

MICROBIOLOGÍA

UNIDAD VI CRECIMIENTO MICROBIANO

Reproducción y multiplicación o división procariota. Fisión Binaria. Tiempo de generación. Crecimiento de poblaciones. Naturaleza y expresión matemática del crecimiento. Representación logarítmica del crecimiento. Fases del crecimiento. Medidas directas e indirectas. Cultivo continuo. Cultivo discontinuo. Curva de crecimiento poblacional. Cambios en la población: recuento total, determinación de la masa microbiana, conteo directo de procariotas. Técnica de Breed, recuento en cámara (Neubauer y Petroff-Hauser), recuento de cultivo de procariotas vivas: por dilución (Número Más Probable) y de colonias. Turbidimetría. Eficiencia del crecimiento: rendimiento. Crecimiento sincrónico. Efecto de la concentración de nutrientes sobre la velocidad del crecimiento. Cultivo continuo de microorganismos. Quimióstatos y Turbidostatos.



CRECIMIENTO EN MICROBIOLOGÍA



INCREMENTO EN EL NÚMERO DE CÉLULAS

- ❖ La célula microbiana tiene un período de vida finito y la especie sólo se mantiene como resultado del crecimiento continuo de la población.
- ❖ El crecimiento microbiano supone toda una serie de reacciones necesarias para doblar la cantidad de todos los componentes celulares y también la división celular para formar 2 células hijas.
- ❖ La mayoría de los microorganismos crece por fisión binaria.

EL CRECIMIENTO ES LA FINALIDAD ÚLTIMA DE LA CÉLULA

Que 1 célula se convierta en 2 = El número de células se duplica en cada generación

- ❖ El crecimiento celular microbiano depende de un gran número de reacciones químicas de una amplia variedad de tipos.
- ❖ Algunas de estas reacciones son transformaciones energéticas.
- ❖ Otras implican biosíntesis de pequeñas moléculas, las unidades básicas de las macromoléculas, así como los diversos cofactores y coenzimas necesarios para las reacciones enzimáticas.



Organismos superiores



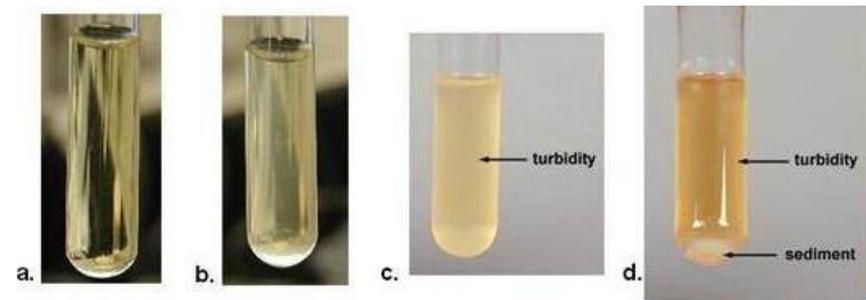
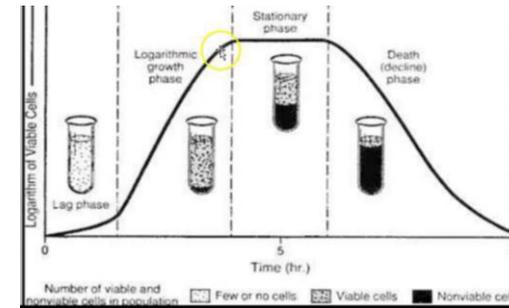
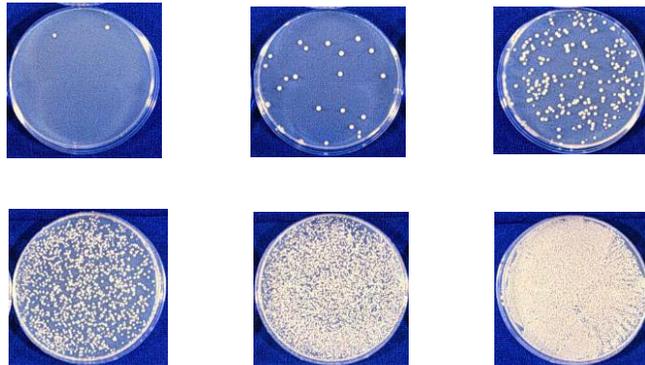
Aumento de tamaño y complejidad



