

12 MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 CRISTALERÍA

Se utilizaron matraces nefelométricos de 250mL tipo Kitasato (Figura 5), de vidrio grueso de borosilicato. También se utilizaron 2 tubos de ensayo.



Figura 5 Matraces nefelométricos con tapón de plástico.

12.2 MEDIO DE CULTIVO, CEPAS BACTERIANAS Y SOBRES GENERADORES DE MICROAEROFÍLIA Y ANAEROBIOSIS.

El medio líquido se preparó de acuerdo a la tesis de Paredes, 2006, y en caso de necesitarse el medio sólido se agregó agar bacteriológico al 2.4%. Todos los medios de cultivo fueron de la marca Bioxon. Se usaron sobres GasPak™ EZ Anaerobe Container System y Campy Container System, para generar anaerobiosis y microaerofilia respectivamente.

Todo el material y medios de cultivos se esterilizaron en autoclave a 121°C (15lb/cm²) por 20 minutos.

12.3 ANTIBIÓTICOS, CONCENTRACIONES Y SIEMBRAS

Los antibióticos utilizados y concentraciones en los medios de cultivo de trabajo, fueron: 5 µg/mL de cloramfenicol y 10µg/mL de kanamicina. Estos antibióticos se agregaron de una solución concentrada y esterilizada por medio de filtración. Los antibióticos se obtuvieron de la marca Sigma.

12.4 CEPAS Y SUS PLÁSMIDOS

Del cepario de la UDLAP se recuperaron tres cepas de *Bacillus subtilis* con clave 832. Todas las cepas fueron recuperadas de frascos congelados a -20°C. Se sembraron y verificaron por medio de una tinción de Gram (véase apéndice 18.1.3) las cepas de *B. subtilis* 832 fueron previamente descritas en la tesis de Paredes, 2006 y Vélez, 2006: para la cepa silvestre y la cepa con el plásmido pUB110::*sspE*::*vgb* ver figura 6 y 7. Por último la cepa con el plásmido pTrp::*vgb* (con sólo una copia del gen *vgb*) ver figura 8.

Tabla 2. (Cepas véase apéndice 18.1).

Tabla 2 Fuente de los plásmidos con los que se trabajó y su resistencia a los antibióticos aplicados en el proyecto

CEPA (tipo de <i>B.subtilis</i>)	Resistencia a:	Fuente de obtención
Silvestre	Ningún antibiótico	Laboratorio Microbiología
pUB110:: <i>sspE</i>	Kanamicina 10µg/mL	Laboratorio Microbiología
pTrp:: <i>vgb</i>	Cloramfenicol 5µmL	Laboratorio Microbiología

Se crecieron las cepas en los medios de cultivo con el antibiótico específico. En el primer caso se hicieron crecer cepas conteniendo el plásmido pUB110 (con la multicopia de gen *vgb*) en el medio 2xYT + 10µg/mL kanamicina (10µg/mL). La cepa con una sola copia del gen *vgb* también se hace crecer en medio sólido de 2xYT + 5µg/mL de cloramfenicol. En el caso de la cepa silvestre, el crecimiento se observó en medio 2xYT sin antibiótico.



Figura 6, 7 y 8: Cepas de *B.subtilis*. A, cepa silvestre; B, cepa con el plásmido pUB110::*sspE*::*vgb* y C, cepa con el plásmido pTrp::*vgb*, en agar 2xYT y con el antibiótico correspondiente.

12.5 INCUBACIÓN

Las incubaciones de las cepas en las cajas Petri se realizaron en una estufa a una temperatura cercana a 37°C. Los medios líquidos fueron incubados en un agitador con agua destilada el cual se mantenía a una temperatura de 37°C. De acuerdo a los experimentos a realizar y a las condiciones de los mismos, es como se preparan las condiciones a evaluar.

12.6 PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CONDICIONES

Para cada experimento se utilizan los tres tipos de cepas y se comparan los resultados para evaluar las diferentes aptitudes de las cepas para crecer en diversas condiciones. Se evalúan cinco diferentes condiciones: aerobiosis, microaerofilia, anaerobiosis, vacío y anaerobiosis + vacío. Véase apéndice 18.2.

