

## Curso Posgrado

### Empleo de estrategias de nanotecnología para el estudio de biofilm microbianos

#### Coordinadores del curso

**Dra. Alejandra Bosch:** Laboratorio de Biofilms Microbianos, Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET-CCT La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

**E-mail:** [bosch@quimica.unlp.edu.ar](mailto:bosch@quimica.unlp.edu.ar)

**Dra. María Elena Vela:** Laboratorio de Nanoscopías y Físicoquímica de Superficies, Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Avanzadas (INIFTA-CONICET-CCT La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

**E-mail:** [mevela@gmail.com](mailto:mevela@gmail.com)

#### Objetivos:

El principal objetivo del curso es proporcionar a los alumnos conocimientos básicos y tecnológicos teórico-prácticos basados en técnicas nanotecnológicas para su aplicación al estudio de biofilms microbianos. Se dará especial atención al: i) empleo de sistemas de cultivo con flujo continuo de nutrientes operadas a condiciones de *shear* hidrodinámico variable, empleando desde cámaras convencionales para estudios microscópicos hasta celdas de la microfluídica, que permiten una resolución menor al micrón; ii) estudio de mecanismos involucrados en la adhesión bacteriana a una superficie, para lo cual se determinará mediante el empleo de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) la posición y distribución de adhesinas sobre la cubierta celular, empleando cantilevers funcionalizados con anticuerpos específicos; iii) empleo de superficies de adhesión funcionalizadas con distintos biopolímeros que asemejen el ambiente donde se encuentran diferentes microorganismos *in vivo*; iv) cuantificación de fuerzas puestas en juego en la interacción bacteria-superficie y bacteria-bacteria mediante MFA; v) estrategias de estudio de la variación de la estructura y composición química espacial y temporal durante la dinámica del crecimiento en biofilm; vi) estudio de nuevas tecnologías de erradicación de biofilms. Se pretende además que el alumno adquiera conocimientos sobre el uso de distintos software que serán discutidos durante clases teóricas y trabajos experimentales. Se buscará generar un escenario de interacción entre todos los participantes del curso de modo que todos los actores salgan potenciados en sus capacidades y posibilidades de interacción a nivel regional. En conclusión se pretende que el alumno pueda entender la fisiología de poblaciones bacterianas que se desarrollan adheridas a superficies en ambientes que emulen las condiciones de crecimiento *in vivo*, analizando las primeras etapas de adhesión, y la construcción del biofilm maduro; así como adquirir conocimiento sobre nuevas estrategias de erradicación de biofilms.

**Requisitos**

Graduados en áreas relacionadas con biotecnología, ciencias biológicas, medicina, bioquímica, ingeniería química, agronomía o similar. Es necesario poseer conocimientos de idioma inglés.

**Número de vacantes**

7 alumnos

**Fecha del curso**

22 de octubre al 2 de noviembre de 2018

**Inscripción de los alumnos**

Los interesados deberán solicitar su inscripción **por mail a los directores del curso, remitiendo una nota de solicitud, un currículum actualizado (con teléfonos y mails seguros), la justificación de la solicitud (utilidad concreta del curso para el alumno y su lugar de trabajo) y una carta de aval del jefe del grupo de trabajo con su firma.**

**Selección de los alumnos**

Será realizada por los Directores y Coordinadores del Curso

## Programa del Curso

### **Parte Teórica (40 horas)**

#### **Unidad 1. Introducción a los biofilms microbianos (6 horas)**

Definición de biofilms. Dónde se encuentran. Acciones benéficas y perjudiciales asociadas a la formación de biofilms. Importancia del crecimiento adherido a superficies en salud, agricultura y medio ambiente. Requerimientos para la instalación y desarrollo de biofilms. Biofilms uni-y multi-especie. Modelos de estudio de biofilms. Análisis de los modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*.

**Dra. Alejandra Bosch y Dr. Osvaldo Yantorno**

#### **Unidad 2. Crecimiento y desarrollo de los biofilms (6 horas)**

En esta unidad se analizará el fenómeno del desarrollo en biofilm desde la adhesión hasta la formación del biofilm maduro. Se analizará el efecto del *shear* hidrodinámico sobre la adhesión inicial y crecimiento del biofilm. Análisis de los biofilms producidos en celdas de flujo continuo en macro y microescala. Conceptos básicos sobre microscopía de fuerza atómica (MFA). Aplicaciones de MFA en el estudio de biofilms. Posicionamiento de adhesinas mediante estudios de MFA. Determinación de elasticidad de cubierta celular mediante el análisis del módulo de Young, aspectos teóricos y prácticos. Evaluación de la interacción bacteria-superficie, bacteria-bacteria mediante MFA.

