

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 portaobjetos y el capilar doblado en U de cada una de las cámaras de quimiotaxis.
- 2.- Colocar un portaobjetos 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 el 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	Dilución	Capilar
Glucosa 10 ⁻⁶ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻⁵ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻⁴ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻³ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻² M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻¹ M	10 ⁻¹	10 ⁻²
Glucosa 10 ⁻¹ 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

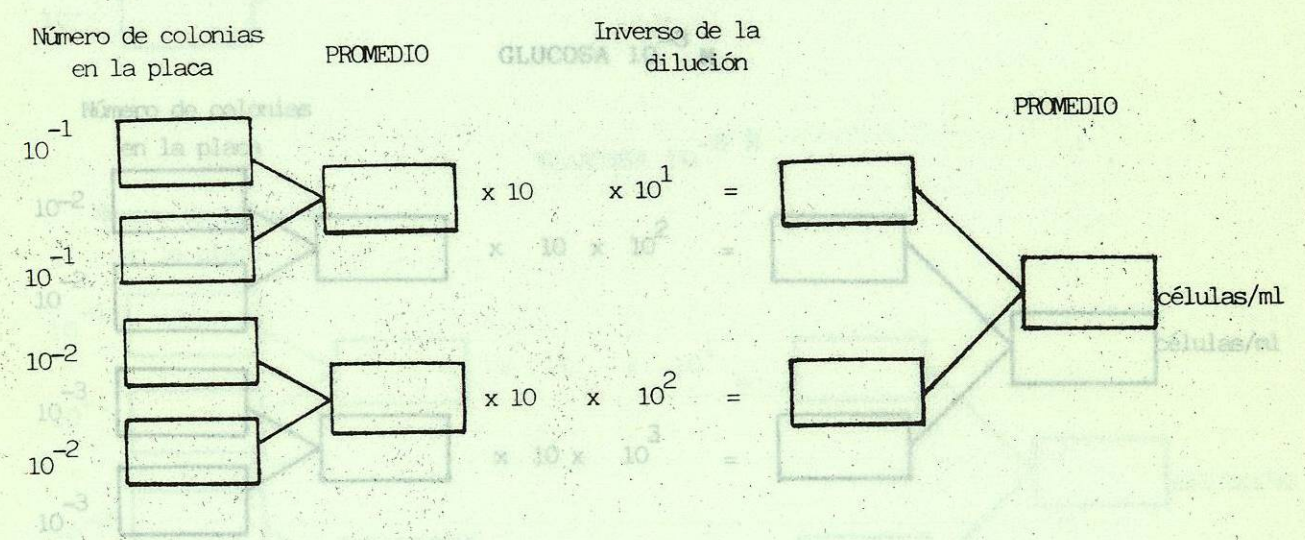
el contenido de los tubos sobre la superficie de placas con Agar nutritivo. Permita que solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24 horas en posición invertida.