12.7 AEROBIOSIS

En un matraz nefelométrico de 250 mL se esterilizaron 100 mL de medio 2xYT con el antibiótico correspondiente del cultivo en placa de toda la noche se midió la absorbancia y se usó para inocular el volumen adecuado y tener una absorbancia de 600 nm con un 0.1 como densidad inicial. El matraz inoculado se puso a incubar en agitación a 150 rpm y a 37°C.

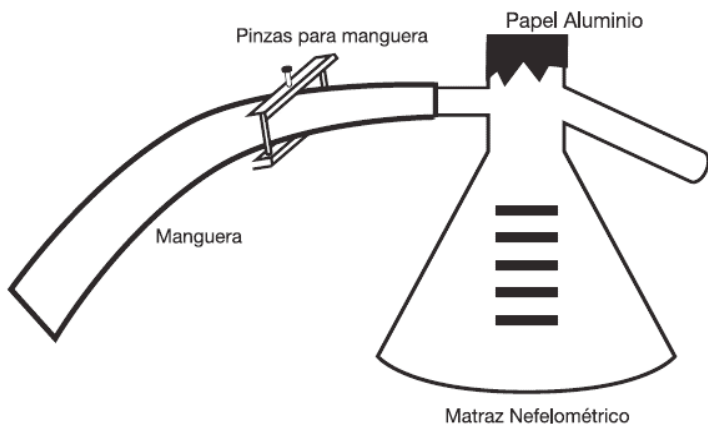


Figura 9 Diagrama de un matraz nefelométrico realizando el crecimiento en condiciones aeróbicas a 37°C.

12.8 MICROAEROFÍLIA

Este experimento consistió en elaborar un sistema con un matraz Kitasato de 1000mL, mangueras y pinzas de mangueras. Se introdujo el sobre Gas-Pak™ EZ Campy Container System en dicho matraz Kitasato, se sella con un tapón de caucho el cual tiene un hoyo con un tubo de vidrio largo unido por fuera con una manguera el cual se sella con parafilm para evitar fugas y del mismo modo la entrada de oxígeno al sistema. Se conecta por medio de mangueras el matraz Kitasato con los dos matraces nefelométricos- Kitasato inoculados de 250mL (con 100 mL de medio) a través de mangueras y de un tubo de vidrio en forma de “Y”. Se mantiene por dos horas hasta obtener condiciones microaerofílicas y se prosigue a cerrar el extremo de la salida Kitasato con las pinzas para manguera y un tapón de caucho sellado con parafilm para evitar fugas. Una vez sellados los matraces se comienzan las mediciones por periodos de dos horas durante 10-12 horas en agitación a 37°C, limpiando el tubo del matraz nefelométrico con un algodón húmedo para eliminar restos de suciedad antes de realizar cada medición.

12.9 ANAEROBIOSIS

El proceso es muy similar al realizado para obtener condiciones de microaerofilia, únicamente varían los tipos de sobres generadores Gas-Pak,™ EZ Anaerobe Container

System ya que se utilizan aquellos que generan condiciones anaerobias. Se espera de igual forma dos horas para crear las condiciones deseadas y se sellan con tapones de caucho y papel parafilm. Se observa el crecimiento durante 12 horas en periodos de dos horas agitando ambos matraces nefelométricos en el agitador a 37°C.