Microorganismos



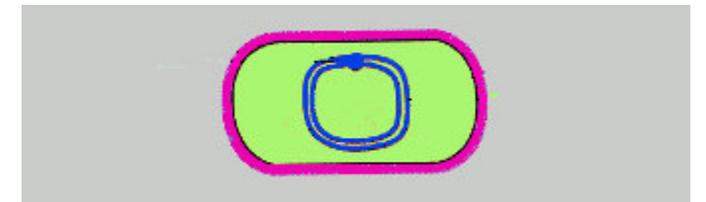
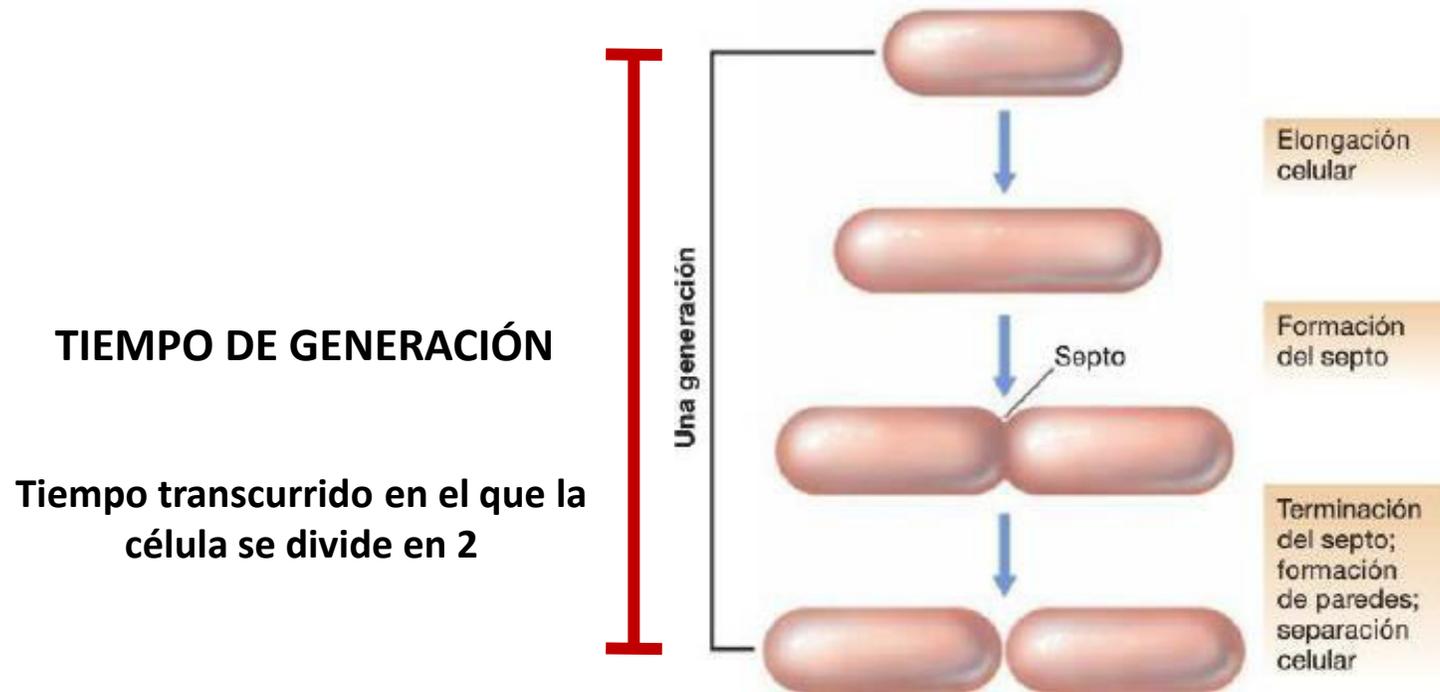
Aumento del número de células