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

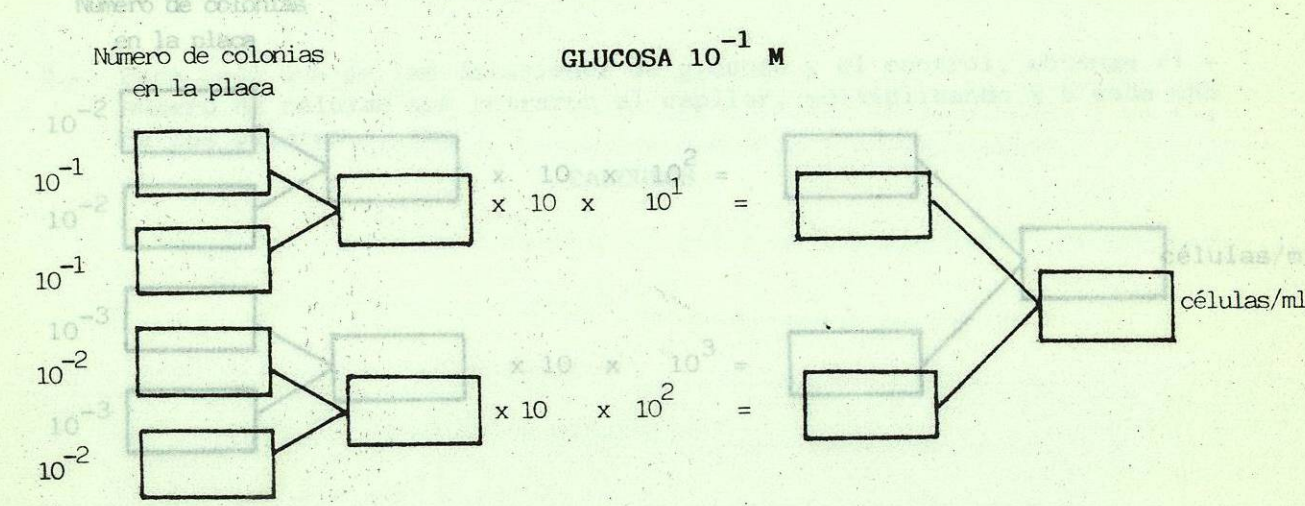
RESULTADOS

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



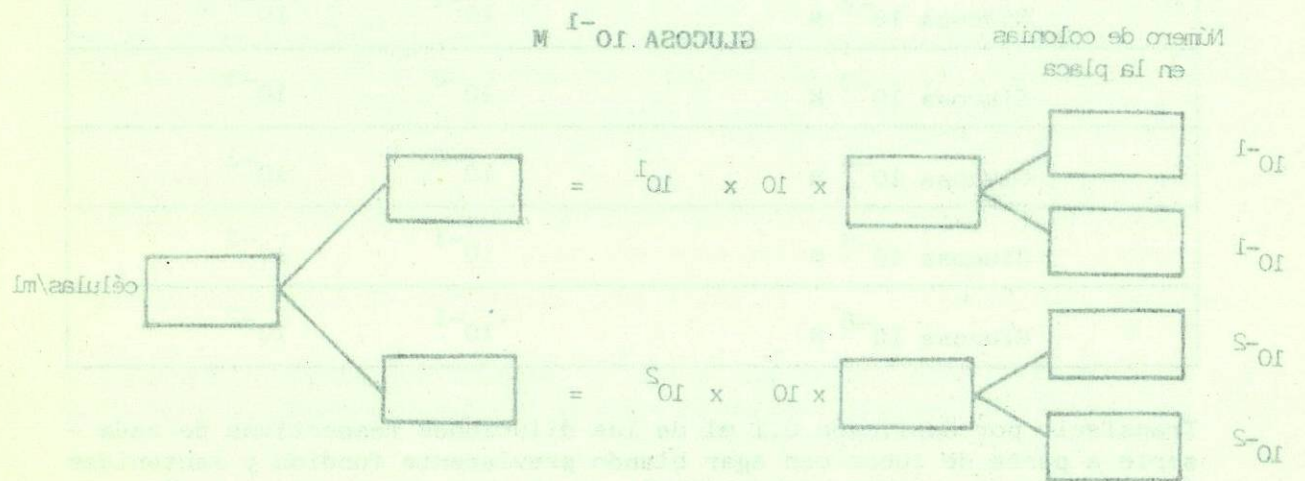
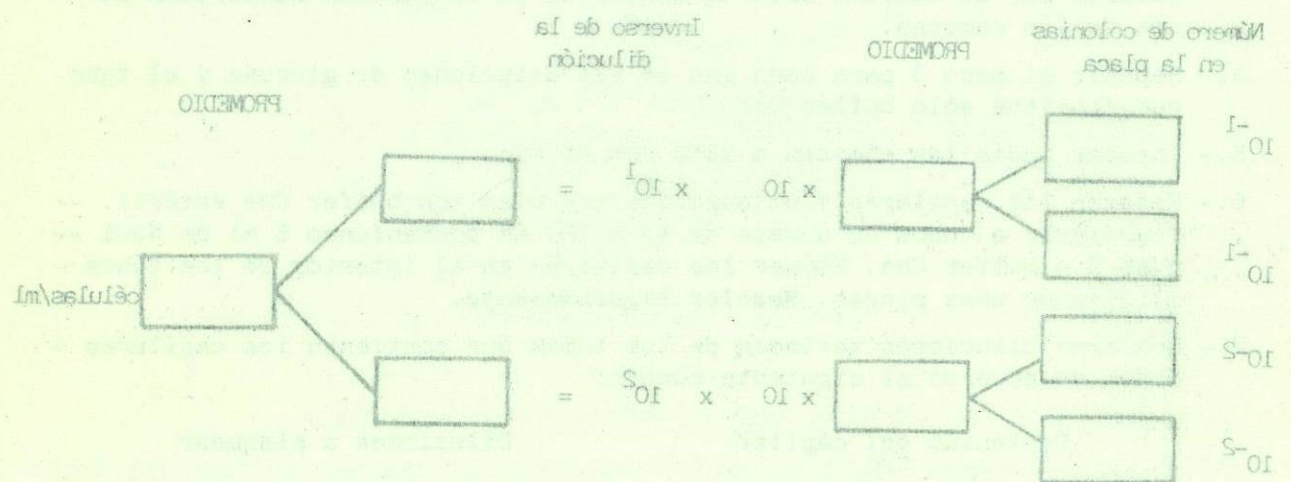
el contenido de los tubos sobre la superficie de placas con Agar nutritivo. Permita que solidifique e incluya las cajas a 37°C durante 24 horas en posición invertida.

