

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



ESTUDIO RESPIROMETRICO DE *Lactobacillus casei*
ATCC 393 EN PRESENCIA DE IONES Cu (II) Y Zn (II).

POR:
MA. ELENA RODRIGUEZ CANTU

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

FEBRERO DE 2000

TM

QR82

.L3

R6

c.1



1080095012



UANL

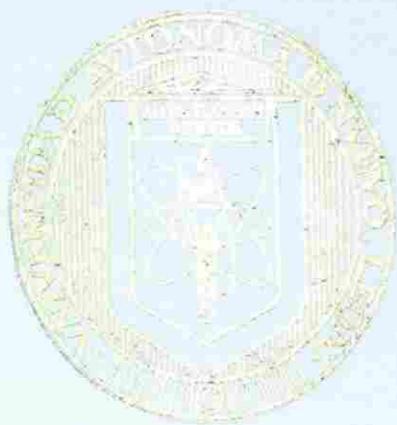
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 394
EN PRESENCIA DE IONES Cu (II) Y Zn (II).**

UANL

Por:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ma. ELENA RODRÍGUEZ CANTÚ

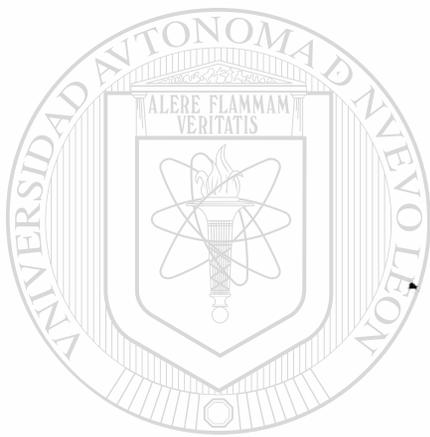
Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRÍA EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD en
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

Febrero de 2000

TM
0282

.L3

26



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



**ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 393
EN PRESENCIA DE IONES Cu (II) Y Zn (II).**

Por:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ma. ELENA RODRÍGUEZ CANTÚ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD en
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

Febrero de 2000



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Febrero de 2000

Ing. José Manuel Martínez Delgado
Director de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
Presente.-

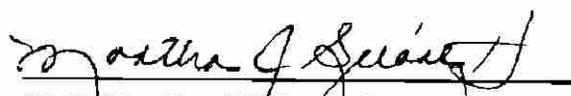
La Tesis elaborada por la señorita Ma. Elena Rodríguez Cantú titulada:

"ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 393
EN PRESENCIA DE IONES Cu(II) Y Zn(II)"

Ha sido aceptada como requisito parcial para optar al título de "Maestría en
Ciencias con especialidad en Microbiología Industrial" ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


M.C. Sergio S. Fernández Delgadillo
Presidente y Asesor


M.C. Martha Alicia Suárez Herrera
Secretario y Coasesor


M.C. Ma. Teresa Garza González
Vocal y Revisor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Febrero de 2000

Ing. José Manuel Martínez Delgado
Director de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
Presente.-

La Tesis elaborada por la señorita Ma. Elena Rodríguez Cantú titulada:

“ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 393
EN PRESENCIA DE IONES Cu(II) Y Zn(II)”

Ha sido aceptada como requisito parcial para optar al título de “Maestría en
Ciencias con especialidad en Microbiología Industrial”

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. Sergio S. Fernández Delgadillo
Presidente y Asesor

M.C. Martha Alicia Suárez Herrera
Secretario y Coasesor

M.C. Ma. Teresa Garza González
Vocal y Revisor

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y salud para realizar una meta más en mi vida.

A mi familia en especial a: mis padres Emilio y Mirthala, mis hermanos Emilio, Ma. Del Carmen, Carmen Luis, Rosa Mirthala, Ma. Antonia y José Librado; a mi tía Esperanza del Roble, mis sobrinos, a ellos , les adeudo la ternura, la paciencia de tolerarme las espinas más agudas, los arrebatos de humor, la negligencia, las vanidades los temores y las dudas.

Al personal del laboratorio de Microbiología por su valiosa ayuda.

Al M.C. Sergio S. Fernández Delgadillo, amigo y asesor quien con sus conocimientos ,asesorías y optimismo, me apoyó para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José Enrique Botello Alvarez amigo que me asesoró en la redacción de esta tesis.

Al Ing. Severo G. Flores Lira por su ayuda en el tratamiento estadístico de datos.

Al Ing. Luis A. Lozano Flores por su valiosa ayuda en la elaboración de dibujos.

A las M.C. Martha A. Suárez Herrera y Ma. Teresa Garza G por sus orientaciones.

Al director de la Facultad de Ciencias Químicas Ing. José Manuel Martínez Delgado y a la Subdirectora M.A. Gloria Nelly Páez Garza por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A mis amigos por su afecto.

GRACIAS.

RESUMEN.

Q.F.B. MA. ELENA RODRÍGUEZ CANTÚ

FEBRERO de 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.

TÍTULO: ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 393 EN PRESENCIA DE IONES Cu (II) Y Zn(II).

No. Páginas 77

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Industrial.

Área de Estudio: Fisiología Bacteriana.

Propósito y Método de Estudio: Estudiar el efecto de la presencia de los iones Cu (II) y Zn (II) sobre la actividad respiratoria del *Lactobacillus casei* ATCC 393, caracterizada por la producción de CO₂, utilizando el método directo de Warburg.

En el presente trabajo se realizaron tres series de experimentos; en la primera, se midió la producción de CO₂ en ausencia de los iones estudiados, mientras que en las otras dos, se estudió el efecto individual de cada uno de los iones, a concentraciones de 50, 500 y 5000 μ M, en el caldo de cultivo.

El efecto se cuantificó midiendo las diferencias en las variables estadísticas, y los parámetros cinéticos de un modelo exponencial, que caracterizaron la producción de CO₂ en ausencia y en presencia de los iones estudiados.

Contribuciones y Conclusiones: Se encontró que la presencia de los iones Cu (II) y Zn (II) modifican tanto la cantidad como la velocidad de producción de CO₂, de las observadas en ausencia de éstos. La presencia de los iones Cu(II) y Zn (II) incrementan la producción de CO₂ hasta un 67.3 y 155.7 % respectivamente. Las velocidades de producción durante el período de estudio son generalmente superiores a las medidas en condiciones normales, sin embargo, para las concentraciones de Cu (II) 5000 μ M y Zn (II) 500 μ M son inferiores en un 37.37 y 12.05% respectivamente.

Asesor

M.C. Sergio S. Fernández Delgadillo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Antecedentes.	1
1.2 Características fisiológicas y bioquímicas del microorganismo.	4
1.3 Propiedades fisicoquímicas de la membrana celular de <i>Lactobacillus casei</i> .	15
1.4 Objetivo General.	17
1.5 Objetivos particulares.	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	18
2.1 Descripción de equipos y reactivos.	18
2.1.1 Reactivos.	18
2.1.2 Equipos.	19
2.2 Manometría a volumen constante. "El Método de Warburg".	19 [®]
2.2.1 Principios Generales.	21
2.2.2 Derivación y significado de la constante del matraz.	21
2.2.3 Derivación alternativa de la constante del matraz.	26
2.2.4 La solubilidad del oxígeno.	27
2.2.5 El Termobarómetro.	29

2.2.6 Procedimiento empleado.	34
2.2.7 Limitaciones del método.	35
2.3 Preparación de soluciones y medios de cultivo.	35
2.4 Composición del medio de cultivo empleado.	39
2.5 Preparación del inóculo.	39
2.6 Curva de crecimiento.	40
2.7 Metodología del análisis de resultados.	41
2.7.1 Tratamiento estadístico.	41
2.7.2 Estudio cinético.	42
3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.	46
3.1 Respirimetría en condiciones normales.	46
3.2 Análisis estadístico.	52
3.3 Estudio cinético.	59
3.3.1 Efecto del ion Cu (II) en las velocidades de producción de CO ₂ .	59
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	70
REFERENCIAS	72
Apéndices	75
Apéndice A	76

LISTA DE FIGURAS

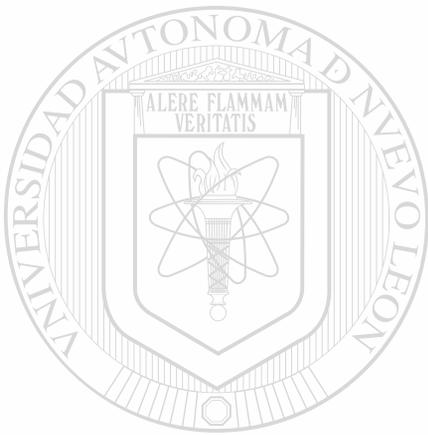
Figura	Página
2.1 Respirómetro de Warburg a volumen constante.	20
2.2 Diagrama de la preparación de soluciones de Cu(II).	38
2.3 Diagrama de la preparación de soluciones de Zn(II).	38
2.4 Algoritmo del programa CO2expo.for para la optimización de los parámetros del modelo de la cinética de producción de CO ₂	45
3.1 Producción de CO ₂ y consumo de O ₂ por <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 en condiciones normales de cultivo en caldo MRS a 25 °C.	46
3.2 Curva de producción de CO ₂ y consumo de O ₂ por <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 en condiciones normales de cultivo en caldo MRS a 25 °C.	48
3.3 Rutas metabólicas abreviadas de las bacterias lácticas.	51
3.4 Comparación entre las distribuciones de frecuencias relativas de la producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en presencia de iones Cu(II) 50,500 y 5000 μM y en condiciones normales.	53
3.5 Comparación entre las distribuciones de frecuencias relativas de la producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en presencia de iones Zn(II) 50,500 y 5000 μM y en condiciones normales.	54

3.6 Comparación entre las medias globales de producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en presencia de iones Cu (II) 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales (es decir [Cu] es =0)	56
3.7 Comparación entre las medias globales de producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en presencia de iones Zn (II) 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales (es decir [Zn] es =0).	57
3.8 Comparación de la producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Zn(II) 50,500 y 5000 μM.	59
3.9 Comparación de la producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu(II) 50,500 y 5000 μM.	61
3.10 Comparación de la velocidad de producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Zn(II) 50,500 y 5000 μM.	63
3.11 Comparación de la velocidad de producción de CO ₂ por <i>L. casei</i> ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu(II) 50,500 y 5000 μM.	65
3.12 Valores del parámetro <i>b</i> para <i>L. casei</i> ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu(II) 50,500 y 5000 μM y de iones Zn(II) 50,500 y 5000 μM.	67

3.13 Valores del parámetro a para *L. casei* ATCC 393 en

condiciones normales y en presencia de iones

Cu(II) 50,500 y 5000 μM y de iones Zn(II) 50,500 y 5000 μM . 68



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1 Taxonomía formal y común de <i>Lactobacillus casei</i> .	2
2.1 Lista de reactivos.	18
2.2 Equipos.	19
2.3 La solubilidad del oxígeno.	28
2.4 Correcciones para cambios en el termobarómetro.	31
2.5 Cálculos del consumo de O ₂ a partir de las lecturas del manómetro.	32
2.6 Composición del caldo MRS.	39
3.1 Comportamiento de los parámetros <i>a</i> y <i>b</i>	62
3.2 Velocidades de producción de CO ₂ en presencia de iones Zn(II).	63
3.3 Velocidades de producción de CO ₂ en presencia de iones Cu (II)	66

NOMENCLATURA

ATP	Adenosín trifosfato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
E°	Potencial de reducción
CoA	Coenzima A
TPP	Tirosín pirofosfato.
SOD	Superóxido dismutasa
ATCC	American Type Cultur Collection
μM	Concentración micromolar.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo 1

Introducción

1.1 Antecedentes

Las bacterias lácticas constituyen un grupo muy importante por muchas razones, se encuentran en las tradicionales leches fermentadas como el kefir, el yogurt, el Laban zeer, y también en una variedad de quesos tales como el Provolone, Parmesano y el Manchego, y más recientemente en productos comerciales tales como Yakult ®, Actimel®, Gelifilus®, y Vifit®. Entre las bacterias lácticas, *Lactobacillus casei* puede usarse solo o en asociación con otras bacterias del mismo grupo a fin de crear propiedades organolépticas diferentes.

Fueron descubiertas en el año 1900 por Eli Metchnikoff, quien después de estudiar su relación con el proceso digestivo en el ser humano, sugirió que algunas enfermedades gastrointestinales se podían mejorar si se utilizaban las bacterias lácticas presentes en el yogurt (1).

Las investigaciones de las últimas décadas sugieren que *L. casei* puede ser benéfico para la salud, y puede utilizarse:

- En el tratamiento y prevención de la diarrea intestinal y la causada por el uso de antibióticos.
- Como probiótico.
- En la prevención del cáncer de colon.

El término "probiótico" se refiere a "organismos vivos, cuya ingestión en cierta cantidad ejerce beneficios en la salud, más allá de la nutrición básica inherente". Las cepas de *L. casei* se encuentran naturalmente en vegetales

fermentados, leche y carne; así como en la boca y el intestino humanos y en el medio ambiente (13).

El nombre *L. casei* se utilizó por primera vez en 1919 y su nomenclatura está relacionada con la palabra queso y caseína (la principal proteína de la leche) y se origina del latín *caseus* que significa queso.

Hoy en día con las técnicas de homología de DNA-DNA es posible reconocer al *L. casei* como un grupo con varias especies, donde cada especie es capaz de formar subespecies, y aunque cada especie difiere en ciertas características tales como temperatura de crecimiento óptimo, capacidad para fermentar carbohidratos específicos; (Tabla 1.1) genéticamente son muy similares.

Tabla 1.1.- Taxonomía formal y común de *Lactobacillus casei*

Taxonomía formal	Taxonomía común	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcares
<i>L. casei</i> subesp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i>	10-40 °C	Ribosa, sacarosa, D- turanosa
<i>L. casei</i> subesp. <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>	10-40 °C	Gran diversidad de azúcares.
<i>L. casei</i> subesp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> subesp. <i>tolerans</i>	10-37 °C resiste a 72 °C, 40 min.	Metaboliza muy pocos azúcares.
<i>L. casei</i> subespecie <i>rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	15-45 °C	ramnosa

Los *Lactobacillus casei* se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, por lo general inmóviles; no forman esporas, difieren de otros lactobacilos en varios aspectos. Son más pequeños que *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. helveticus* son heterofermentadores facultativos y mesofílicos (2).

Para considerarse como probiótico los lactobacilos deben alcanzar el sitio de acción en el intestino en cantidades lo suficientemente grandes para lograr el efecto deseado. Ellos deben ser capaces de sobrevivir al pH ácido del estómago el cuál puede ser de 3 y también de los ácidos biliares en el intestino. *L. casei* es resistente a ambas cosas. En un estudio *ex vivo*, Goldin y colaboradores encontraron que *L. casei* permanece viable en un rango de pH de 3.0-7.0. Los probióticos tampoco deben causar problemas secundarios, aunque son raras las manifestaciones de infecciones, en particular se ha asociado a varias especies de lactobacilos incluyendo *L. casei*, *L. acidophilus*, y *L. plantarum* con endocarditis (menos de 70 casos a lo largo de 50 años), pero no fueron de origen alimenticio. Las leches fermentadas con *L. casei* han sido consumidas por miles de años por millones de personas sin producir enfermedades, y por lo tanto son considerados como productos alimenticios seguros (1,2,3).

Se ha demostrado que *L. casei* disminuye las enzimas relacionadas con el cáncer de colon. Las enzimas β -glucuronidasa , nitroreductasa y ácido glicocólico hidrolasa incrementan la velocidad de conversión de células procarcinógenas a carcinógenas en el intestino, y a niveles elevados incrementan el riesgo de cáncer de colon. Estudios en humanos revelaron que después de consumir 10^{10} a 10^{11} ufc (unidades formadores de colonias) por día de una cepa de *L. casei* los niveles de dichas enzimas retornaron a la normalidad (1,2,3,10,11).

Las leches fermentadas, entre ellas el yogurt; ofrecen ventajas para quienes tienen problemas con la digestión de la lactosa, a causa de la deficiencia de lactasa en su organismo, ya que está más digerida en el yogurt que en la leche normal. También el yogurt reduce la duración de ciertos tipos de diarrea, especialmente en niños. Asimismo consumir leches fermentadas incrementa los linfocitos B, interferón γ , interleucinas (2). Otro aspecto benéfico del consumo de estos productos es la disminución del nivel de colesterol en algunos individuos sometidos a estudio, aunque no se ha demostrado el cómo, lo cierto es que su consumo regular no incrementa la concentración de colesterol en plasma (3).

En estudios con niños con diarrea aguda que fueron tratados con *L. casei* se encontró que se elevaron los niveles de varias inmunoglobulinas.

A cerca de los beneficios antes mencionados, de las bacterias lácticas, las leches fermentadas y en especial el *L. casei* microorganismo de interés en

el presente estudio, es importante relatar que para que dichos efectos se logren, los microorganismos deben estar vivos a fin de ser activos. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2 Características fisiológicas y bioquímicas del microorganismo.

Todas las bacterias lácticas crecen anaeróticamente, la mayor parte de ellas no son sensibles al oxígeno pudiendo crecer en su presencia o ausencia; considerándose anaerobios aerotolerantes, o bien anaerobios indiferentes, es decir que esté o no presente el oxígeno ellas obtienen ATP por medio de la fermentación de azúcares.

La capacidad de utilizar el oxígeno o crecer en su ausencia dependerá de la ruta energética que posea el microorganismo, pero la capacidad de resistir a los efectos tóxicos del oxígeno depende de si posee enzimas intrínsecas sensibles al oxígeno, o es capaz de degradar los dos productos altamente tóxicos que derivan de la utilización de oxígeno, como lo son el peróxido de hidrógeno y el ion superóxido, mediante las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (4).

Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación oxidativa, la energía que requieren la obtienen por fosforilación a nivel de sustrato.

No se forma ATP en la reacción de flavoproteínas oxidasas, pero el sistema oxidasa puede emplearse para la reoxidación de NADH. La mayor parte de las bacterias lácticas puede obtener energía solo del metabolismo de los carbohidratos y compuestos relacionados por esta razón su hábitat debe contenerlos.

Las bacterias lácticas tienen una capacidad biosintética limitada y sus requerimientos nutricionales son complejos, pues requieren vitaminas, purinas y pirimidinas.

Una diferencia importante entre los subgrupos de las bacterias lácticas se basa en la naturaleza de los productos que se forman en la fermentación de azúcares. De ahí que se clasifiquen en homofermentadoras las que forman solo ácido láctico y heterofermentadoras las que producen ácido láctico, CO₂, pequeñas cantidades de etanol, y otras sustancias aromáticas (5, 34).

Algunas especies homofermentadoras forman una amplia variedad de productos si se alteran las condiciones de fermentación.

A pH alcalino la producción de formato, acetato y etanol se incrementa a expensas de lactato. Esto es importante para determinar si la mezcla de productos de la fermentación homoláctica surge de la misma ruta que de la de las especies heterofermentadoras. Mientras que varios investigadores proporcionan evidencia de que las especies homofermentadoras contenían los intermediarios de la ruta EMP, la evidencia más convincente la proporcionaron los estudios con marcaje radiactivo.

L.casei, *L.pentosus*, y *S.faecalis* producen lactato con el 50 % de las moléculas marcadas con ^{14}C en el grupo metilo, si se usa como fuente de carbono, glucosa marcada en el carbono 1 con ^{14}C , y lactato con ^{14}C en el carboxilo cuando proviene de los carbonos 3 y 4 de la glucosa marcados con ^{14}C , estos resultados, indican la distribución de átomos de C esperados de la utilización de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas.

Las bacterias homolácticas producen solo ácido láctico a través de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas pues contienen aldolasa una de las enzimas clave en la glucólisis. Las heterofermentadoras siguen la ruta de la hexosa monofosfato pues carecen de aldolasa y no pueden descomponer la hexosa difosfato a triosa fosfato. En lugar de ello, oxidan glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato y luego lo descarboxilan a pentosa fosfato, que se transforma en triosa fosfato y acetilfosfato por medio de la enzima fosfoacetolasa. La triosa fosfato se convierte por último en ácido láctico con la producción de 1 mol de ATP, mientras el acetil fosfato acepta electrones a partir de NADH generado

durante la producción de pentosa fosfato, y así se convierte en etanol sin producción de ATP. Debido a esto los heterofermentadores, producen un solo mol de lactato, en lugar de dos moles, como lo hacen los homofermentadores.

