una unitat processadora Motorola 68020, encarregada del control de totes les funcions. La unitat presentava 3 tipus de làsers: un làser d'argó-kriptó operant a 568 nm, un làser d'argó operant a 488 nm i un làser d'heli-neó operant a 633 nm.

La resta de les mostres es va estudiar al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona, on s'ha treballat amb un microscopi confocal Leica TCS (Leica Microsystems, Barcelona), format per un microscopi Leica DMR, amb els objectius PL Fluotar 40 x (AN= 1,0-0,5 OIL), PL APO 63 x (AN=1,4 OIL) i PL Fluotar 100 x (AN=1,3-0,6 OIL). La unitat presentava un làser d'argó-kriptó operant en tres línies a 488, 568 i 647 nm.

Les mostres es van analitzar atenent a la fluorescència de les cèl·lules del biofilm. Després de seleccionar l'objectiu a utilitzar i la grandària del "pinhole" corresponent per tal d'aconseguir la màxima confocalitat, es van realitzar seccions òptiques del biofilm en el pla focal horitzontal (x-y). Per fer-ho, es buscava en primer lloc la imatge obtinguda per la fluorescència de les colònies presents a la part més externa del suport i, posteriorment, s'anava profunditzant cap a l'interior del biofilm fins que no s'observava cap senyal (veure Figura 4.3). D'aquesta forma, ha estat possible conèixer la profunditat o gruix del biofilm desenvolupat al material de suport. Després d'establir el nombre de seccions òptiques a adquirir i l'interval entre elles, s'ha realitzat la reconstrucció de la morfologia estructural del biofilm, així com la seva topografia. També es van obtenir imatges del biofilm a partir de seccions efectuades en el pla vertical x-z.

Les imatges es van adquirir generalment amb dos canals, proporcionant imatges de l'emissió de fluorescència verda i vermella del mateix camp microscòpic, o tres canals quan s'afegia la auto-fluorescència blava de certs materials del fons de les mostres. Les imatges obtingudes a cada canal s'han combinat digitalment per realitzar les mesures oportunes en cada cas.

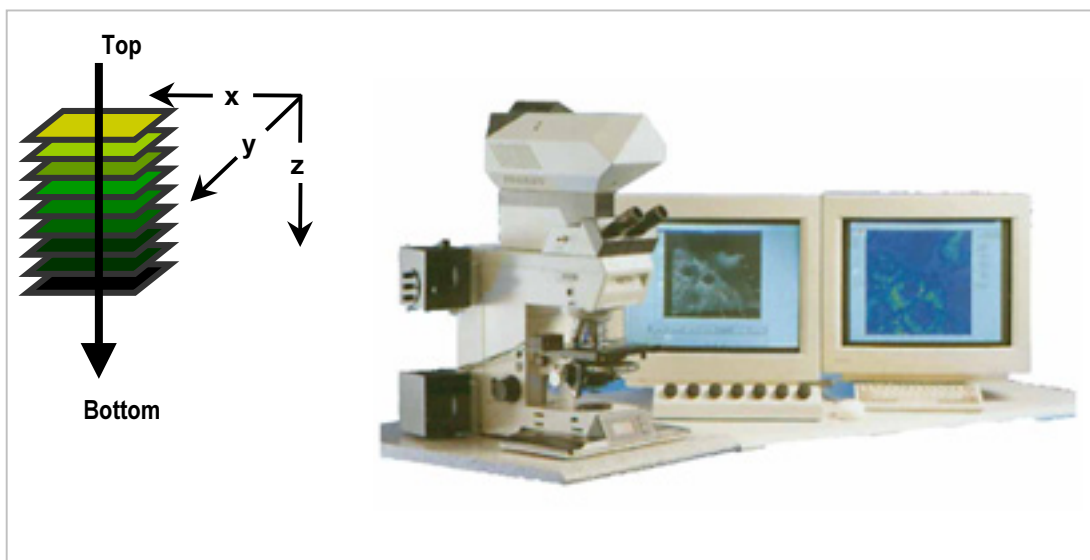


Figura 4.3. Microscopi confocal de rastreig. Esquema de la realització de seccions òptiques en el pla focal horitzontal x-y, per a la caracterització dels biofilms a la superfície del medi de suport (esferes de vidre).

