

Crecimiento y visualización de biofilms *in-vivo* sobre cubreobjetos

Introducción

El objetivo de este práctico es conocer y ejecutar una metodología de cultivo *in vivo* (sin fijación) de biofilms sobre cubreobjetos de vidrio, aprender a montar muestras para microscopía y capturar imágenes de muestras en movimiento con microscopía confocal de disco giratorio. Con las imágenes que se adquieran se deberá dar una descripción cuantitativa de la dinámica de las bacterias durante la formación del biofilm, aplicando conceptos y metodologías de procesamiento y análisis de imágenes aprendidas a lo largo del curso. Para ello, se tendrá a disposición cultivos de *Proteus mirabilis* ATCC 12453.

Procedimiento:

Planificación

Día	Actividades
Día 1 (Lunes)	Cultivo de biofilms Tinción fluorescente Montaje para microscopía
Día 2 (Martes)	Captura de imágenes microscopía confocal
Día 3 (Jueves)	Procesamiento y análisis de imágenes

Nota: secciones de los procedimientos escritos en rojo no se realizarán por falta de tiempo.

1. Cultivo de biofilms

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en agar sólido de triptona de soya (TSA), incubar 24 horas a 37°C.
2. Preparar pre-inóculo de *P. mirabilis* en un tubo Falcon estéril de 15 mL e incubar 24 horas a 37°C en 10 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB).
3. Medir la densidad óptica (OD) a 600 nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que hayan llegado a fase estacionaria.
4. Tomar 2 mL del pre-inóculo y depositarlos en un tubo Falcon de 50 mL estéril, y diluir en medio LB estéril hasta 20 mL aproximadamente. Medir la densidad óptica (OD) a 600 nm de las bacterias planctónicas de esta solución bacteriana y evaluar que tenga una OD₆₀₀ de 0.1. En caso de alejarse mucho de este valor, ajustar agregando medio LB estéril o volúmenes pequeños de pre-inóculo. Esto se hace para que cada pocillo pueda ser sembrado con una cantidad similar de bacterias para la formación de biofilms a lo largo de experimentos independientes.

5. Sobre un cubreobjetos de 24x50 mm, posicionar y sellar un anillo de acrílico usando resina sellante hidrófoba.
6. Agregar entre 400 y 500 μL de solución bacteriana $\text{OD}_{600} = 0.1$. al interior del anillo de acrílico y posicionar otro cubreobjetos sobre el anillo como una tapa. Dejar incubando a 37°C sin agitación durante 24 horas.
7. Remover el medio de cultivo y realizar la tinción fluorescente.

2. Tinción fluorescente de ADN para live-imaging:

Solución de tinción de YOYO-1 $1 \mu\text{M}$:

Solución	Volumen (μL)
Stock de YOYO-1 1 mM	1
PBS	999

1. Incubar con solución de tinción por 15 minutos a temperatura ambiente (RT) con agitación suave y en oscuridad.
2. Retirar la solución de tinción y agregar medio LB estéril.

3. Montaje de muestras para microscopía

1. Posicionar un cubreobjetos en la cara apical del anillo y sellarlo con resina sellante hidrófoba. Luego visualizar bajo microscopía confocal de disco giratorio.