Esta diferencia en el producto de ATP a partir de glucosa refleja el hecho de que los homofermentadores producen el doble de masa celular que los heterofermentadores a partir de la misma cantidad de glucosa. Dado que los heterofermentadores descarboxilan 6-fosfogluconato, producen CO₂ como un producto de fermentación, mientras que los homofermentadores producen poco o nada de CO₂. Entonces una forma simple de detectar un heterofermentador es observar la producción de CO₂ en cultivos de laboratorio.

Muchas cepas de heterofermentadores pueden utilizar oxígeno como aceptor de electrones con una flavoproteína que sirve como donador de electrones. En esta reacción la mitad del NADH generado por la oxidación de la glucosa a ribosa se transfiere a una flavina y al O₂. De esta manera el acetilfosfato se puede convertir en acetato en lugar de ser reducido a etanol sintetizándose así un ATP adicional. En algunos organismos pueden operar ambas rutas. Uno de los factores principales que controlan el tipo de producto formado, es la cantidad de equivalentes reductores disponibles.

En el paso oxidativo de la triosa fosfato el $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ $E^0 = -0.28\text{v}$
El E^0 de la ácido láctico deshidrogenasa es de -0.18v . Aunque éste es un potencial más alto el NAD reducido (o sea NADH) donará sus átomos de H al piruvato, reduciéndolo a lactato. Sin embargo si está disponible algún otro aceptor de H el NADH donará su H a este aceptor adicional, y no al piruvato, si el potencial de electrodo de la reacción es más alto.

Varias especies de *Lactobacillus* producen acetoina y diacetilo, compuestos responsables del sabor característico de la mantequilla hecha de crema ácida.

Se han descrito varias rutas para la producción de acetoina.

Lactobacillus casei y otras bacterias lácticas requieren ácido lipóico para su crecimiento y activar el acetato a acetil fosfato y de ahí a Acetil Coenzima A vía acetato cinasa y fosfotransacetilasa. Por lo tanto si el medio de cultivo carece de ácido lipóico las bacterias que lo requieren no podrán formar acetil Coenzima A a partir de piruvato. En un medio libre de ácido lipóico, que contenga glucosa y acetato, se forma la acetoina por ambas rutas la de la Acetil CoA -C₂-TPP y la de condensación C₂-C₃.

Se considera que los organismos productores de ácido láctico metabolizan azúcares mediante rutas fermentadoras. No utilizan oxígeno molecular como aceptor final de H y no se genera ATP por fosforilación oxidativa. La reacción de las enzimas oxidantes con O₂ y luego con el H₂O₂ (que se forme) incrementará los productos tóxicos.



Muchos organismos aeróbicos facultativos están protegidos de la acción tóxica del superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD):



El peróxido de hidrógeno es disipado por la catalasa:



Algunos organismos fermentadores como el *L. plantarum* son aerotolerantes pero no producen SOD o catalasa. El oxígeno no se reduce y por lo tanto no se forman el superóxido y el peróxido de hidrógeno.

En organismos heterofermentadores, la diversidad de productos de fermentación como resultado e influencia del ambiente es mayor que la de los

homofermentadores. Debido a la operación de más de una ruta metabólica de carbohidratos. En ciertos organismos la fermentación básica tiene lugar a través del rompimiento C₂-C₃ de la pentosa fosfato.



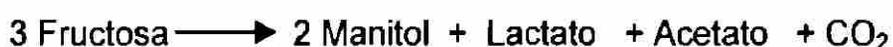
En otros, el glicerol puede ser un producto predominante:



En este último grupo operan ambas rutas juntas para generar los productos finales.

Es interesante comparar la diversidad de productos observados con otros sustratos además de la glucosa. Con fructosa como fuente de carbono se producen grandes cantidades de manitol.

La fructosa sirve como aceptor de H y se reduce a manitol:



Las especies homolácticas producen solo lactato con fructosa como sustrato, mientras que las especies heterofermentadoras convierten fructosa a acetil fosfato, acetaldehído y dihidroxiacetona fosfato. Esos intermediarios se utilizan como aceptores de H para producir etanol y α -glicerolfosfato.

Debido a que los organismos heterolácticos utilizan la ruta de la pentosa fosfato, producen CO_2 del C_1 de la glucosa. La oxidación de glucosa 6- fosfato y 6-fosfogluconato están aparentemente ligadas a la reducción de acetilfosfato y acetaldehído para formar etanol sin la formación de productos adicionales.

Cuando el sustrato está más oxidado o más reducido que la glucosa, habrá el correspondiente movimiento en los productos. Un sustrato reducido tal como el manitol (valor de oxidación = -1) llevará a la producción de más productos reducidos como el glicerol, hidrógeno y etanol. Con sustratos más oxidados como el citrato (valor de oxidación = +3) habrá más productos oxidados.

La distribución de los productos también depende del pH, arriba de un pH de 7.0 se produce poco o nada de lactato:



A pH ácido se forma más lactato y acetoína:

Los pasos iniciales en la fermentación de citrato involucran la acción de la enzima citrasa dando oxalacetato y acetato. La citrasa es una enzima no dependiente de coenzima A que da un incremento de acetato directamente sin la formación de acetilfosfato.

El oxalacetato formado en esta reacción se convierte a piruvato y CO_2 , el piruvato es reducido a lactato. También la acetoína se produce del piruvato con producción adicional de CO_2 .

La ruta de la fosfocetolasa sirve como fuente principal de fosfato de dinucleótido de nicotinamida reducido (NADPH) y proporciona la actividad

reductora requerida en muchas reacciones biosintéticas. Algunos microorganismos utilizan la ruta de la fosfocetolasa como la principal ruta del metabolismo de la glucosa. *Leuconostoc mesenteroides* un típico organismo heterofermentador, utiliza esta ruta para dar lactato, etanol y CO_2 (6).

Lo anteriormente dicho nos mostró la importancia de las bacterias lácticas; no solo como microorganismos productores de alimentos, sino su uso como probiótico. Las rutas metabólicas que utilizan, y el hecho de ser un microorganismo anaerobio indiferente, motivó a estudiar su actividad respiratoria.

Lactobacillus casei normalmente es una bacteria homofermentadora pero la cepa ATCC 393 es heterofermentadora (33), por lo tanto es un buen microorganismo para estudiar su actividad respiratoria ya que es procariota, produce grandes cantidades de CO₂ (en comparación con los homofermentadores), es anaeróbico facultativo.

Por otro lado, dado que el ser humano es capaz de transformar su ambiente, y en su lucha por proveerse confort y satisfacer sus necesidades, ha causado serios problemas de contaminación, y conciente de sus problemas ha buscado solucionarlos. Entre los grandes problemas ocasionados al medio ambiente, el desecho de contaminantes metálicos como Cobre, Fierro, Mercurio, Plomo, Cromo, etc. ha sido ampliamente considerado y son varios los intentos que la comunidad científica ha hecho para disminuir su disposición y al mismo tiempo reducir las cantidades de los mismos que ya están presentes en el medio ambiente.

En la antigüedad, muchos de los recipientes utilizados para producir alimentos fermentados como lo es el caso que nos ocupa, estaban constituidos o contenían en su composición elementos tales como el Fierro, el Cobre, o el Zinc, mismos que al entrar en contacto con medios ácidos eran disueltos en el medio de fermentación, acarreando como consecuencia que los microorganismos utilizados en dichas fermentaciones, se vieran en cierto grado expuestos a concentraciones de los elementos mencionados.

Mucha literatura se ha expuesto a la comunidad científica en la que se analiza el efecto de algunos iones metálicos sobre grupos específicos de

microorganismos, haciendo especial énfasis en la influencia de algunos metales sobre las actividades bioquímicas o fisiológicas de los mismos (12,22,23,24).

Los microorganismos requieren de ciertos elementos metálicos para su funcionamiento y crecimiento. Los macroelementos como el K, y el Mg y elementos traza como el Mn, Fe, Cu, Zn, y Mo. Si bien los microorganismos requieren de esos metales, también es cierto que en altas concentraciones, dichos metales pueden ser tóxicos (27,28,29).

Hughes y colaboradores en 1991 establecieron que la biodisponibilidad y por lo tanto la reactividad de los metales, depende de la forma química en que se encuentra en el medio de cultivo. Por lo general los metales se añaden al medio de cultivo en forma de sales solubles, que en el medio acuoso forman fácilmente acuocomplejos. Sin embargo el ion metálico puede estar en el medio en formas diferentes, lo cual depende de las propiedades químicas y de la concentración de los ligandos y agentes quelatantes presentes en el medio, además del pH. La carga sobre el complejo es un factor importante, ya que es más probable que un complejo neutro atraviese la membrana celular por rutas no específicas, que uno con carga.

La biodisponibilidad, o toxicidad de un ion metálico variará considerablemente con la constitución química del medio y la disponibilidad de ligandos. La toxicidad de un ion metálico puede reducirse si éste forma un complejo fuerte, como se observa en *Tetrahymena pyriforme* que puede tolerar concentraciones 100 veces más altas de Cu(II) en un medio orgánico enriquecido, que en un medio definido, y la adición de extracto de levadura a

cultivos de *Klebsiella pneumoniae* protege a la bacteria de los efectos tóxicos usuales del Cu(II).

Los aniones inorgánicos también pueden afectar la biodisponibilidad de iones metálicos, por formación de complejos. Así tenemos el efecto protector del NaCl a altas concentraciones (2-4 M) sobre el efecto tóxico del CdCl₂, pues se forman clorocomplejos aniónicos.

También son importantes los cambios en la especiación química (la forma en que se encuentra complejado el metal) durante el crecimiento; ya que la célula puede sintetizar algún ligando que compleje el metal. La precipitación de los iones metálicos en forma de oxalatos o fosfatos puede ocurrir si cambia el pH del medio, a consecuencia de los productos de la fermentación.

La capacidad de un ion metálico para complejar un ligando depende de su poder polarizante, (la relación carga/radio del catión). Un catión con alto poder polarizante "es visto" por el ligando como un centro de alta densidad de carga positiva, teniendo lugar una fuerte interacción entre el ion metálico y el ligando (25,26).

Un ion metálico es un ácido de Lewis fuerte.

Los cationes duros son pequeños, de carga alta y no son polarizables. El Cu (II) y el Zn(II) son moderadamente duros y tienen afinidad por ligandos donadores que posean O, N y S. El Cu(II) es el ácido de Lewis más fuerte; y también es el ion metálico divalente que más fuertemente se enlaza a un ligando. Los ingredientes de los medios de cultivo complejos, tales como: extracto de levadura, peptona, aminoácidos; complejan efectivamente a los iones de metales (8).

1.3 Propiedades fisicoquímicas de la membrana celular de

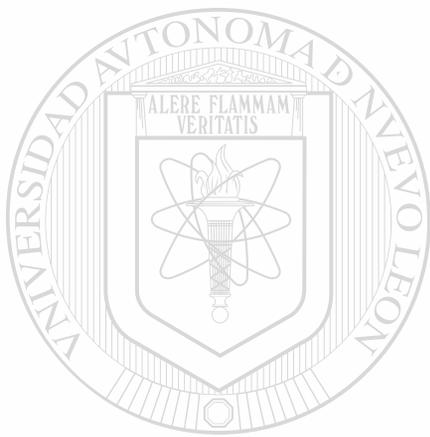
Lactobacillus casei.

Pelletier y colaboradores en 1997 estudiaron algunas propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares de diferentes cepas de Lactobacilos entre ellas la de *Lactobacillus casei* subespecie *casei*; observaron interacciones ácido-base de Lewis resultantes del carácter básico (donador de electrones) que posee la membrana celular de los lactobacilos. Demostraron que los lactobacilos son donadores de electrones fuertes, debido a los grupos cargados negativamente que poseen en sus membranas, tales como los grupos fosfato, carboxilato y las proteínas que la constituyen. Además observaron que el punto isoelectrónico es relativamente específico para las especies de *Lactobacillus*; debido a las propiedades hidrofílicas de la membrana celular (35).

La respiración es un proceso vital que desempeñan todos los seres vivos, y característico de cada grupo.

De ahí el interés por estudiar el proceso respiratorio en un microorganismo como lo es el *Lactobacillus casei* y además observar el efecto que algunos iones metálicos pueden causar sobre la actividad respiratoria de dicho organismo. Esto es importante dada la utilidad industrial del microorganismo involucrado en el estudio, en la rama de la industria alimentaria, productos lácteos, bebidas fermentadas; ya que los *Lactobacillus* son indeseables en la industria de la cerveza, pero indispensables en la elaboración de productos fermentados elaborados a base de leche. La utilización de nuevos materiales en la fabricación de los tanques fermentadores

(materiales metálicos), o el uso de desinfectantes que contengan iones de metales pesados puede afectar el funcionamiento normal de dichos microorganismos (36).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 Objetivo general

- ❖ Determinar el efecto de los iones Cu (II) y el Zn(II) sobre la actividad respiratoria de *Lactobacillus casei* ATCC 393.

1.5 Objetivos Particulares

- ❖ Establecer las condiciones de cultivo del microorganismo.
- ❖ Estudiar la actividad respiratoria de *Lactobacillus casei* ATCC 393.
- ❖ Observar el efecto de las soluciones de iones Cu (II) y el Zn(II), 50 μ M, 500 μ M y 5 mM sobre la actividad respiratoria de *Lactobacillus casei* ATCC 393.
- ❖ Comparar la actividad respiratoria del *Lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones normales con la observada en presencia de iones Cu(II) y Zn

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Descripción de equipos y reactivos

2.1.1 Reactivos

En la tabla 2.1 se muestran los reactivos utilizados en los experimentos realizados.

Tabla 2.1 Lista de reactivos.

FORMULA	NOMBRE	MARCA	PUREZA
Na C ₂ H ₃ O ₂	Acetato de sodio	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
(NH ₄) ₂ C ₆ O ₇ H ₆	Citrato ácido de amonio	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
NaCl	Cloruro de sodio	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
	Colato de sodio		A.C.S.
K ₂ HPO ₄	Fosfato monohidrógeno de potasio	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
C ₆ H ₁₂ O ₆	D-Glucosa	Técnica Química. S.A.	A.C.S.
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	Nitrato de cobre (II) trihidratado	Analytika	99
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Nitrato de zinc hexahidratado	Productos Químicos Monterrey.	99
MgSO ₄	Sulfato de magnesio anhidro.	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.®
MnSO ₄	Sulfato de manganeso	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
	Cristal violeta	Analit	
	Fucsina	Merck	
	Safranina	Analit	A.C.S.
I ₂	Yodo	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
KI	Yoduro de Potasio	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
C ₂ H ₆ O	Etanol	Productos Químicos Monterrey.	96
C ₃ H ₆ O	Acetona	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.

FORMULA	NOMBRE	MARCA	PUREZA
C ₄ H ₁₀ O	Eter etílico	Productos Químicos Monterrey.	A.C.S.
	Grasa silicona		
H ₂ O	Agua desionizada y bidestilada	Lab. De Ingeniería Química. F.C.Q. U.A.N.L.	A.C.S.
	Caldo MRS	MERCK	
	Peptona de caseína	Bioxon	
	Extracto de carne	Bioxon	
	Extracto de levadura	Bioxon	
	Tween 80	Bioxon	

Continuación Tabla 2.1 Lista de reactivos.

2.1.2 Equipos

En la tabla 2.2 se describen los equipos utilizados en el experimento.

Tabla 2.2 Equipos.

NOMBRE	MARCA
Potenciómetro	Química Instrumental
Agitador magnético	Corning.
Placa de calentamiento	Thermolyne.
Microscopio	Carl Ziess
Espectrofotómetro visible	Coleman Jr II. Perkin Elmer.®
Precision Warburg Aparatus	Precision Scientific Co.
Autoclave automática.	National a Heincke Co.

2.2 Manometría a volumen constante “El Método de Warburg”.

Las técnicas manométricas se basan en la ley general de los gases: $PV=RT$

Donde R es la constante general de los gases.

Si se toman como constantes 2 de las 3 variables; la tercera indicará la cantidad de gas consumido o liberado.

Por lo general se toma la temperatura como constante ya que es más difícil medir los cambios de temperatura; el volumen también se puede tomar como constante de tal manera que los cambios en la presión (P) indicarán la cantidad de gas producido o liberado.

El respirómetro de Warburg se elaboró a partir de un manómetro de sangre; con algunas modificaciones. El respirómetro está basado en el principio de que a temperatura y volumen de gas constantes cualquier cambio en la cantidad de gas se puede medir por los cambios de presión.

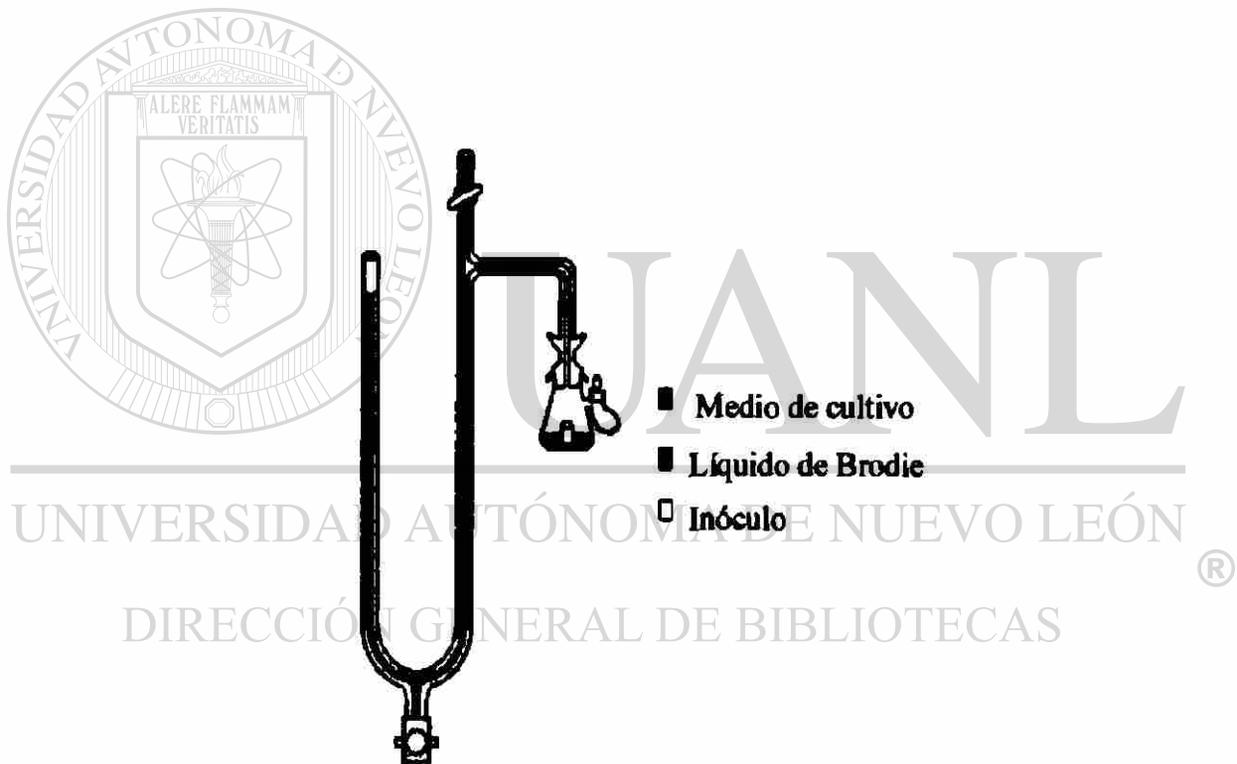


Figura 2.1.- Respirómetro de Warburg, a volumen constante.