A partir de la informació obtinguda en la sèrie de seccions òptiques s'obté una imatge topològica que representa la informació d'alçada segons un codi de colors, així com imatges estereoscòpiques. En aquest últim cas el software calcula dues imatges diferents rotant lleugerament en un cert angle la direcció de visualització. Presentant per a cada ull una imatge lleugerament diferent (ull dret-imatge verda, ull esquerra-imatge vermella), permet que el cervell les interpreti de forma tridimensional.

Algunes de les mostres observades amb microscòpia confocal s'han estudiat al mateix temps amb un nou perfilòmetre òptic confocal desenvolupat al Centre pel Desenvolupament de Sensors, Instruments i Sistemes (CD6) del Departament d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya (Laguarta et al. 1998, Artigas et al. 1999). Aquest microscopi permet obtenir una topografia de la superfície del biofilm amb una resolució espacial menor de 0,5 µm, utilitzant per realitzar el rastreig de la mostra un patró d'esclatxes en comptes del típic "pinhole". Així, cada valor individual de la topografia de la superfície s'adquireix quan un punt donat de la superfície coincideix de forma precisa amb la posició del pla on el patró d'esclatxes es visualitza. Les mostres s'han il·luminat amb llum blanca i s'han utilitzat els següents objectius Nikon de súper llargues distàncies de treball: Nikon 10x SLWD (AN: 0,21), 20x SLWD (AN: 0,35), 50x SLWD (AN: 0,45), 100x SLWD (AN: 0,73). La llum difusa o reflectida s'observa amb una cambra CCD i es processa amb un algorisme de focus, ja sigui el clàssic algorisme confocal d'intensitat (Wilson 1990), o bé l'algorisme de gradient (Fieguth & Staelin 1994). Els biofilms s'han observat directament després del seu processat normal de neteja.

Observació i Anàlisi de biofilms amb ESEM. Finalment, algunes de les mostres també s'han estudiat amb un microscopi electrònic ambiental de rastreig (ESEM). Aquest microscopi té tots els avantatges dels microscopis de rastreig normals (SEM), però al mateix temps el seu detector és capaç d'obtenir imatges d'alta resolució amb pressions d'entre 0,1-50 Torr. Això, permet l'examen d'estructures hidratades com els biofilms (Little et al. 1991, Johnson Assoc. 1996).

Després del processat normal de neteja per separar els microorganismes no adherits, els biofilms s'han sotmès directament a la cambra del microscopi Electroscan 2020 (Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands) del Laboratori de Microscòpia Electrònica del Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya. S'han buscat les condicions idònies de cara a no deshidratar el biofilm, variant la temperatura i la pressió.

Teòricament, per mantenir l'estat plenament hidratat de les mostres s'han de mantenir a 7°C gràcies a la cambra Peltier del microscopi, i s'han d'observar amb una pressió de vapor saturada de 7,51 Torr (Sutton et al. 1994). El microscopi ESEM es va operar a 20 kev utilitzant el detector d'electrons secundaris (ESD), per obtenir imatges amb la millor resolució.

Anàlisi i tractament de les imatges. Les imatges obtingudes al laboratori del Center for Biofilm Engineering amb els dos microscopis citats anteriorment s'han digitalitzat gràcies a una cambra CCD digital de color i refrigerada Optronics Opde-470T, amb un xip Sony ICX038AK de 1/2" i una resolució de 768(H) x 494(V) pixels. Les imatges que s'han visualitzat gràcies a un monitor RGB en color Sony SVPVM1353 d'alta resolució, s'han processat amb una tarja d'adquisició Targa 64+ ADC (Truevision, Inc., USA), i el software Image-Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics). Les imatges s'han arxivat en format TIFF i 24-bits en color.

Les imatges obtingudes s'han tractat amb l'ajuda del programa de domini públic ImageJ (ImageJ, v. 1.18, National Institutes of Health, USA), el qual permet obrir i tractar les piles ("stacks") d'imatges adquirides a partir del microscopi confocal. A partir d'algunes de les sèries d'imatges s'ha realitzat una projecció z, gràcies a l'algorisme d'intensitat màxima.

