

Estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura por fluoruro de sodio

José Pedro López Pérez¹, Raquel Boronat Gil²

¹I.E.S. La Basílica. 30157 Algezares. Murcia. España; Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales. Facultad de Educación. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia. España. josepedro.lopez@murciaeduca.es

²I.E.S. Antonio Menárguez Costa. 30710. Los Alcázares. Murcia. raquel.boronat@murciaeduca.es

[Recibido en junio de 2012, aceptado en octubre de 2012]

En esta comunicación se presentan las directrices necesarias para observar, en el laboratorio de Educación Secundaria, la inhibición del metabolismo de los azúcares en células de levadura por fluoruro de sodio y su inclusión en la materia de Biología en segundo curso de Bachillerato.

Palabras clave: Levadura; Fermentación; Inhibición; Fluoruro de sodio; Educación Secundaria.

Study of the inhibition of respiration/fermentation in yeast cells by sodium fluoride

This paper presents the necessary guidelines to achieve the observation of the inhibition of sugar metabolism in yeast cells by means of the compound sodium fluoride. This activity is appropriate for the subject of Biology in Secondary Education as well as High School.

Keywords: Yeast; Fermentation; Inhibition; Sodium Fluoride; Secondary Education.

Introducción y justificación del trabajo

Las levaduras se definen como microorganismos unicelulares integrantes en el reino de los hongos. Sus células son eucariotas, ya que disponen de una membrana que rodea al material genético, el ADN. Desde tiempos inmemorables han sido empleadas en la producción de vino, cerveza y pan. Hoy día, también se utilizan en la fabricación de vitaminas, enzimas y factores de crecimiento. Asimismo, representan una herramienta valiosísima en los estudios de biotecnología, por la similitud con células animales (Madigan *et al.* 2003).

Se define el metabolismo como el conjunto de procesos bioquímicos que tienen lugar en el interior de la célula, con el objetivo de obtener energía o formar materia propia para la constitución celular. Desde un punto de vista de su metabolismo, las levaduras pueden obtener compuestos ricos en energía (catabolismo celular) mediante dos vías: la fermentación y la respiración celular. La fermentación se define como un proceso catabólico parcial, ya que los productos finales corresponden a sustancias orgánicas que no llegan a descomponerse en su totalidad. Por lo tanto, el proceso de obtención de energía es reducido. En cambio, mediante la respiración, la materia orgánica que se incorpora a la célula se descompone en sustancias inorgánicas sencillas (CO₂ y H₂O), liberando gran cantidad de energía.

En la presente comunicación se presentan las directrices para observar el proceso de inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura de panificación por medio de fluoruro de sodio, salvando las limitaciones (falta de material e instrumental básico) que pueden presentarse en un laboratorio de Educación Secundaria y Bachillerato.

Problemática de obtener una concentración adecuada de microorganismos para el ensayo

Los estudios de inhibición microbiana requieren de una correcta optimización de la concentración del agente antimicrobiano y del número de microorganismos que se quiere probar (López 2007). Por lo que respecta a este número de microorganismos es importante preguntarse cómo conocer la cantidad precisa. Si tomamos una alícuota de microorganismos, la suspendemos en agua y procedemos a realizar diluciones seriadas del mismo, nos cuestionamos qué dilución (densidad microbiana) será la precisa para ensayar la concentración de antimicrobiano que se quiere evaluar. Tanto es así que, si tomamos una densidad óptica de microorganismos por encima de un valor crítico, el estudio de la acción de antibióticos, inhibidores de crecimiento, enzimas, etc., no tendría el efecto que cabría esperar, siendo éste, por el contrario, el objetivo principal a mostrar con esta experiencia.