- ❖ Las principales reacciones de síntesis celular son reacciones de polimerización, por las que se forman los polímeros (macromoléculas) a partir de los monómeros
- ❖ Una vez que se acumulan en el citoplasma de la célula, se ensamblan en nuevas estructuras celulares (pared celular, membrana citoplasmática, flagelos, ribosomas, cuerpos de inclusión, complejos enzimáticos, etc.), lo cual conduce finalmente a la división.

FISIÓN BINARIA

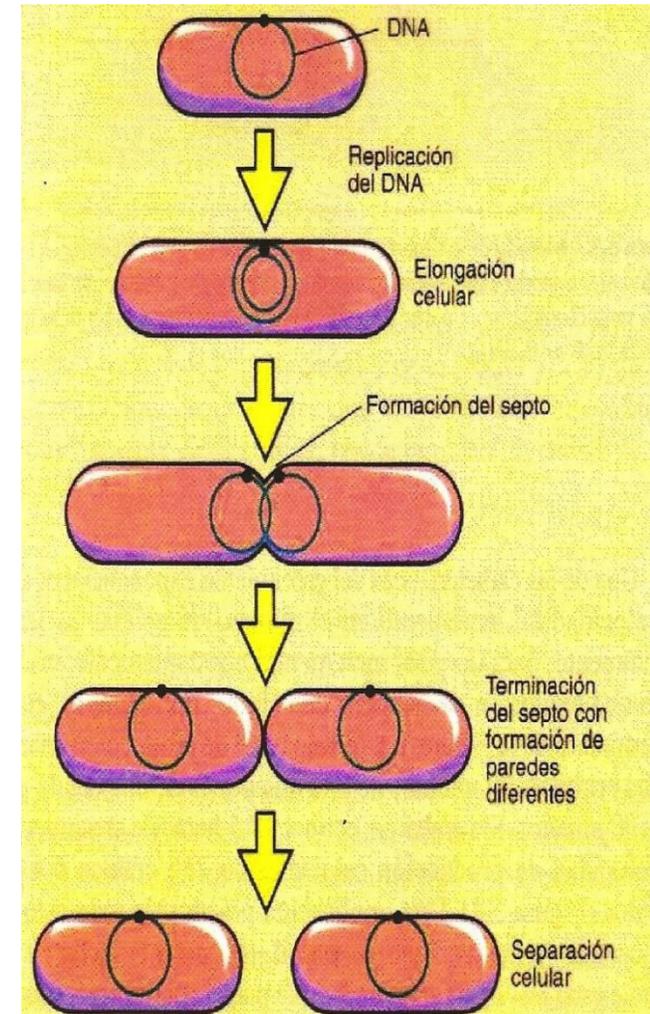
Formación de 2 células a partir de 1



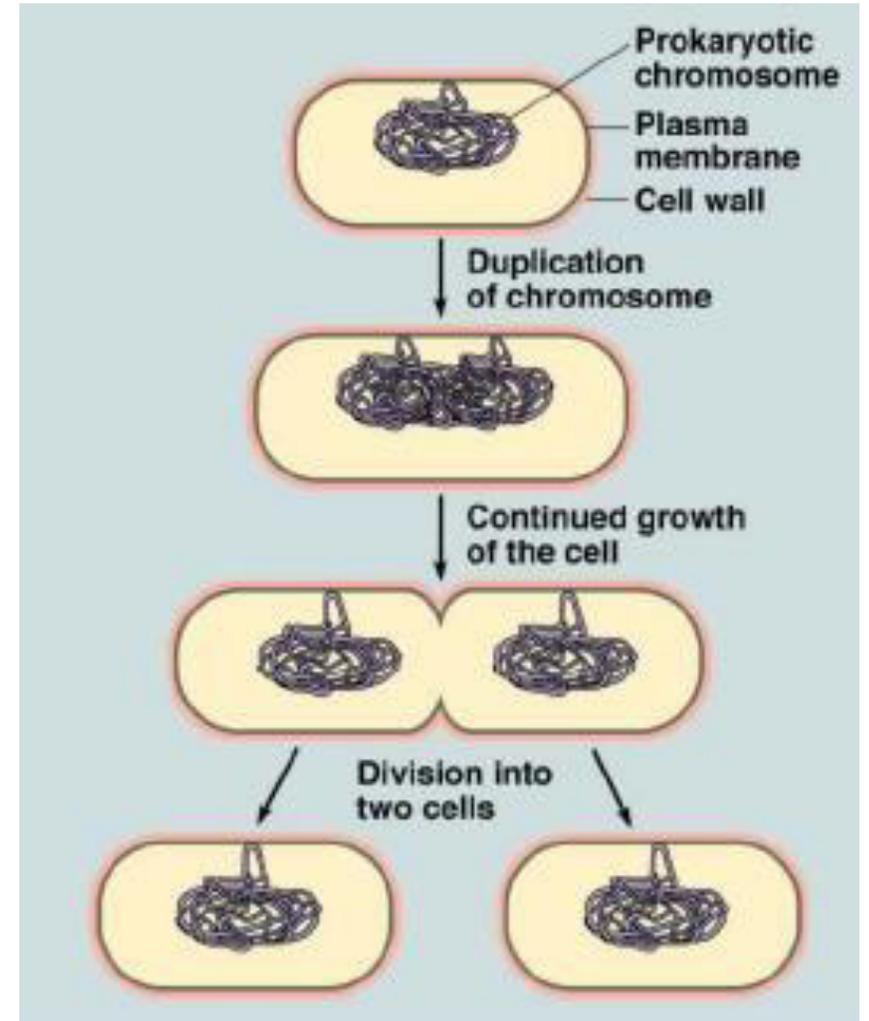
CRECIMIENTO MICROBIANO