**Dr Emanuel Carrilho (Brazil), Dra. María Elena Vela, Dra. Natalia Cattelan,**

#### **Unidad 3. Expresión fenotípica en biofilm (8 horas)**

Heterogeneidad espacial y temporal de los biofilms. Estudios proteómicos y transcriptómicos. Empleo de espectroscopía infrarroja y Raman confocal para describir composición química del biofilm, las células sésiles y la matriz. Análisis espacial y temporal. Señales de quórum-sensing. Matriz extracelular de biofilms: su composición, estructura, genética y modulación de su formación.

**Dr. Osvaldo Yantorno, Dra. Alejandra Bosch**

#### **Unidad 4. Biofilms naturales y en el entorno industrial (6 horas)**

Consortios naturales o contruidos artificialmente que actúan como beneficiosos o patogénicos en el entorno natural. Biofilms mixtos. Organización y cooperación entre distintos integrantes de biofilms mixtos. La microfluídica en la ecología microbiana. Estudio de comportamiento desde células aisladas hasta cultivos mixtos en microambientes altamente controlados. Biofilms electrogénicos. Transporte de electrones y estratificación fisiológica en biofilms electrogénicos. Fisiología de células sésiles que generan energía. Bacterias electrogénicas en la biodegradación de líquidos que proceden del uso doméstico e industrial. Capacidad de formación de biofilms en bacterias del suelo. Biofilms microbianos asociadas a plantas

**Dr Emanuel Carrilho (Brazil), Dr. Osvaldo Yantorno, Dr. Juan Pablo Busalmén, Dra. Angeles Zorreguieta**

#### **Unidad 5. Estrategias de control de los biofilms (6 horas)**

Erradicación de los biofilms. Tolerancia / Resistencia. Mecanismos de tolerancia ( $\beta$ -lactamasas, bombas de flujo, hipermutación, presencia de la matriz polimérica, persistores). Inhibición de la formación de biofilms a diferentes niveles (adhesión, ruptura de la comunicación celular bacteriana –quorum sensing, erradicación de biofilms maduros). Nuevas estrategias para la prevención y/o erradicación de biofilms. Empleo de plasma de gases para la erradicación de biofilms. Investigación de nuevos compuestos. Creación de materiales con superficies anti-infectivas.

**Dr. Alexandre Macedo (Brazil), Dra. Graciela Brelles, Dra. Alejandra Bosch,**

## ***Unidad 6. Biofilms en salud y en enfermedad (6 horas)***

La flora microbiana normal y su efecto protector. (*S. epidermidis*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*). Biofilms en la infección crónica: otitis, conjuntivitis, infecciones pulmonares crónicas, fibrosis quística, infecciones sobre quemaduras, caries dentales, infecciones urinarias. Biofilms sobre equipamiento hospitalario: equipos de hemodiálisis, respiradores artificiales, stens, etc.

**Dr. Alejandro Macedo (Brazil), Dra. Alejandra Bosch**

### ***Trabajos Prácticos (36 horas)***

#### **Trabajo Práctico 1: Desarrollo de biofilms en diferentes modelos experimentales. Monitoreo de la formación de biofilm por métodos microscópicos y espectroscópicos:**

Presentación de diferentes sistemas de cultivo para obtener biofilms uni y multi especie: desarrollo de cultivos estáticos y bajo flujo continuo y semi-continuo de nutrientes de organismos asociados al ambiente y salud. Empleo de placas multi-pocillo, cámaras de cultivo operadas en forma batch, con flujo continuo y semi-continuo de nutrientes bajo diferentes condiciones de *shear*. Se desarrollarán biofilms empleando cámaras diseñadas para el estudio de microfluídos. Análisis de los biofilms a nivel de la microescala. Posteriormente se evaluará la biomasa obtenida por cristal violeta e indirectamente por indicadores metabólicos y colorantes fluorescentes (DAPI y naranja de acridina). Se realizarán estudios estructurales y químicos de los biofilms producidos en los diferentes sistemas por métodos destructivos y no destructivos. Se emplearán distintas técnicas microscópicas para determinar arquitectura de biofilms, microscopía láser confocal, fluorescencia. Se trabajará sobre los software COMSTAT, IMARIS para análisis de imágenes.

