

PRACTICA No. 4

QUIMIOTAXIS BACTERIANA

INTRODUCCION

En su ambiente natural los microorganismos no solamente interactuan con su entorno sino tambien unos con otros, y en estas interacciones la comunicacion quimica juega un papel preponderante. Dado que estan rodeados de concentraciones muy diluidas de iones y sustancias nutritivas, para enfren-- tar el problema de encontrarlos algunas bacterias moviles disponen de una ca pacidad llamada quimiotactismo que les permite detectar sustancias quimicas y acercarse o alejarse de ellas. Tales respuestas le conceden una ventaja selectiva capacitandolas para encontrar sus fuentes de carbono y energia en el ecosistema donde ocurren.

Tras largos años de investigacion sobre el fenomeno de la quimiotaxis Julius Adler y sus colaboradores han señalado que el proceso de respuesta a un agente quimico se inicia con la recepcion del estimulo por medio de quimiorreceptores colocados en la superficie celular; estas moléculas detec-- tan cambios en la concentracion de atrayentes o repelentes. Dicho evento ini cial es independiente de la captacion, metabolismo o produccion de energia del compuesto; una vez que el quimioefector se acopla con el quimiorreceptor, éste ultimo envía una "señal" a la base del flagelo activo modulando el sen tido de su rotacion y en consecuencia la frecuencia de nado y bamboleo, se-- gún sea el caso la celula se acercará o alejará del agente efector.

Aunque la quimiotaxis proporciona una ventaja competitiva a las bacte rias que la poseen, otras actividades como la predacion, simbiosis, agrega-- cion, sexualidad y diferenciacion parecen depender de respuestas quimiotacti cas especificas.

OBJETIVO

Intentamos en este ensayo demostrar la actividad quimiotactica de una bacteria hacia un azúcar, y mediante la realizacion de una curva dosis-res-- puesta trataremos de establecer ciertos parámetros relacionados con este fe-- nómeno como son la concentracion umbral, la concentracion "pico", la concen-- tracion de saturacion y la respuesta "pico".

FUNDAMENTO

Las respuestas quimiotacticas de los microorganismos se han conocid-- durante casi ya un siglo. Sin embargo, la primera observacion de que las -- bacterias se acercaban o alejaban de una sustancia quimica fue hecha en 1881 por T.W. Englemann. Siete años más tarde el alemán Wilhel Pfeffer confirmó-- mediante observaciones microscópicas que las bacterias moviles de una suspen sion eran atraidas hacia el interior de un tubo capilar conteniendo una solu cion de atrayente, sumergido en el caldo.

BIBLIOGRAFIA

1. -- Bar-Shavit, S. I. Glik, R. Goldman, D. Mirman, N. Sharon. (1977). Mannose residues on phagocytes as receptors for the attach ment of E. coli and S. typhi. Biochemi cal and Biophysical Research Communica tions. 78 (1): 455-460.
2. -- Duguid, J.P. 1987. Terminology of bacterial fimbriae or pili, and their types. Nature. 315:89-90.
3. -- Jasson, R.E. 1980. Factor affecting expression of the E. coli plus Kpq. Infect. Immun. 28:190-194.
4. -- Nagaraja, K.V., D.A. Emery, J.A. Newman, B.S. Pomeroy. 1983. Identification and isolation of somatic plus 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. -- Orskov, I., F. Orskov, A. Birch-Anderson. 1980. Comparison of Escherichia coli fimbrial antigen F7 with type 1 fimbrial. Infect. Immun. 27(2):657-666.
7. -- Orskov, J.C.G. 1975. Ecology, Physiology and Genetics of Fim briae and Pili. Ann. Rev. Microbiol. 29:79-108.

QUIMIOXIS 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 entrar en contacto con el problema de encontrar algunas bacterias móviles dispuestas a una capacidad llamada quimiotaxis 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 un quimiorreceptor colocado 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 quimiorreceptor se acopla con el quimiorreceptor, éste último envía una "señal" a la base del flagelo moviendo 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 tratamos 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 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 suspensión eran atraídas 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 quimiotáctica, 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.
- 2 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 es conocida 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 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 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 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 matriz erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de buffer che estéril.
- cupreosjetos estériles.

28 placas de agar nutritivo.
 28 tubos de agar blanco: tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar agar al 0.6 % estéril.
 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.
 7 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.

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 hierro 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.