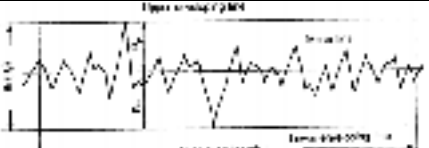
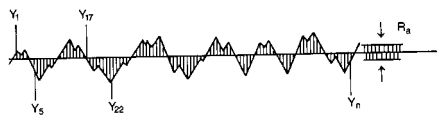
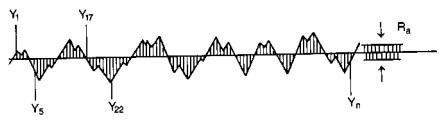
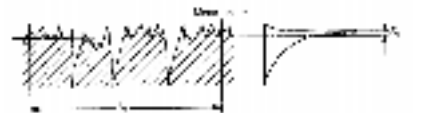
4.2.3. Anàlisi de l'estructura tridimensional dels biofilms

A partir de les imatges obtingudes amb el microscopi confocal de rastreig s'ha realitzat un seguiment de la colonització microbiana del material de suport. Per un cantó, les dades obtingudes amb la microscòpia confocal han permès determinar el gruix del biofilm, analitzant les observacions realitzades en el pla vertical (x-z), o bé realitzant vèries seccions òptiques en el pla focal horitzontal (x-y) i coneixent les coordenades de la secció superior (Top) i la inferior (Bottom). En aquest últim cas, el gruix mitjà s'ha determinat gràcies al mòdul d'anàlisi de superfícies del propi software del microscopi (Leica TCS), que determina i representa la imatge topològica de la superfície, obtinguda a partir de les diferents seccions òptiques x-y.

D'altra banda, el propi software del confocal presenta un mòdul d'anàlisi de superfícies, a partir del qual s'han determinat altres paràmetres importants com la rugositat (veure Taula 4.3). Aquests paràmetres han ajudat a caracteritzar la superfície del material de suport i, alhora, han permès realitzar un seguiment de la colonització microbiana.

Després d'estar un temps predeterminat en contacte amb l'aigua subterrània i de fer el rentat inicial per separar els microorganismes planctònics no adherits (veure 2.2.7), es van transferir part de les esferes (aproximadament 30) en un recipient de plàstic estèril ple amb solució salina (NaCl 0,9%) estèril. El procés es va realitzar a les tres zones de mostreig, agafant mostres dels reactors amb esferes de vidre exposades a l'aigua freàtica del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí-Besós) i de la mina de Ribatallada (CASSA, Sabadell), així com de l'aigua potable del Lab. de Microbiologia a Terrassa. Les mostres del medi de suport dels reactors (esferes de vidre) obtingudes es van tenyir de la forma habitual (veure 4.2.1) i es van observar amb microscòpia confocal (veure 4.2.2) per estudiar l'estructura dels biofilms formats.

Taula 4.3. Principals paràmetres utilitzats per a l'estudi de la superfície del material de suport per microscòpia confocal.

<p>Superfície Total Total de la superfície dins de l'àrea d'interès</p>	$Sup_{tot} = \sum_{i=1}^{i=3} A_i$	
<p>Ratio de Superfície Proporciona el grau de fractura de la superfície</p>	<p>Es divideix la superfície total per l'àrea de la regió d'interès.</p>	
<p>R_t Màxima profunditat de rugositat. Distància entre el punt més alt i el punt més baix d'un perfil.</p>		
<p>R_a (rugositat mitjana) Mitjana aritmètica dels valors Y que s'aparten de la línia mitja al llarg de la superfície de mostreig.</p>	$R_a = \frac{1}{l_m} \int_{x=0}^{x=l_m} y dx$	
<p>R_q Representa la dispersió dels valors d'amplitud al voltant de la línia zero.</p>	$R_q = \sqrt{\frac{1}{l_m} \int_0^{l_m} y^2(x) dx}$	
<p>S_k Mesura el biaix o l'asimetria de la distribució de les amplituds, tant valors positius com negatius.</p>	$S_k = \frac{1}{R_q^3} \cdot \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{i=n} (Y_i - \bar{Y})^3$	

4.3. Resultats a la zona de mostreig I: Sant Martí (Besós)

4.3.1. Microscòpia dels biofilms

Observacions amb Microscòpia Confocal. Tal com s'ha comentat anteriorment es va utilitzar el microscopi confocal per obtenir imatges dels biofilms desenvolupats a la superfície de les esferes de vidre. A les següents tres figures es mostra l'evolució de la colonització del material de suport (esferes de vidre) després de 25 (Figura 4.4), 65 (Figura 4.5) i 92 dies (Figura 4.6) d'exposició a l'aigua freàtica.