Monitoreo del desarrollo de los biofilms *in situ*. Se discutirán formas de evaluación de la heterogeneidad química espacial y temporal de biofilms *in situ*. Empleo de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Se empleará como soporte portaobjetos de vidrio y celdas de ZnSe transparentes al infrarrojo que permiten el monitoreo de la formación de biomasa y detección de la producción de matriz polimérica. Se evaluarán los biofilms y características fenotípicas de las células sésiles por espectroscopía FT-IR. Se discutirán resultados obtenidos por microscopía Raman confocal (MRC).

**Trabajo Práctico 2: Análisis de la comunicación entre las bacterias. Evaluación de señales de quórum sensing.** Detección de señales de *quórum sensing* en ensayos en placas y extractos de sobrenadantes de cultivos líquidos. Extracción de moléculas de AHLs de sobrenadantes de cultivo de fase estacionaria. Empleo de cepas biosensoras para la detección de señales de quórum sensing: *Chromobacterium violaceum* CV026, *C. violaceum* VIR07, *Agrobacterium tumefaciens* KYC55, *A. tumefaciens* WCF47 y *A. tumefaciens* NTL4 y detección por espectroscopía FTIR. Se mostrarán resultados de análisis de señales de QS mediante cromatografía en placa delgada y espectroscopía FTIR, cromatografía gaseosa- espectrometría de masas y *HPLC MS/MS-MRM*.

**Trabajo Práctico 3: Estudios de biofilms por MFA:** a) *Determinación de la distribución de adhesinas en las células sésiles obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo y células planctónicas.* Dado que la microscopía de fuerza atómica permite detectar adhesinas y medir fuerzas de adhesión a diferentes superficies a nivel de la nanoescala se empleará dicha técnica para analizar la distribución de adhesinas sobre la superficie de microorganismos. Se implementarán las medidas por el método *Force Volume* utilizando puntas de cantiléver funcionalizados con anticuerpos. Se realizará un estudio comparativo de distribución de adhesinas en células planctónica y sésiles y células sometidas a esfuerzos de corte a fin de analizar si el *shear* mecánico induce una sobreexpresión de adhesinas. Para realizar discusiones sobre los resultados y obtener conclusiones es necesario realizar medidas sobre un gran número de células, por lo que a tal fin se expondrán resultados obtenidos por nuestros laboratorios sobre la distribución de adhesinas en células sésiles y planctónicas.

b) *Determinación de la elasticidad – rigidez de las membranas en células sésiles.* Esta tecnología será empleada también para evaluar y comparar la rigidez de la envoltura bacteriana de células sésiles. La misma será analizada mediante la adquisición de imágenes de *Force*

*Volume* (FV) de 32x32 pixels registrándose curvas de fuerza que serán analizadas con el fin de determinar los Módulos de Young (E) en diferentes zonas dentro de la célula individual, mediante un software que fue desarrollado por el Dr. Federico Castez (INIFTA). Con los valores recolectados se graficarán histogramas representativos de la distribución de los valores de E y se construirán mapas de E para reflejar la distribución en la superficie bacteriana.

**Trabajo Práctico 4: Evaluación de resistencia, tolerancia y persistencia. Erradicación de biofilms.** Ensayo de resistencia de diferentes cepas a distintos antimicrobianos mediante concentración inhibitoria mínima de células planctónicas y biofilms (CIM y CIMB). Comparación del poder bactericida de los antimicrobianos de uso en la clínica con nuevas drogas basadas compuestos de tiourea y guanidinio (de reciente patentamiento internacional). Medida de tolerancia a antimicrobianos Evaluación de persistores. Estas determinaciones se realizará en placas multi-pocillo evaluando diferentes antimicrobianos. La determinación de persistores se realizará sobre biofilms de 24h sobre los que se aplicará una concentración 4 y 128 veces la CIM. Evaluación de la erradicación de un biofilm de *P. aeruginosa* de 48 horas empleando plasma de gases.

