

Hola alumnos...

Terminaron las vacaciones. Sigamos trabajando!!

CRECIMIENTO MICROBIANO

Entendemos por crecimiento microbiano el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo (*ciclo celular*), sino al demográfico. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división

CICLO CELULAR

Las células aisladas cultivadas en un volumen finito de medio de cultivo apropiado van utilizando los nutrientes que tienen disponibles, sintetizando sus propios componentes celulares y dividiéndose en cuanto duplican su masa y su material genético. El tiempo que tarda una célula en cumplir ese proceso se denomina tiempo de generación y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses en condiciones ambientales. Cada vez que transcurre un tiempo de generación, el número de células se duplica, siguiendo, por tanto, un incremento exponencial.

TIEMPO DE GENERACIÓN

Las principales reacciones de la síntesis celular son reacciones de polimerización, proceso por el cual los polímeros (macromoléculas) se sintetizan a partir de monómeros: síntesis de DNA, RNA y proteínas; que una vez sintetizadas se ensamblan formando las estructuras celulares tales como la envuelta celular, flagelos, ribosomas, cuerpos de inclusión, etc. En la mayor parte de los microorganismos este crecimiento continúa hasta que las células se dividen en dos nuevas células. El tiempo que requiere una célula para completar su ciclo es muy variable y depende de factores nutricionales y genéticos. El intervalo que transcurre en la formación de dos células a partir de una célula se llama generación y el tiempo requerido para esto es el tiempo de generación.

Cálculo del tiempo de generación

Tiempo de generación (G) es el tiempo requerido para que una célula se divida o una población se duplique.

$$G = \frac{t}{n}$$

Si partimos de una célula al cabo de una generación habrá duplicado su número y así sucesivamente en cada generación. Como se puede comprobar el crecimiento se produce en progresión geométrica:

1 generación -----> 2 células = 2¹

2 generaciones -----> 4 células = 2²
 3 generaciones -----> 8 células = 2³
 4 generaciones -----> 16 células = 2⁴
 5 generaciones -----> 32 células = 2⁵

Si partimos de N células (en microbiología los estudios se realizan con poblaciones), a un tiempo determinado (Ta) tenemos un número de células determinadas (Na). En la primera generación se duplicará el número de células (2Na) y así sucesivamente de tal manera que al cabo de un tiempo determinado Tb el número de células determinadas será Nb (Nb = 2ⁿ Na) donde n es el número de generaciones transcurridas desde Ta hasta Tb. En esta fórmula (Nb = 2ⁿ Na) conocemos todos los parámetros excepto el número n de generaciones transcurridas por lo que aplicando logaritmos será posible calcularlo. Una vez obtenido el número de generaciones n transcurridas en un tiempo t podremos calcular el tiempo de generación G para ese microorganismo.

Ta -----> Na
 1 generación -----> 2Na = 2¹ Na
 2 generaciones -----> 4Na = 2² Na
 3 generaciones -----> 8Na = 2³ Na
 4 generaciones -----> 16Na = 2⁴ Na 5 generaciones -----> 32Na = 2⁵ Na n
 generaciones (Tb) -----> Nb = 2ⁿ Na

$$Nb = 2^n Na$$

$$\lg Nb = n \lg 2 + \lg Na$$

$$n = \frac{\lg Nb - \lg Na}{\lg 2}$$

$$\lg Nb - \lg Na$$

$$n = \frac{\lg Nb / Na}{\lg 2}$$

$$G = \frac{t}{3,3 \lg Nb / Na}$$

El tiempo de generación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es de 90 minutos y el de la bacteria *Escherichia coli* es 20 minutos. Esta bacteria tiene un crecimiento muy rápido de tal manera que a partir de una sola célula se obtienen al cabo de 8 horas (8 x 60 = 480 minutos; 480 : 20 = 24 generaciones; 2²⁴ = 2 x 10⁶ células) 2 millones de células. Esta misma bacteria al cabo de dos días se habría multiplicado hasta 2,2 x 10⁴³ células. Una bacteria pesa aproximadamente 10-15 - 10-11 gramos por lo que el peso de todas estas células es de aproximadamente 2,2 x 10³⁰ gramos que equivalen a 8 veces el peso de la Tierra.

CURVA DE CRECIMIENTO

Es la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo. La curva teórica sería una recta pues los microorganismos estarían creciendo constantemente pero en la práctica la curva presenta distintas fases:

- **Fase de latencia:** período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo.
- **Fase exponencial o logarítmica:** aumento regular de la población que se duplica a intervalos regulares de tiempo (G).
- **Fase estacionaria:** cese del crecimiento por agotamiento de nutrientes, por acumulación de productos tóxicos, etc.
- **Fase de declinación o muerte:** el número de células que mueren es mayor que el número de células que se dividen.