El material de suport dels reactors de llit empaquetat va ser ràpidament colonitzat. Inicialment es va formar una monocapa de cèl·lules bacterianes disperses per la superfície, amb una gran presència d'àmplies zones sense colonitzar. La majoria dels microorganismes presentaven forma de bacils individuals o associats formant cadenes curtes de 2-3 cèl·lules com a màxim. Totes aquestes característiques s'han apreciat amb detall en les observacions del biofilm format als 25 dies d'exposició a l'aigua de drenatge (Figura 4.4). En aquesta etapa, el biofilm ha presentat un gruix mitjà proper a les 4,5 μm , tal com s'aprecia a la Taula 4.5 i a la Figura 4.12. No obstant, en aquest període abunden les zones sense presència de microorganismes, com es pot veure amb detall en les seccions sagitals (talls x-z), on es diferencien les zones colonitzades i recobertes per una prima capa de cèl·lules de les regions sense colonitzar (veure Figura 4.4b).

Segons la morfologia i les grandàries cel·lulars habituals la majoria dels microorganismes presents han estat els bacteris i, en concret, els que han presentat forma bacil·lar (veure Figura 4.4a). Durant aquest període els bacils han predominat de forma aïllada o formant cadenes curtes, de 2-3 cèl·lules (veure Figura 4.4a,f). Més rarament, s'han observat algunes cadenes més llargues, com les observades amb la tinció Live/Dead a la Figura 4.4e. A part de bacils també s'han observat cèl·lules amb forma de coc, les quals han presentat en general una major tendència a formar petits agregats (veure Figura 4.4d). No obstant, no s'ha pogut apreciar cap agregat important a cap de les mostres observades. Els més grans es mostren a la Figura 4.4e i Figura 4.4f, però en cap cas han superat les 20 cèl·lules per agregat.

A la majoria de les mostres observades als 65 dies d'exposició s'ha pogut apreciar una capa basal de cèl·lules amb un gruix mitjà de 6 μm (veure Figura 4.5a, Taula 4.5 i Figura 4.12). A la mateixa Figura 4.5a es mostren 3 seccions sagitals (x-z) on la major part del material de suport ha estat colonitzat presentant un recobriment quasi complet de la superfície. A les imatges en projecció z s'aprecia com el biofilm ha cobert pràcticament el total del material de suport (Figura 4.5c,e). En canvi, la presència de cèl·lules ha estat força més restringida, encara que s'ha apreciat un augment significatiu respecte del període anterior. D'altra banda i com es pot veure a la Figura 4.5e, els agregats formats han estat força més grans i, en bastants casos, ja no s'ha apreciat amb detall la morfologia cel·lular degut a la producció d'EPS (veure la Figura 4.5c i Figura 4.5e).

Finalment, durant aquest període s'han observat majoritàriament bacteris, tant cocs com bacils (veure Figura 4.5b), desenvolupant aquests últims llargues cadenes en algun cas (veure Figura 4.7b). A més, s'han observat morfologies cel·lulars diferents que inclouen altres grups de microorganismes a més dels bacteris, com fongs filamentosos (veure Figura 4.7d), protozous i, fins i tot, nemàtodes (veure Figura 4.7a).

A mesura que el biofilm ha madurat ha estat possible diferenciar molts més agregats cel·lulars, arribant a cobrir el creixement bacterià la majoria de les àrees prèviament no colonitzades. A partir dels 80 dies i fins al final del temps d'exposició a l'aigua de drenatge (190 dies), s'ha observat un altre increment en el gruix mitjà del biofilm, situant-se la capa basal en 7-10 μm i zones amb alçades màximes de 25 μm (veure Figura 4.12 i Taula 4.5). En aquesta etapa de maduresa del biofilm s'han apreciat diverses zones on el creixement s'ha produït en forma d'agrupacions cel·lulars o agregats importants.