La escala del manómetro está graduada en centímetros y en milímetros. Normalmente las lecturas se registran en milímetros con aproximaciones de 0.5mm. El aparato como se muestra en la figura 2.1 consta de un matraz desmontable equipado con un brazo lateral, acoplado a un manómetro que contiene un líquido de densidad conocida. El matraz se sumerge en un baño de agua a temperatura constante, el sistema se agita para facilitar el intercambio de gases entre el fluido y la fase gaseosa. Se asume que la temperatura del manómetro el cual no está sumergido en el baño, no difiere mucho de la del matraz. El manómetro mostrado en la figura 2.1 tiene un brazo abierto y uno cerrado. Se selecciona un punto de referencia en el lado cerrado del manómetro (usualmente 150 o 250 mm) y el líquido en el brazo cerrado del manómetro siempre se ajusta a este punto antes de registrar los cambios de presión.

2.2.1 Principios Generales

Para medir el consumo de oxígeno en el matraz, se gira el tornillo que se encuentra al final del manómetro para ajustar el fluido del manómetro a 150 mm con la válvula tres caminos (o llave de paso) abierta. Se cierra la válvula y se registra la lectura en el brazo abierto del manómetro (supongamos que es 149 mm) 10 minutos después el líquido baja en el brazo cerrado y baja en el brazo abierto del manómetro; con el brazo cerrado se ajusta a 150 mm; entonces se toma el volumen de gas en el matraz como constante. Supongamos que la lectura en el brazo abierto ahora es de 120 mm. Para ambas lecturas, inicial y a los 10 minutos, el fluido en el brazo cerrado del manómetro se ajustó a 150 mm, pero durante el intervalo la lectura del brazo abierto disminuyó de 149 a 120 mm como resultado del consumo de oxígeno en el matraz. Si conocemos el volumen de gas en el matraz (V_g), el volumen de líquido en el matraz (V_l), la temperatura de operación, el gas que se está intercambiando y la densidad del líquido en el manómetro entonces es posible conocer la cantidad de gas consumido (si solo un gas se está intercambiando).

2.2.2 Derivación y significado de la constante del matraz.

Fundamentalmente consiste en calibrar el sistema y de los cambios de presión observados se puede calcular la cantidad de gas consumido o desprendido en mm^3 o μl (a 0°C y 760 mm de Hg de presión).

Símbolos empleados:

h = El cambio observado en el brazo abierto del manómetro en mm.

x = μ l de gas (a 0°C , 760 mmHg)

V_g = Volumen de gas en el matraz (incluyendo conexiones hasta el punto de referencia 150 o 250 mm en el brazo cerrado del manómetro.

V_f = Volumen de fluido en el recipiente.

P = Presión inicial en el matraz del gas involucrado en la determinación. (Es la presión parcial del gas en la mezcla de gases). Si esta mezcla de gases contiene vapor de agua, la presión parcial del gas involucrado en la determinación será menor que su presión parcial en condiciones secas. Por lo tanto si P está definido como gas seco, para ecuaciones que involucren

gases húmedos deberá utilizarse $P-R$.

P_0 = Presión estándar la cual es 760 mm Hg ó 10,000 mm con líquido de Brodie.

T = Temperatura del baño en grados absolutos ($273 + T$ en $^{\circ}\text{C}$)

α = Es la solubilidad del gas en el líquido de reacción (expresado como mol de gas/mol de Líquido cuando el gas está a una presión de 760 mm Hg a la temperatura T).

R = Es la presión de vapor del agua (u otro líquido) a la temperatura T .

El líquido en el matraz ejercerá una presión de vapor (R) en la fase gaseosa y algo de gas se disolverá en el líquido.

En la fase gaseosa uno tiene un volumen de gas (V_g) a una temperatura T, y a una presión P-R (P-R = presión parcial del gas menos la presión de vapor del líquido). Este volumen de gas puede cambiarse a condiciones estándar en la fórmula: $PV/T = P'V'/T'$ (2.1)

' significa condiciones estándar $P'=P_0=760$ mmHg.
$$\frac{(P-R)V_g}{T} = \frac{P_0V'}{273} \quad (2.2)$$

En condiciones estándar
$$V' = \frac{V_g}{P_0} \frac{273}{T} (P-R) \quad (2.3)$$

Inicialmente algo de gas está disuelto en el fluido. La cantidad de gas en el fluido es:

$$V_f \alpha (P-R)/P_0 \quad (2.4)$$

donde

α = es la solubilidad del gas en ml de gas/ml de fluido a una presión parcial de 1 atm. El término $(P-R)/P_0$ convierte la solubilidad a 1 atm a la existente en ese momento en el matraz.

De la ley de Henry:

“La concentración de gas disuelto es proporcional a la presión ejercida sobre el líquido. Por lo tanto si α es la solubilidad a P_0 (1 atm.), la solubilidad a la presión actual existente en el matraz ($P-R$, presión atmosférica menos la debida a la del vapor de agua) será

$$\alpha \frac{(P - R)}{P_0} \quad (2.5)$$

La solubilidad de los gases se determina experimentalmente, y es diferente para cada gas en cada solución.

“La solubilidad individual de los gases en una mezcla es casi independiente de la presión de otros gases”.

De las consideraciones anteriores, el gas presente al inicio es el que está en la fase gaseosa más el que está en la fase líquida:

$$\text{Gas al inicio} = \underbrace{V_g \frac{273}{TP_0} (P - R)}_{\text{fase gaseosa}} + \underbrace{V_f \alpha \frac{(P - R)}{P_0}}_{\text{fase fluida}} \quad (2.6)$$

Al final del período de observación este gas se cambia por la cantidad (x) la cual resulta como cambio de la presión a una altura h en mm.

Si se despidе gas, h es positiva; si se consume gas h es negativa.

Si consideramos que se consume gas, su presión deberá ser: $(P-R-h)$ algo más que el valor inicial $(P-R)$.

Entonces en la fase gaseosa: $V_g \frac{273}{T} \frac{(P - R - h)}{P_0}$ (2.7)

En la fase líquida: $V_f \alpha \frac{(P - R - h)}{P_0}$ (2.8)

El gas al final: $V_g \frac{273(P-R-h)}{T P_0} + V_f \alpha \frac{(P-R-h)}{P_0}$ (2.9)

El gas consumido (x) es el que estaba presente inicialmente (2.6) menos el que aparece al final (2.9).

$x = \text{gas inicial} - \text{gas final.}$

$$x = \left[V_g \frac{273(P-R)}{T P_0} + V_f \alpha \frac{(P-R)}{P_0} \right] - \left[V_g \frac{273(P-R-h)}{T P_0} + V_f \alpha \frac{(P-R-h)}{P_0} \right]$$

$$x = V_g \frac{273(P-R)}{T P_0} + V_f \alpha \frac{(P-R)}{P_0} - V_g \frac{273(P-R-h)}{T P_0} - V_f \alpha \frac{(P-R-h)}{P_0}$$

$$x = V_g \frac{273h}{T P_0} + V_f \alpha \frac{h}{P_0}$$

$$x = h \left[\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} \right] = hK \quad (2.10)$$

Observamos que V_g , T , α , V_f y P_0 se conocen, para un experimento dado, y son constantes; estos valores determinan la constante del matraz K , con cuyo valor

se pueden convertir los mm de presión a μl de gas consumido o expulsado.

Resumiendo:

$x =$ cantidad de gas intercambiado =

h

*

K

Lectura
en el
brazo
abierto

Constante
del matraz

$$k = \text{constante del matraz} = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} \quad (2.11)$$

Para calcular P_0 se requiere la densidad del líquido manométrico, (que debe ser 1.033 para que P_0 sea =10,000) y hacer la corrección:

$$P_0 = 760 \frac{13.60}{1.033} = 10,000 \quad (2.12)$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
2.2.3 Derivación alternativa de la constante del matraz. ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

H. Bougerod señaló que si se define P como la presión del gas seco, formada por la presión parcial de todos los gases, por ejemplo $P_{O_2} + P_{N_2} + P_{\text{otros gases}}$. El vapor de agua es otro gas, P_w o R en las ecuaciones anteriores. Entonces:

$$\text{El gas al inicio} = V_g \frac{(273)}{T} \left(\frac{P_{O_2} + P_{N_2} + P_{og} + P_w}{P_0} \right) + V_f \alpha \left(\frac{P_{O_2} + P_{N_2} + P_{og} + P_w}{P_0} \right) \quad (2.13)$$

$$\text{El gas al final} = V_g \frac{(273)}{T} \left(\frac{P_{og} + P_w - h}{P_0} \right) + V_f \alpha \left(\frac{P_{og} + P_w - h}{P_0} \right) \quad (2.14)$$

Cuando estas dos ecuaciones se restan, se obtiene la misma constante del matraz derivada anteriormente.

2.2.4 La solubilidad del oxígeno.

La solubilidad del oxígeno se expresa como ml de O₂/ml de líquido; cuando el gas está a una presión de 1 atm, y se denomina por la letra α .

El valor de α se ve afectado por dos factores. Uno es la temperatura, ya que la solubilidad de los gases disminuye cuando ésta se eleva y el otro factor que disminuye la solubilidad de los gases es la presencia de solutos (sólidos o líquidos) disueltos en el líquido, debido a la hidratación del soluto lo cual deja menos solvente disponible para disolver los gases. En la tabla 2.3 se muestra la solubilidad del oxígeno en diferentes líquidos.

Tabla 2.3. La solubilidad del oxígeno . Tomado de International Critical Tables.(1928).

Valores de α como ml de gas disuelto por ml de líquido a 1 atm de presión.					
Temperatura °C	Solución de Ringer	Agua	HCl 0.2N	H ₂ SO ₄ 2.0N	NaCl 2.0M
0		0.04872			0.023
10	0.0480	0.03793			0.019
15	0.0340	0.03441	0.028		0.017
20	0.0310	0.03091			0.016
25	0.0285	0.02822	0.025	0.023	0.015
30	0.0260	0.02612			0.014
35	0.0245				
40	0.0230				

Aunque el efecto de las sales sobre la solubilidad del oxígeno parece grande, actualmente tiene poco efecto sobre la constante del matraz para la utilización del oxígeno. Por ejemplo un cambio de agua pura a NaCl 2.0 M cambia el valor

de α de 0.028 a 0.016 esto baja la constante del matraz por
$$\frac{(0.012)(V_f)}{10,000}$$

Es decir que una constante de matraz de 0.863 podría ser 0.859 con NaCl 2.0M.

2.2.5 El Termobarómetro

En el desarrollo de la constante, k , se empleó un valor P el cual se asume que permanece constante desde el inicio hasta el final de un período dado. Esta P representó la presión atmosférica inicial. La presión en el laboratorio y la temperatura del baño de agua probablemente estén cambiando, sin embargo esos cambios se corrigen usando un termobarómetro. El termobarómetro consta de un matraz con agua acoplado al manómetro de Warburg; el volumen del matraz y el volumen de agua no son críticos. Sin embargo se usa un volumen de agua igual al volumen del medio de reacción.

Cualquier cambio en la presión de aire en el laboratorio afectará de igual forma a todos los manómetros, aún si el volumen de gas contenido en el recipiente difiere. Igualmente cualquier cambio en la presión resultante o un cambio en la temperatura será el mismo para todos los recipientes independientemente de sus volúmenes. El efecto de la presión se entiende intuitivamente, pero el efecto

de los cambios de temperatura también es independiente del volumen del matraz. Esto se puede mostrar de la siguiente manera: $PV = nRT$ se puede

escribir como
$$P = \frac{(nR)T}{V} \quad (2.15)$$

Donde n es el número de moléculas de gas, las cuales no cambian en el termobarómetro. Entonces n , V y R son constantes (se toma a V como constante en el sistema Warburg).

$$P = (\text{constante}) T, y$$

$$\Delta P = (\text{constante}) \Delta T.$$

Por ejemplo un cambio en la temperatura resulta en un cambio en la presión la cual es independiente del volumen del matraz empleado.

En la figura (2.4) se describe la manera en que se efectúan e interpretan las lecturas en los manómetros, Inicial representa la primera lectura; la lectura del matraz de reacción es 149, la del termobarómetro es 150. Al término de un período dado la lectura en el matraz de reacción bajó a 120 (o sea 29 mm).

Durante el mismo tiempo los cambios en la temperatura del baño o los incrementos de presión en el laboratorio causaron que la lectura en el termobarómetro bajara a 148 (o sea 2 mm). La disminución de la P observada en el matraz de reacción se debió a dos cosas: la utilización de algo de O₂ en el espacio gaseoso del interior del matraz (27 mm) y los cambios externos de T y P (2 mm). La corrección de las lecturas obtenidas por los cambios registrados

en el termobarómetro son obvios después de un amplio estudio de la tabla 2.4 la cual es un ejemplo de cómo manejar los datos. Si el nivel del líquido en el brazo abierto del termobarómetro se elevó fue por una disminución de la P en el laboratorio o un incremento en la T del baño. Para el matraz de reacción el cual registró una caída en la presión, la disminución observada es más pequeña que la disminución actual, debida a la cantidad de fluido que se elevó en el termobarómetro. Por lo tanto la elevación en la lectura del termobarómetro se agrega a la disminución de la presión observada. Si en los matraces de reacción se observó una elevación en la presión, el incremento en la lectura del

termobarómetro se resta de esta elevación observada. Todo este manejo de las lecturas se observa mejor en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Correcciones para cambios en el termobarómetro.

Tiempo (min)	Termobarómetro		Método 1 Respirómetro #1			Método 2 Respirómetro #1			
	lectura	cambio total	lectura	cambio	cambio real	lectura	cambio	cambio real	suma real
0	150		149			149			
60	157 (+7)	+7	148	-1	-8	148	-1	-8	-8
120	159 (+2)	+9	143	-6	-15	143	-5	-7	-15
0	150		149						
60	136	-14	11	-138	-124				

Durante el experimento es importante controlar la temperatura, si el baño disminuye su temperatura 1°C debajo de lo aceptado para el cálculo, el termobarómetro responde a esta caída en temperatura, de este modo el principal error involucrado es el uso de una constante del matraz equivocada, si

suponemos que en la explicación anterior de las lecturas, la temperatura del baño disminuye de 28°C a 27°C y los valores de las constantes se calcularon para la temperatura de 28°C ; a 28° la K_{O_2} es 0.942 pero a 27°C es 0.945 esto introduce un factor de error del 3%. Por lo tanto es importante que la temperatura del baño completo se mantenga uniforme en un rango de 0.05°C , lo cual se logra con una buena agitación.

El uso del Warburg para la medición de la respiración en células vivas, conlleva a la medición del desprendimiento de CO_2 , ya que normalmente en cualquier sistema vivo se consume O_2 y se libera CO_2 ; si esos dos gases (O_2 y CO_2) son los únicos involucrados, es posible medir la respiración (utilización de O_2) absorbiendo el CO_2 liberado, en álcali. En presencia de álcali la P de CO_2 en el aire es cero dentro de los límites de medición. El intercambio de gas causado por la respiración es la absorción de oxígeno más la liberación de CO_2 .

En la tabla 2.5 se ilustran dos métodos para calcular los microlitros de O_2 utilizados, a partir de los cambios observados en el nivel del líquido del manómetro del termobarómetro y del manómetro del matraz de reacción.

Tabla 2.5. Cálculos del consumo de O_2 a partir de las lecturas del Manómetro.

tiempo	Lectura del Termobarómetro mm	Lectura del Matraz mm	Método Total				Método del Intervalo				Suma
			Cambio en mm	Corrección del Termobarómetro	Cambio actual mm	Consumo de O_2 μl	Cambio en mm	Corrección del Termobarómetro	Cambio actual mm	Consumo de O_2 μl	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10:55	165	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11:00	164	127	-19	-1	-18	17.0	-19	-1	-18	17.0	17.0
11:05	164	94	-52	-1	-51	48.1	-33	0	-33	31.1	48.1
11:10	164	59	-87	-1	-86	81.0	-35	0	-35	32.9	81.0
11:15	164	22	-124	-1	-123	115.9	-37	0	-37	34.9	115.9

En el método de utilización total (columnas 4,5,6 y 7 de la tabla 2.5), la utilización de O_2 se calcula restando la lectura inicial (146) de todas las lecturas subsecuentes (columna 4). La corrección del termobarómetro se obtiene restando la lectura inicial (165) de todas las lecturas subsecuentes (columna 5). Entonces en el intervalo de 10:55 a 11:00 la utilización total es de 19 mm en el

matraz de reacción se debió en parte (1 mm) a los cambios térmicos del barómetro, entonces la utilización real fue $19-1 = 18$ mm (columna 6). Para calcular los μl de O_2 consumidos, este valor (columna 6) se multiplica por la constante del matraz para el O_2 (calculada para las condiciones empleadas en el experimento).

En el método del intervalo mostrado en las columnas 8 a la 12 de la tabla 2.5; cada lectura se resta de la siguiente (por ejemplo 146 de 127; 127 de 94, etc.) dando el cambio (columna 8) por encima del intervalo.

Un cálculo similar se hace para el termobarómetro (columna 9) y su cambio real (columna 10). Estos intervalos de valores se multiplican por la constante del matraz (columna 11) para dar la utilización de O_2 (columna 12).

La absorción de oxígeno por las células bacterianas que respiran tiene lugar casi totalmente del O_2 en solución. Esta es la razón por la cual se agitan los fluidos en el respirómetro, para obtener una fase fluida saturada con la fase gaseosa; teniendo cuidado de que la velocidad de utilización por las células no sea más grande que la de difusión del O_2 de la atmósfera al fluido.

La velocidad a la cual el gas difunde hacia el líquido depende de la capa superficial del líquido. En 1941 Roughton describió métodos para corregir los errores de difusión. Agitando los matraces continuamente se expone a una nueva superficie del gas por virtud de la turbulencia del fluido en el matraz. Por lo tanto la velocidad de agitación más grande, la velocidad de difusión del gas, más grande hacia el líquido y la velocidad de respiración más grande se pueden medir sin errores de difusión.

Mediante este método es posible medir la utilización de oxígeno de 300 μl /h con una agitación de 100 oscilaciones por minuto.

En el método directo de Warburg (utilizado en este experimento) la utilización de oxígeno se mide absorbiendo el CO_2 desprendido, en álcali. Si el álcali empleado falla en la absorción completa del CO_2 , la P^{CO_2} en la fase gaseosa no será cero, y las lecturas sobre el manómetro no representarán la utilización real de O_2 . Para evitar estos problemas se utilizaron 0.2 ml de una solución de KOH al 20% y se colocó papel filtro de 2cm^2 enrollado sobre el álcali para atrapar el CO_2 generado en el proceso.

En este método se deben de emplear cantidades de células que utilicen menos de 300 μl /h de O_2 y que den menos de 500 μl /h de CO_2 .

2.2.6 Procedimiento empleado.

- ❖ En los matraces Warburg limpios y secos agregar los materiales (excepto las células) a los compartimentos.
- ❖ Agregar el inóculo al 10% en el brazo lateral.
- ❖ Agregar 0.2 ml de KOH al 20% al centro previamente engrasado.
- ❖ Engrasar los accesorios esmerilados.
- ❖ Agregar las tiras de papel filtro al centro del matraz donde está el álcali.
- ❖ Ensamblar el matraz al manómetro.
- ❖ Colocar el sistema en el baño de agua a Temperatura constante.
- ❖ Ajustar y cerrar el matraz, agitar 10-15 minutos.
- ❖ Invertir el matraz permitiendo que se mezclen el inóculo con el medio de cultivo.

- ❖ Ajustar el fluido del manómetro (líquido de Brodie) a un punto de referencia (150) sobre el brazo cerrado del manómetro con la llave tres caminos abierta.
- ❖ Cerrar la llave tres caminos.
- ❖ Empezar las lecturas.

2.2.7 Limitaciones del método.

- Los gases intercambiados deben ser solo O_2 y CO_2 .
- La atmósfera en el matraz debe estar libre de CO_2 .
- La velocidad de utilización de O_2 y la velocidad de liberación de CO_2 y su absorción estén dentro del rango establecido por el método (que el fluido siempre esté saturado de O_2 y que la P^{CO_2} en la fase gaseosa sea cero.