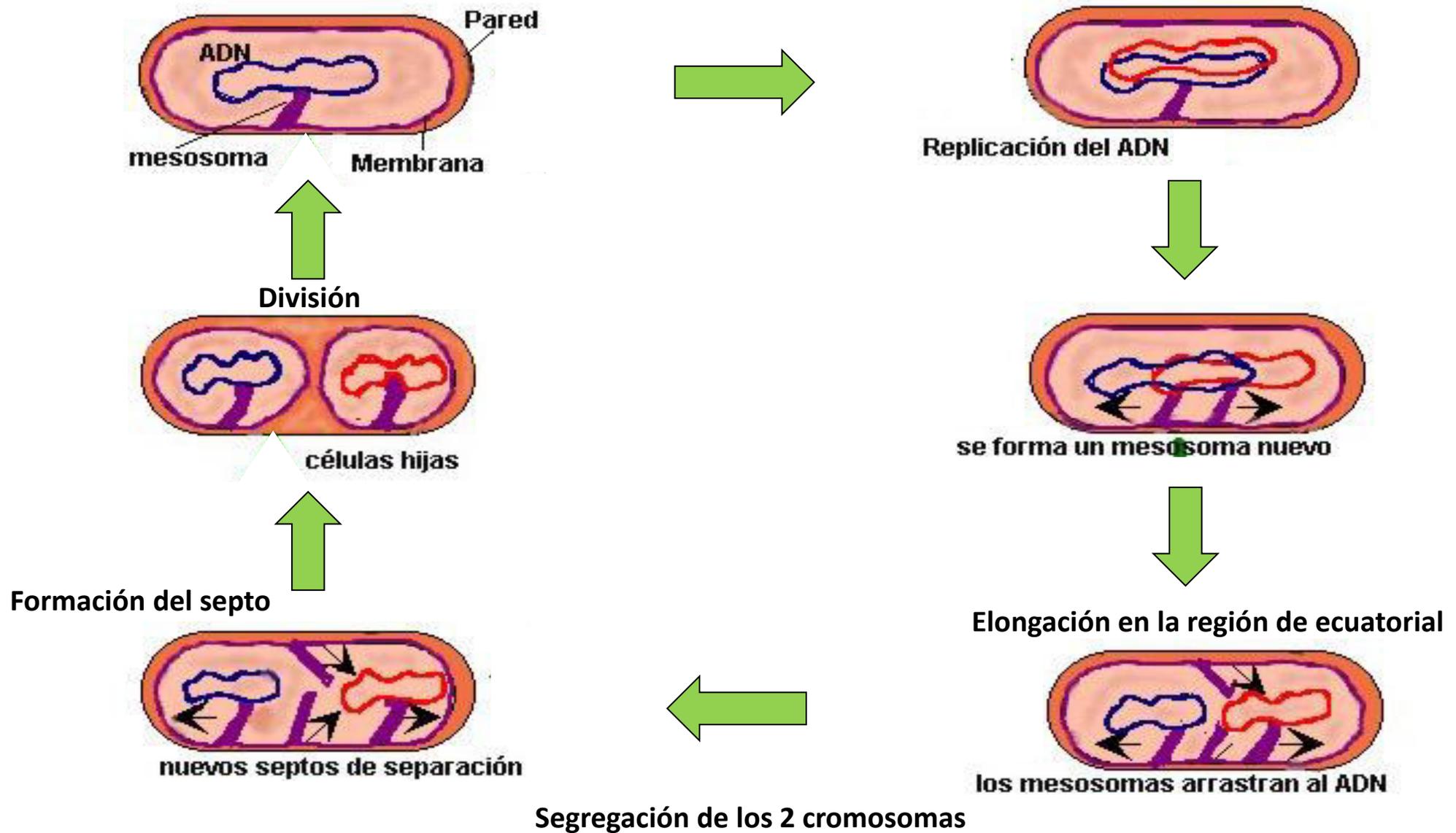
- ❖ Durante el tiempo de generación, todos los constituyentes celulares aumentan proporcionalmente, están en crecimiento equilibrado.
- ❖ Cada célula hija recibe un cromosoma completo y suficientes copias de macromoléculas, monómeros e iones inorgánicos para vivir en forma independiente.
- ❖ Bajo las mejores condiciones nutricionales *E. coli* puede completar su ciclo en 20 minutos.
- ❖ El tiempo para completar una generación es variable y depende de factores nutricionales y genéticos.



- ❖ El reparto del ADN duplicado entre las 2 células hijas depende de la unión del ADN a la membrana durante la división y la segregación real de las 2 copias es facilitada por la formación del septo.
- ❖ Muchas bacterias tienen tiempos de generación comprendidos entre 30 min a 6 horas, pero unas cuantas crecen rápidamente y se dividen en menos de 20 minutos mientras que otras tardan varios días o incluso semanas
- ❖ En la naturaleza es probable que las células microbianas crezcan mucho más despacio que a su velocidad máxima, porque raramente se presentan a la vez todas las condiciones y los recursos que permitan un crecimiento óptimo.