#### Talleres de discusión (4 horas)

Se realizarán talleres de discusión. Se discutirán trabajos científicos de relevancia en la temática en los que participarán el profesor, los auxiliares docentes y los alumnos.

#### Exposición de los alumnos de las temáticas de trabajo.

En los tiempos de espera de incubaciones, reacciones, etc, se realizarán exposiciones orales a cargo de los alumnos sobre los trabajos de investigación que los mismos llevan a cabo en sus lugares de trabajo.

**La coordinación y el desarrollo de los trabajos prácticos estarán a cargo de las Profesoras Dra. Alejandra Bosch, Dra. María Elena Vela y los Jefes de Trabajos Prácticos: Dra. Natalia Cattelan, Dra. Cecilia Bernadelli, Dra. Carolina Vita por el CINDEFI y las Doctoras. Dra. Cecilia Chain, Dra. María Antonieta Daza Millone por el INIFTA.**

#### **Bibliografía**

- Behm, N., R. J., García, H. Rohrer.** 1990. *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods* Eds, NATO ASI Series, Kluwer, Dordrecht
- Bhushan B.,** 2004 *Springer Handbook of Nanotechnology.* Ed. Springer
- Binnig, G.; H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel,** 1982. *Appl. Phys. Lett.* 40, p. 178 (b)
- Binnig, G., H. Rohrer,** 1982 *Phys. Acta* 55, p. 726 (c)
- Binnig, G. H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel,** 1982. *Phys. Rev. Lett.* 49, p. 57 (d)
- Binnig, G. H. Rohrer,** 1999. *Reviews of Modern Physics*, Vol. 71, No. 2, pp. S324-S330(a)
- Briggs, D.**1983. *Practical Surface Analysis, Volume 1 Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy, Ed., John Wiley&Sons, 2<sup>nd</sup> Edition,* Chichester, England.
- Bjarnsholt, Thomas, Maria Alhede, Morten Alhede Steffen R. Eickhardt-Sørensen, Claus Moser, Michael Ku' Peter Østrup Jensen, and Niels Højby** 2013. *Trends in Microbiology*, Vol. 21, No. 9 pp 466-474
- Bonnell, D. A.** 1993. *Scanning Tunneling Microscopy and Spectroscopy*,.Ed.,CH,

- Bonnell Dawn.** 2001. *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy*, Ed. 2nd Ed. Wiley-VCH USA.
- Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann D. and Yantorno, O.** 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 736-747
- Eaton, P.; West, P.** 2010. *Atomic Force Microscopy*. Oxford University Press, New York
- Chuan Hao Tan, et al** 2017 All together now: experimental multispecies biofilms model systems *Environmental Microbiology* 19(1), 42–53
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 21;284 (5418):1318-22.
- Davey, M. E. and G. A. O'Toole.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 847-867.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Duke C.B., E.W.Plummer,** 2002. *Frontiers in Surface and Interface Science*, North-Holland, Elsevier
- Ertl G. and J. Küppers, Verlag Chemie, Weinheim.** 1985. *Low Energy Electrons and Surface Chemistry*
- Güntherodt, H.-J., R. Wiesendanger.** 1994. Eds., Springer- Verlag, Berlin, *Scanning Tunneling Microscopy*
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:95–108.
- Harrison JP and Berry D .** 2017. Microfluidics. *Front. Microbiol.* 8:675.
- Henriette L. Røder,1 Søren J. Sørensen,1 and Mette Burmølle.** 2016. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology*, Vol. 24, No. 6  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, et al.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146(Pt 10): 2395–2407.
- Junghyun Kim 1, Hee-Deung Park, and Seok Chung .** 2012. Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation *Molecules*, 17, 9818-9834; oi:10.3390/molecules17089818
- Lillehei P.T and L.A.Bottomley,** 2000. *Scanning Probe Microscopy Anal.Chem.*72, 189R-196R
- Liu W, Røder et al** 2016. *Front. Microbiol.* 7:1366.
- Magonov, S. N, M.-H. Whangbo,** 1996. *Surface Analysis with STM and AFM*, VCH, Weinheim
- Naumann, D.** 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology, p. 1-29. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. *In Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Naumann D.** 2001. FT-infrared and FT-Raman Spectroscopy in biomedical research., p. 323–377. In I.H.-U.G. and B. Yang (ed.), New York, NY.
- Morbioli, giorgio gianini ; mazzu-nascimento, thiago ; milan, luis aparecido ; stockton, amanda m.; Carrilho, Emanuel .** Improving sample distribution homogeneity in Three-Dimensional *Microfluidic Paper-Based Analytical*