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

RESULTADOS

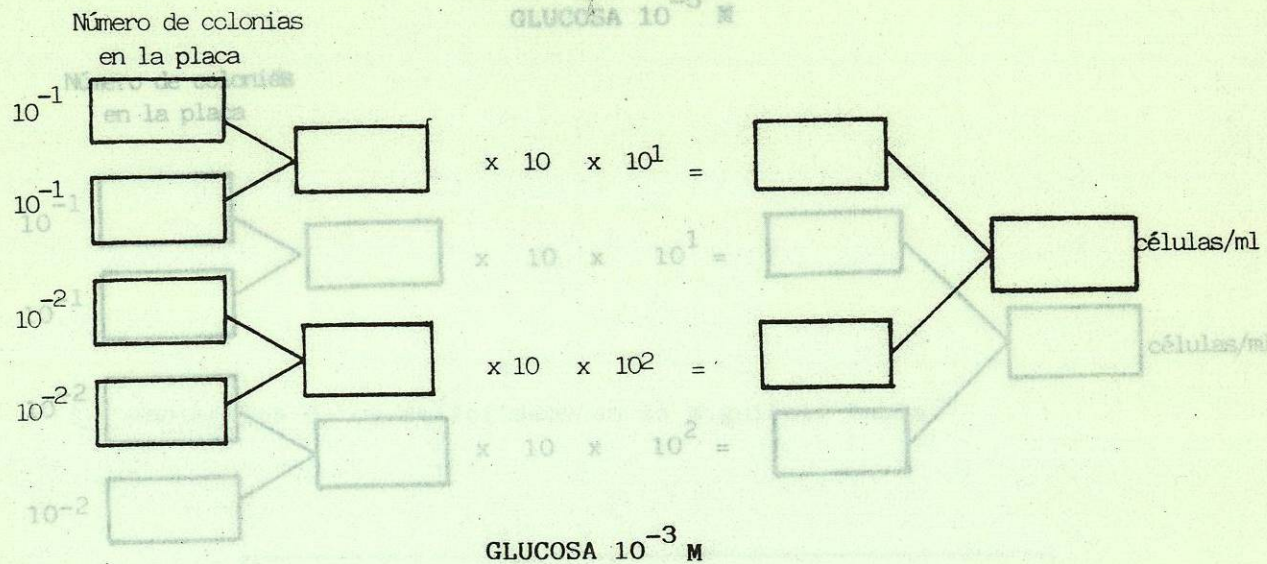
1.- Para cada dilución de glucosa usada como strayente, calcule el número de células/ml presentes en el tubo de ensaye donde se recolectó el capilar después del ensayo de quimiotaxis. Para facilitar el cálculo use los cuadros con los datos solicitados.