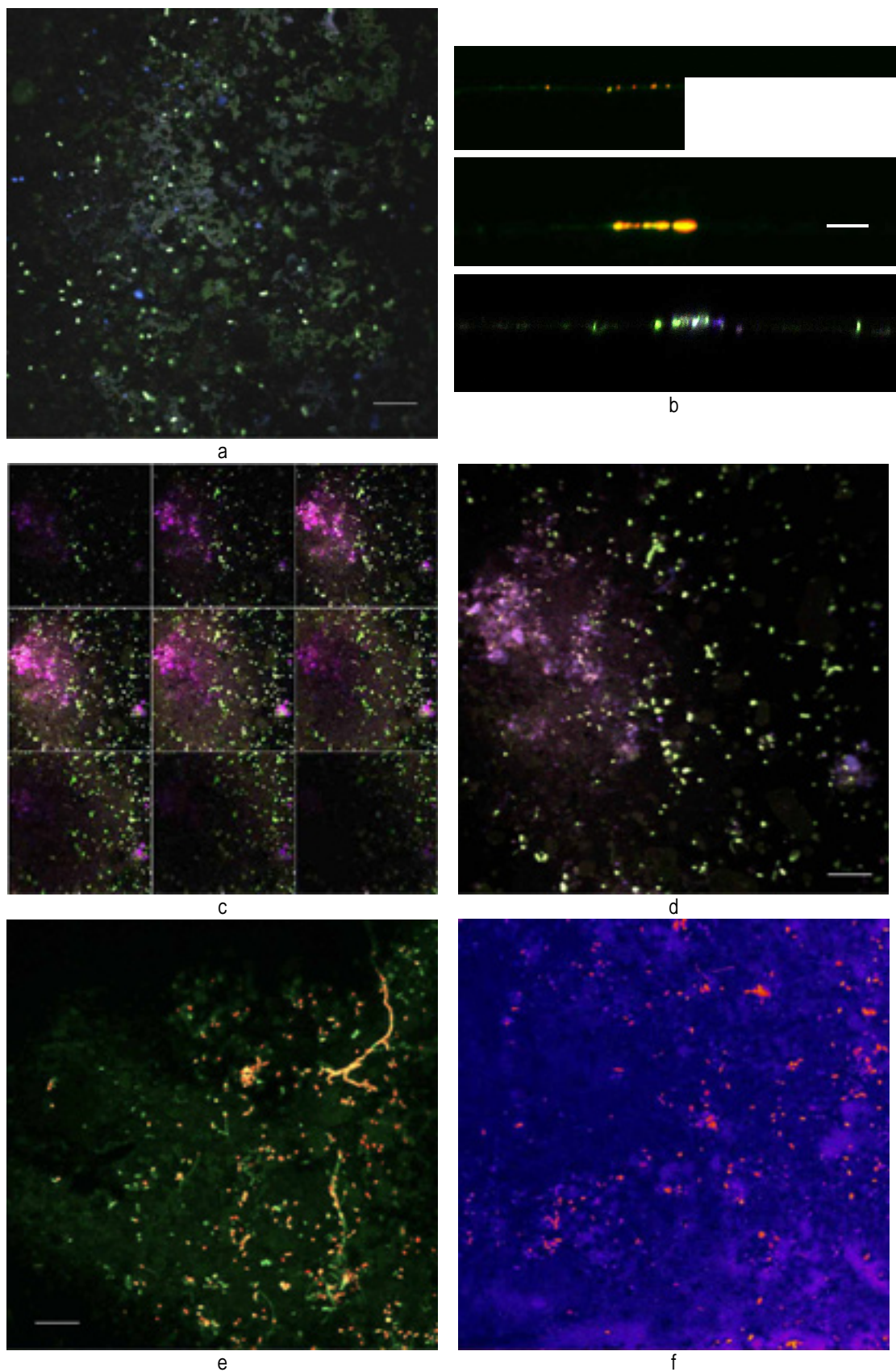


Figura 4.4. Observacions amb el microscopi confocal dels biofilms desenvolupats als **25 dies** d'exposició a l'aigua de drenatge (Objectiu 100x1,4 Oil-PLAPO, barra equivalent a 10 μm): (a) Seccions x-y, tinció amb taronja d'acridina, (b) Seccions sagitals (x-z), (c) Muntatge d'un stack complet d'imatges, amb les diferents seccions x-y i, (d) detall d'una de les seccions (la central), (e) Secció x-y, tinció amb Live/Dead, (f) Projectió z d'un stack d'imatges, utilitzant l'algoritme d'intensitat màxima.