MÉTODOS

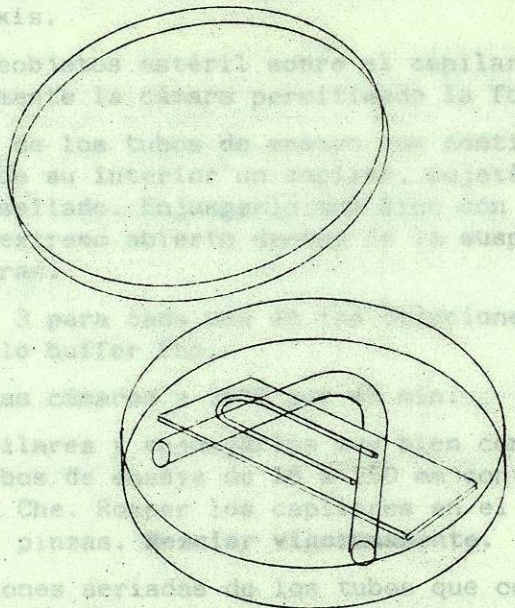
A) PREPARACION DE LA SUSTANCIA ATRAYENTE.

- 1.- Lavar perfectamente una serie de tubos capilares (14) de 5 ml. Una vez secos, tomar cada uno con unas pinzas para disección y sellar uno de los extremos empleando una llama bñta. Esta llama se consigue removiendo de 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^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Transferir alícuotas de 10 ml de cada una de las diluciones a tubos de ensayo 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 ensayo 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.- Doblarse 7 tubos capilares de 7 mm, dándoles a cada uno forma de U. Utilizar la llama bñta.
- 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.

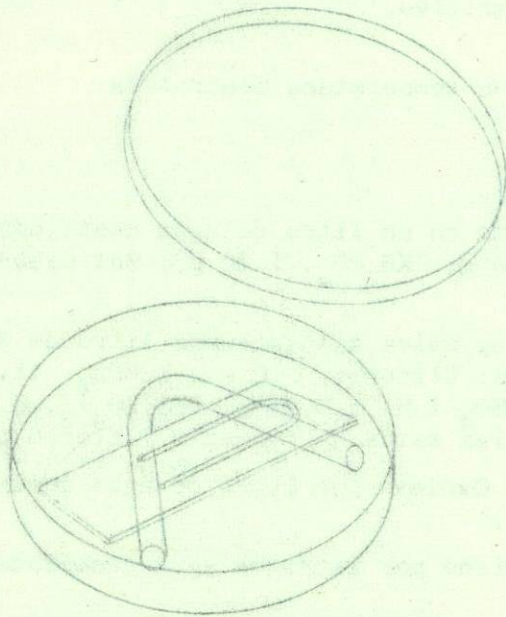


- 1.- Preparar las cámaras de quimiotaxis.
- 2.- Colocar un cubreobjetos estéril sobre el capilar en U empleando pinzas. Inclinar ligeramente la cámara para evitar la formación de un menisco.
- 3.- Seleccionar uno de los tubos de ensayo que contienen las diluciones de glucosa. Tomar de su interior un tubo de vidrio con unas pinzas por su extremo abierto. Transferir a la cámara con buffer che estéril y colocarlo por su extremo abierto en la cámara para que la suspensión bacteriana de una de las cámaras sea más cercana a la de la otra.
- 4.- Repetir el paso 3 para el otro tubo de ensayo que contiene sólo buffer che.
- 5.- Incubar todos los portaobjetos en un matraz nefelométrico con buffer che estéril.
- 6.- Remover los capilares de la cámara con buffer che estéril. Transferir a tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 5 ml de $NaCl$ 0.85 % o buffer che. Esterilizar los capilares en el interior de los tubos utilizando unas pinzas.
- 7.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares - fotos de acuerdo al siguiente cuadro.

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.

- 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.



(C) OBTENCION 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 sola estría en el centro de una caja de petri contenido 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 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 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 5 min. a temperatura ambiente. Decantar y resuspender el paquete empleando sólo el líquido residual. Añadir 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 vacie todo

8.- Diluir la suspensión hasta una concentración de 0.1 a 500 nm. 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 0.2 ml de la suspensión bacteriana a la cavidad formada entre el portabojas y el capilar doblado en U de cada una de las 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 ácido 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.
- 7.- 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.
- 8.- Realizar diluciones seriadas de los tubos que contienen los capilares rotos de acuerdo al siguiente cuadro:

Contenido del capilar
Diluciones a plasmear

Glucosa 10 ⁻¹ M	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Glucosa 10 ⁻² M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻³ M	10 ⁻¹	10 ⁻³
Glucosa 10 ⁻⁴ M	10 ⁻²	10 ⁻³
Glucosa 10 ⁻⁵ M	10 ⁻¹	10 ⁻⁵
Glucosa 10 ⁻⁶ M	10 ⁻¹	10 ⁻⁵

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

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)