CONTROL (BUFFER CHE)



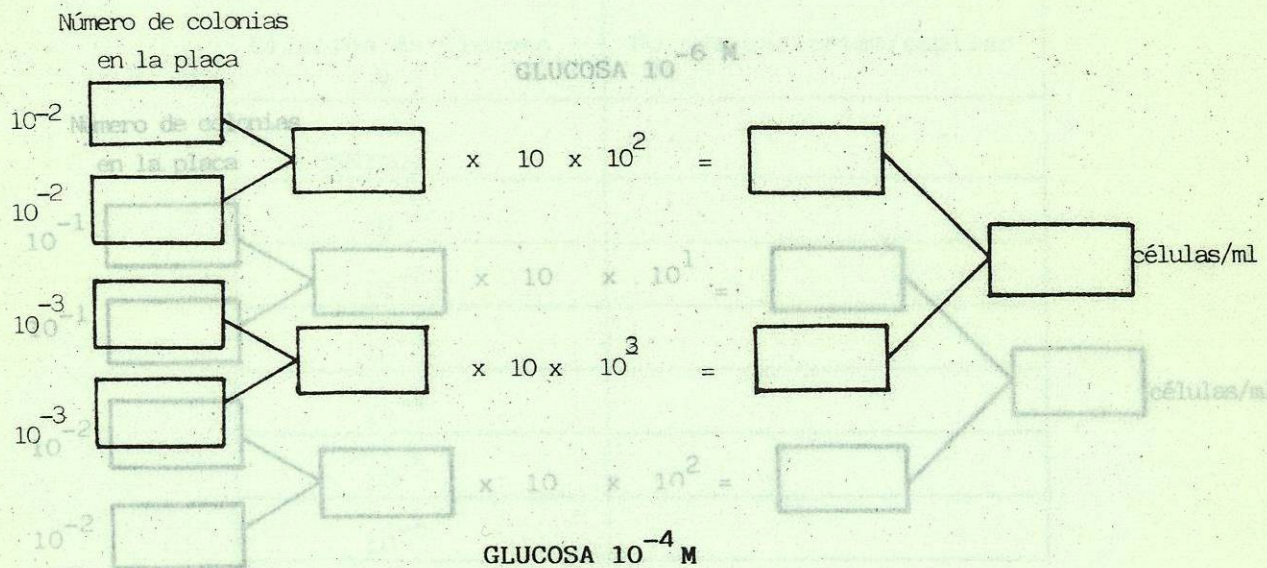
GLUCOSA 10^{-2} M

GLUCOSA 10^{-5} M

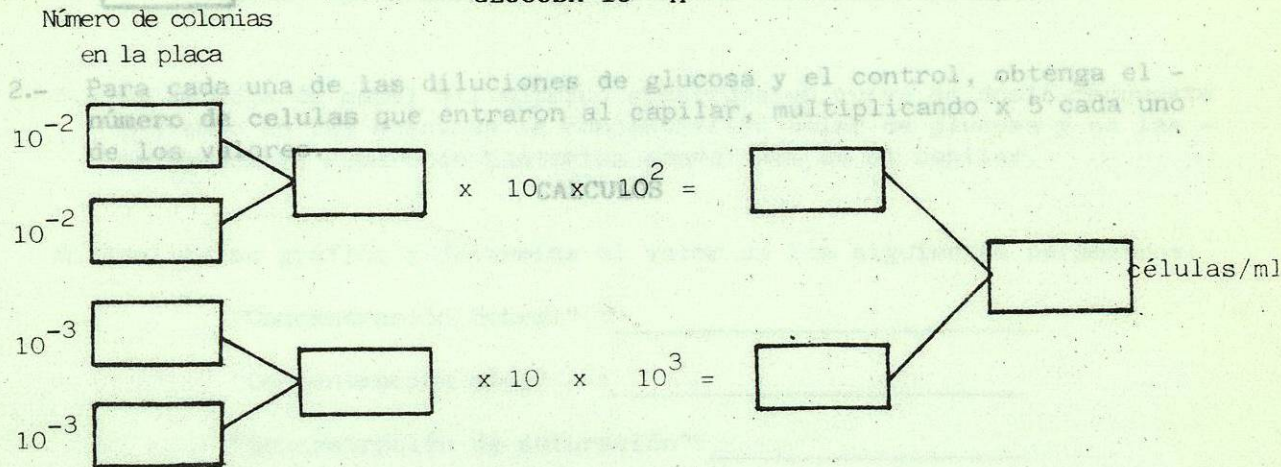


GLUCOSA 10^{-3} M

GLUCOSA 10^{-6} M

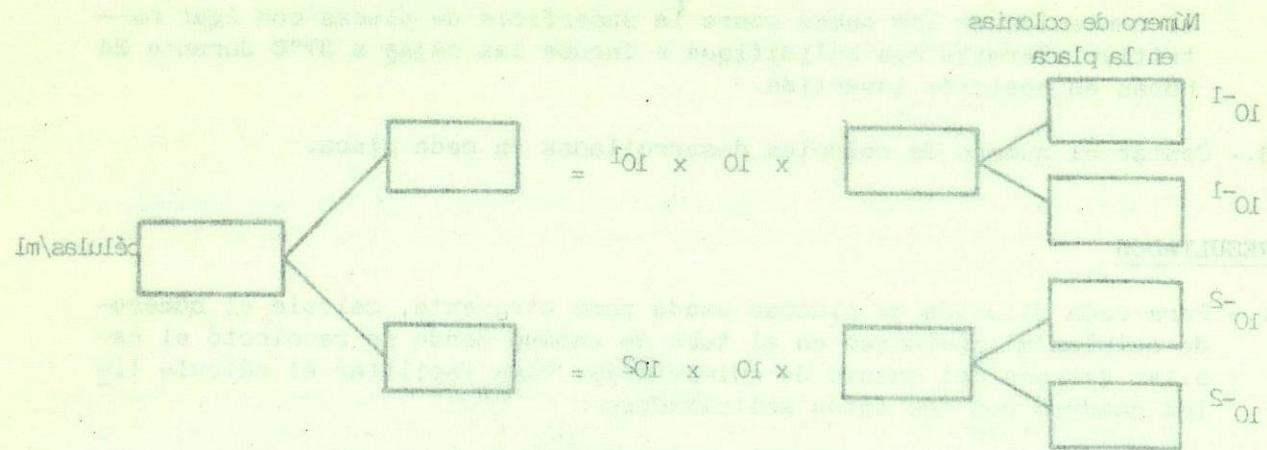