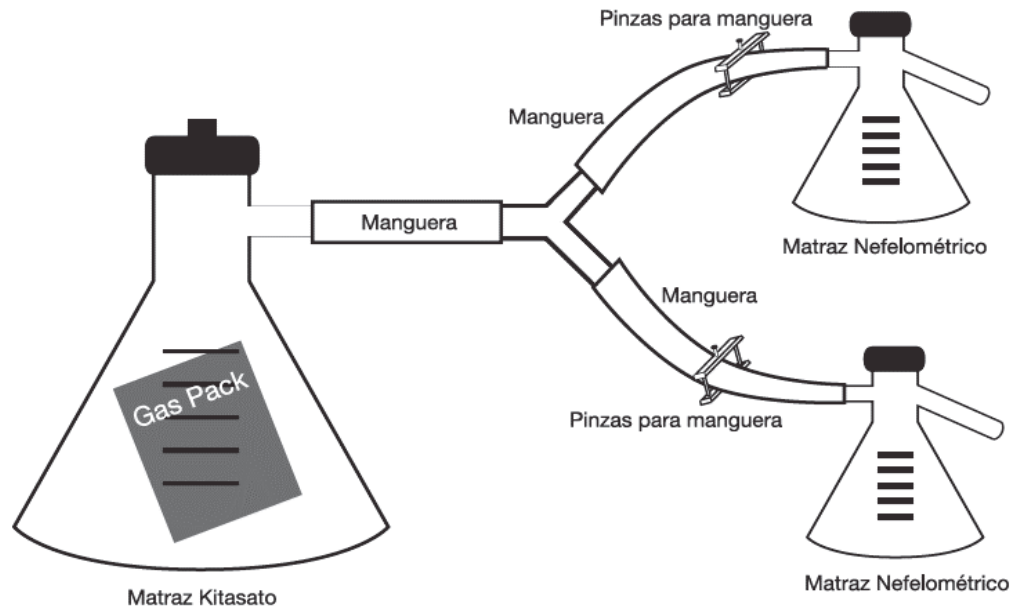


Figura 10 Diagrama del sistema efectuado para el crecimiento microaerófilo y anaeróbico de las tres cepas a 37°C en agitación.



Figura 11. Sistema efectuado para el crecimiento microaerófilo y anaeróbico de las tres cepas a 37°C en agitación

12.10 VACÍO

Para este experimento se utiliza una bomba generadora de vacío prestada amablemente por el Doctor Antonio Quiroz del laboratorio de electroquímica. Se utilizó el mismo matraz Kitasato con “trampa” para evitar que algo del medio 2xYT le llegue a la bomba y afecte su funcionamiento. La forma en la que es conectado el vacío en la trampa con las mangueras de los matraces es a través de un tubo de vidrio largo que atraviesa el tapón de caucho así mismo evitando la entrada de líquido a la bomba y conectando con otra manguera a los dos matraces inoculados. La unión de cada una de las mangueras es sellada con parafilm para evitar cualquier fuga posible, se aseguran de igual forma las mangueras que cubren al tubo de vidrio en forma de “Y”. La bomba se emplea aproximadamente 15 minutos para crear vacío en ambos matraces nefelométricos y posteriormente se cierran las pinzas de las mangueras que unen a la bomba con los matraces nefelométricos. Es importante mencionar que al cerrar las mangueras, esto se realiza con la bomba aun funcionando para evitar la posible entrada de oxígeno en el sistema. Las mediciones se realizan cada cuatro horas por un periodo total de 20 horas. Ambos matraces deben permanecer a lo largo de este periodo agitándose a una temperatura aproximada de 37°C.

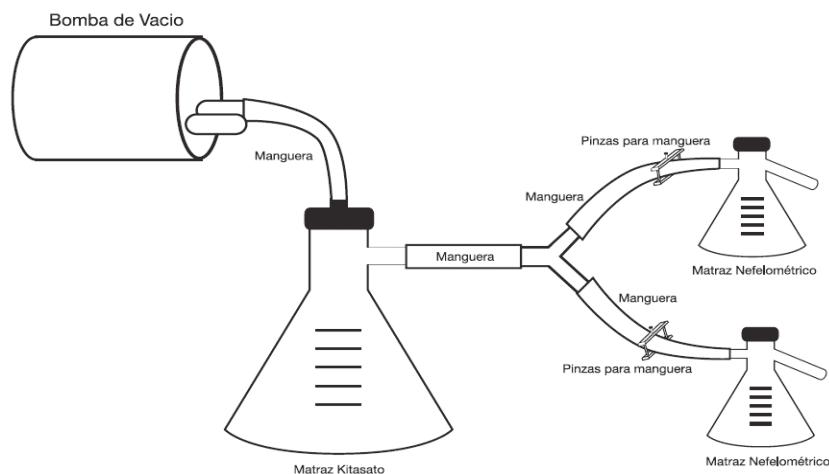


Figura 12 Diagrama del sistema empleado para crear un ambiente con vacío en los matraces nefelométricos inoculados.