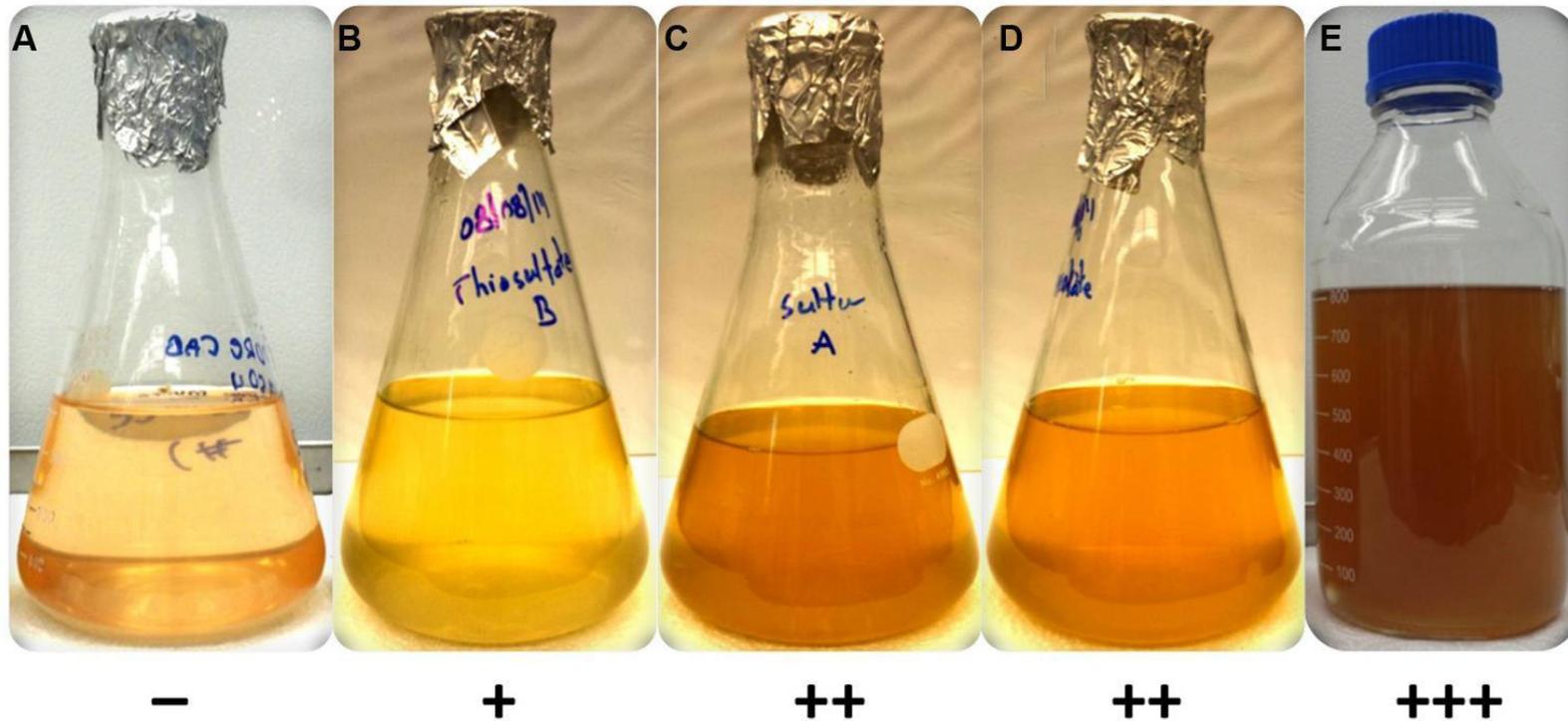


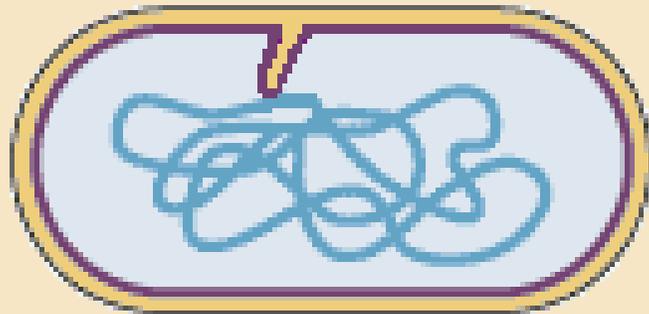
FISIÓN BINARIA



En un cultivo de *Escherichia coli*, las células se alargan hasta alcanzar aproximadamente 2 veces su longitud original y luego se forma un tabique que separa a la célula en 2 células hijas.