- Lipkowski and P.N.Ross** 2012. *Atomic Force Microscopy in Liquid. Biological Applications*, A.M.Baró y R.G.Reifenberger Eds. Chapt.7 in “Imaging of Surfaces and Interfaces” J Eds., Wiley-VCH, USA, Wiley-VCH. Weinheim, Germany.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Pestana, Cezar Rangel ; Urbaczek, Ana Carolina ; Alberici, Juliana Vieira ; Rodrigues, Gersonjhonatan ; Carrilho, Emanuel .** 1973. Metabolic profiling of human endothelial cells during autophagy assessed in a biomimetic .. *Life Sciences* 172, p. 42-47, 2017.
- Rusconi Roberto and Roman Stocker.** Microbes in flow. *Current Opinion in Microbiology* 2015, 25:1-8
- Serra, Alejandra Bosch, Daniela Russo, María E. Rodríguez, Ángeles Zorreguieta, Juergen Schmitt, Dieter Naumann and Osvaldo Yantorno.** 2007. Continuous non-destructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by spectroscopy and other corroborative techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1759-1767
- Serra D., Luecking G., Weiland F., Schulz S., Görg A., Yantorno O. M., Ehling-Schulz M.** 2008. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics.* 8, 23-24: 4995-5010.
- Schmickler, W.** 1999. *Theoretical Aspects of the Scanning Tunneling Microscope Operating in an Electrolyte Solution*,
- Takano, H.J.R.Kenseth, S-SWong, J.C.O'Brien and M.D.Porter,.** 1999. *Chemical and Biochemical Analysis Using Scanning Force Microscopy*, *Chem.Rev.*, 99, 2845-2890.
- Thompson, Brandon L ; Ouyang, Yiwen ; Duarte, Gabriela R M ; Carrilho, Emanuel ; Krauss, Shannon T; Landers, James P .** 2015. Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method. *Nature Protocols.* v. 10, p. 875-886,.
- Weinheim, J. Lipkowski, P. N. Ross.** 1999. *Imaging of Surfaces and Interfaces*, Eds., Wiley-VCH, New York,.
- Wiechers, J., T. Twomey, D. M. Kolb, R. J. Behm, J. Electroanal.** 1988. *Chem.* 248, p. 451.
- Wenzheng Liu1, Henriette.** 2016. Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Trends in Microbiology*, , Vol. 24, No. 6
- Wenzheng Liu, Henriette L. Røder, Jonas S. Madsen, Thomas Bjarnsholt, Søren J. Sørensen and Mette Burmølle.** 2016 *Front. Microbiol.*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01366>
- Woodruff D.P., and T.A.Delchar,** 1994. Cambridge *Modern Techniques of Surface Science*, Univ.Press, Cambridge,.
- Yawata Y, Nguyen J, Stocker R, Rusconi R.** 2016. Microfluidic studies of biofilm formation in dynamic environments. *J Bacteriol* 198:2589 –2595. doi:10.1128/JB.00118-16.

