

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MANUAL DE PRACTICAS
DE
BIOQUIMICA MICROBIANA
2a EDICION

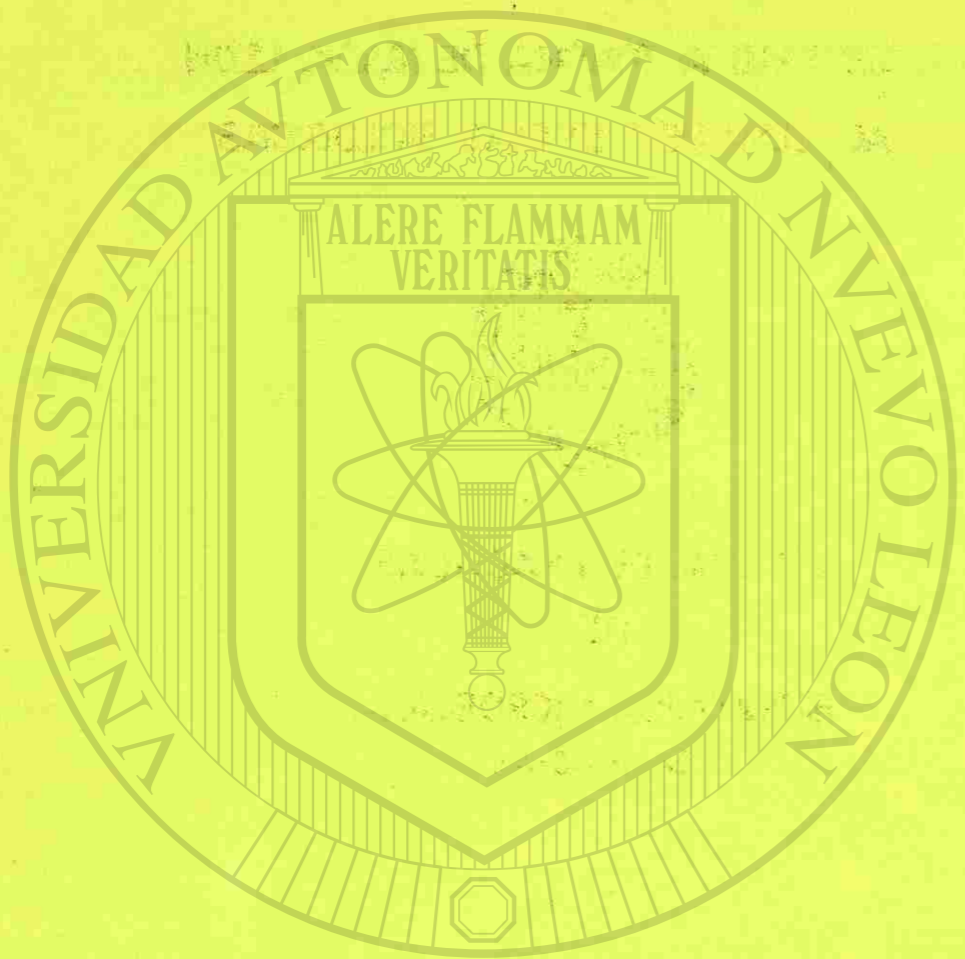
Q.B.P. JUAN ANTONIO RODRIGUEZ ARZAVE
Q.B.P. EUGENIO SERGIO RODRIGUEZ YAÑEZ

QD415
.5
R6
1988

TO DE BIOQUIMICA

1988

QD415
.5
R6
1988



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

0112-49960

21109
2,
28
8891

GENÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional de las bacterias se mide por el incremento en la masa celular o del número de células. Dependiendo de los parámetros que se midan se puede observar un crecimiento exponencial, pero para hablar de los logaritmos de cultivo.

La masa celular se expresa en gramos secos, volumen celular seco, etc. También se puede expresar en términos de la absorbancia en un espectrofotómetro permitiendo medir el crecimiento de un cultivo bacteriano.



MANUAL DE PRACTICAS
DE
BIOQUIMICA MICROBIANA
2a EDICION

El crecimiento en el laboratorio de células, éste es determinado directamente por métodos viables en placa para ciertos tipos de bacterias.

El crecimiento de un cultivo bacteriano en un medio líquido puede ser medido por métodos indirectos como la turbidimetría, la densidad óptica, etc.

El desarrollo celular poblacional apreciando los cambios en el número de células por unidad de tiempo.

Se puede utilizar el método del rastreo fotocolorimétrico para definir el crecimiento de un cultivo bacteriano.

El crecimiento de un cultivo bacteriano en función del incremento en el número de células.

Q.B.P. JUAN ANTONIO RODRIGUEZ ARZAVE
Q.B.P. EUGENIO SERGIO RODRIGUEZ YAÑEZ

ALUMENOS

La absorción de luz por las bacterias depende de la longitud de onda de la luz, pues ésta depende del índice de refracción de la bacteria. A longitudes de onda corta la razón absorbancia/luz dispersa es baja.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

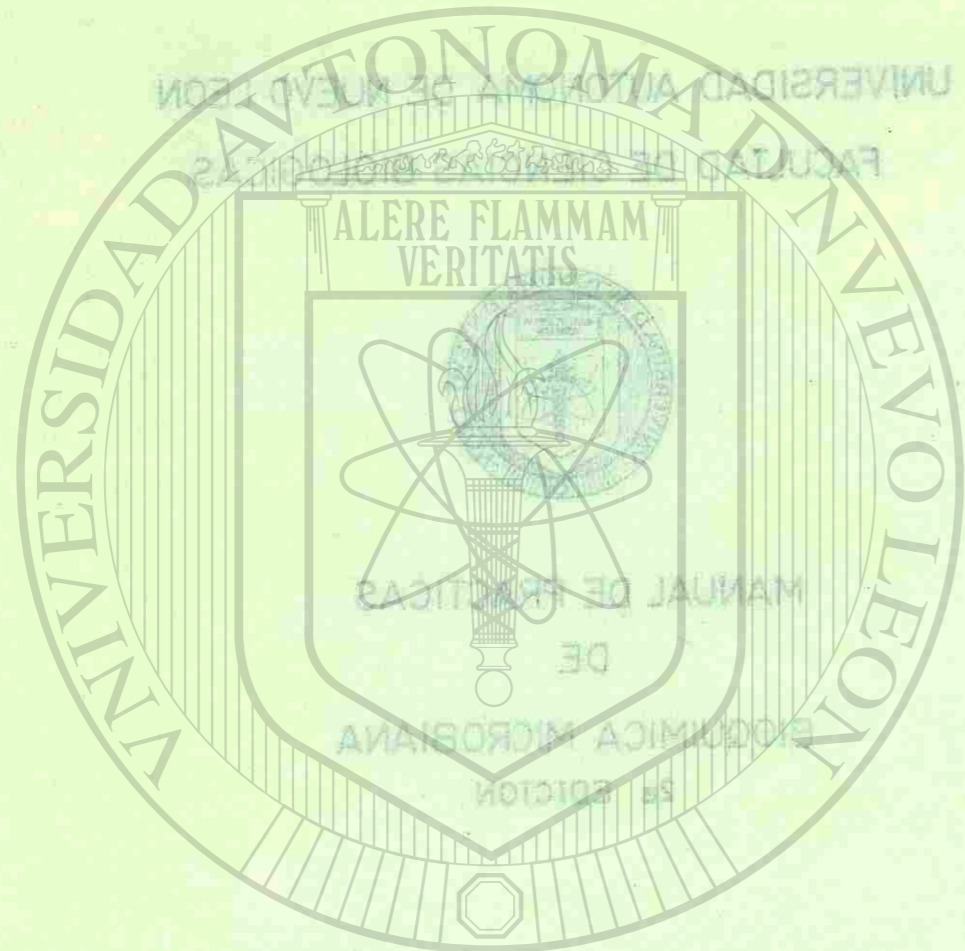
1988



QD415
.5
R6
1988



1020111463



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO UNIVERSITARIO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Generalmente se emplean longitudes de onda de 430 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por parte de los constituyentes celulares podría llegar a ser significativa. **CINETICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO BACTERIANO** cierta longitud de onda y el número de células por ml. El tiempo de generación depende de las condiciones de cultivo, ya que la velocidad de crecimiento de células se modifica

INTRODUCCION

El crecimiento poblacional bacteriano puede definirse en términos del incremento en la masa celular o del número de células. Generalmente estos dos parámetros guardan una relación directamente proporcional, pero puede variar según las condiciones de cultivo.

La masa celular es expresada ya sea como peso seco, volumen celular empaquetado, contenido de nitrógeno o turbidez, ésta última es la más usualmente empleada pues su medición rápida en un fotocolorímetro o espectrofotómetro permite rastrear la densidad de un cultivo mientras está creciendo.

Respecto al incremento en el número de células, éste es determinado directamente mediante cuentas viables en placa aunque existen técnicas electrónicas sofisticadas que permiten detectarlo.

OBJETIVO

En este ensayo perseguimos los siguientes objetivos:

- 1) Monitorear fotocolorimetricamente la turbidez de un cultivo bacteriano en multiplicación activa.
- 2) Representar graficamente el desarrollo celular poblacional apreciando los diferentes estadios de crecimiento.
- 3) Manejar matematicamente los datos del rastreo fotocolorimétrico para definir los parámetros de crecimiento bacteriano.
- 4) Determinar los parámetros de crecimiento en función del incremento en el número de células.
- 5) Establecer una comparación entre los parámetros obtenidos a partir de ambas alternativas.

FUNDAMENTO

Los cultivos bacterianos son capaces de dispersar la luz de una manera aproximadamente proporcional a la masa celular. A longitudes de onda en el rango del espectro visible, la absorción de luz por los constituyentes celulares coloreados es insignificante por lo que la mayor parte de la turbidez se debe a la dispersión de la luz, pues ésta depende del alto índice de refracción de la bacteria. A longitudes de onda donde la razón **absorbancia/luz dispersa** es baja, la densidad óptica de un cultivo puede medirse en un espectrofotómetro y es proporcional al número de células.

3) En T_{λ} Generalmente se emplean longitudes de onda entre 490 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por productos amarillos podría llegar a ser significativa. La relación exacta entre la absorbancia a cierta longitud de onda y el número de células varía de acuerdo a la cepa utilizada y a las condiciones de cultivo, ya que la razón **masa/número de células** se modifica con el medio.

La curva de crecimiento completa comprende principalmente tres fases: - la adaptativa, exponencial y estacionaria. La más utilizada para caracterizar el crecimiento de un cultivo es la fase exponencial, a partir de la cual se obtiene la **velocidad de crecimiento** y el **tiempo de generación** partiendo de las siguientes suposiciones:

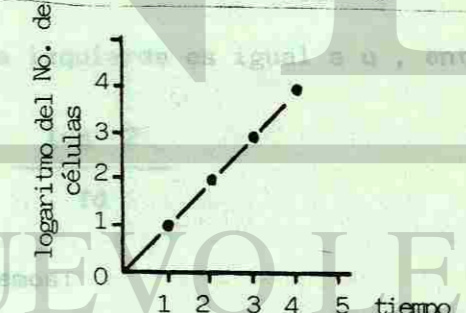
- 1) Las bacterias se reproducen por fisión binaria, lo que significa que el incremento en el número de células conforme transcurre el tiempo podría expresarse de la siguiente forma:

$$1 \text{ célula} \rightarrow 2 \text{ células} \rightarrow 4 \text{ células} \rightarrow 8 \text{ células}$$

- 2) Cuando el crecimiento se expresa matemáticamente en términos de una **base**, el incremento es determinado por su **exponente**, por ello este tipo de crecimiento recibe el nombre de **exponencial**:

$$2^0 \text{ células} \rightarrow 2^1 \text{ células} \rightarrow 2^2 \text{ células} \rightarrow 2^3 \text{ células} \rightarrow 2^4 \text{ células}$$

Una gráfica del logaritmo de número de células (exponentes) contra tiempo proporciona una línea recta cuya pendiente define a la **velocidad específica de crecimiento** (μ) como se muestra enseguida:



Matemáticamente la velocidad específica de crecimiento se obtiene conforme la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\log N_f - \log N_0}{t} \quad (1)$$

donde N_0 y N_f son el número inicial y final de células respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre ambos conteos.

GENÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional bacteriano puede definirse en términos del incremento en la masa celular o del número de células. Generalmente estos dos parámetros guardan una relación directamente proporcional, pero puede variar según las condiciones de cultivo.

La masa celular se expresa ya sea como peso seco, volumen celular, o contenido de nitrógeno o turbidez. Esta última es la más utilizada porque su medición rápida en un fotocolorímetro o espectrofotómetro permite rastrear la densidad de un cultivo mientras está creciendo.

Respecto al incremento en el número de células, éste se determina directamente mediante cuentas viables en placa, aunque existen técnicas electroquímicas sofisticadas que permiten determinarlas.

OBJETIVO

En este ensayo se persiguen los siguientes objetivos:

- 1) Monitorizar fotocolorimétricamente la turbidez de un cultivo bacteriano en multiplicación activa.
 - 2) Representar gráficamente el desarrollo celular por etapas apreciando los diferentes estadios de crecimiento.
 - 3) Manejar matemáticamente los datos del rastreo fotocolorimétrico para definir los parámetros de crecimiento bacteriano.
 - 4) Determinar los parámetros de crecimiento en función del incremento en el número de células.
- Se establecerá una comparación entre los parámetros obtenidos a partir de ambas alternativas.

FUNDAMENTO

Los cultivos bacterianos son capaces de dispersar la luz de una manera directamente proporcional a la masa celular. A longitudes de onda del espectro visible, la absorción de luz por los constituyentes celulares es insignificante por lo que la mayor parte de la turbidez que se genera es significativa por la que la mayor parte de la turbidez que se genera es la luz, pues ésta depende del índice de refracción de la bacteria. A longitudes de onda donde la razón absorbancia/luz dispersada es baja, la densidad óptica de un cultivo puede medirse en un espectrofotómetro y es proporcional al número de células.

3) En forma más general, el número inicial de células se modifica conforme transcurre el tiempo de acuerdo a la siguiente relación:

$$N_0 \rightarrow 2N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0$$

o sea, el número final de células es igual a:

$$N_f = 2^z N_0 \quad (2)$$

donde z es el número de generaciones, el cual puede obtenerse fácilmente al conocer el tiempo transcurrido y el tiempo de duplicación (Td):

$$z = \frac{t}{T_d} \quad (3)$$

Comunmente se desconocen Td y z, por lo que combinando las ecuaciones 2 y 3 se puede obtener Td según el planteamiento siguiente:

a) Despejando z de la ecuación 2 tenemos:

$$\frac{\log N_f - \log N_0}{\log 2} = z = \frac{t}{T_d}$$

b) Combinando las ecuaciones y regroupando términos tenemos que:

$$\frac{\log N_f - \log N_0}{t} = \frac{\log 2}{T_d}$$

c) Puesto que el miembro de la izquierda es igual a u, entonces:

$$\mu = \frac{\log 2}{T_d} \quad (4)$$

De aquí al despejar Td obtenemos:

$$T_d = \frac{\log 2}{\mu}$$

Ecuaciones similares se obtienen si se sustituye el número de células (N) por peso seco, absorbancia o unidades Klett. Si existe una relación directa entre el número de células y cualquiera de los otros parámetros, una consecuencia matemática de este hecho es que el valor de μ deberá ser igual.

Generalmente se emplean longitudes de onda entre 490 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por productos amarillos podría llegar a ser significativa. La relación exacta entre la absorbancia a cierta longitud de onda y el número de células varía de acuerdo a la cepa utilizada y a las condiciones de cultivo, ya que la razón masa/número de células se modifica con el medio.

La curva de crecimiento muestra un comportamiento que puede ser descrito por la ley de crecimiento exponencial. El crecimiento de un cultivo en la fase exponencial se caracteriza por tener la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación constantes en las siguientes suposiciones:

1) Las bacterias se reproducen por fisión binaria. Lo que significa que el incremento en el número de células durante un tiempo determinado se expresa de la siguiente forma:

$$1 \text{ célula} \rightarrow 2 \text{ células} \rightarrow 4 \text{ células} \rightarrow 8 \text{ células}$$

2) Cuando el crecimiento se expresa matemáticamente en términos de una base, el incremento es determinado por su exponente, por ello se puede de crecimiento recibe el nombre de exponencial:

$$2^0 \text{ células} \rightarrow 2^1 \text{ células} \rightarrow 2^2 \text{ células} \rightarrow 2^3 \text{ células}$$

Una gráfica del logaritmo de número de células (log N) contra el tiempo (t) proporciona una línea recta cuya pendiente indica la velocidad específica de crecimiento (μ) como se muestra enseguida:



Matemáticamente la velocidad específica de crecimiento se obtiene cuando se la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\log N_f - \log N_0}{t}$$

donde N₀ y N_f son el número inicial y final de células respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre ambos conteos.



MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensaye con Agar Nutritivo inclinado, conteniendo un cultivo de *Escherichia coli*.
- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo nutritivo o Caldo Luria.
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 1 matraz nefelométrico de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo (Caldo Nutritivo o Medio Mínimo de Glucosa y sales)
- 1 pipeta graduada de 5 ml estéril
- 1 gradilla
- 3 Tubos de dilución: tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 9.9 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 4 Tubos de dilución: tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 4.5 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 8 Tubos de agar blando: tubos de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar-agar al 0.6% estéril.
- 9 pipetas de 1 ml estériles
- 8 placas de Agar Nutritivo
- Fotocolorimetro equipado con filtro verde
- Baño de agua a 45°C
- Vortex
- Incubadora a 37°C
- Agitador rotatorio con temperatura controlada
- El Medio Mínimo de Glucosa y sales contiene en un litro de agua destilada los siguientes ingredientes: $MgSO_4$, 0.2 g; $CaCl_2$, 0.1 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; K_2HPO_4 , 1.0 g; NH_4Cl , 2.0 g; Glucosa, 1.0 g.

MÉTODOS

- 1.- Inocular por asada un tubo de ensaye conteniendo 10 ml de Caldo Luria, empleando la cepa de *Escherichia coli*. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2.- Verificar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en el matraz nefelométrico, habiendo calibrado el aparato previamente con agua destilada. El valor obtenido deberá sustraerse a cada una de las lecturas subsecuentes y la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transfiera asépticamente 1 ml del cultivo de toda la noche al matraz nefelométrico y registre inmediatamente la turbidez. Esta se considerará la lectura al tiempo 0.
- 4.- A la vez realice una cuenta viable del inóculo procediendo como sigue: prepare diluciones seriadas del cultivo de toda la noche y luego transfiera **por duplicado** 0.1 ml de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} a pares de tubos de agar blando previamente fundidos y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcle homogéneamente y vacie **todo** el contenido de los tubos sobre la superficie de Agar Nutritivo contenido en cajas de Petri. Permita que se lidifique e incube las cajas a 37°C durante 24°C invirtiéndolas.

MATERIAL Y REACTIVOS

1 tubo de ensayo con Agar Nutritivo inclinado, contenido en cubitaje de Escherichia coli.
1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm contenido de 10 ml de caldo nutritivo a Caldo Luria.
1 asa bacteriológica
1 mechero
1 matraz nefelométrico de 250 ml
Nutritivo o Medio Mínimo de Glucosa y sales controlado en un litro de agua destilada
1 pipeta graduada de 5 ml esterilizada
3 tubos de dilución: tubos de ensayo de 18 x 150 mm esterilizados a los 100°C.
Las diluciones serán: 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ de 0.1 ml de NaCl 0.85% en 9.9 ml de agua.
4 Tubos de dilución: tubos de ensayo de 18 x 150 mm esterilizados a los 100°C.
Las diluciones serán: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ de 0.1 ml de NaCl 0.85% en 9.9 ml de agua.
8 Tubos de agar plático: tubos de ensayo de 18 x 150 mm contenidos de 2.5 ml de agar-agar al 0.8% en agua.
9 pipetas de 1 ml esterilizadas
8 placas de Agar Nutritivo
Fotocolorímetro equipado con filtro verde
Baino de agua a 45°C
Vortex
Incubadora a 37°C
Agitador rotatorio con temperatura controlada
El Medio Mínimo de Glucosa y sales controlado en un litro de agua destilada
algunos ingredientes: NaCl 0.1 g; Caseína 0.1 g; KH₂PO₄ 1.0 g; MgSO₄ 1.0 g; NaHCO₃ 0.2 g; Glucosa 1.0 g.

MÉTODOS

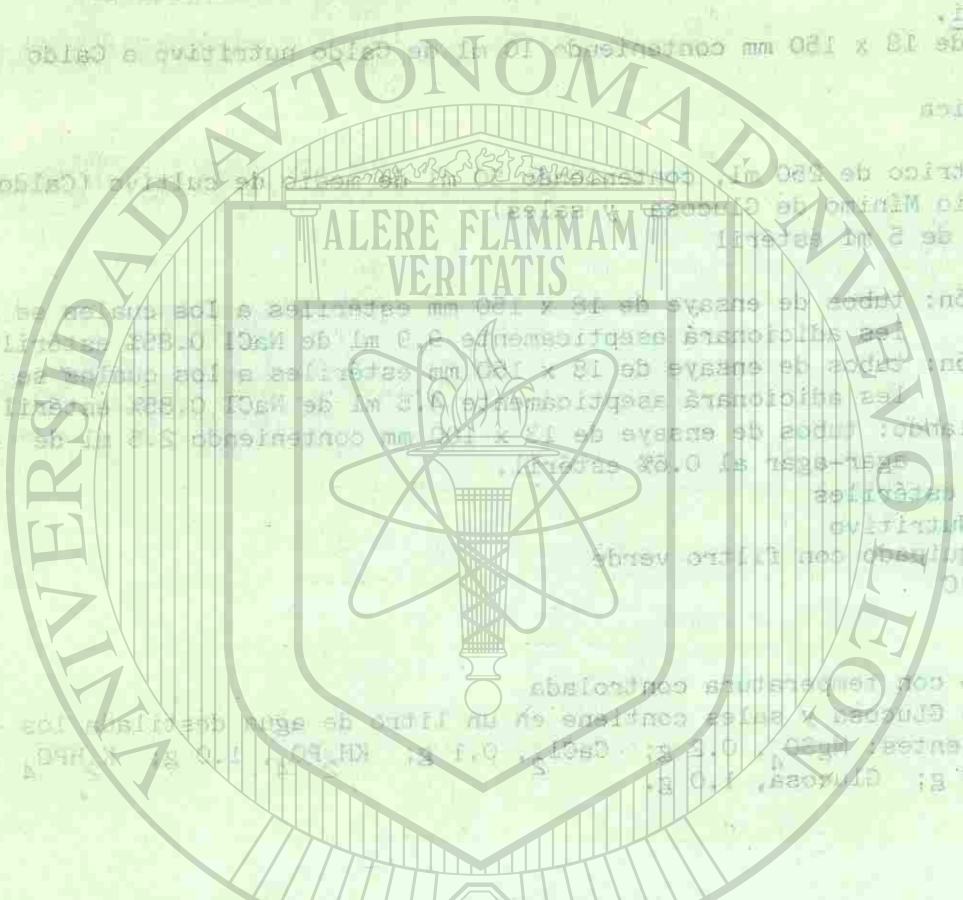
1.- Inocular por asepsia un tubo de ensayo contenido de 10 ml de caldo Luria, empujando la cepa de Escherichia coli. Incubar a 37°C durante toda la noche.
2.- Verificar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en el matraz nefelométrico, haciendo calibrado el aparato previamente con agua destilada. El valor obtenido deberá anotarse a cada una de las lecturas subsiguientes y la diferencia entre ellas a turbidez térmica expresada en log U.K. las presentes en el caldo.
3.- Transferir asepticamente 1 ml del cultivo de toda la noche al matraz nefelométrico y registrar inmediatamente la turbidez. Para ser considerado el lectu- ra al tiempo 0.
4.- A la vez realizar una cuenta viable del cultivo procediendo como sigue: pre- parar diluciones seriadas del cultivo de toda la noche y luego transferir por duplicado 1 ml de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ a placas de tubos de agar siendo previamente fundidos y mantenidos en baino de agua a 45°C. De in- medio mezcle homogéneamente y vacie todo el contenido de los tubos sobre- la superficie de Agar Nutritivo contenido en cajas de Petri. Permita que se solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24°C invertiéndolas.

- 5.- Una vez hecha la lectura del matraz nefelométrico, incubelo con agitación a 37°C durante 13 horas.
6.- Cada hora registrar la turbidez del cultivo al fotocolorímetro y anotar sus lecturas.
7.- Entre las 3 - 5 horas de incubación, realizar nuevamente una cuenta viable pero ahora del cultivo en crecimiento, para ello proceda conforme se indicó en el inciso 4, pero para el vaciado en placa utilice las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ del cultivo.

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla registre las lecturas ya corregidas de la turbidez observada por su cultivo.
Temperatura de incubación: _____

TIEMPO (h)	UNIDADES KLETT (U.K.)	log U.K.
0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.- Una vez hecha la lectura del material bacteriológico, incubado con agitación a 37°C durante 18 horas.

3.- Cada hora registrar la turbidez del cultivo al fotocolorímetro y anotar sus lecturas.

4.- Entre las 3 - 5 horas de incubación, realizar nuevamente una cuenta viva por hora del cultivo en cámara de recuento para ello preparar como se indicó en el inciso 4. para las lecturas en cámara de recuento las divisiones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ del cultivo.

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla registre las lecturas ya corregidas de la turbidez observada por el cultivo.

Tiempo (h)	log U.K.
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	

2.- Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel - semilogaritmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscissas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Procure rotular correctamente su figura.

3.- Localice en la gráfica las diferentes fases de crecimiento, e indique enseguida su duración:

Fase Lag : _____

Fase Exponencial : _____

Fase Estacionaria: _____

4.- Registre tambien los siguientes datos:

Medio de Cultivo : _____

Temperatura de Incubación: _____

Agitación : _____

5.- Analice su gráfica, determine que puntos corresponden a la fase exponencial de crecimiento y complete el siguiente cuadro considerando - como X al tiempo en horas y Y al logaritmo de las Unidades Klett. Somete esos datos a regresión lineal para obtener la pendiente que es - la que representa la velocidad de crecimiento (μ).

Tiempo (h) X	log U.K. Y	X ²	XY	Y ²
$\Sigma X =$	$\Sigma Y =$	$\Sigma X^2 =$	$\Sigma XY =$	$\Sigma Y^2 =$
n =				

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.- Con las ecuaciones dadas a continuación obtenga la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan los puntos de la fase exponencial. *Estos valores se reportan usando el tipo de logaritmo empleado en su cálculo. Independientemente, los ejes de μ son siempre h^{-1} o $\ln h^{-1}$.*

Ecuación de la recta: $Y = m X + b$

Obtenga el tiempo de duplicación y el número de células por litro por hora. Use las ecuaciones (3) y (5) dadas en el fondo del libro.

$$b = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{Intersecto con el eje de las Y}$$

CALCULOS

$$m = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{pendiente de la recta}$$

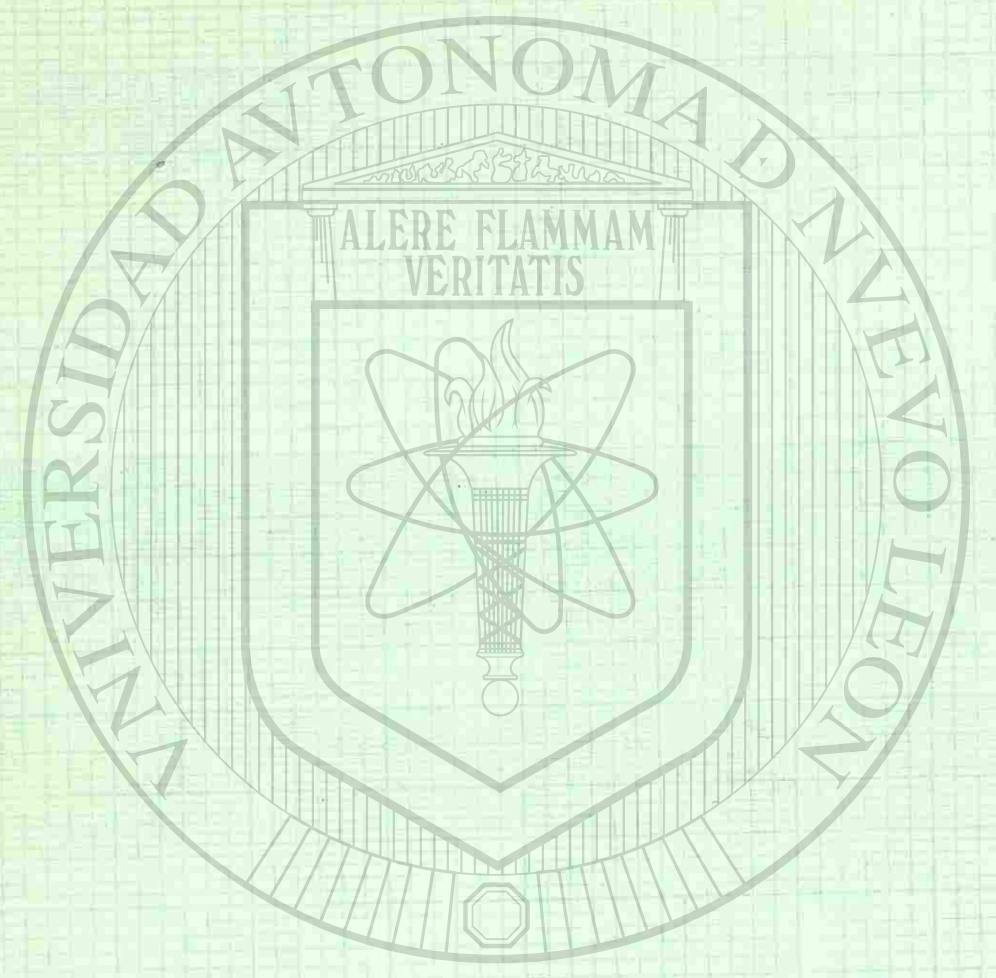
CALCULOS

U A N L

3.- Obtenga el número de células presentes en el inóculo; para ello proceda llenando los bloques que se proporcionan a continuación con los datos solicitados en la parte superior y realizando las operaciones indicadas en la secuencia.

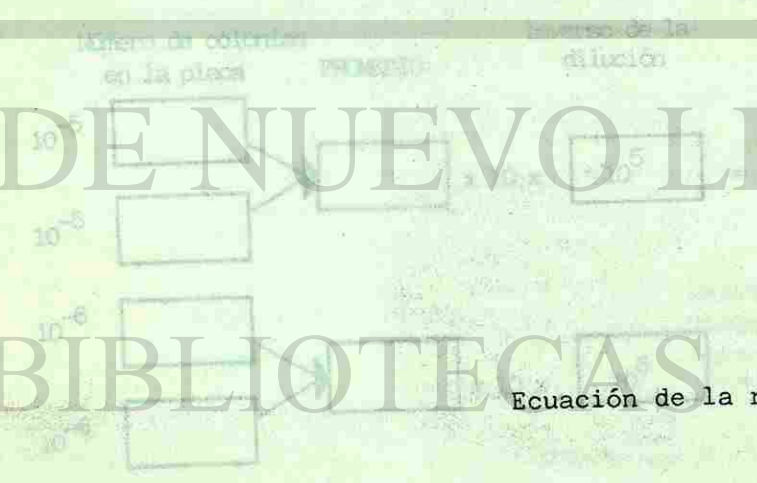
Td = _____
 Z = _____

El promedio es el número de células por litro en el inóculo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



(R)

b = _____
 m = _____
 Ecuación de la recta = _____
 μ = _____

6.- Con las ecuaciones dadas a continuación obtenga la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan los puntos de la fase exponencial. *Estos valores se reportan usando el tipo de logaritmo empleado en su cálculo. Independientemente, las gráficas de μ son siempre t^{-1} o $\ln t^{-1}$.*

Ecuación de la recta: $Y = m X + b$

Obtenga el tiempo de duplicación y el número de células por litro por hora. Use las ecuaciones (3) y (5) dadas en el fondo del libro.

$$b = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{Intersecto con el eje de las Y}$$

CALCULOS

$$m = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{pendiente de la recta}$$

C A L C U L O S

U A N L

3.- Obtenga el número de células presentes en el inóculo; para ello proceda llenando los bloques que se proporcionan a continuación con los datos solicitados en la parte superior y realizando las operaciones indicadas en la secuencia.

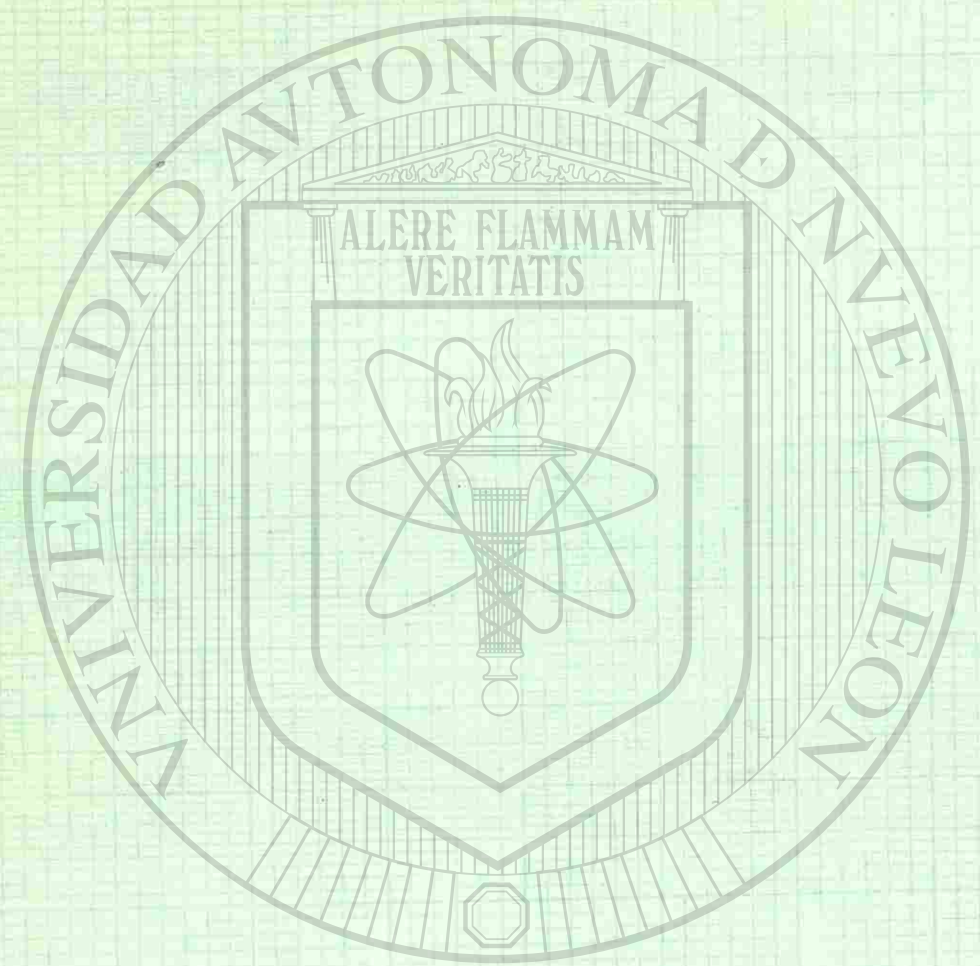
Td = _____
 Z = _____

El promedio es el número de células por litro en el inóculo.

Número de colonias en la placa	Volumen de la dilución
10^5	10^{-5}
10^4	10^{-4}
10^3	10^{-3}
10^2	10^{-2}
10^1	10^{-1}

(R)

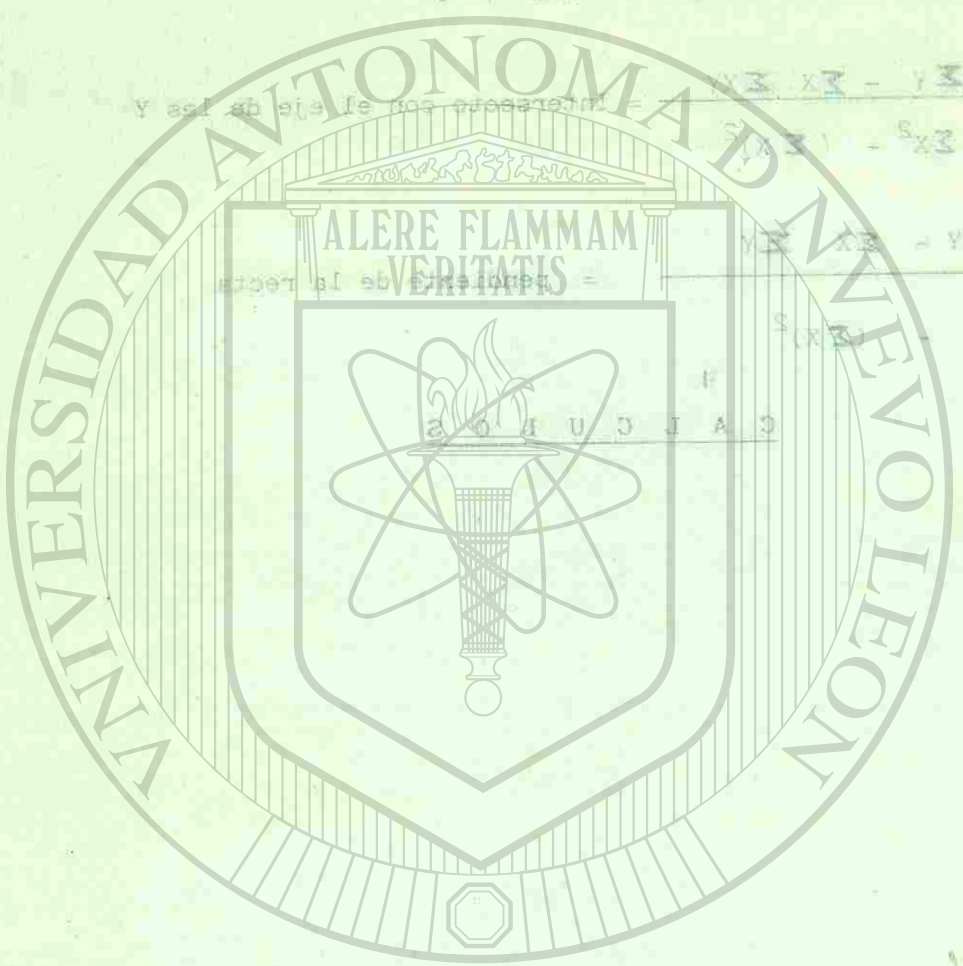
b = _____
 m = _____
 Ecuación de la recta = _____
 $\mu =$ _____



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

8.- Con las ecuaciones dadas a continuación obtenga la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan los puntos de la fase exponencial.



NOTA: La velocidad de crecimiento (μ) puede obtenerse también utilizando logaritmos - o aún mejor logaritmos base 2, por lo que cuando se informa respecto a estos valores es importante señalar el tipo de logaritmos empleados en su cálculo. Independientemente, las unidades de μ son siempre h^{-1} o min^{-1} .

CALCULOS

7.- Una vez obtenida μ , calcule el tiempo de duplicación y el número de generaciones transcurridas durante el intervalo comprendido por la fase exponencial. Emplee las ecuaciones (3) y (5) dadas en el fundamento.

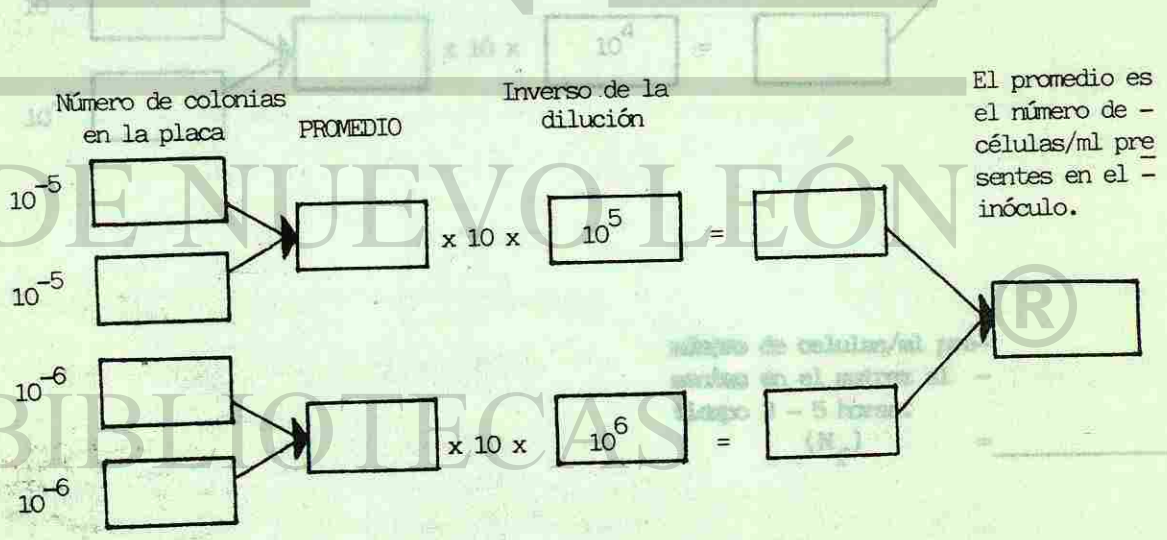
CALCULOS

número de células/ml presentes en el matraz al tiempo 0 (N_0)

10.- Obtenga el número de células/ml presentes en el matraz al tiempo 3-5 horas; para ello proceda como se indicó anteriormente en el inciso 8.

Número de colonias en la placa PROMEDIO Inverso de la dilución El promedio es el número de células/ml.

8.- Obtenga el número de células/ml presentes en el inóculo; para ello proceda llenando los bloques que se proporcionan a continuación con los datos solicitados en la parte superior y realizando las operaciones indicadas en la secuencia.

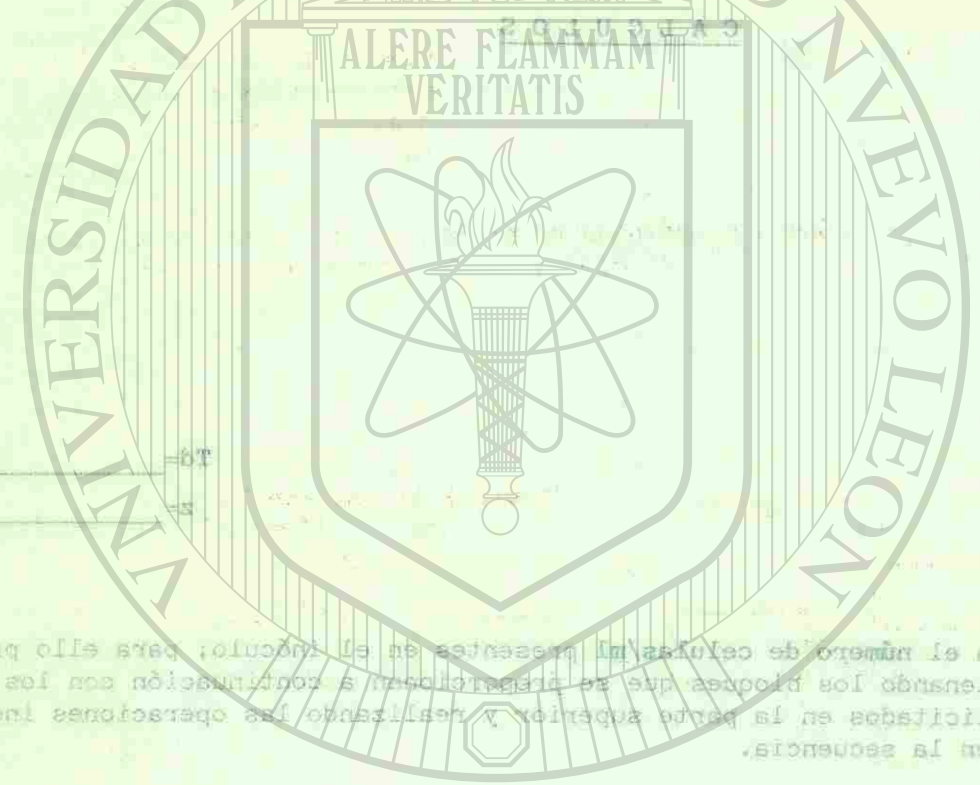


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOTA: La velocidad de crecimiento (μ) puede obtenerse también utilizando logaritmos o sus mejores logaritmos base 2, por lo que cuando se informe respecto a estos valores es importante señalar el tipo de logaritmos empleados en su cálculo. Indicar, si es posible, las unidades de μ, así como el tiempo de generación.

Una vez obtenida μ, calcule el tiempo de generación y el número de generaciones que ocurren durante el intervalo comprendido por las fases exponencial, logarítmica y estacionaria. Emplee las ecuaciones (1) y (2) dadas en el fundamento.



Obtenga el número de células/ml presentes en el matraz para ello proceda como se indicó anteriormente en el inciso 8. Cada vez que se realice una operación de división en la secuencia, registre el resultado en la columna correspondiente.



9.- Con el dato anterior calcule el número de células/ml presentes en el matraz nefelométrico al tiempo 0. Considere que tomó 1 ml del cultivo de toda la noche y lo adicionó a 50 ml de medio.

CALCULOS

número de células/ml presentes en el matraz al tiempo 0 (N₀) = _____

10.- Obtenga el número de células/ml presentes en el matraz al tiempo 3-5 horas; para ello proceda como se indicó anteriormente en el inciso 8.

12.- Llene la siguiente tabla con los datos solicitados:

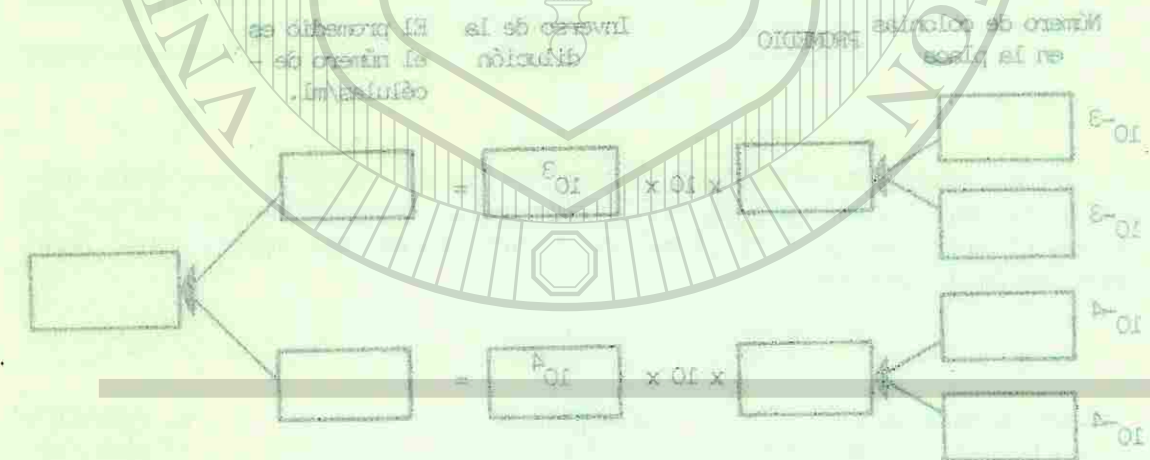
Número de colonias en la placa	PROMEDIO	Inverso de la dilución	El promedio es el número de células/ml.
10 ⁻³ <input type="text"/>	<input type="text"/> x 10 x	10 ³	= <input type="text"/>
10 ⁻³ <input type="text"/>	<input type="text"/>		
10 ⁻⁴ <input type="text"/>	<input type="text"/> x 10 x	10 ⁴	= <input type="text"/>
10 ⁻⁴ <input type="text"/>	<input type="text"/>		

número de células/ml presentes en el matraz al tiempo 3-5 horas. (N_f) = _____

9.- Con el dato anterior calcule el número de células/ml presentes en el
 punto de tiempo 0. Considere que tomó 1 ml del cultivo
 y lo sembró en un tubo de 50 ml de medio.

CALCULOS

10.- Obtenga el número de células/ml presentes en el punto de tiempo 3-5
 horas; para ello proceda como se indicó anteriormente en el inciso 8.



11.- Con los datos obtenidos en los incisos 9 y 10 obtenga μ , T_d y z em
 pleando las ecuaciones (1), (3) y (5) dadas en el fundamento.

CALCULOS

12.- Llene la siguiente tabla con los datos solicitados.

FUENTE	PARAMETROS DE CRECIMIENTO		
	μ (h^{-1})	T_d (h)	z
TURBIDEZ			
NUMERO DE CELULAS			

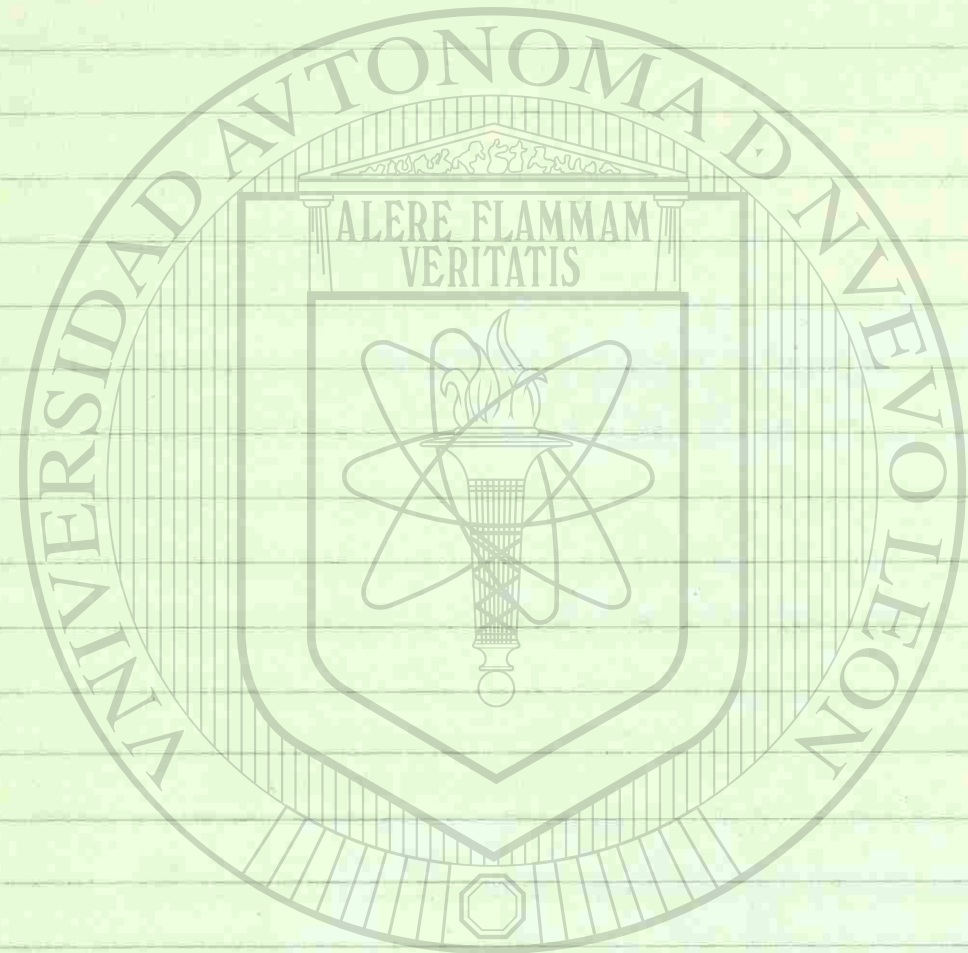
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

Blank lines for writing conclusions.

BIBLIOGRAFIA

1.-Davis, B.O., R. Dulbecco., H.M. Eisen., H.S. Gardner.,
 G.B. Wood y M. McCarty. 1973. Microbiology. Har-
 per & Row Publishers. 2a. Edition. pp 95-98.

2.-Daven, E.A. 1972. Quantitative Problems in Biochemistry.
 Garland Livingstone. 5a. Edition. Edinburg &
 London. pp 312-332.

3.-Gaudy A.F. y E.T. Gaudy. 1981. Microbiology for Environmen-
 tal Scientists and Engineers. McGraw-Hill Inter-
 national Book Company. 1a. Edition. pp 207-307.

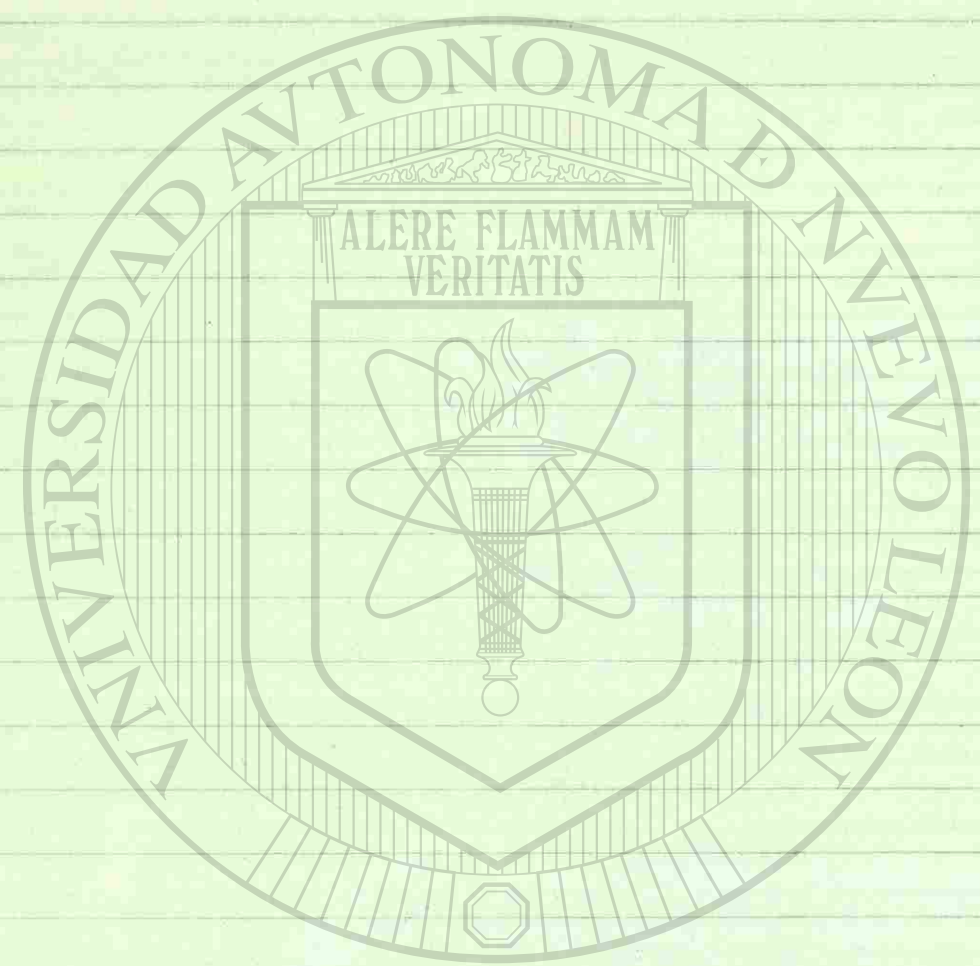
4.-Jayson, E., J.L. Melnick y E. A. Adelberg. 1980. Review
 of Medical Microbiology. Lange Medical Publica-
 tion. 14th. Edition. pp 88-95.

5.-Jochlik, W.K., H.P. Willett y D.B. Ames. 1975. *Genética*
Microbiología. Editorial Médica Panamericana.
 18ª Edición. pp 95-102.

6.-Miller, J.H. 1977. Experiments in Molecular Genetics.
 Cold Spring Harbor Laboratory. pp 31-38.

Blank lines for additional bibliography or notes.

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ISOLAMIENTO DE BACTERIAS ENVIAJADAS

INTRODUCCION

Las bacterias viajan en los alimentos, en el agua y en el aire...

BIBLIOGRAFIA

1.-Davis, B.D., R. Dulbecco., H.M. Eisen., H.S. Ginsberg., W.B. Wood y M. McCarty. 1973. Microbiology. Harper & Row Publishers. 2a. Edition. pp 96-98.

2.-Dawes, E.A. 1972. Quantitative Problems in Biochemistry. Churchill Livingstone. 5a. Edition. Edinburg & London. pp 312-332.

3.-Gaudy.A.F. y E.T.Gaudy. 1981. Microbiology for Enviromental Scientists and Engineers. McGraw-Hill International Book Company. 1a. Edition. pp 207-307.

4.-Jawetz, E., J.L. Melnick y E. A. Adelberg. 1980. Review of Medical Microbiology. Lange Medical Publication. 14th. Edition. pp 86-95.

5.-Joklik, W.K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986, Zinsser - Microbiología. Editorial Médica Panamericana. - 18ª Edición. pp 96-102.

FUNDAMENTO

El aislamiento de bacterias se realiza en un medio de cultivo...

Después del enriquecimiento se inoculará directamente el cultivo...

Después del enriquecimiento se inoculará directamente el cultivo...

PRACTICA No. 2

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENVAINADAS

algodonosa.

Estas colonias... incapacidad para oxidar iones manganosos.

INTRODUCCION

MATERIAL Y REACTIVOS

Ciertas bacterias acuáticas, principalmente los generos Sphaerotilus y Leptothrix, son capaces de formar vainas que les permiten adherirse a superficies sólidas y las protegen de la depredación. Una característica de estos organismos es su capacidad para depositar hidróxido férrico y algunas veces (Leptothrix), dióxido de manganeso en sus vainas. Supuestamente esta impregnación contribuye a la estabilidad y densidad de las vainas, las cuales perduran aún cuando las bacterias ya las han abandonado.

Estos microorganismos están ampliamente distribuidos y son relativamente fáciles de aislar. Sphaerotilus natans tiene como hábitat las corrientes lentas de aguas contaminadas con desechos de alcantarillado o de las industrias papelera, agrícola o alimenticia; donde forma grandes borlas viscosas adheridas a las piedras, plantas y otros objetos sumergidos. También se le encuentra en los lodos activados y como flora natural de rios y estanques. Por otra parte, los miembros del género Leptothrix se encuentran en rios o arroyos de corriente lenta que no están contaminados. Algunas especies de este género tambien pueden encontrarse en aguas escasamente contaminadas o en lodos activados.

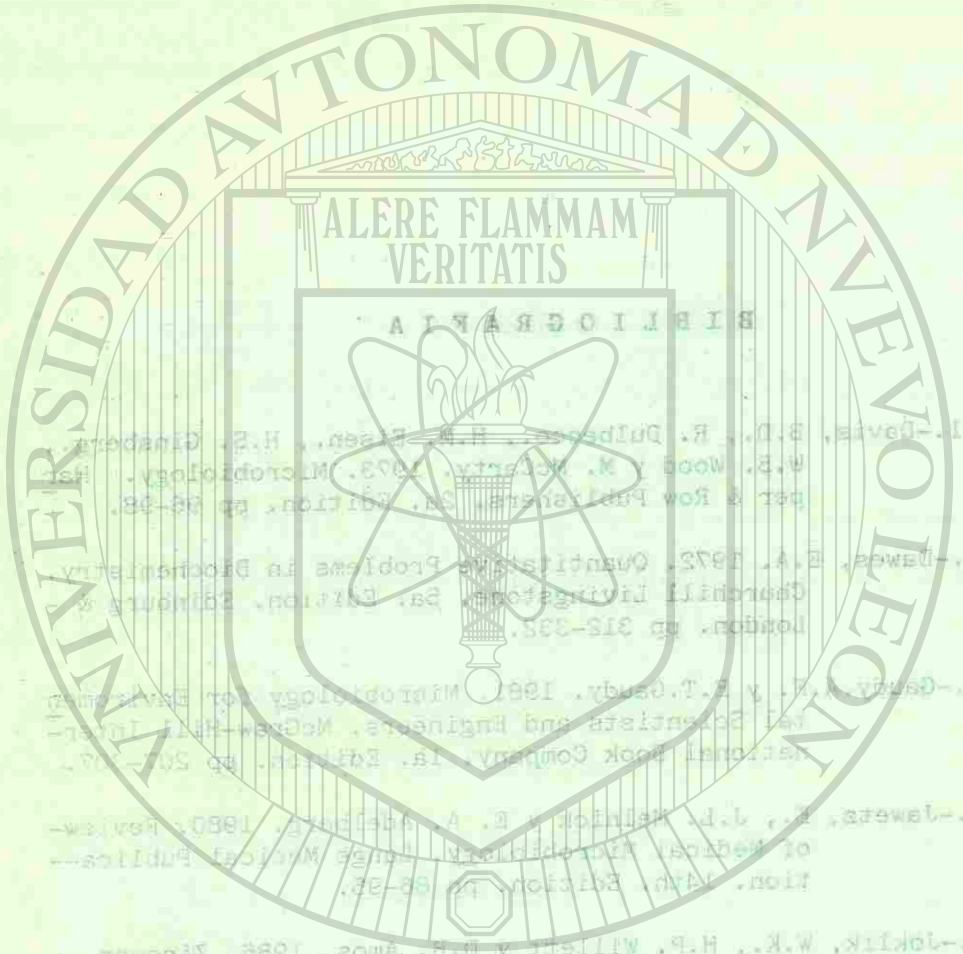
OBJETIVO

Mediante observaciones microscópicas y cultivo en medios adecuados pretendemos aislar de su hábitat natural alguna bacteria productora de vainas, y al lograrlo ensayaremos su capacidad para oxidar el manganeso.

FUNDAMENTO

Atendiendo a su hábitat natural se localizará un cuerpo de agua en la localidad que posea las siguientes características: flujo lento y contaminación densa con materia orgánica procedente de desechos industriales. Se tomará una muestra y se inoculará en un medio con escaso contenido de nutrientes para favorecer el desarrollo filamentosos de Sphaerotilus natans y a la vez frenar la multiplicación de otros microorganismos. El medio contendrá pequeños fragmentos de paja que servirán como soportes a donde se adherirán las vainas.

Después del enriquecimiento se examinará microscópicamente el cultivo para detectar la presencia de organismos envainados. Luego transferiremos una paja a un medio sólido pobre en nutrientes que deberá incubarse previamente a 37°C durante toda la noche para reducir la humedad e impedir el desarrollo de organismos indeseables. Se examinará macroscópicamente el crecimiento desarrollado en busca de las colonias típicas de S. natans, de acuerdo a las siguientes características: colonias planas, de bordes irregulares, opacas y



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DIRECCIÓN GENERAL DE

5.- Con pinzas estériles remover del caldo una de las pajitas y lavarlas con abundante agua estéril.
algunos.

Estas colonias serán purificadas por resiembras y se ensayará su incapacidad para oxidar iones manganosos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de enriquecimiento de Stokes
- 1 matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 50 ml de agua destilada estéril
- 4 Placas de medio sólido de Stokes
- 1 tubo de 13 x 100 mm conteniendo Medio solido de Stokes inclinado
- 1 mechero
- 1 asa bacteriológica
- 2 pipetas graduadas de 10 ml estériles
- portaobjetos y cubreobjetos
- 1 lupa
- 1 pinzas de disección
- 1 regla
- 1 microscopio con objetivo de 100 X
- aceite de inmersión

Medio de enriquecimiento de Stokes: Consiste de paja de alfalfa al 1% en agua de la llave. La paja debe cortarse en piezas de 1 pulgada de largo y trarse con grandes volúmenes de agua hirviendo para eliminar en su totalidad la materia orgánica soluble antes de preparar el medio final.

Medio sólido de Stokes: contiene por litro de agua de la llave los siguientes ingredientes: Glucosa, 1 g; peptona, 1 g; MgSO₄, 0.2 g; CaCl₂, 0.05 g; FeCl₃, 0.01 g; agar, 12.5 g.