- ❖ Este tabique es el SEPTO y es el resultado del crecimiento hacia dentro de la membrana plasmática y de la pared celular desde direcciones opuestas hasta que las 2 células hijas se separan.

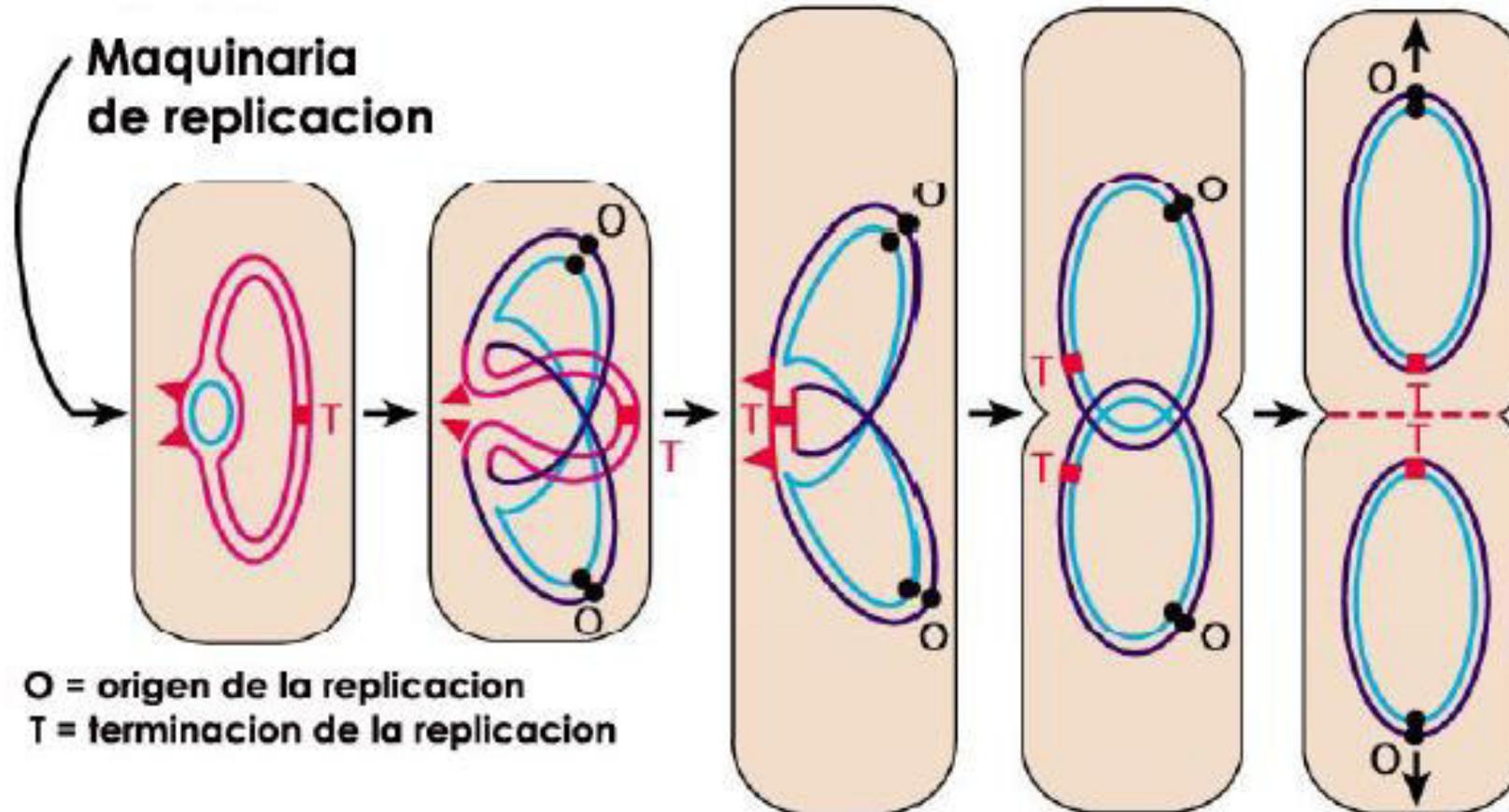




REPLICACIÓN DEL CROMOSOMA

Ori C: Secuencia de origen de la replicación (245 pb)