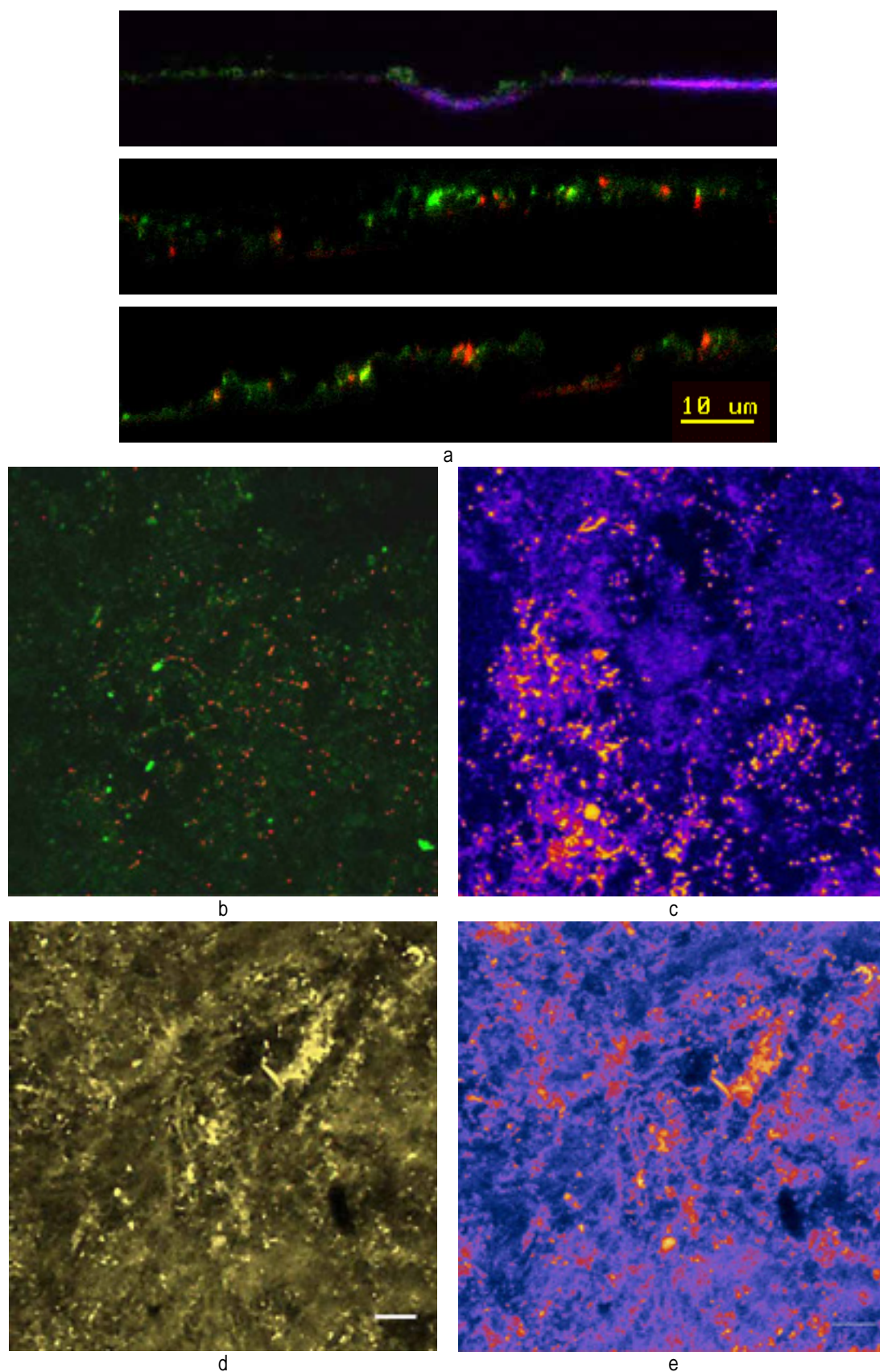


Figura 4.5. Observacions amb el microscopi confocal dels biofilms desenvolupats als **65 dies** d'exposició a l'aigua de drenatge (Objectiu 100x1,4 Oil-PLAPO, barra equivalent a 10 μm): (a) Seccions sagitals (x-z), (b) Secció x-y, tinció amb taronja d'acridina, (c, e) Projectió z d'un stack d'imatges, utilitzant l'algoritme d'intensitat màxima, (d) estereograma.