Medio de Rouf y Stokes: contien por litro de agua de la llave los siguientes constituyentes: peptona, 5.0 g; Citrato férrico amónico, 0.15 g; MgSO₄, 0.2 g; CaCl₂, 0.05 g; MnSO₄, 0.05 g, FeCl₃, 0.01 g; agar, 12.0 g.

MÉTODOS

- 1.- Recolectar una muestra de agua en un frasco estéril y transportarla al laboratorio.
- 2.- Transferir 10 ml de la muestra de agua a un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio de enriquecimiento.
- 3.-Incubar estáticamente a temperatura ambiente durante una semana.
- 4.-Tomar muestras del cultivo con una asa bacteriológica y depositarlas separadamente sobre portaobjetos conteniendo una gota de colorante vital. Mezclar, colocar un cubreobjetos y examinar al microscopio con objetivo de 40X en busca de los filamentos de bacterias envainadas.
- 5.-Dibujar todo el material biológico que aparezca en su preparación, y trate de identificarlo.

ATASMIENTO DE BACTERIAS ENVAINADAS

INTRODUCCION

Las bacterias envainadas son organismos que poseen una estructura celular especial, caracterizada por la presencia de una envaina o capa protectora que las rodea. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables y de permanecer viables durante largos períodos de tiempo.

Las bacterias envainadas son organismos que poseen una estructura celular especial, caracterizada por la presencia de una envaina o capa protectora que las rodea. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables y de permanecer viables durante largos períodos de tiempo.

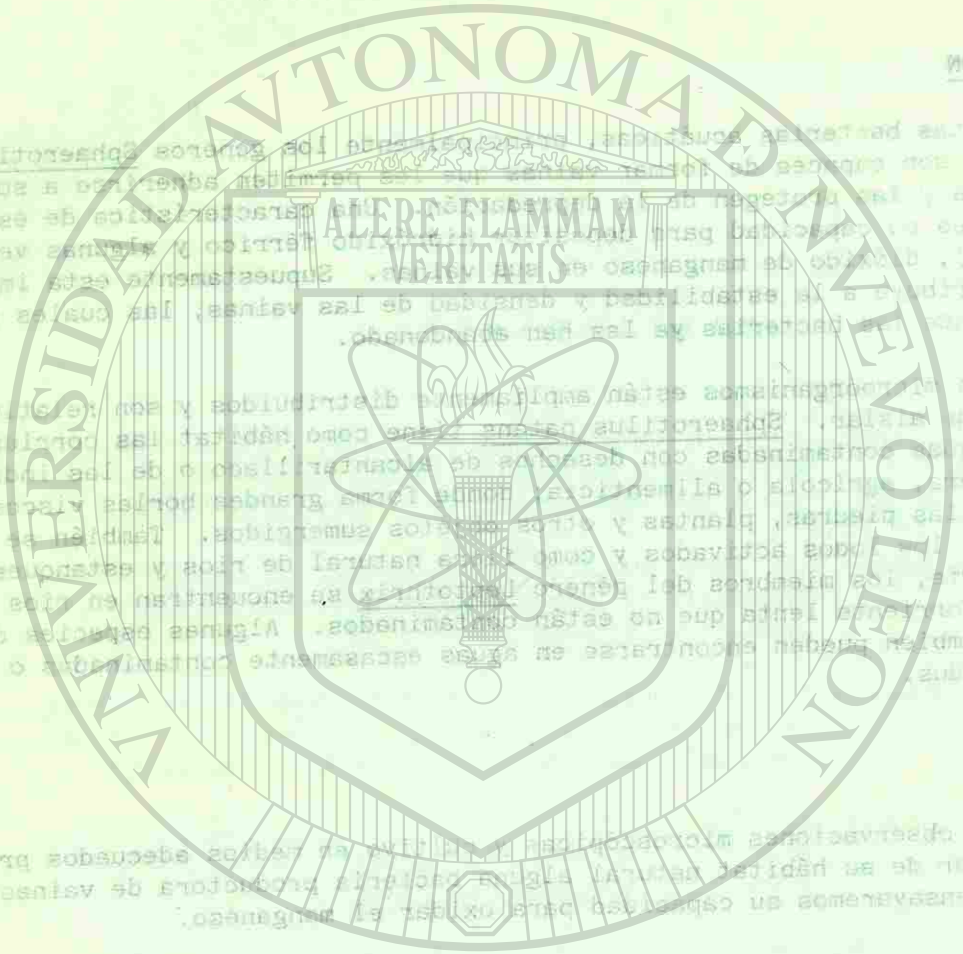
OBJETIVO

Mediante observaciones microscópicas se pretende identificar a las bacterias envainadas que se encuentran en el agua de la llave.

FUNDAMENTO

Atendiendo a su hábitat natural se localizará un cuerpo de agua en la localidad que posee las siguientes características: agua estancada, poca corriente, poca luz solar, etc.

Después del crecimiento se examinará microscópicamente el cultivo para detectar la presencia de organismos envainados. Luego transferiremos una gota a un medio sólido para su identificación.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 6.- Con pinzas estériles remover del caldo una de las pajitas y lavarla con abundante agua estéril.
- 7.- Colocar la paja limpia sobre la superficie de una placa de medio sólido de Stokes seca, procurando depositarla en una orilla; a partir de ella-estriar sobre la superficie del agar con una asa bacteriológica.
- 8.- Incubar la placa a 20 - 25°C durante 2 a 6 días. Después de la incubación examine el crecimiento en busca de las colonias típicas de S. natans. La apariencia de las colonias recuerda las de un hongo joven pero no son tan secas ni tan toscas.
- 9.- Anotar las características macroscópicas de las colonias consideradas -presumiblemente como de S. natans, y medir el diámetro con una regla.
- 10.- Confirmar microscópicamente la identidad de la colonia tomando una muestra de ella con el asa bacteriológica y haciendo una preparación como -se indicó previamente. Dibujar el material biológico observado. Utilice los objetivos de 40X y 100X.
- 11.- Una vez hecha la confirmación, de dicha colonia estriar sobre una placa de medio sólido de Stokes e incubarla de 2 a 6 a 25°C.
- 12.- Reconfirmar la identidad de las colonias típicas de S. natans que aparecen en la placa.
- 13.- De estas colonias tomar una muestra y transferirla a un tubo de ensaye- conteniendo medio sólido de Stokes inclinado e incubarlo a 25°C durante varios días. Otra muestra deberá de ser estriada sobre placas de medio sólido de Rouf y Stokes para probar la incapacidad de S. natans de oxidar iones manganosos. Esta placa se incubará a 25°C durante 48 horas. Las colonias que desarrollen sobre el agar no deberán adquirir una coloración café.
- 14.- Una vez obtenido crecimiento en el tubo de ensaye, etiquetarlo apropiadamente y entregarlo con su informe.

RESULTADOS

- 1.- Anote las características macroscópicas presentadas por el crecimiento - obtenido en el matraz.

MATERIAL Y REACTIVOS

1 matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de enriquecimiento de Stokes
 1 matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 50 ml de agua destilada estéril
 4 placas de medio sólido de Stokes
 1 tubo de 13 x 100 mm conteniendo Medio sólido de Stokes inclinado
 1 mechero
 1 asa bacteriológica
 2 pipetas graduadas de 10 ml estériles
 portapijotas y cubreobjetos
 1 lupa
 1 pinzas de disección
 1 regla
 1 microscopio con objetivo de 100X
 aceite de inmersión

Medio de enriquecimiento de Stokes: Consiste de parte de alfileres de la llave. La parte superior se pica de 1 pulgada de largo y tres tercios con grandes volúmenes de agua hirviendo para eliminar el total. Se da la materia orgánica antes de preparar el medio.

Medio sólido de Stokes: consiste por litro de agua de las siguientes sustancias: Glucosa, 1 g; extracto de levadura, 1 g; FeCl₃ 0.01 g; agar, 10 g.

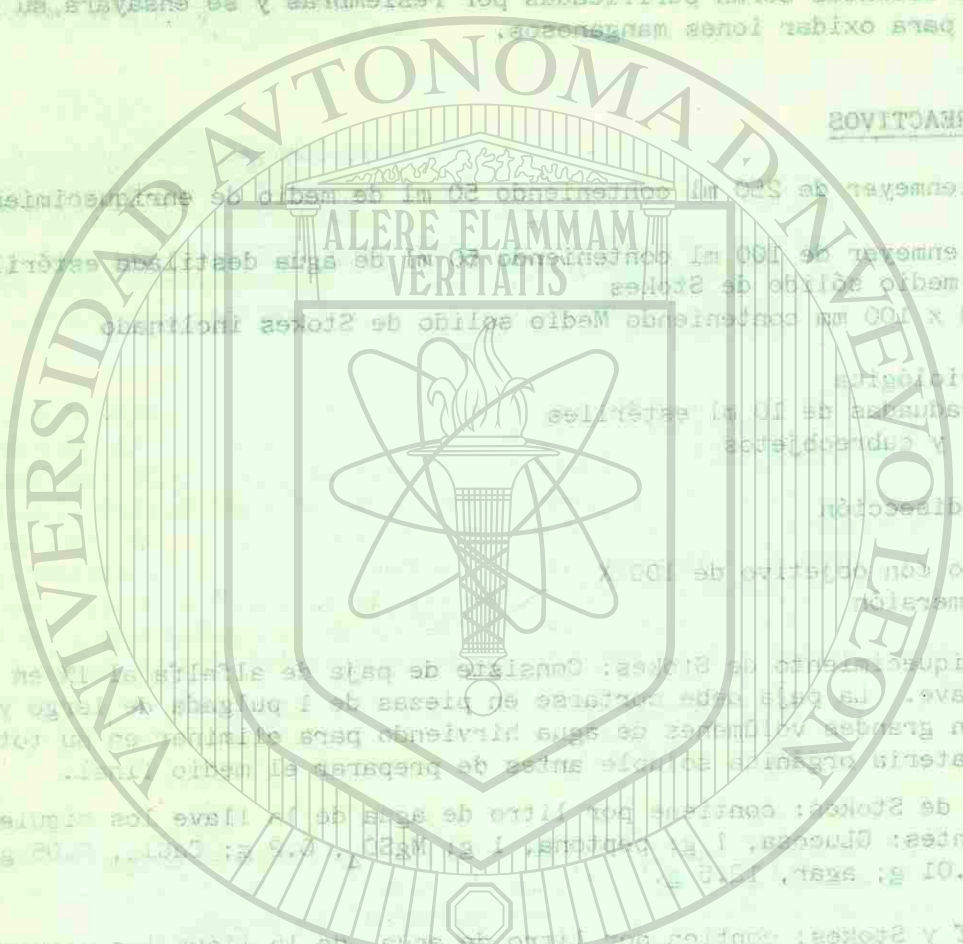
Medio de Rouf y Stokes: consiste por litro de agua de las siguientes sustancias: Glucosa, 5.0 g; extracto de levadura, 0.1 g; FeCl₃ 0.01 g; agar, 10 g; MnSO₄ 0.2 g; CaCl₂ 0.05 g; MgSO₄ 0.05 g; FeCl₃ 0.01 g; agar, 10 g.

MÉTODOS

1.- Transferir 10 ml de la muestra de agua a un matraz Erlenmeyer de 250 ml de medio de enriquecimiento.

2.- Transferir 10 ml de la muestra de agua a un matraz Erlenmeyer de 250 ml de medio de enriquecimiento.

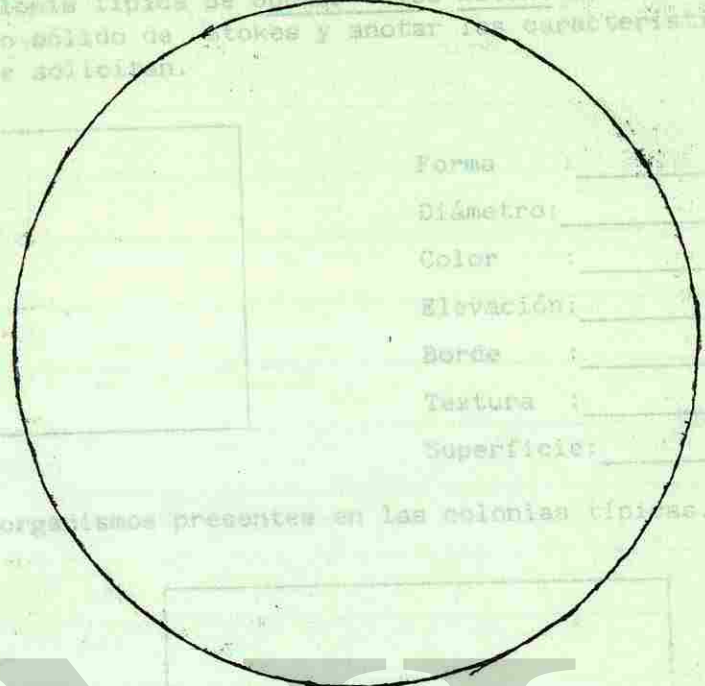
3.- Dibujar todo el material biológico que aparezca en un preparación y etiquetarlo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.- Dibuje enseguida el material biológico observado al examinar microscópicamente el caldo de enriquecimiento, e identifíquelo.


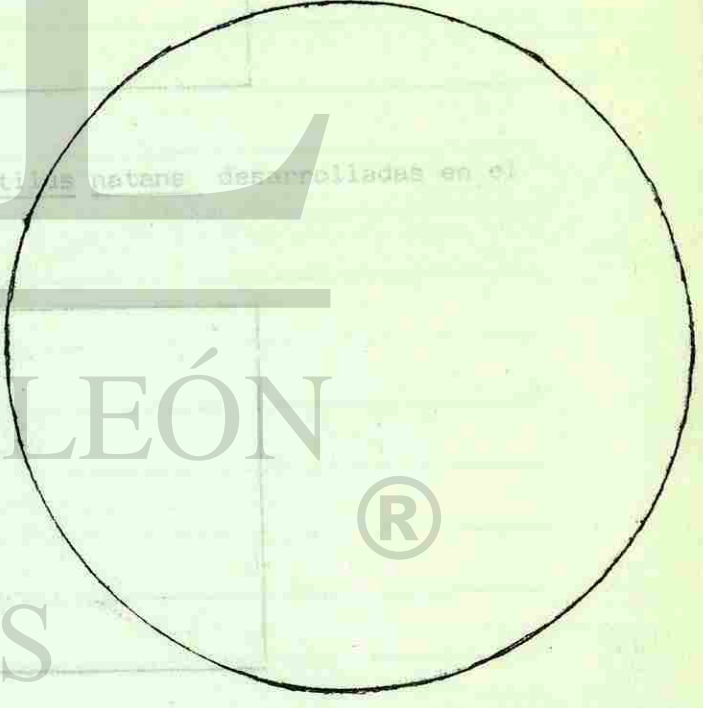
4.- Dibuje una colonia típica de *S. aureus* en un medio sólido de agar y anote sus características macroscópicas.



Forma	_____
Diámetro	_____
Color	_____
Elevación	_____
Borde	_____
Textura	_____
Superficie	_____

5.- Dibujar los organismos presentes en las colonias típicas.

3.- En los espacios siguientes dibuje exclusivamente un filamento de células envainadas observadas en su preparación a los aumentos indicados.

400 X

1000 X

6.- Con pinzas estériles remover del caldo una de las gotas y lavarlas con abundante agua estéril.

7.- Colocar la gota limpia sobre la superficie de una placa de medio sólido de Stokes seca, procurando depositarla en una orilla; a partir de ella esparcir sobre la superficie del agar con una sés bacteriológica.

8.- Incubar la placa a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación examinar el crecimiento en busca de las colonias típicas de *S. aureus*. La apariencia de las colonias típicas de *S. aureus* en un medio sólido de agar es la siguiente:

9.- Anotar las características macroscópicas de las colonias características presentándose como de *S. aureus*. Medir el diámetro con una regla.

10.- Contratar microscópicamente la identidad de la colonia típica que muestra un tipo de crecimiento en forma de gota y haciendo una preparación típica se ilustra previamente. Dibujar el material biológico observado. Utilice los objetivos de 40X y 100X.

11.- Una vez hecha la confirmación de dicha colonia esparcir sobre una placa de medio sólido de Stokes e incubarla de 24 a 36°C.

12.- Reconfirmar la identidad de las colonias típicas de *S. aureus* que aparecen en la placa.

13.- De estas colonias tomar una muestra y transferirla a un tubo de ensayo conteniendo medio sólido de Stokes mojado e incubarlo a 37°C durante varios días. Una muestra deberá ser esparcida sobre placas de medio sólido de agar y placas para probar la identidad de *S. aureus* de oxidar iones manganesos. Esta placa se incubará a 37°C durante 48 horas. Las colonias que desarrollan sobre el agar no deberán adquirir una coloración café.

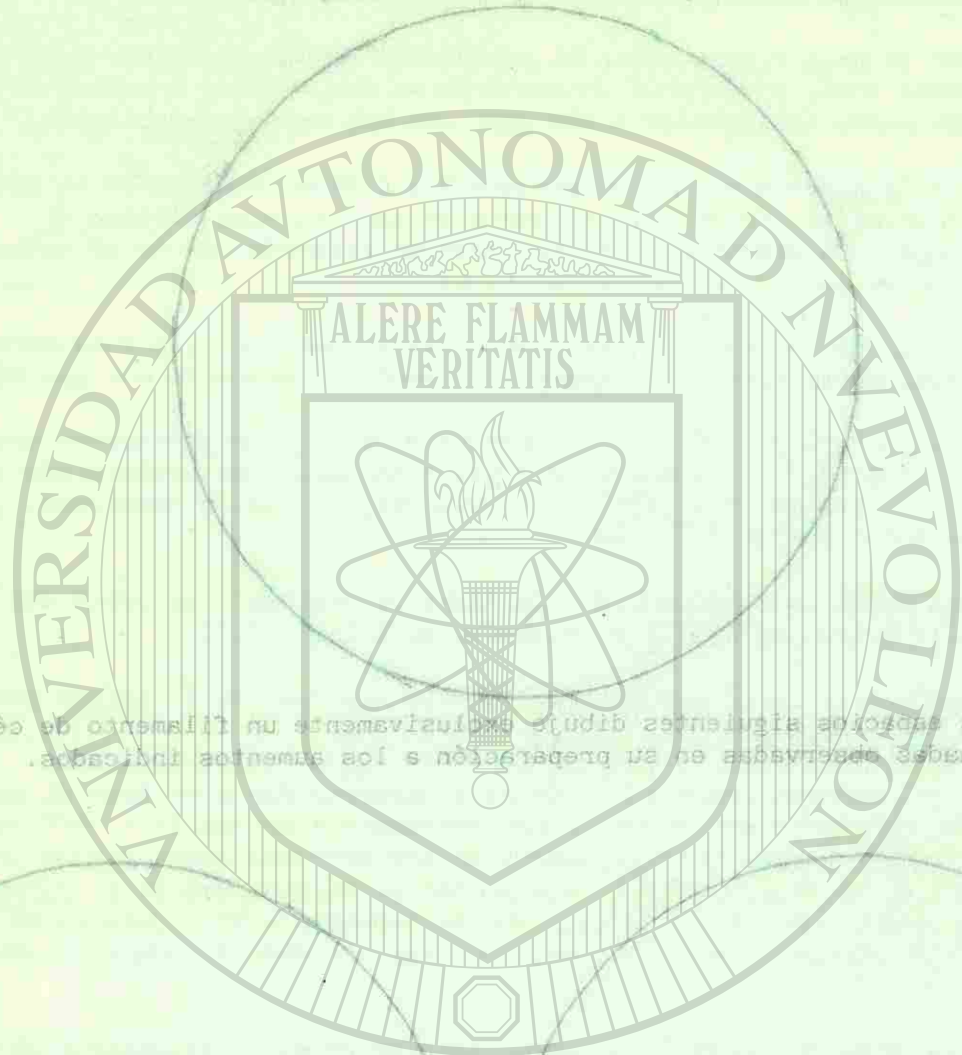
14.- Una vez obtenido crecimiento en el tubo de ensayo, etiquetarlo apropiadamente y entregarlo con su informe.

RESULTADOS

1.- Anote las características macroscópicas presentadas por el crecimiento obtenido en el medio.



3.- Dibuje enérgicamente el material biológico observado al examinar microscópicamente el caldo de enriquecimiento e identifíquelo.



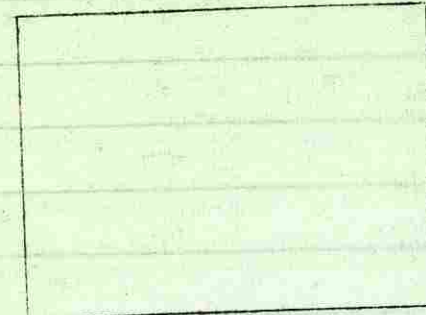
3.- En los cuadros siguientes dibuje exclusivamente un filamento de células envueltas observadas en su preparación e los aumentos indicados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

X 0301

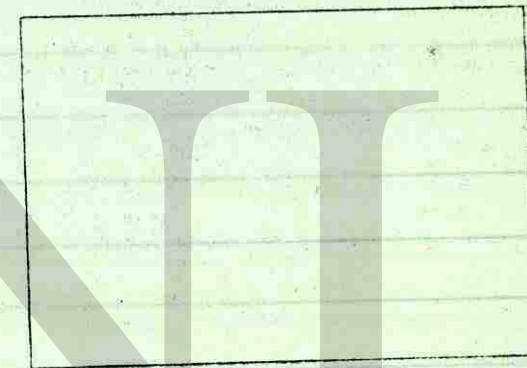
X 0301

4.- Dibuje una colonia típica de Sphaerotilus natans de las desarrolladas sobre el medio sólido de Stokes y anotar las características macroscópicas que se solicitan.

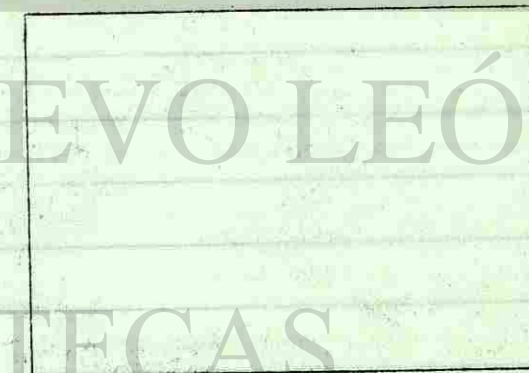


Forma : _____
Diámetro: _____
Color : _____
Elevación: _____
Borde : _____
Textura : _____
Superficie: _____

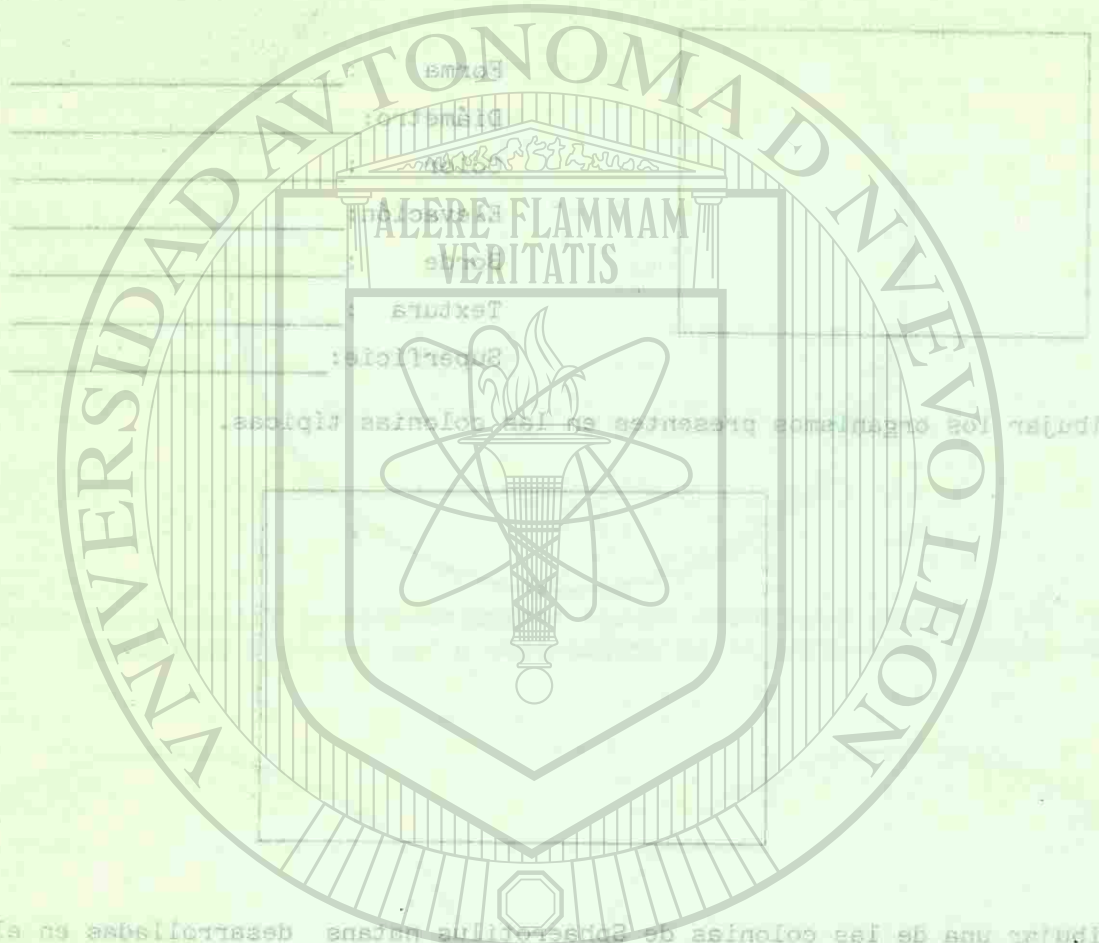
5.- Dibujar los organismos presentes en las colonias típicas.



6.- Dibujar una de las colonias de Sphaerotilus natans desarrolladas en el medio sólido de Rouf y Stokes.



4.- Dibuje una colonia típica de *Sphaerotilus natans* de las desarrolladas sobre el medio sólido de Stokes y anotar las características macroscópicas que se solicitan.



5.- Dibujar los organismos presentes en las colonias típicas.

6.- Dibujar una de las colonias de *Sphaerotilus natans* desarrolladas en el medio sólido de Boux y Stokes.

DISCUSION

Handwritten notes in the discussion section, including the word 'STOKES' and several lines of text.

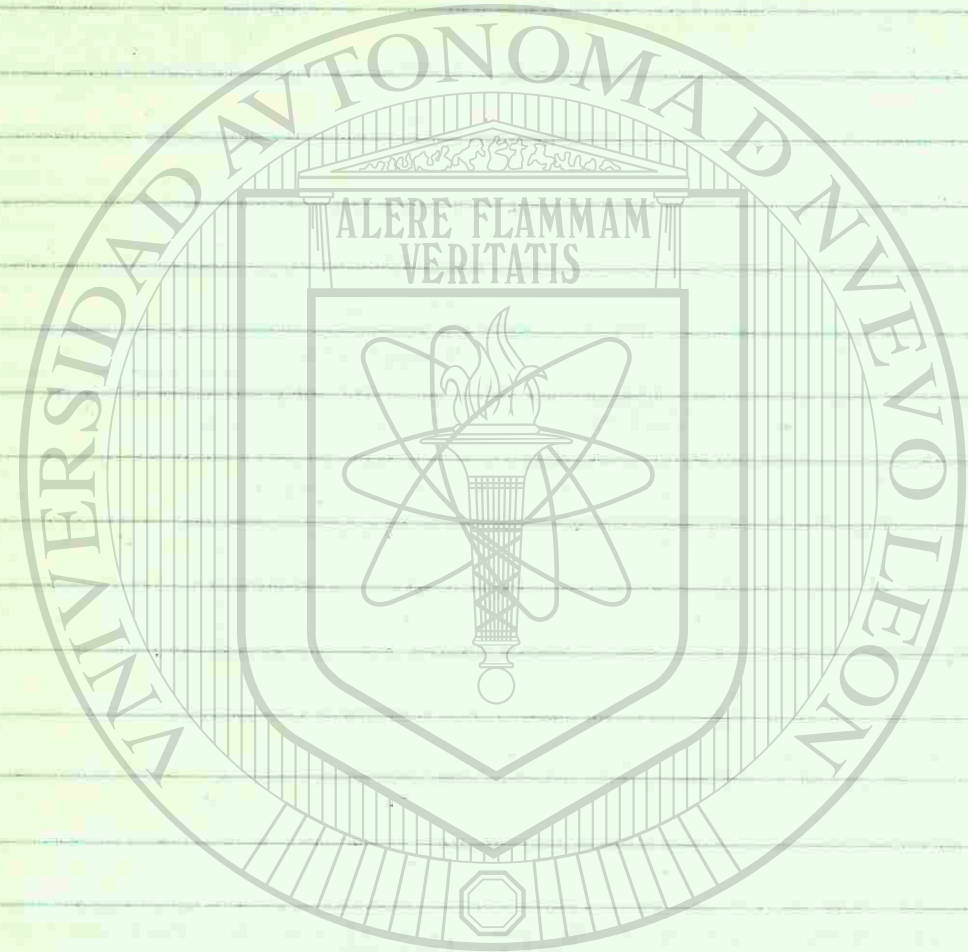
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DISCUSION



CONCLUSIONES

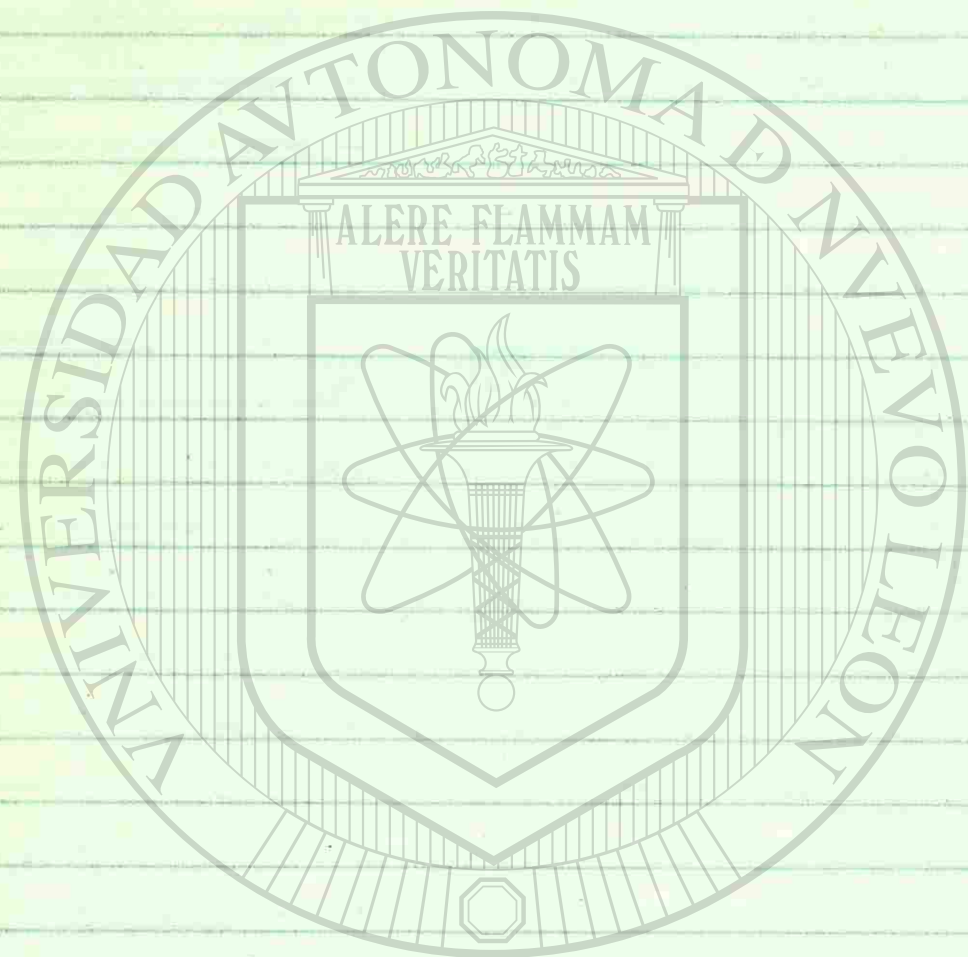
Blank lined area for writing conclusions.

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ACTIVIDAD DEMAGNÉTICA DE LAS FIBRIAS

INTRODUCCION

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Gaudy, A.F. y E. T. Gaudy. 1981. Microbiology for Environmental Scientist and Engineers. McGraw-Hill International Book Company. 1a. Edition. pp365-367.
- 2.-Mulder, E.G. y M. H. Deinema (1981). The Sheathed bacteria In: Mortimer, P., Stolph, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds). The Prokaryotes: A Handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Vol I, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, New York.
- 3.-Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1986. Microbiología. Ediciones Repla, S.A. Versión española de la 4a. Edición. 582-583.
- 4.-Van Veen, W.L., E.G. Mulder y M.H. Deinema (1978). The Sphaerotilus- Leptothrix group of bacteria. Microbiol. Rev. 42 (2): 329-356.

PRACTICA No. 3

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LAS FIMBRIAS

INTRODUCCION

Un grupo numeroso de bacterias llevan sobre su superficie varias centenas de finisimos apéndices filamentosos rectos y delgados observables -- solamente bajo el microscópio electrónico. Estas estructuras filiformes, -- de naturaleza proteica, fueron llamadas inicialmente **fimbrias** o **pili**, y dada su gran ubicuidad y variedad se trató de separarlas en distintas categorías considerando su tamaño y dimensiones. Así surgió la primera clasificación -- que los agrupó en dos tipos: los **pili sexuales** y las **fimbrias**. La presencia de éstas últimas le confiere propiedades adhesivas al microorganismo que -- las presenta, facilitando su fijación sobre objetos animados o inanimados; -- esta característica sirvió para acuñar un término para nombrarlas: **adhesinas**.

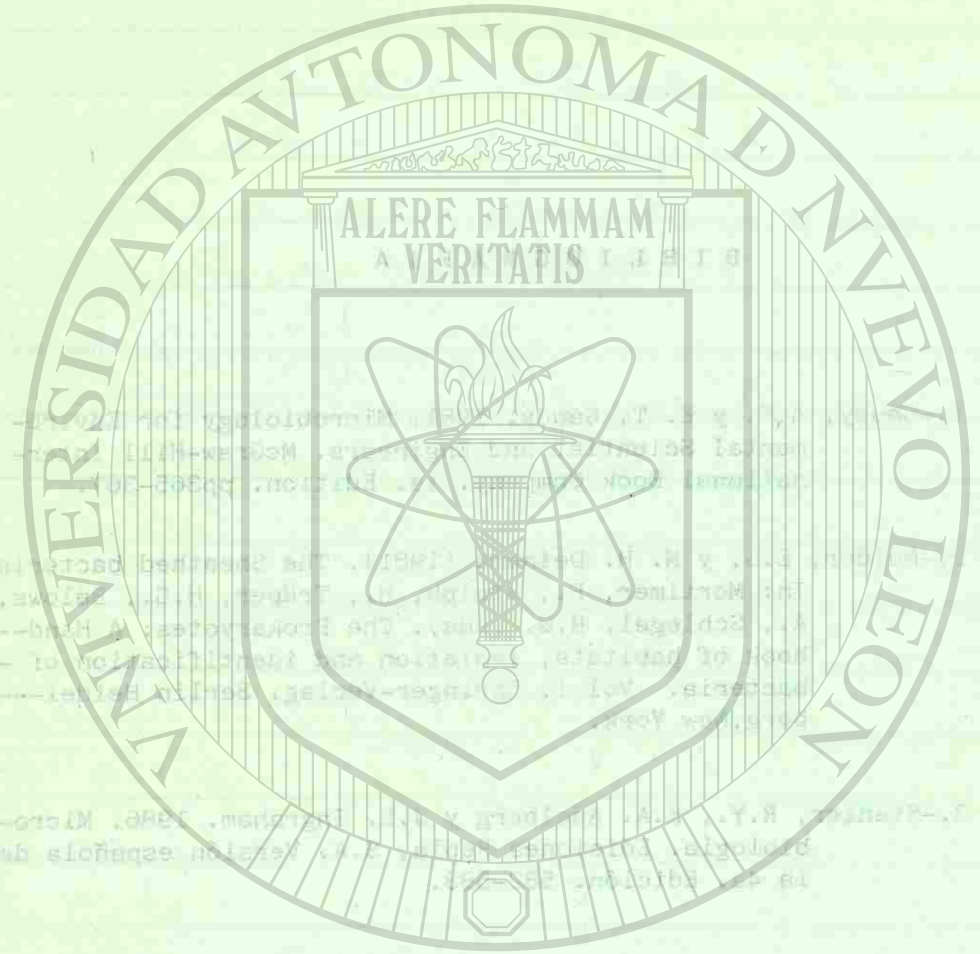
Cuando las células fimbriadas se cultivan en caldo bajo condiciones -- estacionarias, la sobrepoblación promueve que las bacterias se asocien entre sí acomodandose en la interfase aire-agua, y la película microbiana flotante así formada tiene un acceso mayor al oxígeno.

La consideración de las propiedades adhesivas conjuntamente con sus -- características morfológicas y dimensiones, han servido de base para clasifi-- caciones ulteriores; una de ellas, la de Ottow, las separa en seis grupos, -- ubicando a las fimbrias dentro del grupo 1.

Desde el punto de vista clínico, las propiedades adhesivas de las fim-- brias tienen una gran relevancia, pues se ha reconocido ampliamente que la -- adherencia es un factor de virulencia importante en la patogénesis de cier-- tas infecciones bacterianas. Este evento promueve la colonización y poste-- rior invasión de epitelios y tejidos del hospedero ya sea humano o animal, -- causandoles severas infecciones intestinales, urogenitales, orales o respira-- torias.

La unión de gérmenes a las celulas epiteliales, mediada por adhesinas -- es específica y evita su expulsión por los mecanismos fisicoanatómicos del -- hospedero como son el estornudo, tos, acción ciliar, expulsión de moco, -- peristaltismo y acción de lavado que ejercen las secreciones.

La interacción entre las fimbrias y las células eucarióticas es inhi-- bida por α -D-Manosa, ciertos análogos y oligosacaridos de α -D-Manosa, lo -- que implica la presencia de un receptor específico sobre la superficie celu-- lar el cual debe contener manosa o un compuesto de estructura similar, proba-- blemente un glicolípido. Las fimbrias permiten también la asociación de -- las bacterias a los eritrocitos humanos o de origen animal; en consecuencia, la actividad hemaglutinante de un microorganismo revela indirectamente la -- existencia de fimbrias sobre él.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LAS FIMBRIAS

INTRODUCCION

Un grupo numeroso de bacterias poseen la capacidad de adherirse a superficies de células animales y vegetales. Esta capacidad de adherencia es una característica importante de las bacterias que causan enfermedades y que son capaces de invadir tejidos y órganos. La adhesión de las bacterias a las células es un proceso complejo que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms.

La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms. La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms.

La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms. La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms.

La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms. La adhesión de las bacterias a las células es un proceso que involucra a las fimbrias bacterianas y a los receptores de las células. Las fimbrias son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias y se adhieren a los receptores de las células. Este proceso de adhesión es esencial para la colonización de las células y para la formación de biofilms.

MATERIAL Y REACTIVOS

OBJETIVO

- Este experimento persigue los siguientes propósitos:
- 1) Demostrar la capacidad adhesiva de las células fimbriadas presentes en un cultivo bacteriano.
 - 2) Comprobar que la asociación entre las fimbrias bacterianas y la superficie de los eritrocitos es específica, e involucra un receptor que contiene manosa.
 - 3) De acuerdo al perfil de hemaglutinación mostrado, ubicar a las fimbrias del organismo estudiado en su categoría correspondiente de acuerdo a la clasificación de Ottow.

FUNDAMENTO

Dada la capacidad hemaglutinante de las células fimbriadas, se preparará un cultivo bacteriano en el medio y condiciones ambientales adecuadas que permitan la expresión máxima de las fimbrias: el caldo Infusión Cerebro Corazón o el Caldo Nutritivo exento de glucosa sirven para este propósito. La glucosa muestra una actividad represora sobre la biosíntesis de estos filamentos y también una acción estimulante sobre la formación de cápsula, por que los microorganismos cultivados en su presencia manifiestan una capacidad hemaglutinante disminuida.

El cultivo bacteriano será cosechado en fase estacionaria, precisamente donde son máximos tanto la proporción de células fimbriadas como el número de apéndices por célula. No es recomendable tratar esta suspensión con agentes bactericidas como la formalina o el glutaraldehído, porque aunque no modifican la morfología de las fimbrias, si afectan severamente sus propiedades hemaglutinantes.

Para obtener una aglutinación apreciable, la suspensión bacteriana deberá contener como mínimo 10^8 células/ml y la cantidad de eritrocitos empleados será la necesaria para tener una relación bacterias: eritrocitos de 1:1.

El ensayo de hemaglutinación se hará empleando placas de vidrio excavadas y eritrocitos de diversos organismos. Para lograr la inhibición de la hemaglutinación las bacterias se tratarán con diferentes carbohidratos a una concentración de 2.5 mg/ml preparados en Regulador-Salina-Fosfatos (PBS).

La inhibición de la hemaglutinación es proporcional a la concentración de azúcar en un rango comprendido entre 0.1 y 2.5 mg/ml.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 asa bacteriológica
- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm
- 1 matraz Erlenmeyer de 500 ml
- 8 jeringas desechables de 5 ml
- 8 pipetas Pasteur con bulbo de caucho
- 8 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de hule conteniendo 0.5 ml de Citrato de sodio al 4% .
- 4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 5 pipetas graduadas de 10 ml
- 2 pipetas graduadas de 5 ml.
- 2 placas de vidrio con excavaciones
- 1 centrifuga refrigerada
- 1 incubadora
- cuatro frío a 4°C o refrigerador

Regulador Salina Fosfatos (PBS): Disolver 2.7598 gramos de NaH_2PO_4 monohidratado y 8.766 gramos de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. La solución así formada será 0.02M en NaH_2PO_4 y 0.15 M en NaCl.

Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC): Preparese según las instrucciones del fabricante.

Soluciones de D-Manosa, D-Galactosa, D-Fructosa 2.5 mg/ml: Disolver 0.0125 gramos del azúcar en 5 ml de PBS.

Solución Anticoagulante: Citrato de sodio al 4%: Disolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada.

METODOS

Los procedimientos siguientes deberán realizarse empleando material estéril y condiciones asépticas.

A) SUSPENSIONES BACTERIANAS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa fimbriada de *E. coli* que le será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por asada 10 ml de caldo ICC contenidos en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2.- Transferir 1 ml del cultivo de toda la noche a 150 ml de Caldo ICC contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, e incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones estáticas.

OBJETIVO

Este experimento persigue los siguientes propósitos:

- 1) Demostrar la capacidad adhesiva de las células fimbriadas presentes en un cultivo bacteriano.
- 2) Comprobar que la adhesión de las células fimbriadas a las superficies depende de las fimbrias y no de otros factores como la presencia de flagelos.
- 3) De acuerdo al perfil de hemaglutinación observado, ubicar a las fimbrias del organismo estudiado en el categoría correspondiente de acuerdo a la clasificación de Ottow.

FUNDAMENTO

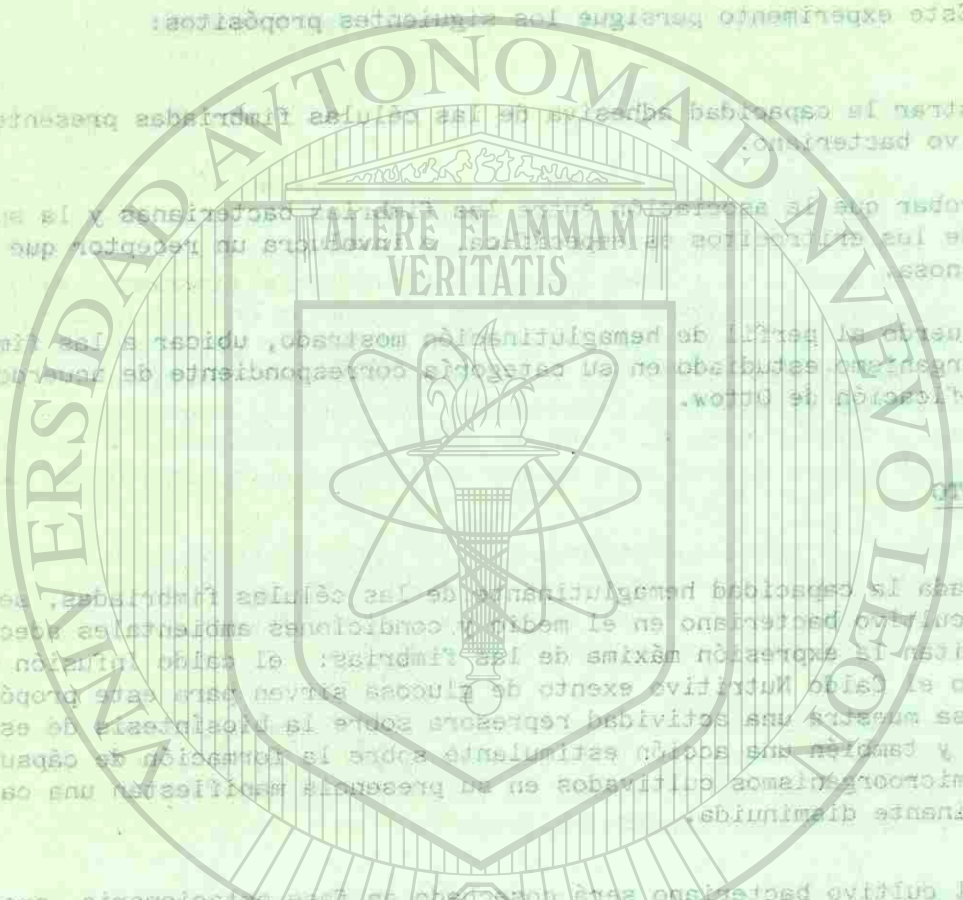
Las células fimbriadas de las células fimbriadas, se agrupan en un cultivo bacteriano en el medio y condiciones ambientales adecuadas que permitan la expresión máxima de las fimbrias; el caldo infusión Cerebro Corazón o el caldo nutritivo exento de glucosa sirven para este propósito. La glucosa muestra una actividad repressora sobre la biosíntesis de estas fimbrias y también una acción estimulante sobre la biosíntesis de cápsula, por lo que los microorganismos cultivados en su presencia exhiben una capacidad hemaglutinante disminuida.

El cultivo bacteriano será inoculado en las excavaciones, previamente hechas en las placas de vidrio, en la proporción de células fimbriadas como el número de esferúculas por célula. No es recomendable tratar esta suspensión con agentes bactericidas como la formalina o el glutaraldehído, porque aunque no modifican la morfología de las fimbrias, sí afectan severamente sus propiedades hemaglutinantes.

Para obtener una aglutinación adecuada, la suspensión bacteriana deberá contener como mínimo 10⁸ células/ml y la cantidad de eritrocitos de 1:1.

El ensayo de hemaglutinación se hará empleando placas de vidrio excavadas y eritrocitos de diversos organismos. Para lograr la inhibición de la hemaglutinación las bacterias se tratarán con diferentes compuestos a una concentración de 2.5 mg/ml preparados en Regulador Salina Fosfatos.

La inhibición de la hemaglutinación es proporcional a la concentración de azúcar en un rango comprendido entre 0.1 y 2.5 mg/ml.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIAL Y REACTIVOS

1. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

2. - Transferir 1 ml del cultivo de toda la noche a 150 ml de Caldo ICC contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 ml e incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones estáticas.

3. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

4. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

5. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

6. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

7. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

8. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

9. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

10. - Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por la noche 10 ml de caldo ICC contenido en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

MÉTODOS

Los procedimientos siguientes deberán realizarse empleando material estéril y condiciones asepticas.

A) SUSPENSIONES BACTERIANAS

1. - Colectar 5 ml de sangre de las siguientes especies: humanos, pollo, cerdo, cobayo, res, conejo y caballo empleando jeringas desechables, y transferirlas a tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante.

2. - Lavar los eritrocitos dos veces de la siguiente manera: centrifugar la sangre a 3,000 r.p.m. por 10 minutos.

3. - Eliminar el suero empleando pipetas Pasteur.

4. - Resuspender el paquete celular con suficiente PBS hasta completar el volumen original; para homogenizar coloque un tapón de hule en el tubo e inviertalo con suavidad varias veces par evitar la hemólisis.

5. - Centrifugar nuevamente a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.

6. - Eliminar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos con PBS hasta completar el volumen inicial de sangre. Esta suspensión fresca de eritrocitos deberá ser empleada solamente el día de su preparación.

- 3.- Del cultivo obtenido, transferir alícuotas de 5 ml a 4 tubos de ensayo de 13 x 100 mm designados Tubo A, B, C y D respectivamente.
- 4.- Centrifugar los tubos a 5, 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 5.- Desechar el sobrenadante y el sedimento lavarlos dos veces de la siguiente manera: resuspender el paquete celular en el volumen residual de sobrenadante, luego adicionar 5 ml de PBS homogenizando suavemente la suspensión.
- 6.- Centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 7.- Descartar el sobrenadante, resuspender el sedimento conforme las indicaciones del paso 5. Una vez hecha la suspensión, centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 8.- Eliminar el sobrenadante, el sedimento del tubo A resuspenderlo con 5 ml de PBS, el del tubo B con 5 ml de Manosa 2.5 mg/ml en PBS, el del tubo C con 5 ml de Galactosa 2.5 mg/ml en PBS y el del tubo D con 5 ml de Fructosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 9.- Guardar las cuatro suspensiones en refrigeración hasta el momento de su uso.

B) SUSPENSIONES DE ERITROCITOS

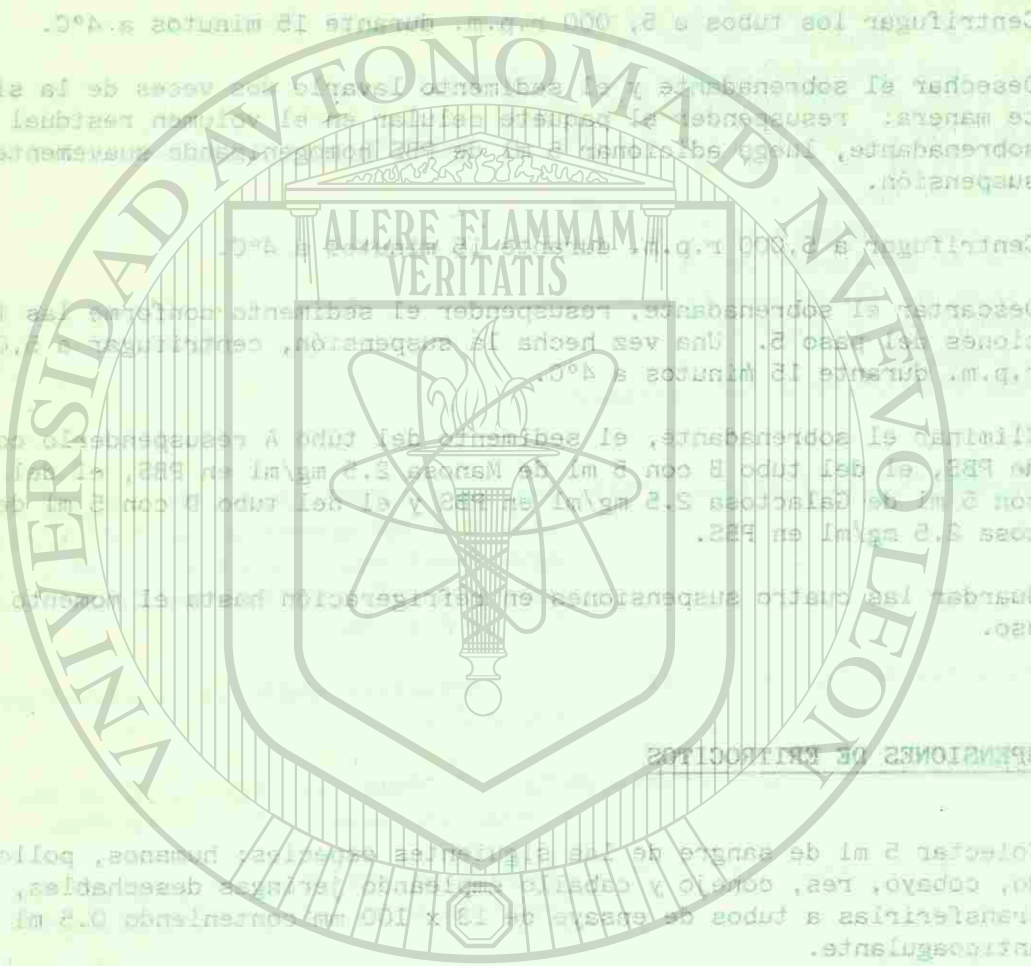
- 1.- Colectar 5 ml de sangre de las siguientes especies: humanos, pollo, cerdo, cobayo, res, conejo y caballo empleando jeringas desechables, y transferirlas a tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante.
- 2.- Lavar los eritrocitos dos veces de la siguiente manera: centrifugar la sangre a 3,000 r.p.m. por 10 minutos.
- 3.- Eliminar el suero empleando pipetas Pasteur.
- 4.- Resuspender el paquete celular con suficiente PBS hasta completar el volumen original; para homogenizar coloque un tapón de hule en el tubo e inviertalo con suavidad varias veces par evitar la hemólisis.
- 5.- Centrifugar nuevamente a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos con PBS hasta completar el volumen inicial de sangre. Esta suspensión fresca de eritrocitos deberá ser empleada solamente el día de su preparación.

C) ENSAYO DE HEMAGLUTINACION

- 1.- Guardar en refrigeración durante toda la noche una placa de vidrio con excavaciones envuelta en papel.
- 2.- Colocar separadamente en las excavaciones de la placa una gota de las siete suspensiones de eritrocitos preparadas, luego
- 3.- Adicionar a cada una de ellas una gota de la suspensión bacteriana en-PBS.
- 4.- Mezclar suavemente con el extremo romo de un palillo de madera.
- 5.- La aparición de grumos en el fondo de la excavación indicará una aglutinación inmediata.
- 6.- Incubar la placa en refrigeración a 4°C durante 15 minutos.
- 7.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación. El grado de hemaglutinación se registrará en unidades arbitrarias desde (+), (++) o (+++); en caso de no ocurrir aglutinación anotar (-). Registrar sus resultados.

D) INHIBICION DE LA AGLUTINACION

- 1.- En las excavaciones de la placa de vidrio colocar separadamente una gota de las siete suspensiones de eritrocitos, luego
- 2.- Adicionar a cada una de ellas una gota de la suspensión bacteriana tratada con Manosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 3.- Mezclar suavemente con un palillo de madera
- 4.- Observar si ocurre aglutinación inmediata
- 5.- Incubar la placa a 4°C durante 15 minutos
- 6.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación, de ser así utilice las unidades referidas anteriormente y anoteles.
- 7.- Para las suspensiones bacterianas tratadas con Galactosa 2.5 mg/ml en PBS o Fructosa 2.5 mg/ml, proceder de la misma forma.
- 8.- Registrar los resultados de ambos ensayos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

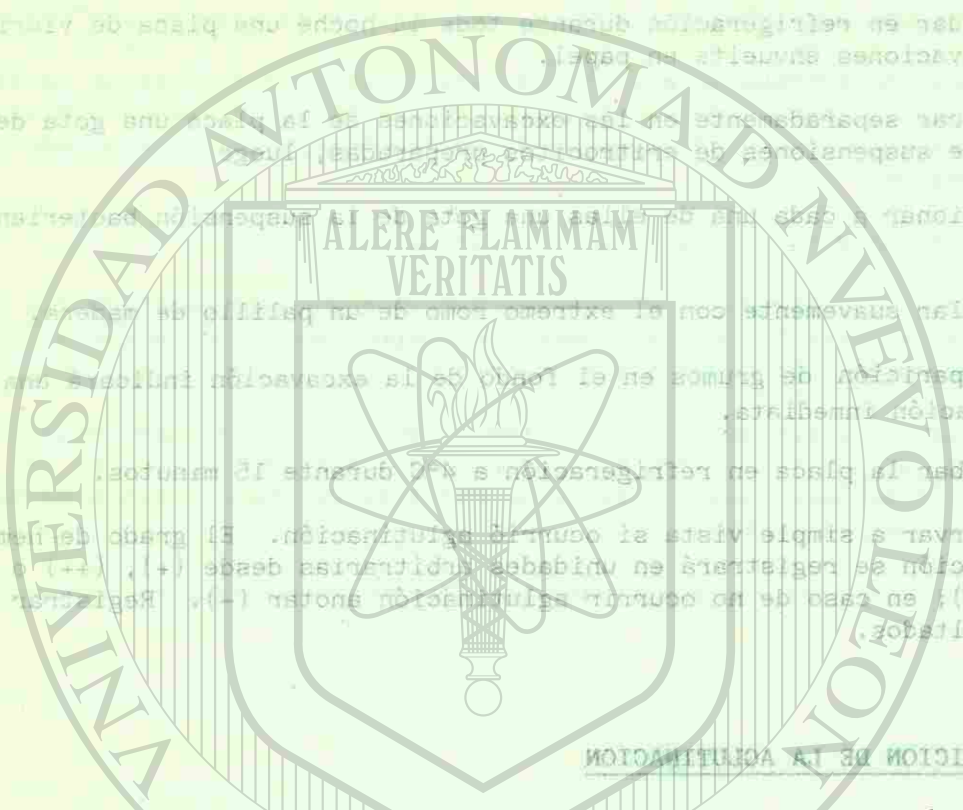
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente anotar los resultados obtenidos tanto en el -
Ensayo de Hemaglutinación como en el de la Inhibición de la Hemaglu-
tinación.

Tratamiento de las células - bacterianas	HEMAGLUTINACION DE ERITROCITOS DE						
	HUMANO	POLLO	CERDO	COBAYO	RES	CONEJO	CABALLO
NINGUNO							
MANOSA							
GALACTOSA							
FRUCTOSA							

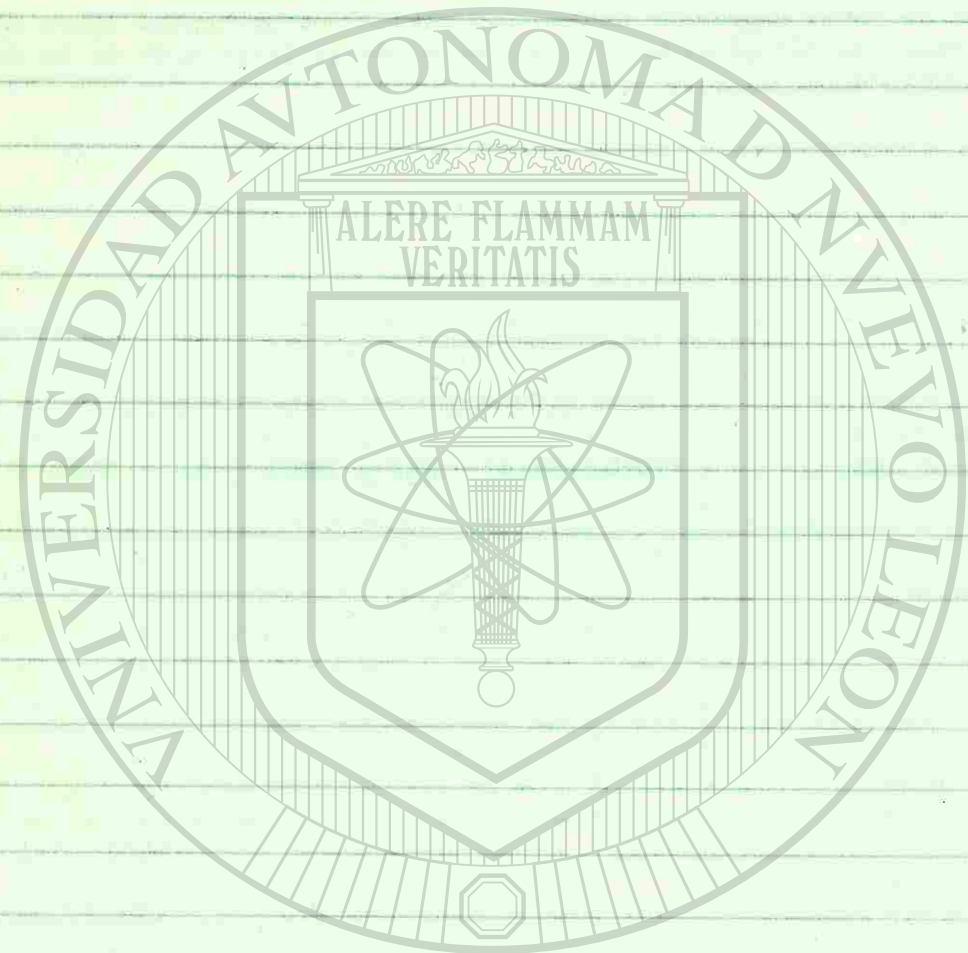
(+++): hemaglutinación completa e instantanea; (++) : hemaglutinación incompleta y retardada; (+): hemaglutinación debil; (-): no hemaglutinó



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

1. Bar-Shavit, M.; I. Uzan, S. Goldman, D. Niraihan. *Isolation and characterization of a specific antigen from the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 23F. In: Proceedings of the 10th International Conference on Antimicrobial Chemotherapy, London, 1977.*

2. Duggan, G. 1967. Bacteriophage adsorption to the cell wall, and their types. *Nature*, 215:89-90.

3. Tanskanen, J. 1960. Factors affecting expression of the cell wall antigen of *Streptococcus pneumoniae*.

4. Madsen, K. 1967. Isolation and isolation of somatic phage from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Veterinary Research*, 44:284-287.

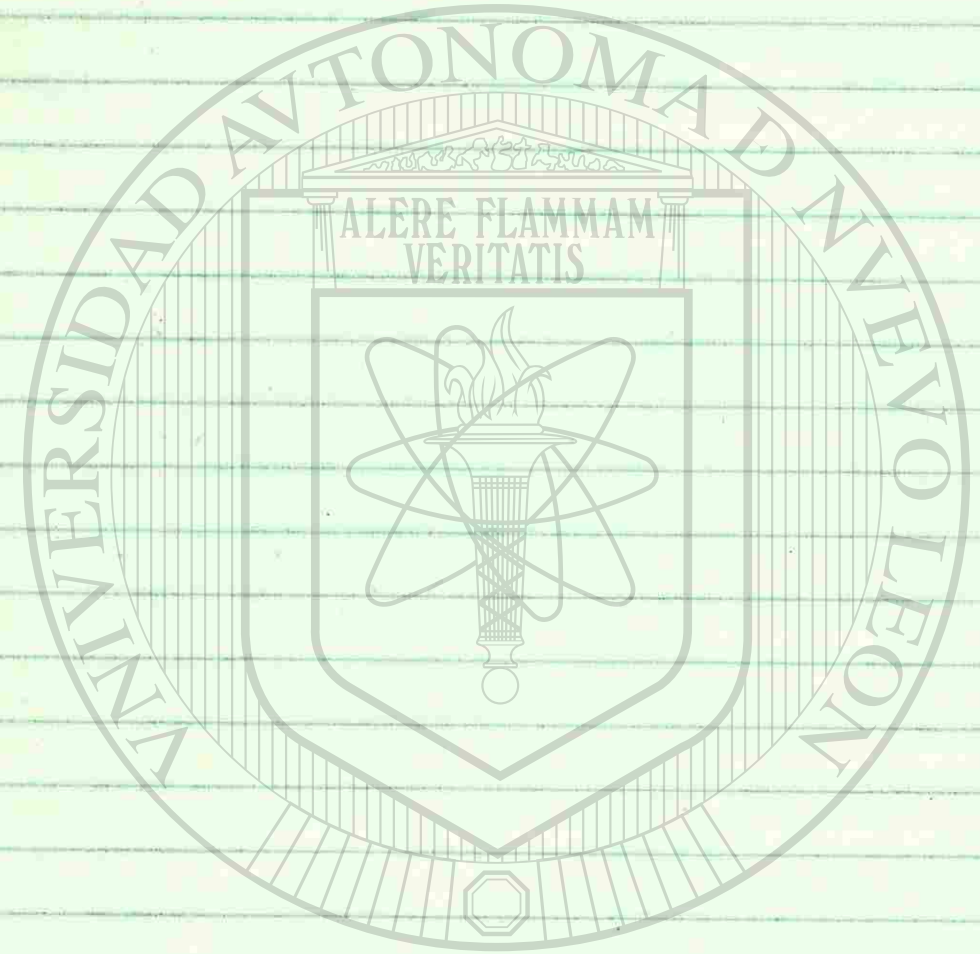
5. Gold, J.C. 1972. Inhibition of the interaction between fibrillar haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J. Gen. Microbiol.* 71: 149-157.