GLUCOSA 10^{-4} M

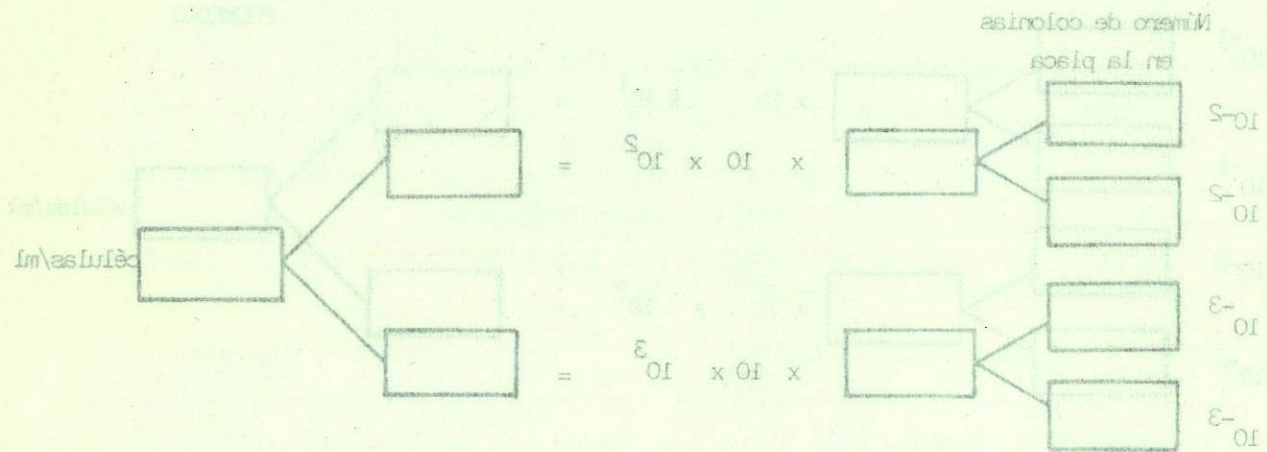


2.- Para cada una de las diluciones de glucosa y el control, obtenga el número de células que entraron al capilar, multiplicando $\times 5^5$ cada uno de los valores.