A pesar de las limitaciones del Método Directo de Warburg; las condiciones requeridas para su buen funcionamiento se reunieron fácilmente en esta investigación. (7).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.3 Preparación de soluciones y medios de cultivo.

La preparación del líquido de Brodie (el líquido que lleva el manómetro), se llevó a cabo de la siguiente manera:

En balanza analítica se pesaron 2.5 g de colato de sodio, 11.5 g de NaCl

250 mg de fucsina básica y se aforó a 250 ml con agua desionizada bidestilada.

Se determinó la densidad del líquido de Brodie utilizando un picnómetro, y ésta

fue de 1.033 g/ml.

Se preparó una solución stock de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 500mM de la siguiente manera: se pesaron 12.075g de la sal, se disolvió en agua desionizada bidestilada y se aforó a 100 ml se determinó la concentración por absorción atómica. A partir de esta solución se prepararon 2 soluciones más:

- 1) Se tomaron 10 ml de la solución stock y se aforó a 100 ml para obtener una solución 50 mM en iones Cu (II) y
- 2) Se tomó 1 ml de la solución stock y se aforó a 100 ml para obtener una solución 5mM en iones Cu(II).

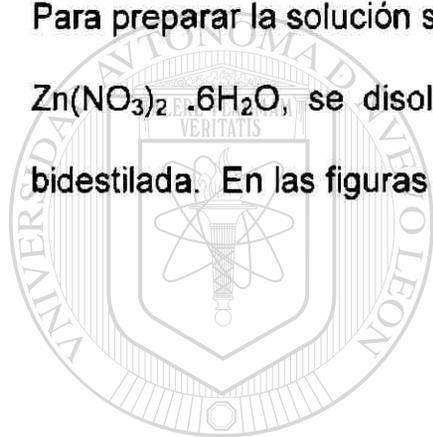
El medio de cultivo se preparó disolviendo 52.2 g del caldo MRS de la marca MERCK en 1 l de agua desionizada y bidestilada, se esterilizó a 118 °C en autoclave.

Las soluciones de cobre se esterilizaron por filtración, con filtros micropore, en condiciones asépticas se mezclaron con los caldos e inmediatamente se utilizaron en la respirometría correspondiente. De tal manera que para preparar medio de cultivo con iones Cu(II) 50 μM se tomó 1 ml de la solución de Cu(II) 5 mM y se aforó a 100 ml con caldo MRS de esta forma la concentración de iones Cu (II) en el medio fue 50 μM . Así mismo para preparar medio de cultivo con iones Cu(II) 500 μM se tomaron 5 ml de la solución de Cu (II) 5 mM y se aforó a 50mL con caldo MRS de esta forma la concentración de iones Cu (II) en el medio fue 500 μM . El medio de cultivo con iones Cu(II) 5000 μM se preparó diluyendo 5 ml de la solución de Cu(II) 50 mM a 50 ml con caldo MRS en

matraz de aforación. Todas las mezclas se hicieron en condiciones asépticas, ya que las mezclas de los medios de cultivo con las soluciones no se deben esterilizar en autoclave, para evitar modificaciones o alteraciones químicas por acción del calor de las especies iónicas de interés.

Para las soluciones de Zn (II) se utilizó el mismo procedimiento; en este caso se pesaron 0.7438 g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, se disolvieron y aforaron a 500 ml con agua desionizada bidestilada así la concentración de esta solución stock fue 5mM.

Para preparar la solución stock 50 mM se pesaron 7.435 g de la sal $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se disolvieron y aforaron a 500 ml con agua desionizada bidestilada. En las figuras 2.2 y 2.3 se muestran los diagramas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

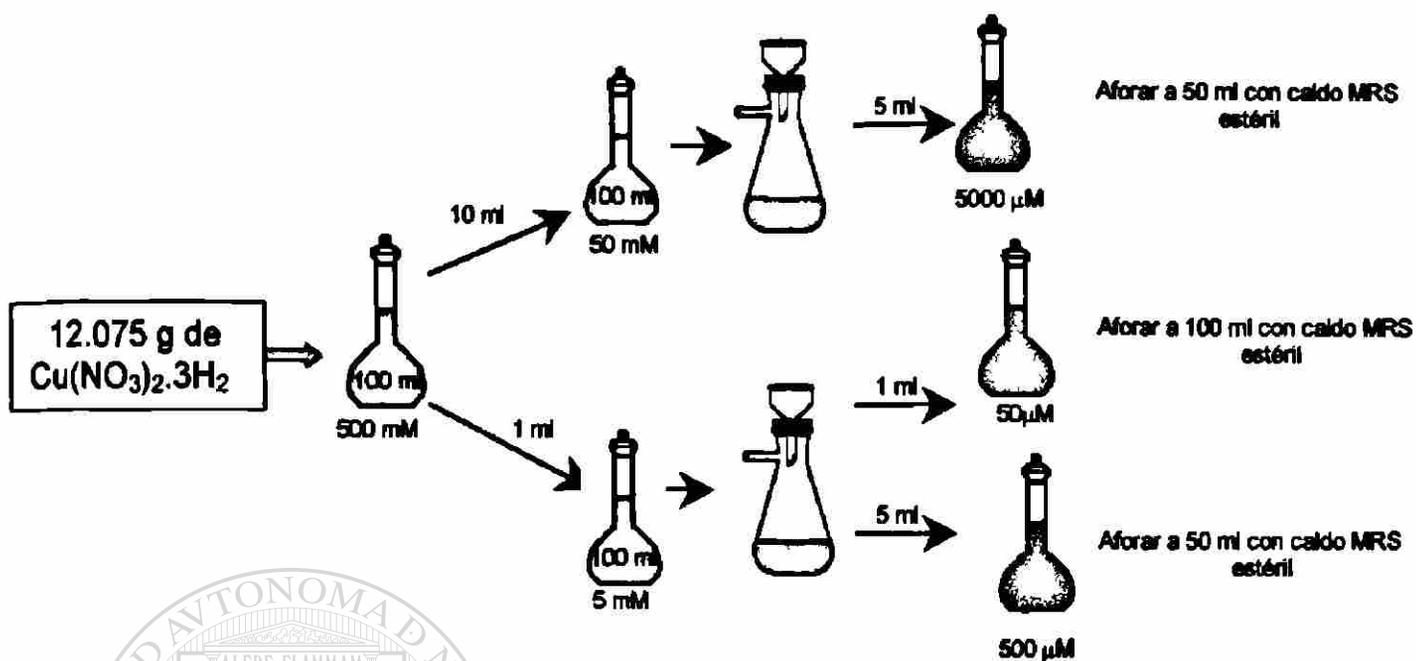


Figura. 2.2 Diagrama de la preparación de soluciones de Cu(II) .

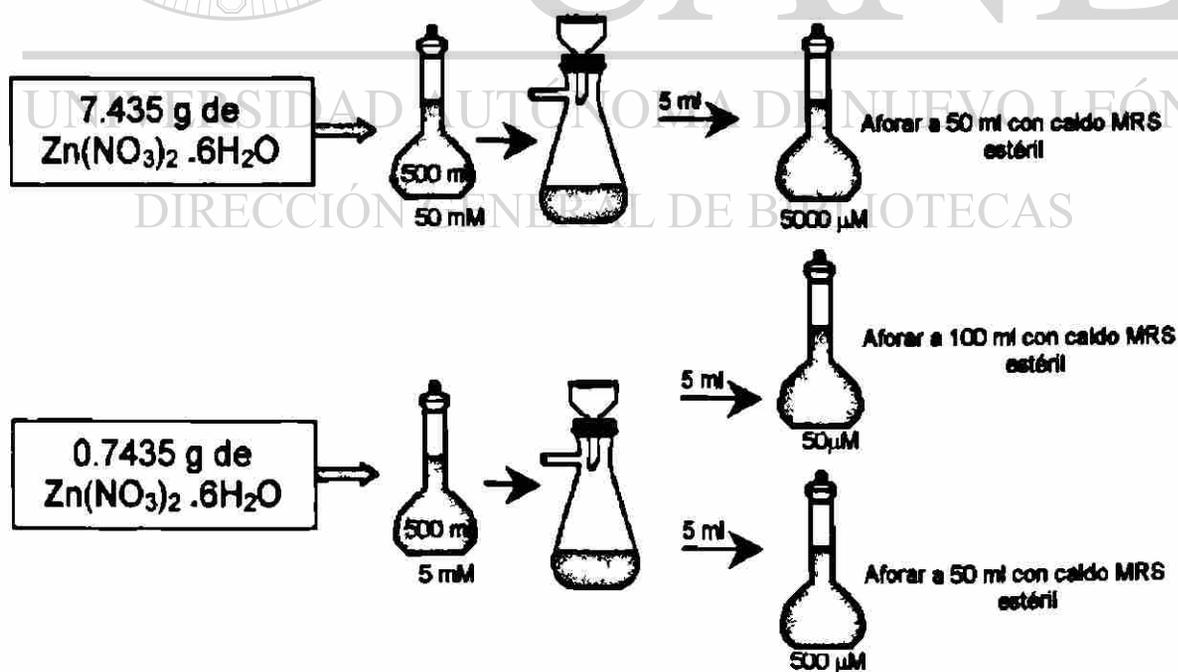


Figura. 2.3 Diagrama de la preparación de soluciones de Zn(II) .

2.4 Composición del medio de cultivo empleado.

En la tabla 2.6 se describen los constituyentes del caldo MRS utilizado como medio de cultivo óptimo para el crecimiento del microorganismo (19,20,21,30,31,32).

Tabla 2.6 Composición del caldo MRS.

Constituyentes	Peso (g/l)
Peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
D-Glucosa	20
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
Citrato ácido de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05

El pH del medio es de 5.7 ± 0.2 .

2.5 Preparación del Inóculo

Para preparar el inóculo se tomó una pequeña muestra con asa estéril de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 393 del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y se inoculó en un tubo de ensaye con 5 mls de caldo MRS estéril, se incubó por 48 horas a temperatura del laboratorio aproximadamente 25 °C, de ahí se hizo una resiembra transfiriendo los 5 mls de cultivo a un matraz E.M. con 50 mls de caldo MRS, y así sucesivamente. Para mantener el cultivo activo se hicieron resiembras cada 48 horas, de tal manera que en todos los experimentos la edad del inóculo fuera la misma. Esporádicamente se realizaron resiembras en placas con agar MRS y frotis al Gram para checar la pureza del cultivo. Posteriormente para preparar el inóculo

para cada respirometría, se fijó como parámetro que siempre tuviera un 50% de transmitancia; haciéndose la dilución correspondiente del microorganismo con medio de cultivo hasta ajustar a la transmitancia antes mencionada. Una vez establecida la dilución se procedió a hacerla de la misma forma pero con solución salina en lugar de caldo MRS, éste fue el inóculo utilizado en cada respirometría.

2.6 Curva de crecimiento.

El crecimiento microbiano implica el incremento en el número de células más que en el tamaño de células individuales, de tal manera que si se requiere observar detalladamente el proceso de crecimiento es necesario inocular el microorganismo de interés en un medio de cultivo líquido que reúna los nutrientes necesarios para su crecimiento y seguir el curso de ese desarrollo mediante una técnica que permita su cuantificación ya sea por recuento celular directo, turbidez, o determinación de peso seco, de tal manera que se observen las diferentes fases de la curva de crecimiento: de latencia, exponencial, y estacionaria.

En este trabajo se efectuó la curva de crecimiento utilizando el método turbidimétrico. En este método se mide la turbidez generada en el medio de cultivo a consecuencia del crecimiento del microorganismo. Es un método sencillo y rápido; con errores ya que la forma y el tamaño de la célula no es uniforme y además se miden tanto células muertas como vivas. La turbidez causada por el crecimiento de microorganismo se midió como % de

transmitancia en un espectrofotómetro UV/Vis Coleman Junior II modelo 6/20 a una $\lambda = 600$ nm calibrando a 0 y 100 %T con un blanco consistente en medio de cultivo caldo MRS estéril.

La realización de la curva de crecimiento se llevó a cabo para comprobar que el microorganismo crece adecuadamente en ese medio de cultivo.

2.7 Metodología del análisis de resultados.

Los resultados obtenidos serán analizados tanto estadísticamente como cinéticamente para investigar el efecto de las diferentes concentraciones de los iones Cu(II) y Zn (II) establecidas.

2.7.1 Tratamiento estadístico.

Con los datos obtenidos se construirá una gráfica de distribución de frecuencias relativas, para investigar si existe un comportamiento similar a las distribuciones

de frecuencias típicas y en base a esto hacer un análisis comparativo entre las variancias y las medias obtenidas con respecto a la variancia y la media del experimento realizado en condiciones normales, que sirve como marco de referencia.

Para hacer una inferencia estadística sobre el efecto de algún factor sobre el comportamiento de un sistema particular, es necesario hacer una prueba de significancia con la cual se pueda averiguar si existe un efecto significativo tanto en medias como en variancias entre dos tratamientos hechos a un determinado sistema (17,18).

2.7.2 Estudio cinético.

Suponiendo que la producción de CO₂ durante la etapa de crecimiento exponencial estudiada está directamente asociada al crecimiento de biomasa. Su producción a través del tiempo fue descrita mediante un modelo exponencial cuyos parámetros fueron evaluados por regresión no lineal. Para relacionar el valor de los parámetros estadísticos a variables características del proceso fermentativo y evaluar en ellos los efectos de los iones Cu(II) y Zn(II) en sus diferentes concentraciones estudiadas, se hizo el siguiente desarrollo:

El crecimiento de biomasa está representado por la ecuación (2.15)

$$R_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.15)$$

Donde R_x es la velocidad de crecimiento de biomasa (g/l.h),

x , es la concentración de biomasa (g/l),

t , es el tiempo de fermentación, (h),

μ , es la tasa específica de crecimiento de biomasa.

En la fase de crecimiento exponencial la tasa específica de crecimiento es constante y es igual a la tasa específica de crecimiento máximo, conocida como

$\mu_{\text{máx}}$.

Considerando que la fase exponencial inicia al tiempo $t_{\text{exp}} (=12)$ y que la concentración de biomasa es X_{exp} se consideró la siguiente condición inicial

$$X = X_{\text{exp}} \quad \text{cuando } t = t_{\text{exp}} \quad (2.16)$$

La integración de la ecuación 2.15 considerando la condición inicial 2.16 da:

$$X = X_{\text{exp}} e^{\mu_{\text{max}} (t - t_{\text{exp}})} \quad (2.17)$$

Para un metabolito que está directamente asociado al crecimiento de biomasa como es caso del CO₂ en esta fermentación. La velocidad de producción de CO₂ está representada por la ecuación 2.18 (8,15).

$$R_{\text{CO}_2} = Y_{\text{CO}_2/X} R_X \quad (2.18)$$

entonces

$$R_{\text{CO}_2} = Y_{\text{CO}_2/X} \mu_{\text{max}} X \quad (2.19)$$

Sustituyendo la ecuación (2.17) en la (2.19) se representa R_{CO_2} como:

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}} \mu_{\text{max}} e^{\mu_{\text{max}} (t - t_{\text{exp}})} \quad (2.20)$$

En el tiempo donde inicia la fase exponencial se hizo la siguiente consideración:

$$\text{CO}_2 = \text{CO}_{2\text{exp}} \quad \text{para } t = t_{\text{exp}} \quad (2.21)$$

Integrando la ecuación 2.20, considerando la condición 2.21 se obtiene:

$$\text{CO}_2 = \text{CO}_{2\text{exp}} - Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}} + Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}} e^{\mu_{\text{max}} (t - t_{\text{exp}})} \quad (2.22)$$

De acuerdo a la ecuación (2.22) las concentraciones de CO₂ que se obtendrán experimentalmente, con respecto al tiempo se correlacionarán a la siguiente expresión:

$$y = y_{\text{exp}} - a + ae^{b(t - t_{\text{exp}})} \quad (2.23)$$

Haciendo una analogía entre la ecuación (2.22) y la ecuación (2.23); y_{exp} corresponde a la cantidad de CO₂ al inicio de la etapa de crecimiento

exponencial, el parámetro α nos dará información sobre el producto del coeficiente metabólico de conversión, que relaciona la velocidad de producción de CO_2 respecto a la velocidad de producción de biomasa y la cantidad de biomasa al inicio de la etapa de crecimiento exponencial. El exponente b representará un estimado de la tasa específica de crecimiento máximo, la cual da información sobre el crecimiento de la biomasa. De esta manera una cinética representada por este modelo, con un valor alto de α y un valor bajo de b representará una alta conversión de CO_2 /biomasa, con un bajo crecimiento de biomasa.

Los parámetros de este modelo se estimaron con un programa de cómputo cuyo diagrama de flujo se presenta en la figura 2.4 y su codificación en el lenguaje Fortran se encuentra en el apéndice A. Este programa hace la estimación de parámetros por regresión no lineal utilizando la subrutina GREG¹.

Se hará una comparación de los valores obtenidos de estos parámetros en los experimentos en condiciones normales contra los obtenidos en presencia de los iones Cu(II) y Zn(II) en sus diferentes concentraciones, y así establecer el efecto de estos iones sobre la producción de CO_2 y su interacción con el crecimiento de biomasa.

¹ ©Warren E. Stewart, Mike Caracotsios y Jan P. Sørensen Universidad de Wisconsin-Madison 1991.

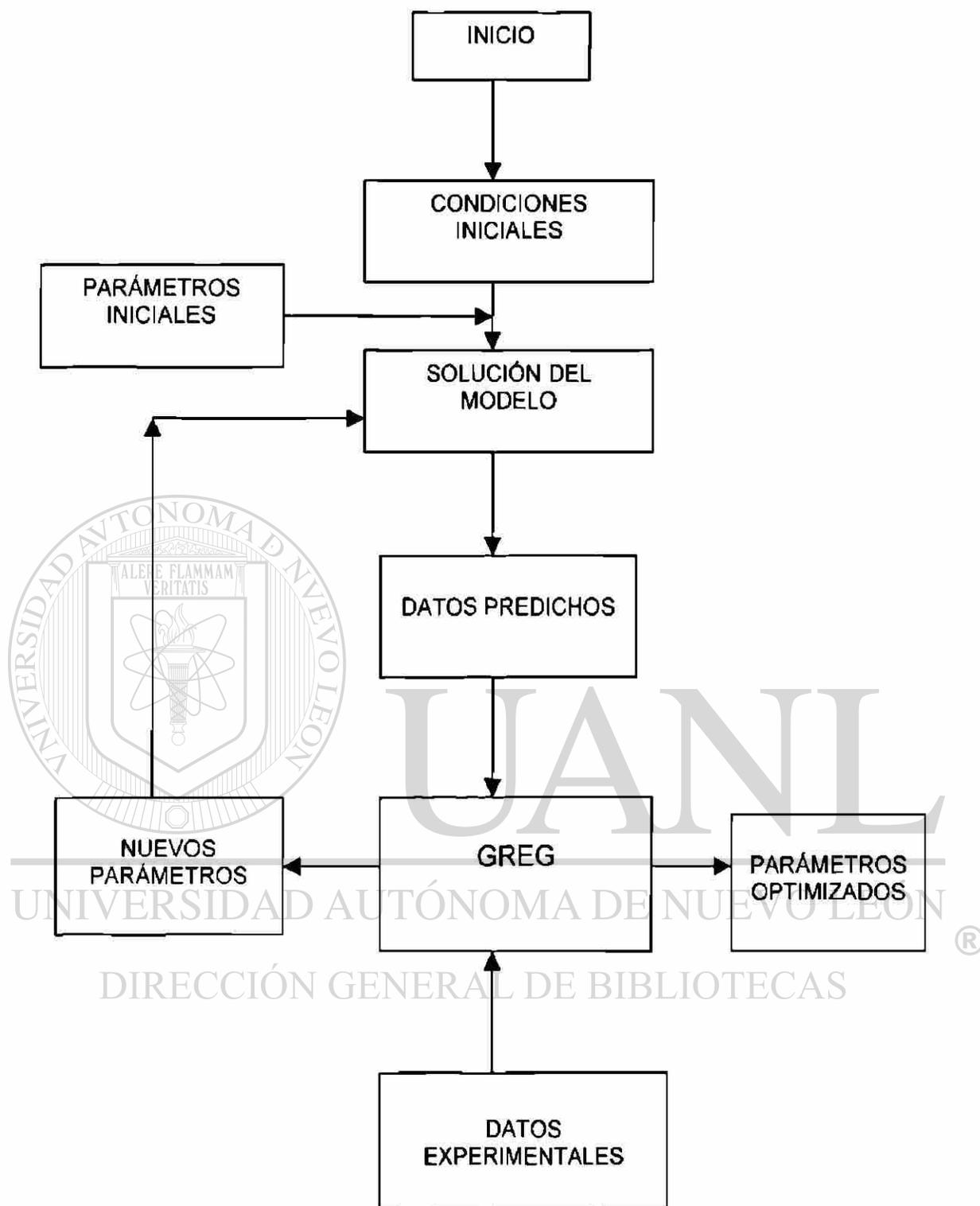


Figura 2.4 Algoritmo del programa CO2expo.for para la optimización de los parámetros del modelo de la cinética de producción de CO₂.