6. Shukla, S.K., S. Chakrabarty, A. B. Choudhury, 1967. Isolation of a somatic cell wall antigen P₁ with type I fibrillar antigen. *Immun.* 27(2): 457-466.

7. Shukla, S.K., J.C. Gold. 1975. Ecology, Physiology and Serology of *Streptococcus pneumoniae*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 79-108.

BIBLIOGRAFIA

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRÁCTICA No. 4
QUINOTAXIS BACTERIANA

INTRODUCCION

En su ambiente natural los microorganismos no solamente interactúan con su entorno sino también entre ellos, y en estas interacciones la combinación química juega un papel preponderante. Cada que están rodeados de concentraciones muy distintas de iones y moléculas orgánicas, para enfrentar el problema de sobrevivir algunas bacterias móviles disponen de una capacidad llamada quimiotaxis que les permite buscar sustancias químicas y acercarse a ellas o alejarse de ellas. En la naturaleza existen sustancias químicas selectivas capaces de atraer o repeler a los organismos móviles y así, en el ecosistema donde ocurren.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bar-Shavit, Z; I. Ofek., R. Goldman., D. Mirelman., N. Sharon. (1977). Mannosa residues on phagocytes as receptors for the attachment of *E. coli* and *S. typhi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 78 (1): 455-460.
- 2.-Duguid, J.P. 1967. Terminology of Bacterial Fimbriae or pili, and Their types. *Nature.* 215:89-90.
- 3.-Issacson, R.E. 1980. Factor affecting expression of the *E. coli* pilus Kpp. *Infect. Immun.* 28:190-194.
- 4.-Nagaraja,K.V.,D.A. Emery., J.A.Newman., B.S.Pomeroy. 1983. Identification and isolation of somatic pilus from pathogenic *E. coli* of turkeys. *American Journal of Veterinary Research.* 44:284-287.
- 5 -Old, D.C. 1972. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J.Gen.Microbiol.* 71: 149-157.
- 6.-Ørskov, I., F. Orskov., A.Birch-Andersen.1980. Comparison of *Escherichia coli* fimbrial antigen F7 with type 1 fimbrial. *Infect. Immun.* 27(2):657-666.
- 7.-Ottow, J.C.G. 1975. Ecology, Physiology and Genetics of Fimbriae and Pili. *Ann.Rev.Microbiol.* 29:79-108.

PRACTICA No. 4

QUIMIOTAXIS BACTERIANA

INTRODUCCION

En su ambiente natural los microorganismos no solamente interactúan con su entorno sino también unos con otros, y en estas interacciones la comunicación química juega un papel preponderante. Dado que están rodeados de concentraciones muy diluidas de iones y sustancias nutritivas, para enfrentar el problema de encontrarlos algunas bacterias móviles disponen de una capacidad llamada **quimiotactismo** que les permite detectar sustancias químicas y acercarse o alejarse de ellas. Tales respuestas le conceden una ventaja selectiva capacitándolas para encontrar sus fuentes de carbono y energía en el ecosistema donde ocurren.

Tras largos años de investigación sobre el fenómeno de la quimiotaxis Julius Adler y sus colaboradores han señalado que el proceso de respuesta a un agente químico se inicia con la recepción del estímulo por medio de quimiorreceptores colocados en la superficie celular; estas moléculas detectan cambios en la concentración de atrayentes o repelentes. Dicho evento inicial es independiente de la captación, metabolismo o producción de energía del compuesto; una vez que el quimioefector se acopla con el quimiorreceptor, éste último envía una "señal" a la base del flagelo activo modulando el sentido de su rotación y en consecuencia la frecuencia de nado y bamboleo, según sea el caso la célula se acercará o alejará del agente efector.

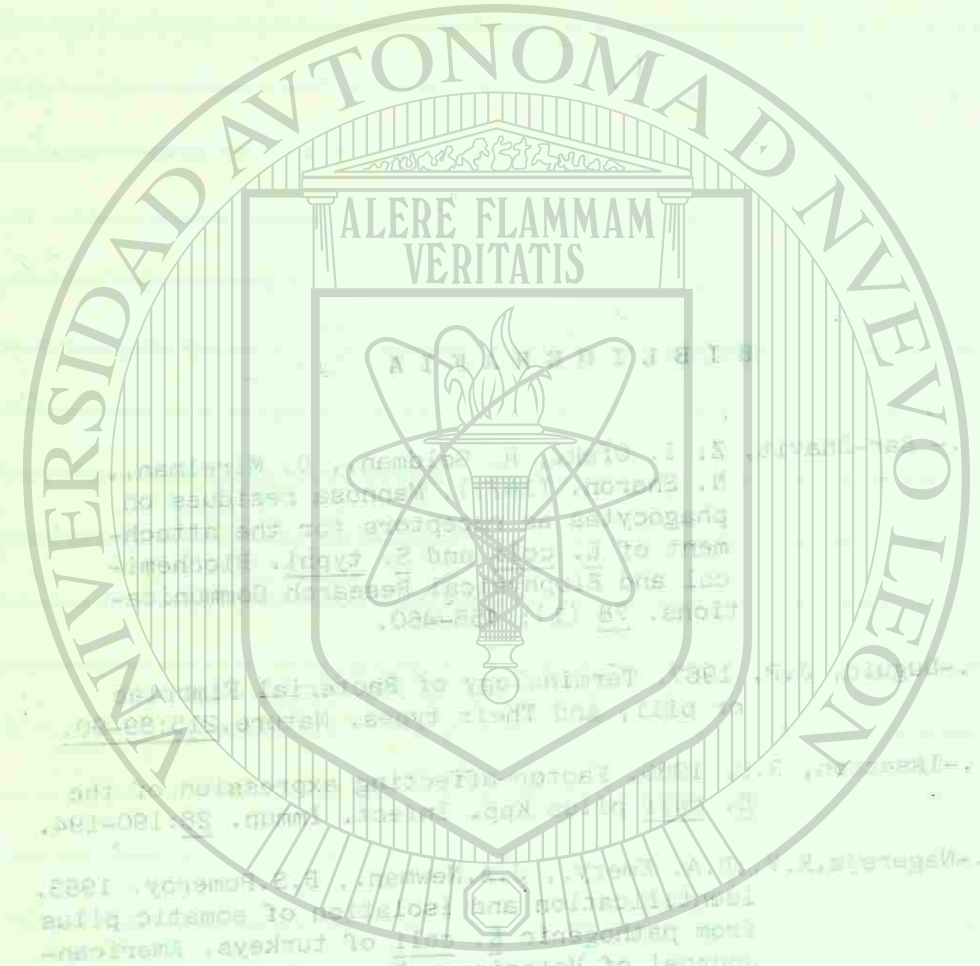
Aunque la quimiotaxis proporciona una ventaja competitiva a las bacterias que la poseen, otras actividades como la predación, simbiosis, agregación, sexualidad y diferenciación parecen depender de respuestas quimiotácticas específicas.

OBJETIVO

Intentamos en este ensayo demostrar la actividad quimiotáctica de una bacteria hacia un azúcar, y mediante la realización de una curva dosis-respuesta trataremos de establecer ciertos parámetros relacionados con este fenómeno como son la concentración umbral, la concentración "pico", la concentración de saturación y la respuesta "pico".

FUNDAMENTO

Las respuestas quimiotácticas de los microorganismos se han conocido durante casi ya un siglo. Sin embargo, la primera observación de que las bacterias se acercaban o alejaban de una sustancia química fue hecha en 1881 por T.W. Englemann. Siete años más tarde el alemán Wilhel Pfeffer confirmó mediante observaciones microscópicas que las bacterias móviles de una suspensión eran atraídas hacia el interior de un tubo capilar conteniendo una solución de atrayente, sumergido en el caldo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIENESTAR

QUIMIOXIA BACTERIANA

INTRODUCCION

En un ambiente natural, los microorganismos no solamente interactúan con su entorno sino también entre ellos y en estas interacciones la comunicación química juega un papel fundamental...

Tras largos años de investigación sobre el fenómeno de la quimioxía Julius Adler y sus colaboradores han señalado que el proceso de respuesta a un agente químico se inicia con la recepción del estímulo por medio de...

Aunque la quimioxía proporciona una ventaja competitiva a las bacterias que la poseen, otras actividades como la reproducción, síntesis, agregación, sexualidad y diferenciación parecen depender de respuestas quimioxóticas específicas.

OBJETIVO

Intentamos en este ensayo demostrar la actividad quimioxótica de una bacteria hacia un azúcar y mediante la realización de una curva dosis-respuesta tratamos de establecer ciertos parámetros relacionados con este fenómeno como son la concentración umbral, la concentración de saturación y la respuesta "pico".

FUNDAMENTO

Las respuestas quimioxóticas de los microorganismos se han conocido durante casi un siglo. Sin embargo, la primera observación de que las bacterias se acercaban o alejaban de una sustancia química fue hecha en 1881 por T.W. Engelmann. Siete años más tarde el alemán Wilhelm Pfeffer confirmó mediante observaciones microscópicas que las bacterias móviles de una sustrato se acercaban hacia el interior de un tubo capilar contenido una solución de atrayente, sumergido en el caldo.

En base a tal procedimiento Julius Adler en 1969 diseñó una técnica sencilla para determinar semicuantitativamente la respuesta quimioxótica, ésta es conocida como el Ensayo del capilar de Adler. Al realizar curvas-concentración-respuesta se obtienen una serie de parámetros que definen cuantitativamente el proceso, entre ellos los siguientes:

- a) Concentración "Umbral": Es la concentración mas baja de atrayente que ocasiona una acumulación de bacterias dentro del capilar, mayor que la obtenida en ausencia de atrayente.
b) Concentración "Pico": Es la concentración de atrayente a la cual ocurre la máxima acumulación de organismos en el interior del capilar.
c) Concentración de saturación: Es la concentración de atrayente sobre la cual la bacteria ya no es capaz de detectar una concentración más alta de atrayente en el capilar.
d) Respuesta "Pico": Es el numero de organismos acumulados dentro del capilar que contiene la concentración pico de atrayente.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm con agar nutritivo inclinado conteniendo la cepa bacteriana.
tubos capilares de 75 mm (75 µl).
tubos capilares de 5 µl o menos.
7 tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tapón de acero.
7 pipetas graduadas de 1 ml.
25 ml de solución de glucosa 0.1 M en buffer che.
100 ml de buffer che.
1 mechero
2 pinzas de disección.
portaobjetos
esmalte transparente.
7 varillas de vidrio dobladas en V.
7 cajas de petri.
1 caja de petri conteniendo agar triptona suave.
1 tubo de ensayo de 18 x 150 conteniendo 10 ml de caldo triptona estéril.
1 asa bacteriológica.
2 matraces nefelométricos de 125 ml conteniendo 10 ml de medio de glicerol y sales.
45 pipetas graduadas de 1 ml estériles.
10 pipetas graduadas de 10 ml estériles.
2 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de acero, estériles.
1 matraz erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de buffer che estéril.
cubreobjetos estériles.

- 7 tubos de dilución : tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asépticamente 5 ml de buffer che ó NaCl 0.85 % estéril.
- 30 tubos de dilución: tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asépticamente 4.5 ml de buffer che ó NaCl 0.85 % estéril.
- 28 tubos de agar blando: tubos de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar agar al 0.6 % estéril.
- 28 placas de agar nutritivo.

Incubadora
 Agitador rotatorio con temperatura controlada.
 Centrífuga.
 Espectrofotómetro.
 Autoclave.

El Buffer che contiene en un litro de agua destilada los siguientes ingredientes: K_2HPO_4 , 1.74 g; KH_2PO_4 , 1.36 g; Sal disódica de EDTA, 33 mg. Ajustar el pH a 7.

El Medio de Glicerol y Sales contiene por litro de agua destilada los siguientes ingredientes: Glicerol, 5.0 g; K_2HPO_4 , 11.2 g; KH_2PO_4 , 4.8 g; $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g; $Fe_2(SO_4)_3$, 0.5 mg; esterilizar la fuente de carbono y las sales de magnesio y fierro por separado.

Agar triptona suave: Contiene por litro de agua destilada; triptona, 10 g; NaCl, 5 g; agar, 7 g.

Caldo triptona: Contiene por litro de agua destilada; triptona, 10 g y NaCl, 5 g.

METODOS

A) PREPARACION DE LA SUSTANCIA ATRAYENTE.

- 1.- Lavar perfectamente una serie de tubos capilares (14) de 5 µl. Una vez secos, tomar cada uno con unas pinzas para disección y sellar uno de los extremos empleando una llama baja. Esta llama se consigue removiendo la parte superior del mechero y utilizando sólo la base.
- 2.- Preparar a partir de la solución de glucosa 0.1 M en buffer Che la siguiente serie de diluciones utilizando buffer che como diluyente: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Transferir alícuotas de 10 ml de cada una de las diluciones a tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapón de acero. Incluir un tubo conteniendo sólo 10 ml de buffer Che.
- 3.- Colocar dos capilares sellados en cada uno de los tubos de ensaye que contienen las alícuotas de las diluciones de glucosa y al tubo con buffer che. Esterilizar a 10 lb/ 10 min. en autoclave.

B) PREPARACION DE LA CAMARA DE QUIMIOTAXIS.

- 1.- Doblar 7 tubos capilares de 7 mm, dándoles a cada uno forma de U. Utilice llama baja.
- 2.- Lavar los capilares doblados y una serie de portaobjetos (7). Secar al aire.

En base a tal procedimiento Julius Adler en 1969 diseñó una técnica sencilla para determinar semicuantitativamente la respuesta quimiotáctica, ésta se conoce como el ensayo del capilar de Adler. Al realizar curvas de concentración-respuesta se obtienen una serie de parámetros que definen cuantitativamente el proceso, entre ellos los siguientes:

- a) Concentración "Umbral": Es la concentración más baja de atrayente que ocasiona una estimulación de bacterias dentro del capilar, más allá de la obtenida en ausencia de atrayente.
- b) Concentración "Pico": Es la concentración de atrayente a la cual ocurre la máxima acumulación de organismos en el interior del capilar.
- c) Concentración de saturación: Es la concentración de atrayente sobre la cual la bacteria ya no es capaz de detectar una concentración más alta de atrayente en el capilar.
- d) Respuesta "Pico": Es el número de organismos acumulados dentro del capilar que contiene la concentración pico de atrayente.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm con agar nutritivo inclinado conteniendo la cepa bacteriana.
- tubos capilares de 75 mm / 75 µl.
- tubos capilares de 5 µl o menos.
- 7 tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapón de acero.
- 7 pipetas graduadas de 1 ml.
- 25 ml de solución de glucosa 0.1 M en buffer che.
- 100 ml de buffer che.
- 1 mechero
- 2 pinzas de disección.
- portaobjetos
- esmalte transparente
- 7 varillas de vidrio dobladas en V.
- 7 cajas de petri.
- 1 caja de petri conteniendo agar triptona suave.
- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 conteniendo 10 ml de caldo triptona estéril.
- 1 asa bacteriológica.
- 2 matraces volumétricos de 125 ml conteniendo 10 ml de medio de glicerol y sales.
- 10 pipetas graduadas de 1 ml estériles.
- 10 pipetas graduadas de 10 ml estériles.
- 2 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de acero, estériles.
- 1 matraz erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de buffer che estéril.
- portaobjetos estériles.



30 tubos de dilución: Tubos de ensayo de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 5 ml de buffer che 0.85 % estéril.

38 tubos de agar: Tubos de ensayo de 18 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar 2% estéril.

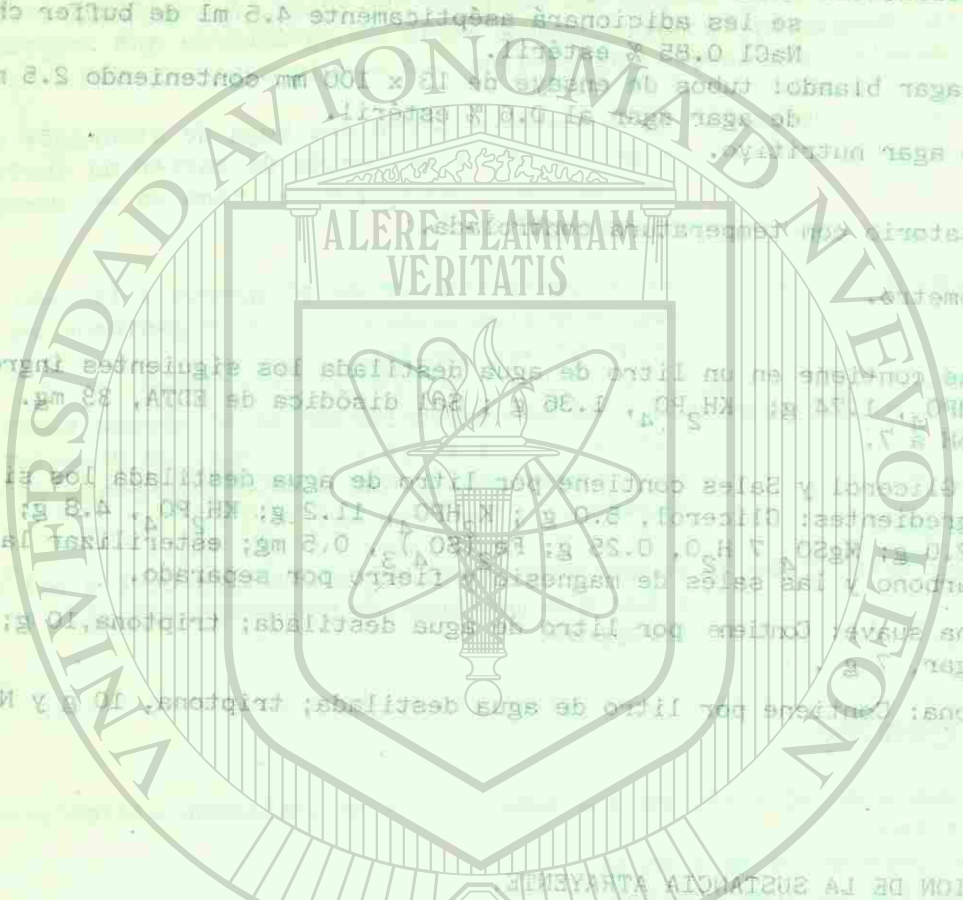
38 placas de agar nutritivo.

Incubadora
 Agitador rotatorio con recipiente
 Centrífuga
 Espectrofotómetro
 Autoclave

El Buffer che contiene en un litro de agua destilada los siguientes ingredientes: KH₂PO₄ 1.36 g, K₂HPO₄ 4.8 g, NaCl 0.85 g, MgSO₄ 0.2 g, H₂O 0.2 g, estérilizado a 121°C por 15 min.

Agar triptona suave: Contiene por litro de agua destilada: triptona 10 g, NaCl 5 g, agar 2 g.

Caldo triptona: Contiene por litro de agua destilada: triptona 10 g y NaCl 5 g.



MÉTODOS

4) PREPARACION DE LA SUSPENSION ATRAVESADA

1.- Lavar perfectamente una serie de tubos capilares (14) de 5 ml. Una vez secos, tomar cada uno con una pinza para disección y sellar uno de los extremos empleando una llama para. Esta llama se consigue removiendo de la parte superior del mechero y utilizando sólo la parte superior.

2.- Preparar a partir de la solución de glucosa 0.1 M en buffer che la siguiente serie de diluciones utilizando buffer che como diluyente: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Transferir alícuotas de 10 ml de cada una de las diluciones a tubos de ensayo de 18 x 150 mm con capón de acero. Incluir un tubo conteniendo sólo 10 ml de buffer che.

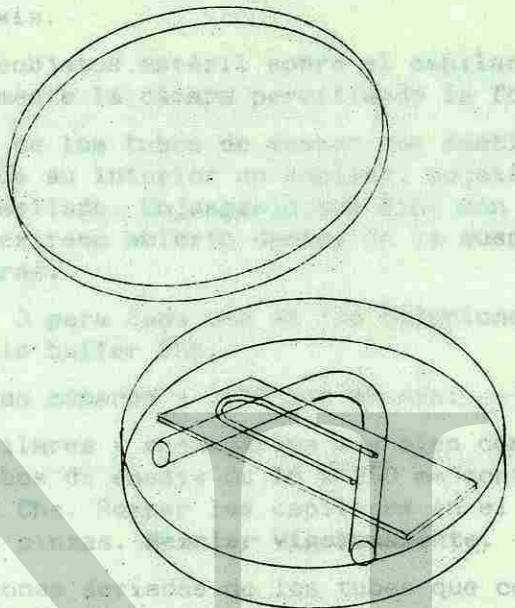
3.- Colocar los capilares sellados en cada uno de los tubos de ensayo que contienen las alícuotas de las diluciones de glucosa y al tubo con buffer che. Esterilizar a 10 lb/10 min. en autoclave.

5) PREPARACION DE LA CAMARA DE QUIMIOTAXIS

1.- Lavar y tubos capilares de 2 mm, doblados a cada uno forma de U. Utilizar llama para.

2.- Lavar los capilares doblados y una serie de portaobjetos (7). Secar al aire.

- 3.- Unir con esmalte transparente los capilares doblados y los portaobjetos limpios, utilizando pinzas para ello. Colocar los capilares con el extremo abierto de la U hacia el centro de los portaobjetos. Evite tocar los capilares o portaobjetos con los dedos.
- 4.- Montar los portaobjetos, usando esmalte transparente, sobre varillas de vidrio dobladas en V, dejar secar cuando menos toda la noche y transferir todo el conjunto a cajas de petri. Esterilizar a 15 lb/ 15 min. Una vez terminadas, las cámaras serán como la que se muestra en el esquema.



- 1.- Colocar un cubreobjetos estéril sobre el capilar en U empleando pinzas. Inclinar ligeramente la cámara para favorecer la formación de un menisco.
- 2.- Seleccionar uno de los tubos de ensayo que contienen las diluciones de glucosa. Tomar 5 ml de su interior, inclinando el tubo con unas pinzas por su extremo abierto, y transferir a la cámara buffer che estéril y 5 ml de suspensión bacteriana.
- 3.- Repetir el paso 2 para cada uno de los tubos de ensayo de glucosa y el tubo que contiene el buffer che.
- 4.- Incubar todos los portaobjetos en una cámara húmeda a 37°C.
- 5.- Remover los capilares de la cámara con buffer che estéril. Transferir a tubos de ensayo de 18 x 100 mm conteniendo 5 ml de NaCl 0.85 % a buffer che estéril. Transferir a la cámara el interior de los tubos utilizando una pinza.
- 6.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares. Hacer un alícuota de 5 ml de cada una de ellas.

- C) OBTENCION DE LAS CELULAS PARA EL ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.
- 1.- Tomar una asada, en condiciones asépticas, del cultivo en agar inclinado de la cepa bacteriana y realizar una sola estría en el centro de una caja de petri conteniendo agar triptona suave. Incube por 24 h a 37°C.
 - 2.- Tomar una asada, en condiciones asépticas, de los bordes del crecimiento en la placa de agar triptona suave e inocular un tubo conteniendo 10 ml de caldo triptona. Incubar a 37°C por 24 h.
 - 3.- Tomar, en condiciones asépticas, 0.1 ml del cultivo en caldo triptona y transferirlos a un matraz nefelométrico de 125 ml conteniendo 10 ml de medio de glicerol y sales. Incubar con agitación a 35°C. Llevar el cultivo hasta fase estacionaria, determinando espectrofotométricamente a 590 nm, la duración de la fase exponencial.
 - 4.- Transferir asépticamente 0.1 ml de este cultivo a un segundo matraz nefelométrico conteniendo 10 ml de medio glicerol y sales. Llevar el crecimiento hasta mitad de fase exponencial.
 - 5.- Tomar asépticamente 5 ml del cultivo y transferirlos a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm estéril.
 - 6.- Centrifugar a 5000 r.p.m. por 5 min. a temperatura ambiente. Decantar y resuspender el paquete empleando sólo el líquido residual. Aforar al volumen original empleando buffer che.
 - 7.- Repetir dos veces más el paso 6.

8.- Diluir la suspensión hasta una absorbancia de 0.1 a 590 nm. Conservar a 4°C hasta el momento de realizar el ensayo de quimiotaxis.

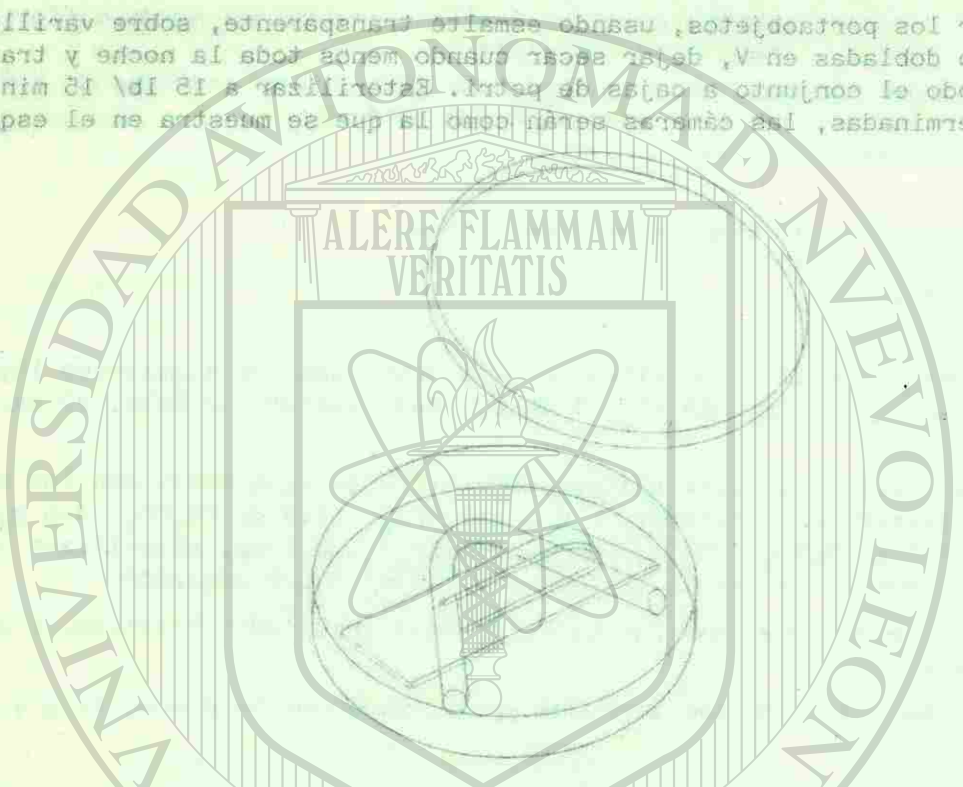
D) ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.

En condiciones asépticas realizar lo siguiente:

- 1.- Transferir 0.2 ml de la suspensión bacteriana a la cavidad formada entre el portaobjetos y el capilar doblado en U de cada una de las 7 cámaras de quimiotaxis.
- 2.- Colocar un cubreobjetos estéril sobre el capilar en U empleando pinzas. Inclinar ligeramente la cámara permitiendo la formación de un menisco.
- 3.- Seleccionar uno de los tubos de ensayo que contienen las diluciones de glucosa. Tomar de su interior un capilar, sujetándolo con unas pinzas por su extremo sellado. Enjuagarlo muy bien con buffer Che estéril y colocarlo por su extremo abierto dentro de la suspensión bacteriana de una de las cámaras.
- 4.- Repetir el paso 3 para cada una de las diluciones de glucosa y el tubo que contiene sólo buffer Che.
- 5.- Incubar todas las cámaras a 30°C por 45 min.
- 6.- Remover los capilares y enjuagarlos muy bien con buffer Che estéril. Transferir a tubos de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo 5 ml de NaCl 0.85 % o buffer Che. Romper los capilares en el interior de los tubos utilizando unas pinzas. Mezclar vigorosamente.
- 7.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares rotos de acuerdo al siguiente cuadro:

Contenido del capilar	Diluciones a plaqurear	
buffer Che	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻¹ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻² M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻³ M	10 ⁻²	10 ⁻³
Glucosa 10 ⁻⁴ M	10 ⁻²	10 ⁻³
Glucosa 10 ⁻⁵ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻⁶ M	10 ⁻¹	10 ⁻²

Transferir por duplicado 0.1 ml de las diluciones respectivas de cada serie a pares de tubos con agar blando previamente fundido y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcle homogéneamente y vacíe todo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.- Unir con esmalte transparente los capilares doblados y los portaobjetos limpios, utilizando pinzas para ellos. Colocar los capilares con el extremo abierto de la U hacia el centro de los portaobjetos. Evite tocar los capilares o portaobjetos con los dedos.

4.- Montar los portaobjetos, usando esmalte transparente, sobre varillas de vidrio dobladas en V, dejar secar cuando menos toda la noche y transferir todo el conjunto a cajas de papel. Esterilizar a 15 lb a 15 min. Una vez terminadas, las cámaras serán como las que se muestra en el esquema.

C) OBTENCIÓN DE LAS CELULAS PARA EL ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.

- 1.- Tomar una saada, en condiciones asépticas del cultivo en agar inclinado de la cepa bacteriana y realizar una saada en el centro de una cámara de petri conteniendo agar tripton suave. Incubar por 24 h a 37°C.
- 2.- Tomar una saada, en condiciones asépticas, de los bordes del crecimiento en la placa de agar tripton suave e inocular un tubo conteniendo 10 ml de caldo tripton. Incubar a 37°C por 24 h.
- 3.- Tomar, en condiciones asépticas, 0.1 ml del cultivo en caldo tripton y transferirlo a un matraz metalométrico de 125 ml conteniendo 10 ml de medio de glicerol y sales. Incubar con agitación a 35°C. Llevar el cultivo hasta fase estacionaria, determinando espectrofotométricamente a 590 nm, la duración de la fase exponencial.
- 4.- Transferir asépticamente 0.1 ml de este cultivo a un segundo matraz metalométrico conteniendo 10 ml de medio glicerol y sales. Llevar el cultivo hasta mitad de fase exponencial.
- 5.- Tomar asépticamente 5 ml del cultivo y transferirlo a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm estéril.
- 6.- Centrifugar a 5000 r.p.m. por 2 min. a temperatura ambiente. Decantar y resuspendir el pellet empleando sólo el líquido residual. Añorar al volumen original empleando buffer che.
- 7.- Repetir dos veces más el paso 6.

8.- Diluir la suspensión hasta una concentración de 0.1 a 200 ml. Conservar a 4°C hasta el momento de realizar el ensayo de quimiotaxis.

D) ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.

- En condiciones asepticas realizar lo siguiente:
- 1.- Transferir 0.5 ml de la suspensión bacteriana a la cavidad formada entre el portapipetas y el capilar dotado en U de cada una de las cámaras de quimiotaxis.
 - 2.- Colocar un capilar estéril sobre el capilar en U empalmado pinzas. Inclinar ligeramente la cámara para que la formación de un menisco.
 - 3.- Seleccionar uno de los tubos de ensayo que contienen las diluciones de glucosa. Tomar de su interior un capilar, sujetándolo con unas pinzas - por su extremo sellado, enjuagarlo muy bien con buffer Che estéril y colocarlo por el extremo abierto dentro de la suspensión bacteriana de una de las cámaras.
 - 4.- Repetir el paso 3 para cada una de las diluciones de glucosa y el tubo que contiene sólo buffer Che.
 - 5.- Incubar todas las cámaras a 30°C por 24 hrs.
 - 6.- Remover los capilares y enjuagarlos muy bien con buffer Che estéril.
 - 7.- Transferir a tubos de ensayo de 13 x 100 mm contenido 5 ml de NaCl 0.85 % o buffer Che. Remover los capilares en el interior de los tubos utilizando unas pinzas. Mezclar vigorosamente.
 - 8.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares - rotos de acuerdo al siguiente cuadro:

Contenido del capilar. Diluciones a plasmear

buffer Che	
10^{-1}	10^{-1}
10^{-2}	10^{-1}
10^{-2}	10^{-2}
10^{-3}	10^{-2}
10^{-3}	10^{-3}
10^{-5}	10^{-1}
10^{-5}	10^{-2}

Transferir por duplicado 0.1 ml de las diluciones respectivas de cada serie a pares de tubos con agar blando previamente fundido y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcla homogéneamente y vacie todo

GLUCOSA 10^{-2} M

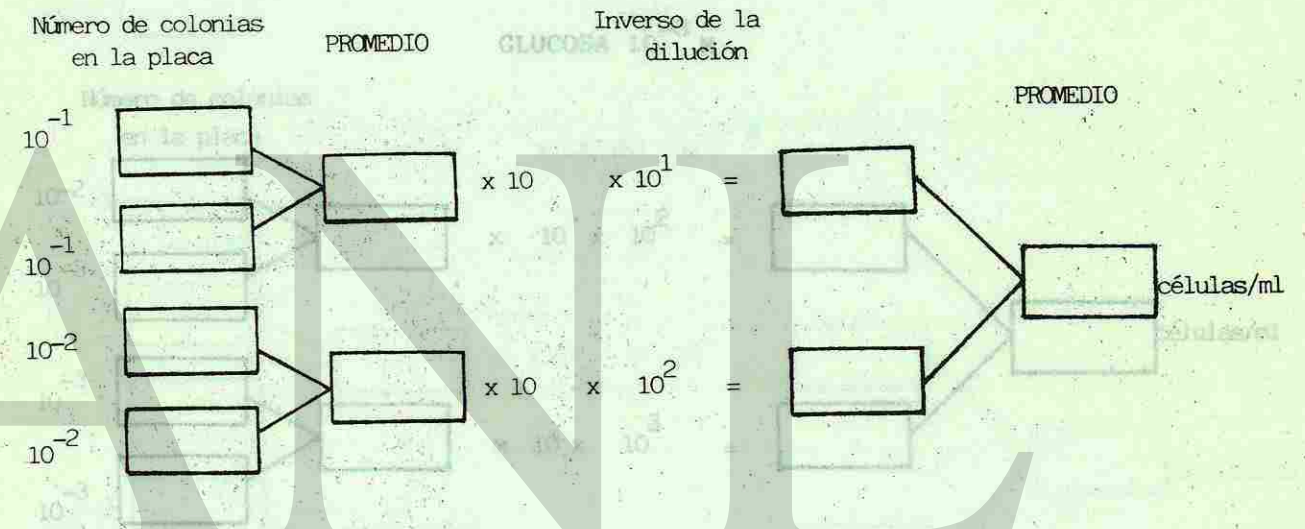
el contenido de los tubos sobre la superficie de placas con Agar nutritivo. Permita que solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24 horas en posición invertida.

8.- Contar el número de colonias desarrolladas en cada placa.

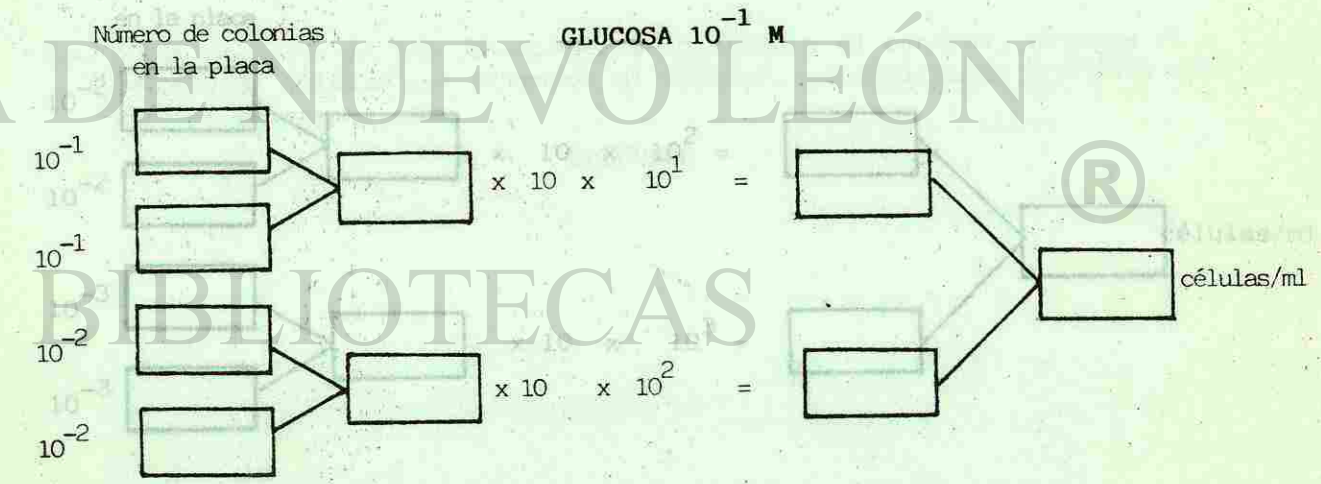
RESULTADOS

1.- Para cada dilución de glucosa usada como atrayente, calcule el número de células/ml presentes en el tubo de ensayo donde se recolectó el capilar después del ensayo de quimiotaxis. Para facilitar el cálculo lle los cuadros con los datos solicitados.

CONTROL (BUFFER CHE)



GLUCOSA 10^{-4} M



8.- Diluir la suspensión hasta una concentración de 0.1 a 200 ml. Conservar a 4°C hasta el momento de realizar el ensayo de quimiotaxis.

D) ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.

- En condiciones asepticas realizar lo siguiente:
- 1.- Transferir 0.5 ml de la suspensión bacteriana a la cavidad formada entre el portobjeto y el capilar, diluido en 0.5 de cada una de las 7 cámaras de quimiotaxis.
 - 2.- Colocar un capilar estéril sobre el capilar en el ángulo formado por las placas. Inclinar ligeramente la cámara para que la formación de un menisco.
 - 3.- Seleccionar uno de los tubos de ensayo que contienen las diluciones de glucosa. Tomar de su interior un capilar, sujetándolo con unas pinzas - por su extremo sellado, enjuagarlo muy bien con buffer Che estéril y colocarlo por el extremo abierto dentro de la suspensión bacteriana de una de las cámaras.
 - 4.- Repetir el paso 3 para cada una de las diluciones de glucosa y el tubo que contiene sólo buffer Che.
 - 5.- Incubar todas las cámaras a 30°C por 24 hrs.
 - 6.- Remover los capilares y enjuagarlos muy bien con buffer Che estéril.
 - 7.- Transferir a tubos de ensayo de 13 x 100 mm contenido 5 ml de NaCl 0.85 % o buffer Che. Remover los capilares en el interior de los tubos utilizando unas pinzas. Mezclar vigorosamente.
 - 8.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares - rotos de acuerdo al siguiente cuadro:

Contenido del capilar. Diluciones a plasmear

buffer Che	
10^{-1}	10^{-1}
10^{-2}	10^{-1}
10^{-3}	10^{-1}
10^{-4}	10^{-1}
10^{-5}	10^{-1}
10^{-6}	10^{-1}
10^{-7}	10^{-1}

Transferir por duplicado 0.1 ml de las diluciones respectivas de cada serie a pares de tubos con agar blando previamente fundido y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcla homogéneamente y vacie todo

GLUCOSA 10^{-2} M

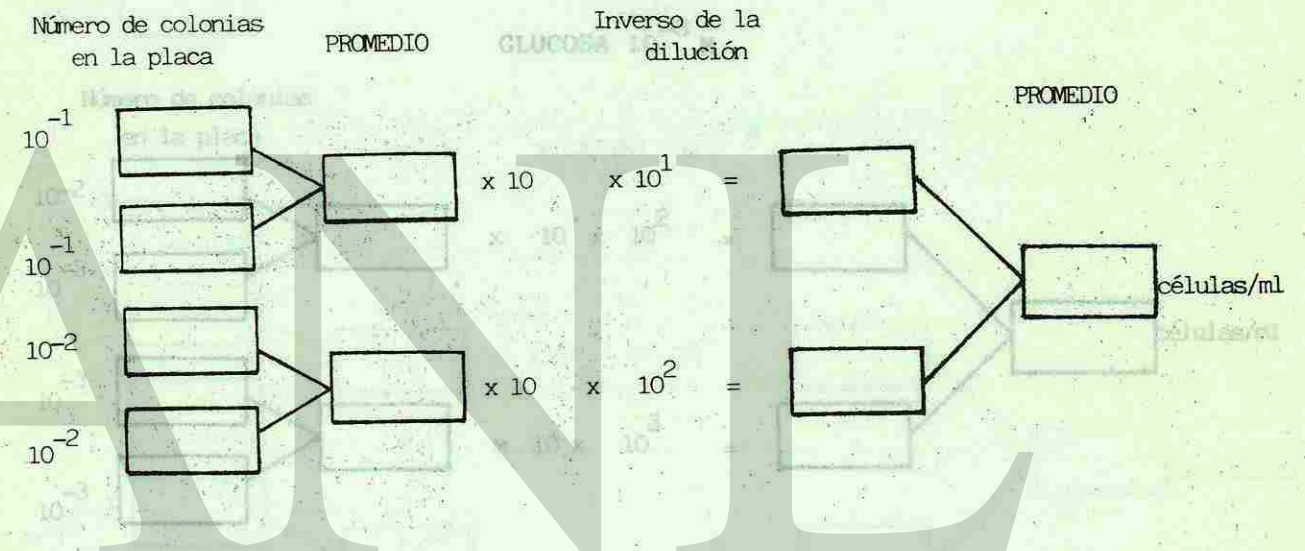
el contenido de los tubos sobre la superficie de placas con Agar nutritivo. Permita que solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24 horas en posición invertida.

8.- Contar el número de colonias desarrolladas en cada placa.

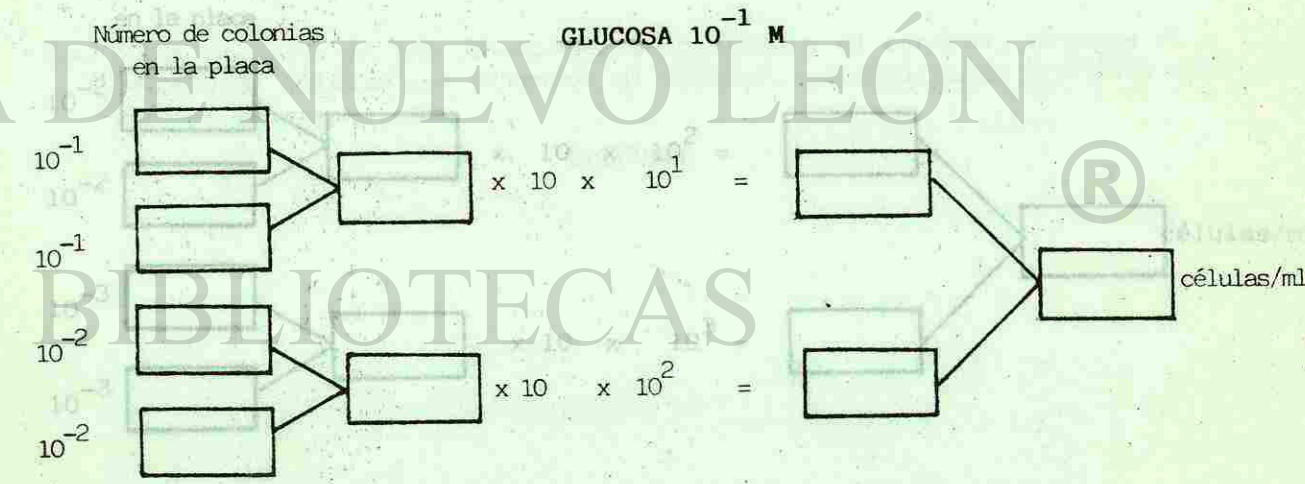
RESULTADOS

1.- Para cada dilución de glucosa usada como atrayente, calcule el número de células/ml presentes en el tubo de ensayo donde se recolectó el capilar después del ensayo de quimiotaxis. Para facilitar el cálculo lle los cuadros con los datos solicitados.

CONTROL (BUFFER CHE)



GLUCOSA 10^{-4} M

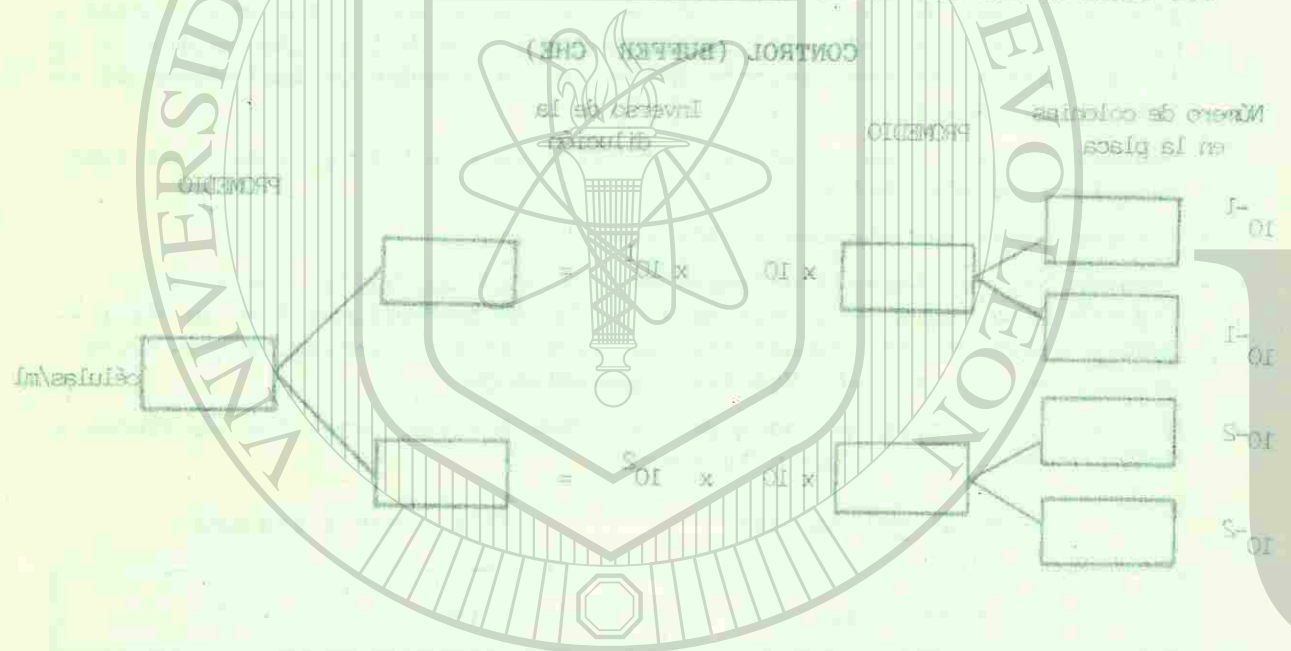


el contenido de los tubos sobre la superficie de placas con Agar no-
trítico. Permita que solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24
horas en posición invertida.

8.- Contar el número de colonias desarrolladas en cada placa.

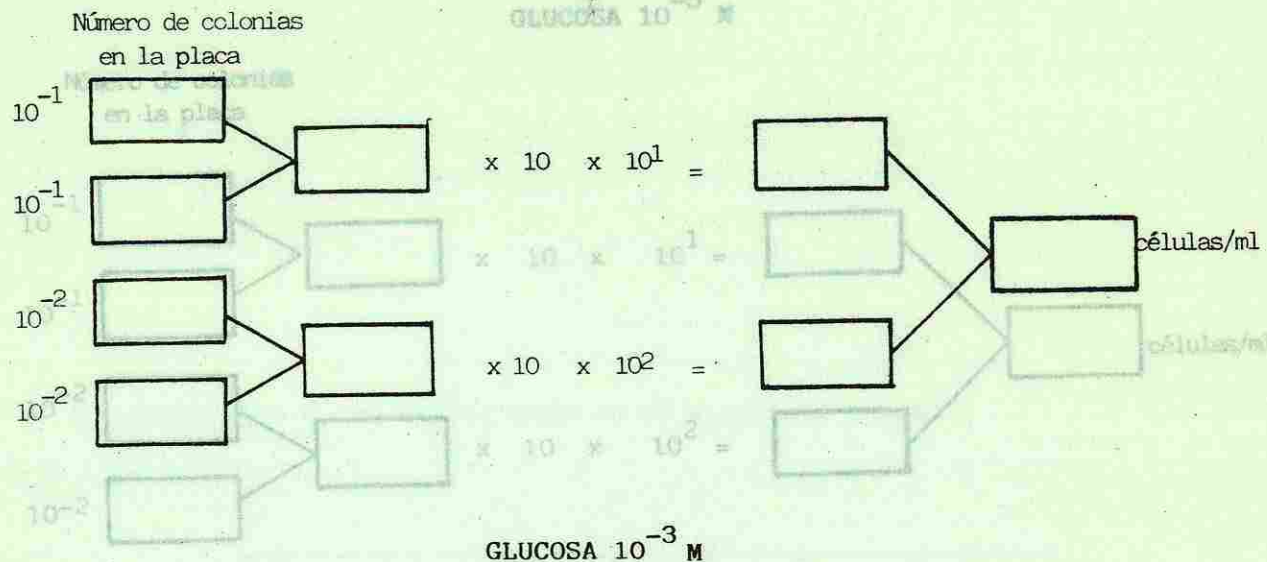
RESULTADOS

1.- Para cada dilución de alícuota usada como estándar, calcule el número
de células/ml presentes en el tubo de ensayo donde se recalcó el ca-
pilar después del ensayo de dilución. Para facilitar el cálculo de
los cuadros con los datos solicitados.

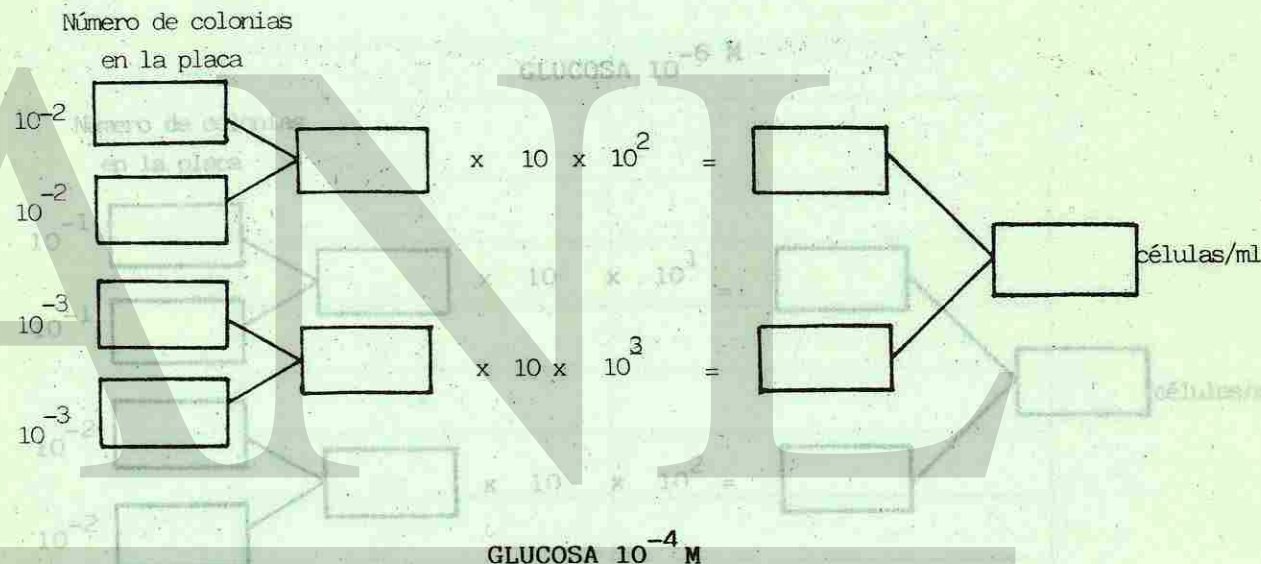


GLUCOSA 10^{-2} M

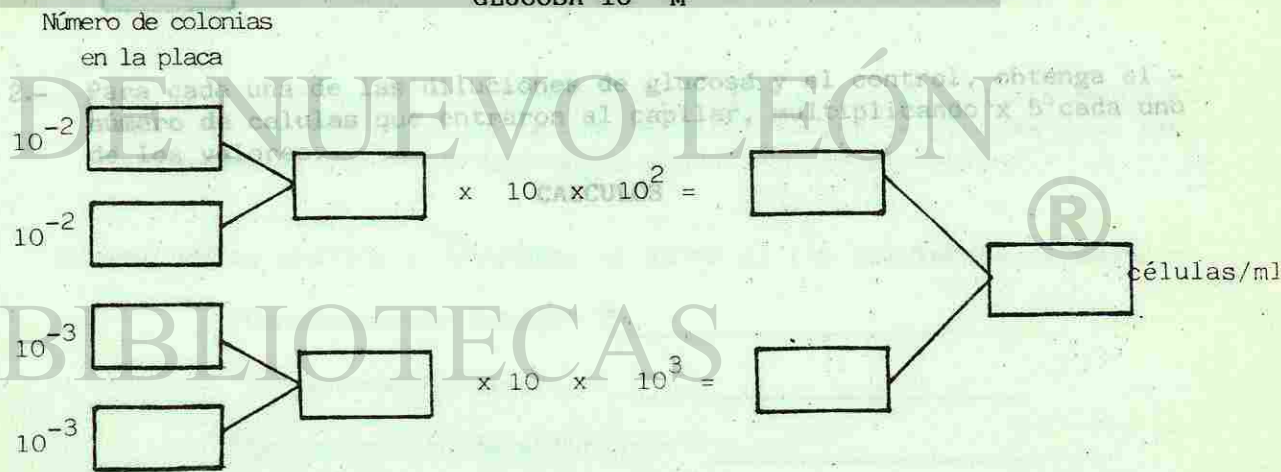
GLUCOSA 10^{-5} M



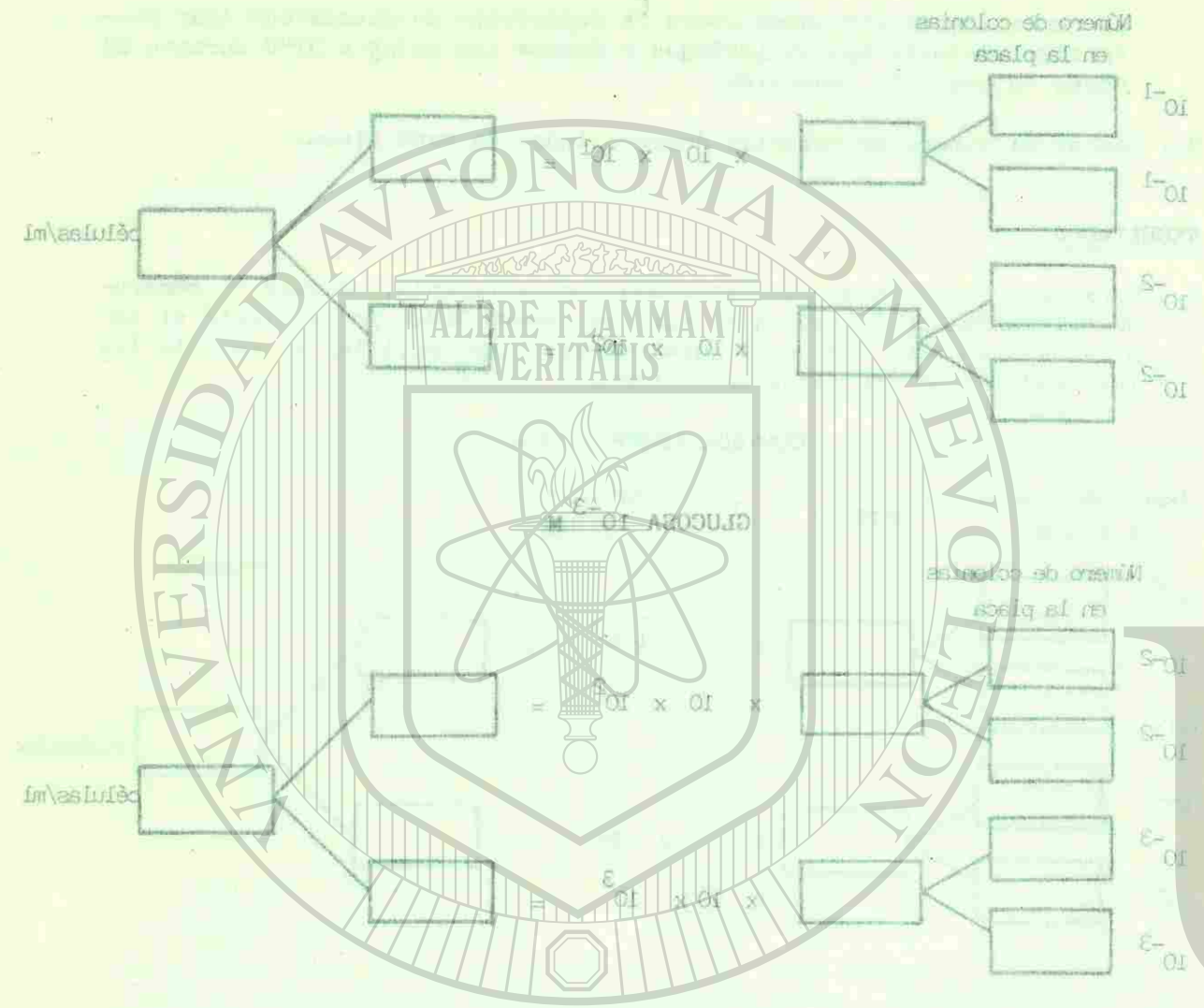
GLUCOSA 10^{-3} M



GLUCOSA 10^{-4} M



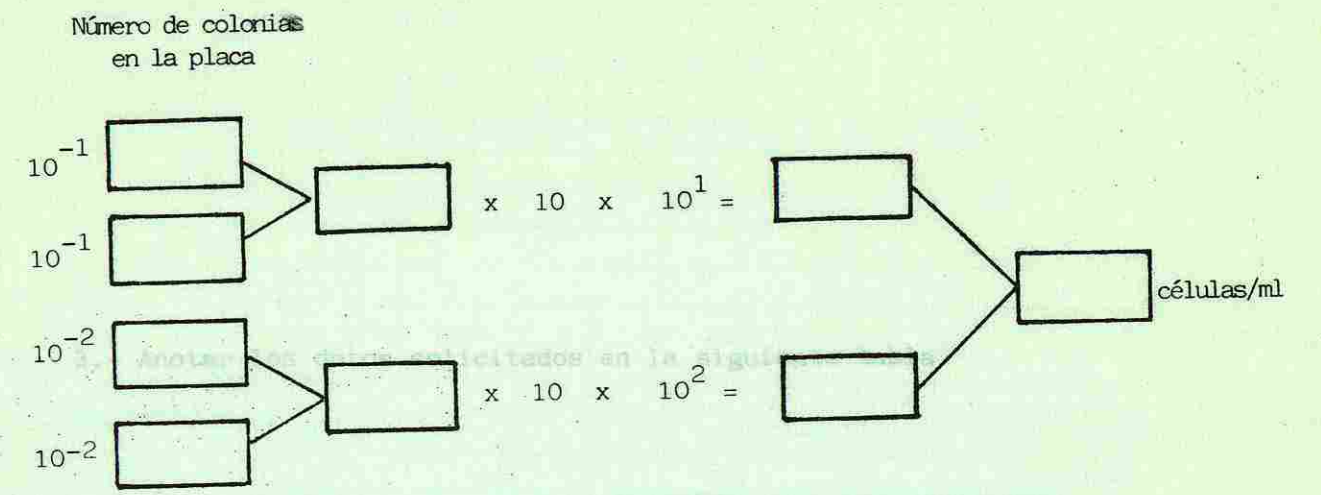
GLUCOSA 10⁻⁵ M



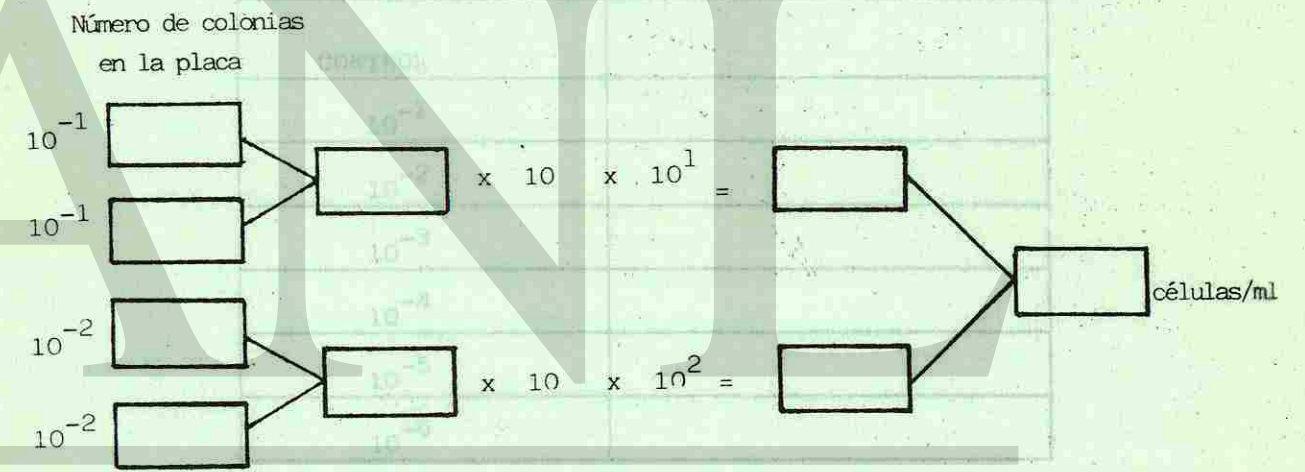
GLUCOSA 10⁻⁶ M



GLUCOSA 10⁻⁵ M



GLUCOSA 10⁻⁶ M

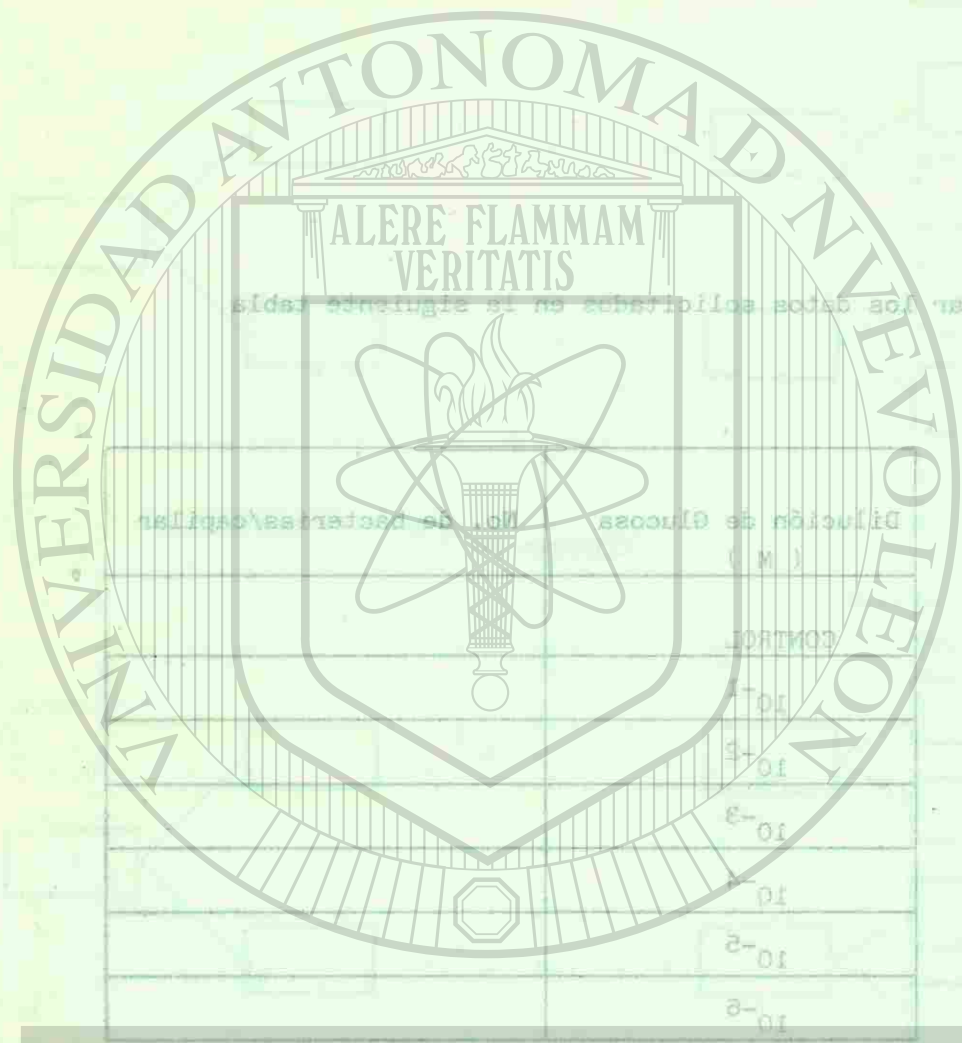


2.- Para cada una de las diluciones de glucosa y el control, obtenga el número de células que entraron al capilar, multiplicando x 5 cada uno de los valores.