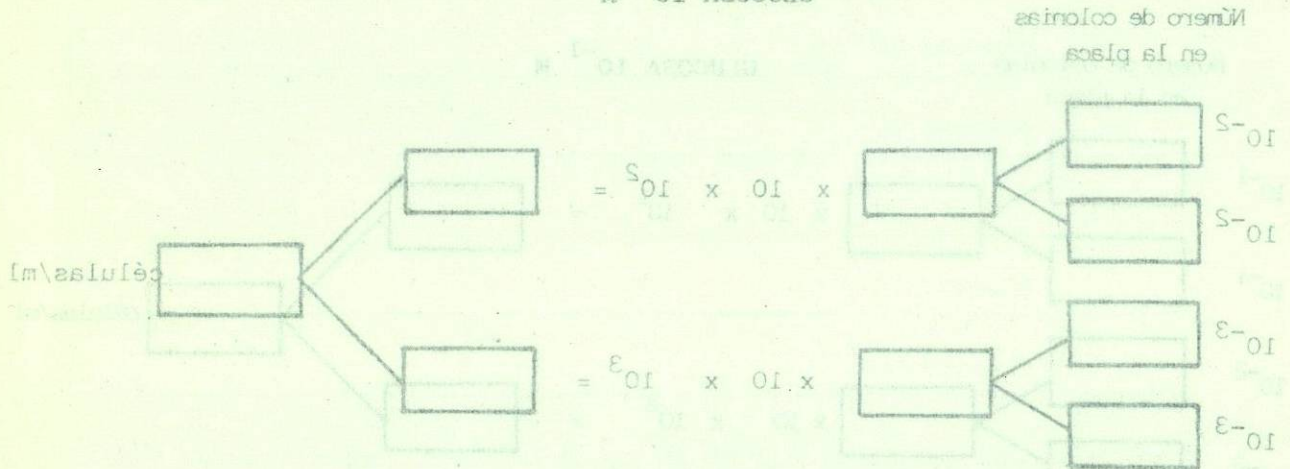
GLUCOSA 10^{-2} M



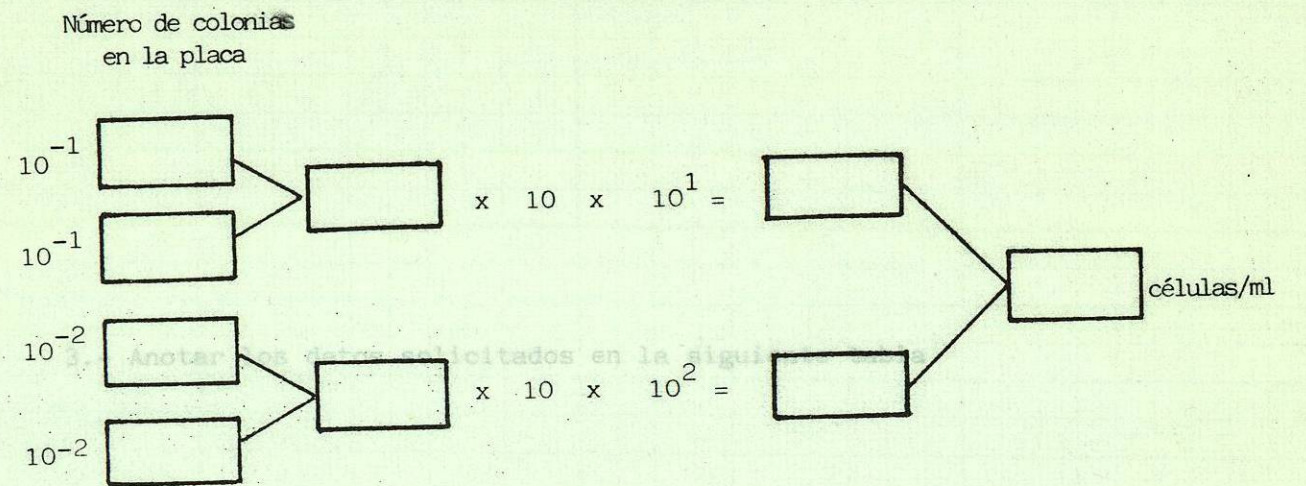
GLUCOSA 10^{-3} M



GLUCOSA 10^{-4} M



GLUCOSA 10^{-5} M