12.11 ANAEROBIOSIS + VACÍO

Para el último experimento se utilizó tanto la bomba como los sobres Gas-Pak para anaerobiosis. Una vez inoculado el medio líquido de 2xYT con la cepa deseada, se prosigue a crear el ambiente anaeróbico, por lo que se deposita un sobre Gas-Pak en el matraz Kitasato, es decir “la trampa” y ésta se sella con el mismo tapón de caucho con el tubo de vidrio utilizado anteriormente igualmente sellado con parafilm. Se cierra con las pinzas de manguera la salida a la bomba de vacío para evitar la entrada de oxígeno. Después de aguardar dos horas una vez que se ha creado un ambiente anaerobio se enciende la bomba de vacío y se retiran las pinzas de la manguera. Durante 15 minutos se doblaga las condiciones anaeróbicas (anaerobiosis + vacío). Una vez alcanzado el lapso requerido de tiempo se cierran las pinzas de manguera y de igual forma se cierra con un tapón de caucho y se sellan con parafilm las salidas de las mangueras. Se agitan ambos matraces a una temperatura de 37°C. Se realizan mediciones cada cuatro horas por un lapso de 28 horas en total.

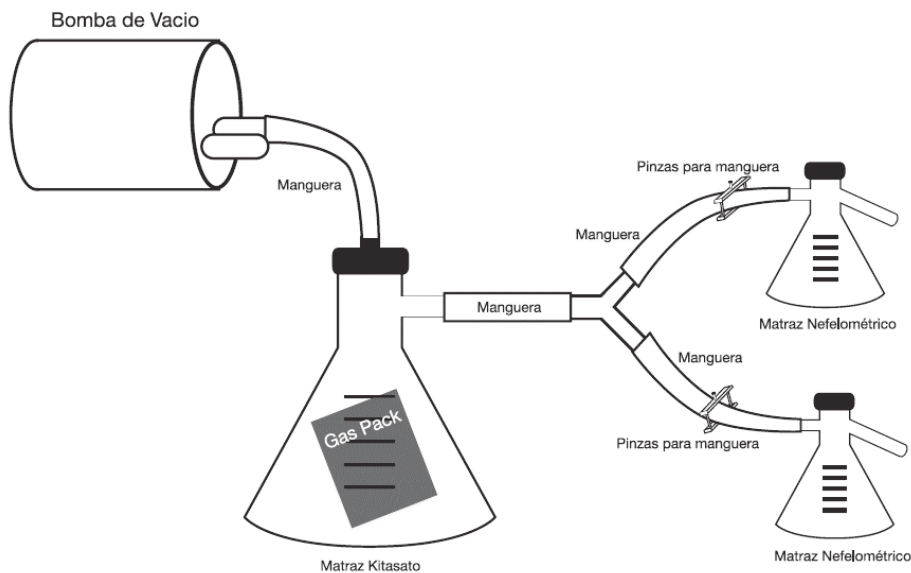


Figura 13 Diagrama del sistema utilizado para crear una la condición anaerobiosis+ vacío con los sobres Gas-pack y la bomba de vacío.

12.12 CURVAS DE CRECIMIENTO

Para la medición de la absorbancia a 600 nm y el crecimiento se utilizó un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D+ (Milton Roy) (figura 14), en la modalidad de absorbancia en el filtro entre 600 y 950nm, el cual debe dejarse calentando alrededor de 15 minutos previos al inicio cada experimento. Posteriormente, se procede a calibrarlo a una absorbancia con una longitud de onda de 600nm con medio 2xYT esterilizado y sin sembrar en un tubo de ensayo cubierto por papel aluminio. Al introducirse en el espectrofotómetro la muestra a calibrar, se cubre la posible entrada de luz con una lata de metal evitando que afecte los valores.



Figura 14 espectrofotómetros SPECTRONIC 20D+ (Milton Roy) en donde se mide la absorbancia con un filtro entre 600 y 950nm.

En el caso de realizar las mediciones con los tubos de los matraces nefelométricos, éstos se cubren con un trapo oscuro, para que al igual que el control, la luz no afecte de manera directa a los resultados otorgados por el espectrofotómetro.

A partir de las condiciones en las cuales se planteó el experimento, fue la frecuencia con la que se realizaron las mediciones. Estos valores se usaron para graficar en el programa Excel de Office Windows 2007.