CALCULOS

3.- Aplique su gráfica y determine el valor de los siguientes parámetros:

- "Concentración de saturación": _____
- "Concentración de glucosa": _____
- "Respuesta Pico": _____



3.- Analice los datos solicitados en la siguiente tabla:

Dirección de Glucosa

CONTROL

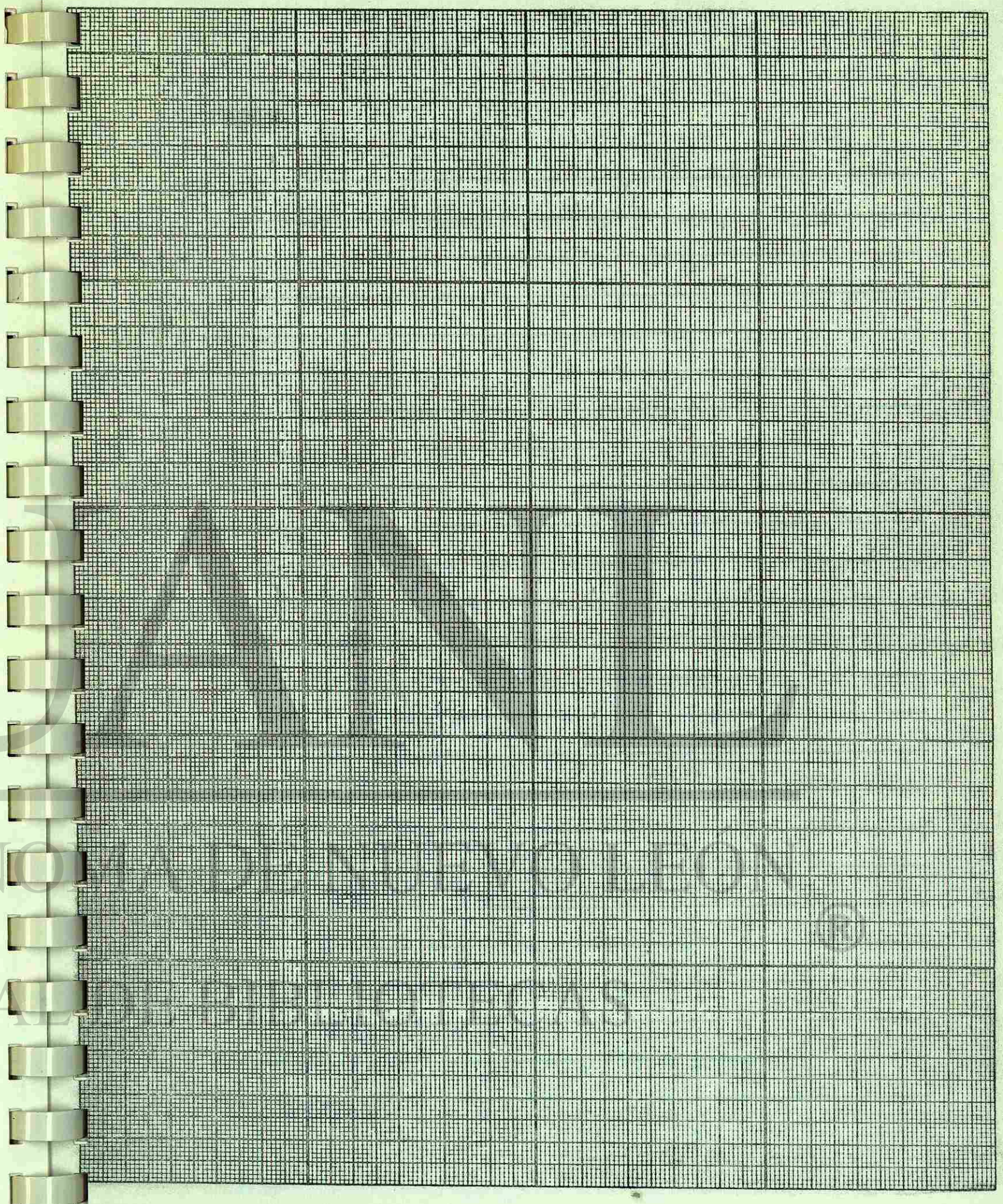
10⁻¹
 10⁻²
 10⁻³
 10⁻⁴
 10⁻⁵
 10⁻⁶

4.- En la hoja de papel milimétrico construya un curva de costo-respuesta notando en las abscisas la concentración molar de glucosa y en las ordenadas el número de bacterias somatizadas en el cultivo.

5.- Analice su gráfica y determine el valor de los siguientes parámetros:

"Concentración umbral"
 "Concentración pico"
 "Concentración de saturación"
 "Resposta Pico"

U



EFFECTO DE ALGUNOS TENSIOACTIVOS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática es una estructura delgada de 4 a 5 nm de espesor que rodea al citoplasma y constituye la frontera entre el medio intracelular y el medio extracelular. Se distingue, en los procariontes, por una gran capacidad de flexibilidad, para dada su propiedad de actuar como barrera molecular selectiva respecto al establecimiento de gradientes de concentración y como medio de salida de los residuos y la entrada de nutrientes y la salida de moléculas de desecho.

BIBLIOGRAFIA

Todas las membranas plasmáticas consisten de una bicapa discontinua de lípidos a la cual se adhieren proteínas, ambas moléculas coexisten estableciendo mediante sus grupos hidrofóbicos y sus interacciones hidrofóbicas y iónicas.

- 1.- Adler, J. 1973. A method for Measuring Chemotaxis and Use of the method to Determinate Optimum Conditions -- for chemotaxis by *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 74: 77-91.
- 2.- Adler, J. 1976. The Sensing of Chemicals by Bacteria. *Sci. Am.* 234 (4) : 40-47.
- 3.- Chet, I., R.P. Mitchel. 1976. Ecological Aspectos of Microbial Chemotactic Behavior. *Ann. Rev. Microbiol.* 30: 321-339.
- 4.- Gomez Lin. M.A. y E. Garcia H. 1981. Percepción de estímulos en las bacterias. *Naturaleza.* 12 (4):218-225.
- 5.- Melton, T., P.E. Hartman., J.P. Stratis., T.L. Lee y A. T. Davis. 1978. Chemotaxis of *Salmonella typhimurium* to aminoacids and some sugars. *J. Bacteriol.* 133 (2): 708-716.

El estudio del efecto de ciertos agentes tensioactivos sobre la integridad de la membrana plasmática, se puede realizar de la siguiente manera:

- 1) Determinar la eficiencia con la cual los agentes tensioactivos dañan la superficie ocasionan daños en la membrana celular.

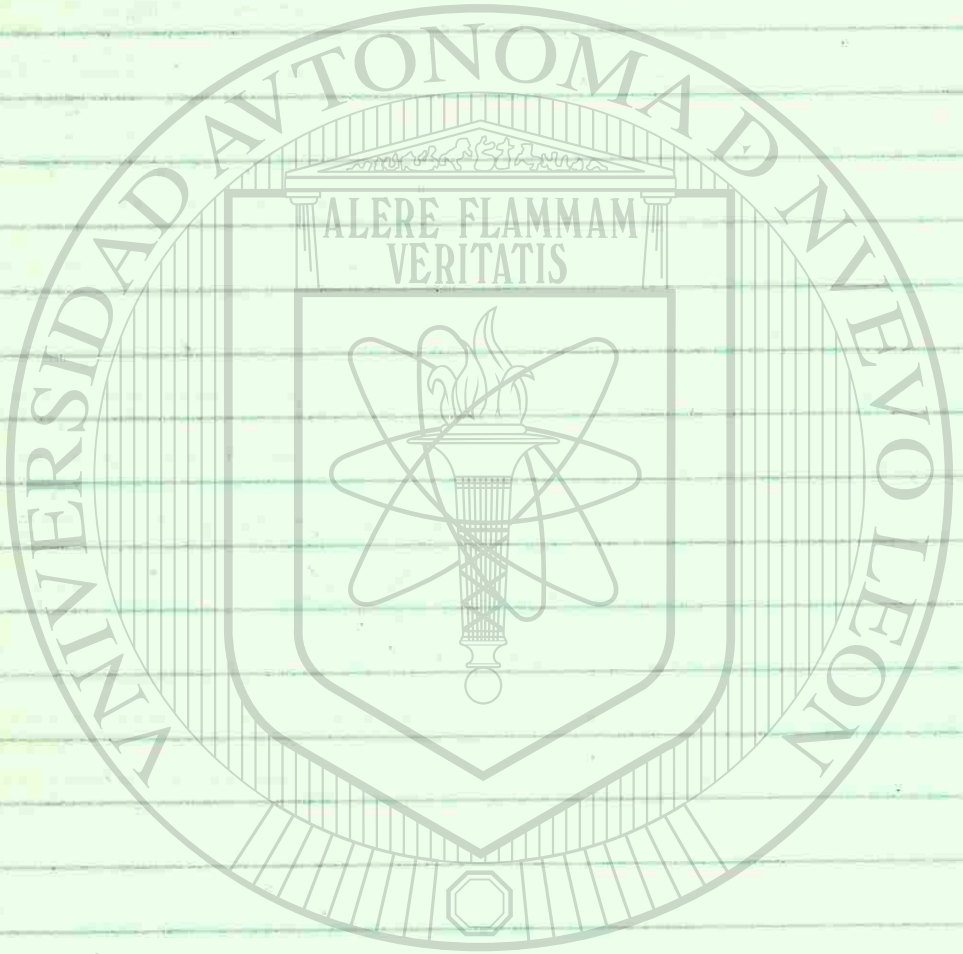
3) Mediante un ensayo de dosis-respuesta, establecer la concentración a la cual los agentes tensioactivos probados presentan su máxima actividad.

DISCUSIÓN

Se ha postulado que las proteínas membranales se insertan en la bicapa lipídica mediante cuatro formas alternativas que involucran principalmente a las interacciones hidrofóbicas. Como los lípidos membranales, los agentes tensio-

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

activas (detergentes), son moléculas cuya porción hidrofílica altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aquellos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como **EFFECTO DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA** grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los detergentes no iónicos poseen un grupo polar sin carga.

INTRODUCCION

Los detergentes en el agua tienden a formar micelas; y cuando se ponen en contacto con la membrana plasmática es una estructura delgada de 4 a 5 nm de espesor que rodea al citoplasma y delimita a la célula constituyendo la frontera entre el contenido citoplásmico y el medio circundante. Es dinámica, en los procesos cumple una gran variedad de funciones, pero dada su propiedad de actuar como tamiz molecular selectivo, permite el establecimiento de gradientes de concentración a ambos lados de ella los cuales promueven la entrada de nutrientes y la salida de materiales de desecho. Al depender del tipo y concentración de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización estructural de todas las membranas biológicas estudiadas consisten de una bicapa discontinua de lípidos a la cual se asocian proteínas, ambas moléculas coexisten y se establecen mediante uniones no covalentes como son interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas de atracción. Debido a su naturaleza fluida, los lípidos pueden desplazarse lateralmente en el plano de la membrana o rotar sobre su propio eje longitudinal.

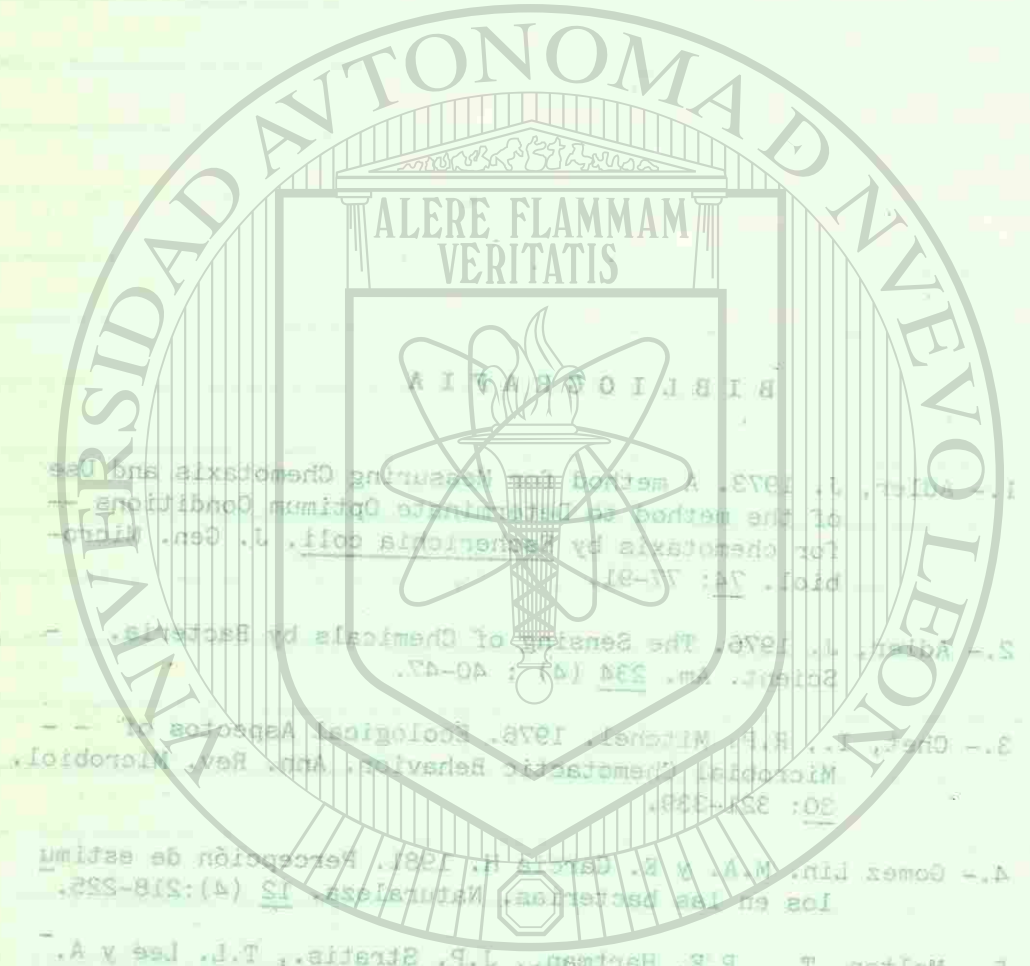
Las funciones atribuidas a la membrana son desempeñadas por sus componentes; la bicapa de lípidos es responsable de la impermeabilidad hacia moléculas hidrofílicas en tanto que las proteínas están involucradas en el tránsito específico de moléculas, la generación de energía, la recepción y transducción de señales físicas y químicas provenientes del medio ambiente o actividades enzimáticas. La ordenada disposición de sus lípidos y proteínas es responsable de la integridad estructural de la membrana, por lo que cualquier agente que perturbe esta organización causará severos trastornos en su funcionalidad y en consecuencia afectará la viabilidad celular en diferente grado.

OBJETIVOS

- En este ensayo nos proponemos como objetivos los siguientes:
- 1) Estudiar el efecto de ciertos agentes tensoactivos sobre la integridad de la membrana plasmática.
 - 2) Determinar la eficiencia con la cual los distintos agentes activos de superficie ocasionan daños en la membrana celular.
 - 3) Mediante un ensayo de dosis-respuesta, establecer la concentración a la cual los agentes tensoactivos probados presentan su máxima actividad.

FUNDAMENTO

Se ha postulado que las proteínas membranales se asocian con la bicapa lipídica mediante cuatro formas alternativas que involucran principalmente a las interacciones hidrofóbicas. Como los lípidos membranales, los agentes tenso-



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EFEECTO DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

INTRODUCCION

Las membranas plasmáticas de las células animales y vegetales son estructuras que rodean al citoplasma y permiten la comunicación entre el contenido celular y el medio exterior. Estas membranas cumplen una gran variedad de funciones, pero todas se pueden resumir como tamiz molecular selectivo, permitiendo el paso de sustancias de menor concentración y impidiendo el paso de las de mayor concentración y la salida de materiales de desecho.

Todas las membranas plasmáticas constan de una doble capa de lípidos y proteínas. Los lípidos se asocian entre sí por sus cadenas hidrofóbicas, formando una bicapa lipídica. Las proteínas se asocian a los lípidos por sus grupos hidrofílicos, formando una estructura estable que permite el transporte de sustancias y la generación de energía.

Las funciones atribuidas a la membrana son semejantes a las de una barrera selectiva; la bicapa de lípidos es responsable de la impermeabilidad y las proteínas que la componen están involucradas en el transporte específico de moléculas, la generación de energía, la recepción de señales físicas y químicas provenientes del medio ambiente y la activación de enzimas. La organización de las proteínas en la membrana depende de la naturaleza de la bicapa lipídica y de la naturaleza de las proteínas mismas. En consecuencia, la integridad celular depende del grado de asociación entre las proteínas y los lípidos.

OBJETIVOS

En este ensayo nos proponemos como objetivos los siguientes:

- 1) Estudiar el efecto de ciertos agentes tensoactivos sobre la integridad de la membrana plasmática.
- 2) Determinar la eficiencia con la cual los distintos agentes activos de superficie ocasionan daños en la membrana celular.
- 3) Mediante un ensayo de dosis-respuesta, establecer la concentración a la cual los agentes tensoactivos poseen su máxima actividad.

FUNDAMENTO

Se ha postulado que las proteínas membranales se asocian con la bicapa lipídica mediante cuatro formas alternativas que involucran principalmente a las interacciones hidrofóbicas. Como los lípidos membranales, los agentes tenso-

activos (detergentes), son moléculas anfipáticas cuya porción hidrofílica altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aquellos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como **detergentes catiónicos**, los **detergentes aniónicos** llevan un grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los **detergentes no iónicos** poseen un grupo polar sin carga.

Los detergentes en el agua tienden a formar micelas, y cuando se ponen en contacto con la membrana se asocian con ella insertando sus porciones no polares; esta unión rompe las interacciones hidrofóbicas existentes entre las proteínas y lípidos circundantes destruyéndose la bicapa lipídica. Las proteínas son liberadas en forma de complejo con moléculas de detergente y unos cuantos lípidos; los lípidos son solubilizados también por el detergente en forma de micelas.

El grado de daño ocasionado a la membrana depende del tipo y concentración de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización estructural de la membrana sobreviene pérdida de su permeabilidad manifestándose en la liberación de metabolitos intracelulares, bloqueo en el transporte activo y del metabolismo energético; cuando el daño es severo ocurre la destrucción total de la membrana y la lisis celular. Estas propiedades han hecho de los detergentes candidatos en el empleo como agentes bactericidas.

En esta práctica ensayaremos la actividad hemolítica de los detergentes siguiendo espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina a partir de las células rotas. Se emplearán diferentes concentraciones de agente tensoactivo.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Sangre humana fresca
- Gradilla
- Jeringa y aguja estériles
- 1 tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante
- 20 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de hule
- 2 pipeta graduada de 5 ml
- 1 pipeta graduada de 1 ml
- 3 pipetas graduadas de 0.1 ml
- 1 pipeta Pasteur con bulbo de caucho
- 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 1 centrifuga
- 1 Baño de agua
- 1 espectrofotómetro

- Solución Salina: NaCl 0.85 %: Disolver 0.85 gramos de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- Soluciones de detergente al 1%: Disolver 0.1 gramos de detergente en 10 ml de agua destilada. Los detergentes que se emplearán serán Tween-80, Tritón X-100, Cetrimida, Dodecil-sulfato de sodio (SDS) y Desoxicolato de sodio.
- Solución anticoagulante: Citrato de Sodio al 4%: Disolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada. Distribuir volúmenes de 0.5 ml en tubos de ensayo de 13 x 100.

RESULTADOS

METODOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre humana con una jeringa estéril y transferirla a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio al 4%.
- 2.- Mezclar suavemente por inversión para no causar hemólisis.
- 3.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.- Eliminar el suero con una pipeta Pasteur.
- 5.- Lavar dos veces el paquete celular con NaCl al 0.85%.
- 6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.85%, ajustando al volumen original de sangre.
- 7.- Preparar diluciones de la suspensión de eritrocitos de manera que cuando se adicionen 0.5 ml de la dilución a 4.5 ml de Triton X-100 al 1%, el sobrenadante obtenido después de centrifugar, muestre una absorbancia de 0.8 - 0.9 a 540 nm. El valor de absorbancia obtenido se considerará como el 100% de lisis; por lo que el porcentaje de hemólisis ocasionado por los diferentes agentes podrá calcularse a partir de este valor.
- 8.- La suspensión de eritrocitos deberá diluirse con NaCl al 0.85% a la dilución que mostró el valor de densidad óptica recomendado anteriormente.
- 9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensaye de 13 x 100 mm, y adicionarles 4.5 ml de NaCl 0.85%.
- 10.- Añadir a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y mezclar de la forma ya indicada.
- 11.- A cada uno de los tres tubos de ensaye de la primera serie añadirles 10, 30 y 50 µl respectivamente de Tween-80 al 1%. Mezclar cuidadosamente por inversión e incubar los tubos en baño de agua durante 20 minutos.
- 12.- De manera similar proceder con las tres series de tubos restantes, empleando los agentes tensoactivos como sigue:
 - 2a. serie de tubos: Cetrimida al 1%
 - 3a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%
 - 4a. serie de tubos: Desoxicolato de sodio al 1%
- 13.- Después de la incubación, centrifugar todos los tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células que permanecieron intactas.
- 14.- Determinar la absorbancia de todos los sobrenadantes a 540 nm en un espectro fotómetro.
- 15.- Registrar los valores.

activos (detergentes), son moléculas anfipáticas cuyas porciones hidrofílicas altamente polar puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica; aque- llos cuyo grupo ionizable es un núcleo de amonio cuaternario cargado positivamente se conocen como detergentes catiónicos, los detergentes aniónicos llevan un grupo cargado negativamente en su molécula, en tanto que los detergentes no ióni- cos poseen un grupo polar sin carga.

Los detergentes en el agua tienden a formar micelas, y cuando se ponen en contacto con la membrana se unen a ella rompiendo sus regiones no polares; esta unión rompe las interacciones hidrofóbicas que mantienen unidas las proteínas y lípidos circundantes de la membrana. Los detergentes aniónicos y no iónicos son lípi- dos en forma de complejo por moléculas de detergente y lípidos cuando lípidos; los lípidos son solubilizados también por el detergente en forma de micela.

El grado de daño ocasionado a la membrana depende del tipo y concentra- ción de agente tensoactivo. Al perturbarse de esta manera la organización es- tructural de la membrana sobreviene pérdida de su permeabilidad manteniéndose en la liberación de metabolitos intracelulares, aunque en el transporte activo y del metabolismo energético, cuando el daño es severo ocurre la destrucción to- tal de la membrana y la lisis celular. Entre los detergentes han hecho de los deter- gentes candidatos en el empleo como agentes tensoactivos.

En esta práctica ensayaremos la actividad hemolítica de los detergentes - siguientes espectroscópicamente la liberación de hemoglobina a partir de las células rojas. Se emplearán diferentes concentraciones de agente tensoactivo.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Sangre humana fresca
- Gradilla
- Jeringa y aguja estériles
- 1 tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio
- 30 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de goma
- 2 pipetas graduadas de 5 ml
- 1 pipeta graduada de 1 ml
- 3 pipetas graduadas de 0.1 ml
- 1 pipeta Pasteur con tubo de caucho
- 1 baño de agua
- 1 espectrofotómetro

- Solución Salina: NaCl 0.85 %; Dissolver 0.85 gramos de NaCl en 100 ml de agua des- tiada.
- Soluciones de detergentes al 1%: Dissolver 0.1 gramos de detergente en 10 ml de - agua destilada. Los detergentes que se emplearán serán Tween-80, Tritón X-100, Cetrimida, Dodecil sulfato de sodio (SDS) y Desoxicolato de sodio.
- Solución anticoagulante: Citrato de sodio al 4%; Dissolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada. Distribuir volúmenes de 0.5 ml en tubos de ensaye de 13 x 100.



RESULTADOS

1.- Registre enseguida la dilución a la que se preparó la suspensión de eritrocitos empleada en el ensayo. Así mismo anote la densidad óptica considerada como el 100% de Hemólisis.

Dilución: _____
D.O. a 540 nm: _____

2.-Registre las densidades ópticas debidas a la liberación de hemoglobina tras la lisis eritrocítica causada por las distintas dosis de detergentes.

DETERGENTE	D.O. 540		
	10 µl	30 µl	50 µl
TWEEN-80			
CETRIMIDA			
DODECIL SULFATO DE SODIO			
DESOXICOLATO DE SODIO			

3.-Calcule los porcentajes de hemólisis para las concentraciones ensayadas de cada uno de los detergentes.

MÉTODOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre humana con una técnica estéril y transferirla a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio al 4%.
- 2.- Mezclar suavemente por inversión para no causar hemólisis.
- 3.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 4.- Eliminar el suero con una pipeta.
- 5.- Lavar dos veces el paquete celular con NaCl 0.85%.
- 6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.85% ajustando al volumen original de sangre.
- 7.- Preparar diluciones de la suspensión de eritrocitos de manera que cuando se adicionen 0.5 ml de la dilución a 4.5 ml de Triton X-100 al 1%, se obtenga ante operación después de centrifugar a 3,000 r.p.m. una absorbancia de 0.8 - 0.9 a 540 nm. El valor de absorbancia obtenido se considerará como el 100% de lisis; por lo que el porcentaje de hemólisis ocasionado por los diferentes agentes podrá calcularse a partir de este valor.
- 8.- La suspensión de eritrocitos deberá diluirse con NaCl al 0.85% a la dilución que mostró el valor de densidad óptica recomendado anteriormente.
- 9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensayo de 13 x 100 mm, y adicionarles 4.5 ml de NaCl 0.85%.
- 10.- Añadir a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y mezclar de la forma ya indicada.
- 11.- A cada uno de los tres tubos de ensayo de la primera serie añadirles 10, 30 y 50 µl respectivamente de Tween-80 al 1%. Mezclar cuidadosamente por inversión e incubar los tubos en baño de agua durante 30 minutos.
- 12.- De manera similar proceder con las tres series de tubos restantes, empleando los agentes tensioactivos como sigue:
 - 1a. serie de tubos: Cetrimida al 1%.
 - 2a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%.
 - 3a. serie de tubos: Desoxicolato de sodio al 1%.
- 13.- Después de la incubación, centrifugar todos los tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células que permanecieron intactas.
- 14.- Determinar la absorbancia de todos los sobrenadantes a 540 nm en un espectrofotómetro.
- 15.- Registrar los valores.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESULTADOS

1.- Registre enseguida la dilución a la que se preparó la suspensión de eritrocitos empleada en el ensayo. Así mismo anote la densidad óptica considerada como el 100% de Hemólisis.

Dilución: _____
D.O. a 540 nm: _____

2.-Registre las densidades ópticas debidas a la liberación de hemoglobina tras la lisis eritrocítica causada por las distintas dosis de detergentes.

DETERGENTE	D.O. 540		
	10 µl	30 µl	50 µl
TWEEN-80			
CETRIMIDA			
DODECIL SULFATO DE SODIO			
DESOXICOLATO DE SODIO			

3.-Calcule los porcentajes de hemólisis para las concentraciones ensayadas de cada uno de los detergentes.

MÉTODOS

- 1.- Colectar 2 ml de sangre humana con una técnica estéril y transferirla a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio al 4%.
- 2.- Mezclar suavemente por inversión para no causar hemólisis.
- 3.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.- Eliminar el suero con una pipeta.
- 5.- Lavar dos veces el paquete celular con NaCl 0.9%.
- 6.- Resuspender el paquete celular con NaCl 0.9% ajustando al volumen original de sangre.
- 7.- Preparar diluciones de la suspensión de eritrocitos de manera que cuando se adicionen 2 ml de la dilución a 4.5 ml de Triton X-100 al 1%, se obtenga durante 5 minutos después de centrifugar a 3,000 r.p.m. una absorbancia de 0.8 - 0.9 a 540 nm. El valor de absorbancia obtenido se considerará como el 100% de lisis; por lo que el porcentaje de hemólisis ocasionado por los diferentes agentes podrá calcularse a partir de este valor.
- 8.- La suspensión de eritrocitos deberá diluirse con NaCl al 0.9% a la dilución que mostró el valor de densidad óptica recomendada anteriormente.
- 9.- Preparar cuatro series de 3 tubos de ensayo de 13 x 100 mm, y adicionarles 4.5 ml de NaCl 0.9%.
- 10.- Añadir a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión diluida de eritrocitos, y mezclar de la forma ya indicada.
- 11.- A cada uno de los tres tubos de ensayo de la primera serie añadirles 10, 30 y 50 µl respectivamente de Tween-80 al 1%. Mezclar cuidadosamente por inversión e incubar los tubos en baño de agua durante 30 minutos.
- 12.- De manera similar proceder con las tres series de tubos restantes, empleando los agentes tensioactivos como sigue:
 - 1a. serie de tubos: Cetrimida al 1%
 - 2a. serie de tubos: Dodecil sulfato de sodio al 1%
 - 3a. serie de tubos: Desoxicolato de sodio al 1%
- 13.- Después de la incubación, centrifugar todos los tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos para separar las células que permanecieron intactas.
- 14.- Determinar la absorbancia de todos los sobrenadantes a 540 nm en un espectrofotómetro.
- 15.- Registrar los valores.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

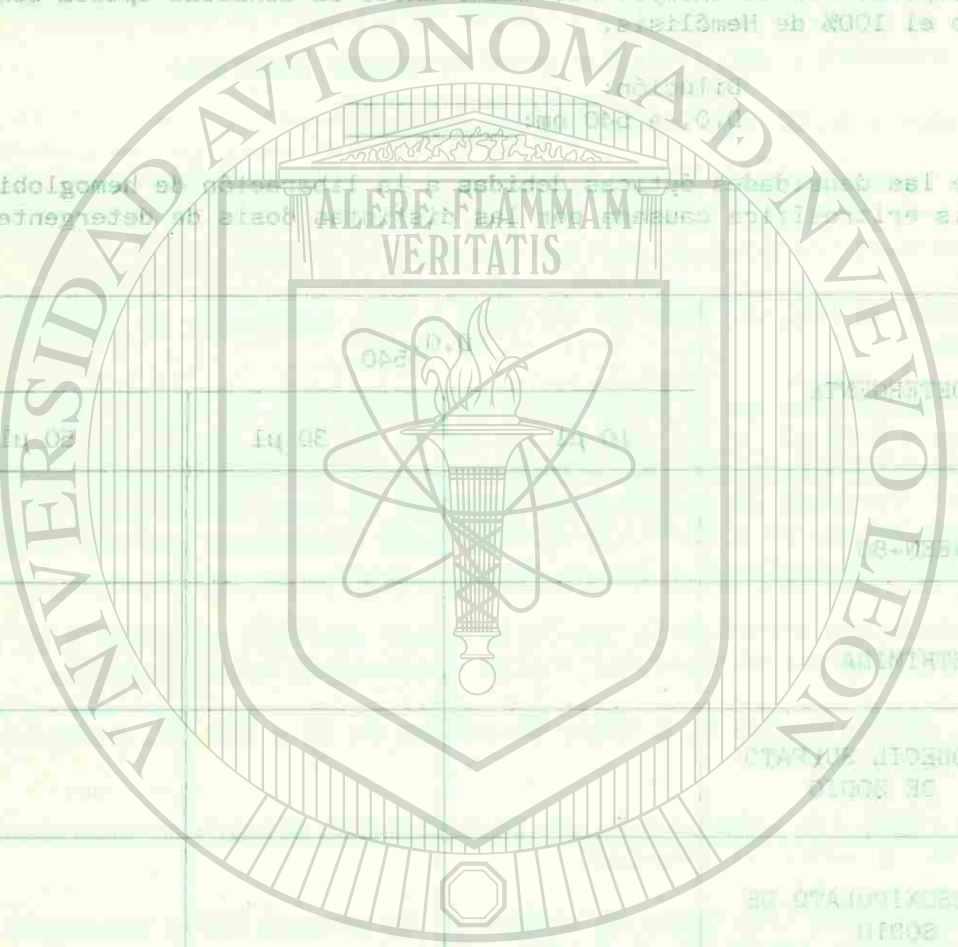
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESULTADOS

1.- Registrar enseguida la dilución a la que se preparó la suspensión de eritrocitos empleada en el ensayo. Así mismo anote la densidad óptica considerando como el 100% de hemólisis.

2.- Registrar las densidades ópticas de las suspensiones de eritrocitos en los diferentes detergentes.



Detergente	Densidad Óptica
TWEEN-80	
CETRIMIDA	
DODECIL SULFATO DE SODIO	
DESOXICOLATO DE SODIO	

3.- Calcule los porcentajes de hemólisis para las concentraciones ensayadas de cada uno de los detergentes.

4.- Anote los porcentajes de hemólisis ocasionados por las concentraciones crecientes de agente tensoactivo.

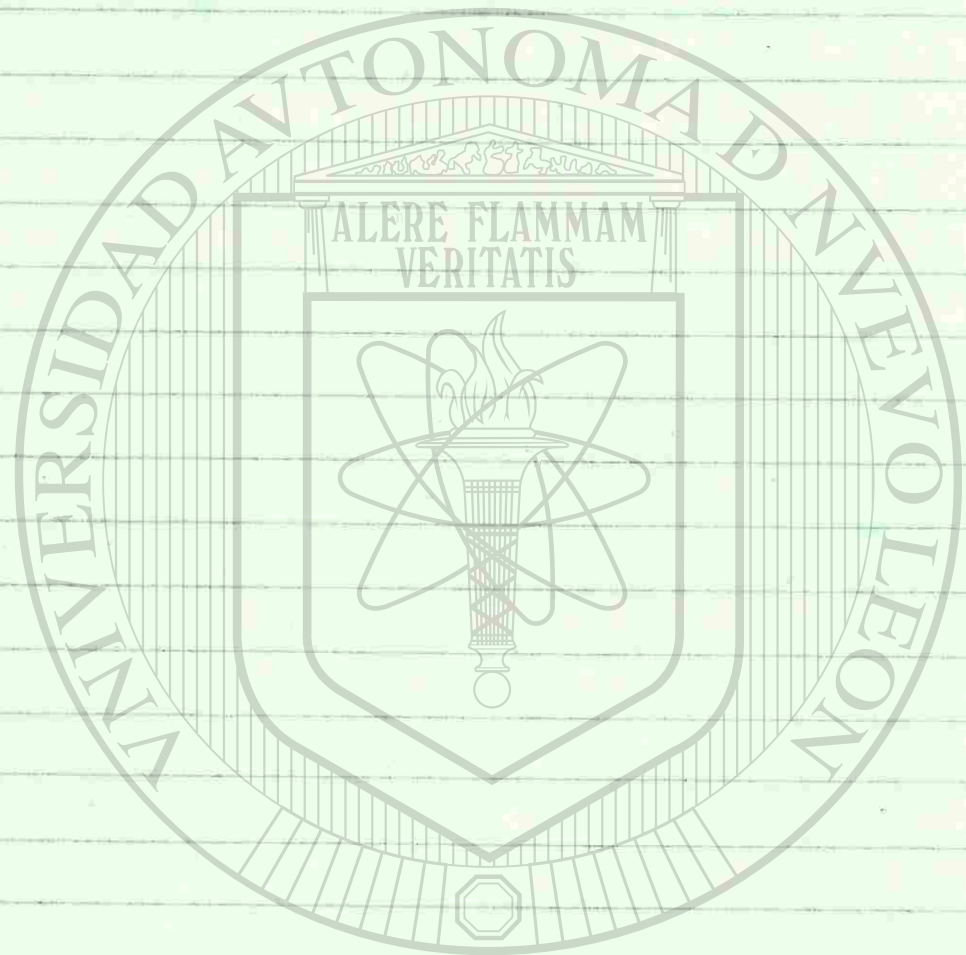
DETERGENTES	PORCENTAJE DE HEMÓLISIS CON:		
	10 µl	30 µl	50 µl
TWEEN-80			
CETRIMIDA			
DODECIL SULFATO DE SODIO			
DESOXICOLATO DE SODIO			

5.- Construya en papel milimétrico una gráfica de dosis-respuesta, anotando en las abscisas el volumen de detergente utilizado, y en las ordenadas el porcentaje de hemólisis ocasionado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE LABORATORIOS

DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

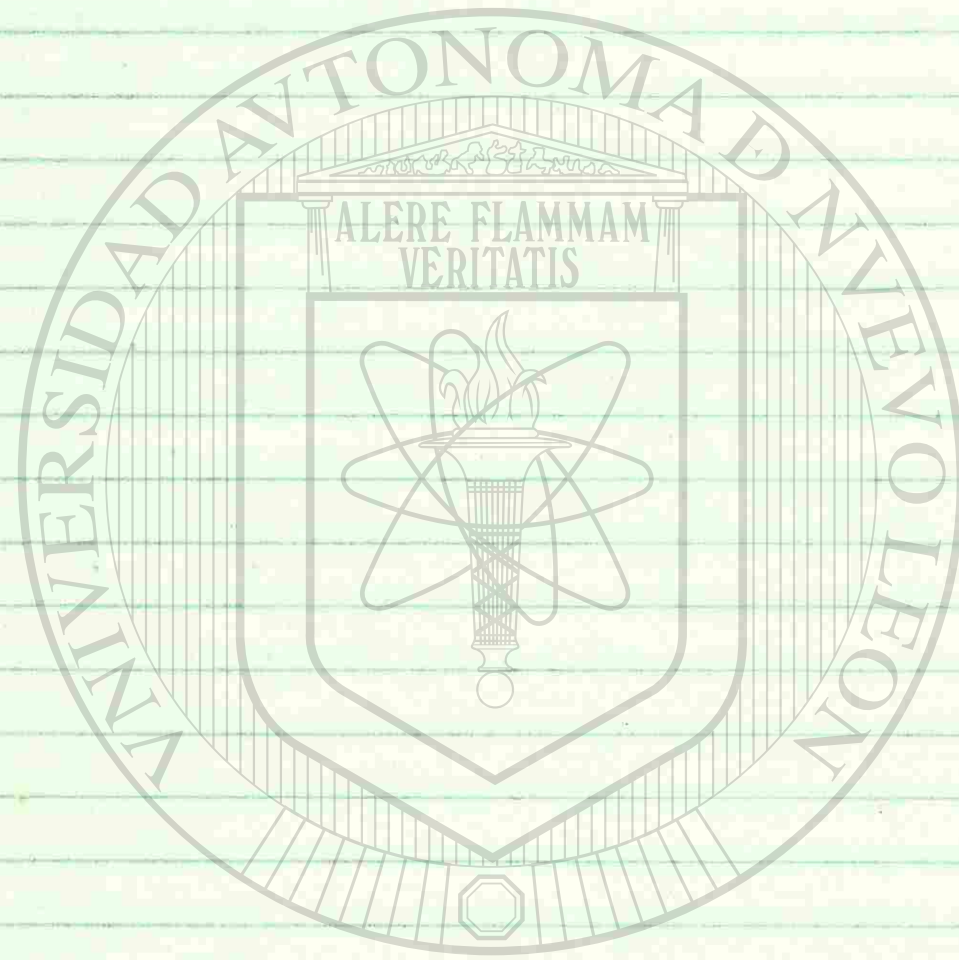
CONCLUSIONES

Handwritten notes in the conclusions section, including the name "JUAN L..." and some illegible text.

BIBLIOGRAFIA

Handwritten bibliographic entries in the bibliography section, including a reference to "The Journal of the Royal Society of Medicine" and a page number "194-197".

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TRANSPORTE DE AZÚCAR EN LEVADURAS

INTRODUCCIÓN

El transporte de azúcar en levaduras es un proceso complejo que implica la participación de varios sistemas de transporte...

BIBLIOGRAFIA

1.- Alberts, B., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts y J.D. Watson. 1986. Molecular Biology of The Cell Garland Publishing, Inc. New Yor & London. pp - 255-317.

2.- Joklik, W. K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986. Zinsser - Microbiología. Editorial Médica Panamericana. - 18ª Edición. pp 284-293.

3.- Plummer, D.T. 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. 2ª Edition. McGraw- Hill Book Co. pp - 218-219.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo de transporte de azúcar en levaduras...

FUNDAMENTO

El transporte de azúcar en levaduras es una característica de las membranas biológicas y ha sido estudiado en sistemas biológicos como eucariotas...

PRACTICA No. 6

TRANSPORTE DE AZUCARES EN LEVADURAS

INTRODUCCION

Los microorganismos en su ambiente natural se enfrentan tanto a condiciones adversas del entorno como a la competencia con otras formas de vida por la adquisición de los nutrientes escasamente presentes, y para preservar su sobrevivencia no solamente emplean la locomoción, quimiotaxis o la secreción de extracelulares sino también fabrican estructuras extracelulares como vainas, holdfast, materiales mucilaginosos, etc; mediante los cuales se fijan sobre objetos sólidos y aseguran la captación de materiales nutritivos.

Sin embargo, cualquiera que sea la habilidad desplegada para proveer se de nutrientes, estos materiales deben ser movilizados desde el medio exterior hasta el citoplasma donde son metabolizados, pero la membrana plasmática por sus características estructurales constituye una barrera al paso libre de solutos. Esta envoltura desempeña una actividad muy dinámica en la entrada de nutrientes así como en la excreción de productos de desecho; para que ésta translocación suceda, los microorganismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de transporte mediante los cuales los solutos son movilizados de un lado a otro de la membrana según las conveniencias de la célula.

OBJETIVO

Con la aplicación de agentes fisicoquímicos pretenderemos dilucidar el mecanismo de transporte utilizado por *Saccharomyces cerevisiae* para captar glucosa.

FUNDAMENTO

Los procesos de transporte son una característica de las membranas biológicas y han sido estudiados tanto en sistemas bacterianos como eucarióticos. En los microorganismos se conocen cinco mecanismos de transporte de azúcares mediados por acarreador, éstos pueden ser clasificados de acuerdo a la fuente energética acoplada en: difusión facilitada, sistema de transporte activo sensible a choque osmótico frío, sistema de transporte activo ligado con H^+ , cotransporte con Na^+ y el sistema de la fosfotransferasa. El primero es independiente de energía, en tanto que el segundo y el último están enlazados a la energía liberada por la hidrólisis de moléculas fosforiladas de alta energía; mientras que el sistema de transporte activo ligado a H^+ y el de cotransporte con Na^+ son dependientes de la diferencia de potencial electroquímico establecido a través de la membrana y generado por las reacciones de oxidoreducción que sufren las moléculas transportadoras que participan en la cadena de transporte de electrones.

102111465

INTRODUCCIÓN

Las microorganismos en su metabolismo realizan tanto a con-
distintas velocidades de transporte de los nutrientes con otras formas de vi-
da por la adaptación de los nutrientes a las necesidades de los organismos y para pre-
servar su estructura no solamente utilizan la osmolaridad, sino también la actividad
de la membrana celular. En los organismos eucariotas, la actividad de la membrana celular
está regulada por enzimas, hormonas, factores físicos, químicos, etc; mientras que en los
organismos procariotas, la actividad de la membrana celular está regulada por factores
nutritivos.

Sin embargo, cualquier que sea el mecanismo de transporte de nutrientes
se de nutrientes, estos materiales deben ser movilizados desde el medio ex-
terior hasta el citoplasma donde son metabolizados, pero la membrana plasmática
no es permeable a los nutrientes, por lo tanto, los nutrientes deben ser transportados
libre de ser absorbidos. Esta actividad es una actividad muy dinámica en
la entrada de nutrientes al como en la excreción de productos de desecho.
Para que este transporte ocurra, los microorganismos han desarrollado una
gran variedad de mecanismos de transporte mediante los cuales los solutos
son movilizados a un lado o al otro de la membrana según las necesidades de
la célula.

OBJETIVO

Con la aplicación de agentes físico-químicos pretendemos dilucidar
el mecanismo de transporte utilizado por *Saccharomyces cerevisiae* para cap-
tar glucosa.

FUNDAMENTO

Los procesos de transporte son una característica de las membranas
biológicas y han sido estudiados tanto en sistemas bacterianos como eucari-
otas. En los microorganismos se conocen cinco mecanismos de transporte de
solutos: mediante por acarreador, éstos pueden ser clasificados de acuerdo
a la fuente energética acoplada en difusión facilitada, sistema de trans-
porte activo sensible a choque osmótico frío, sistema de transporte activo
ligado con H^+ cotransporte con H^+ y el sistema de la fosfotransferasa. El
último es independiente de energía, en tanto que el segundo y el último
requieren a la energía libre que por la hidrólisis de moléculas como
ATP y GTP. Mientras que el sistema de transporte activo ligado
a H^+ y el de cotransporte con H^+ son dependientes de la diferencia de
potencial electroquímico establecido a través de la membrana y generado por
las reacciones de oxidoreducción que sufren las moléculas transportadas.
que participan en la cadena de transporte de electrones.

Del sistema de transporte enlazado a la translocación de H^+ se cono-
cen varios tipos como son los mecanismos simportador, antiportador y unipor-
tador.

El estudio de los sistemas de transporte ha involucrado herramientas
genéticas y bioquímicas como son el uso de cepas mutantes, compuestos anti-
metabolitos, reactivos con especificidad por grupos tiol proteicos, desaco-
plantes de la fosforilación oxidativa, agentes ionóforos, etc; disponiendo-
se hasta la fecha de información muy completa al respecto.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml
- 7 pipetas graduadas de 10 ml
- 9 pipetas graduadas de 5 ml
- 6 pipetas graduadas de 1 ml
- 1 gradilla
- 20 canicas
- 20 tubos de ensayo de 18 x 150 mm
- 20 tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- papel aluminio
- Centrífuga
- Baño de Hielo
- Baño de Agua
- Termómetro
- Vortex
- Espectrofotómetro
- Mechero, tripié y tela de asbesto
- 1 vaso de precipitados de 600 ml
- 1 palangana de plástico

Suspensión de levaduras: Lavar por centrifugación una porción adecuada de -
levaduras empleando agua destilada a pH=3.8, una-
vez que el sobrenadante esté claro resuspender el-
paquete celular al volumen original y preparar una
suspensión al 30% v/v.

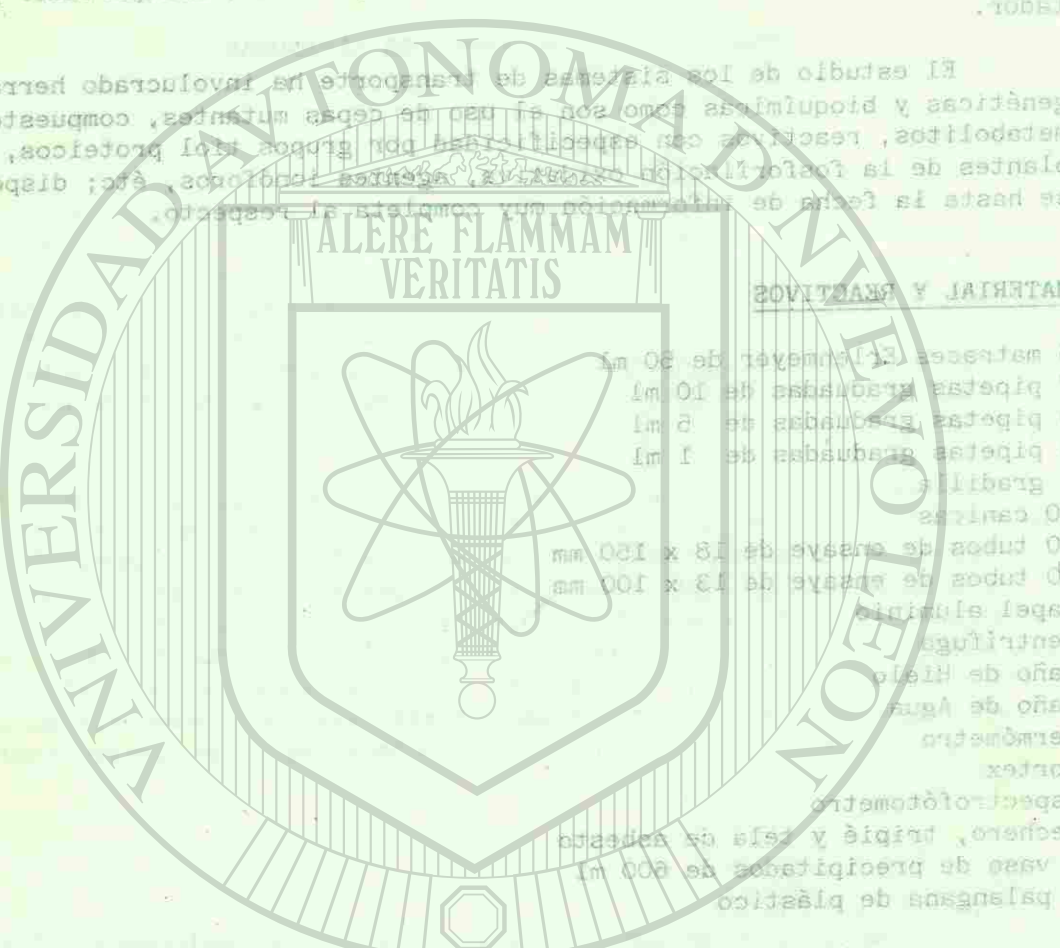
- 50 ml de Glucosa 4 mg/ml
- 300 ml de agua destilada ajustada a un pH=3.8 con ácido acético
- 10 ml de azida de sodio 3.3 mM
- 10 ml de 2,4 dinitrofenol 1 mM
- 10 ml de Cianuro de sodio 1 mM
- 80 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado
- 24 ml de sulfato de zinc al 10% y 24 ml de NaOH 0.5N

MÉTODOS

- 1.-Realizar una curva de calibración de glucosa por el método de la Antrona
empleando una solución patrón de azúcar de 100 mg/ml, el rango de concen-
tración deberá ser de 0 - 50 ug/ml.
- 2.-Preparar 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml como se indica en el siguiente -
cuadro:

Del sistema de transporte enlazado a la translocación de H⁺ se conocen varios tipos como son los mecanismos simportador, antiportador y unipor-
tador.

El estudio de los sistemas de transporte en involucrados herramientas genéticas y bioquímicas como son el uso de cepas mutantes, compuestos anti-
metabólicos, resacas con especificidad por genes tales como proteos, desace-
plantes de la fosforilación oxidativa, etc.; disponiendo se hasta la fecha de información que permita el estudio.



MATERIAL Y REACTIVOS

- 50 matraces Erlenmeyer de 50 ml
- 7 pipetas graduadas de 10 ml
- 8 pipetas graduadas de 5 ml
- 8 pipetas graduadas de 1 ml
- 1 gradilla
- 50 centenas
- 50 tubos de ensayo de 18 x 150 mm
- 50 tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- papel almidonado
- Centrifuga
- Baño de Hielo
- Baño de Agua
- Termómetro
- Vortex
- Espectrofotómetro
- Mezclador, trapío y tela de algodón
- 1 vaso de precipitados de 500 ml
- 1 palanquilla de plástico

Suspensión de levaduras: lavar por centrifugación una porción adecuada de levaduras empleando agua destilada a pH=3.8, una vez que el sobrenadante este claro resuspender el padure celular al volumen original y preparar una suspensión al 30% v/v.

- 50 ml de Dinitrofenol 1 mM
- 300 ml de agua destilada ajustada a un pH=3.8 con ácido acético
- 10 ml de azida de sodio 1 mM
- 10 ml de 2,4 dinitrofenol 1 mM
- 10 ml de Cianuro de sodio 1 mM
- 80 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico concentrado
- 24 ml de sulfato de zinc al 10% y 24 ml de NaOH 0.5N

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.- Realizar una curva de calibración de glucosa por el método de la Antrona empleando una solución patrón de azúcar de 100 mg/ml, el rango de concentración deberá ser de 0 - 50 ug/ml.

2.- Preparar 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml como se indica en el siguiente cuadro:

RESULTADOS

MATRAZ	LEVADURAS (ml)	H ₂ O pH 3.8 (ml)	Cianuro de sodio 1mM (ml)	Azida de Sodio 1mM (ml)	Dinitrofenol 1 mM (ml)	Temperatura (°C)
1	4	6	-	-	-	28
2	4	6	-	-	-	0*
3	4	-	6	-	-	28
4	4	-	-	6	-	28
5	4	-	-	-	6	28
6	4	16	-	-	-	28

- 3.- Adicionar a los primeros cinco matraces 10 ml de una solución fría de - glucosa 4 mg/ml, mezclar homogéneamente e incubar a las temperaturas in-
dicadas.
- 4.- A los 20, 40 y 60 minutos de incubación, tomar muestras de 3 ml de cada
matraz y depositarlas en tubos de ensayo de 13 x 100.
- 5.- Adicionar a los tubos 1.2 ml de NaOH 0.5 N y ZnSO₄ al 10%. Mezclar vigo-
rosamente y centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 6.- Para cada sobrenadante transferir 0.1 ml a un tubo de ensayo de 18 x -
150 mm y diluir a 2 ml con agua destilada y mezclar. En un tubo de en-
saye de 18 x 150 depositar 2 ml de agua destilada, éste servirá como --
blanco.
- 7.- Introducir todos los tubos en un baño de hielo durante 10 minutos.
- 8.- Sin sacar los tubos del baño de hielo, adicionar lentamente a cada uno-
4 ml de Antrona al 0.2% en ácido sulfúrico de manera que se estratifi-
que, y dejar reposar 10 minutos.
La capa superior deberá ser de un color blanco lechoso y la inferior amarilla,
si se desarrolla un color verde el tubo deberá descartarse.
- 9.- Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos empleando un Vortex y -
llevarlos inmediatamente a un baño de agua hirviente durante 10 minu-
tos.
- 10.- Enfriar los tubos en un baño de agua fría.
- 11.- Determinar la densidad óptica de cada solución empleando un espectro-
foto metro a una longitud de onda de 640 nm.
- 12.- Registre sus resultados.

RESULTADOS

1.- Anote los valores de densidad óptica exhibidos por las soluciones patrón empleadas para obtener la Curva de Calibración.

Concentración de glucosa (ug/ml)	D.O. ₆₄₀
0	
10	
20	
30	
40	
50	

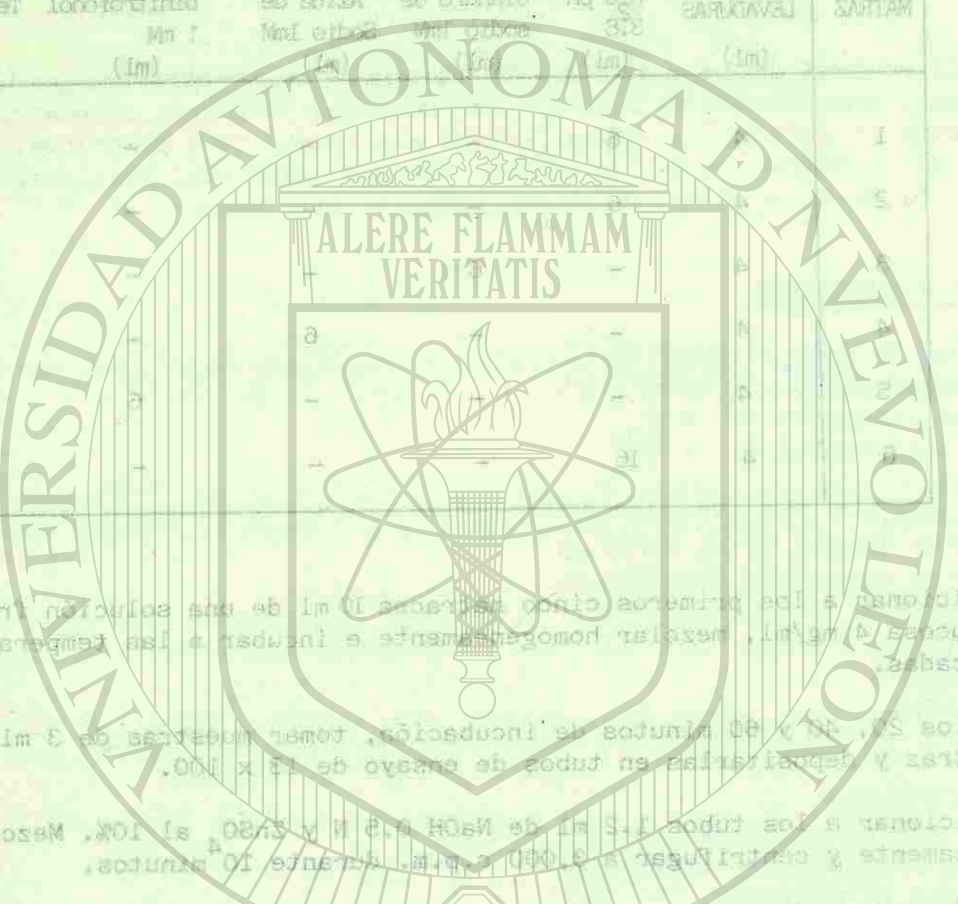
2.- Considerando como X a la concentración de glucosa y como Y a la densidad óptica, proporcione los datos solicitados en la tabla

X	Y	X ²	XY	Y ²
0	0	0	0	0
10		100		
20		400		
30		900		
40		1600		
50		2500		
$\Sigma X=150$	$\Sigma Y=$	$\Sigma X^2= 5500$	$\Sigma XY=$	$\Sigma Y^2=$

N=6

4.-Escriba la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan sus datos

Matraz	Leavadas	H.O. en el momento de Azida de	Unidad de Temperatura
(ml)	(ml)	(ml)	(°C)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			



1.- Registrar sus resultados.

2.- Determinar la densidad óptica de cada solución empleando un espectrófotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

3.- Entrar los tubos en un baño de agua fría.

4.- Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos empleando un vortex y dejar reposar a un baño de agua ambiente durante 10 minutos.

5.- Mezclar vigorosamente el contenido de los tubos empleando un vortex y dejar reposar a un baño de agua ambiente durante 10 minutos.

6.- En cada tubo de ensayo de 18 x 150 mm depositar 2 ml de agua destilada, este servirá como blanco.

7.- Añadir a los tubos de ensayo de 18 x 150 mm 2 ml de agua destilada y mezclar.

8.- Para cada concentración preparar 0.1 ml de un tubo de ensayo de 18 x 150 mm y diluir a 2 ml con agua destilada y mezclar.

9.- Añadir a los tubos de ensayo de 18 x 150 mm 2 ml de agua destilada y mezclar.

10.- Registrar los resultados.

3.- Someta los datos a regresión lineal para encontrar la ecuación de la línea recta al cual se ajustan. Utilice las ecuaciones siguientes:

$$\text{Intersecto} = b = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$\text{Pendiente} = m = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Ecuación de la Línea Recta: $Y = mX + b$

CALCULOS	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

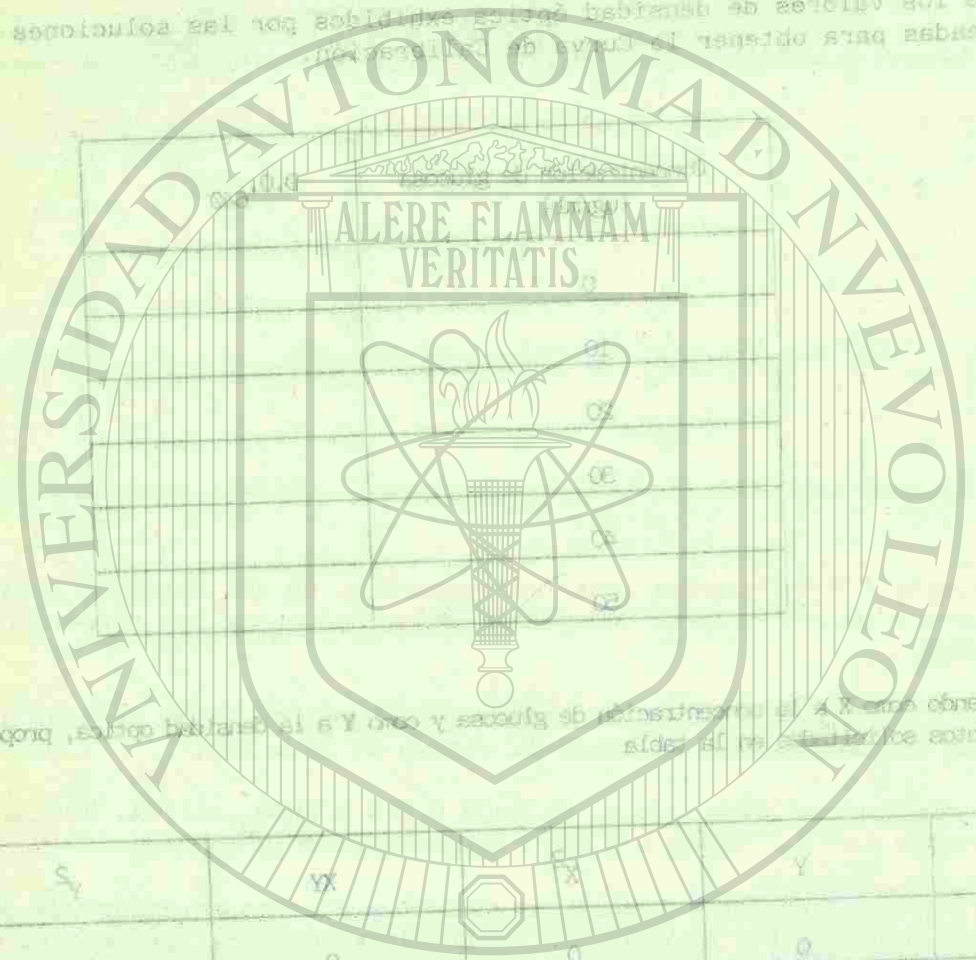
Con la ecuación de la línea recta obtenida, haga los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los ensayos. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que sufrió su muestra (35).

CALCULOS

4.-Escribe la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan tus datos

RESULTADOS

1.- Anote los valores de densidad óptica obtenidos por las soluciones patrón empleadas para obtener la curva de calibración.