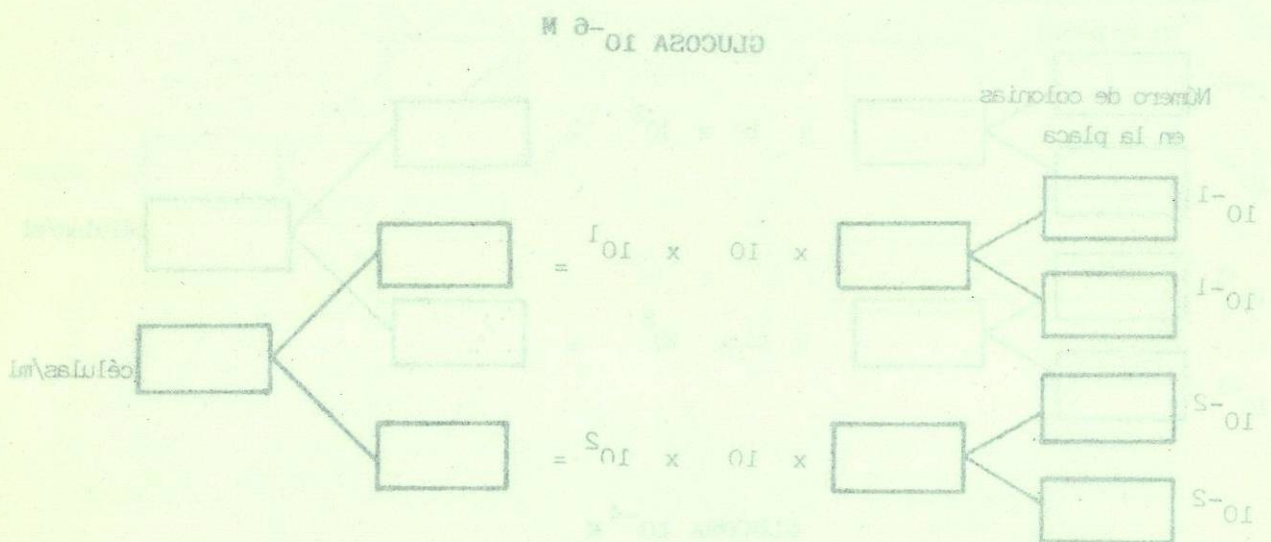
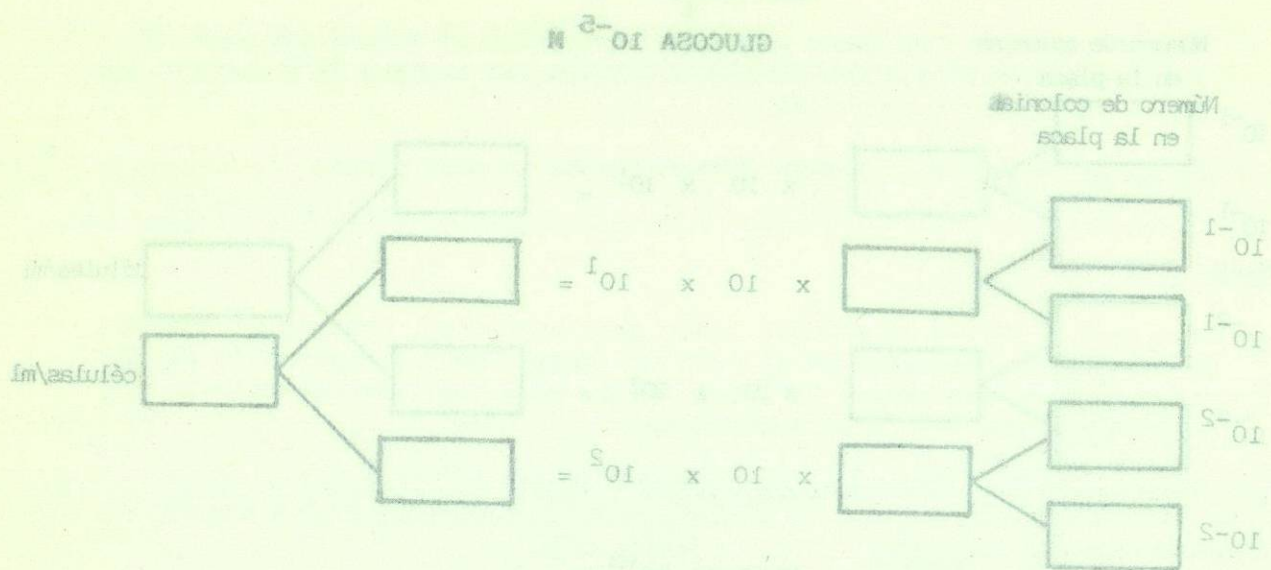
Dilución de Glucosa (M)	No. bacterias/capilar
CONTROL	
10^{-1}	
10^{-2}	
10^{-3}	
10^{-4}	
10^{-5}	
10^{-6}	