CAPÍTULO 3

DISCUSIÓN Y RESULTADOS.

3.1 Respirometría en condiciones normales.

En la fig. 3.1 se muestra la curva de la respirometría en condiciones normales que se realizó para *Lactobacillus casei* ATCC 393, en la cual se observa que la etapa de mayor producción de CO₂ ocurre en la parte exponencial de la curva, dentro de las horas 12-23.

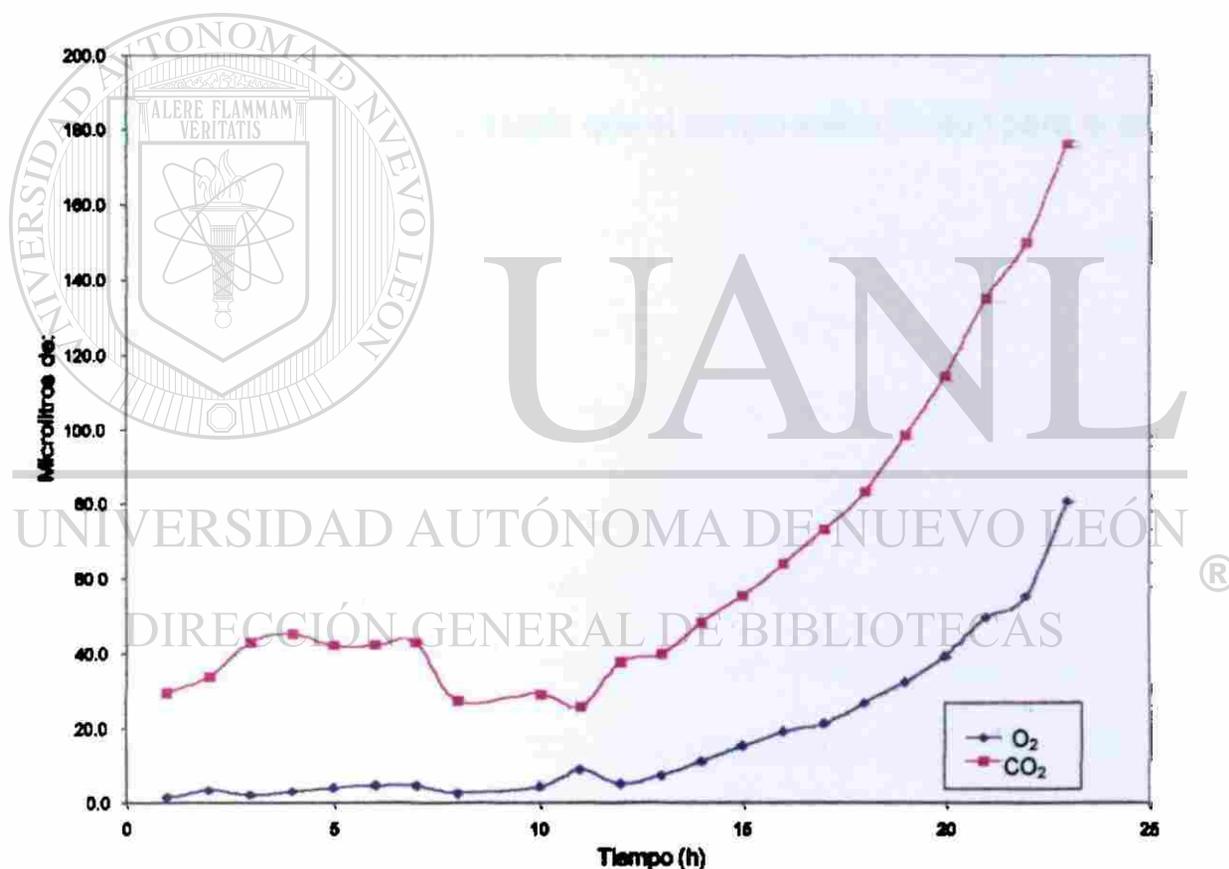
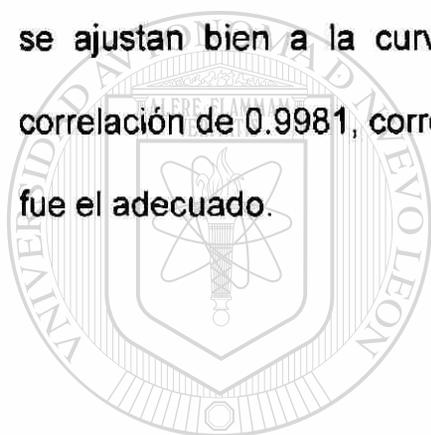


Figura. 3.1. Producción de CO₂ y consumo de O₂ por *Lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones normales de cultivo en caldo MRS a 25°C, llevada a cabo en un Respirómetro Warburg Scientific. Esta curva es el promedio de 8 réplicas con una D.E. ≤ 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta curva se estableció, que el tiempo de estudio para las respirometrías en presencia de los iones Cu (II) y Zn (II); sería de la hora 12 a la 22.

De las respirometrías realizadas en condiciones normales en la Fig. 3.2 se observan solo los datos de producción de CO₂ y consumo de O₂ por *Lactobacillus casei* ATCC 393 en el período de 12 a 22 horas. Como se aprecia los datos experimentales tanto de producción de CO₂ como de consumo de O₂ se ajustan bien a la curva del modelo exponencial, con un coeficiente de correlación de 0.9981, corroborando que el tiempo seleccionado para el estudio, fue el adecuado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

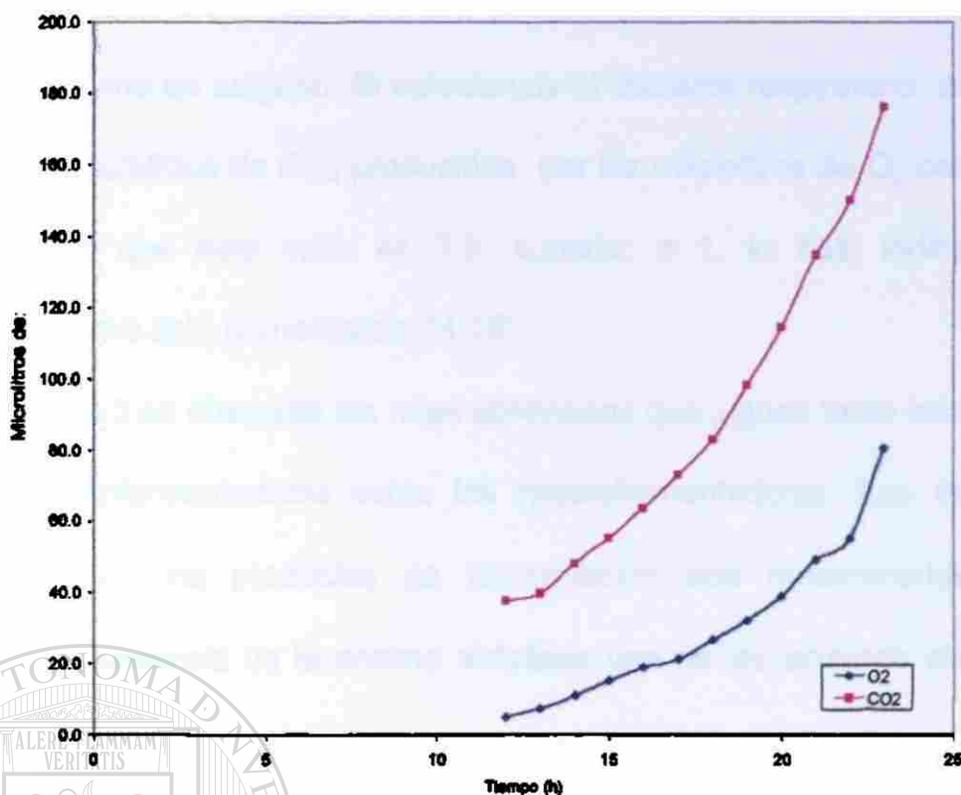


Figura. 3.2. Curva de producción de CO₂ y consumo de O₂ por *Lactobacillus casei* ATCC 393 llevada a cabo en condiciones normales de cultivo en caldo MRS a 25°C. En un respirómetro Warburg Scientific. Esta gráfica es el promedio de 8 réplicas con una D.E. ≤ 1.

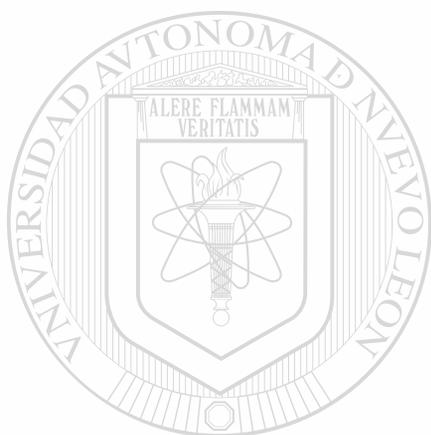
De acuerdo al comportamiento de las bacterias lácticas, de ser anaerobios aerotolerantes se observó un consumo bajo de O₂, en condiciones normales; mientras que en presencia de los iones Cu(II) y Zn(II) 50, 500 y 5000 μM no hubo consumo de O₂ (curvas no mostradas); por algún mecanismo desconocido el microorganismo no consume O₂ bajo la presencia de los iones Cu (II) y Zn(II) .

Como se observó en la Figura 3.2 la producción de CO_2 es alta comparada con el bajo consumo de oxígeno. Si calculamos el cociente respiratorio, es decir al dividir los microlitros de CO_2 producidos por los microlitros de O_2 consumidos encontramos que este valor es 3.5, superior a 1, lo cual indica que el microorganismo está fermentando(14,16).

En la figura 3.3 se observan las rutas abreviadas que siguen tanto las bacterias lácticas homofermentadoras como las heterofermentadoras. Las diferencias observadas en los productos de fermentación son determinadas por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa una de las enzimas clave en la glucólisis.

Las heterofermentadoras carecen de aldolasa y no pueden descomponer el difosfato de hexosa a fosfato triosa. En lugar de ello, oxidan glucosa 6- fosfato a 6- fosfogluconato descarboxilándolo a pentosa fosfato, que se transforma en triosa fosfato y acetilfosfato por medio de la enzima **fosfocetolasa**. La triosa fosfato se convierte por último en ácido láctico con la producción de 1 mol de ATP, mientras que el acetilfosfato acepta electrones a partir del NADH generado durante la producción de pentosa fosfato, así se convierte en etanol sin producción de ATP. Debido a esto los heterofermentadores producen 1 solo mol de ATP a partir de 1 mol de glucosa, en lugar de 2 moles como lo hacen los homofermentadores. Esta diferencia en la producción de ATP a partir de glucosa refleja el hecho de que los homofermentadores producen el doble de masa celular que los heterofermentadores, a partir de la misma cantidad de glucosa. Dado que los heterofermentadores descarboxilan 6- fosfogluconato,

producen CO_2 como producto de fermentación, mientras que los homofermentadores producen poco o nada de CO_2 . Entonces una forma simple de detectar un heterofermentador es observar la producción de CO_2 en cultivos de laboratorio (5).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

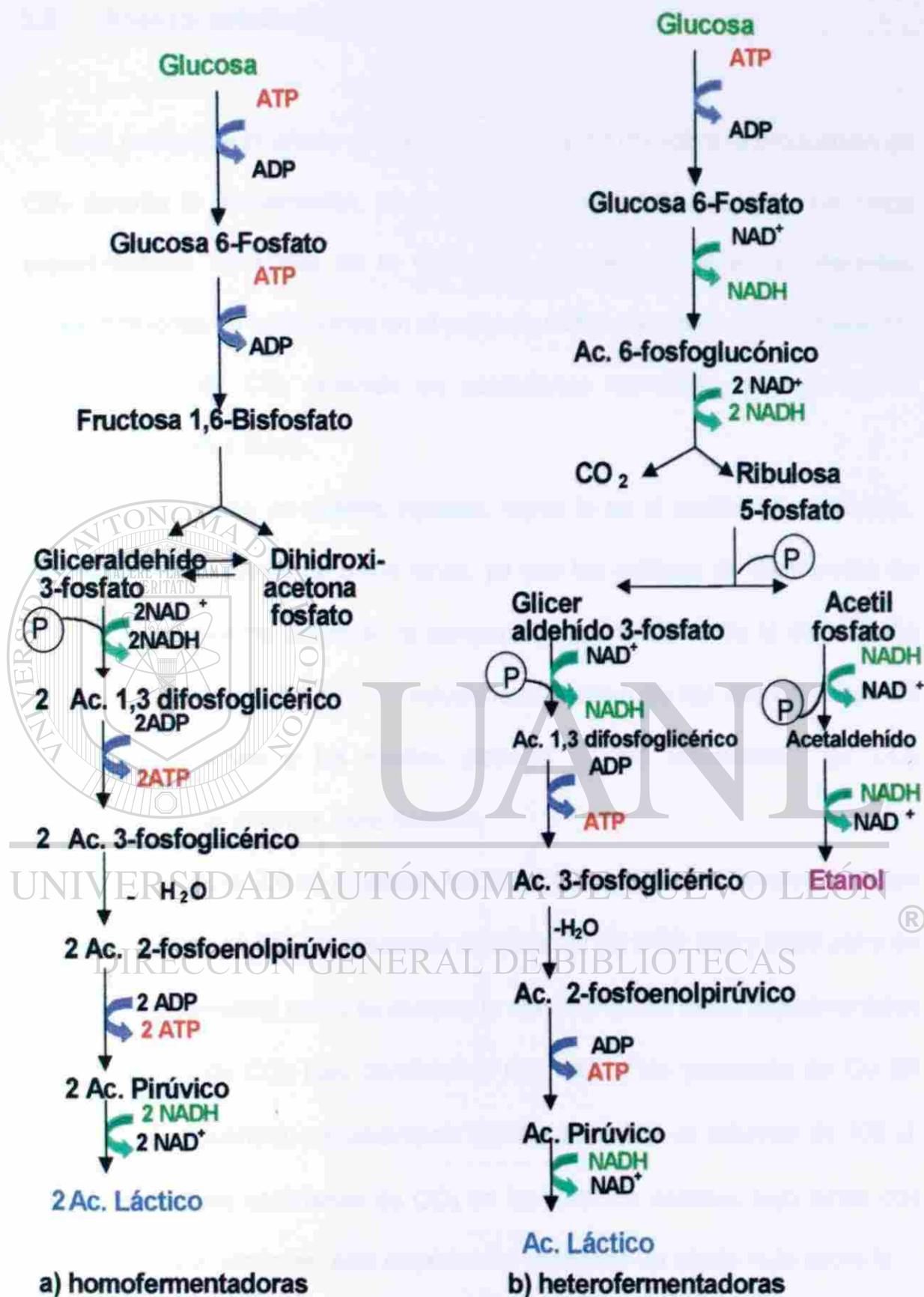


Figura 3.3 Rutas metabólicas abreviadas de las bacterias lácticas.

3.2 Análisis estadístico.

Para evidenciar el efecto de los iones Cu (II) y Zn (II) sobre la producción de CO₂ durante la fermentación; se realizó un análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos en las diferentes corridas realizadas a diferentes concentraciones de estos iones en el caldo de cultivo, teniendo como referencia la producción de CO₂ obtenida en condiciones normales; es decir sin la presencia de estos iones.

No se realizó un análisis riguroso, como lo es el análisis de variancia, para observar el efecto de estos iones, ya que las gráficas de distribución de frecuencia relativa no muestran la campana gaussiana típica de la distribución normal. Sin embargo se hizo un estudio comparativo de las distribuciones de frecuencias relativas y las medias globales de los volúmenes de CO₂ producidos en los distintos experimentos.

En la Figura 3.4 se muestran las distribuciones de frecuencias relativas de la producción de CO₂ en presencia de iones Cu (II) a 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales; como se observa la mayoría de los datos experimentales de producción de CO₂ bajo condiciones normales y en presencia de Cu (II) 5000 μM se encuentran principalmente distribuidos hasta un volumen de 100 μl, indicando que las cantidades de CO₂ en las distintas corridas bajo estas dos condiciones son similares, esta observación implicaría un efecto nulo sobre la producción; sin embargo como se verá en la sección del análisis cinético su efecto en realidad es significativo.

Un porcentaje importante de los datos experimentales del CO₂ producido a concentraciones de 50 y 500 μM de Cu (II), se encuentran dispersas hacia volúmenes superiores a 100 μl , desfasándose de los obtenidos en condiciones normales y los obtenidos a 5000 μM de Cu (II), indicando que la producción de CO₂ se favorece, en los experimentos realizados en presencia de Cu (II) 50 y 500 μM .

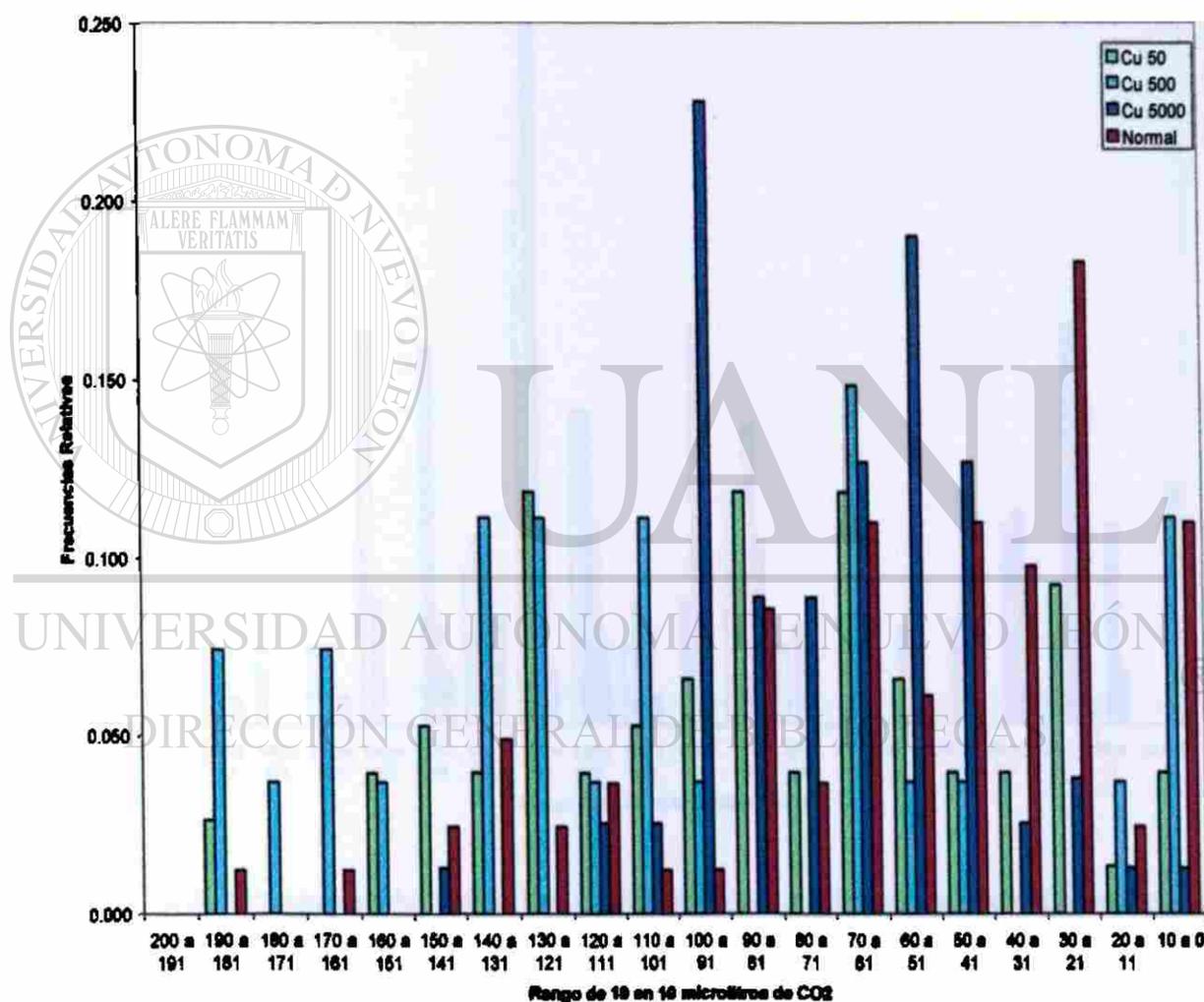


Figura.3.4. Comparación entre las distribuciones de frecuencias relativas de la producción de CO₂ por *L. casei* ATCC 393 en presencia de iones Cu(II) 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales.