2.- Considerando como X a la concentración de glucosa y como Y a la densidad óptica, proporcione los datos obtenidos en la tabla.

X	Y
0	0
10	0.001
20	0.002
30	0.003
40	0.004
50	0.005
60	0.006
70	0.007
80	0.008
90	0.009
100	0.010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.- Someta los datos a regresión lineal para encontrar la ecuación de la línea recta al cual se ajustan. Utilice las ecuaciones siguientes:

$$\text{Intersecto} = b = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$\text{Pendiente} = m = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

Ecuación de la Línea Recta: $Y = mX + b$

CALCULOS	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

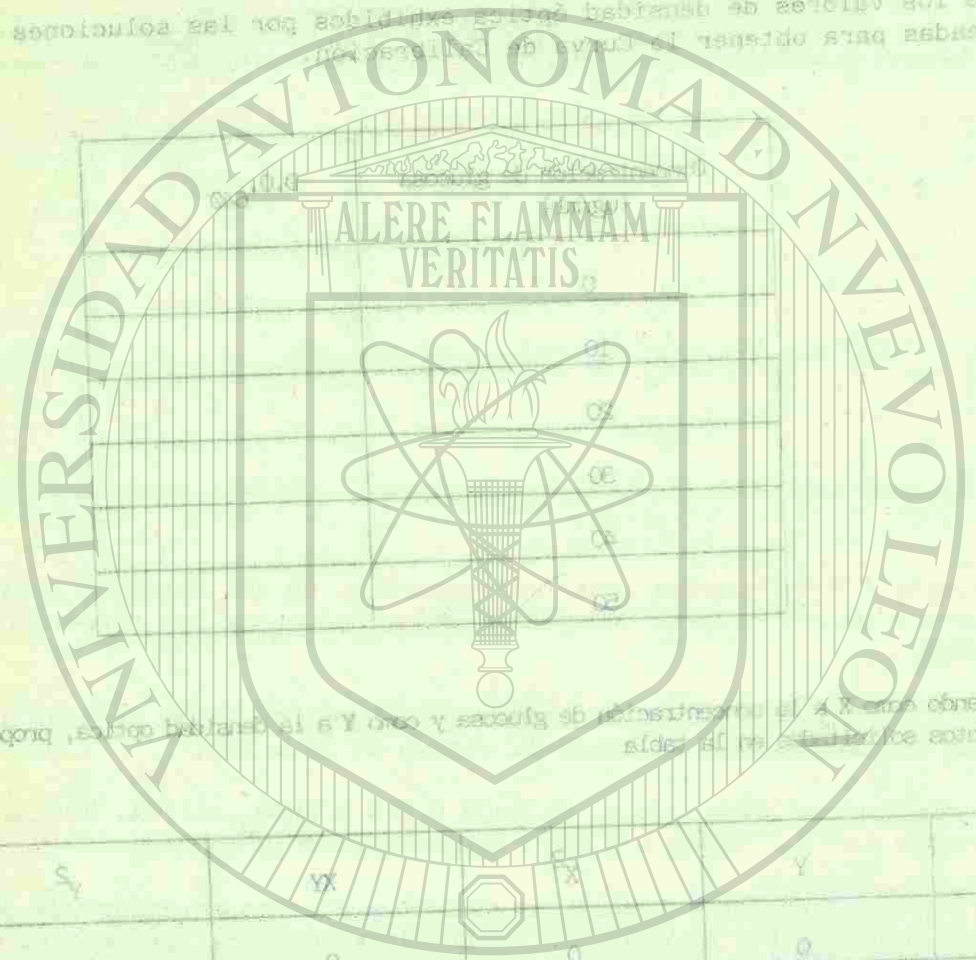
Con la ecuación de la línea recta obtenida, haga los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los ensayos. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que sufrió su muestra (35).

CALCULOS

4.-Escribe la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan tus datos

RESULTADOS

1.- Anote los valores de densidad óptica obtenidos por las soluciones patrón empleadas para obtener la curva de calibración.



X	Y
0	0
10	0
20	0
30	0
40	0
50	0
60	0
70	0
80	0
90	0
100	0

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



5.-Escriba en la tabla los valores de absorbancia obtenidos en sus ensayos

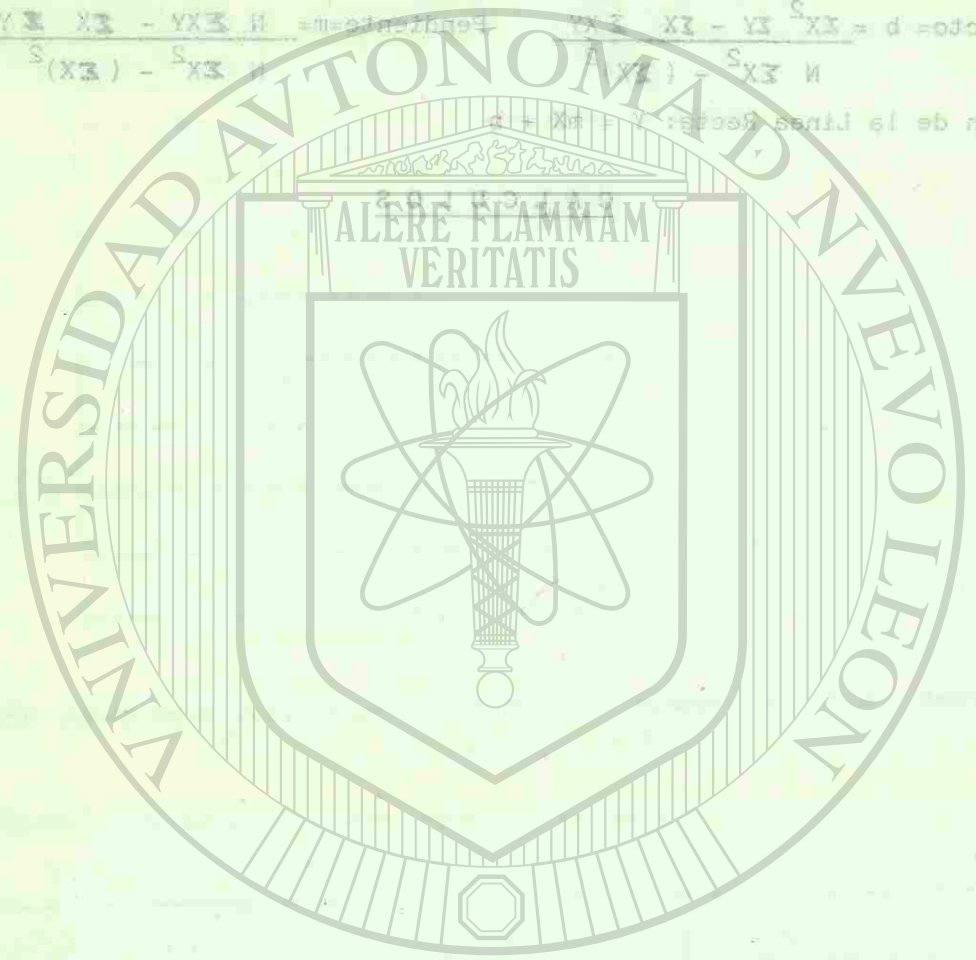
M A T R A Z	D.O. ₆₄₀ registradas a los		
	20 min	40 min	60 min
1			
2			
3			
4			
5			
6			

6.-Con la ecuación de la línea recta obtenida, haga los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los matraces. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que sufrió su muestra (36).

C A L C U L O S

7.- Anote en la tabla los datos anteriores

MATRAZ	Concentración residual de glucosa (mg/ml)		
	20 minutos	40 minutos	60 minutos
1			
2			
3			
4			
5			
6			

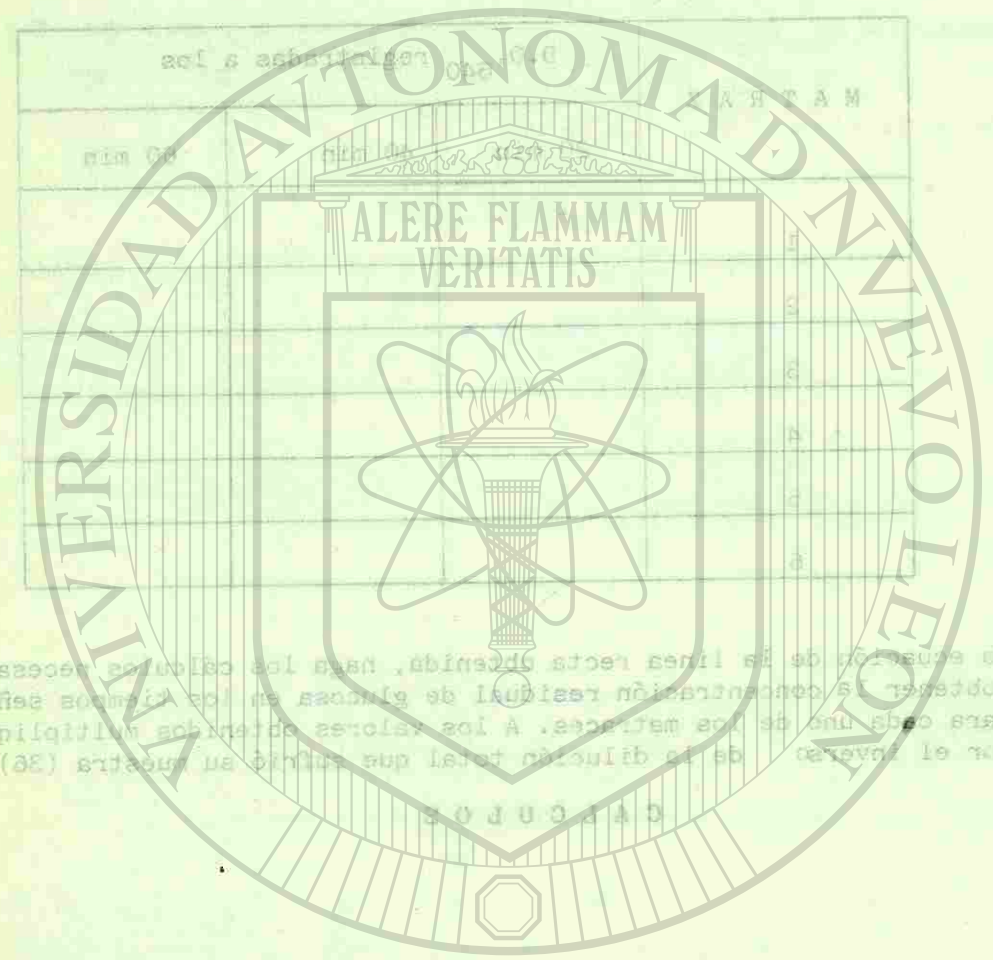


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.-Escriba la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan sus datos

3.-Escriba en la tabla los valores de absorbancia obtenidos en sus ensayos



8.-Con la ecuación de la línea recta obtenida, para los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los matraces. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que existe en el matraz (36).

8.- En la hoja de datos se debe registrar el tiempo que transcurre desde el momento en que se comienza a medir la absorbancia hasta el momento en que se termina de medir la absorbancia. Este tiempo se debe registrar en la columna correspondiente de la tabla.

9.- Con la ecuación que se obtuvo en el punto anterior, para los cálculos necesarios para obtener la concentración residual de glucosa en los tiempos señalados para cada uno de los matraces. A los valores obtenidos multiplíquelos por el inverso de la dilución total que existe en el matraz (36).

Concentración residual de glucosa (mg/ml) en los tiempos señalados para cada uno de los matraces.

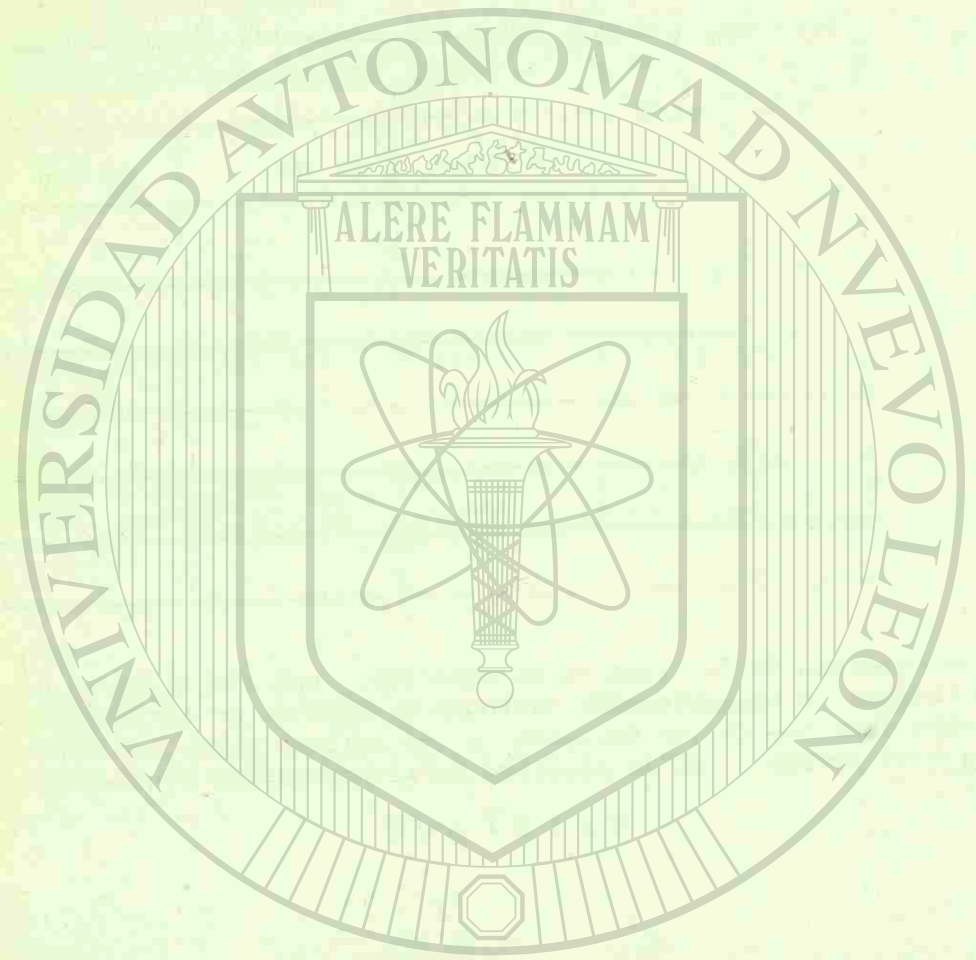
U A N L

7.- Anote en la tabla los datos anteriores

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATRAZ	Concentración residual de glucosa (mg/ml)		
	20 minutos	40 minutos	60 minutos
1			®
2			
3			
4			
5			
6			



V. - Anote en la tabla los datos siguientes

Matraz	Concentración residual de glucosa (mg/ml)	50 minutos	40 minutos	30 minutos
1				
2				
3				
4				
5				
6				

8.- En la hoja de papel milimétrico, construya una figura graficando en las abscisas el tiempo en minutos, y en las ordenadas la concentración residual de glucosa en mg/ml. Rotule adecuadamente su figura y utilice símbolos distintos para cada ensayo.

9.- Con la ecuación que proporcionamos enseguida, calcule el porcentaje de inhibición del transporte de glucosa registrados a los diferentes tiempos bajo las condiciones utilizadas.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Concentración residual de glucosa en el matraz 2} - \text{Concentración residual de glucosa en el matraz 1}}{\text{Concentración residual de glucosa en el matraz 1}} \times 100$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

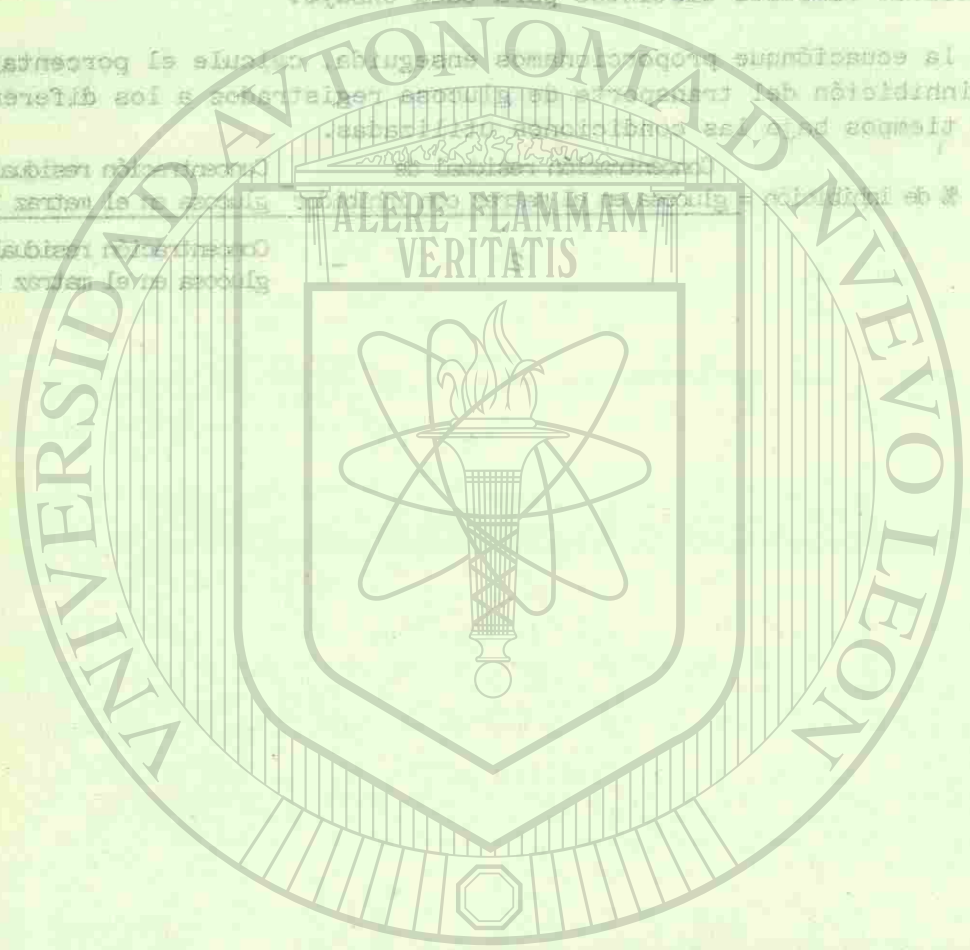
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



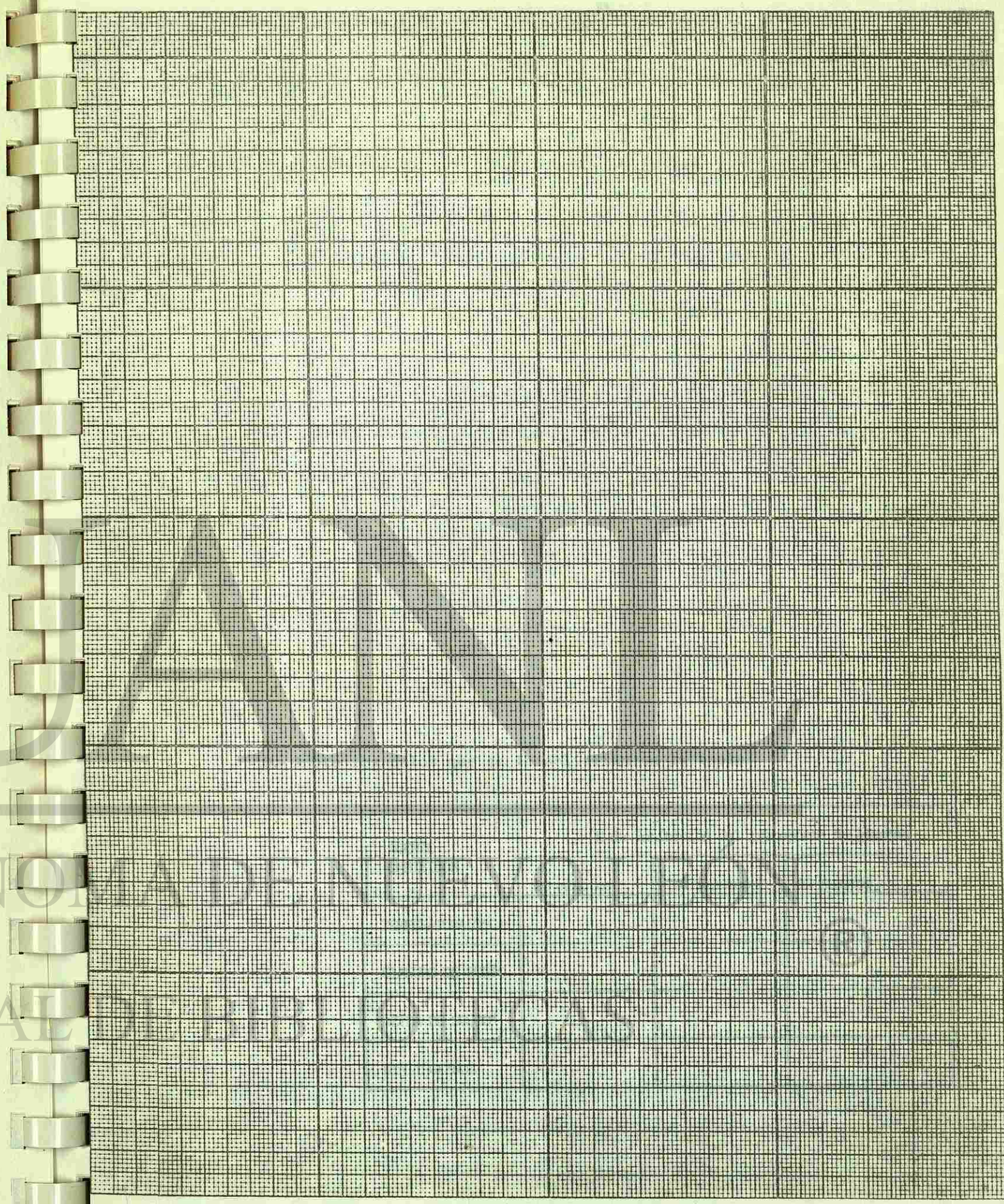
8.- En la hoja de papel milimétrico, construya una figura graficando en las abscisas el tiempo en minutos, y en las ordenadas la concentración residual de glucosa en mg/ml. Retine adecuadamente su figura y utilice símbolos distintos para cada ensayo.

9.- Con la ecuación que proporcione en cada punto, calcule el porcentaje de inhibición de la enzima en las reacciones a los diferentes tiempos para las reacciones indicadas.

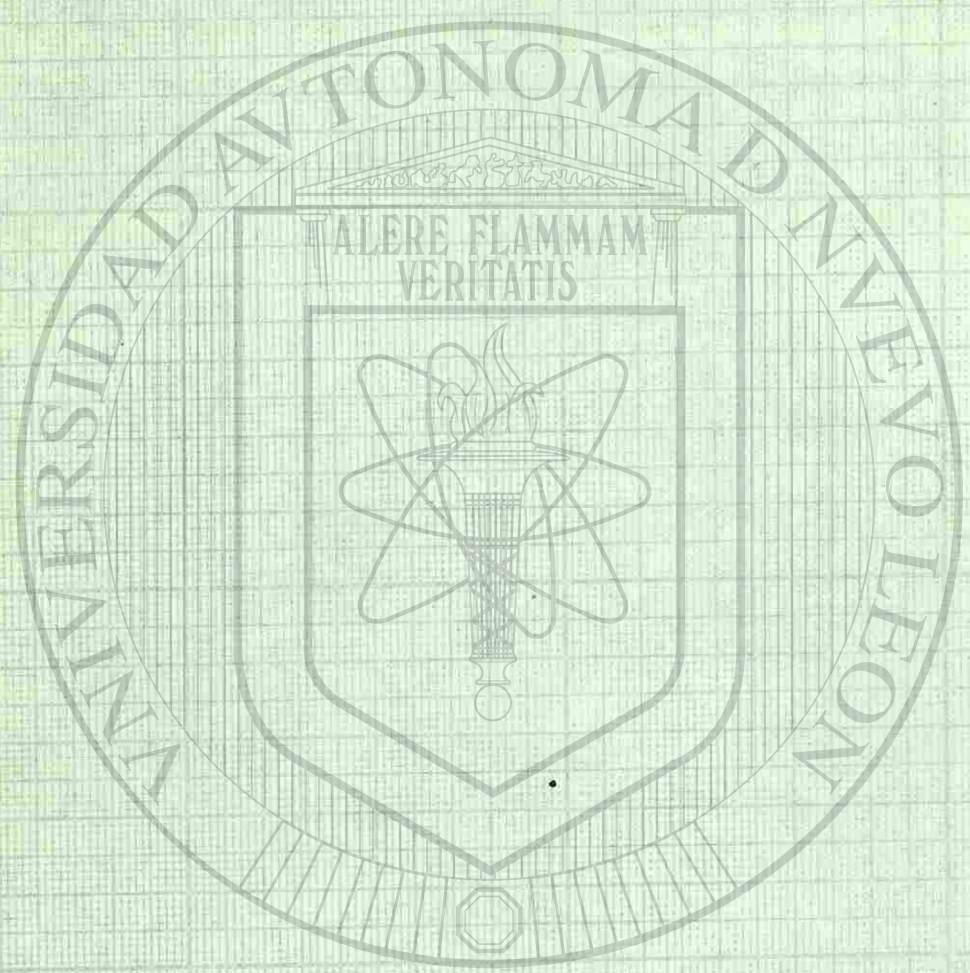
Construya el gráfico de la actividad enzimática en función del tiempo para las reacciones I y II. Indique en el eje de las abscisas el tiempo en minutos y en el eje de las ordenadas la actividad enzimática en unidades por hora.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



DISCUSION

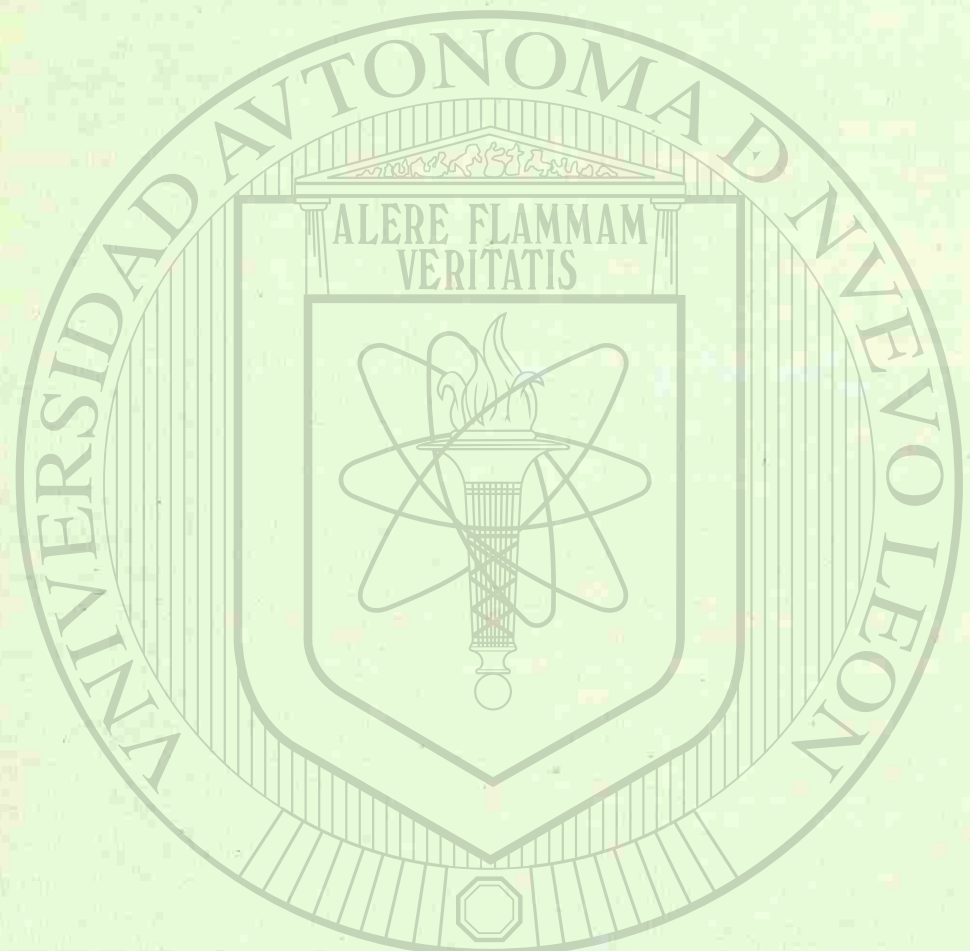


U A N L

10.- Anote los datos que se le solicitan en la tabla:

AGENTE INHIBIDOR	% de inhibición del transporte de glucosa		
	20 minutos	40 minutos	60 minutos
TEMPERATURA(0°C)			®
CIANURO DE SODIO			
AZIDA DE SODIO			
DINITROFENOL			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



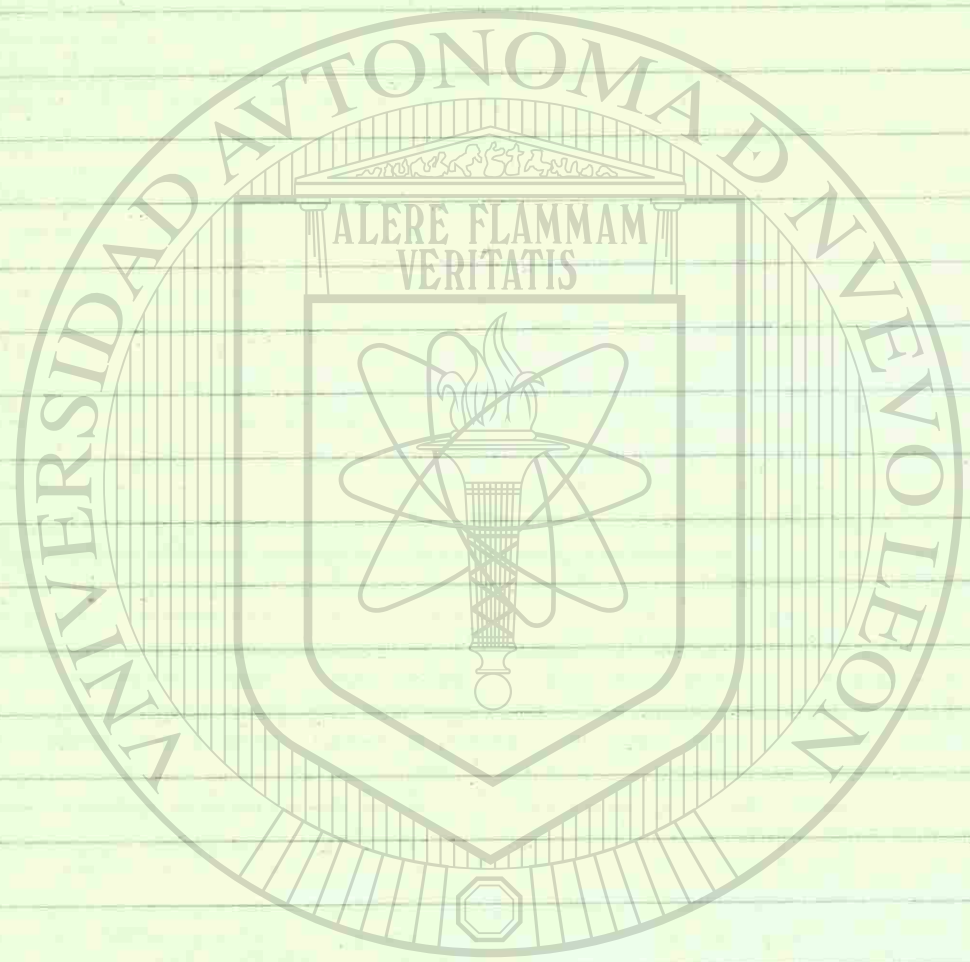
10.- Anexe los datos que se le solicitan en la tabla:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN	
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS	

DISCUSION

Handwritten notes and lines for discussion.

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRÁCTICA No. 7

ASELAMIENTO DE TIENDAS A PARTIR DE ENZIMAS

OBJETIVO

El propósito fundamental de esta práctica es conocer la técnica de asealamiento de tiendas a partir de enzimas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dills, S.S., A. Apperson., M.R. Schmidt., M.H. Saier. 1980. Carbohydrate Transt in bacteria. Microbiological Reviews. 44 (3): 385-418.
- 2.- Dimler, R.J. y W.C. Shasfer. 1952. Anal. Chem. 124:1411
- 3.- Harold, F.M. 1972. Conservation and Transformation of Energy by Bacterial Membranes. Bacteriological Reviews. 36 (2): 172-230.
- 4.- Parada, J.L., M.V. Ortega y G. Carrillo. 1973. Biochemical and Genetic Characteristics of the C₄-Dicarboxylic acids transport systems of Salmonella typhimurium. Arch. Mikrobiol. pp 1-12.
- 5.- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1986. Microbiología. Ediciones Repla, S.A. versión española de la 4a edición en ingles. pp:279-284.

El propósito fundamental de esta práctica es conocer la técnica de asealamiento de tiendas a partir de enzimas.

FUNDAMENTO

La fructosa 1,6-bis-fosfato (F-1,6-bis-P) es un disacárido homogéneo, no reductor, descubierta en el cuerpo de los animales superiores, hemolinfa de insectos, capullo de mariposa y células del género Laminaria, y también ocurre en hongos como Aspergillus niger.

Este disacárido de reserva fue aislado por Koch y Koch en 1825 a partir de levaduras, y más tarde por Stewart y colaboradores, a partir de la misma fuente. Estructuralmente este disacárido consiste de dos unidades de D-glucosa unidas mediante un enlace glucosídico α 1-6 y posee un poder reductor [9].

PRACTICA No. 7 preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le agregan las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con alcohol de etanol pesados y calor, los cristalizamos por enfriamiento y se identifican los componentes constituyentes.

AISLAMIENTO DE TREHALOSA A PARTIR DE LEVADURAS

INTRODUCCION

MATERIA: La examinación microscópica de los microorganismos ha revelado que éstos depositan en citoplasma sustancias que pueden considerarse como materiales de reserva. Tales depósitos se acumulan cuando en el medio está presente la fuente de carbono pero el crecimiento se halla impedido ya sea por la carencia de un nutriente o por la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento; bajo estas condiciones, los organismos manifiestan su capacidad de acumular la fuente de carbono en forma de polímeros osmoticamente inertes e insolubles en agua, que cumplen un papel como sustancias de reserva.

Cuando la fuente de carbono escasea, pero el nutriente faltante es aportado al medio de crecimiento, el microorganismo metaboliza las sustancias de reserva para obtener la energía que apoye su crecimiento o bien las emplea para fabricar esporas; en ambos casos logra prolongar su viabilidad en ausencia de fuentes externas de energía.

Las inclusiones de reserva formadas por un microorganismo dependen de las actividades metabólicas del propio organismo, su estado funcional así como del tipo de medio. Entre las inclusiones de reserva que han sido detectadas en las bacterias podemos citar a los gránulos de glicógeno, gotas de lípidos, gotas de azufre, gránulos metacrómicos y gránulos decianoficina. Por otra parte, las levaduras y los hongos acumulan depósitos de glicógeno, trehalosa, grasas neutras y polifosfatos.

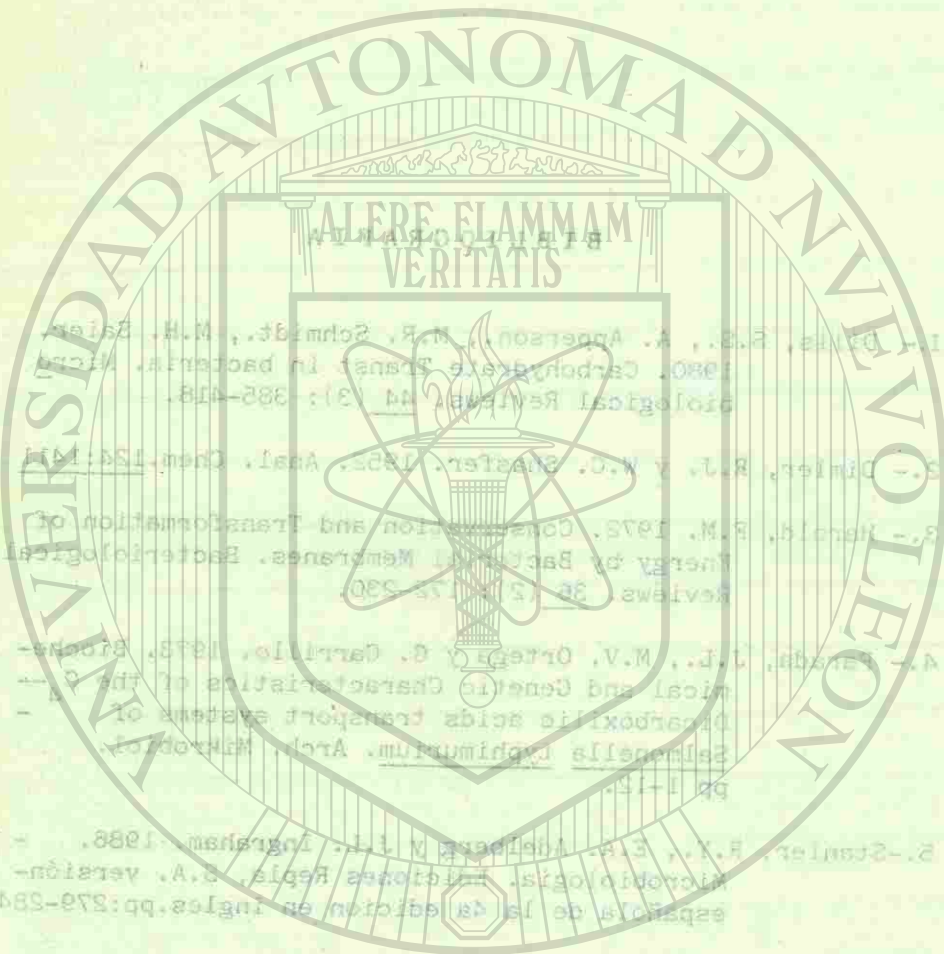
OBJETIVO

El propósito fundamental de esta práctica es aislar la trehalosa a partir de levaduras y caracterizarla parcialmente.

FUNDAMENTO

La trehalosa (1-0-(α -D-glucopiranosil)- α -D-glucopiranososa) es un disacárido homogéneo, no reductor, descubierto en el cornezuelo del arroz a principios del siglo pasado. Ha sido aislado a partir de plantas superiores, hemolinfa de insectos, capullos de escarabajos parásitos del género *Larinus*, y también ocurre en hongos como *Amanita muscaria*.

Este disacárido de reserva fue aislado por Koch y Koch en 1925 a partir de levaduras, y más tarde por Stewart y colaboradores, a partir de la misma fuente. Estructuralmente este disacárido consiste de dos unidades de α -D-glucosa unidas mediante un enlace glucosídico α 1---1 y posee un poder rotatorio $[\alpha]_D^{20} = +178^\circ$.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El aislamiento de trehalosa consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor, la cristalización se logrará adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Levadura de panadería
- 2 vasos de precipitados de 600 ml
- 2 vasos de precipitados de 250 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 2 pipetas de 10 ml
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 varilla de vidrio
- 1 matraz Kitasato
- 1 embudo Büchner
- 1 manguera
- papel filtro
- 1 tapón monohoradado
- 1 frasco Gerber
- 1 barra magnética
- 1 base magnética
- 1 potenciómetro
- 1 mechero, tripié, tela de asbesto
- 400 ml de alcohol etílico al 95%
- 50 ml de HCL 0.1N
- 50 ml de fenoltaleína
- 200 ml de una solución saturada de Ba(OH)₂
- 1 gramo de celite
- 1 gramo de carbón activado
- 90 ml de alcohol etílico al 70%
- 20 ml de ZnSO₄ al 20%
- 1 cuarto frío

MÉTODOS

- 1.- En un vaso de precipitados de 600 ml, colocar 32 gramos de levadura de panadería y adicionar 68 ml de agua destilada.
- 2.- Preparar una suspensión agitando con una varilla de vidrio.
- 3.- Añadir 250 ml de alcohol etílico al 95%.
- 4.- Depositar dentro de la suspensión una barra magnética.
- 5.- Colocar el vaso de precipitados sobre una base magnética y someter a agitación durante 30 minutos.

AISLAMIENTO DE TREHALOSA A PARTIR DE LEVADURAS

INTRODUCCION

La extracción de trehalosa de levaduras se realiza mediante un procedimiento que consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor, la cristalización se logrará adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

El aislamiento de trehalosa consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor, la cristalización se logrará adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensayará su capacidad reductora y se identificarán los monómeros constituyentes.

OBJETIVO

El propósito fundamental de esta práctica es aislar la trehalosa a partir de levaduras y caracterizarla parcialmente.

FUNDAMENTO

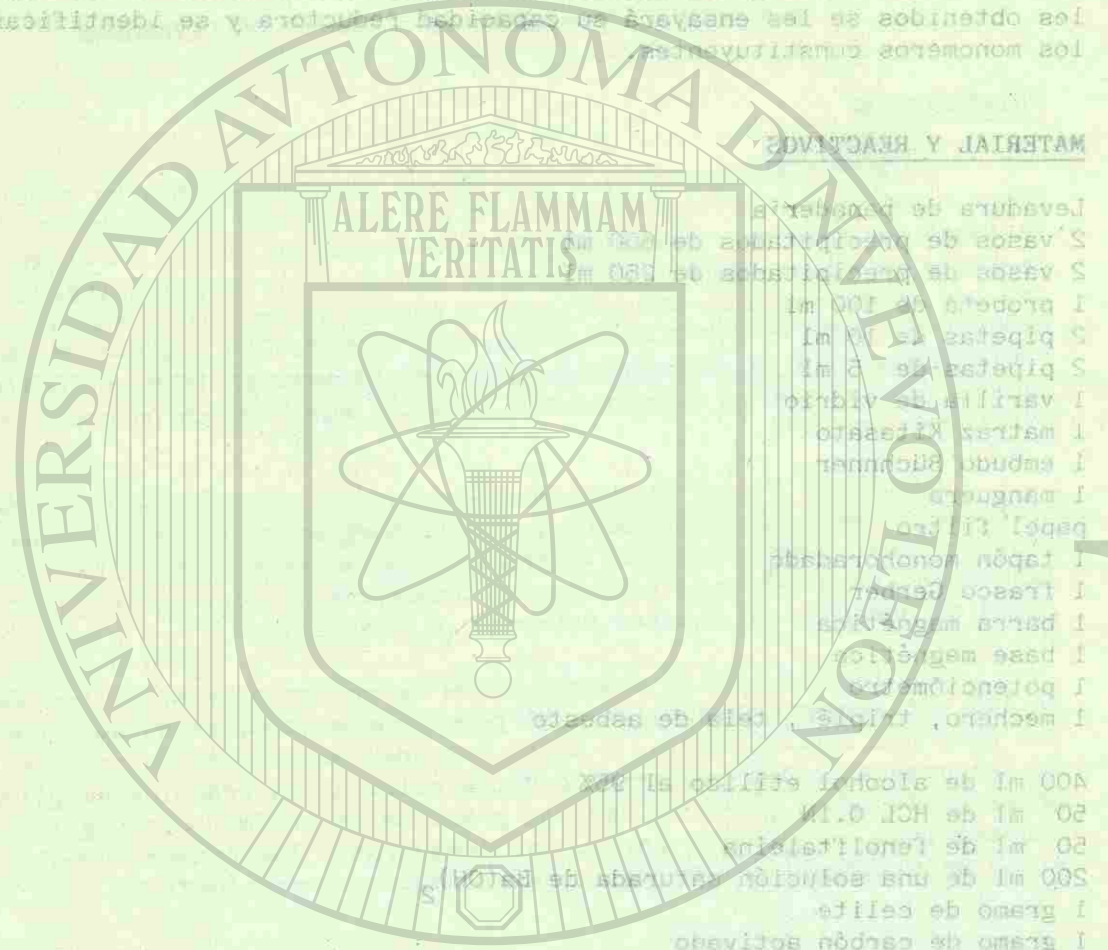
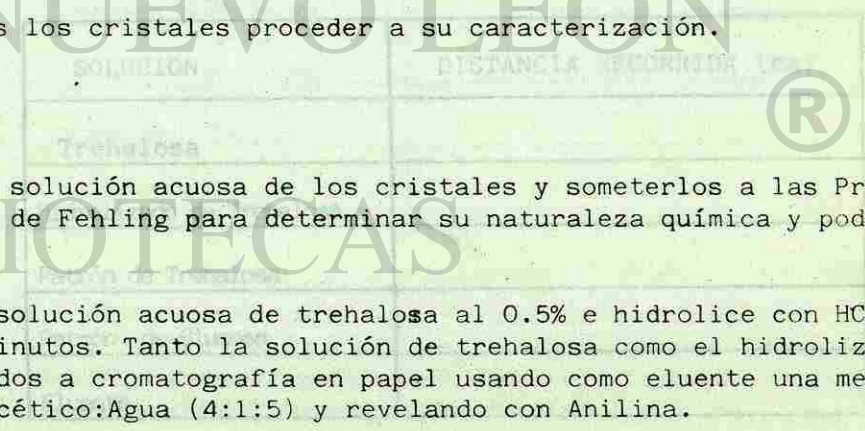
La trehalosa (1-0- α -D-glucopiranosil)- α -D-glucopiranosil) es un disacárido homogéneo, no reductor, descubierto en el cono de nieve por un principio del siglo pasado. Ha sido aislado a partir de plantas superiores, hongos de levadura, capullos de escarabajos parásitos del género larinas, y también ocurre en hongos como *Aspergillus muscaria*.



- 6.-Dejar reposar durante 10 minutos. Filtrar a través de un embudo Büchner, procurando transferir primero el sobrenadante claro y después el sedimento. Ayudese con una varilla de vidrio.
- 7.-Guardar el filtrado. Lavar el residuo que quedó en el papel filtro, con tres porciones de 30 ml de alcohol etílico al 70%. Conservar los lavados.
- 8.-Combinar los lavados con el filtrado original en un vaso de precipitados de 600 ml.
- 9.-Añadir 20 ml de $ZnSO_4$ al 20%, 1 ml de Fenolftaleína al 1% y suficiente solución saturada de $Ba(OH)_2$, hasta que la suspensión tome un color rosa permanente.
- 10.-Luego adicionar 2 gramos de carbón activado y calentar la mezcla a $70^\circ C$ durante 15 minutos, con agitación constante.
- 11.-Dejar en reposo durante 10 minutos sin retirarlo del fuego, y luego filtrar en caliente a través de un embudo Büchner procurando que el papel filtro esté recubierto de celite.
- 12.-Transferir el filtrado claro a un vaso de precipitados de 600 ml y ajustar el pH a 7 con HCl 0.1N.
- 13.-Concentrar la solución hasta un volumen de 10 ml. Para ello caliente al mechero agitando constantemente la solución con una varilla de vidrio para evitar que se derrame el contenido del vaso.
- 14.-Llevar el concentrado a un frasco Gerber y mantenerlo en baño de hielo.
- 15.-Adicionar lentamente 80 ml de etanol al 95% frío y mezclar suavemente.
- 16.-Dejar en refrigeración durante una semana para permitir la cristalización de la trehalosa.
- 17.-Recolectar los cristales, para ello primero elimine el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta Pasteur, y luego dejar evaporar el alcohol residual, a temperatura ambiente.
- 18.-Una vez secos los cristales proceder a su caracterización.

CARACTERIZACION

- 1.-Preparar una solución acuosa de los cristales y someterlos a las Pruebas de Molisch y de Fehling para determinar su naturaleza química y poder reductor.
- 2.-Prepare una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidrolize con HCl 1N durante 20 minutos. Tanto la solución de trehalosa como el hidrolizado serán sometidos a cromatografía en papel usando como eluyente una mezcla de Butanol:Acético:Agua (4:1:5) y revelando con Anilina.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El aislamiento de trehalosa consiste en preparar un extracto alcohólico de levaduras, al cual se le remueven las proteínas y los ácidos nucleicos mediante tratamiento con sales de metales pesados y calor. La cristalización se logra adicionando etanol al 95% frío. A los cristales obtenidos se les ensaya su capacidad reductora y se identifican los monómeros constituyentes.

MATERIAL Y REACTIVOS

Levadura de levadura
2 vasos de precipitados de 600 ml
2 vasos de precipitados de 600 ml
1 pipeta de 100 ml
2 pipetas de 10 ml
2 pipetas de 5 ml
1 varilla de vidrio
1 matraz Erlenmeyer
1 embudo Büchner
1 manguera
papel filtro
1 tapón neopreno
1 frasco Gerber
1 barra magnética
1 base magnética
1 potenciómetro
1 mechero, celite, tela de asbesto

400 ml de alcohol etílico al 70%
50 ml de HCl 0.1N
50 ml de fenolftaleína
500 ml de una solución saturada de $Ba(OH)_2$
1 gramo de celite
1 gramo de carbón activado
50 ml de alcohol etílico al 70%
50 ml de $ZnSO_4$ al 20%
1 cubete frío

MÉTODOS

- 1.- En un vaso de precipitados de 600 ml, colocar 35 gramos de levadura de panadería y adicionar 80 ml de agua destilada.
- 2.- Preparar una suspensión agitando con una varilla de vidrio.
- 3.- Añadir 250 ml de alcohol etílico al 70%.
- 4.- Depositar dentro de la suspensión una barra magnética.
- 5.- Colocar el vaso de precipitados sobre una base magnética y someter a agitación durante 30 minutos.

Para establecer la identidad de los productos de hidrólisis de la trehalosa, emplee como patrón soluciones de glucosa y trehalosa.

3.- Haga una observación al microscopio de los cristales obtenidos.

RESULTADOS

1.-En la siguiente tabla anote los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas.

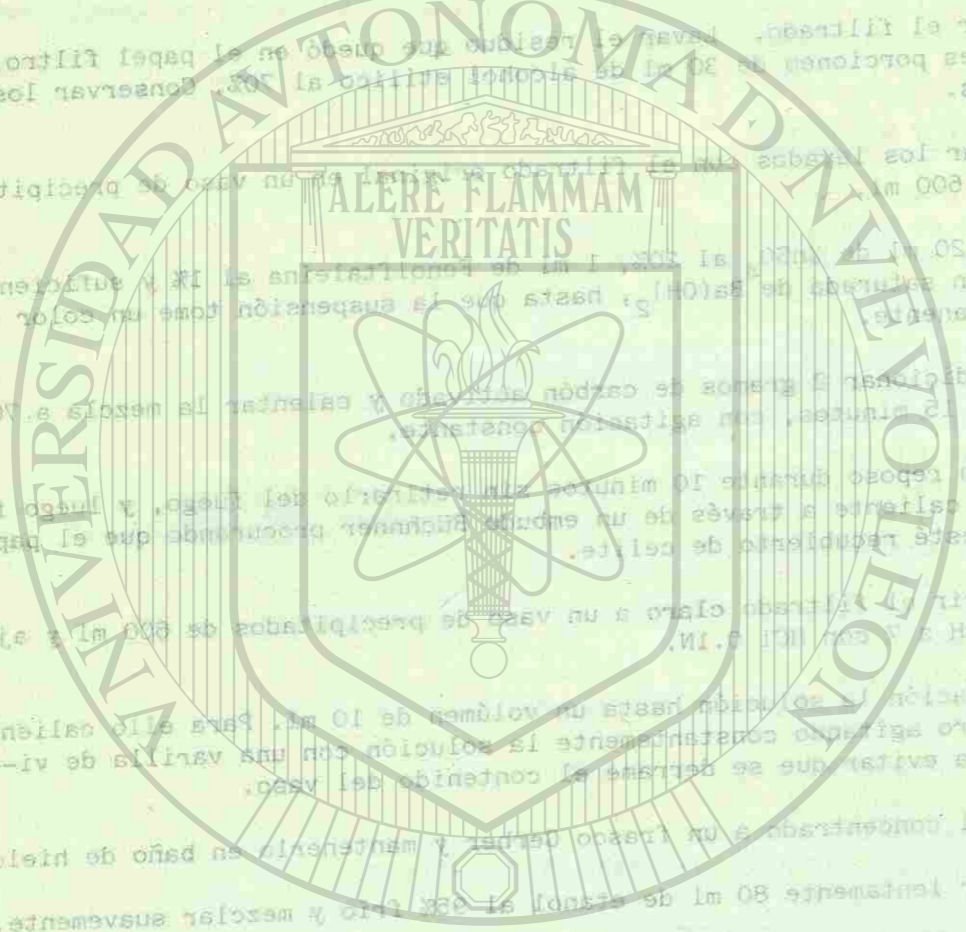
SOLUCION	PRUEBA DE MOLISCH	PRUEBA DE FEHLING
Trehalosa obtenida		
Hidrolizado de Trehalosa		
Trehalosa pura		
Agua destilada		

2.- Dibuje los cristales de trehalosa, y comente sobre sus características

3.-En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por las manchas desarrolladas en su cromatograma.

SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa	
Hidrolizado de Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	
Patrón de Glucosa	
Eluente	

6.-Dejar reposar durante 10 minutos. Filtrar a través de un embudo Büchner...
7.-Guardar el filtrado...
8.-Combinar las lavadas...
9.-Añadir 20 ml de alcohol...
10.-Luego adicionar 2 gramos de carbon activado...
11.-Dejar en reposo durante 10 minutos...
12.-Transferir el filtrado claro a un vaso de precipitados de 500 ml...
13.-Concentrar...
14.-Llevar el concentrado a un frasco de vidrio y mantenerlo en baño de hielo...
15.-Adicionar lentamente 80 ml de etanol al 95% frío y mezclar suavemente...
16.-Dejar en refrigeración durante una semana para permitir la cristalización...
17.-Recoger los cristales...
18.-Una vez secos los cristales proceder a su caracterización.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.-Prepara una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidroliza con HCl 1N durante 30 minutos...
3.-Prepara una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidroliza con HCl 1N durante 30 minutos...
4.-Prepara una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidroliza con HCl 1N durante 30 minutos...
5.-Prepara una solución acuosa de trehalosa al 0.5% e hidroliza con HCl 1N durante 30 minutos...

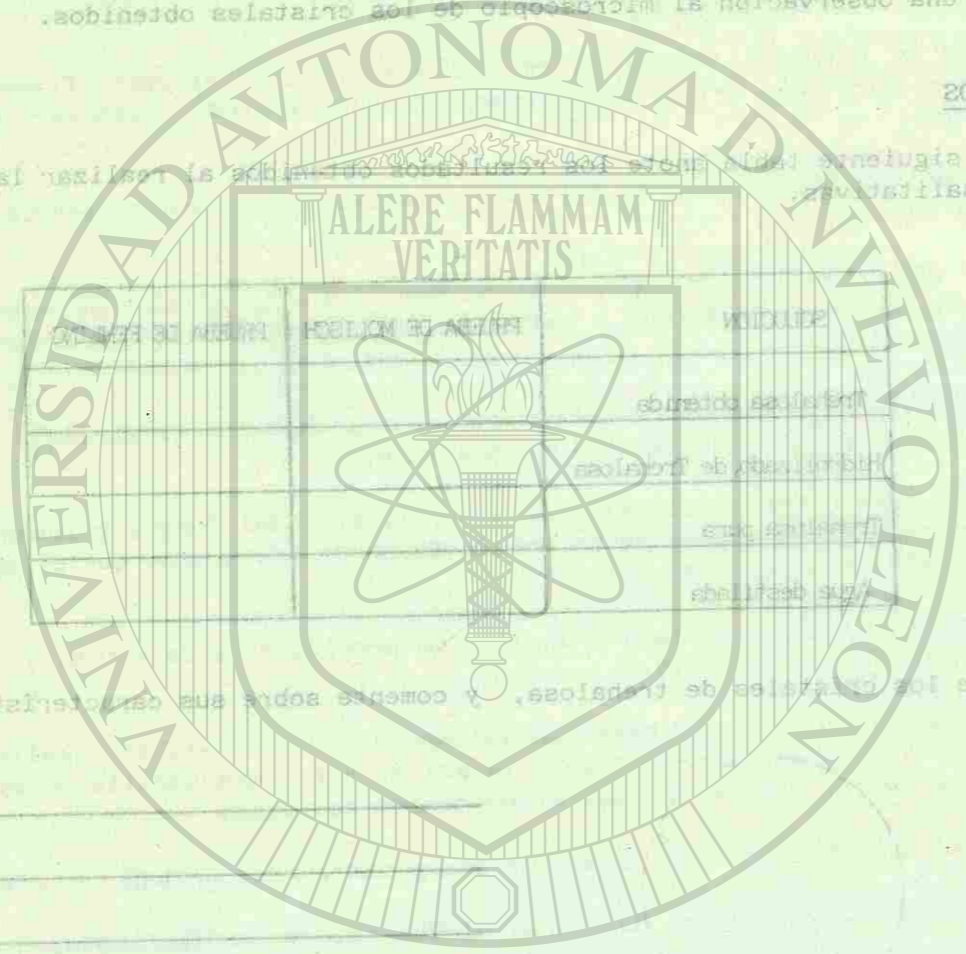
4.- Calcule los Rf's de cada una de las manchas que aparecieron en su cromatograma.

CALCULOS

5.-En la siguiente tabla anota los valores de Rf obtenidos.

SOLUCION	Rf
Trehalosa obtenida	
Hidrolizado de trehalosa	
Patrón de trehalosa	
Patrón de Glucosa	

6.-En la siguiente hoja anexe el cromatograma obtenido o bien una fotocopia del mismo.



RESULTADOS

3.- Haga una observación al microscopio de los cristales obtenidos. Para establecer la identidad de los productos de hidrólisis de la trehalosa, emplee como patrón soluciones de glucosa y trehalosa.

1.- En la siguiente tabla anote los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas.

2.- Dibuje los cristales de trehalosa, y comente sobre sus características.

3.- En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por las manchas de trehalosa en su cromatograma.

SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa	
Hidrolizado de Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	
Patrón de Glucosa	
Eluente	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

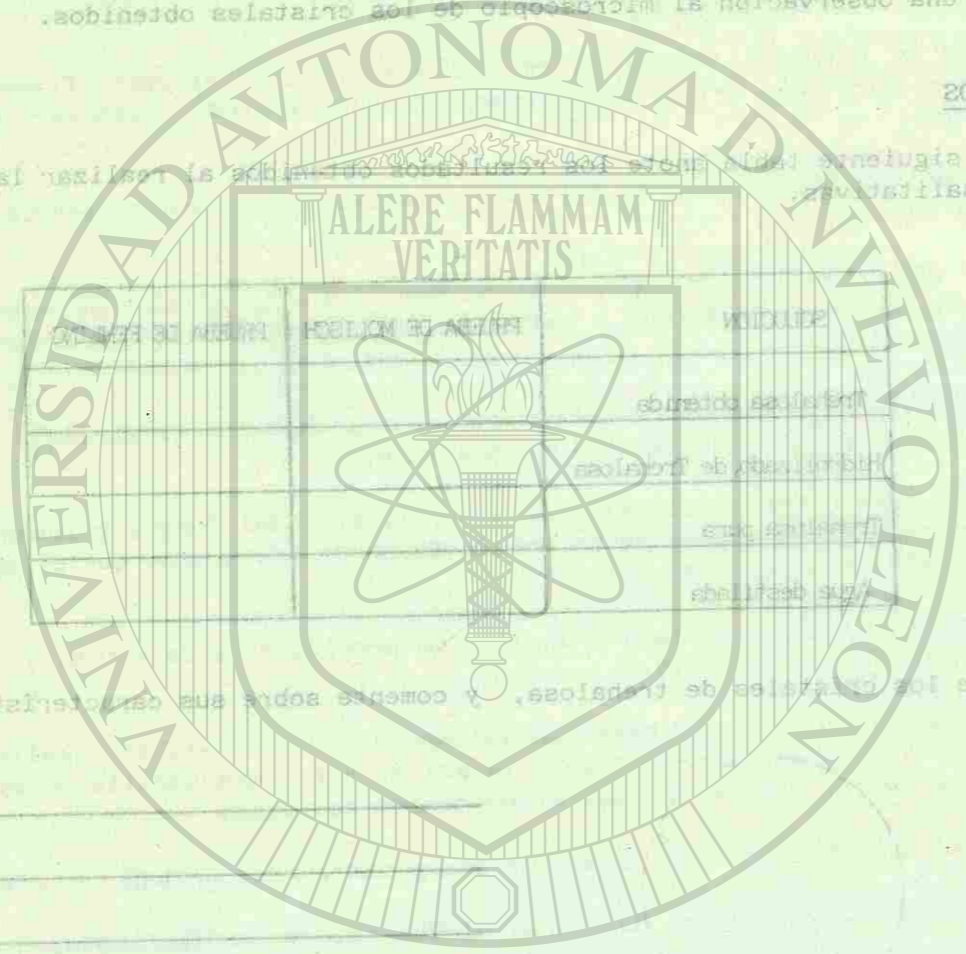
4.- Calcule los Rf's de cada una de las manchas que aparecieron en su cromatograma.

CALCULOS

5.-En la siguiente tabla anota los valores de Rf obtenidos.

SOLUCION	Rf
Trehalosa obtenida	
Hidrolizado de trehalosa	
Patrón de trehalosa	
Patrón de Glucosa	

6.-En la siguiente hoja anexe el cromatograma obtenido o bien una fotocopia del mismo.



RESULTADOS

3.- Haga una observación al microscopio de los cristales obtenidos. Para establecer la identidad de los productos de hidrólisis de la trehalosa, emplee como patrón soluciones de glucosa y trehalosa.

1.- En la siguiente tabla anote los resultados obtenidos al realizar las pruebas cualitativas.

2.- Dibuje los cristales de trehalosa, y comente sobre sus características.

3.- En la siguiente tabla anote las distancias recorridas por las manchas de trehalosa en su cromatograma.

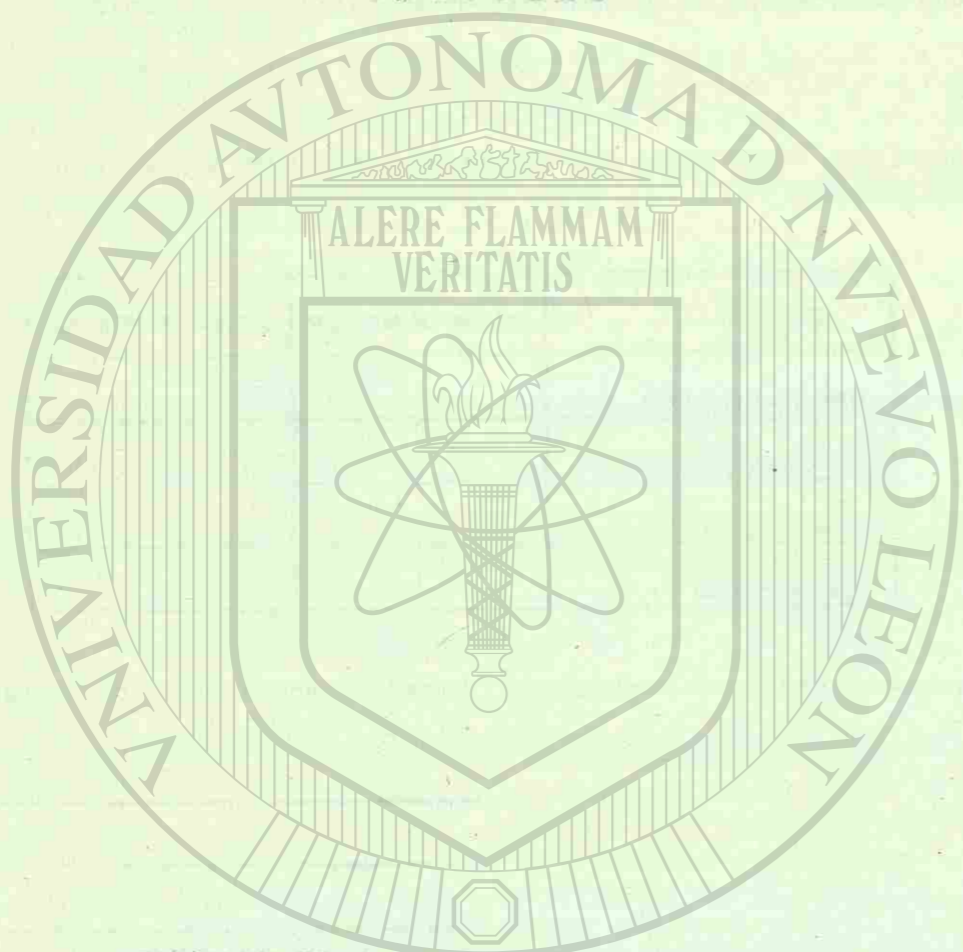
SOLUCION	DISTANCIA RECORRIDA (cm)
Trehalosa	
Hidrolizado de Trehalosa	
Patrón de Trehalosa	
Patrón de Glucosa	
Eluente	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.- Calcule los RT's de cada una de las manchas que aparecen en su cromatograma.