Las propiedades de un microorganismo dependerán de la fase de la curva en que se encuentren (la producción de antibióticos se lleva a cabo en la fase estacionaria).

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

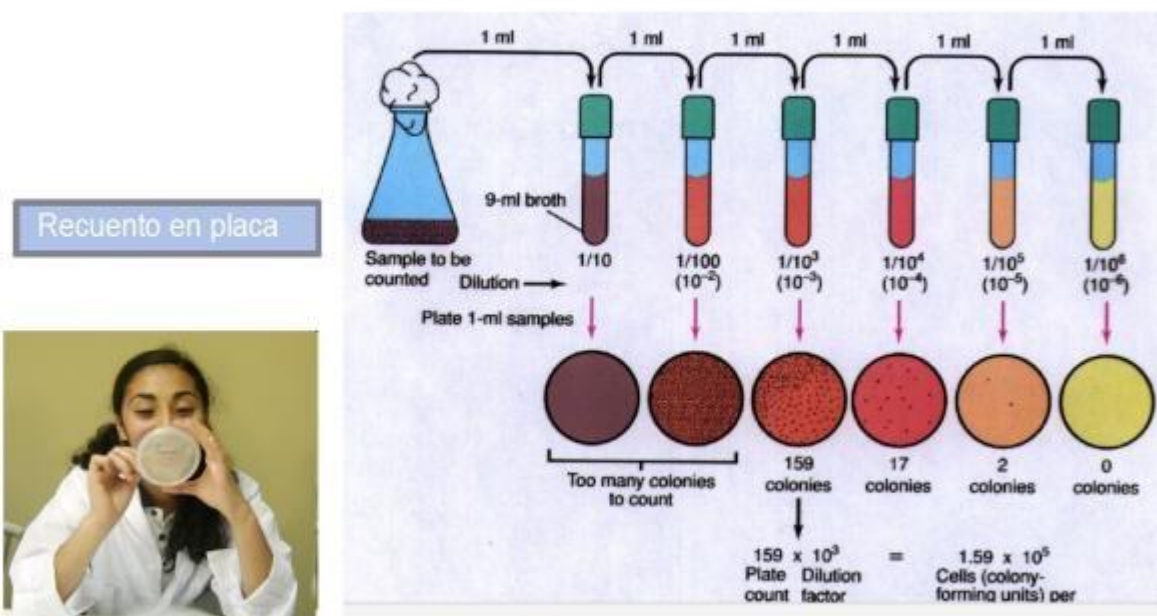
El cálculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica en relación al tamaño de la población). Todos estos métodos se clasifican en dos apartados: métodos directos y métodos indirectos.

- **Métodos directos:**
 - Recuento del número de células en una cámara Thoma
 - Peso seco celular
 - Determinación de nitrógeno o de proteínas totales
 - Determinación de DNA
 - **Métodos indirectos:**
 - **Recuento de colonias de viables en placa**
 - Recuento sobre filtro de membrana
 - Consumo de oxígeno
 - Liberación de dióxido de carbono
 - Concentración de un enzima constitutivo
 - Decoloración de un colorante
 - Incorporación de precursores radiactivos
 - **Método turbidimétrico.**
-

Recuento de colonias de viables en placa

Consiste en la dilución de una muestra (con solución salina estéril, buffer fosfato, agua peptona) hasta que las bacterias se diluyan lo suficiente como para contar con precisión. Se siembra un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una célula aislada. Las placas de final de la serie debe tienen entre 25 y 250 colonias (o entre 30 y 300 colonias). Menos de 25 las colonias no son aceptables por razones estadísticas, y más de 250 colonias en una placa es probable que produzcan colonias muy cerca unos de otros para ser distinguidos como distintas unidades formadoras de colonias (UFC).

En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 μm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.



Las relaciones de dilución, pueden presentarse ya sea con dos puntos (:) o barras (/). Una barra indica la proporción de una parte a un conjunto, por ejemplo, $1/2$ significa 1 de 2 partes, con un total de 2 partes. Dos puntos indica la proporción de 1 parte a 2 partes, con un total de 3 partes. Así, $1/2$ es igual a $1:1$, pero $1:2$ es igual a $1/3$.

Método turbidimétrico

El sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio.

La densidad de células debe ser del orden de 10^5 por ml. Esta metodología se basa en la ley de Lambert-Beer. **Ley de Lambert-Beer:**

Hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si conocemos I_0 y I_1 , la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.

La intensidad de la energía radiante transmitida I_1 es menor a la intensidad inicial I_0 debido precisamente a que la solución fue capaz de absorber cierta cantidad de energía radiante.