En la Figura 3.5 se muestran las distribuciones de frecuencias relativas para la producción de CO₂ en presencia de iones Zn (II) a 50, 500 y 5000 μ M y en condiciones normales.

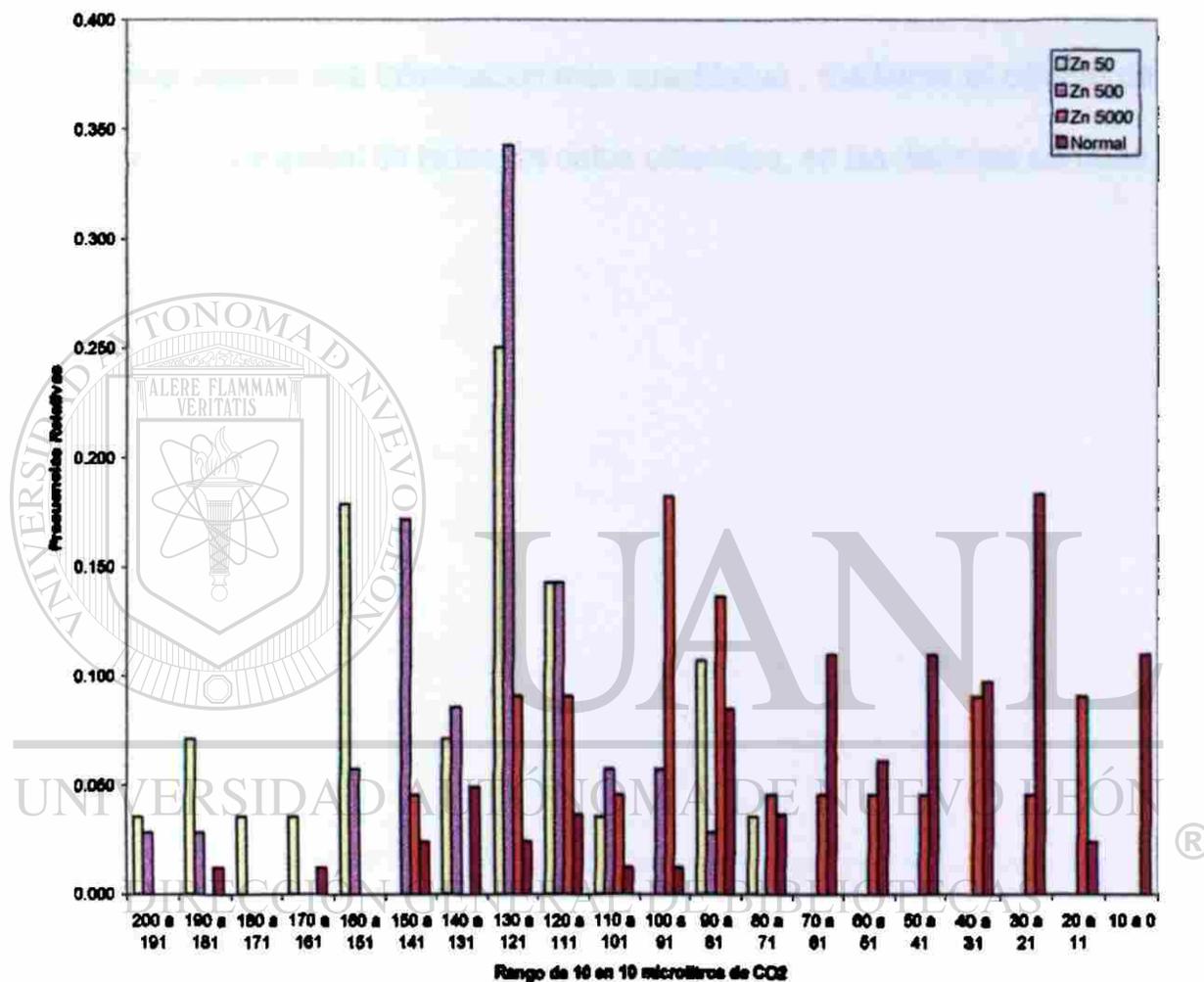
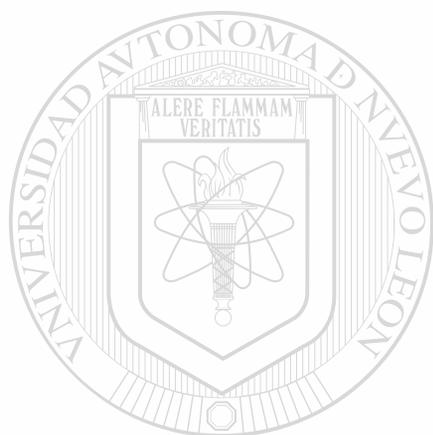


Figura 3.5. Comparación entre las distribuciones de frecuencias relativas de la producción de CO₂ por *L. casei* ATCC 393 en presencia de iones Zn (II) 50, 500 y 5000 μ M y en condiciones normales.

En esta gráfica se observa que un porcentaje importante de los datos de CO₂ producidos en los experimentos con Zn (II) 5000 μ M se encuentran distribuidos

a volúmenes superiores a 100 μ l, mientras que casi la totalidad de los datos a 50 y 500 μ M de Zn son superiores a los observados en condiciones normales, esto muestra que la presencia del Zn favorece más la producción de CO₂, que en presencia de cualquiera de las concentraciones de Cu (II) utilizadas y bajo condiciones normales.

Es posible obtener una información más cuantitativa, mediante el cálculo de la media aritmética global de todos los datos obtenidos, en las distintas corridas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

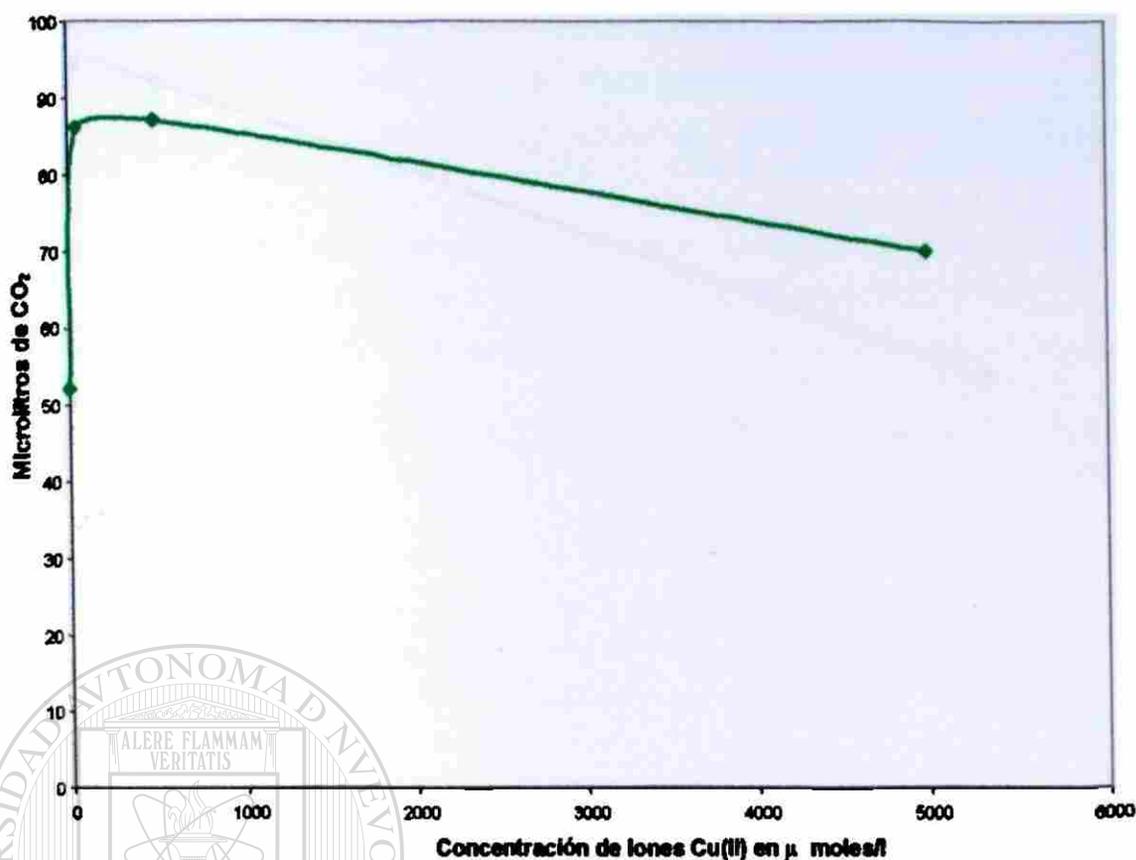


Figura 3.6. Comparación entre las medias globales de producción de CO_2 por *L. casei* ATCC 393 en presencia de iones Cu(II) 50, 500 y 5000 μ M y en condiciones normales (es decir $[\text{Cu}] = 0$)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la Figura 3.6 aparece una comparación entre las medias globales de producción de CO_2 en presencia de iones Cu(II) 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales ($[\text{Cu}] = 0$). Aquí se observa que todas las medias de producción de CO_2 en presencia de iones Cu(II) son superiores a la obtenida en condiciones normales y de acuerdo a la línea de tendencia, se observa que la producción de CO_2 es prácticamente igual a concentraciones de 50 y 500 μM y disminuye al aumentar la concentración de iones Cu(II) a 5000 μM .

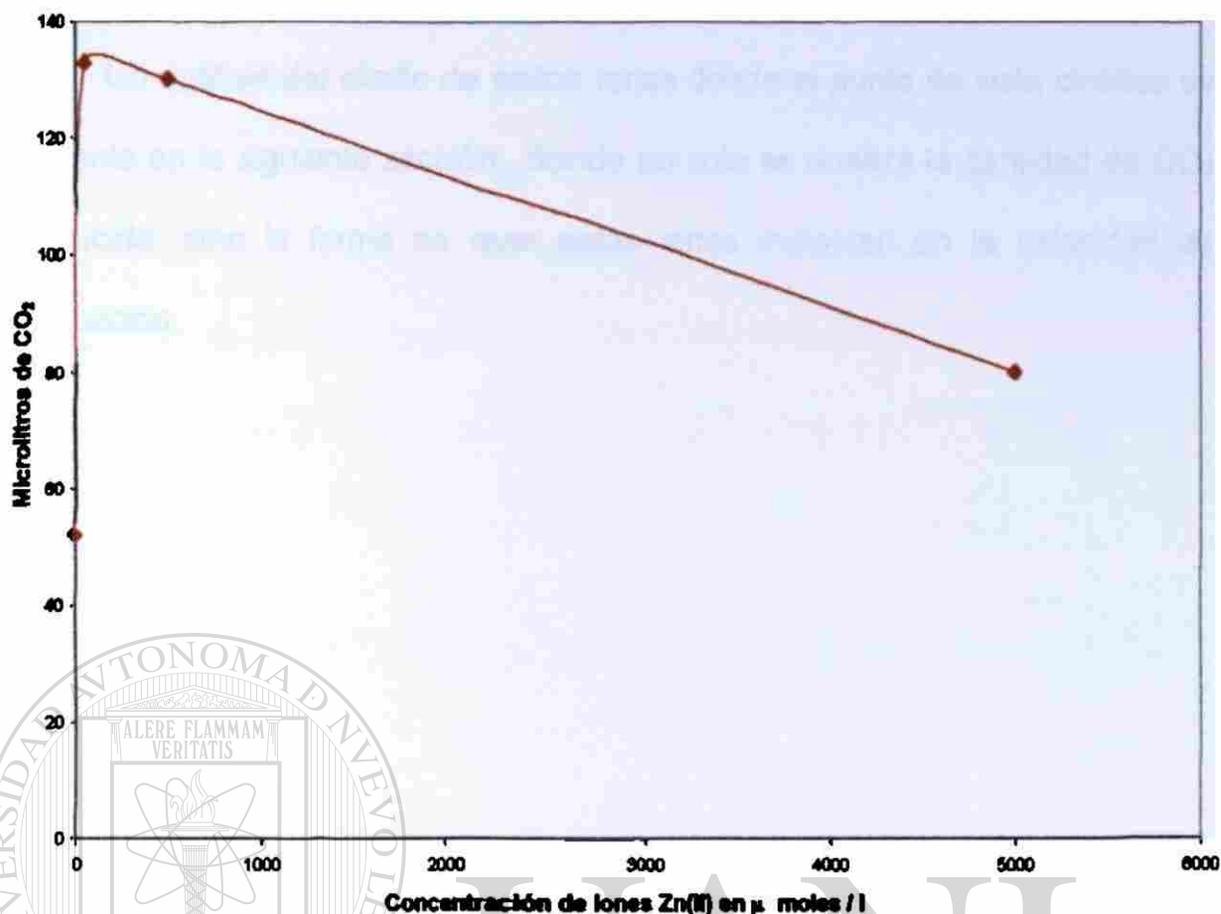
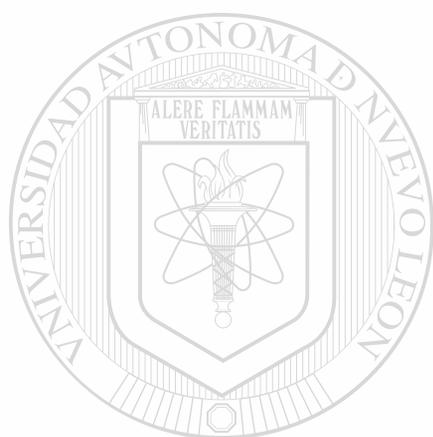


Figura 3.7. Comparación entre las medias globales de producción de CO₂ por *L. casei* ATCC 393 en presencia de iones Zn (II) 50, 500 y 5000 μ M y en condiciones normales (es decir [Zn] es = 0).

En la Figura 3.7 se muestran las medias globales de producción de CO₂ en presencia de las distintas concentraciones de iones Zn (II) estudiadas; y las medias de los datos de producción en condiciones normales. Se observa que las medias de producción de CO₂ son superiores a las mostradas por el ion Cu (II); sin embargo la tendencia es similar, es decir, se presenta una disminución en la producción de CO₂ al incrementarse la concentración de los iones Zn (II) en el medio de cultivo.

Un análisis del efecto de estos iones desde el punto de vista cinético se presenta en la siguiente sección, donde no solo se analiza la cantidad de CO₂ producida, sino la forma en que estos iones impactan en la velocidad de producción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3 Estudio cinético.

3.3.1 Efecto del ion $Zn(II)$ en las velocidades de producción de CO_2 .

En la Figura 3.8 se muestran los microlitros de CO_2 promedio, producidos a través del tiempo de fermentación; bajo condiciones normales y en presencia de iones $Zn(II)$ 50, 500 y 5000 μM .

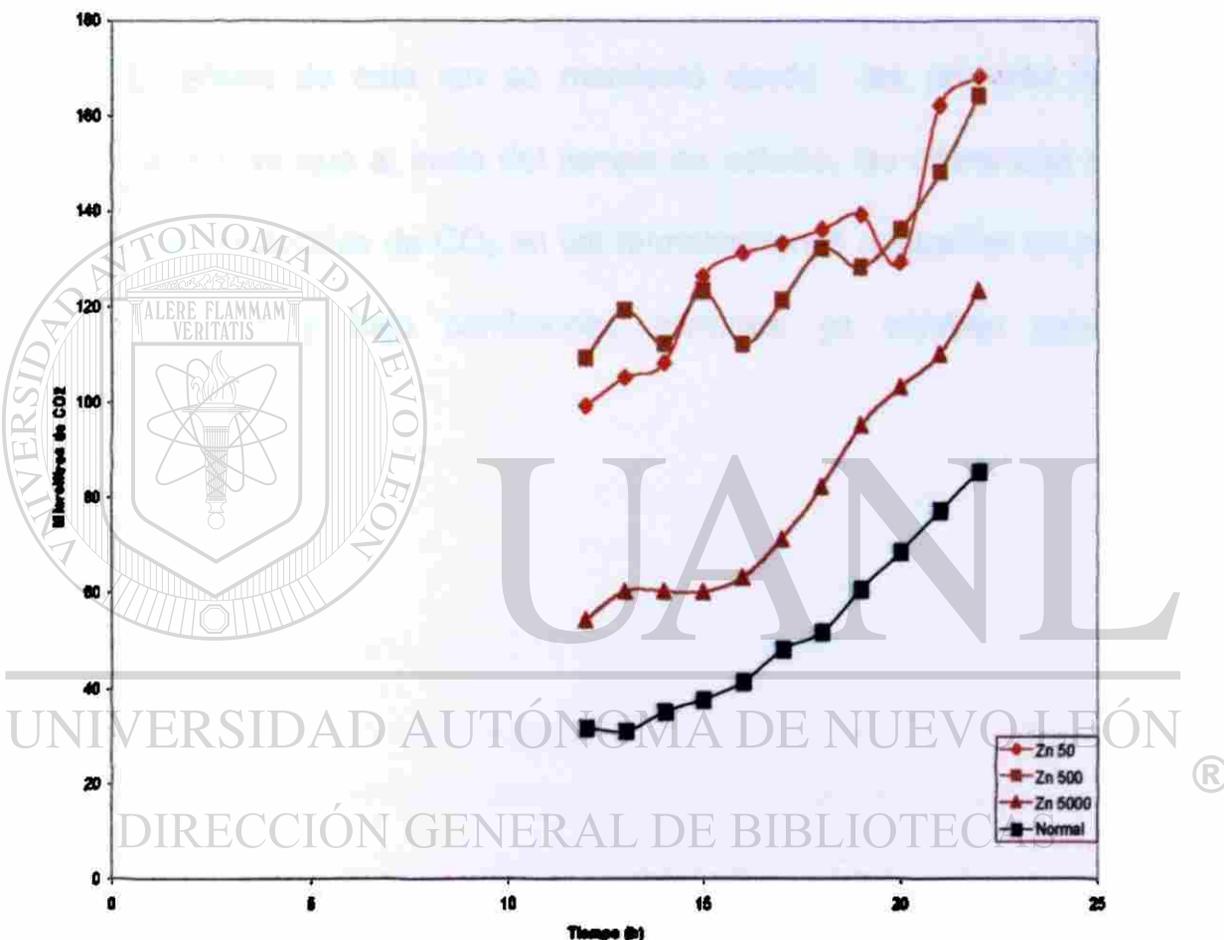
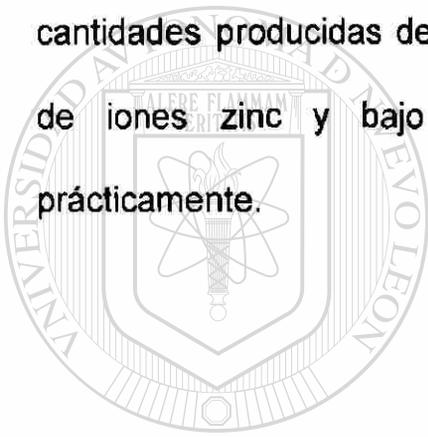


Figura 3.8. Comparación de la Producción de CO_2 por *L. casei* ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones $Zn(II)$ 50, 500, y 5000 μM .