CALCULOS



5.- En la siguiente tabla anote los valores de RT obtenidos.

RT	SOLUCION
	Trazas de aminoácidos
	Hidrolizados de proteínas
	Patrón de trazas
	Solución de glucosa

6.- En la siguiente hoja anexe el cromatograma obtenido o bien una fotocopia del mismo.

DISCUSION

Blank lined area for discussion.

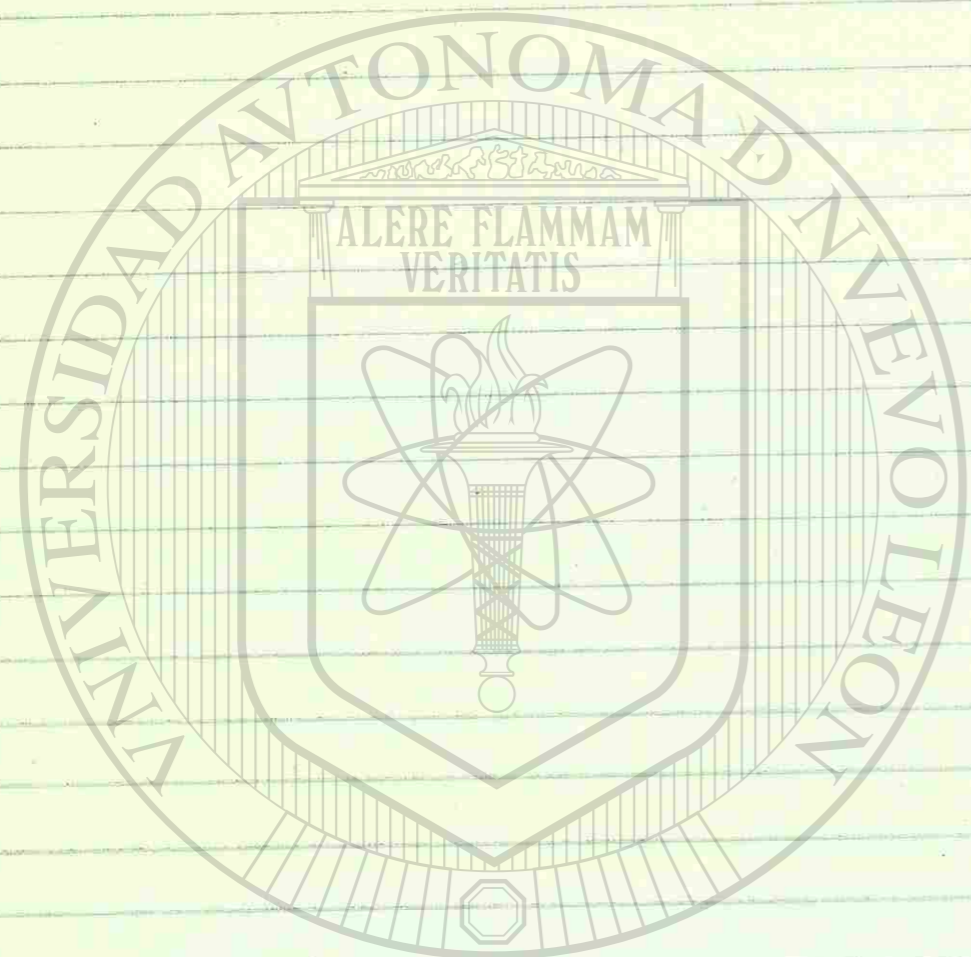
UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

1.- Glass, J.M. 1955. *Microbiologia Experimental*. Editorial Scribner, 18. Edición. pp 59-61.

2.- Dawson, H.M.C., G.C. Elliott., W.H. Elliott., K.M. Jones. 1953. *Data for Biochemical Research*. Oxford at the Clarendon Press, 2a. Edición pp 246-247.

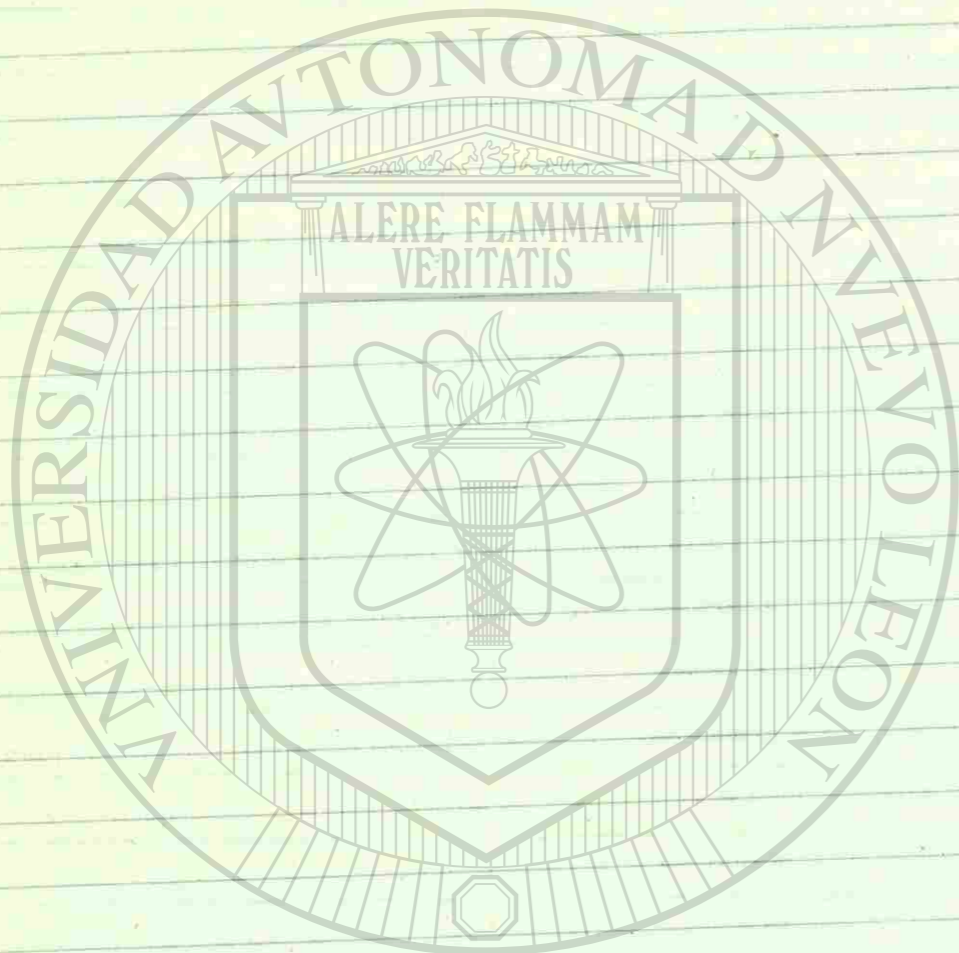
3.- Ellis, W.J. & Bellis, 1953. Reserve carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*. 143 (3): 1394-1394.

4.- Rendón, G. 1974. *Técnicas de Biología Aplicada*. Editorial Interamericana, 18. Edición pp 128-129.

BIBLIOGRAFIA



CONCLUSIONES



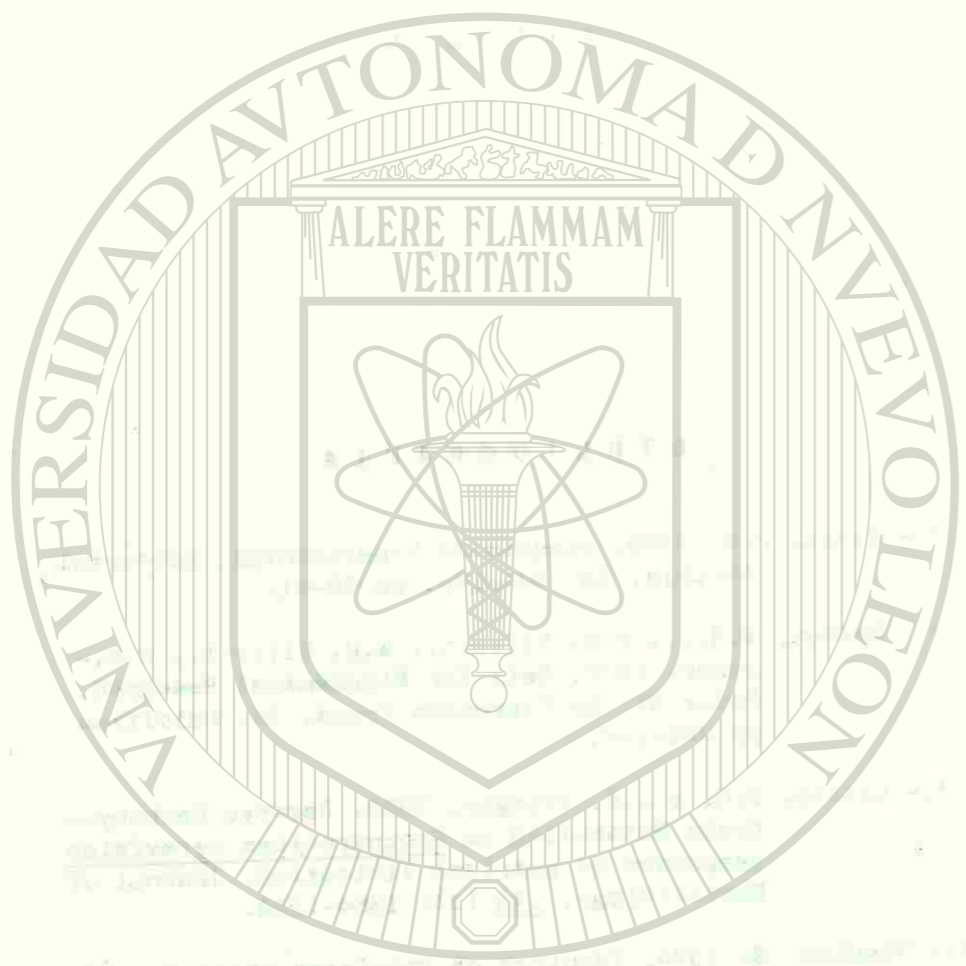
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Clark, J.M. 1966. Bioquímica Experimental. Editorial Acribia. 1a. Edición. pp 59-61.
- 2.- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott., W.H. Elliott., K.M.- Jones. 1972. Data for Biochemical Research. Oxford at the Clarendon Press. 2a. Edición pp 246-247.
- 3.- Lillie, S.H. y J.R. Pringle. 1980. Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*. 143 (3): 1384-1394.
- 4.- Rendina, G. 1974. Técnicas de Bioquímica Aplicada. Editorial Interamericana. 1ª. Edición pp 128--129.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRACTICA No. 8

EFFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

Las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente tienen una gran influencia sobre el crecimiento microbiano, la temperatura, el potencial de oxidoreducción, la tensión de CO2, presión osmótica, humedad y la aireación son factores externos que deberán ser controlados para que un cultivo se desarrolle en las condiciones adecuadas. El pH es otro de los agentes externos que también afectan la velocidad con que ocurre el crecimiento celular, sin embargo, las bacterias disponen de mecanismos homeostáticos que les permiten mantener constante el pH citoplasmico independientemente de las fluctuaciones que se presenten en el exterior; esta capacidad de regular su pH interno es diferente para cada organismo ya que en muchos de ellos el pH interno varia solo 0.1 unidad por cada unidad de pH que cambie afuera, mientras que en otros se han observado cambios más grandes.

Estudios realizados con un rango amplio de organismos han reconocido que no hay un valor de pH interno al cual se mantenga el citoplasma, -- los organismos acidofílicos exhiben valores de pH interno en el rango de - 6.5 a 7.0, los neutrofílicos de 7.5 - 8.0 y los acidofílicos de 9.4 - 9.0.

Esta capacidad regulatoria del pH citoplásmico permite a la mayoría de las bacterias mantener las condiciones intracelulares apropiadas para el funcionamiento de las enzimas involucradas en su metabolismo y por consiguiente sobrevivir ante las alteraciones del pH exterior.

No se ha esclarecido el mecanismo mediante el cual el pH ejerce su efecto sobre la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se ha postulado que quizá ejerza un bloqueo en el transporte de nutrientes a través de la membrana.

OBJETIVO

En esta práctica nuestra finalidad es estudiar el efecto que tiene el pH sobre el crecimiento bacteriano y determinar los límites del espectro de pH tolerable por Escherichia coli así como su pH optimo de crecimiento.

FUNDAMENTO

El pH del medio de cultivo no solo determina si una especie microbiana puede o no desarrollarse en un medio particular sino tambien modifica la velocidad a la cual se replica. La mayoría de los microorganismos de diversos metabolismos y hábitats muestran un crecimiento máximo a pHs cercanos a la neutralidad en tanto que un número reducido lo hacen a valores cercanos a la acidez o a la alcalinidad. El valor obtenido de

res por arriba o abajo de 7. De acuerdo a esta preferencia se les ha denominado organismos neutrofilicos, alcalinofilicos o acidofilicos respectivamente. Cada especie presenta un rango determinado de pH que puede tolerar. El valor mínimo y máximo que delimitan a este espectro es amplio y comprende de 3 - 4 unidades, lo que representa un cambio de diez mil veces en la concentración de H⁺.

Empero, la velocidad máxima de crecimiento se presenta a un valor de pH específico para cada organismo, y a ese valor se le designa como el pH optimo de crecimiento.

Cuando en el laboratorio inoculamos un microorganismo en un medio de cultivo ajustado al pH optimo, el crecimiento se inicia rapidamente, pero como resultado del desarrollo celular sobreviene la liberación de metabolitos de desecho que modifican severamente el pH exterior frenando se así la proliferación celular. Para mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango tolerable, se incluyen entre los ingredientes del mismo sustancias como el KH₂PO₄ y el K₂HPO₄ en concentraciones adecuadas de manera que además de servir como fuentes de fósforo desempeñan un papel como reguladores del pH.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 6 matraces nefelométricos de 250 ml conteniendo 50 ml de Medio mínimo de Glucosa-Sales, a los cuales se le ajusta el pH con HCl o NaOH a los siguientes valores : 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente
- 1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria.
- 1 tubo de 15 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio mínimo
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
- 1 incubadora
- 1 fotocolorimetro Klett-Summerson con filtro verde

Medio Mínimo: contiene por litro de agua destilada MgSO₄, 0.2 g; CaCl₂, 0.1 g; KH₂PO₄, 1.0 g; K₂HPO₄, 1.0 g, NH₄Cl, 2.0; Glucosa, 1.0.

Caldo Luria: en un litro de agua destilada se disuelven: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0; NaCl, 10 g.

METODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche, para ello inocular un tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria con una asada de la cepa.
- 2.- Incubar durante toda la noche a 37°C.
- 3.- Examinar al fotocolorimetro la turbidez del medio contenido en los matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el medio contenido en el tubo de ensaye de 15 x 150. El valor obtenido de-

PRACTICA No. 8
EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

Las condiciones de crecimiento de los organismos dependen de una gran variedad de factores, entre los cuales el pH del medio de cultivo es uno de los más importantes. El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución, y se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (H⁺). En un medio de cultivo, el pH puede afectar directamente la actividad de las enzimas y la estabilidad de las membranas celulares, lo que a su vez influye en la velocidad de crecimiento y en la supervivencia de las bacterias.

El pH óptimo de crecimiento es aquel valor de pH en el cual un organismo muestra el mayor crecimiento. Este valor puede variar considerablemente entre diferentes especies de bacterias, desde valores ácidos (alrededor de 5.0) hasta valores alcalinos (alrededor de 8.0). Por lo tanto, es importante determinar el pH óptimo de crecimiento para cada especie de organismo que se va a estudiar en el laboratorio.

En esta práctica se estudia el efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano. Para ello se preparan cultivos de una misma especie de bacteria en medios de cultivo con diferentes valores de pH. Se mide la turbidez de cada cultivo a lo largo del tiempo, utilizando un fotocolorimetro, para determinar la velocidad de crecimiento. Los resultados se comparan para establecer el pH óptimo de crecimiento de la bacteria en estudio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BENARROCH DE LAS YAGUAJAYES
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El pH del medio de cultivo no solo determina si una especie microbiana puede o no desarrollarse en un medio particular sino también modifica la velocidad a la cual se replica. La mayoría de los microorganismos de diversos metabolismos y hábitos muestran un crecimiento máximo a pH cercanos a la neutralidad en tanto que un número reducido lo hacen a valo-

res por arriba o abajo de 7. De acuerdo a esta preferencia se les ha denominado organismos neutrofilos, acidófilos o alcalófilos respectivamente. Cada especie presenta un rango determinado de pH que puede tolerar. El valor mínimo y máximo que delimita a este espectro es el rango de crecimiento. Lo que representa un cambio de diez mil veces en la concentración de H⁺.

Embudo, la velocidad máxima de crecimiento se presenta a un valor de pH específico para cada organismo y a ese valor se le designa como el pH óptimo de crecimiento.

Cuando en el laboratorio inoculamos un microorganismo en un medio de cultivo ajustado al pH óptimo el crecimiento se inicia rápidamente, pero como resultado del desarrollo celular sobreviene la liberación de metabolitos de base que modifican eventualmente el pH exterior. Cuando se así la producción celular. Para mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango tolerable, se incluyen entre los ingredientes del mismo sustancias como el KH₂PO₄ y el K₂HPO₄ en concentraciones adecuadas de manera que además de servir como sales de amortiguamiento un papel como reguladores del pH.

MATERIAL Y REACTIVOS

5 matraces nefelométricos de 250 ml conteniendo 50 ml de Medio Mínimo de Glucosa-Sales. A las matrasas se le ajusta el pH con HCl o NaOH a los siguientes valores: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente.
 1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de caldo Luria.
 1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio mínimo aséptico.
 1 mechero
 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
 1 incubadora
 1 fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro verde

Medio Mínimo: contiene por litro de agua destilada MgSO₄ 0.2 g; CaCl₂ 0.1 g; KH₂PO₄ 1.0 g; K₂HPO₄ 1.0 g; NH₄Cl 2.0 g; Glucosa 1.0 g.
 Caldo Luria: en un litro de agua destilada se disuelven: peptonas 10 g; extracto de levadura 5.0 g; NaCl 10 g.

MÉTODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche para ello inocular un tubo de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria con una asada de la cepa.
- 2.- Incubar durante toda la noche a 37°C.
- 3.- Examinar el fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en los matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el medio contenido en el tubo de ensayo de 18 x 150. El valor obtenido de

berá sustraerse a cada una de las lecturas subsecuentes, la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes en el medio.

- 4.- En condiciones de esterilidad, inocular los matraces nefelométricos con 1 ml del cultivo de toda la noche y leer inmediatamente la turbidez en un fotocolorímetro equipado con filtro verde.
- 5.- Incubar el matraz a 37°C con agitación durante 12 horas, determinando cada hora la turbidez del cultivo.

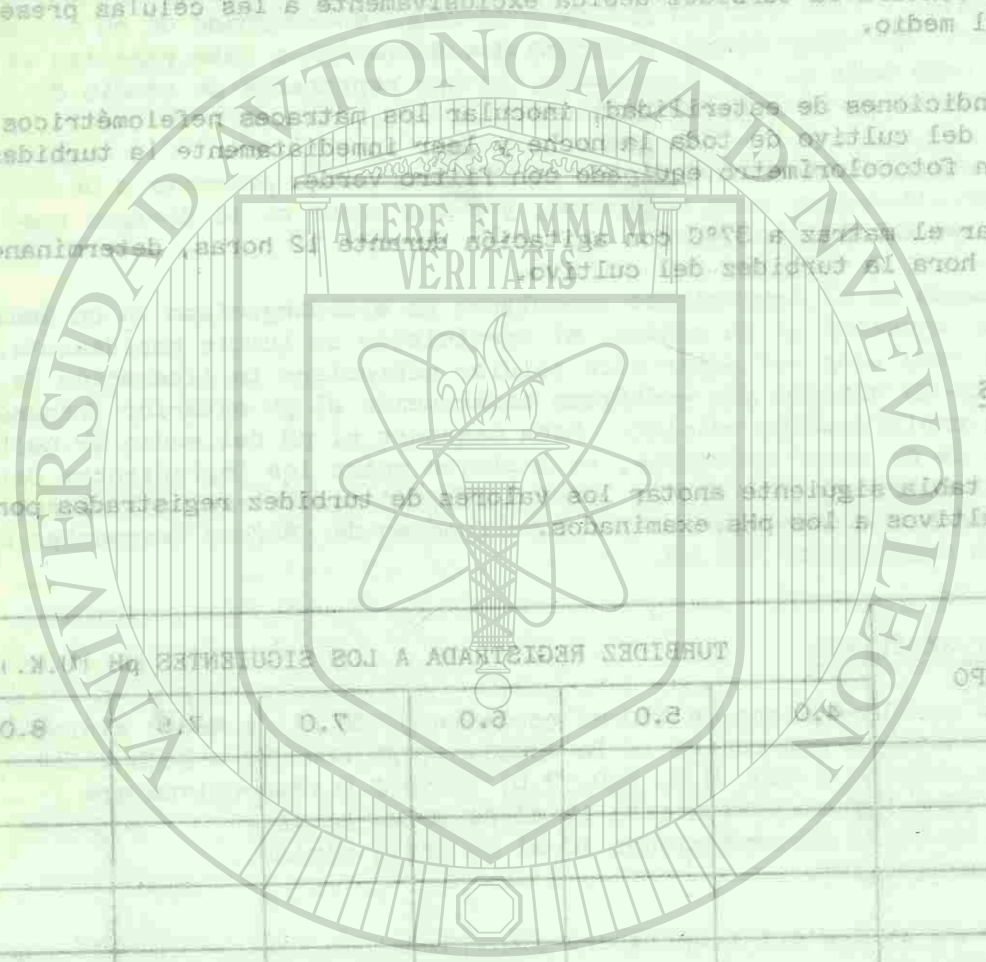
RESULTADOS

- 1.- En la tabla siguiente anotar los valores de turbidez registrados por sus cultivos a los pHs examinados.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA A LOS SIGUIENTES pH (U.K.)					
	4.0	5.0	6.0	7.0	7.5	8.0
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

para sustrarse a cada una de las lecturas subsiguientes, la diferencia
representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes
en el medio.

4.- En condiciones de esterilidad, inocular los ratones hemocultivos con
1 ml del cultivo de los ratones a los inmediatamente la turbidez
en un fotocolorímetro.
5.- Incubar el ratón a 37°C con el ratón durante 12 horas, determinando
cada hora la turbidez del cultivo.



RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente anotar los valores de turbidez registrados por
sus cultivos a los tres exámenes.

TIEMPO (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0												
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

2.- Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel semi-logarítmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Procure rotular correctamente la figura y utilizar símbolos distintos para cada curva.

3.- Analice sus graficas, para cada una seleccione los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento y sométalos a regresión lineal para calcular la velocidad de crecimiento (μ). Considere como X al tiempo en horas y como Y al logaritmo de las unidades Klett.

CALCULOS

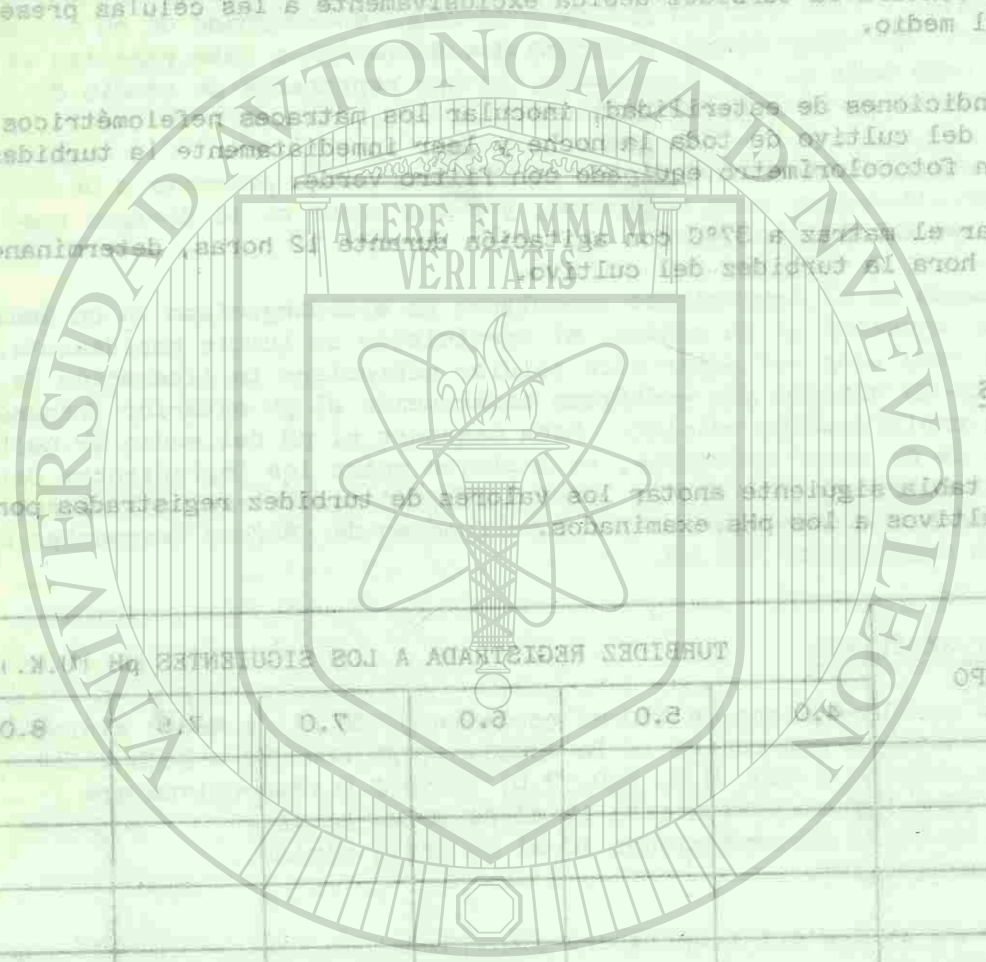
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



para sustrarse a cada una de las lecturas subsiguientes, la diferencia
representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes
en el medio.

4.- En condiciones de esterilidad, inocular los ratones pelotométricos con
1 ml del cultivo de *C. parvum* a los ratones inmediatamente la turbidez
en un fotocolimetro. Registrar los valores de turbidez por
2.- Incubar el ratón a 37°C con el ratón durante 12 horas, determinando
cada hora la turbidez del cultivo.



RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente anotar los valores de turbidez registrados por
sus cultivos a los tres exámenes.

TIEMPO (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0												
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

2.- Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel semi-logarítmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Procure rotular correctamente la figura y utilizar símbolos distintos para cada curva.

3.- Analice sus graficas, para cada una seleccione los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento y sométalos a regresión lineal para calcular la velocidad de crecimiento (μ). Considere como X al tiempo en horas y como Y al logaritmo de las unidades Klett.

CALCULOS

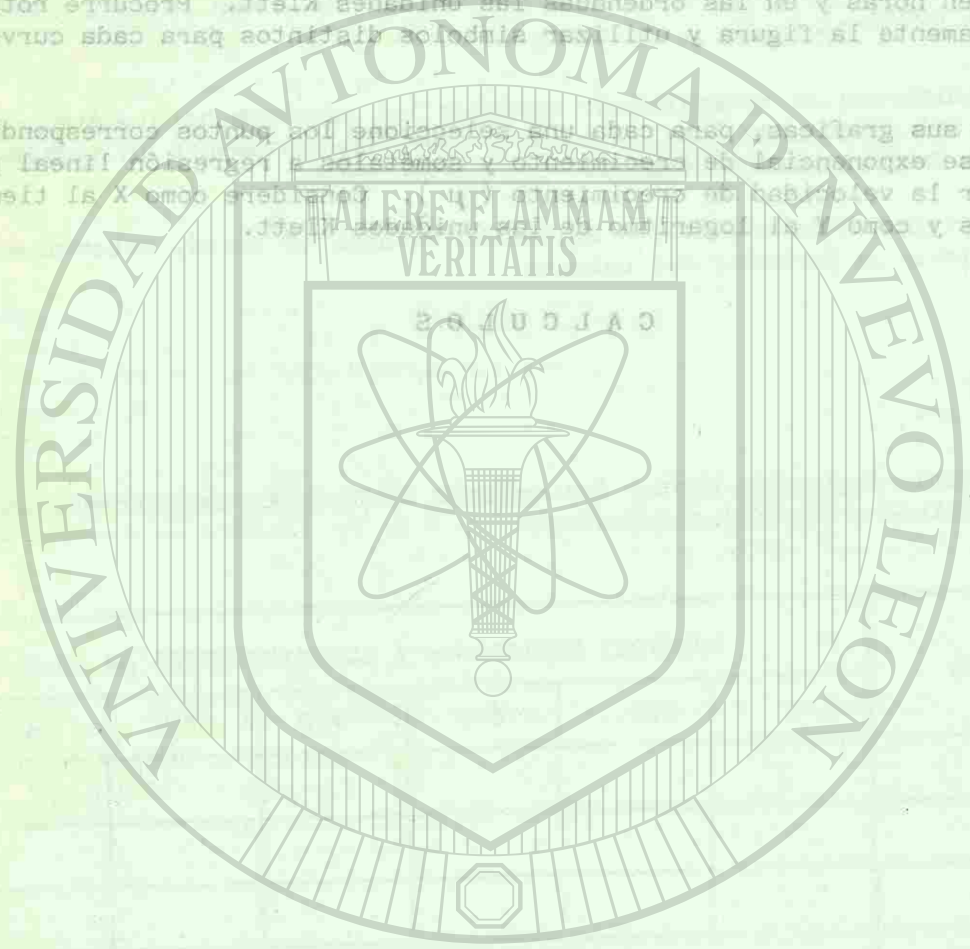
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



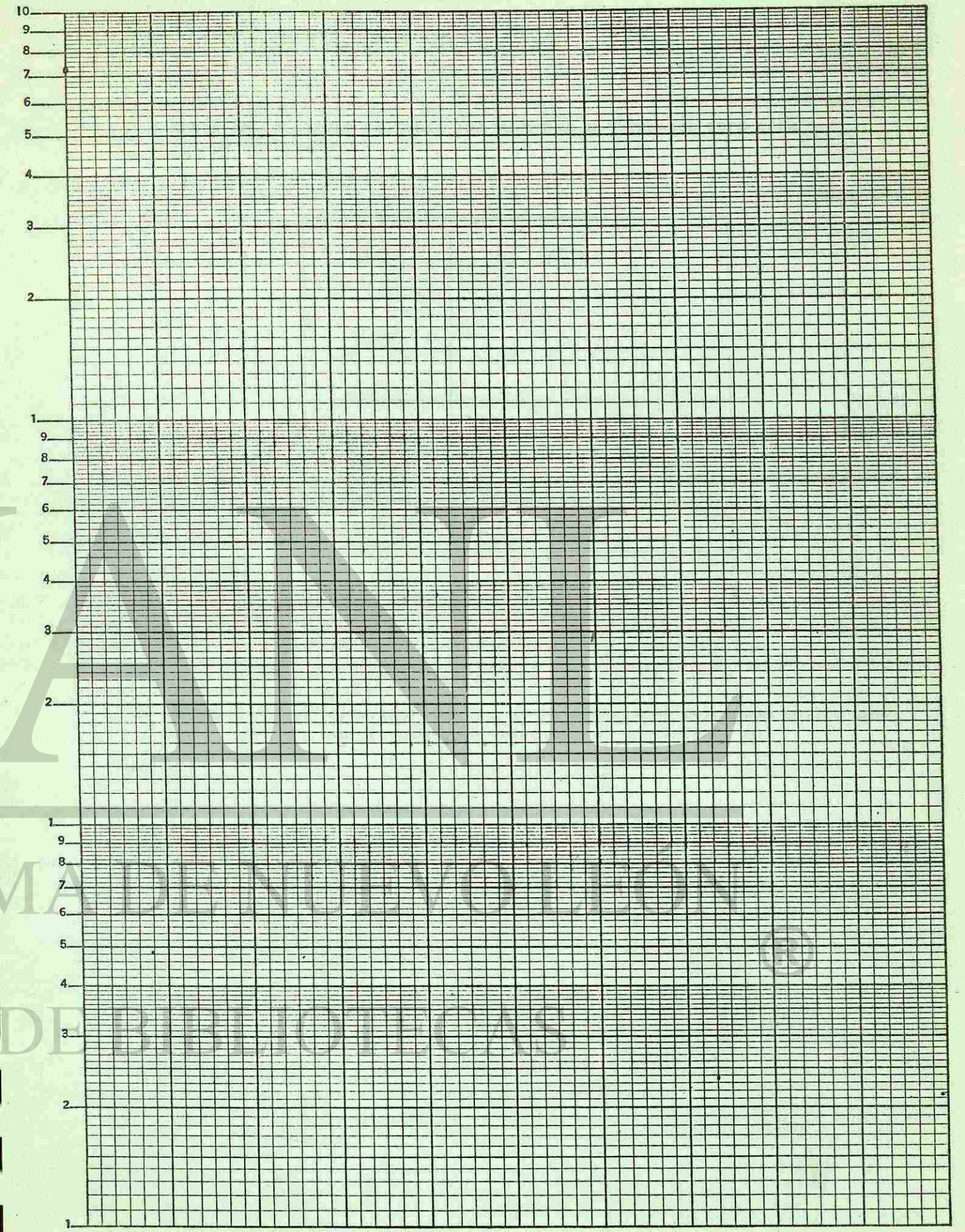
5. - Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel semi-logarítmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas las unidades Klett. Procure representar correctamente la figura y utilice símbolos distintos para cada curva.

3. - Analice sus graficas, para cada una indique los puntos correspondientes a la fase exponencial y a la fase lineal para calcular la velocidad de crecimiento y el tiempo como X al tiempo en horas y como Y el logaritmo de las unidades Klett.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

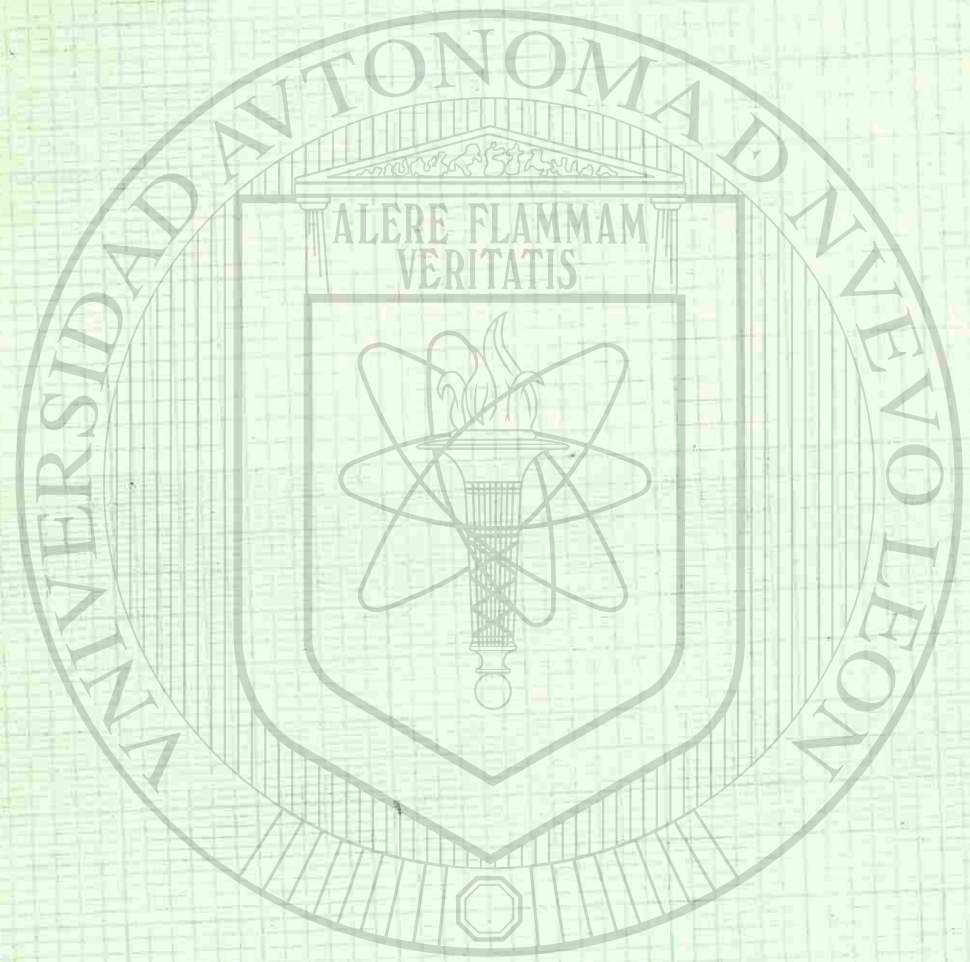
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4.- Anote en la siguiente tabla los valores de μ obtenidos para cada uno de los pH utilizados.

pH	μ (h^{-1})
4.0	
5.0	
6.0	
7.0	
7.5	

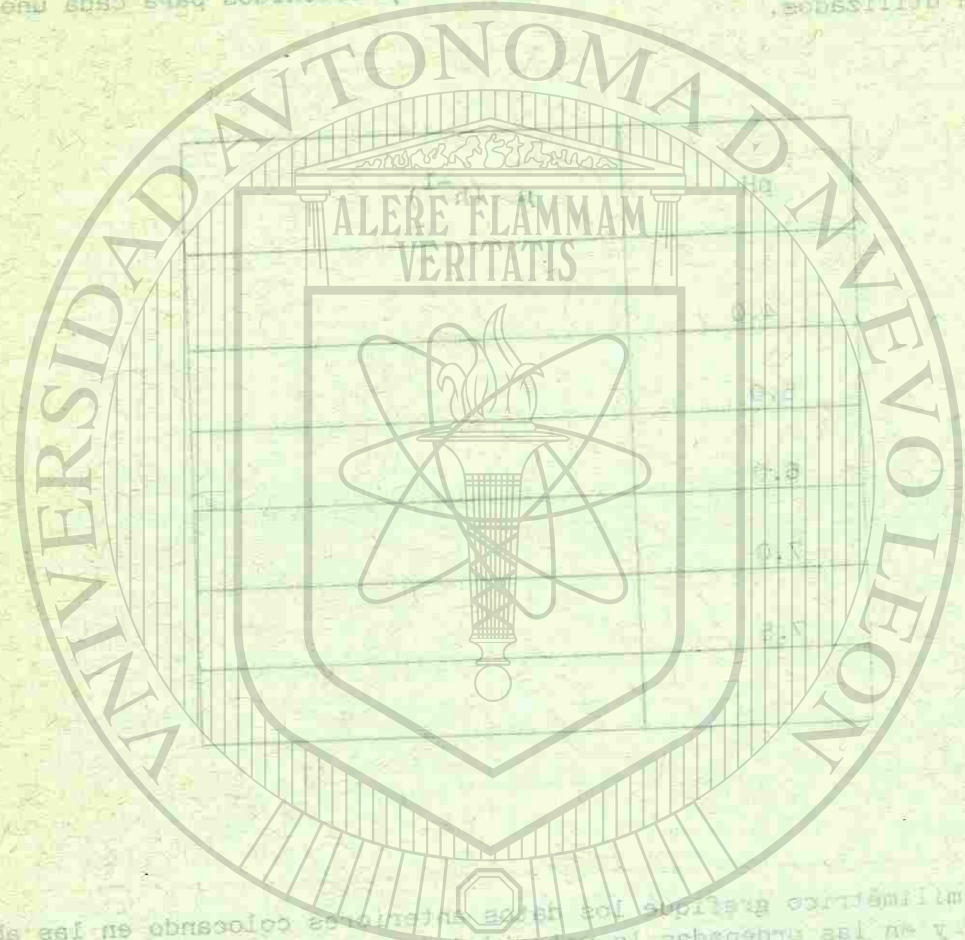
5.-En papel milimétrico grafique los datos anteriores colocando en las abscisas el pH y en las ordenadas la velocidad de crecimiento (μ)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

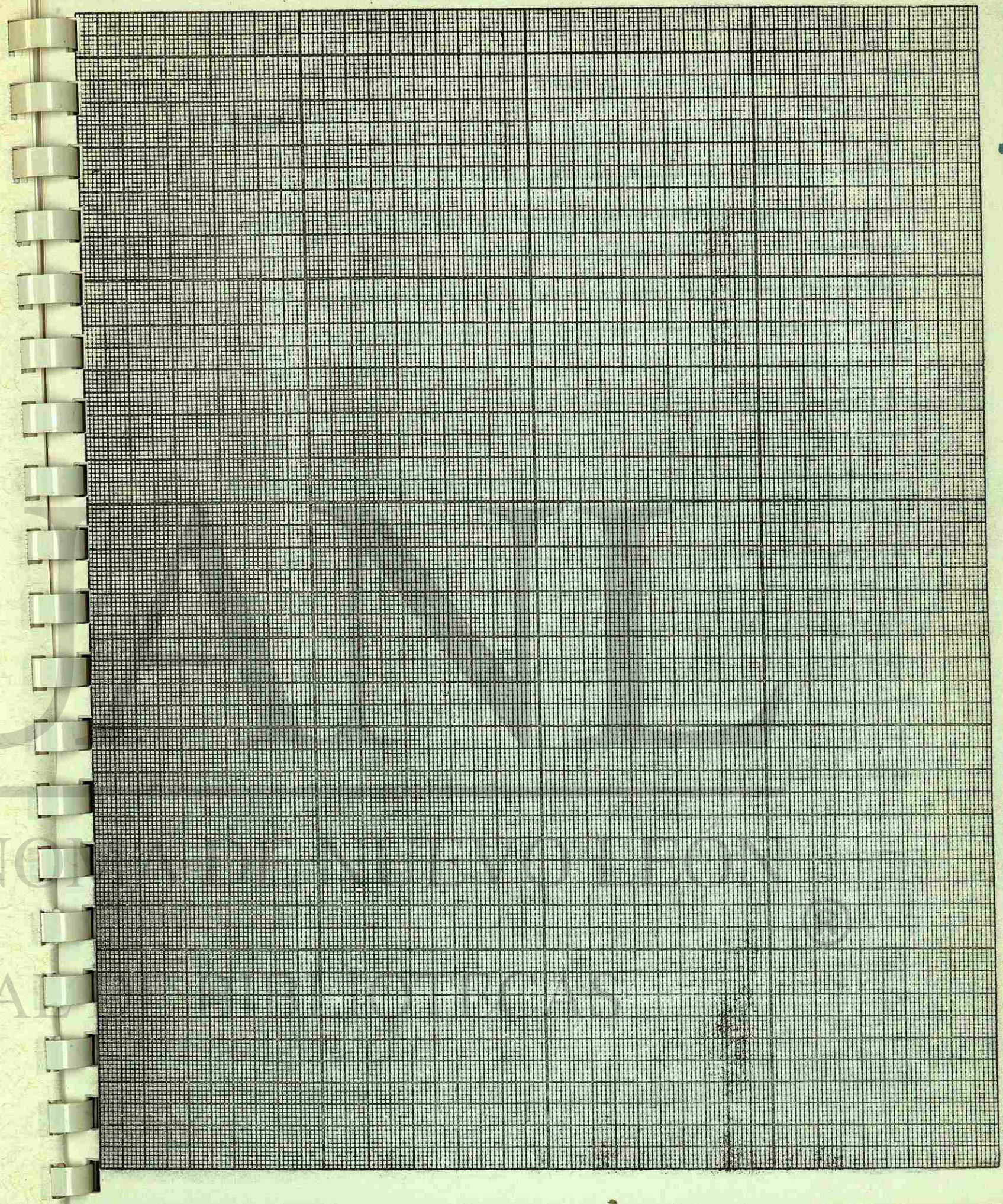
4.- Anote en la siguiente tabla los valores de y obtenidos para cada uno de los pH utilizados.

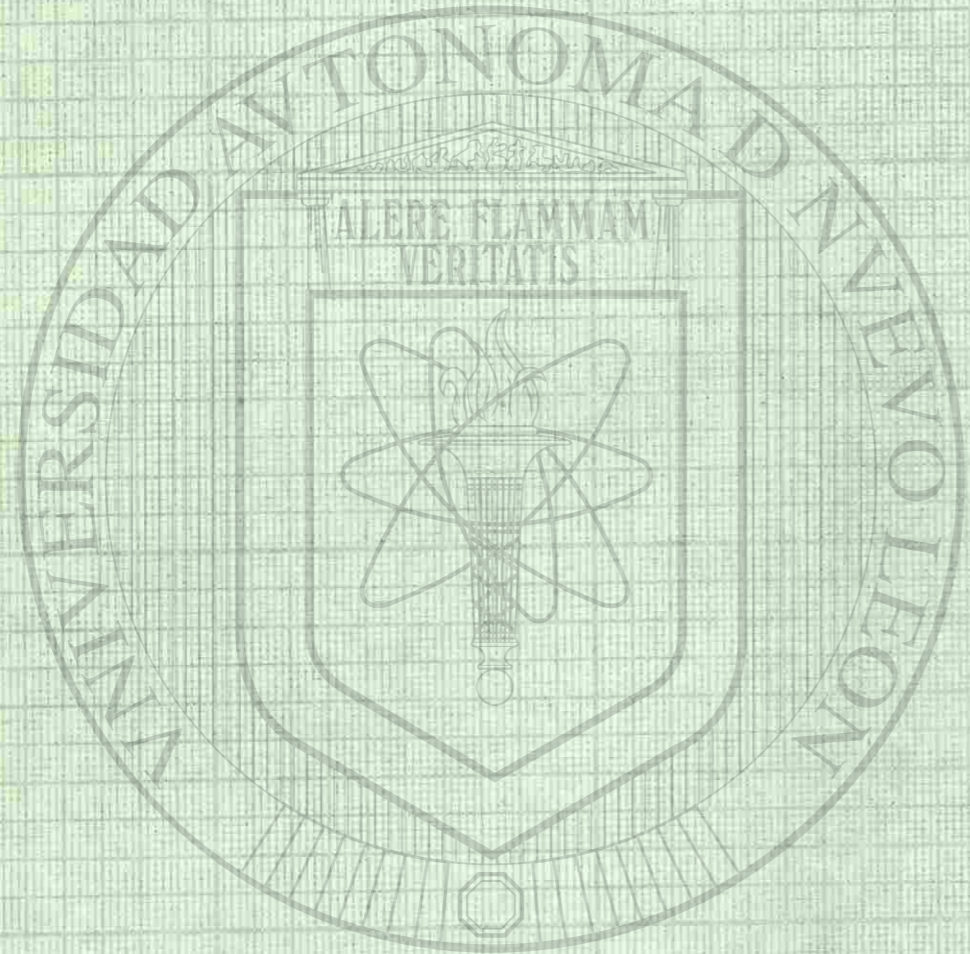


En un papel milimetrado grafique los datos obtenidos colocando en las abscisas el pH y en las ordenadas la velocidad de crecimiento (μ)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

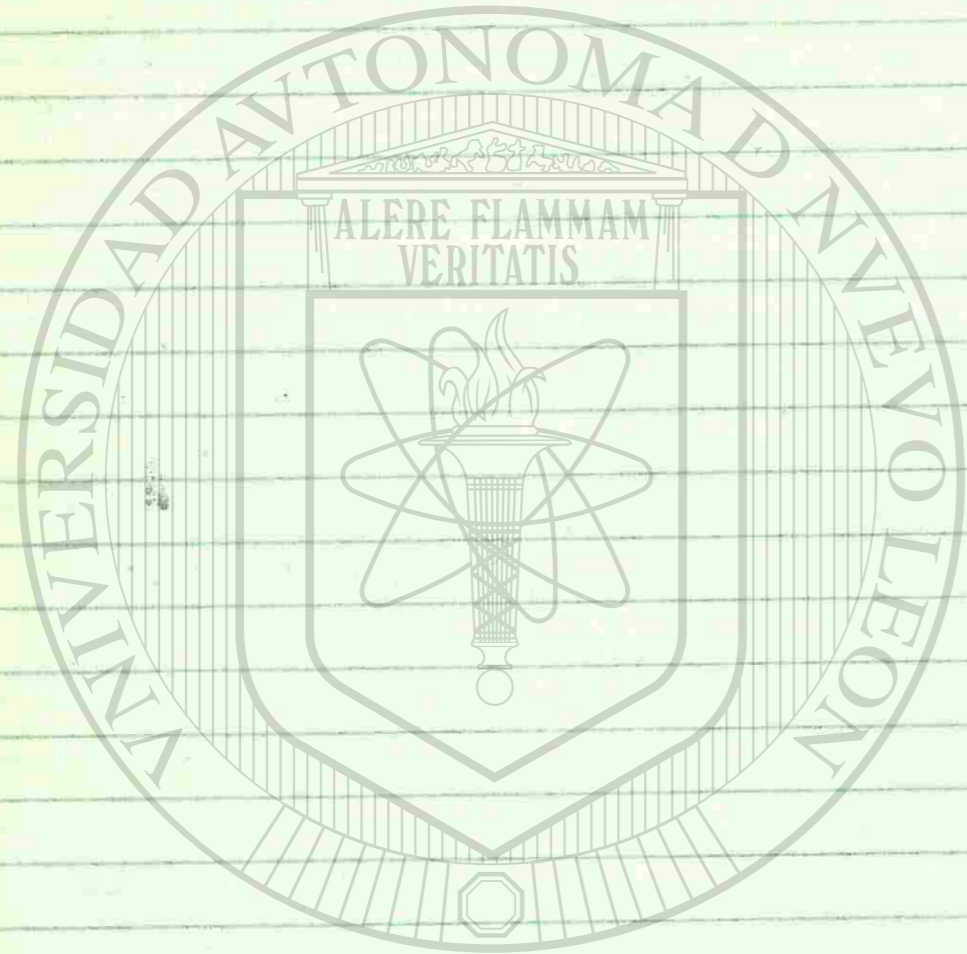
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION

Blank lined area for writing the discussion.

BIBLIOTECA

Blank lined area for library information, including a registered trademark symbol (®).



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRÁCTICA No. 9

EFFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

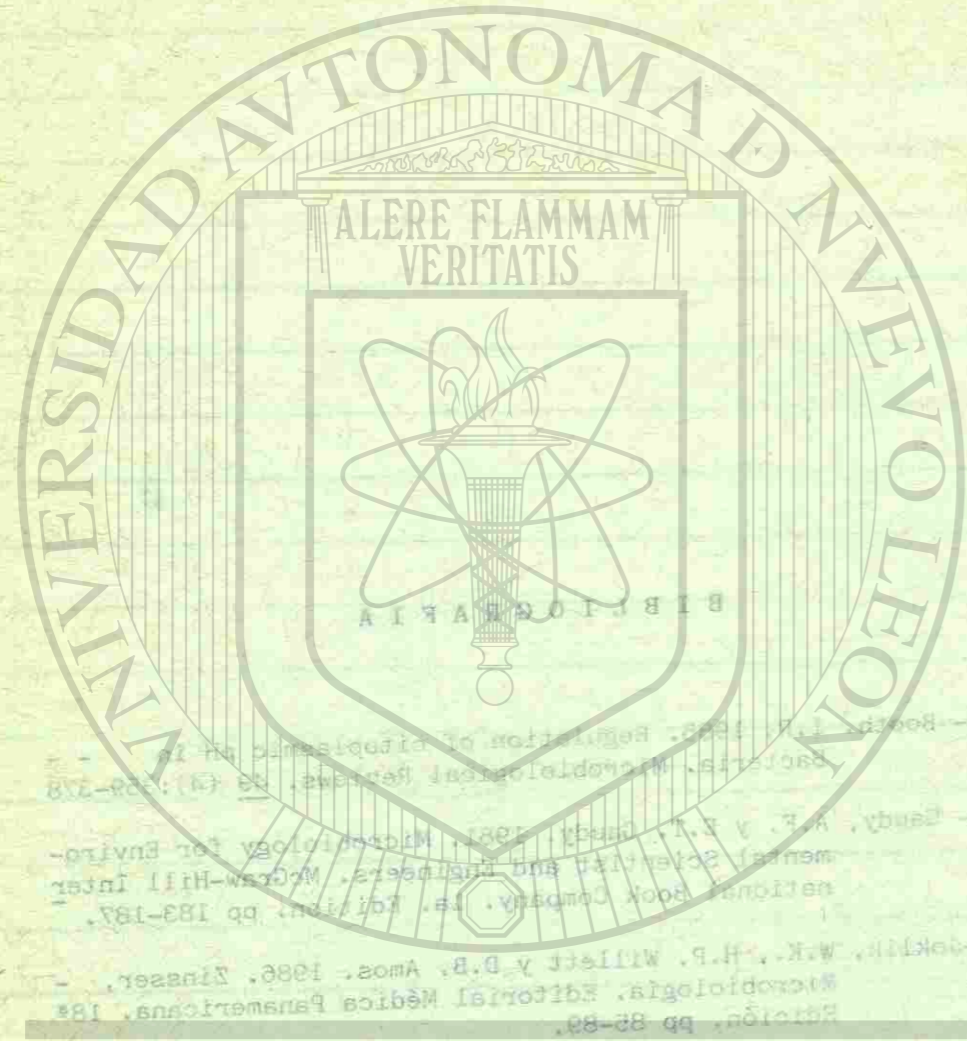
Si se habilita a un organismo vivo en las condiciones que le son más favorables, éste se reproducirá y crecerá. Sin embargo, si se le somete a condiciones que no le son favorables, su crecimiento se verá afectado. En este experimento se estudia el efecto de la presión osmótica sobre el crecimiento bacteriano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Booth, I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological Reviews*. 49 (4):359-378
- 2.- Gaudy, A.F. y E.T. Gaudy. 1981. *Microbiology for Environmental Scientist and Engineers*. McGraw-Hill International Book Company. 1a. Edition. pp 183-187.
- 3.- Joklik, W.K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986. *Zinsser, Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. 18ª Edición. pp 85-89.
- 4.- Kobayashi, H. 1980. *Streptococcus faecalis* Mutants defective in Regulation of cytoplasmic pH. *Journal of Bacteriology*. 143 (3): 1187-1193.
- 5.- Schlegel, H.G. 1975. *Microbiología Genral*. Ediciones Omega, S.A. traducción de la 2a edición alemana. pp 140-146.

FUNDAMENTO

El agua es una molécula esencial para el desarrollo microbiano. No solamente porque actúa como el medio donde ocurren la mayoría de las reacciones biológicas, sino también por su participación como sustrato en algunas de ellas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRACTICA No. 9

EFFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

En su hábitat natural las bacterias afrontan las condiciones fluctuantes del medio ambiente, y para asegurar su supervivencia, disponen de mecanismos homeostáticos muy versátiles mediante los cuales preservan su viabilidad. Uno de los factores más cambiantes es la osmolaridad; cuando esta se eleva, las células la pérdida del agua intracelular y en consecuencia la inhibición de su crecimiento.

Para prevenir la deshidratación dañina, algunos microorganismos se adaptan a estas condiciones de "stress osmótico" acumulando en su citoplasma ya sea iones K^+ o moléculas orgánicas osmóticamente activas que elevan la presión osmótica interna hasta hacerla equivalente con la del entorno consiguiendo con ello evitar la difusión de agua hacia el exterior pero permitiendo la multiplicación microbiana aún en condiciones de hiperosmolaridad.

En la industria alimenticia, es permitido el empleo de aditivos para la preservación de alimentos, sin embargo, aún y cuando estas sustancias reducen el agua disponible para los microorganismos, el crecimiento microbiano puede darse si éstos poseen la habilidad de regular su osmolaridad. Este hecho es conveniente que sea considerado no solo por el personal que se dedica al área alimenticia sino por quienes están relacionados con la medicina y la agricultura.

OBJETIVOS

En esta investigación nos plantearemos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar el efecto de la osmolaridad externa sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. La fuerza osmótica del medio se modificará con la adición de NaCl al medio de cultivo.
- 2) Observar el efecto estimulador de la glicil-betaína sobre la tasa de crecimiento de células bacterianas sometidas a distintos grados inhibitorios de fuerza osmótica.

FUNDAMENTO

El agua es una molécula esencial para el desarrollo microbiano, no solamente porque actúa como solvente donde ocurren la mayoría de las reacciones biológicas, sino también por su participación como sustrato en muchas de ellas.

Este conocimiento fué la base de uno de los métodos más antiguos para impedir el deterioro de materiales putrescibles: la desecación.

Además de la evaporación y sublimación, existen otras formas de limitar el agua accesible a los microorganismos, entre ellas la congelación y la adición de sales o azúcares. En el último caso las sustancias adicionadas incrementan la fuerza osmótica del ambiente promoviendo así la salida de agua intracelular y la plasmólisis del microbio.

Sin embargo algunos microorganismos cuando son expuestos a un incremento en la osmolaridad de su medio de crecimiento, responden elevando la tensión osmótica interna consiguiendo con ello evitar la pérdida de agua. El incremento se debe a la acumulación de moléculas osmoticamente activas ya sea de origen endógeno o exógeno. Este mecanismo regulatorio se le conoce como **Osmoregulación** y a los microorganismos que disponen de él se les llama **Osmoterantes**. Las moléculas involucradas en el balanceo osmótico se denominan **Osmoreguladores, Osmoprotectores o Agentes para el balanceo osmótico**, e incluyen sustancias orgánicas como son aminoácidos, azúcares, polioles y betaínas.

La elucidación de los mecanismos involucrados en la sensibilidad osmótica y la modulación de la osmolaridad interna, están siendo sujetas actualmente a un intenso estudio desde el punto de vista genético y bioquímico.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 8 matraces nefelométricos de 250 ml
- 8 tubos de ensaye de 16 x 150 mm conteniendo las soluciones blanco
- 1 incubadora
- 1 Baño de agua con agitación
- 1 espectrofotometro o fotocolorimetro equipado con filtro azul
- 1 pipeta de 10 ml

Medio Rico: Caldo Luria: Contiene Triptona, 10 g; Extracto de Levadura, 5g ; - NaCl, 5g; agua destilada, 1,0000 ml. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH.

Medio Mínimo: Medio 63: Contiene KH_2PO_4 , 13.6 g; KOH, 4.2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.98g $MgSO_4$, 0.39 g; $FeSO_4$, 0.0006 g; Glucosa 1.98 g; agua destilada, 1,0000 ml. Ajustar el pH a 7.2.

Medios con Fuerza Osmotica Elevada: Estos se obtendrán adicionando NaCl sólido al Medio 63. Los matraces que se emplearán contendran lo siguiente:

PRÁCTICA No. 9
EFECTO DE LA PRESIÓN OSMÓTICA SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

En la naturaleza, las células bacterianas se encuentran en ambientes acuáticos y por lo tanto, su supervivencia depende de los mecanismos fisiológicos que les permiten mantener un balance hídrico adecuado. Este balance depende de la capacidad de las células para regular su contenido de agua y electrolitos. Cuando se someten a condiciones de alta osmolaridad, las células pierden agua por ósmosis y esto puede resultar en la muerte celular.

Para estudiar la sensibilidad osmótica de algunas bacterias se utilizan medios de cultivo con diferentes concentraciones de solutos. El efecto de la osmolaridad externa sobre el crecimiento de *Bacteriella coli* se estudia modificando la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

El observar el efecto osmótico de la fuerza osmótica externa sobre la tasa de crecimiento de células bacterianas sometidas a distintos grados inhibitorios de fuerza osmótica.

OBJETIVOS

El observar el efecto osmótico de la fuerza osmótica externa sobre el crecimiento de *Bacteriella coli*. La fuerza osmótica del medio se modificará con la adición de NaCl al medio de cultivo.

FUNDAMENTO

El agua es una molécula esencial para el desarrollo microbiano, no solamente porque actúa como solvente donde ocurren la mayoría de las reacciones biológicas, sino también por su participación como sustrato en muchas de ellas.

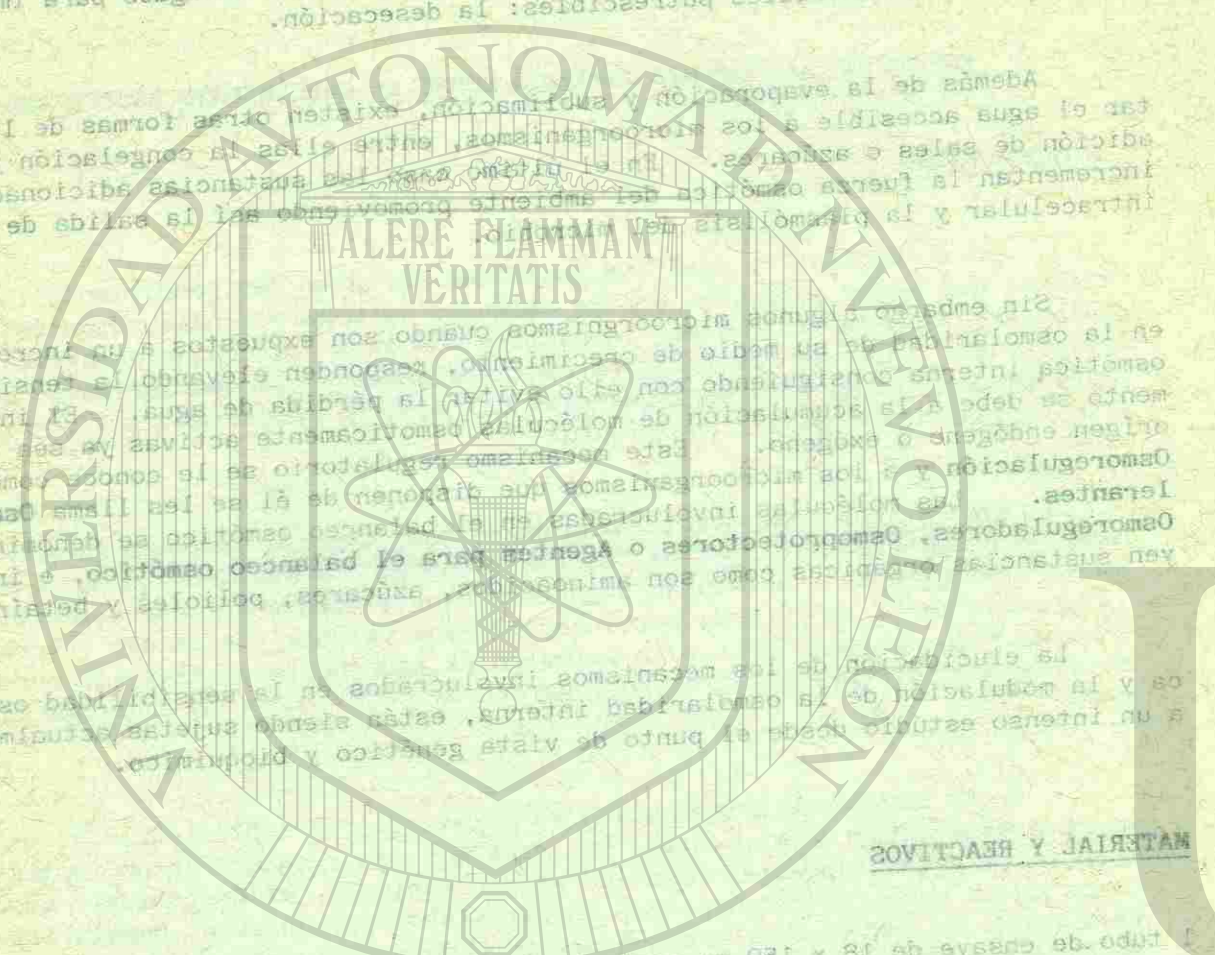
- MATRAZ 1: Medio 63
- MATRAZ 2: Medio 63 + Betaína 1 mM
- MATRAZ 3: Medio 63 + NaCo 0.65 M
- MATRAZ 4: Medio 63 + NaCl 0.65 M + Betaína 1 mM
- MATRAZ 5: Medio 63 + NaCl 0.8 M
- MATRAZ 6: Medio 63 + NaCl 0.8 M + Betaína 1 mM
- MATRAZ 7: Medio 63 + NaCl 1 M
- MATRAZ 8: Medio 63 + NaCl 1M + Betaína 1 MM

Para facilitar la preparación de los contenidos de los frascos anteriores se recomienda proceder en el orden e indicaciones siguientes:

- 1.-Preparar Medio Base disolviendo 0.495 g de $(NH_4)_2SO_4$; 3.4 de KH_2PO_4 y --- 1.05 g de KOH en 100 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.2. Distribuya 10 ml a cada uno de los matraces. A los matraces 3, 4, 5, 6, 7 y 8 adicionar las cantidades de NaCl indicadas en la tabla que aparece mas adelante. Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.
- 2.-Solución de Sulfatos: Disolver 0.97 g de $MgSO_4$ y 0.0001 g de $FeSO_4$ en 50 ml de agua destilada. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Transferir asepticamente 5 ml de esta solución a cada uno de los 8 matraces.
- 3.-Fuente de Carbono: Disolver 0.495 g de Glucosa en 50 ml de agua destilada y esterilizar a 10 libras de presión por 10 minutos. Distribuir 5 ml a cada uno de los ocho matraces.
- 4.-Betaína : Disolver 0.01537 g de Gilcil-betaína en 25 ml de agua destilada y esterilizar a 10 libras por 10 minutos. Transferir 5 ml de esta solución a los matraces 2, 4, 6 y 8.