Los grandes laboratorios de ciencia disponen de complejos materiales, los espectrofotómetros, que determinan curvas de crecimiento relacionadas con densidades ópticas. Clásicamente, el alumno podría trabajar mediante un estándar de densidad óptica, el índice de McFarland. Éste determina una comparación visual entre una precipitación química llevada a cabo mediante el uso de cloruro de bario en medio ácido y la turbiedad que determinan un número de microorganismos. Es decir, la mayor precipitación química de los reactivos es equivalente a indicar la presencia de un mayor número de microorganismos en la muestra. Para que nos hagamos una idea, una densidad óptica muy utilizada en el índice de McFarland es 0,5 (que puede suministrar un comercial de productos de laboratorio), equivalente a precisar un número estimado de $1,5 \times 10^9$ microorganismos (Gamazo *et al.* 2005); esta cantidad es estándar en muchos ensayos de sensibilidad a antimicrobianos o inhibiciones. Ahora bien, volvamos a la pregunta de si un centro de Educación Secundaria puede permitirse la adquisición y el manejo de este costoso tipo de materiales.

Descripción de la actividad. Metodología

Boronat-Gil y López (2011) proponen una metodología simple para la observación de los productos finales de la fermentación de azúcares (glucosa) por parte de células de levadura, así como toda una síntesis del proceso teórico de la producción de etanol.

El estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura consta de una laboriosa metodología: los alumnos verterán 26 g de levadura fresca, junto a 200 ml de agua del grifo, en un matraz Erlenmeyer de un litro. La boca la tapanán con papel de aluminio y dejarán el cultivo a temperatura ambiente durante 24 horas. Trascorrido este período de tiempo, diluirán la suspensión tomando 20 ml de la misma en una probeta y enrasarán con agua del grifo hasta 100 ml. Al no disponer de reactivos ni material complejo para la obtención del índice de McFarland, de manera empírica y mediante pruebas de ensayo-error, se han optimizado las concentraciones de inhibidor, fluoruro de sodio (NaF), del proceso catabólico. De esta manera, los alumnos procederán a la elaboración de una dilución 1M de NaF, tomando 4,2 g de reactivo y 100 ml de agua del grifo en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Si no pudiera diluirse el reactivo en su totalidad, sería preciso calentar la mezcla. Las diluciones que buscamos serán 0,5 y 0,1 M. Para ello, se tomarán 50 y 10 ml de la dilución stock madre 1M de NaF, y se mezclarán con 50 y 90 ml de agua del grifo, respectivamente.

El siguiente paso es la elaboración de un respirómetro o sistema para medir la cantidad de dióxido de carbono desprendido por el proceso catabólico de las levaduras sobre los glúcidos. Nuestro sistema va a ser muy simple y su medida va a ser cualitativa, como se desprende de la observación de la figura 1, donde el análisis de los resultados demuestra claramente este

proceso. Para ello, dispondremos de dos tipos de tubos de ensayo: unos de dimensiones 10 mm × 150 mm y otros de 8 mm × 100 mm (que se introducirán en los primeros de manera invertida, tal y como se observa en la figura 1).