Como se observa existe un marcado efecto de la presencia del ion Zn en el caldo de cultivo, sobre la producción de CO_2 , pues todos los datos

experimentales obtenidos en presencia de este ion están por encima de los obtenidos en condiciones normales. Indicando que la producción de CO₂ se incrementa substancialmente a concentraciones de 50 y 500 μM, disminuyendo a la concentración de 5000 μM, no obstante, sigue siendo superior al obtenido bajo condiciones normales.

El efecto de este ion se manifestó desde las primeras horas de fermentación, ya que al inicio del tiempo de estudio, las diferencias entre las cantidades producidas de CO₂ en las fermentaciones realizadas en presencia de iones zinc y bajo condiciones normales ya estaban establecidas prácticamente.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

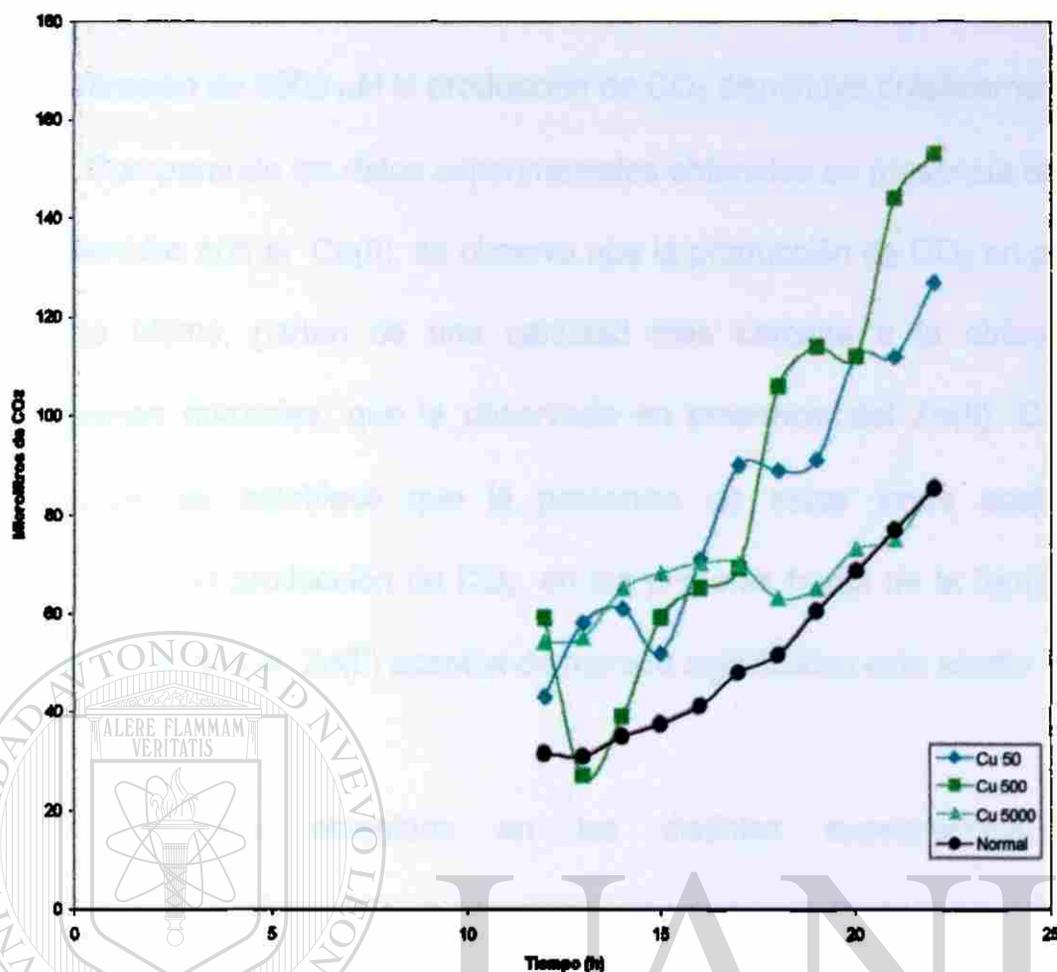


Figura 3.9. Comparación de la Producción de CO₂ por *L. casei* ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu(II) 50, 500, y 5000 μM.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la Figura 3.9 se muestran las cantidades de CO₂ producidos a través del tiempo de fermentación, en presencia de iones Cu (II) a concentraciones de 50, 500 y 5000 μM en el medio de cultivo y en condiciones normales.

De manera similar al efecto del ion Zn(II), el ion Cu(II) también incrementa la producción de CO₂ aunque en forma moderada. De acuerdo a esta gráfica la producción de CO₂ alcanza un máximo cuando la concentración

de Cu(II) es de 500 μM ; disminuyendo ligeramente a 50 μM , mientras que a la concentración de 5000 μM la producción de CO_2 disminuye drásticamente.

Comparando los datos experimentales obtenidos en presencia de Zn(II) y los obtenidos con el Cu(II); se observa que la producción de CO_2 en presencia de este último, parten de una cantidad más cercana a la obtenida bajo condiciones normales, que la observada en presencia del Zn(II). Con estos resultados, se establece que la presencia de estos iones aceleran las velocidades de producción de CO_2 , en las primeras horas de la fermentación; mostrándose que el Zn(II) acentúa de manera significativa este efecto.

Los datos obtenidos en los distintos experimentos; fueron correlacionados al modelo exponencial propuesto en la ecuación 2.23. Los parámetros obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.1. Comportamiento de los parámetros *a* y *b*.

Comportamiento de los parámetros <i>a</i> y <i>b</i>						
	Cu	Zn	Cu	Zn	Normal	
[concentración, μM]	$b \approx \mu_{\text{max}}$	$b \approx \mu_{\text{max}}$	$a \approx Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}}$	$a \approx Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}}$	$b \approx \mu_{\text{max}}$	$a \approx Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}}$
50	0.0379	0.0182	179.23	311.24	0.1912	9.6542
500	0.2696	0.2403	7.4049	5.2222	0.1912	9.6542
5000	0.0104	0.1833	234.30	13.544	0.1912	9.6542

Utilizando este modelo con sus diferentes parámetros se obtuvieron las velocidades de producción de CO_2 con respecto al tiempo, mediante la ecuación (2.20), donde μ_{max} está representada por el parámetro *b* y el producto

$Y_{\text{CO}_2/X} X_{\text{exp}}$ por el parámetro *a* tomados de la tabla 3.1.

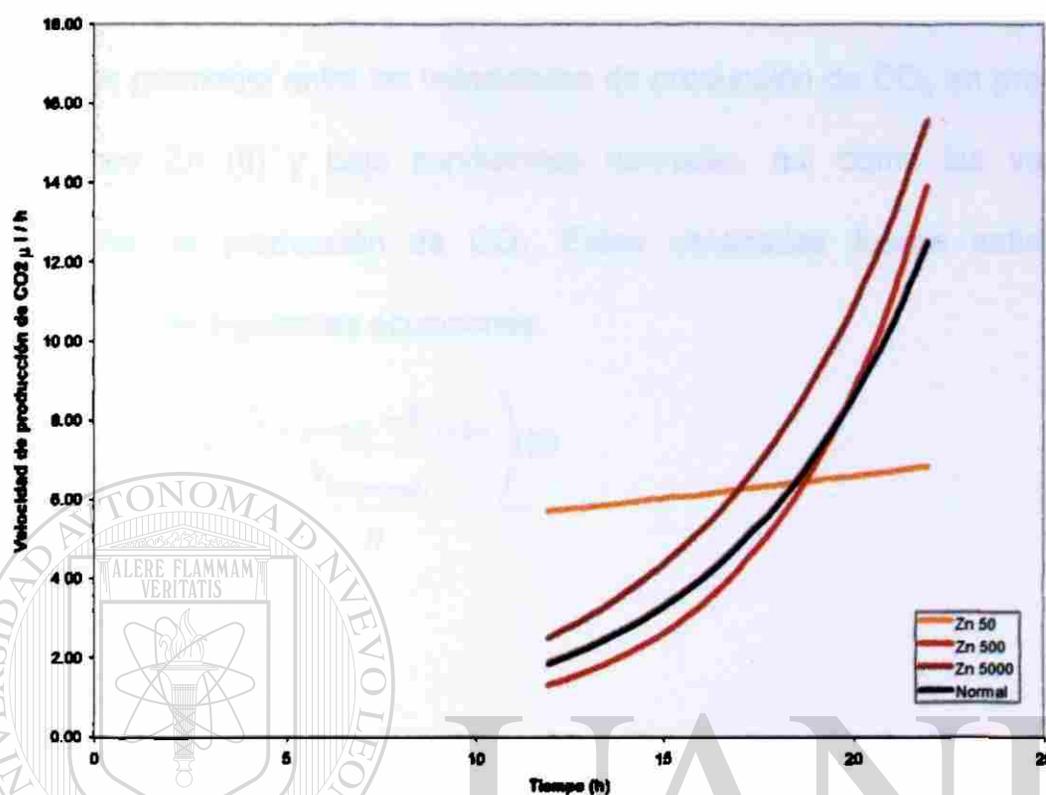


Figura 3.10. Comparación de la velocidad de producción de CO_2 por *L.*

casei ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones $\text{Zn}(\text{II})$ 50, 500, y 5000 μM .

Tabla 3.2 Velocidades de producción de CO_2 en presencia de

iones $\text{Zn}(\text{II})$.

Concentración de iones $\text{Zn}(\text{II})$ ($\mu\text{moles/l}$)	Porcentajes relativos de velocidad	Velocidades de Producción promedio ($\mu\text{l/h}$)
50	-49.4	6.21
500	12.05	5.48
5000	-29.33	7.3
Normal		5.73

En la Figura 3.10 se presentan las velocidades de producción de CO₂ estimadas, en presencia de Zn(II) 50, 500 y 5000 μM y en condiciones normales, a partir de la hora doce. En la tabla 3.2 se presentan los porcentajes relativos promedio entre las velocidades de producción de CO₂ en presencia de los iones Zn (II) y bajo condiciones normales, así como las velocidades promedio de producción de CO₂. Estas cantidades fueron estimadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Relativo} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{V_{CO_2,normal i} - V_{CO_2,Zn i}}{V_{CO_2,normal i}} \right)}{n} 100 \quad (3.1)$$

$$V_{promedio} = \frac{\sum_{i=1}^n V_{CO_2 i}}{n} \quad (3.2)$$

Donde n es el número de puntos experimentales, $V_{CO_2,normal i}$, $V_{CO_2,Zn i}$ y $V_{CO_2 i}$ son las velocidades de producción de CO₂ calculadas para condiciones normales, en presencia del ion Zn(II) y para cualesquiera de las dos condiciones respectivamente.

Como se observa en la figura 3.10 y en la tabla 3.2 las velocidades de producción de CO₂ en presencia de los iones Zn (II) difiere de las calculadas bajo condiciones normales. A la concentración de 50 μM se tienen velocidades de producción con un porcentaje de 49.4% por encima de la normal, sin embargo como se observa en la figura 3.10 las velocidades se incrementan a una tasa pequeña casi constante e incluso son inferiores a la normal a partir de la hora 19. Las curvas de velocidad para 500 y 5000 μM son similares a la

normal. La de 5000 μM es superior en un 29.33% a la normal, la de 500 μM es en general inferior a la normal en un 12.05%, sin embargo, presenta un periodo con velocidades superiores y otro pequeño donde son inferiores a las normales. Las curvas normal, a 500 y 5000 μM muestran un crecimiento exponencial, a diferencia de la de 50 μM que casi es lineal.

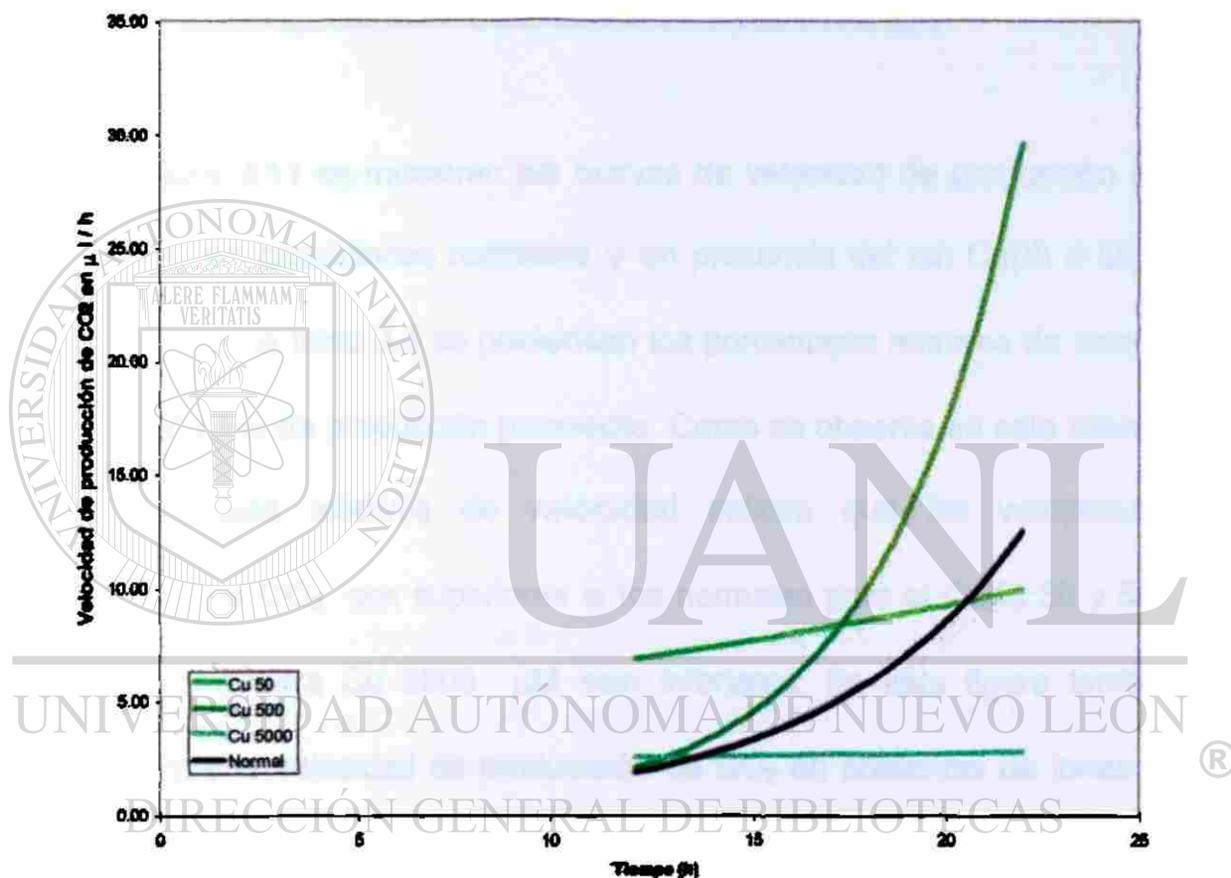


Figura 3.11. Comparación de la velocidad de producción de CO_2 por *L. casei* ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu (II) 50, 500, y 5000 μM .

Tabla 3.3 Velocidades de producción de CO₂ en presencia de iones Cu(II).

Concentración de iones Cu(II) (μmoles/l)	Porcentajes relativos de velocidad	Velocidades de Producción promedio (μl/h)
50	-91.8	8.27
500	-65.02	10.8
5000	37.37	2.57
Normal		5.73

En la Figura 3.11 se muestran las curvas de velocidad de producción de CO₂ calculadas en condiciones normales y en presencia del ion Cu(II) a 50, 500 y 5000 μM y en la tabla 3.3 se presentan los porcentajes relativos de velocidad y las velocidades de producción promedio. Como se observa en esta última tabla los porcentajes relativos de velocidad indican que las velocidades de producción de CO₂ son superiores a los normales para el Cu(II) 50 y 500 μM, mientras que para Cu 5000 μM son inferiores. En esta figura también se observa que la velocidad de producción de CO₂ en presencia de iones Cu (II) 50 μM es alta, sin embargo varía a una tasa constante pequeña, por esto su curva se observa como una línea recta con pendiente baja. Las velocidades de producción en presencia de iones Cu(II) 500 μM son siempre superiores a las normales y su curva muestra que varía en forma exponencial. En el caso de Cu (II) 5000 μM la producción de CO₂ se da con una velocidad constante y muy baja.

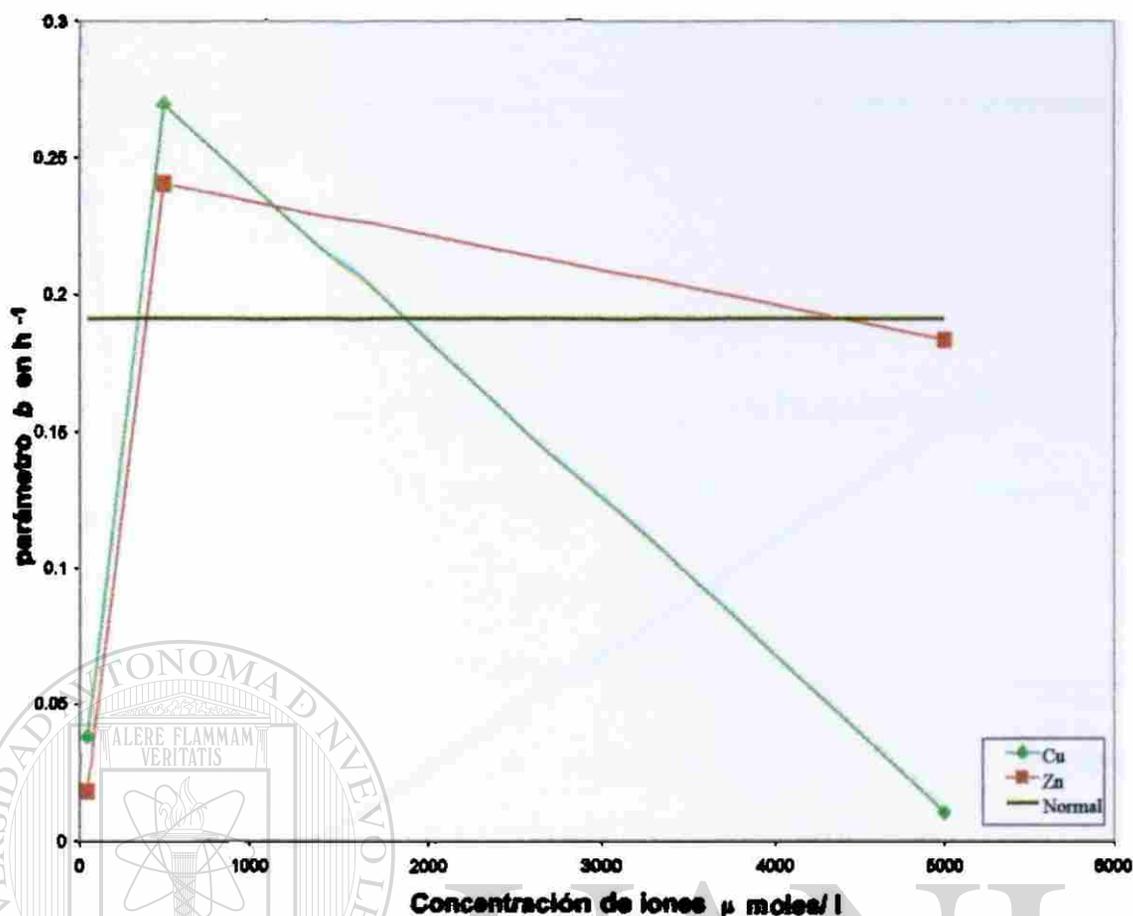


Figura 3.12. Valores del parámetro *b* para *L. casei* ATCC 393 en condiciones normales, en presencia de iones Cu (II) 50, 500, y 5000 μ M y de iones Zn (II) 50, 500, y 5000 μ M.