El volumen final de solución contenido en cada matraz será de 25 ml. Cerciorese que cada matraz lleve los ingredientes señalados recurriendo a la tabla siguiente:

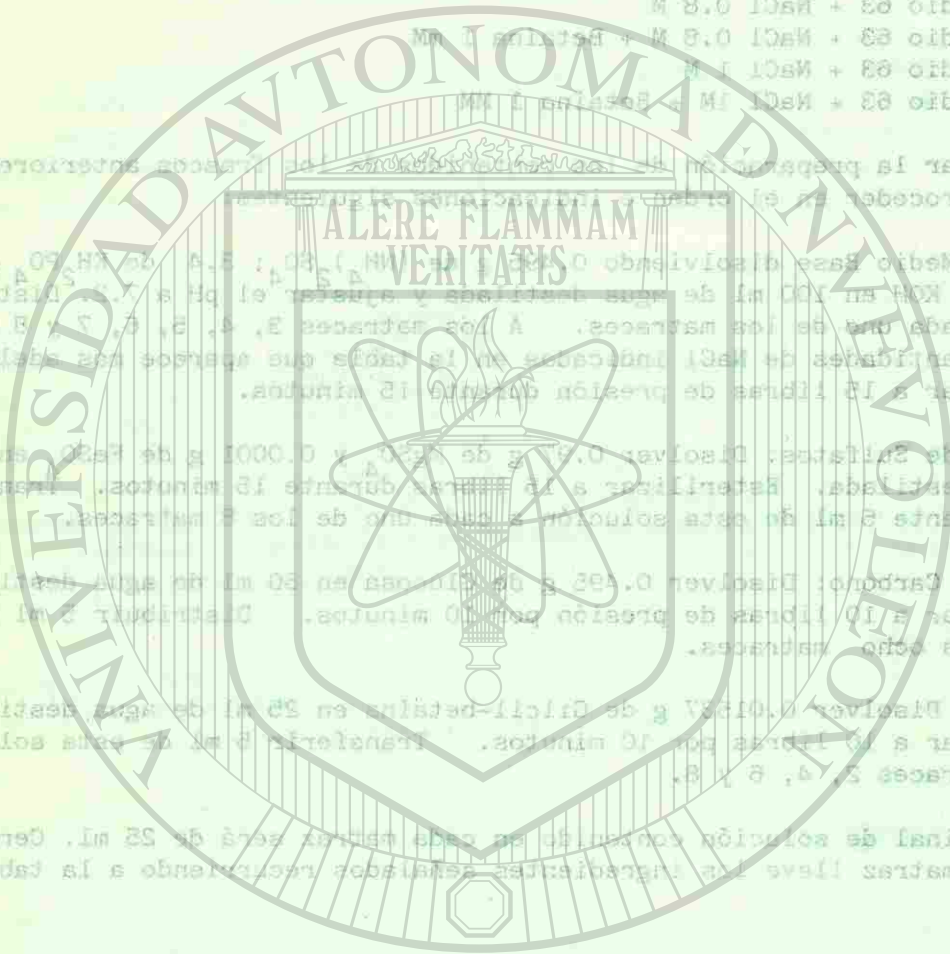
INGREDIENTE	M A T R A Z							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl sólido (g)	-	-	0.95	0.95	1.17	1.17	1.4625	1.4625
Medio Base (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
Sol'n de Sulfatos(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucosa (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Betaína (ml)	-	5	-	5	-	5	-	5
Agua Dest (ml)	5	-	5	-	5	-	5	-
Presión Osmótica (bars)	7.4	7.4	36.2	36.2	43	43	52.9	52.9



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATRAZ 1: Medio 83 + Betaina 1 ml
 MATRAZ 2: Medio 83 + NaCl 0.25 M
 MATRAZ 3: Medio 83 + NaCl 0.5 M + Betaina 1 ml
 MATRAZ 4: Medio 83 + NaCl 0.8 M
 MATRAZ 5: Medio 83 + NaCl 0.8 M + Betaina 1 ml
 MATRAZ 6: Medio 83 + NaCl 1 M
 MATRAZ 7: Medio 83 + NaCl 1 M + Betaina 1 ml
 MATRAZ 8: Medio 83 + NaCl 1 M + Betaina 1 ml



Para facilitar la preparación de las matracas se recomienda el siguiente procedimiento:

- 1.- Preparar Medio Base disolviendo 0.25 g de NaCl en 100 ml de agua destilada y agregar el pH a 7.0. A las matracas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 agregar las cantidades de NaCl indicadas en la tabla que aparece en el anexo. Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.
- 2.- Solución de Sulfatos: Disolver 0.25 g de Na₂S₂O₄ y 0.0001 g de FeSO₄ en 50 ml de agua destilada. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Transferir asépticamente 5 ml de esta solución a cada una de las 8 matracas.
- 3.- Fuente de Carbono: Disolver 0.495 g de azúcar en 50 ml de agua destilada y esterilizar a 10 libras de presión por 10 minutos. Distribuir 2 ml a cada uno de los ocho matracas.
- 4.- Betaina: Disolver 0.0187 g de glicil-betaina en 25 ml de agua destilada y esterilizar a 10 libras por 10 minutos. Transferir 5 ml de esta solución a las matracas 2, 4, 5, 6, 7 y 8.

El volumen final de solución contenido en cada matracas será de 25 ml. Cerciorarse que cada matracas lleva las cantidades indicadas recomendando a la tabla siguiente:

INGREDIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8
Medio Base (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
Sol'n de Sulfatos (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Glucosa (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Betaina (ml)	-	5	-	-	-	-	-	-
Agua Dest (ml)	5	-	5	-	-	-	5	-
Presión Osmótica (atm)	7.4	7.4	36.2 - 30.5	45	45	45	45	45

CEPA: Escherichia coli

MÉTODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche de E. coli. Para ello inocular por asada 10 ml de Caldo Luria contenidos en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm e incubar a 37°C durante toda la noche (12 - 15 horas).
- 2.- Transferir asépticamente 1 ml del cultivo de toda la noche a cada uno de los 8 matracas nefelométricos.
- 3.- Inmediatamente determinar la absorbancia de cada matracas a $\lambda = 420$ nm o la turbidez en un fotocolorímetro Klett-Summerson equipado con filtro azul.
- 4.- Incubar los matracas a 37°C con agitación durante 18 horas determinando la absorbancia o turbidez cada hora.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



5.-EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO.

En papel semi-logarítmico grafique los datos de las matraces 1, 2, 3 y 4 anotando en el eje de las abscisas el tiempo en horas, y en el eje de las ordenadas la turbidez en unidades Klett.

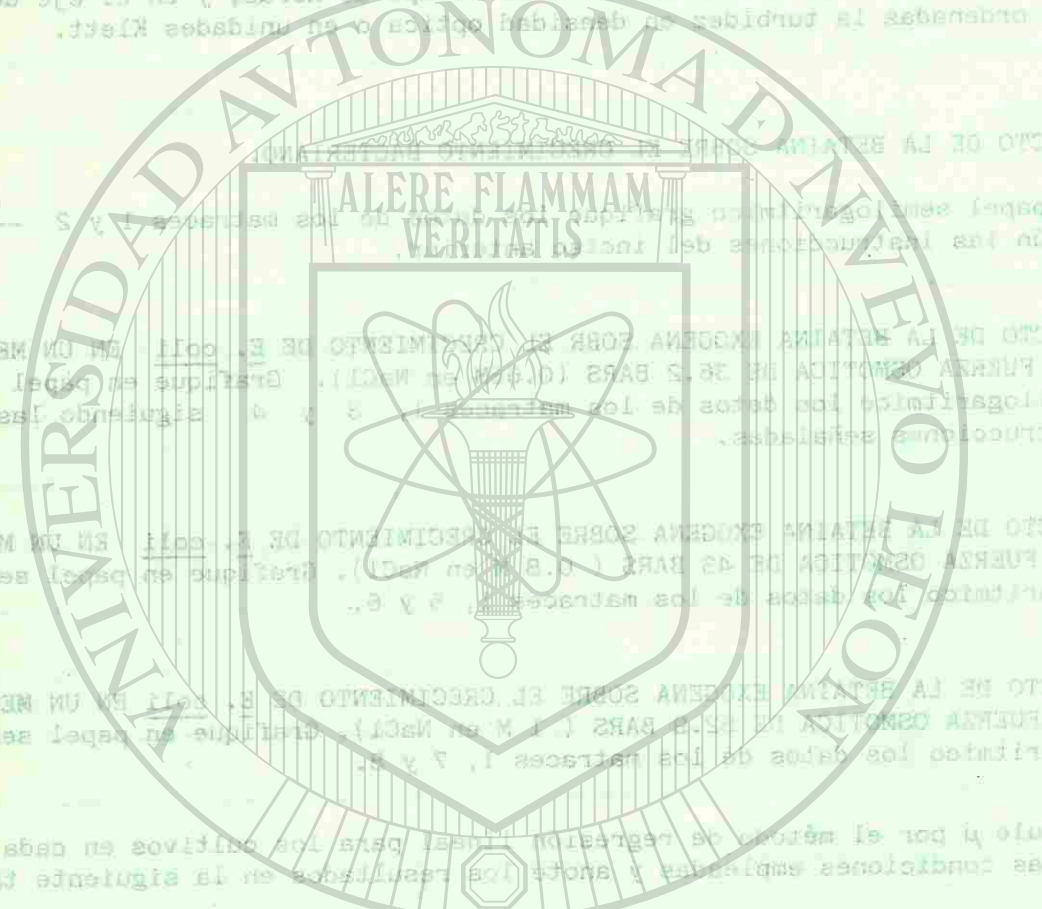
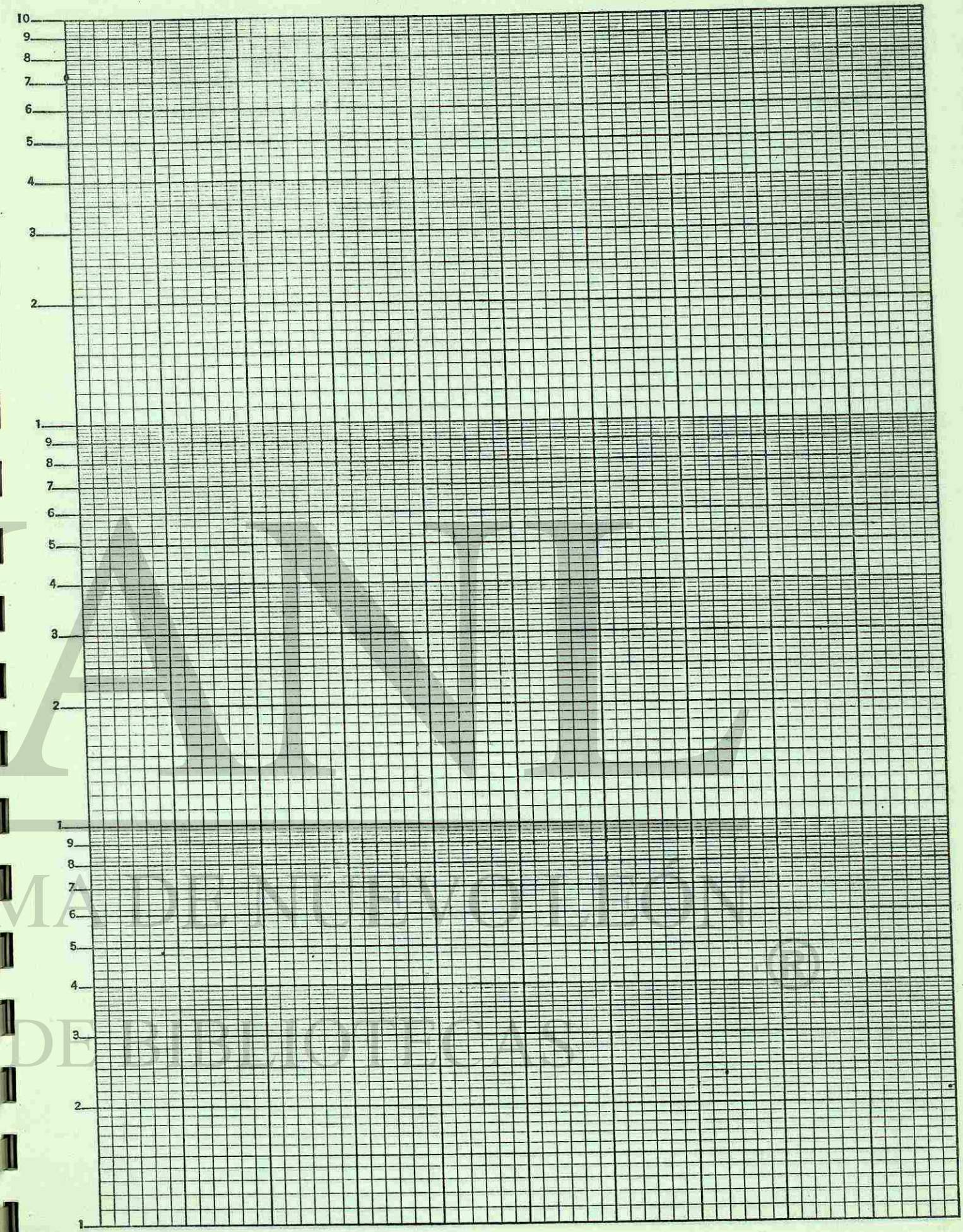
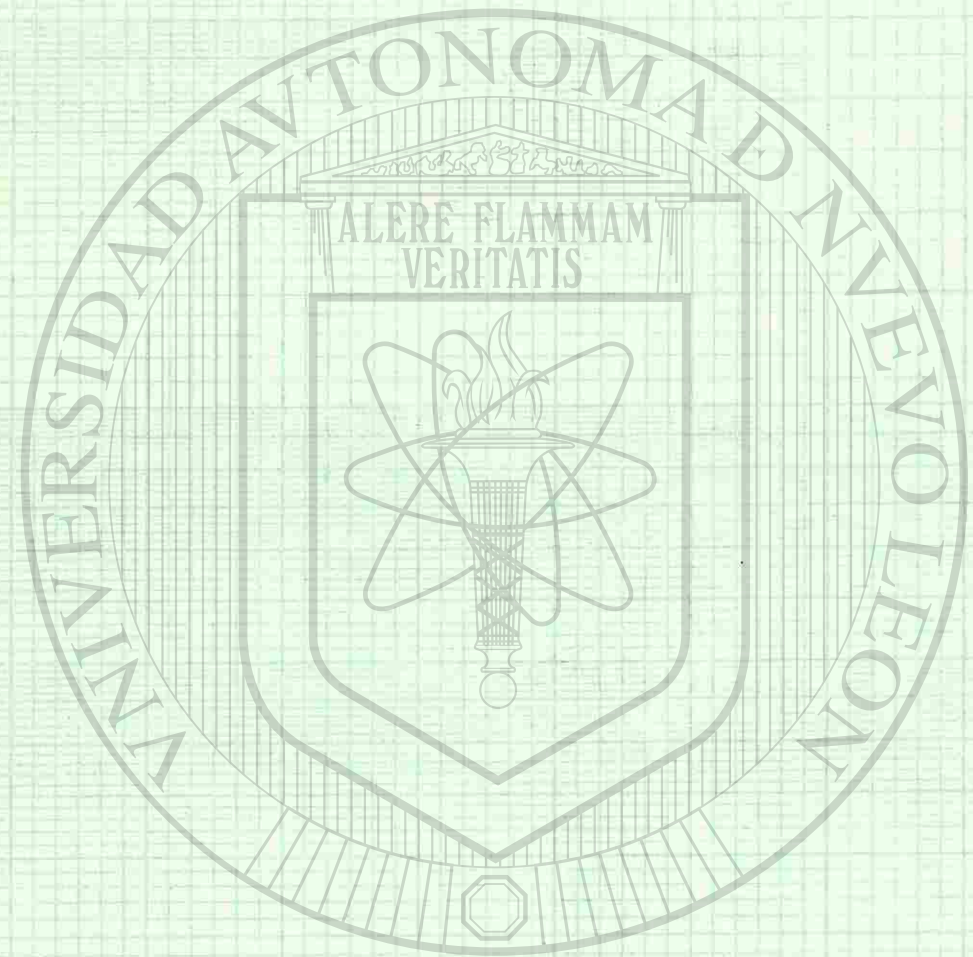


TABLA 1. EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO DE E. coli Y LA ACTIVIDAD OSMOPROTECTORA DE LA BETAINA.

CONDICIONES DE ENSAYO	MATRIZ	μ (h ⁻¹)

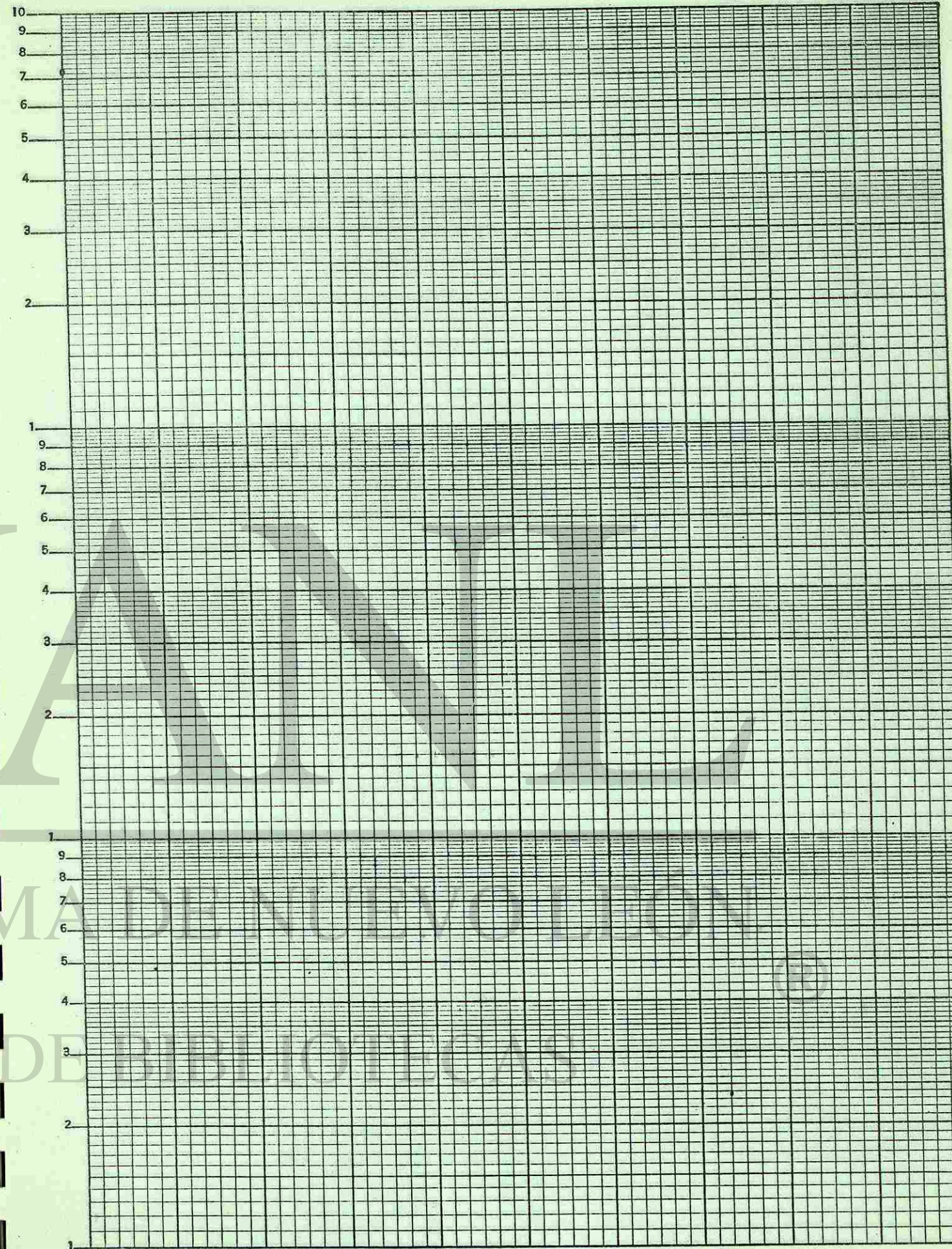


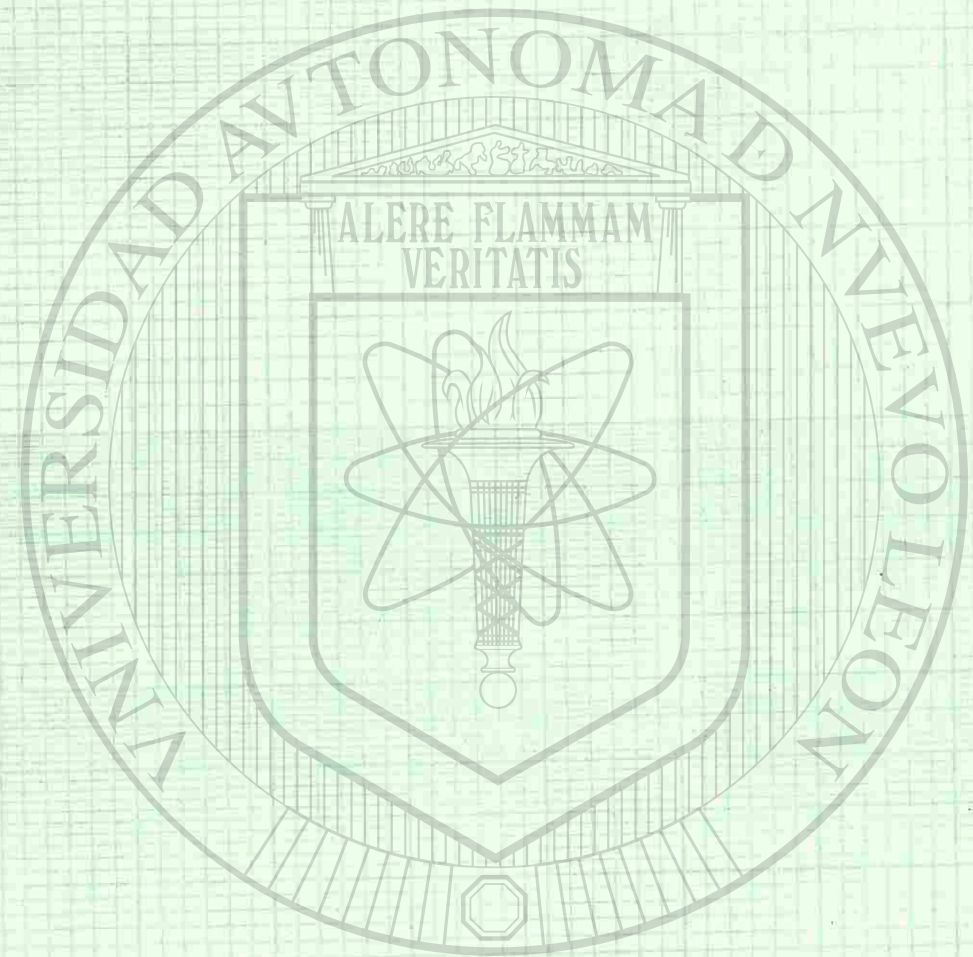
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TOLUCA DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

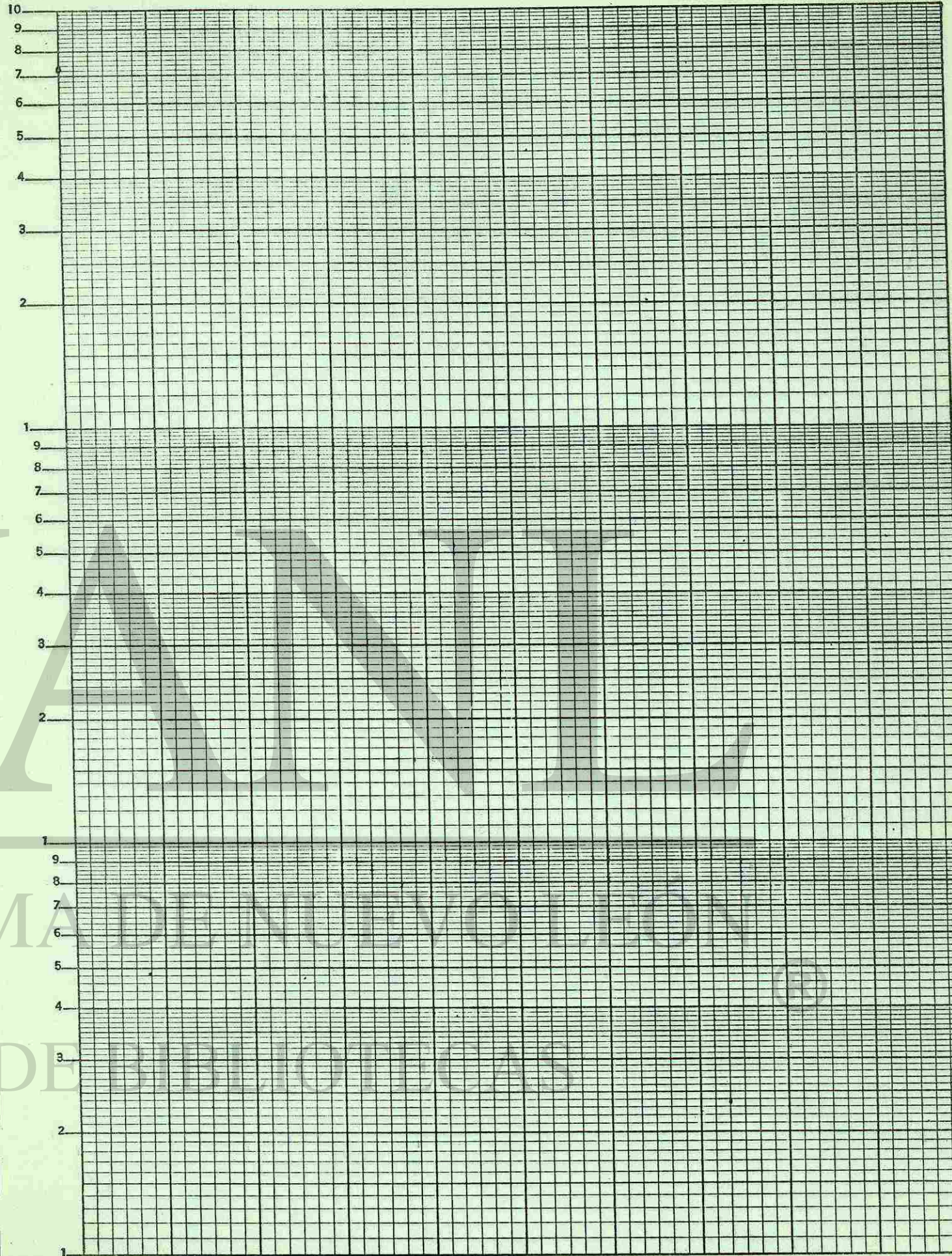
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

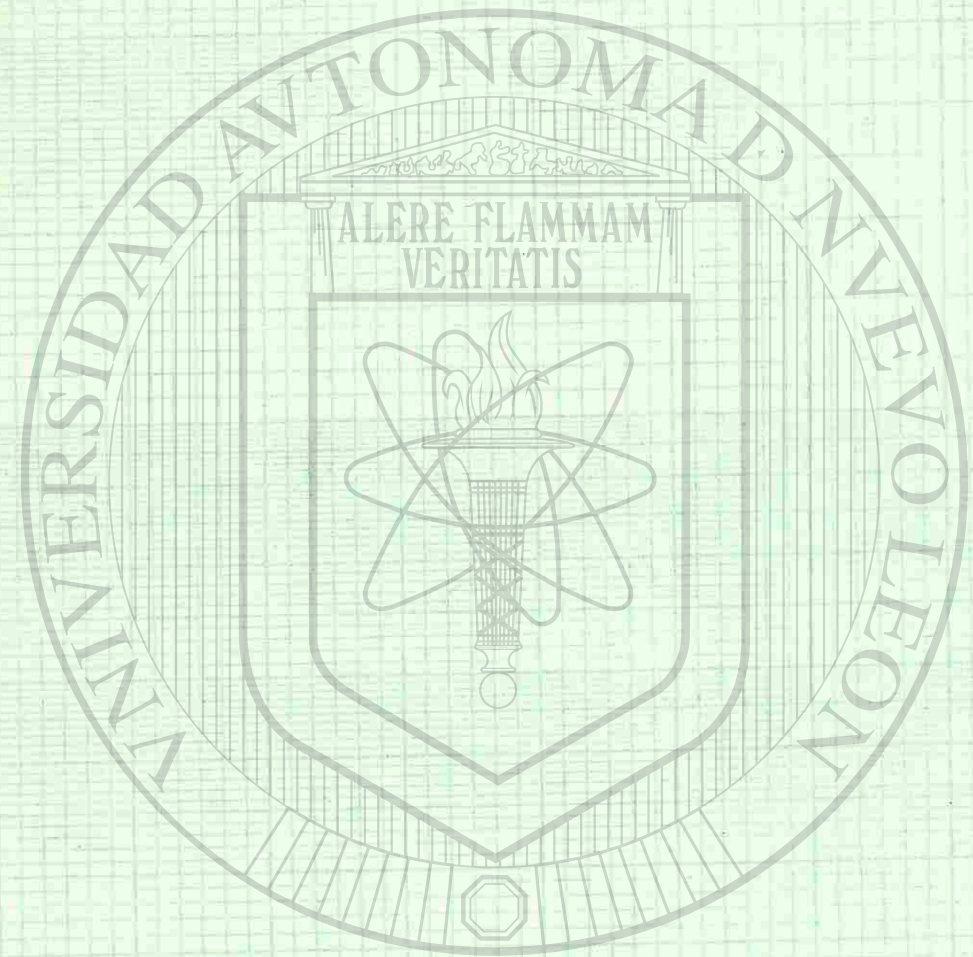




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

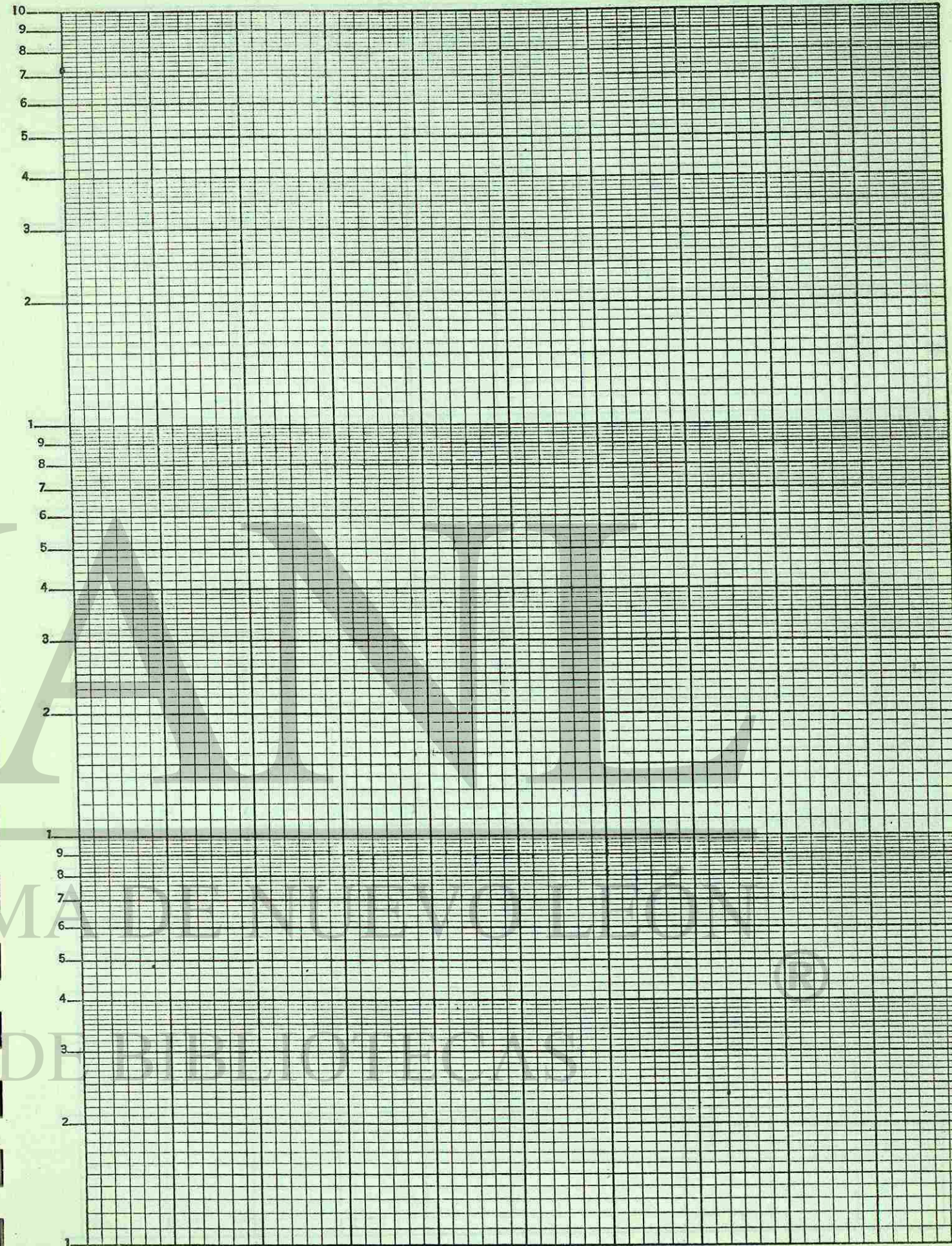
DIRECCIÓN GENERAL DE

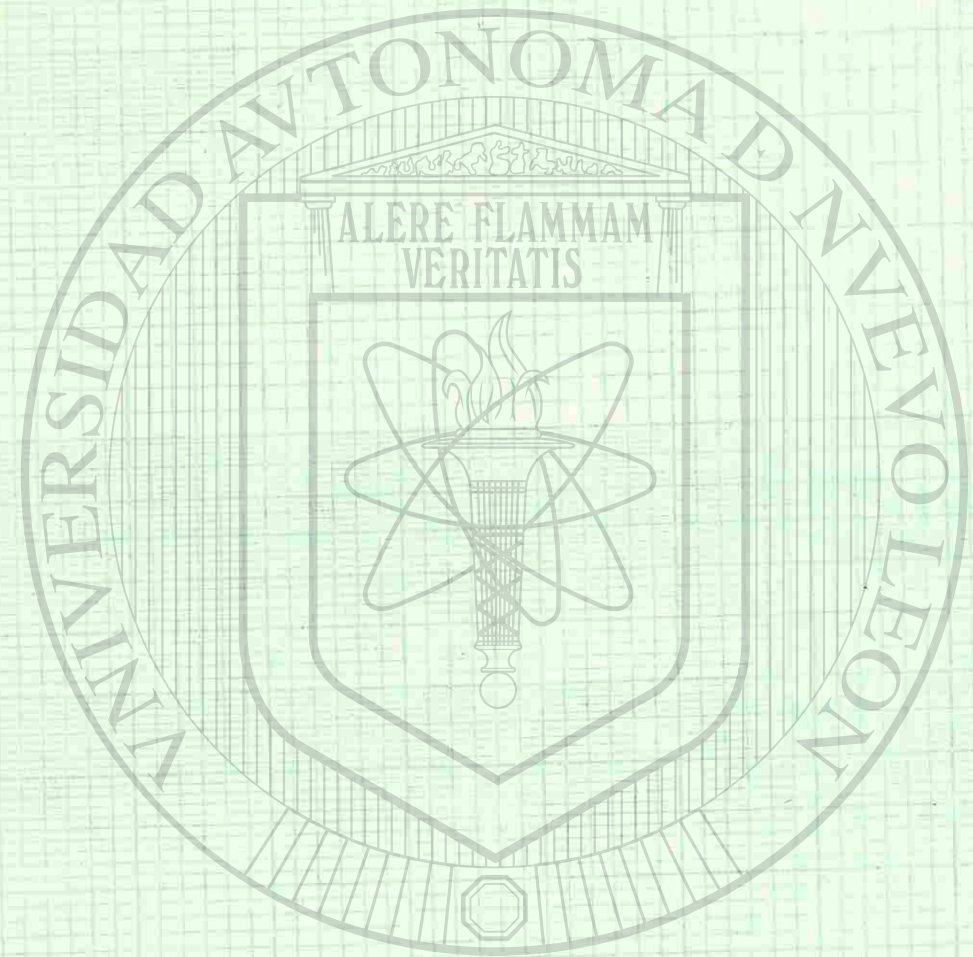




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DIRECCIÓN GENERAL DE

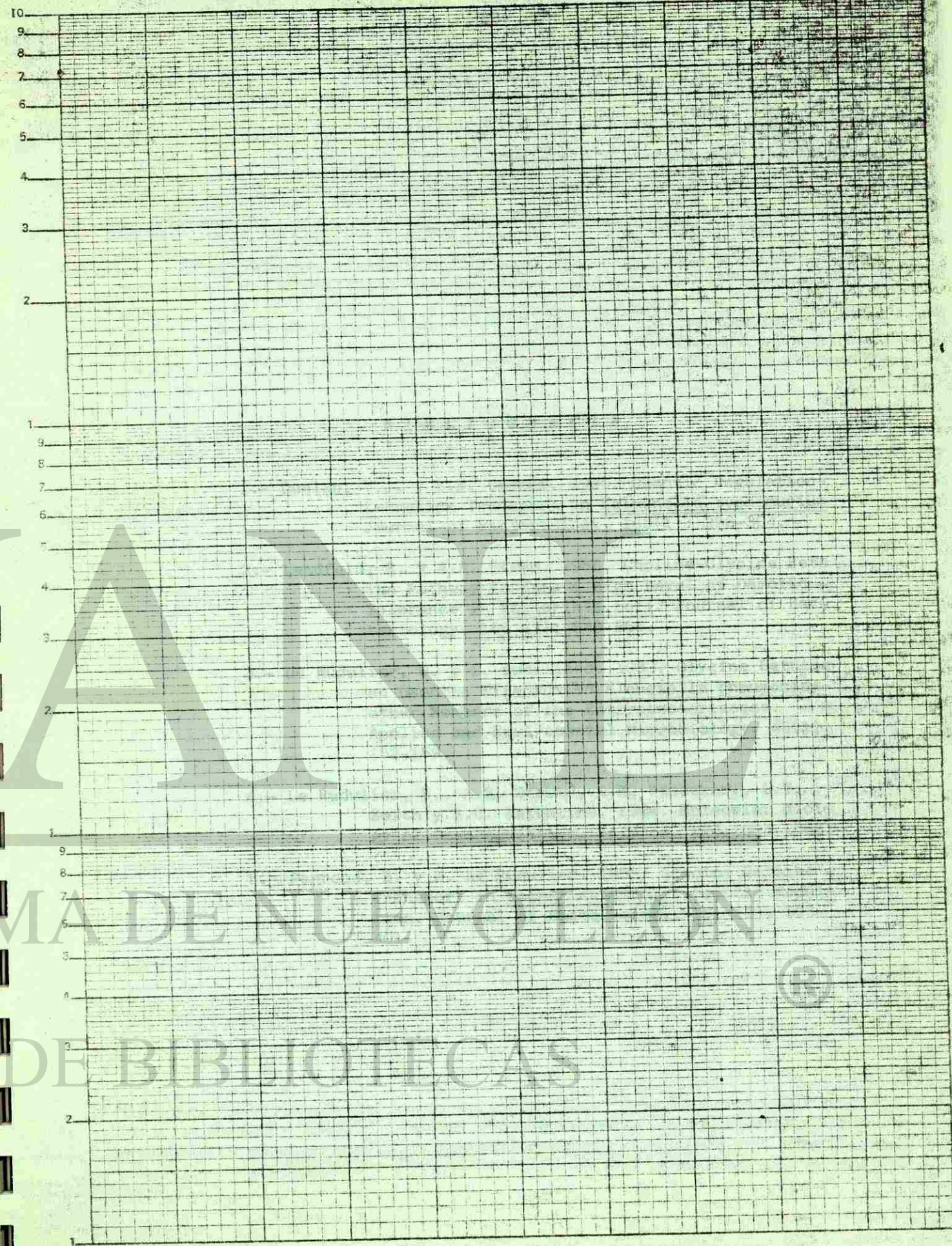




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

U A N L



EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio al cultivar a los microorganismos tratamos de proporcionarles las condiciones más adecuadas para su desarrollo, estas requieren varían intensamente de un organismo a otro, pero en general los requisitos básicos para que ocurra la multiplicación celular incluyen: un medio que contenga los nutrientes indispensables en cantidades apropiadas, una atmósfera, temperatura, presión osmótica, pH, humedad, condiciones de oxígeno, reducción y aireación adecuadas.

La modificación de estas condiciones influye en diferentes grados sobre el incremento o decremento de una población bacteriana viable.

BIBLIOGRAFÍA

1.- Dunlap, V.J. y L.N. Csonka. 1985. Osmotic Regulation-L-Proline Transport in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 163(1): 296-304.

OBJETIVOS

La finalidad de esta práctica es hacer que el estudiante conozca la influencia de los nutrientes en el crecimiento bacteriano, y determinar la influencia de los nutrientes en el crecimiento bacteriano.

2.- Landfald, B. y A.R. Strøm. 1986. Choline-Glycine Beta-ine Pathway Confers a High Level of Osmotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 165 (3): 849-855.

FUNDAMENTO

Al disolver un sólido en un líquido se requiere un aporte de energía para romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidos a las moléculas de agua. Este proceso es endotérmico y requiere un aporte de energía.

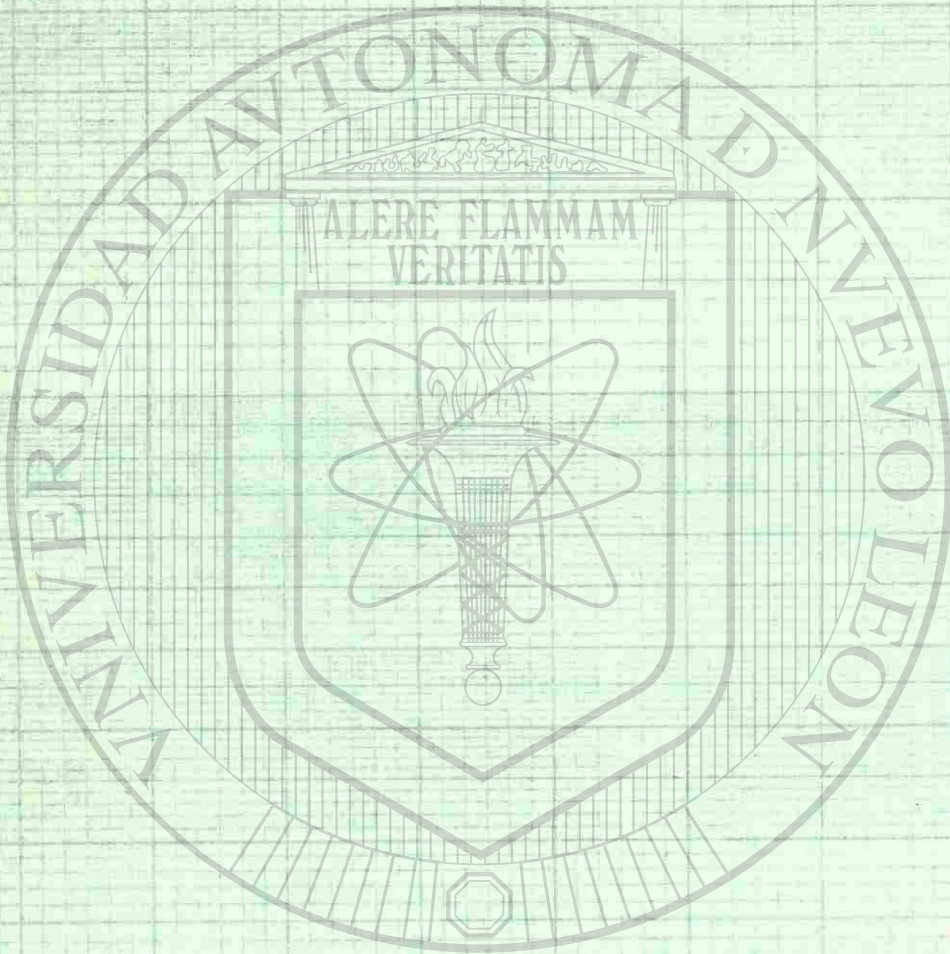
3.- Le Rudulier, D. y L. Bouillard. 1983. Glycine Betaine an Osmotic Effector in *Klebsiella pneumoniae* - other Members of the Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(1): 152-159.

4.- Le Rudulier, E., A.R. Strom., A.M. Dandekar., L.T. Smith y R.C. Valentine. 1984. Molecular Biology of Osmoregulation. *Science*. 224:1064-1068.

5.- Perroud, B. y D. Le Rudulier. 1985. Glycine Betaine - Transport in *Escherichia coli*: Osmotic Modulation. *Journal of Bacteriology*. 161 (1): 393-401.

La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo. La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo. La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo.

La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo. La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo. La velocidad de crecimiento bacteriano depende de la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRACTICA No. 10

EFFECTO DE LA CALIDAD DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

En el laboratorio al cultivar a los microorganismos tratamos de proporcionarles las condiciones más adecuadas para su desarrollo, estos requerimientos varían intensamente de un organismo a otro, pero en general los requisitos básicos para que ocurra la multiplicación celular incluyen: un medio que contenga los nutrientes indispensables en cantidades apropiadas, una atmósfera, temperatura, presión osmótica, pH, humedad, condiciones de óxido-reducción y aireación adecuadas.

La modificación de cualquiera de estos factores influirá en diferente grado sobre el incremento o decremento de una población bacteriana viable.

OBJETIVOS

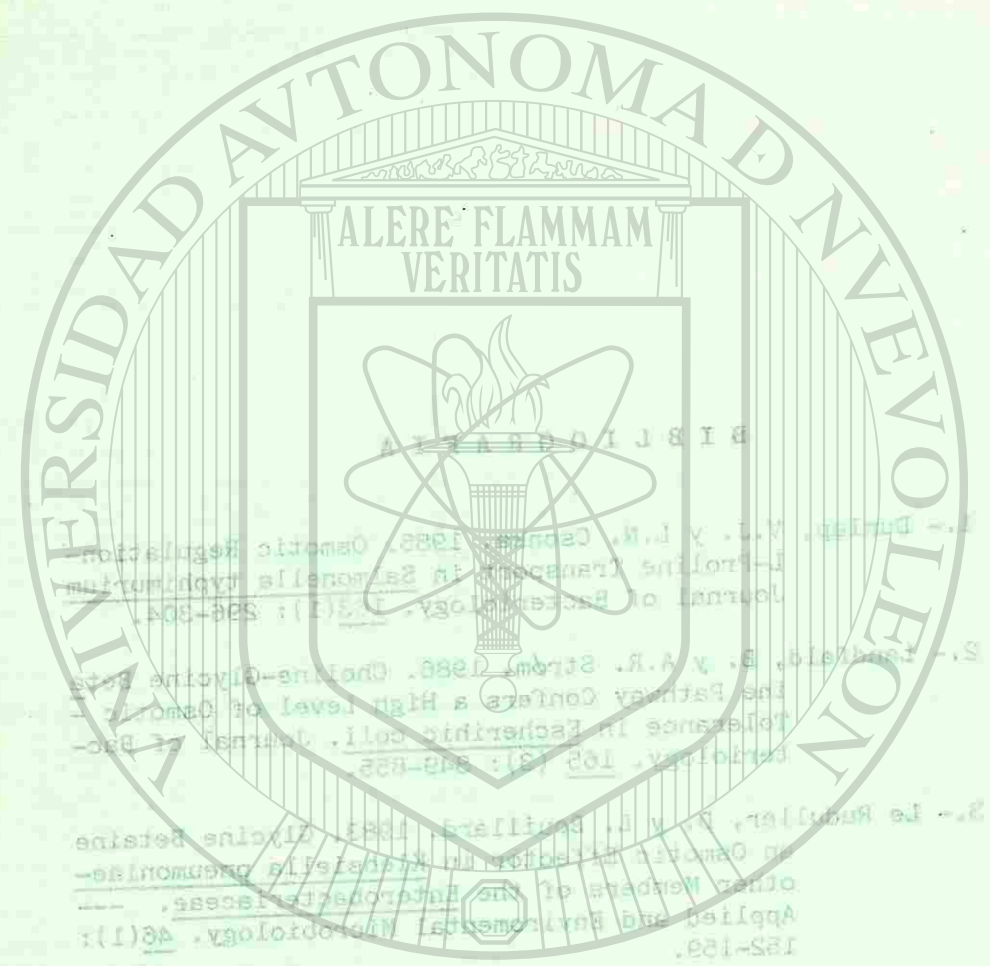
La finalidad de este ensayo es hacer crecer una bacteria en distintos medios de cultivo, cada uno de ellos con un número y tipo variable de fuente de carbono, y determinar su influencia sobre la velocidad de crecimiento.

FUNDAMENTO

Al diseñar un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, es conveniente conocer las características fisiológicas y capacidades metabólicas del organismo en particular, no obstante, el medio deberá proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos, a concentraciones que permitan un buen crecimiento, entre estos se incluye la fuente de carbono, fuente de energía, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo, fuente de azufre, nutrientes inorgánicos y factores de crecimiento si es necesario. Adicionalmente se procurará proveer al microorganismo de las condiciones ambientales que favorezcan su proliferación.

Respecto a los materiales nutritivos se ha observado que influyen notablemente sobre la velocidad de crecimiento según sea su concentración y calidad, en cuanto a lo último se ha advertido que cuando el medio contiene un sólo componente como fuente de carbono y energía además de los ingredientes necesarios, la velocidad de crecimiento desarrollada dependerá de las posibilidades de ese compuesto de proporcionar energía para las reacciones celulares y metabolitos carbonados indispensables para el crecimiento, por tal motivo algunas fuentes de carbono favorecen una velocidad mayor que otras.

Cuando se amplía el número de sustratos disponibles como fuente de carbono y energía, la velocidad de crecimiento sufre un incremento sustancial según sea el número de materiales adicionales, esto es debido a que la célula no invierte energía en sintetizarlos sino solamente los toma del medio, por consiguiente, la energía ahorrada en su síntesis se emplea en otros



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

procesos dependientes de energía como son la absorción de solutos, síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas, síntesis de estructuras celulares como pared celular, cápsula, membrana, etc. En medios enriquecidos el tiempo promedio de generación se reduce a escasos 15 minutos como ocurre con Salmonella typhimurium.

MATERIAL Y REACTIVOS

7 matraces nefelométricos de 250 ml, conteniendo 25 ml de medio como se indica enseguida:

- MATRAZ 1 : Medio de Glucosa y Sales
- MATRAZ 2 : Medio de Glutamato y sales
- MATRAZ 3 : Medio de Succinato y sales
- MATRAZ 4 : Medio de Lactosa y sales
- MATRAZ 5 : Agua Peptonada
- MATRAZ 6 : Caldo Nutritivo
- MATRAZ 7 : Caldo Infusión cerebro corazón

7 tubos de ensayo de 15 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio tal y como se indicó anteriormente.

- 1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria.
- 1 asa
- 1 mechero
- 1 pipeta graduada de 5 ml
- 1 tubo de 13 x 100 con Agar Nutritivo inclinado, conteniendo la cepa de Escherichia coli.
- 1 incubadora
- 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
- 1 fotocolorimetro equipado con filtro verde

Agua Peptonada: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10g; NaCl, 5 g. Los ingredientes se disuelven en agua destilada caliente, se filtra y luego se ajusta el pH a 7.2-7.4.

Medio Mínimo: incluye por litro de agua destilada los siguientes componentes: KH_2PO_4 , 3.0 g; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 7.5 g; NaCl, 0.5 g; NH_4Cl , 1.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.12 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 11 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg; la fuente de carbono (Glucosa, Succinato de sodio, Glutamato de sodio) 5 g. Ajustar el pH a 7.2.

Caldo Luria: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0 g; NaCl, 10 g.

MÉTODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche inoculando por asada 10 ml de Caldo Luria contenidos en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Emplear una cepa de E. coli. Incubar durante toda la noche (12-14 horas) a 37°C.

EFFECTO DE LA CALIDAD DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio se cultivan bacterias en condiciones de laboratorio. Las condiciones de cultivo varían en general los factores básicos para los cultivos bacterianos son: temperatura, humedad, presión osmótica, pH, luz, etc. La modificación de cualquiera de estos factores influye en el grado sobre el crecimiento o desarrollo de una población bacteriana visible.

OBJETIVOS

La finalidad de este ensayo es hacer crecer las bacterias en distintos medios de cultivo, variando de ellos con el número y tipo variables de fuentes de carbono, y de observar en influencia sobre la velocidad de crecimiento.

FUNDAMENTO

Al diseñar un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, es conveniente conocer las características físicas y químicas metabólicas del organismo en particular, de su hábitat, el medio deberá proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos, a concentraciones que permitan un buen crecimiento, entre estos se incluye la fuente de carbono, fuente de energía, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo, fuente de azufre, etc. Además, se procurará proveer al microorganismo de las condiciones ambientales que favorezcan su proliferación.

La velocidad de crecimiento de un organismo que crece en un medio de cultivo depende de la velocidad de crecimiento de las bacterias. La velocidad de crecimiento de las bacterias depende de las reacciones químicas de las bacterias. La velocidad de crecimiento de las bacterias depende de la velocidad de las reacciones químicas de las bacterias.

Cuando se analiza el número de bacterias disponibles como fuente de carbono y energía, la velocidad de crecimiento de un organismo depende de la velocidad de las reacciones químicas de las bacterias. La velocidad de crecimiento de las bacterias depende de la velocidad de las reacciones químicas de las bacterias.

- 2.- Determinar al fotocolorímetro la turbidez de los medios contenidos en los siete matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el tubo de ensayo de 18 x 150 mm que contenga el medio respectivo. La lectura registrada deberá sustraerse de cada una de las lecturas posteriores, la diferencia representará la turbidez debida a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transferir asepticamente a cada uno de los matraces 0.5 ml del cultivo de toda la noche y determinar inmediatamente la turbidez al fotocolorímetro, ésta será la turbidez correspondiente al tiempo cero.
- 4.- Incubar los matraces a 37°C con agitación durante 12 horas, determinando cada hora la turbidez de los cultivos.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente registrar los valores de turbidez mostrados por los cultivos durante la cinética de crecimiento realizada.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA EN LOS MATRACES						
	1	2	3	4	5	6	7
0							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

PROCESOS DEPENDIENTES DE ENERGÍA COMO SON LA ABSORCIÓN DE SOLUCIONES, ALASTASIA DE MACROMOLECULAS COMO RNA Y PROTEINAS, SÍNTESIS DE ESTRUCTURAS CELULARES COMO PARED CELULAR, CÁPSULA, MEMBRANA, ETC. EN MEDIOS ENRIQUESCIDOS EN TRAM- PO PROMEDIO DE GENERACIÓN SE REDUCE A ESPACIOS 10 MINUTOS COMO OCURRE CON SALMONELLA TYPHIMURIA.

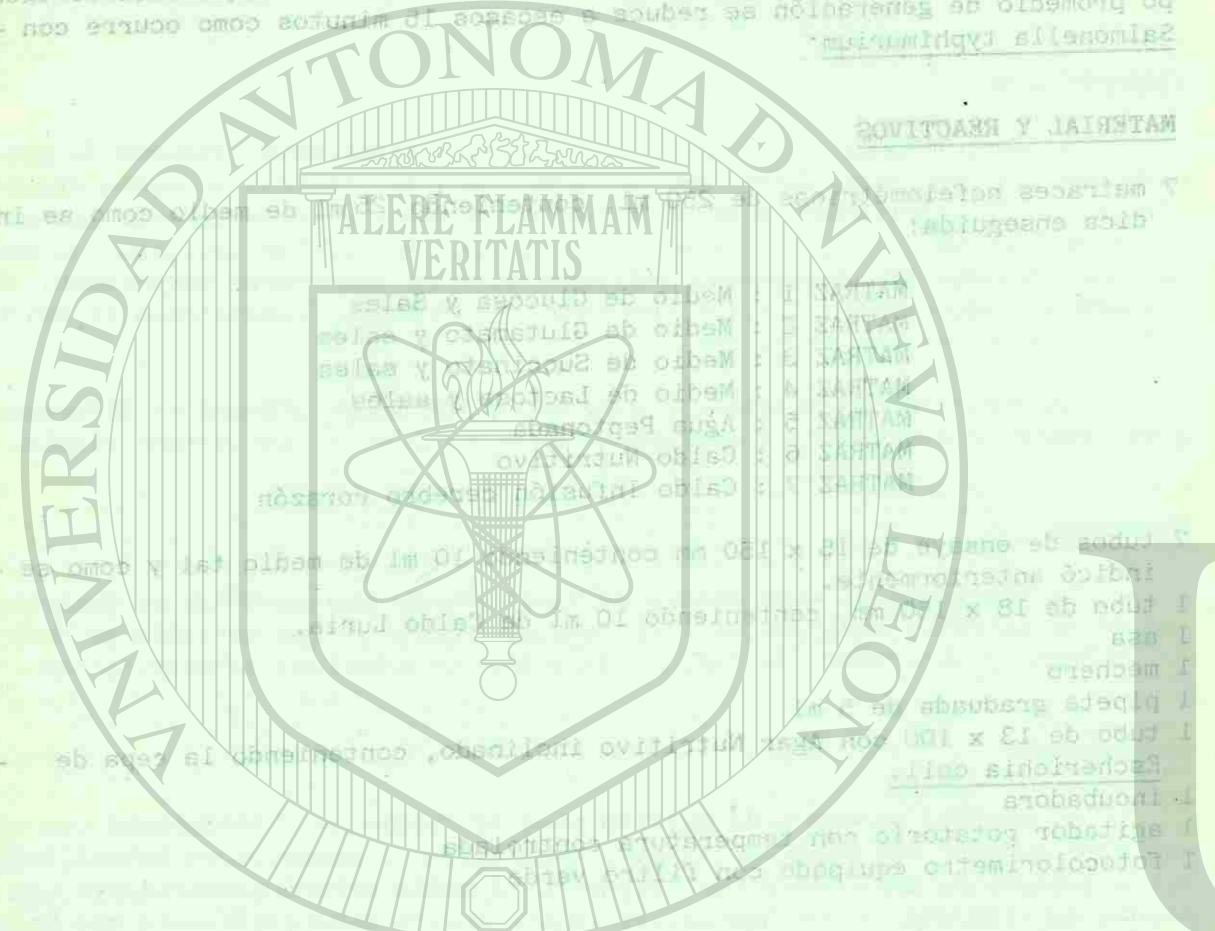
MATERIAL Y REACTIVOS

7 matraces nefelométricos de 18 x 150 mm. 1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm. 1 pipeta graduada de 1 ml. 1 pipeta graduada de 0.5 ml. 1 tubo de 13 x 100 mm con agitador magnético. 1 fotocolorímetro equipado con filtro verde. 1 incubadora. 1 agitador rotatorio con recipiente apropiado. 1 agua peptonada: contiene por litro de agua destilada: peptones, 10g; NaCl, 5 g. Los ingredientes se disuelven en agua destilada en un frasco de 1 litro y luego se ajusta el pH a 7.2-7.4.