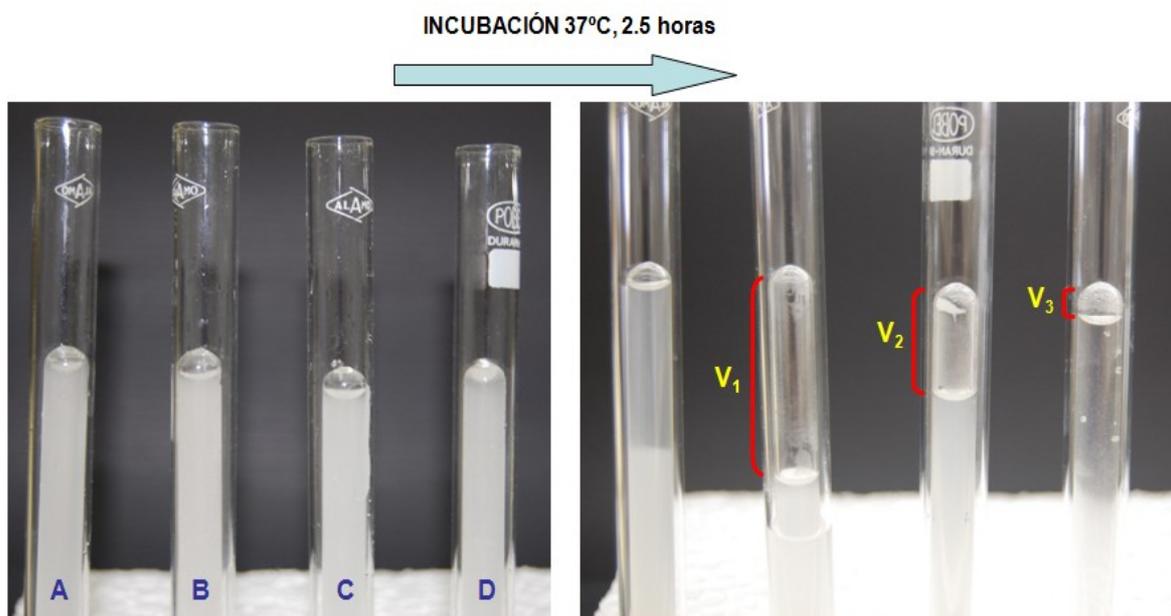


Figura 1. Aspecto de los tubos de respiración/fermentación al inicio y tras la incubación a 37 °C, durante 2,5 horas. [A] Control (agua del grifo más cultivo de levadura). [B] Cultivo de levadura suplementado con glucosa. [C y D] Cultivo de levadura suplementado con glucosa y fluoruro de sodio (0,1 y 0,5 M, respectivamente). [V₁, V₂ y V₃] Volúmenes de dióxido de carbono producidos tras la incubación en los tubos B, C y D.

Los alumnos rotularán 4 tubos de ensayo y verterán las cantidades que se especifican en la tabla 1. A continuación, y tras homogeneizar las diluciones mediante volteo, los alumnos verterán la cantidad precisa en los tubos de menor dimensión. Seguidamente, cada tubo pequeño se dispondrá en el interior de uno de mayor dimensión (previamente rotulado). Con la ayuda de un bolígrafo se deslizará por su interior, y tras su volteo quedarán tal y como se muestra en la figura 1. La dilución de levaduras más sustratos quedará en el interior del tubo de ensayo pequeño, a la espera de comenzar la experiencia. La incubación se llevará a cabo a 37 °C durante 2,5 horas. Si no se dispone de incubadora, puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, necesitándose toda una mañana para poder observar resultados. Si se elige esta segunda opción, el cultivo podrá guardarse en el frigorífico, finalizada la incubación, a la espera de comprobación de los resultados por parte del alumnado.

Tabla 1. Composición de los tubos de fermentación ensayados en la experiencia. (*) Disolución elaborada a partir de 1 g de glucosa en 20 ml de agua de grifo.

Tubo	Suspensión de levadura	Agua del grifo	Fluoruro de sodio	Solución de glucosa 5% (*)
A	5 ml	10 ml	-	-
B	5 ml	5 ml	-	5 ml
C	5 ml	-	5 ml (0,1 M)	5 ml
D	5 ml	-	5 ml (0,1 M)	5 ml

Resultados y discusión

La figura 2 muestra un esquema resumen que el alumno debe disponer para el apartado teórico de la experiencia.