## **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

		Lunes 22	Martes 23	Miércoles 24	Jueves 25	Viernes 26
<b>CINDEFI</b>	9:00-10:30	Introducción a los biofilms microbianos  <b>Alejandra Bosch</b>	Factores que influyen en la adhesión a superficies. Efectos del <i>shear</i> hidrodinámico. Análisis de biofilms en macro y micro-escala. Microfluídica <b>Emanuel Carrilho (Brazil)</b>	Evaluación de la interacción bacteria-superficie, bacteria-bacteria mediante MFA.  <b>María Elena Vela- Laura Arnal</b>	Consortios naturales o construidos artificialmente que actúan como beneficiosos o patogénicos en el entorno natural <b>Angeles Zorreguieta</b>	Los biofilms electrogénicos en la vida del hombre del siglo XXI.  <b>Juan Pablo Busalmén</b>
	10:30-10:45	Pausa	Pausa	Pausa	Pausa	Pausa
	10:45-12:15	Colonización de superficies y formación de biofilm maduros. Etapas involucradas en la formación de biofilms. Cinética de crecimiento. <b>(Osvaldo Yantorno)</b>	Conceptos básicos sobre microscopía de fuerza atómica (MFA). Aplicaciones de MFA en el estudio de biofilms. Determinación de elasticidad a través del módulo de Young, aspectos teóricos y prácticos. <b>María Elena Vela</b>	¿Cómo abordar el estudio de biofilms mixtos? Microfluídica <b>Emanuel Carrilho (Brazil)</b>	Transporte de electrones y estratificación fisiológica en biofilms electrogénicos. <b>Juan Pablo Busalmén</b>	Heterogeneidad espacial y temporal de los biofilms. Evaluación de la composición química espacial y temporal por métodos espectroscópicos (FTIR y RAMAN CONFOCAL) <b>Alejandra Bosch</b>
<b>CINDEFI</b>	12:15-13:30	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo
	13:30-18:30	<b>Trabajo Practico 1</b> Inicio de los cultivos de biofilm en sistemas estáticos y flujo continuo de nutrientes. Soportes. Placas multi-pocillos, reactores tipo batch, cámaras de cultivo con flujo continuo de nutrientes.	<b>Trabajo Practico 1</b> Evaluación de la capacidad de adhesión y formación de biofilm de diferentes aislamientos clínicos y ambientales.  Evaluación de la cinética de crecimiento de un biofilm con CV y otras metodologías directas e indirectas.	<b>Trabajo Practico 1</b> Observación de los biofilms obtenidos por sistemas de cultivo con flujo continuo y semi-continuo de nutrientes.  <b>Trabajo Practico 2</b> Inicio de TP de QS	<b>Trabajo Practico 1</b> Empleo de distintas técnicas microscópicas y espectroscópicas para determinar arquitectura y a composición química de los biofilms obtenidos. Microscopía laser confocal, fluorescencia, espectroscopia FTIR y Raman  <b>Trabajo Practico 2</b> Continuación. Observación de resultados	<b>Trabajo Practico 1</b> Análisis de la estructura de los biofilms. Entrenamiento para el empleo de los software COMSTAT e IMARIS para análisis de imágenes de los biofilms.  Obtención de parámetros asociados a la estructura <b>Trabajo Practico 2</b> Finalización de TP QS
	<b>Exposición de actividades en investigación/desarrollo de los participantes</b>					

		Lunes 29	Martes 30	Miércoles 31	Jueves 1	Viernes 2
<b>CINDEFI</b>	9:00-10:30	<i>Quorum sensing</i> <b>Graciela Brelles</b>	Nuevas estrategias para la prevención y/o erradicación de biofilms <b>Alexandre Macedo</b>	Erradicación de biofilms por aplicación de plasma de descarga de gases <b>Graciela Brelles</b>	Biofilms en salud. La infección crónica. Tolernacia /persistencia <b>Alejandra Bosch</b>	<b>Libre para estudio</b>
	10:30-10:45	Pausa	Pausa	Pausa	Pausa	
	10:45-12:15	Mecanismos de inhibición de la formación de biofilms. <b>Alexandre Macedo</b>	Nuevas estrategias fisicoquímicas para la erradicación de biofilms <b>Graciela Brelles</b>	Creación de materiales con superficies anti-infectivas <b>Alexandre Macedo</b>	<b>Taller</b> Continuación de discusión de trabajos científicos que fueron entregados a los alumnos previamente	
	12:15-13:30	Almuerzo	<b>Almuerzo</b>	<b>Almuerzo</b>	<b>Almuerzo</b>	<b>Evaluación final</b>
<b>INIFTA</b>	14:00-18:30	<b>Trabajo Práctico 3 y 4</b> Inicio de los cultivos para la realizar los TP 3 y 4. <b>Taller</b> Taller de Discusión de trabajos científicos que fueron entregados a los alumnos previamente	<b>Trabajo Práctico 3 (a)</b> Determinación de la distribución de adhesinas en las células sésiles obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo y células planctónicas.	<b>Trabajo Práctico 3 (b)</b> Determinación de la elasticidad de las membranas en células sésiles y planctónicas	<b>Trabajo Práctico 4</b> Discusión de los resultados de CIM y CIMB evaluados por métodos tradicionales y mediante cantilevers ultrasensitivos.	
	16:00-16:30	Pausa	Pausa	Pausa	Pausa	