Medio Minimal: lactosa por litro de agua destilada: lactosa, 10g; NaCl, 5g; K₂HPO₄, 0.5g; MgSO₄, 0.5g; FeSO₄, 0.01g; ZnSO₄, 0.01g; MnSO₄, 0.01g; CaCl₂, 0.01g; Vit. B₁₂, 0.01g; Vit. B₆, 0.01g; Vit. B₁, 0.01g; Vit. B₂, 0.01g; Vit. B₃, 0.01g; Vit. B₅, 0.01g; Vit. B₇, 0.01g; Vit. B₈, 0.01g; Vit. B₉, 0.01g; Vit. B₁₀, 0.01g; Vit. B₁₁, 0.01g; Vit. B₁₂, 0.01g; Vit. B₁₃, 0.01g; Vit. B₁₄, 0.01g; Vit. B₁₅, 0.01g; Vit. B₁₆, 0.01g; Vit. B₁₇, 0.01g; Vit. B₁₈, 0.01g; Vit. B₁₉, 0.01g; Vit. B₂₀, 0.01g; Vit. B₂₁, 0.01g; Vit. B₂₂, 0.01g; Vit. B₂₃, 0.01g; Vit. B₂₄, 0.01g; Vit. B₂₅, 0.01g; Vit. B₂₆, 0.01g; Vit. B₂₇, 0.01g; Vit. B₂₈, 0.01g; Vit. B₂₉, 0.01g; Vit. B₃₀, 0.01g; Vit. B₃₁, 0.01g; Vit. B₃₂, 0.01g; Vit. B₃₃, 0.01g; Vit. B₃₄, 0.01g; Vit. B₃₅, 0.01g; Vit. B₃₆, 0.01g; Vit. B₃₇, 0.01g; Vit. B₃₈, 0.01g; Vit. B₃₉, 0.01g; Vit. B₄₀, 0.01g; Vit. B₄₁, 0.01g; Vit. B₄₂, 0.01g; Vit. B₄₃, 0.01g; Vit. B₄₄, 0.01g; Vit. B₄₅, 0.01g; Vit. B₄₆, 0.01g; Vit. B₄₇, 0.01g; Vit. B₄₈, 0.01g; Vit. B₄₉, 0.01g; Vit. B₅₀, 0.01g; Vit. B₅₁, 0.01g; Vit. B₅₂, 0.01g; Vit. B₅₃, 0.01g; Vit. B₅₄, 0.01g; Vit. B₅₅, 0.01g; Vit. B₅₆, 0.01g; Vit. B₅₇, 0.01g; Vit. B₅₈, 0.01g; Vit. B₅₉, 0.01g; Vit. B₆₀, 0.01g; Vit. B₆₁, 0.01g; Vit. B₆₂, 0.01g; Vit. B₆₃, 0.01g; Vit. B₆₄, 0.01g; Vit. B₆₅, 0.01g; Vit. B₆₆, 0.01g; Vit. B₆₇, 0.01g; Vit. B₆₈, 0.01g; Vit. B₆₉, 0.01g; Vit. B₇₀, 0.01g; Vit. B₇₁, 0.01g; Vit. B₇₂, 0.01g; Vit. B₇₃, 0.01g; Vit. B₇₄, 0.01g; Vit. B₇₅, 0.01g; Vit. B₇₆, 0.01g; Vit. B₇₇, 0.01g; Vit. B₇₈, 0.01g; Vit. B₇₉, 0.01g; Vit. B₈₀, 0.01g; Vit. B₈₁, 0.01g; Vit. B₈₂, 0.01g; Vit. B₈₃, 0.01g; Vit. B₈₄, 0.01g; Vit. B₈₅, 0.01g; Vit. B₈₆, 0.01g; Vit. B₈₇, 0.01g; Vit. B₈₈, 0.01g; Vit. B₈₉, 0.01g; Vit. B₉₀, 0.01g; Vit. B₉₁, 0.01g; Vit. B₉₂, 0.01g; Vit. B₉₃, 0.01g; Vit. B₉₄, 0.01g; Vit. B₉₅, 0.01g; Vit. B₉₆, 0.01g; Vit. B₉₇, 0.01g; Vit. B₉₈, 0.01g; Vit. B₉₉, 0.01g; Vit. B₁₀₀, 0.01g.

MÉTODOS

1.- Preparar un cultivo de toda la noche inoculando por asepsia 10 ml de Caldo de Luria contenidos en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Registrar una ce- pa de E. coli. Incubar durante toda la noche (12-14 horas) a 37°C.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.- Determinar el fotocolimetro la fundida de los medios contenidos en los siete matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el tubo de ensayo de 18 x 130 mm que contiene el medio respectivo. La lectura registrada deberá sustraerse de cada una de las lecturas posteriores, la diferencia representará la fundida debida a las células presentes en el caldo.

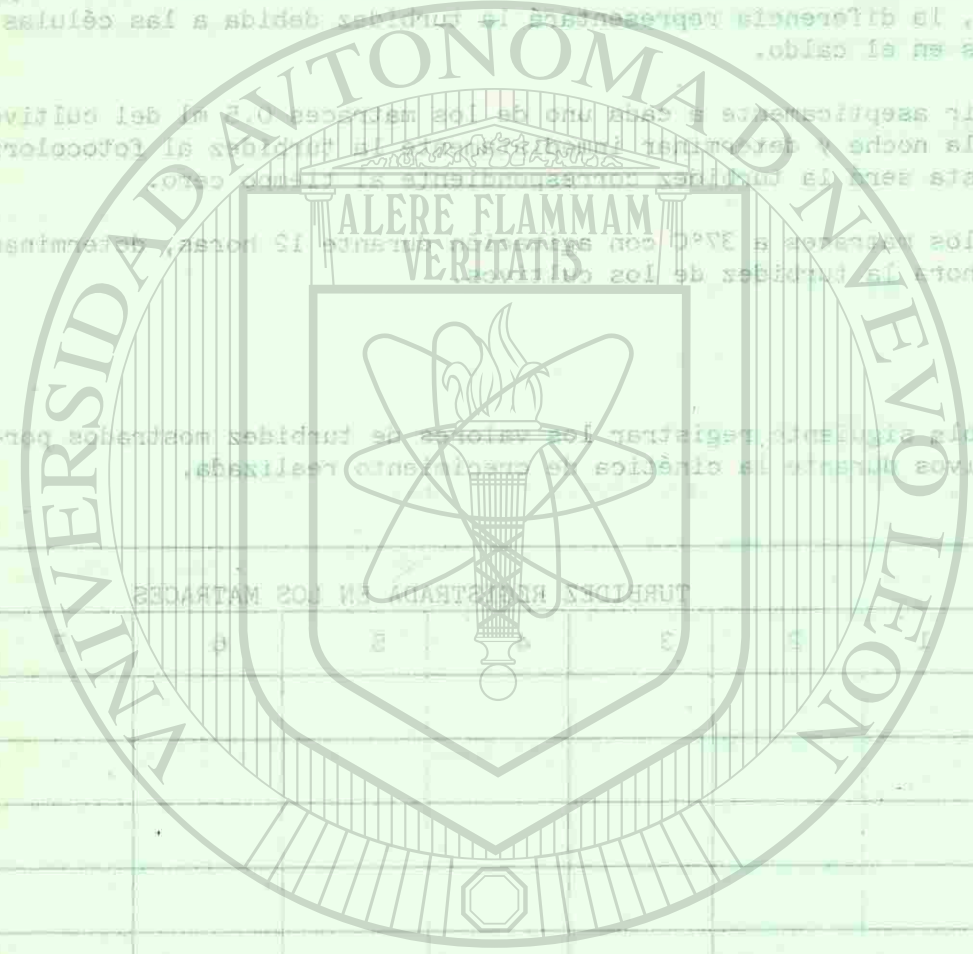
3.- Transferir asepticamente a cada uno de los matraces de 10 ml del cultivo de toda la noche y registrar la fundida en el fotocolimetro. metro, ésta será la fundida correspondiente al tiempo cero.

4.- Incubar los matraces a 37°C con agitación durante 12 horas, determinar de cada hora la fundida de los cultivos.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente registrar los valores de fundida mostrados por los cultivos durante la cinética de crecimiento realizada.

TIEMPO (h)	FUNDIDA REGISTRADA EN LOS MATRACES
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 2.- En la hoja de papel semilogarítmico grafique los datos de la tabla anterior colocando en las abscisas el tiempo en horas y en la ordenadas las Unidades Klett. Rotule correctamente la figura y emplee símbolos distintos para cada curva señalándolo apropiadamente en el pie de figura.
- 3.- Analice sus gráficas, para cada una seleccione los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento y sométalos a regresión lineal para calcular la velocidad de crecimiento (μ). Considere como X al tiempo en horas y como Y al logaritmo de las unidades Klett.

CALCULOS

U A N L



2.- Determinar el fotocolimetro la fundida de los medios contenidos en los siete matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el tubo de ensayo de 18 x 130 mm que contiene el medio respectivo. La lectura registrada deberá sustraerse de cada una de las lecturas posteriores, la diferencia representará la fundida debida a las células presentes en el caldo.

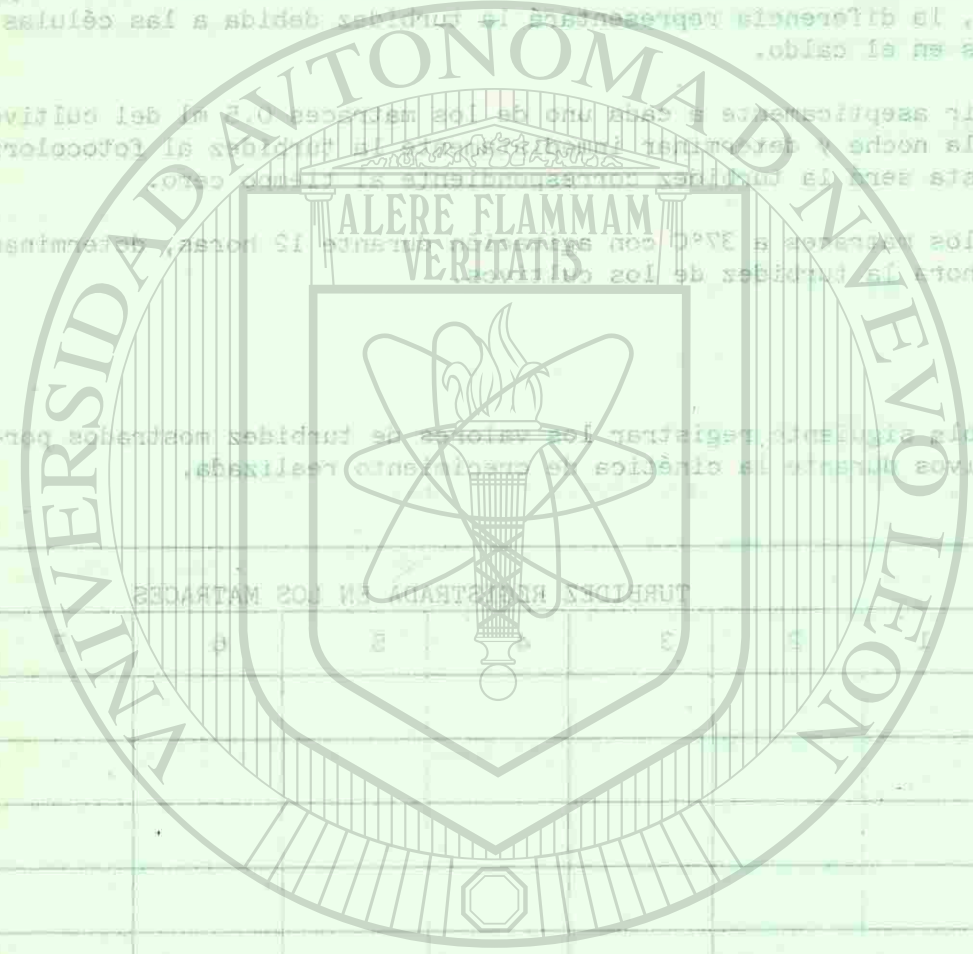
3.- Transferir asepticamente a cada uno de los matraces de 10 ml del cultivo de toda la noche y registrar la fundida en el fotocolimetro. metro, ésta será la fundida correspondiente al tiempo cero.

4.- Incubar los matraces a 37°C con agitación durante 12 horas, determinar de cada hora la fundida de los cultivos.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente registrar los valores de fundida mostrados por los cultivos durante la cinética de crecimiento realizada.

TIEMPO (h)	FUNDIDA REGISTRADA EN LOS MATRACES
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 2.- En la hoja de papel semilogarítmico grafique los datos de la tabla anterior colocando en las abscisas el tiempo en horas y en la ordenadas las Unidades Klett. Rotule correctamente la figura y emplee símbolos distintos para cada curva señalándolo apropiadamente en el pie de figura.
- 3.- Analice sus gráficas, para cada una seleccione los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento y sométalos a regresión lineal para calcular la velocidad de crecimiento (μ). Considere como X al tiempo en horas y como Y al logaritmo de las unidades Klett.

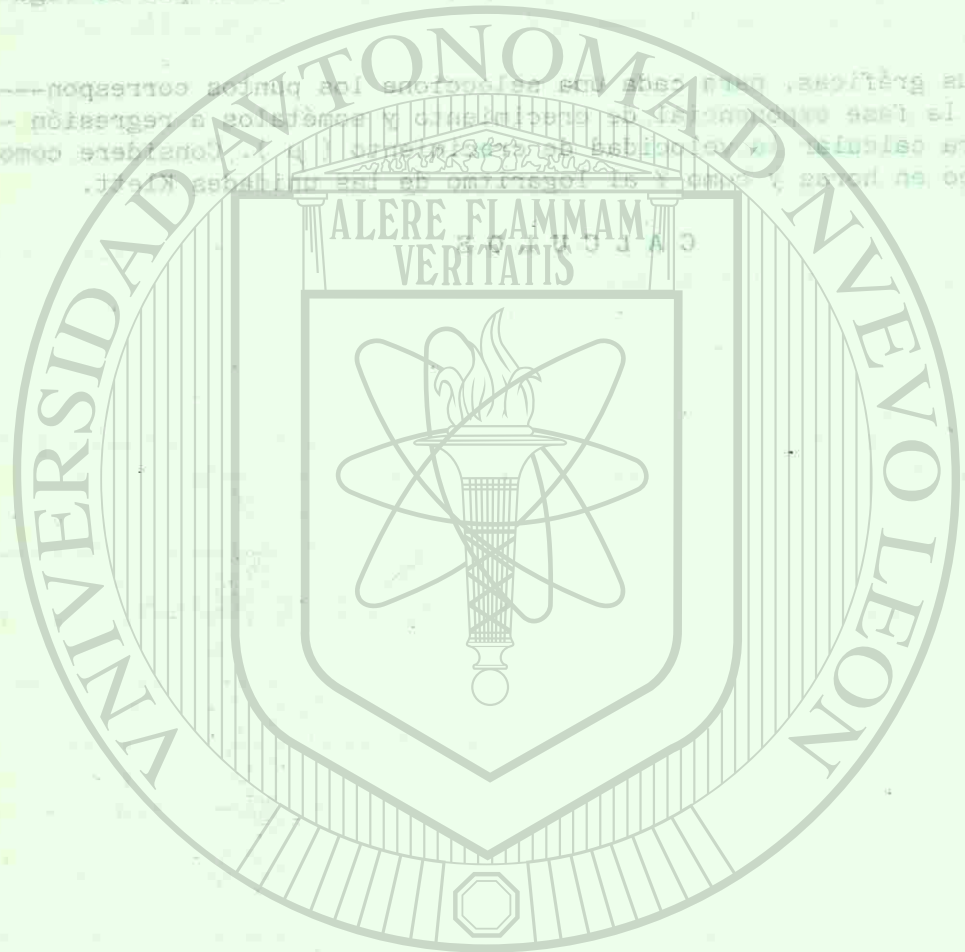
CALCULOS

U A N L



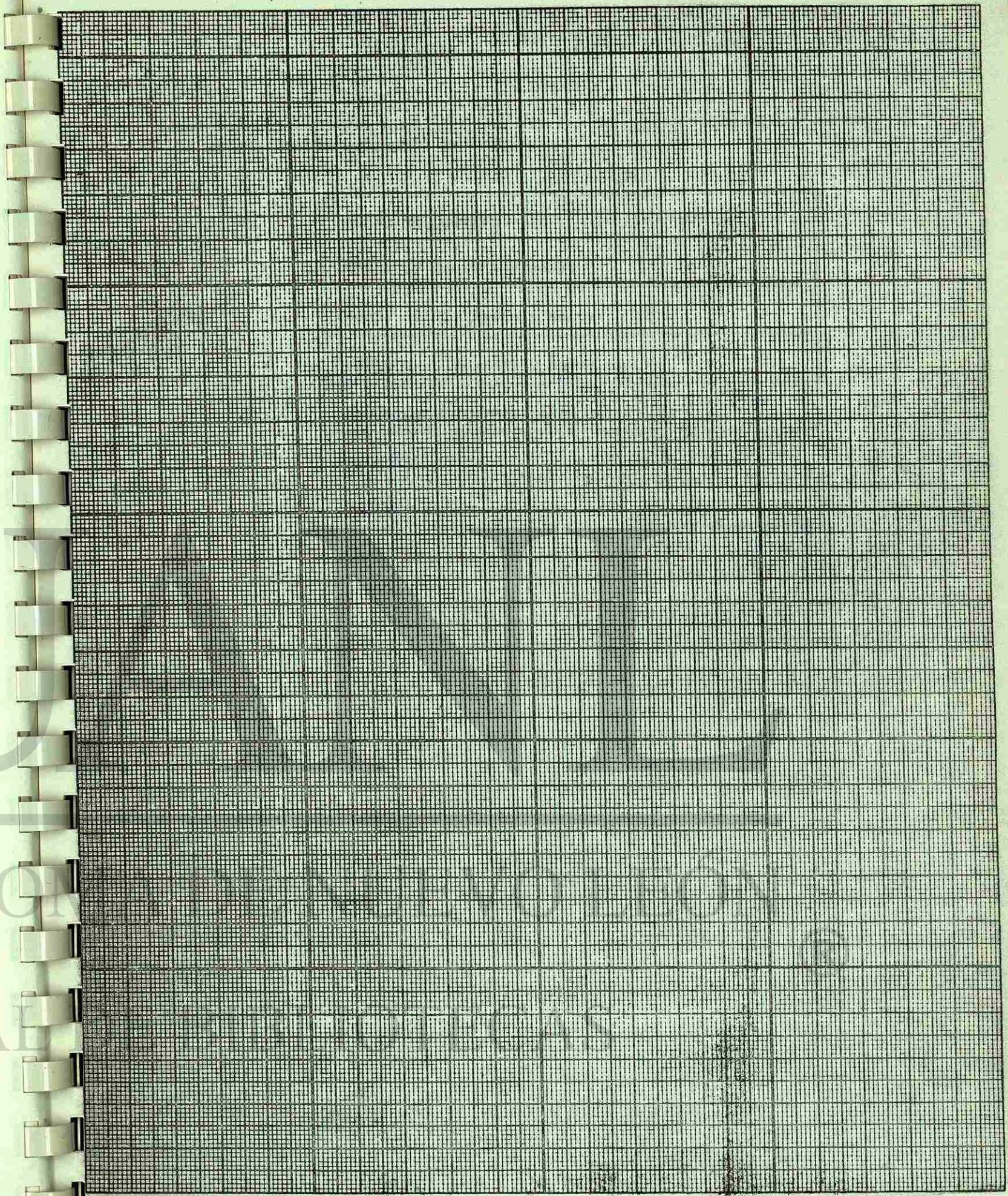
2.- En la hoja de papel semi-logarítmico grafique los datos de la tabla anterior colocando en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Marque correctamente la figura y emplee símbolos distintos para cada curva señalando su correspondencia en el pie de figura.

3.- Analice sus gráficas, para cada una señale las curvas correspondientes a la fase de crecimiento y a la fase de regresión. Trace líneas rectas para calcular la velocidad de crecimiento y considere como X el tiempo en horas y Y el logaritmo de las unidades Klett.



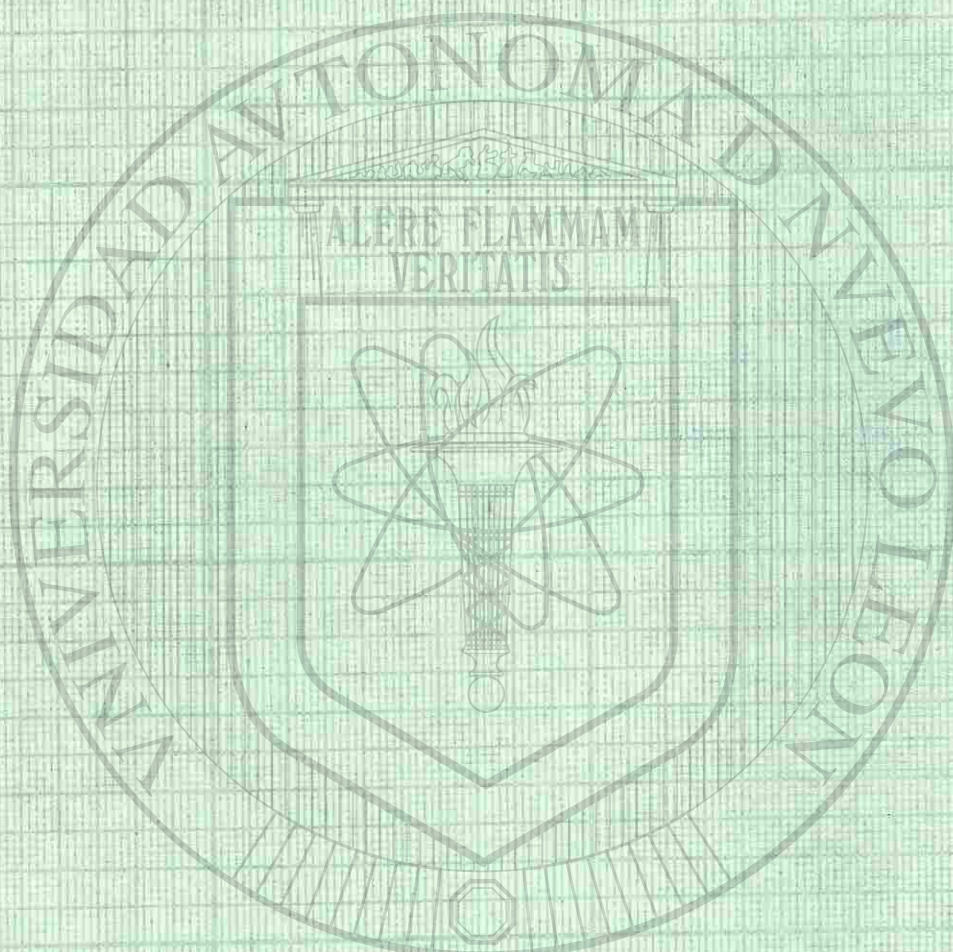
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DIRECCIÓN GENERAL



4.- Anote en la tabla siguiente los valores de μ desarrollados por la cepa en los distintos medios de cultivo

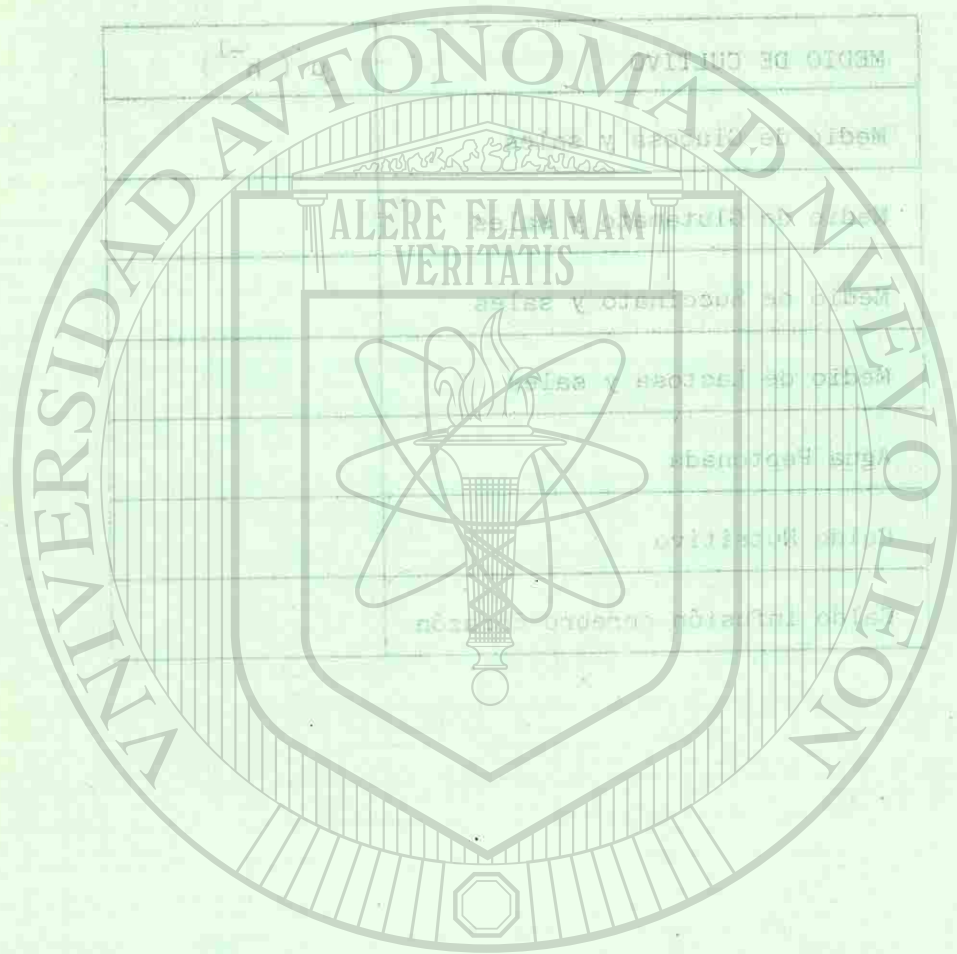
MEDIO DE CULTIVO	μ (h ⁻¹)
Medio de Glucosa y sales	
Medio de Glutamato y sales	
Medio de Succinato y sales	
Medio de Lactosa y sales	
Agua Peptonada	
Caldo Nutritivo	
Caldo infusión cerebro corazón	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.- Anote en la tabla siguiente los valores de p determinados por la curva en las distancias medidas de curvatura



DISCUSION

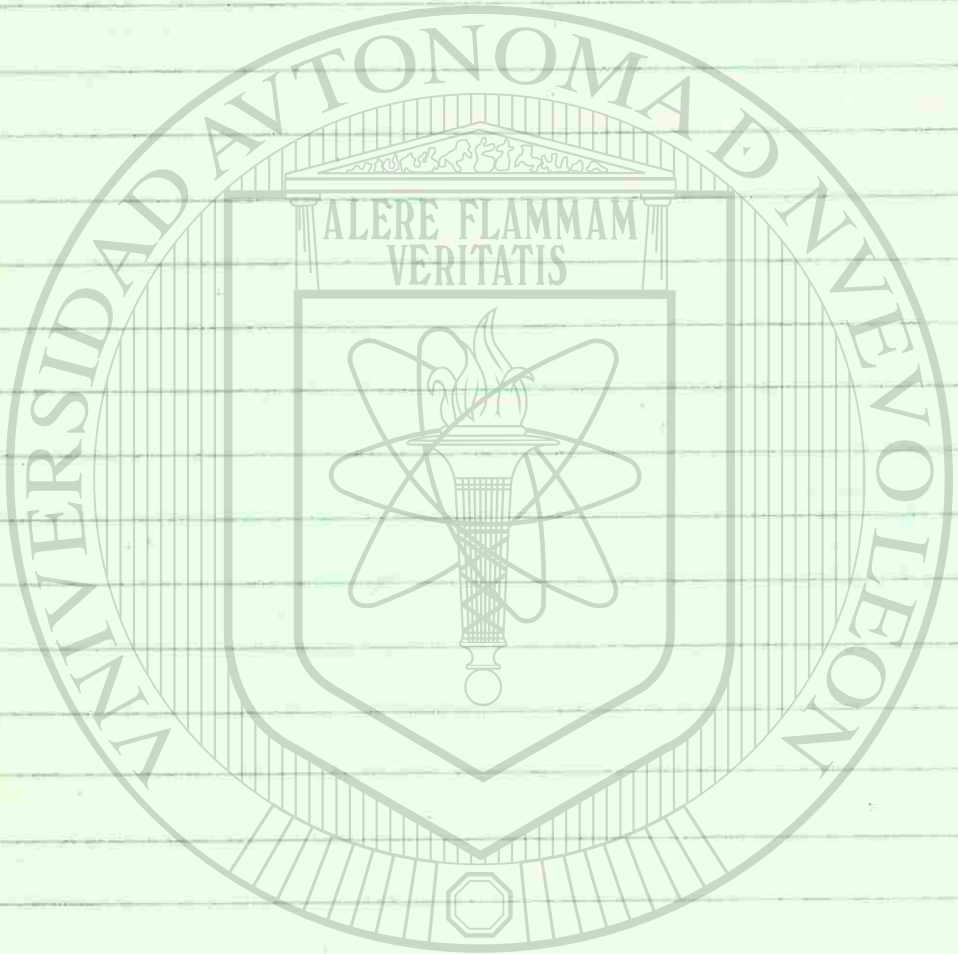
Handwritten notes and lines under the 'DISCUSION' header.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

Blank lined area for conclusions.

BIBLIOGRAFIA

Blank lined area for bibliography.

BIBLIOGRAFIA

Blank lined area for bibliography.



DETECCION DE INTERMEDIARIOS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA POR LEVADURAS

INTRODUCCION

Un gran número de microorganismos utilizan la ruta glicolítica para degradar a la glucosa y azúcares afines; mediante esta secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, la hexosa es escindida en dos moléculas de ácido pirúvico con formación concomitante de NADH, extrayéndose sólo una pequeña parte del elevado contenido energético de esta molécula. En condiciones aeróbicas, el ácido carboxílico producido es oxidado posteriormente hasta CO₂ y H₂O obteniéndose así una gran cantidad de energía, suficiente para apoyar el crecimiento celular. Sin embargo, parte del abastecimiento de glucosa no es oxidado como fuente de carbono.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Dawes, I.W. e I.W. Sutherland. 1978. Fisiología de los microorganismos. H. Blume ediciones. 1ª Edición española. pp 58-59
- 2.-Delaat, A.N.C. 1984. Microbiología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 2a. Edición. pp 63-67.
- 3.-Joklik, W.K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 18ª. Edición. pp 85-89.
- 4.-Stanier, R.Y., E.A. Adelberg y J.L. Ingraham. 1986. Ediciones Repla, S.A. versión española de la 4ª. Edición. pp 273-274.

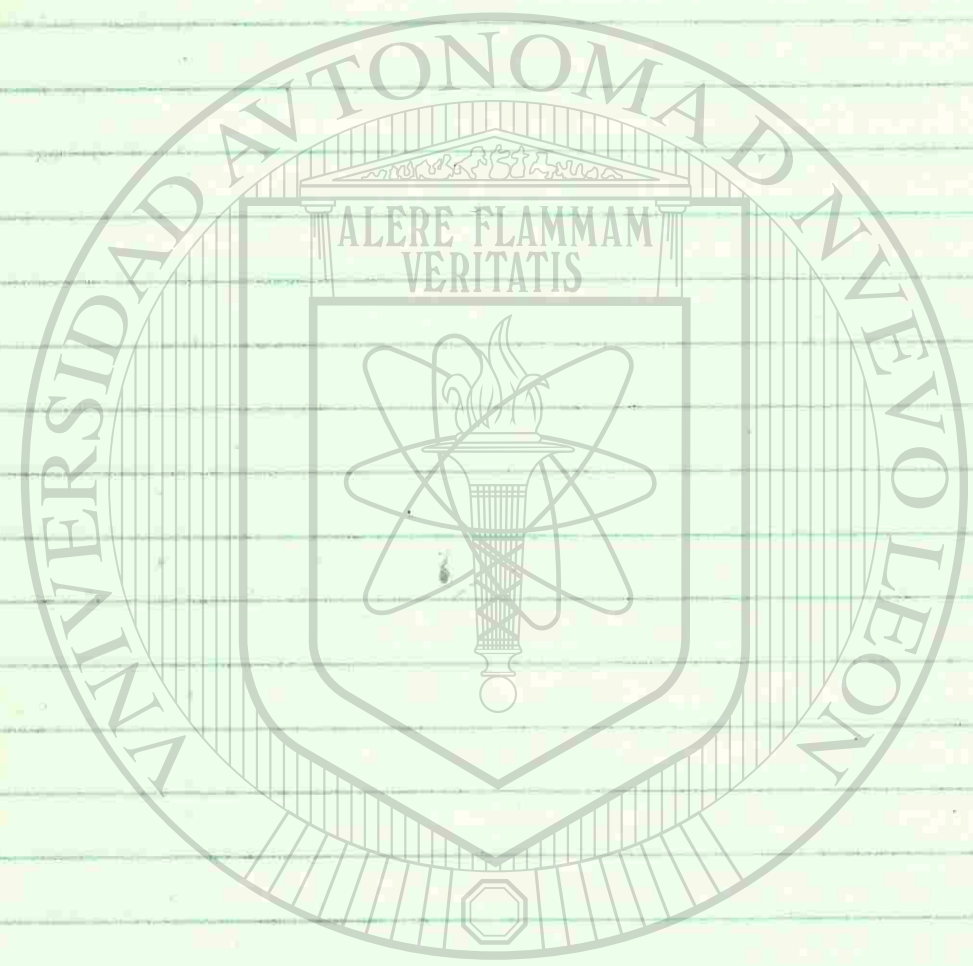
OBJETIVO

En este experimento intentaremos demostrar de una manera sencilla la participación del ácido pirúvico, acetilaldehído y CO₂ durante la fermentación alcohólica de azúcares por levaduras.

FUNDAMENTO

La fermentación alcohólica de azúcares consiste básicamente en la degradación de glucosa mediante la secuencia glicolítica que produce acción pirúvico y NADH. Dos reacciones adicionales son necesarias para completar la fermentación alcohólica: el ácido pirúvico es descarboxilado por acción de la enzima PIRUVATO CARBOXILASA para producir acetilaldehído; éste a su vez es reducido por la enzima ALCOHOL DESHIDROGENASA empleando los equivalentes reductores del NADH, generándose etanol. Con esta par de reacciones se consigue mantener en equilibrio las condiciones de oxidoreducción del ciclo. En la figura se esquematizan los eventos involucrados.

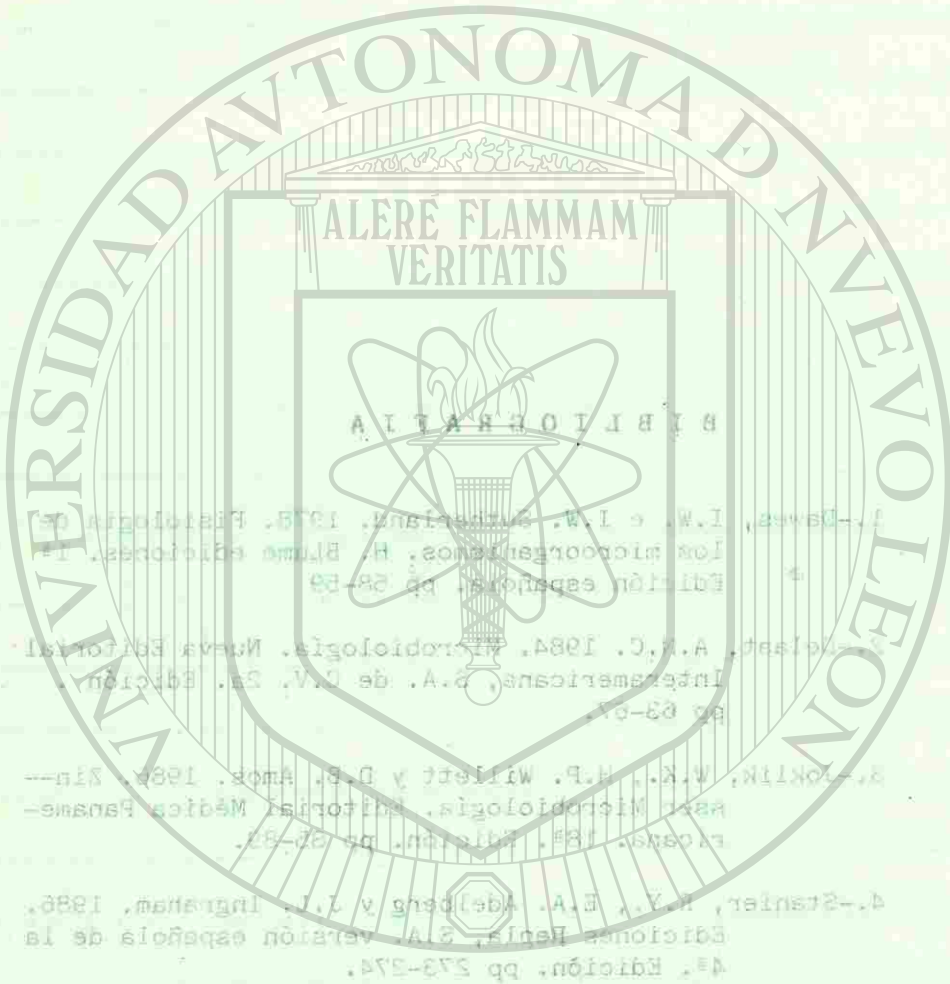
CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

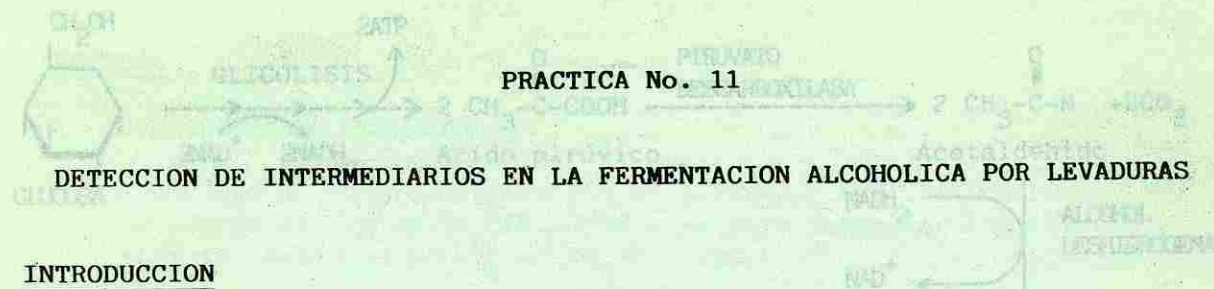
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE



PRACTICA No. 11

DETECCION DE INTERMEDIARIOS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA POR LEVADURAS

INTRODUCCION

Un gran número de microorganismos utilizan la ruta glicolítica para degradar a la glucosa y azúcares afines; mediante esta secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, la hexosa es escindida en dos moléculas de ácido pirúvico con formación concomitante de NADH₂, extrayéndose sólo una pequeña parte del elevado contenido energético de esta molécula. En condiciones aeróbicas, el ácido carboxílico producido es oxidado posteriormente hasta CO₂ y H₂O obteniéndose así una gran cantidad de energía, suficiente para apoyar el crecimiento celular, sin embargo, parte del abastecimiento de glucosa no es oxidado completamente sino se emplea como fuente de carbono.

En los organismos anaerobios o anaerobios facultativos el NADH₂ producido durante el proceso glicolítico debe ser reoxidado para mantener el equilibrio de oxidoreducción; esto se logra mediante reacciones subsecuentes propias de cada organismo y de las condiciones de crecimiento; así a partir del ácido pirúvico se pueden formar una gran variedad de productos consiguiéndose en algunos casos generar energía adicional en forma de ATP. Estas reacciones ocurren en ausencia de oxígeno, y al proceso completo se le denomina **fermentación**.

Las levaduras llevan a cabo principalmente una fermentación alcohólica donde el acetaldehído formado por descarboxilación del ácido pirúvico es usado como aceptor de protones para reoxidar al NADH₂ produciéndose por consiguiente etanol.

OBJETIVO

En este experimento intentaremos demostrar de una manera sencilla la participación del ácido pirúvico, acetaldehído y CO₂ durante la fermentación alcohólica de glucosa por levaduras.

FUNDAMENTO

La fermentación alcohólica de azúcares consiste básicamente en la degradación de glucosa mediante la secuencia glicolítica que produce ácido pirúvico y NADH₂. Dos reacciones adicionales son necesarias para completar el proceso, en la primera el ácido pirúvico es descarboxilado por acción de la enzima PIRUVATO DESCARBOXILASA produciéndose acetaldehído; éste a su vez es reducido por la enzima ALCOHOL DESHIDROGENASA empleando los equivalentes reductores del NADH₂, generándose etanol. Con este par de reacciones se consigue mantener en equilibrio las condiciones de oxidoreducción del citosol. En la figura se esquematizan los eventos involucrados.

DETECCION DE INTERMEDIARIOS EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA POR LEVADURAS

INTRODUCCION

Un gran número de microorganismos, especialmente las levaduras, son capaces de transformar la glucosa en alcohol y CO₂. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. Durante este proceso, la glucosa se convierte en piruvato a través de la glicólisis. El piruvato puede ser convertido en alcohol y CO₂ por la enzima piruvato descarboxilasa. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. En este experimento se pretende demostrar la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.

La glicólisis es el primer paso de la fermentación alcohólica. En este proceso, la glucosa se convierte en piruvato. Este proceso requiere de enzimas y de un agente reductor como el NAD⁺. Durante la glicólisis, el NAD⁺ se reduce a NADH₂. El piruvato puede ser convertido en alcohol y CO₂ por la enzima piruvato descarboxilasa. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. En este experimento se pretende demostrar la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.

El acetaldehído es un intermediario de la fermentación alcohólica. Este compuesto se forma a partir del piruvato por la acción de la enzima piruvato descarboxilasa. El acetaldehído puede ser convertido en alcohol y CO₂ por la enzima alcohol deshidrogenasa. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. En este experimento se pretende demostrar la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.

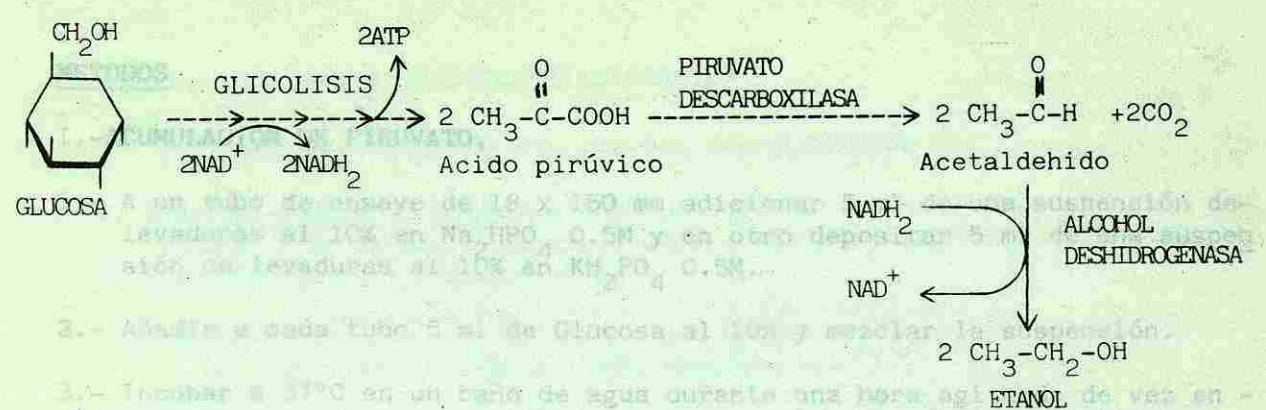
Las levaduras llevan a cabo principalmente una fermentación alcohólica. Durante este proceso, la glucosa se convierte en alcohol y CO₂. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. En este experimento se pretende demostrar la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.

OBJETIVO

En este experimento intentaremos demostrar de una manera sencilla la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.

FUNDAMENTO

La fermentación alcohólica de azúcares consiste básicamente en la degradación de la glucosa mediante la secuencia glicolítica que produce ácido pirúvico. Este ácido pirúvico puede ser convertido en alcohol y CO₂ por la enzima piruvato descarboxilasa. Este proceso se denomina fermentación alcohólica. En este experimento se pretende demostrar la presencia de los intermediarios de la fermentación alcohólica: piruvato y acetaldehído.



Para conseguir la acumulación del ácido pirúvico y poderlo detectar, la fermentación se llevará a cabo en condiciones ligeramente alcalinas para inactivar a la enzima Piruvato Descarboxilasa. La identificación se hará mediante dos pruebas cualitativas coloreadas. La acumulación de acetaldehído se logrará adicionando sulfito de sodio al medio de cultivo, este agente acompleja al acetaldehído formando un producto bisulfítico de adición soluble en agua, la reacción es como sigue:

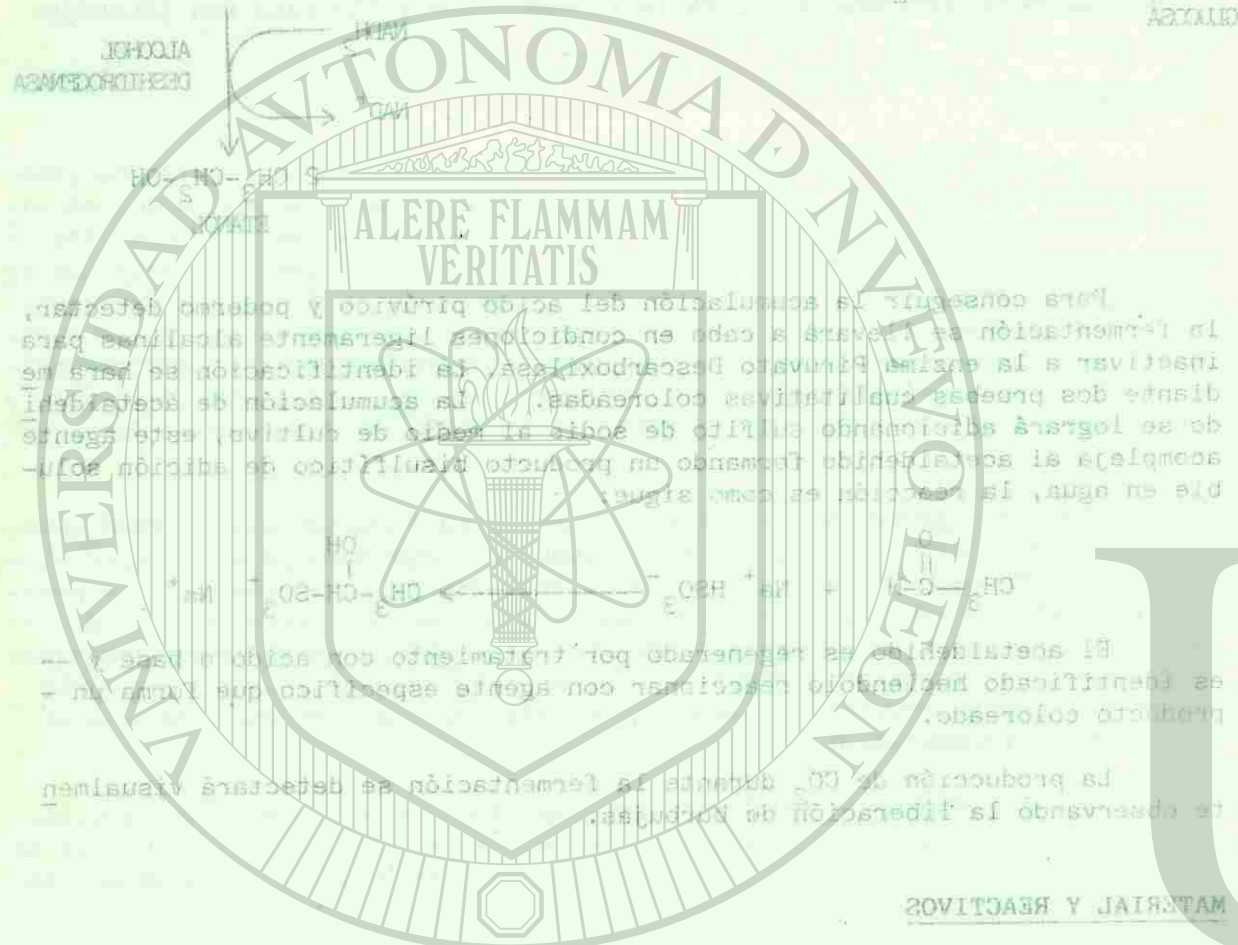


El acetaldehído es regenerado por tratamiento con ácido o base y es identificado haciéndolo reaccionar con agente específico que forma un producto coloreado.

La producción de CO₂ durante la fermentación se detectará visualmente observando la liberación de burbujas.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 20 tubos de ensaye de 18 x 150 mm
- 10 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 1 gradilla
- 1 piceta con agua destilada
- 6 pipetas graduadas de 5 ml
- 1 espátula
- 1 centrifuga
- 1 baño de agua
- 1 balanza granataria
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en Na₂HPO₄ 0.5M
- 5 ml de suspensión de levaduras al 10% en KH₂PO₄ 0.5M
- 10 ml de suspensión de levaduras al 10% en agua
- 20 ml de Glucosa al 10% en agua
- 2 ml de Nitroprusiato de sodio al 0.5% en agua recientemente preparado
- 4 ml de ácido tricloroacético al 10%
- 10 ml de hidroxido de amonio concentrado
- 6 gramos de (NH₄)₂SO₄
- 0.5 gramos de sulfito de sodio
- 2 ml de NaOH al 10%
- 2 ml de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M
- 4 ml de Bpiridina al 3%



MATERIAL Y REACTIVOS

20 tubos de ensayo de 18 x 150 mm
 10 tubos de ensayo de 13 x 100 mm
 1 gradilla
 1 placa con agua destilada
 1 placa con agua de 2 ml
 1 espatula
 1 pipeta
 1 balón de agua
 1 balanza granataria
 2 ml de suspensión de levadura al 10% en Na₂HPO₄ 0.5M
 5 ml de suspensión de levadura al 10% en KH₂PO₄ 0.5M
 10 ml de suspensión de levadura al 10% en agua
 10 ml de agua al 10% en agua
 5 ml de Nitroprusiato de sodio al 0.5% en agua recientemente preparado
 4 ml de ácido tricloroacético al 10%
 10 ml de hidróxido de amonio concentrado
 6 gramos de (NH₄)₂SO₄
 0.5 gramos de sulfato de sodio
 2 ml de NaOH al 10%
 2 ml de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M
 4 ml de Biquinina al 3%

MÉTODOS

I.-ACUMULACION DE PIRUVATO.

- 1.- A un tubo de ensayo de 18 x 150 mm adicionar 5 ml de una suspensión de levaduras al 10% en Na₂HPO₄ 0.5M y en otro depositar 5 ml de una suspensión de levaduras al 10% en KH₂PO₄ 0.5M.
- 2.- Añadir a cada tubo 5 ml de Glucosa al 10% y mezclar la suspensión.
- 3.- Incubar a 37°C en un baño de agua durante una hora agitando de vez en cuando.
- 4.- Observar la velocidad de desprendimiento de burbujas en los tubos y registrarla.
- 5.- Al terminar la incubación agregar 2 ml de ácido tricloroacético al 10% a ambos tubos y mezclar vigorosamente.
- 6.- Distribuir el contenido de cada tubo a un par de tubos de 13 x 100 mm y rotularlos como SN1 y SN2 respectivamente. Centrifugar a 3,000 r.p.m.- por 10 minutos.
- 7.- Con los sobrenadantes SN1 realizar la Prueba del Nitroprusiato de sodio y con los SN2 la prueba de la dinitrofenilhidracina para identificar la presencia de piruvato.

II.-DETECCION DE PIRUVATO

A) PRUEBA DEL NITROPRUSIATO DE SODIO

- Efectuar lo siguiente con los tubos SN1:
- 1.- En un tubo de ensayo de 18 x 150 mm agregar con una espatula suficiente (NH₄)₂SO₄ solido hasta llenar una altura de 1 cm a partir del fondo.
 - 2.- Adicionar 2 ml de sobrenadante SN1 y mezclar.
 - 3.- Agregar 4 gotas de una solución recientemente preparada de Nitroprusiato de sodio al 0.5% y mezclar vigorosamente.
 - 4.- Por la pared interna del tubo depositar lentamente 5 ml de NH₄OH concentrado de manera que se estratifique. **NO MEZCLAR.**
 - 5.- Colocar el tubo de ensayo en la gradilla y dejar reposar 15 minutos.
 - 6.- Observar la aparición de un anillo verde o azul en la interfase y comparar la intensidad del color entre los dos sobrenadantes SN1.

NOTA: Cuando en el sobrenadante ocurren compuestos con grupo tiol libre, aparecerá un anillo de color rosa antes de que aparezca el color verde o azul característico.

B) PRUEBA DE LA 2,4 DINITROFENILHIDRACINA

Realizar lo siguiente con los dos sobrenadantes SN2:

- 1.- Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm y adicionar 1 ml de una solución de 2,4 dinitrofenilhidracina saturada en HCl 2M, mezclar homogéneamente.
- 2.- Transferir 5 gotas de esta mezcla a otro tubo de ensaye de 18 x 150 mm y agregar 1 ml de NaOH al 10%, mezclar.
- 3.- Enseguida añadir 3 ml de agua destilada y mezclar nuevamente. Dejar reposar durante 15 minutos.
- 4.- Si la solución toma una coloración café rojiza oscura indicará la presencia de piruvato. Compare la intensidad de color desarrollada con los dos sobrenadantes SN2 y registre la.

III.- ACUMULACION DE ACETALDEHIDO

- 1.- En dos tubos de ensaye de 18 x 150 mm depositar 5 ml de una suspensión de levadura al 10% en agua respectivamente.
- 2.- Añadir 0.5 gramos de sulfito de sodio a uno de los tubos y mezclar.
- 3.- Adicionar a ambos tubos 5 ml de glucosa al 10% y homogenizar.
- 4.- Incubar los tubos a 37°C en baño de agua durante una hora.
- 5.- Después de la incubación distribuir el contenido de cada tubo en un par de tubos de ensaye de 13 x 100 mm rotulados SNA y SNB respectivamente.
- 6.- Centrifugar los 4 tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 7.- Emplear solamente los sobrenadantes SNA para hacer la identificación de acetaldehído, los sobrenadantes SNB quedarán en reserva.

IV.- DETECCION DE ACETALDEHIDO

A) PRUEBA DE LA BIPIRIDINA

Efectuar lo siguiente solamente con los sobrenadantes SNA: [®]

- 1.- Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de 18 x 150 mm y adicionar 0.5 ml de una solución recientemente preparada de nitroprusiato de sodio al 0.5%.
- 2.- Enseguida añadir 2 ml de Biperidina al 3% en agua y mezclar, dejar reposar 15 minutos; si está presente el acetaldehído se observará un color rosa. Comparar las intensidades de color dadas por los dos sobrenadantes.

B) PRUEBA DE LA S₂A DINITROFENILHIDRACINA

Realizar lo siguiente con los sobrenadantes S2A:

1.- Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm y adicionar 1 ml de una solución de S₂A dinitrofenilhidracina saturada en HCl 5M, mezclar homogéneamente.

2.- Transferir 5 gotas de esta mezcla a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm y agregar 1 ml de agua destilada.

3.- Búsqueda rápida de 5 ml de agua destilada y mezclar nuevamente. Dejar reposar durante 15 minutos.

4.- Si la solución toma una coloración rosa oscura indicar la presencia de piruvato. Compare la intensidad de color desarrollada con los dos sobrenadantes S2B y S2C.

III.- AGUMACION DE ACETALDEHIDO

1.- En dos tubos de ensayo de 18 x 150 mm depositar 2 ml de una suspensión de levadura al 10% en agua respectivamente.

2.- Añadir 0.5 gramos de sulfito de sodio a uno de los tubos y mezclar.

3.- Adicionar a ambos tubos 2 ml de glucosa al 10% y homogeneizar.

4.- Incubar los tubos a 37°C en baño de agua durante una hora.

5.- Después de la incubación transferir el contenido de cada tubo en un par de tubos de ensayo de 18 x 100 mm rotulados S2A y S2B respectivamente.

6.- Centrifugar los 4 tubos a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.

7.- Emplear solamente los sobrenadantes S2A para hacer la identificación de acetaldehído, los sobrenadantes S2B quedarán en reserva.

IV.- DETECCIÓN DE ACETALDEHIDO

A) PRUEBA DE LA BIPRIDINA

Realizar lo siguiente solamente con los sobrenadantes S2A:

1.- Colocar 2 ml de sobrenadante en un tubo de 18 x 150 mm y adicionar 0.5 ml de una solución recientemente preparada de nitroprusiato de sodio al 0.5%.

2.- Búsqueda rápida de 2 ml de Bipridina al 2% en agua y mezclar, dejar reposar 15 minutos; si está presente el acetaldehído se observará un color rosa. Comparar las intensidades de color dadas por los dos sobrenadantes.

DISCUSION

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla registrar los resultados obtenidos durante la detección de piruvato y CO₂.

CONDICIONES DE LA FERMENTACION	PRESENCIA DE PIRUVATO		VELOCIDAD DE DESPRENDIMIENTO DE CO ₂
	Prueba del Nitroprusiato	Prueba de la DNFH	
GLUCOSA+ Na ₂ HPO ₄			
GLUCOSA+ KH ₂ PO ₄			

(+++): fuertemente positiva, (++) : medianamente positiva; (+): debilmente positiva (-): ausencia de color o de desprendimiento de burbujas

2.- En la siguiente tabla anotar sus resultados observados en la detección de acetaldehído tras la fermentación de glucosa por S. cerevisiae

CONDICIONES DE LA FERMENTACION	PRESENCIA DE ACETALDEHIDO
	Prueba de la Bipridina
GLUCOSA+SULFITO DE SODIO	
GLUCOSA-SULFITO DE SODIO	

(+++): fuertemente positiva, (++) : medianamente positiva; (+): debilmente positiva, (-): ausencia de color.

RESULTADOS

1.- En la siguiente tabla registrar los resultados obtenidos durante la de-
tección de parvovirus y su...

CONDICIONES DE LA REGENERACION	GLUCOSA-SUMITO LE SODIO
Prueba de la Eritritina	GLUCOSA-SUMITO LE SODIO

(-): ausencia de color o de depositos en las pruebas
(++): resultado positivo; (++) resultado positivo; (+): resultado positivo

2.- En la siguiente tabla anotar los resultados obtenidos en la detección de
acetaldehidro. Las pruebas de la transacción de glucosa por la cerivasa

CONDICIONES DE LA REGENERACION	GLUCOSA-SUMITO LE SODIO
Prueba de la Eritritina	GLUCOSA-SUMITO LE SODIO

(-): ausencia de color o de depositos en las pruebas
(++): resultado positivo; (++) resultado positivo; (+): resultado positivo

DISCUSION

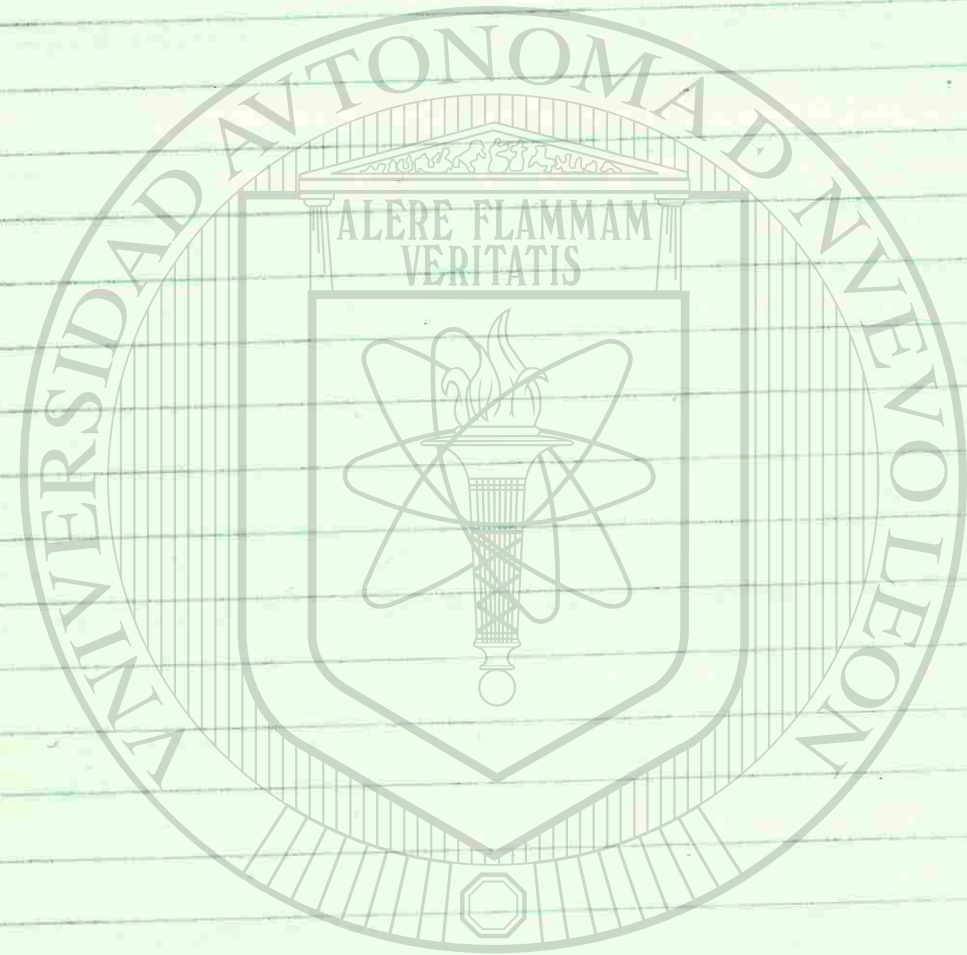
BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DISCUSION



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

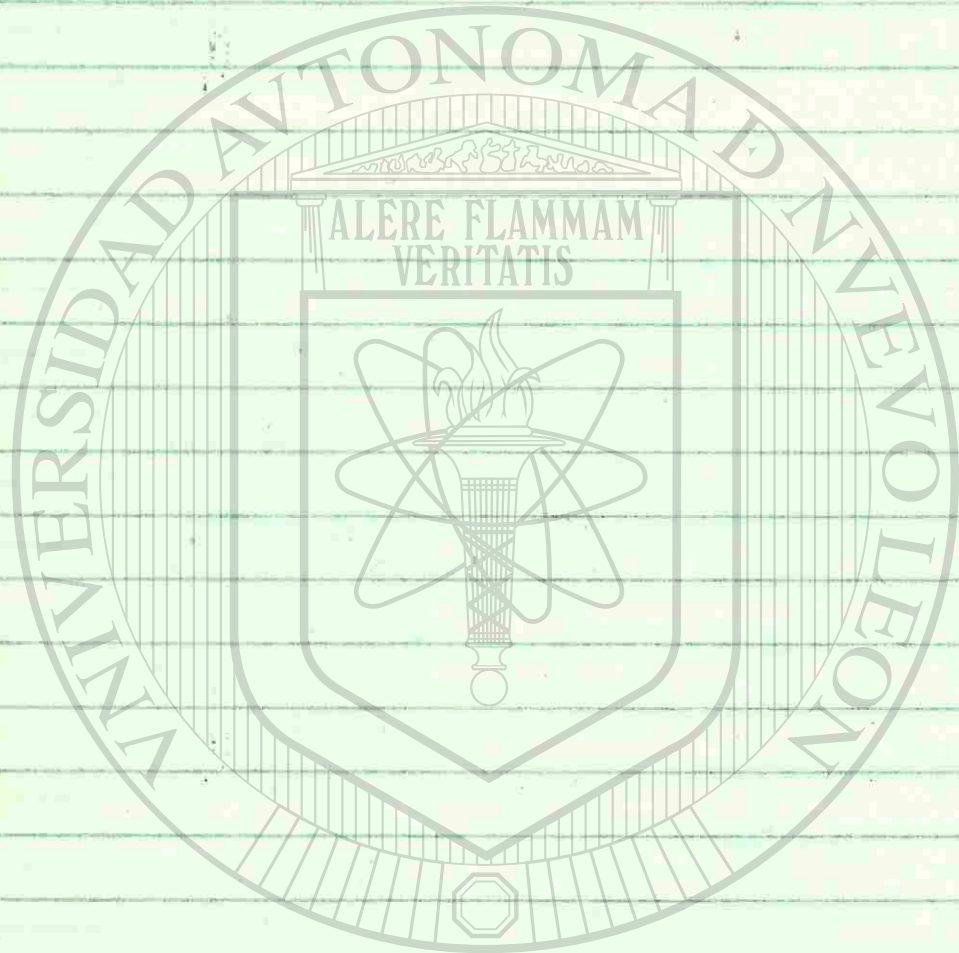
CONCLUSIONES

Blank lined area for writing conclusions.

BIBLIOGRAFIA

Blank lined area for writing bibliography.

CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fessenden, R.J. y J. S. Fessenden. 1983. Química Organica. Grupo Editorial Iberoamericano. 2a. Impresión. pp 535.
- 2.- Gaudy, A.F. y E.T. Gaudy. 1981. Microbiology for Enviromental Scientists and Engineers. McGraw-Hill International Book Company. 1a. Edition. pp 519-548.
- 3.- Joklik, W.K., H.P. Willett y D.B. Amos. 1986. Zinsser, - Microbiología. Editorial Médica Panamericana. - 18ª. Edición. 59-64.
- 4.- Plummer, D.T. 1981. Bioquímica Práctica. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana, S.A. Traducido de la 2ª. Edición en inglés. pp 294-296.



U A N

SIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO

CCIÓN GENERAL DE BIBLIOTEC