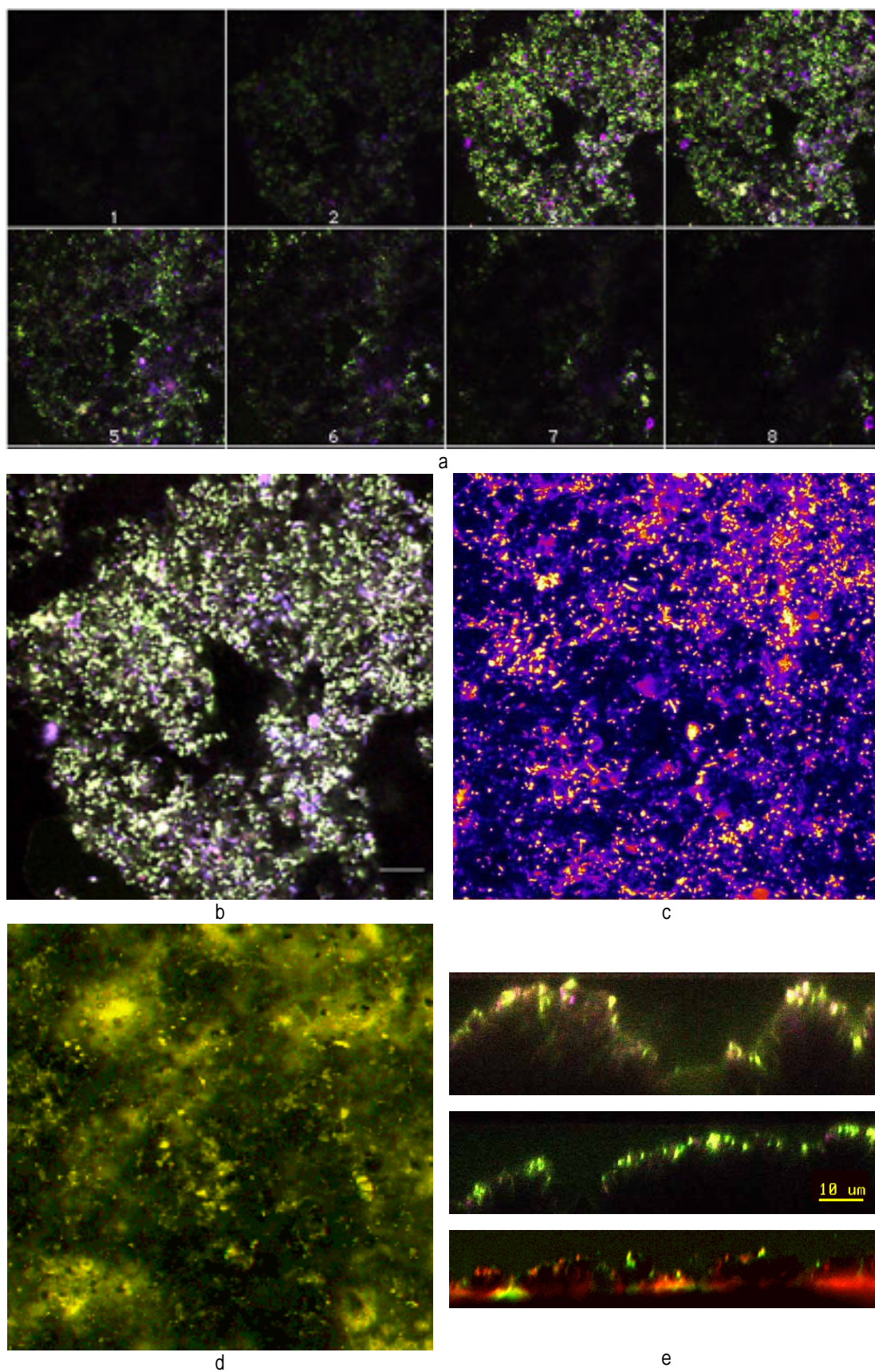


Figura 4.6. Observacions amb el microscopi confocal dels biofilms desenvolupats als **92 dies** d'exposició a l'aigua de drenatge (Objectiu 100x1,4 Oil-PLAPO, barra equivalent a 10 µm): (a) Muntatge d'un stack complet d'imatges, amb les diferents seccions x-y, tinció taronja d'acridina, (b) detall d'una de les seccions (secció 3), (c) Projectió z d'un stack d'imatges, utilitzant l'algoritme d'intensitat màxima, (d) Estereograma, (e) Seccions sagitals (x-z).

Tanmateix, la majoria de les àrees del material de suport han aparegut totalment colonitzades (veure Figura 4.6c i Figura 4.6d). Comparant amb l'etapa anterior, no s'han apreciat canvis radicals en referència a les morfologies més abundants. Així, també s'han identificat altres grups de microorganismes a més dels bacteris, com fongs filamentosos, protozous i nemàtodes.