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.

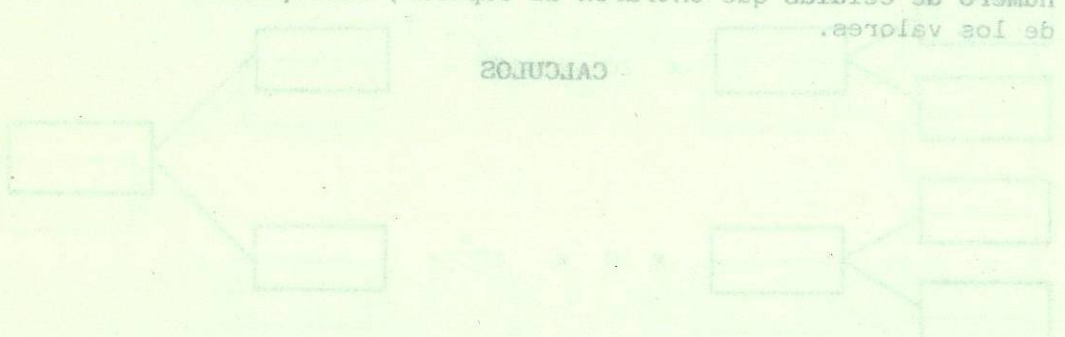
CALCULOS

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

- "Concentración Umbral": _____
- "Concentración pico": _____
- "Concentración de saturación": _____
- "Respuesta Pico": _____



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



3.- Anotar los datos solicitados en la siguiente tabla

Dilución de Glucosa (M)	No. de bacterias/capilar
CONTROL	
10^{-1}	
10^{-2}	
10^{-3}	
10^{-4}	
10^{-5}	
10^{-6}	

4.- En la hoja de papel milimétrico construya un curva de dosis-respuesta anotando en las abscisas la concentración molar de glucosa y en las ordenadas el número de bacterias acumuladas en el capilar.

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

"Concentración Umbral" : _____

"Concentración pico" : _____

"Concentración de saturación": _____

"Respuesta Pico" : _____

3.- Anotar los datos solicitados en la siguiente tabla

Dilución de Glucosa (M)	No. de bacterias/capilar
CONTROL	
10 ⁻¹	
10 ⁻²	
10 ⁻³	
10 ⁻⁴	
10 ⁻⁵	
10 ⁻⁶	

4.- En la hoja de papel milimétrico construya un curva de dosis-respuesta anotando en las abscisas la concentración molar de glucosa y en las ordenadas el número de bacterias acumuladas en el capilar.

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

- "Concentración Umbral": _____
- "Concentración pico": _____
- "Concentración de saturación": _____
- "Respuesta Pico": _____