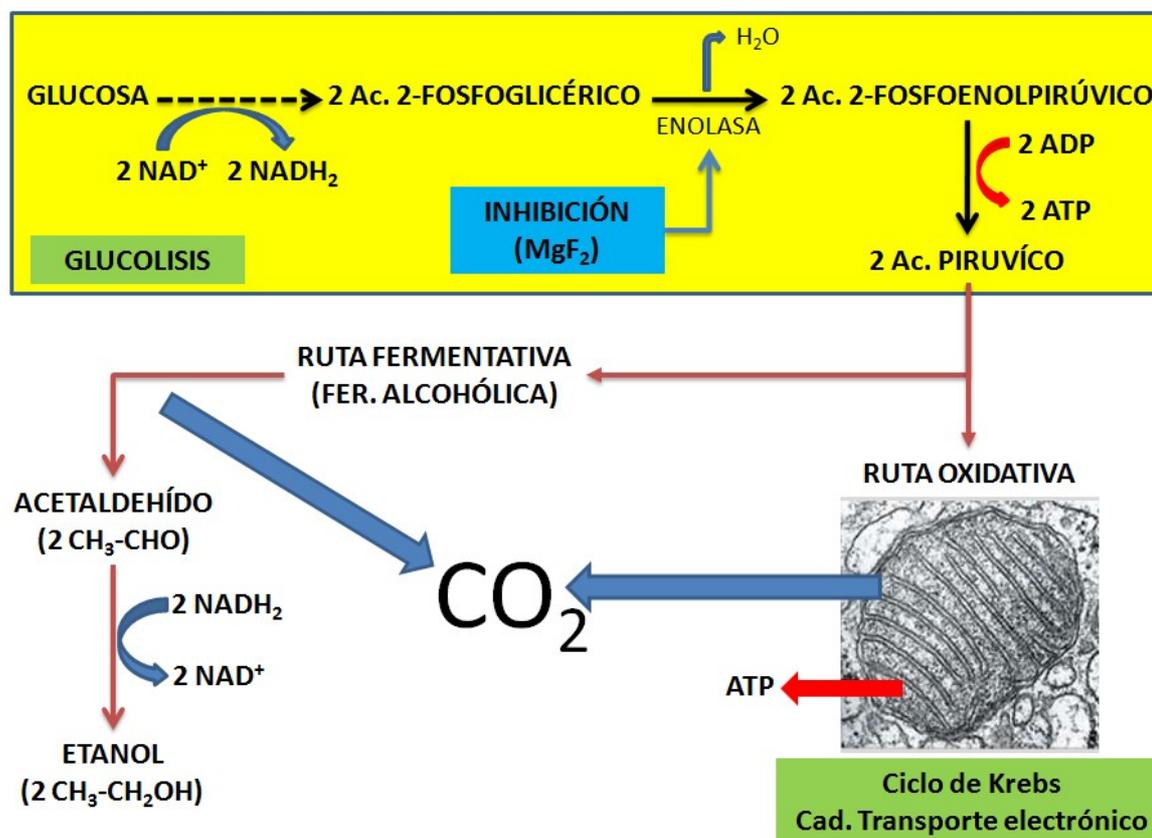


Figura 2. Esquema resumen de la producción de dióxido de carbono (CO_2) a partir de ácido pirúvico y lugar de la inhibición por parte del anión fluoruro. La ruta oxidativa especificada está compuesta por dos etapas importantes del catabolismo de glúcidos: el ciclo de Krebs y la ruta de fermentación. En el primero, la molécula de piruvato sufre un conjunto de transformaciones cíclicas en las que se producen descarboxilaciones oxidativas (paso de oxalsuccinato a α -cetoglutarato), poder reductor (NADH_2 y FADH_2) y moléculas energéticas (GTP). El poder reductor será conducido a la cadena de transporte electrónico hasta acabar en el oxígeno. En el trasiego electrónico se libera energía que es utilizada para formar los enlaces ricos en energía del ATP. Por lo que respecta a la ruta fermentativa, la especificada en el esquema corresponde a la producción de etanol. La fermentación es un proceso catabólico parcial, donde el aceptor del poder reductor es una molécula orgánica. En la primera reacción de esta ruta en particular, llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se produce una descarboxilación de la molécula de piruvato hasta dar acetaldehído.

El catabolismo de los azúcares se puede considerar dividido en varias etapas con el objetivo de facilitar el estudio por parte del alumnado. A modo de resumen: (1) tras una etapa preliminar, donde se pueden descomponer los grandes polisacáridos (almidón, glucógeno) en monosacáridos, se obtiene glucosa. (2) Mediante una serie de reacciones de oxidación (glucólisis), la glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico. Éste puede continuar por diferentes vías. Por un lado, un catabolismo oxidativo (3), en presencia de oxígeno, donde el piruvato entra a la mitocondria, sufriendo un complejo ciclo de reacciones donde se producen descarboxilaciones oxidativas, liberándose dióxido de carbono, poder reductor (FADH_2 , NADH_2) y moléculas energéticas (GTP): el ciclo de Krebs. El poder reductor será conducido hasta la cadena de transporte electrónico, dispuesta en las crestas mitocondriales,

donde cederá los hidrógenos a la molécula de oxígeno para dar agua. En el proceso de óxido-reducción, se liberará energía que se empleará en la formación de enlaces ricos en energía guardados en la molécula de ATP.