En la Figura 3.12 se graficaron los valores del parámetro *b* mostrados en la Tabla 3.1. De acuerdo al modelo propuesto en el cual se supone una asociación directa de la velocidad de producción de CO₂ con la velocidad de crecimiento de biomasa, el parámetro *b* indica el valor de la tasa específica de crecimiento máxima.

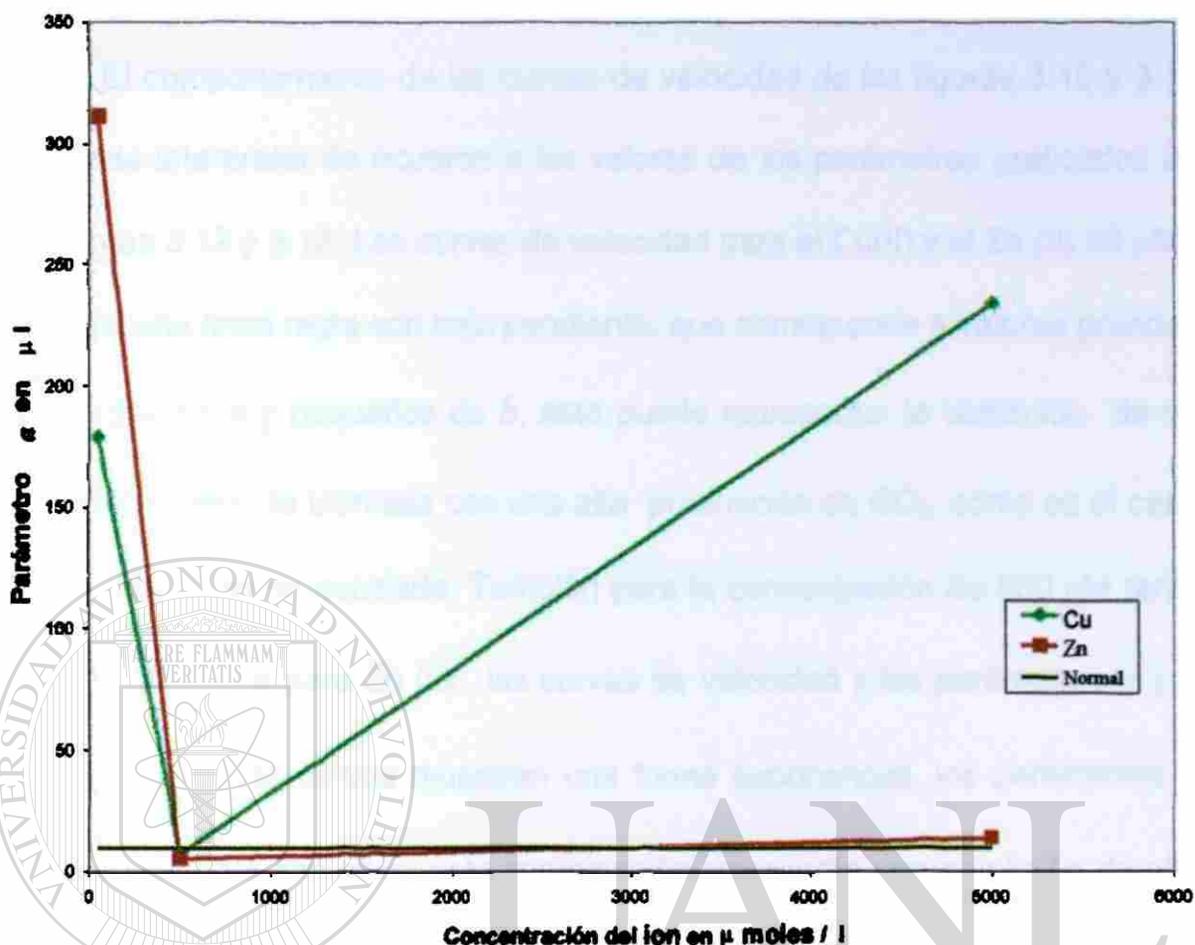


Figura 3.13. Valores del parámetro α para *L. casei* ATCC 393 en condiciones normales, en presencia de iones Cu (II) 50, 500, y 5000 μ M y de iones Zn (II) 50, 500, y 5000 μ M.

En la Figura 3.13 se muestra la variación del parámetro α para las distintas corridas realizadas. Como se estudió anteriormente es un indicador del producto del coeficiente metabólico que relaciona la velocidad de producción

de CO₂ a la velocidad de crecimiento de biomasa y la cantidad de biomasa al inicio del período de crecimiento exponencial.

El comportamiento de las curvas de velocidad de las figuras 3.10 y 3.11 se puede interpretar de acuerdo a los valores de los parámetros graficados en las figuras 3.12 y 3.13. Las curvas de velocidad para el Cu(II) y el Zn (II) 50 μM , son casi una línea recta con baja pendiente, que corresponde a valores grandes del parámetro a y pequeños de b , esto puede representar la condición de un bajo crecimiento de biomasa con una alta producción de CO₂, como es el caso de la producción no asociada. También para la concentración de 500 μM tanto para Cu (II) como para Zn (II), las curvas de velocidad y los parámetros a y b son similares. Las curvas muestran una forma exponencial, los parámetros a son bajos y los b son altos; esta combinación representa una condición de alto crecimiento y una baja conversión a CO₂. Los parámetros y las curvas para la concentración de 5000 μM de Zn (II) y Cu (II) son muy diferentes, para el Zn (II) se observa un comportamiento similar al de la concentración de 500 μM , mientras que para el caso del Cu (II) los parámetros a y b son bajos, lo que denota una desfavorable producción de CO₂. También se observó que las condiciones más cercanas a la normal ocurrieron cuando la concentración de ambos iones era 500 μM .

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Se establecieron como condiciones normales de cultivo para el microorganismo, el caldo MRS y una temperatura de crecimiento de 25°C.

Al estudiar la actividad respiratoria de *Lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones normales y en presencia de iones Cu (II) y Zn (II) se observó lo siguiente:

- La presencia de iones Cu (II) en concentraciones de 50, 500, y 5000 μM en el medio de cultivo, incrementaron la producción de CO_2 en 65.4, 67.3 y 34.6 % de la obtenida en condiciones normales.
- Las velocidades de producción de CO_2 durante el período de estudio muestran una alta dependencia de la concentración de los iones Cu(II). A concentraciones de 50 y 500 μM las velocidades de producción de CO_2 son superiores en 91.8 y 65.02% respectivamente a la observada en condiciones normales, mientras que a la concentración de 5000 μM es menor en un 37.37 %.
- La presencia de iones Zn (II) en concentraciones de 50, 500, y 5000 μM en el medio de cultivo, incrementaron la producción de CO_2 en 155.7, 150 y 53.8 % de la obtenida en condiciones normales.
- Las velocidades de producción de CO_2 durante el período de estudio en presencia de iones Zn(II) a concentraciones de 50 y 5000 μM son superiores a la observada bajo condiciones normales en porcentajes de

49.4 y 29.33 % respectivamente, mientras que a la concentración de 500 μM es inferior en 12.05 %.

Recomendaciones:

Al inicio del período de estudio respirométrico del microorganismo en presencia de los iones metálicos; en la mayoría de los experimentos se encontró ya una elevada producción de CO_2 . Esto posiblemente implicaría que la presencia de los iones Cu (II) y Zn(II) causa un desfase en el tiempo en el que la producción de CO_2 se encuentra en la fase exponencial del observado en condiciones normales. Por tal razón se recomienda que el período de estudio inicie desde la hora 0.

Las mediciones del consumo de sustratos, la producción de metabolitos y el crecimiento de biomasa, conjuntamente con la producción de CO_2 , deben realizarse para establecer las relaciones cinéticas que caractericen completamente el proceso de fermentación.

Incrementar los rangos de concentración de los iones estudiados a fin de encontrar las concentraciones bajo las cuales se inhibe completamente la producción de CO_2 .

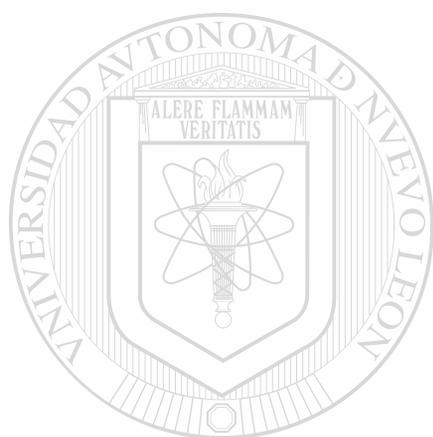
También es importante estudiar el efecto sinérgico de estos iones sobre la actividad respiratoria del microorganismo.

BIBLIOGRAFIA.

1. Saloff-Coste.Cathy J. *Kefir*. Danone World Newsletter.
<http://www.danonenewsletter.fr/nw11.html>
2. Saloff-Coste.Cathy J. *Lactobacillus casei* Danone World Newsletter.
<http://www.danonenewsletter.fr/nw7.html>
3. Saloff-Coste. Cathy J. *Health benefits of fermented milks and probiotics: An overview*. Danone World Newsletter.
<http://www.danonenewsletter.fr/nw15.html>
4. Neidhart Frederick C, Ingraham John L, Schalchter Moselio. *Physiology of the bacterial cell*. Sinauer Associates Inc.1990: pp 133-166.
5. Thomas D. Brock. *Microbiología*. Ed. Prentice-Hall. 1997: pp 109-176; 718-723.
6. Moat Albert G, Foster John W. *Microbial Physiology*. John Wiley & sons. 1988:pp 125-127; 177-180..
7. W.W. Umbreit, R.H. Burris, J.F. Stauffer. *Manometric and Biochemical Techniques*. Burgess Publishing Co. 1972: cap. 1-4.
8. Hughes, M.N., and R. K. Poole. 1991. *Metal speciation and Microbial growth-the hard (and soft) facts*. J. Gen. Microbiol. **137**: 725-734.
9. Crueger Wulf, Crueger Anneliese. *Biotechnology*. Sinauer Associates Inc. 1990: pp 64-74.
10. Saloff-Coste. Cathy J. *Health benefits of acid lactic bacteria*. Danone World Newsletter.
<http://www.danonenewsletter.fr/nw6.html>
11. Saloff-Coste.Cathy J. *Bifidobacteria*. Danone World Newsletter.
<http://www.danonenewsletter.fr/nw16.html>
12. J. C. Dunning, Y. Ma, and R. E. Marquis.1998. *Anaerobic killing of oral Streptococi by reduced transition metal cations*. Appl. Environ. Microbiol.**64**:27-33.

13. Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins (ed). Section 14. 1986: pp 1208-1234.
14. Strayer Lubert. *Bioquímica*. Ed. Reverté, S. A. 1995: pp 482-506.
15. Stanbury Peter F. And Allan Whitaker. *Principles of Fermentation Technology*. Ed. Pergamon Press. 1984: pp 11-24
16. Lehninger Albert L, Nelson David L, Cox Michael M. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. 1993: pp 400-445.
17. Marqués de Cantú Ma. José. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas*. Ed. Mc-Graw Hill. 1998: pp 174-218.
18. Zar Jerrold H. *Biostatistical Analysis*. Ed. Prentice-Hall 1996: pp 31-42 .
19. Mäyra-Mäkinen, A., and N. Bigret. *Industrial use and production of lactic acid bacteria*. In S. Salminen and A. von Wright (ed). *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker Inc., New. York. 1993: pp 65-95
20. Peebles, M.M., S.E. Gilliland and N.L. Speck. 1969. *Preparation of concentrated lactic streptococcus starters*. *Appl. Microbiol.* **17**: 805-810.
21. De Man. J.C. M, Rogosa, and M.E. Sharpe. 1960. *A medium for the cultivation of lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
22. Cervantes, C., and F. Gutiérrez-Corona. 1994. *Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 121-137.
23. Hazel, J.R., and E.E. Williams. 1990. *The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment*. *Prog. Lipid. Res.* **29**: 167-227.
24. Mehlhorn, R.J. 1986. *The interaction of inorganic species with biomembranes*, p. 85-97. In M. Bernhard, F.E. Brickman, and O.J. Sadler (ed), *The importance of chemical "speciation" in environmental processes*. Springer-Verlag, Berlín.
25. Silver, S., B.T. O. Lee, N.L. Brown, and D.A. Cookey. 1993. *Bacterial plasmid resistances to copper and zinc trials*. Royal Society of Chemistry London.
26. Stohs, S. J., and D. Bagchi. 1995. *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. *Free Rad. Biol. Med.* **18**: 321-336.

27. Ellis, T.G., D.S. Barbeau, B.F. Smets and C.P.L. Grady, Jr. 1996. *Respirometric technique for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation*. Water Environ. Res. **68**: 917-926.
28. Bird, N.P. Chambers, J. G., Leech. R.W. & Cummins. D.1985. *A note on the use of metal species in microbiological tests involving growth media*. Journal of Applied Bacteriology. **59**: 353-355.
29. Gadd, G.M. & Griffiths, A. J.1978. *Microorganisms and heavy metal toxicity*. Microbial Ecology. **4**: 303-307.
30. Sejong Oh, Sungsue Rheem, Jaehun Sim, Sangkyo Kim, and Youngjin Baek.1995. *Optimizing conditions for the growth of Lactobacillus casei YIT 9018 in tryptone-yeast extract glucose medium by using response surface methodology*. Appl. Environ. Microbiol.**61**:3809-3814.
31. T. Wijtzes, J.C de Wit, J.H.J Huis in't Veld, K. Van't Riet, and M.H. Zwietering.1995. *Modelling bacterial growth of Lactobacillus curvatus as a function of acidity and temperature*. Appl. Environ. Microbiol.**61**:2533-2539.
32. Edwin P. W. Kets, Pauline J. M. Teunissen, and Jan A.M. de Bont.1996. *Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying*. Appl. Environ. Microbiol.**62**:259-261.
33. *Lactobacillus casei* . ATCC 393.
<http://www.atcc.org/>
34. Stainer. *Microbiología*. Ed. Repla. S.A. 1986: pp 650-656.
35. Pelletier Christophe, Bouley Christine, Cayuela Chantal, Boutier Sylvie, Bourliox Pierre, Bellon-Fontaine Marie-Noële. 1997. *Cell surface characteristics of Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus paracasei subsp paracasei , and Lactobacillus rhamnosus strains*. Applied and Environ. Microbiol.**63**: pp 1725-1731.
36. Fernández S.S, González M.G, and Sierra A. 1993. *Evaluation of the effect of acid washing on the fermentative and respiratory behavior of yeasts by the acidification power test*. MBAA Technical Quarterly. **30**: pp 1-8.



APÉNDICES

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE A

```

$debug

```

```

C

```

```

C   PROGRAMA DE OPTIMIZACION DE PARAMETROS
C   MODELO CINETICO DE PRODUCCION DE ANHIDRIDO CARBONICO
C

```

```

      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      EXTERNAL MODEL

```

```

C

```

```

C   DIMENSIONAMIENTO DE ARREGLOS DE TRABAJO
C

```

```

      DIMENSION OBS(11), PAR(2), BNDLW(2), BNDUP(2), CHMAX(2)
      DIMENSION DSC(65), ISC(12), DEL(2)

```

```

C

```

```

C   DIMENSIONAMIENTO DE ARREGLOS PARA LA SUBROUTINA DE
C   OPTIMIZACION.
C

```

```

      MDSC=65
      MISC=12
      NOB=11
      NPAR=2

```

```

C

```

```

C   ENTRADA DE DATOS EXPERIMENTALES A CORRELACIONAR
C

```

```

      DATA OBS/99,105,108,126,131,133,136,139,129,162,168/

```

```

C

```

```

C   ENTRADA DE VALORES INICIALES DE LOS PARAMETROS
C

```

```

      PAR(1)=168
      PAR(2)=0.031

```

```

C

```

```

C   INICIALIZACION DEL ARREGLO ISC
C

```

```

      ISC(1)=1
      ISC(2)=10
      ISC(3)=0

```

```

C

```

```

C   LLAMADANDO AL PAQUETE DE REGRESION
C

```

```

      CALL GREG(NOB, OBS, NPAR, PAR, BNDLW, BNDUP, CHMAX, DEL, MDSC, DSC,
      *          MISC, ISC, IOBS, IDET, EMOD, VPIV, APIV, RPTOL, RSTOL, MODEL)

```

```

C

```

```

C   FIN DEL PROGRAMA PRINCIPAL
C

```

```

      STOP
      END

```

```

C

```

```

C   ENTRADA DEL MODELO
C

```

```

      MODELO DE PRODUCCION ASOCIADA AL CRECIMIENTO

```

```

C

```

```

      SUBROUTINE MODEL(PAR, F, NOB, NPAR, IDER, DERIV, MINFO)
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)

```

```

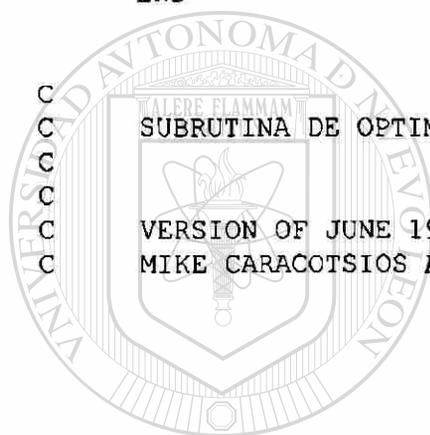
C
C DIMENSIONAMIENTO DE ARREGLOS DE TRABAJO
C
C DIMENSION PAR(2),F(11),T(11)
C
C ENTRADA DE PUNTOS DE MUESTREO
C
C DATA T/12.0,13.0,14.0,15.0,16.0,17.0,18.0,
*          19.0,20.0,21.0,22.0/
C
C TEXP=12
C CEXP=99
C
C RESOLUCION DEL MODELO Y LLENADO DE ARREGLO CON
C DATOS CALCULADOS.
C
C DO 10 I=1,11
C F(I)=CEXP-PAR(1)+PAR(1)*DEXP(PAR(2)*(T(I)-TEXP))
10 CONTINUE
C RETURN
C END

```

```

C
C SUBROUTINA DE OPTIMIZACION GREG.
C
C VERSION OF JUNE 1990. COPYRIGHT 1990 BY WARREN E. STEWART,
C MIKE CARACOTSIOS AND JAN P. SORENSEN.

```



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ma. Elena Rodríguez Cantú.

Candidato al Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología Industrial

Tesis: ESTUDIO RESPIROMÉTRICO DE *Lactobacillus casei* ATCC 393 EN PRESENCIA DE IONES Cu (II) y Zn(II).

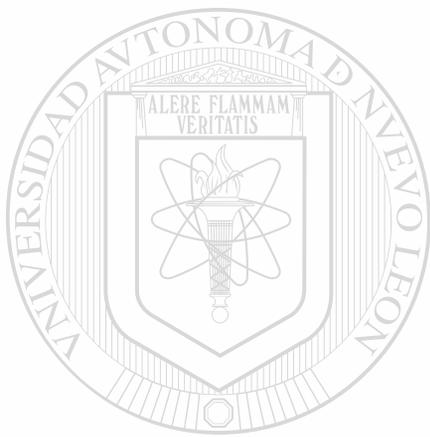
Campo de Estudio: Fisiología Bacteriana.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Los Ramones, Nuevo León el 1 de Enero De 1958, hija de Emilio Rodríguez Rodríguez y Mirthala Cantú Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado Obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 1978 con mención Honorífica.

Experiencia Profesional: Responsable de los Laboratorios de Análisis Clínicos "Santa Mónica, S. A." de 1978-1984, Maestro de la Esc. Ind y Preparatoria Técnica "Pablo Livas" de la U.A.N.L. de 1985 a 1997. Maestro de Tiempo Completo en la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. desde 1991.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



