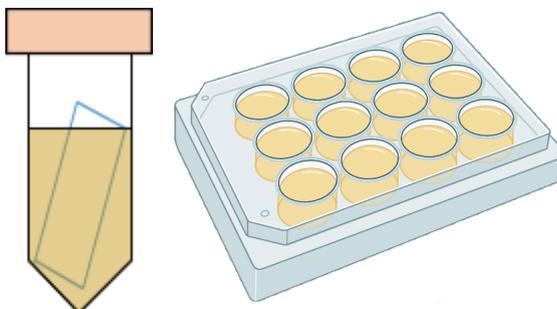


Crecimiento y visualización de biofilms estáticos sobre cubreobjetos



Introducción

El objetivo de este práctico es conocer y ejecutar una metodología de cultivo estático de biofilms sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm, aprender a montar muestras para microscopía y capturar imágenes con microscopía confocal de disco giratorio. Con las imágenes que se adquieran se deberá dar una descripción cuantitativa de la morfología de las bacterias presentes en el 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 y también de biofilms previamente fijados.

Procedimiento:

Planificación

Día	Actividades
Día 1 (Lunes)	Cultivo y fijación 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 y fijación de muestras 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. En una placa de poliestireno de 24 pocillos estéril, posicionar con cuidado cubreobjetos estériles de 12 mm, uno por pocillo.
5. 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.
6. Agregar entre 350 y 400 µL de solución bacteriana OD₆₀₀ = 0.1. a los pocillos y dejar incubando a 37°C sin agitación durante 48 horas, posicionando la placa en un ángulo de alrededor de 45° para permitir que exista una interfase aire-líquido en la superficie de los cubreobjetos donde pueda desarrollarse el biofilm. Es importante no incubar durante mucho más de 2 días. El formato de este ensayo sólo permite el cultivo de biofilms durante períodos cortos debido a la evaporación del medio de cultivo.
7. Remover el medio de cultivo y realizar 2 o 3 lavados gentiles con PBS estéril para retirar las bacterias planctónicas.
8. Agregar paraformaldehído (PFA) al 4% (m/v) para fijar las bacterias del biofilm. Dejar incubar durante 20 minutos a RT con agitación suave.
9. Realizar otros 2 o 3 lavados gentiles con PBS para remover el exceso de PFA y de bacterias débilmente adheridas. Dependiendo del tipo de tinción que se desee emplear, puede ser conveniente realizar también tratamientos con detergente para permeabilizar las bacterias del biofilm (para este caso no será necesario).
10. Realizar la tinción fluorescente.

2. Tinción fluorescente de ADN y de pared celular/cápsula/exopolisacáridos:

Solución de tinción de SYTO 61 5 μ M :

Solución	Volumen (μ L)
Stock de SYTO 61 5 mM	1
PBS	999

Solución de tinción de lectina WGA-Alexa488 50 μ g/mL :

Solución	Volumen (μ L)
Stock de conjugado fluorescente de lectina WGA-AlexaFluor 488 1 mg/mL	50
PBS	950

1. Retirar el PBS o medio en el cual esté sumergido el biofilm y reemplazar por solución de tinción de SYTO 61. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (RT) con agitación suave y en oscuridad.
2. Retirar la solución de tinción y realizar 2 lavados de 5 minutos con PBS en agitación suave.
3. Retirar el PBS y reemplazar por solución de tinción de lectina WGA-AlexaFluor 488. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente (RT) con agitación suave y en oscuridad.
4. Retirar la solución de tinción y realizar 2 lavados de 5 minutos con PBS en agitación suave.

3. Montaje de muestras para microscopía

1. Retirar los biofilms de sus pocillos y dejarlos secar al aire boca arriba y en oscuridad.
2. Depositar una gota de medio de montaje anti-fading *Fluoroshield* sobre un portaobjetos y posicionar encima de ésta el cubreobjetos con el biofilm boca abajo. 20 μ L de medio de montaje son suficientes.
3. Esperar que el medio de montaje se asiente por unos momentos y luego sellar los bordes del cubreobjetos con esmalte de uñas transparente para evitar la desecación del biofilm y el desplazamiento del cubreobjetos. Dejar que el esmalte se seque durante unos minutos, en oscuridad. Luego, almacenar las muestras a 4°C para su visualización bajo microscopía confocal de disco giratorio al día siguiente.