La Figura 4.6a mostra una sèrie d'imatges després de 92 dies d'exposició a l'aigua freàtica, des de la part inferior on es troba la superfície del biofilm (imatge 1, Figura 4.6a) fins a la part superior. Cal destacar la presència d'un gran nombre de cèl·lules en algunes de les imatges obtingudes. En concret, les seccions 3 (imatge ampliada a la Figura 4.6b), 4 i 5, han presentat una elevada densitat cel·lular. En aquestes mateixes imatges sembla evident la presència de zones on no s'aprecia cap tipus de cèl·lula, que podien correspondre a zones de canals o espais buits. Tot això es pot observar igualment en la projecció z obtinguda a partir de la reconstrucció de la sèrie completa de seccions x-y, utilitzant l'algorisme d'intensitat màxima (Figura 4.6c). De fet, l'observació dels talls sagitals (Figura 4.6e) ha mostrat l'existència de biofilms plenament desenvolupats, amb presència d'una capa basal d'aproximadament 7-10 μm . A part, s'han apreciat determinades zones on el biofilm ha sobresortit de la capa basal, formant unes piles o "stacks" de cèl·lules característiques. Aquestes agrupacions cel·lulars han fet augmentar de forma considerable el gruix del biofilm local en determinades zones del material de suport. Tanmateix, l'observació d'alguna de les seccions sagitals amb més gruix sembla indicar que, en alguns cas, la tinció no ha pogut assolir les capes més profundes del biofilm.

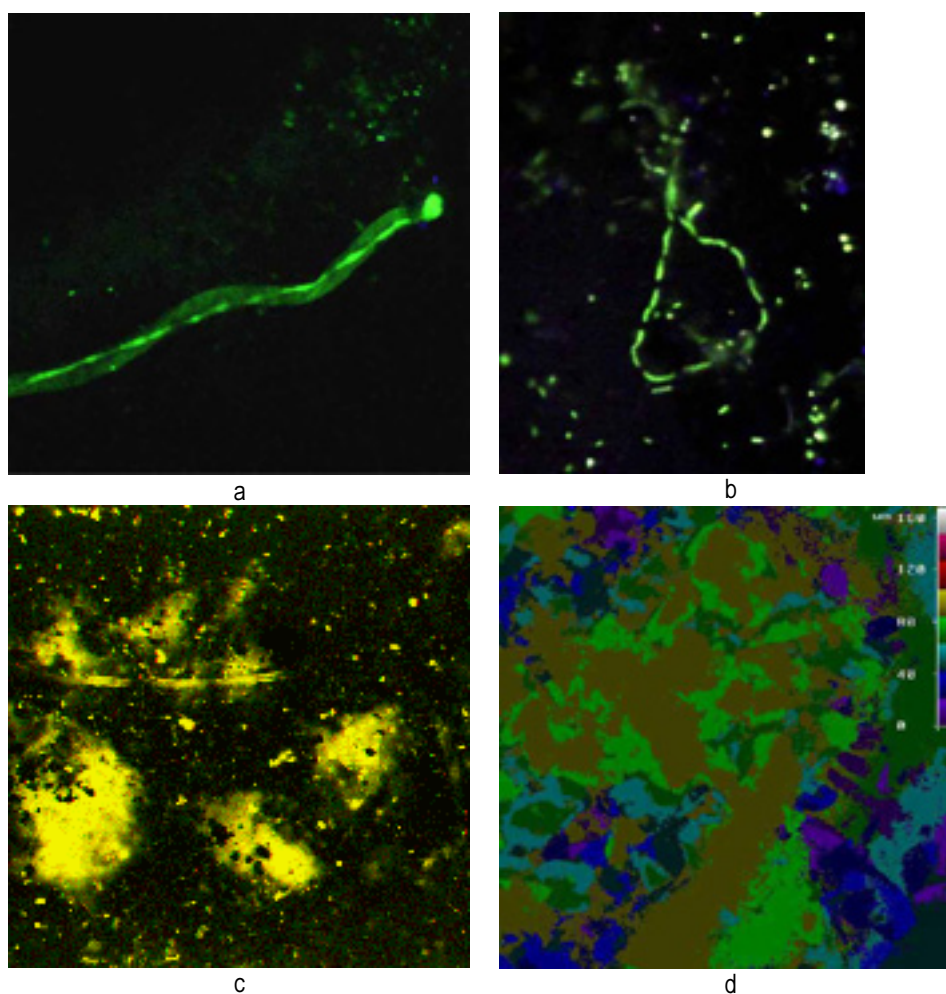


Figura 4.7. Observacions amb microscòpia confocal dels biofilms desenvolupats a partir de l'aigua freàtica del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí), (Objectiu 100x1,4 Oil-PLAPO): (a) Nemàtode, (b) Bacils en cadenes, (c) Fong filamentos i (d) Imatge topològica, amb informació de la profunditat.