Y, por otro lado, si no se dispone de oxígeno en el medio (4), las células pueden llevar a cabo un tipo de catabolismo parcial, las fermentaciones, donde el aceptor de los hidrógenos del poder reductor es una molécula orgánica. En este caso, el esquema especifica la ruta fermentativa de producción de etanol. Durante el proceso, también se produce una descarboxilación del piruvato hasta acetaldehído, como paso previo a la formación de alcohol (Nelson y Cox 2006).

En esta experiencia, el inhibidor elegido del proceso catabólico es el fluoruro de sodio. Esta molécula en disolución acuosa y en el interior de la célula es capaz de formar un complejo con el catión magnesio y el anión fosfato inhibiendo a la enzima enolasa (figura 2), responsable de la reacción de formación de 2-fosfoenolpiruvato a partir de 2-fosfoglicerato (desprendiéndose una molécula de agua). En presencia de elevadas concentraciones del inhibidor fluoruro, éste compite activamente con el sustrato propio de la enzima por el centro activo (Baynes y Dominiczak 2007), reduciéndose la producción de piruvato y restringiéndose el proceso catabólico de respiración/fermentación. La inhibición del catabolismo de la levadura se pone de manifiesto por una reducción drástica en la formación de dióxido de carbono. En la figura 1 puede comprobarse tal hecho cuando se comparan los volúmenes de gas producidos en los tubos C y D (presencia de inhibidor) con el del tubo B (sin inhibidor). A mayor concentración de fluoruro (tubo D) la producción de gas es mínima, indicativo de su poder inhibitorio del proceso catabólico.

Finalizada la experiencia y como medida básica de higiene, es aconsejable el lavado de las manos con agua y jabón. El material de trabajo (pipetas, tubos de ensayo, matraces...) debe dejarse durante algunas horas en hipoclorito de sodio para facilitar su limpieza.

Nivel de programación

La actividad descrita es adecuada para alumnos que cursan la materia de Biología en segundo curso de Bachillerato, como actividad final al Bloque 4 (“El mundo de los microorganismos y sus aplicaciones”) y complemento del Bloque 2 (“Morfología, estructura y función celular: la respiración celular, su significado biológico. Orgánulos implicados en el proceso respiratorio. Aplicaciones de las fermentaciones”) (BOE 2007).

Temporalización

La experiencia se realiza en dos sesiones. En una primera sesión el profesor presenta la práctica, su objetivo principal (observación del proceso de respiración/fermentación en células de levadura), recordatorio de conceptos básicos de metabolismo y fisiología microbiana, así como el desarrollo del montaje de toda la experiencia. En una sesión final, se discutirán y evaluarán los resultados obtenidos con el modelo teórico propuesto en la figura 2. Además, los alumnos responderán en su cuaderno de laboratorio a cuestiones del tipo:

- 1) ¿A qué se deben las diferencias observadas en los tubos de fermentación ensayados?
- 2) ¿Cuál de los tubos se considera control de la experiencia? ¿Qué tipo de información ofrece su resultado?

Referencias

- BOE (2007) Real Decreto 1467/2007, de 2 de noviembre, por el que se establece la estructura de bachillerato y se fijan sus enseñanzas mínimas. BOE nº 266. pág. 45432.
- Baynes J., Dominiczak M. (2007) Glucolisis. Pág. 153 en *Bioquímica Médica*, 2ª ed. Amsterdam-Barcelona. Elsevier-Mosby.
- Boronat-Gil R., López J. P. (2011) El estudio de la fermentación en el laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 8(1), 111-114.
- Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. (2005) Técnicas de recuento microbiano. Pág. 45 en *Manual práctico de Microbiología*, 3ª ed. Barcelona. Masson.
- López J. P. (2007) *Microbiología de la producción de ocratoxina en uvas para vinificación y pimentón: biología de los hongos responsables y microbiota asociada*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Inédita.
- Madigan T., Martinko J. M., Parker J. (2003) *Brock. Biología de los microorganismos*, 10ª ed. Madrid. Pearson Prentice-Hall.
- Nelson D., Cox M. (2006) *Lehninger. Principios de bioquímica*. 4ª ed. Barcelona. Omega.