Se duplica cuando comienza la replicación



Se omiten los puntos de anclaje a la membrana para simplificar

SÍNTESIS Y SEGREGACIÓN

Elongación en la región ecuatorial



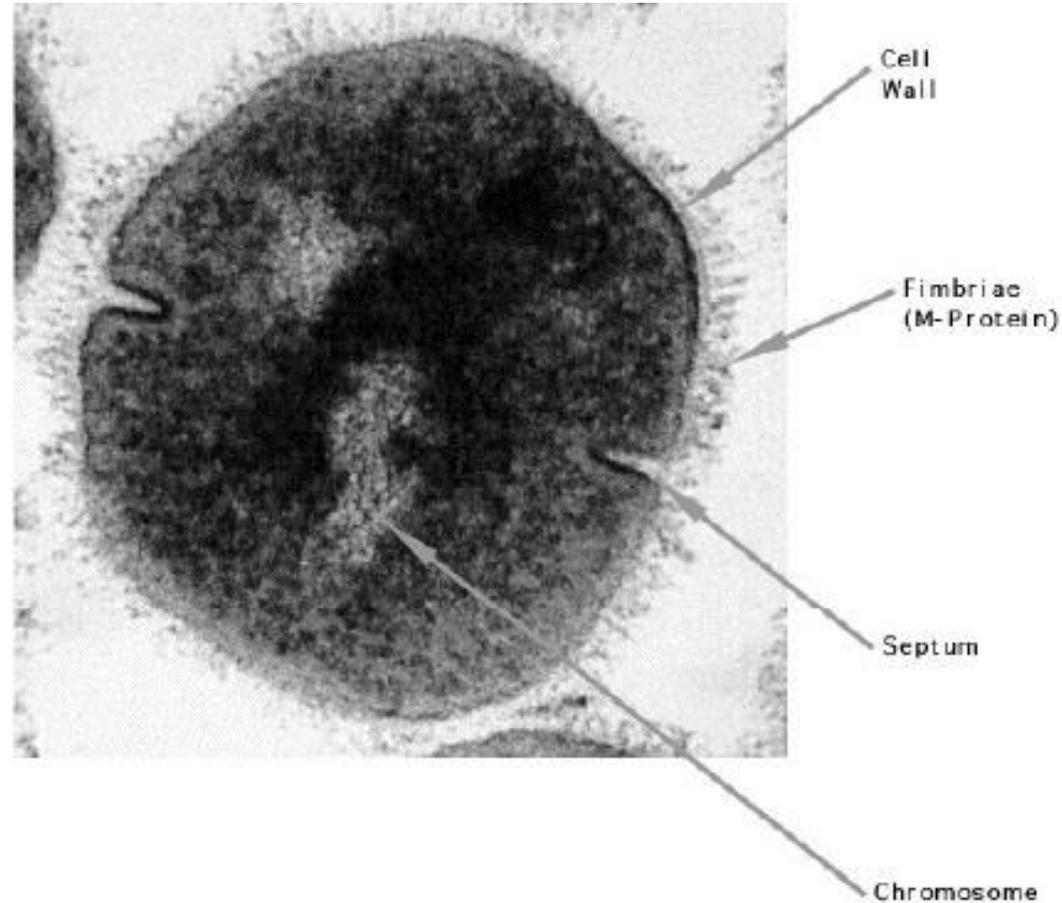
aumento de tamaño



Formación del septo



Segregación de los cromosomas

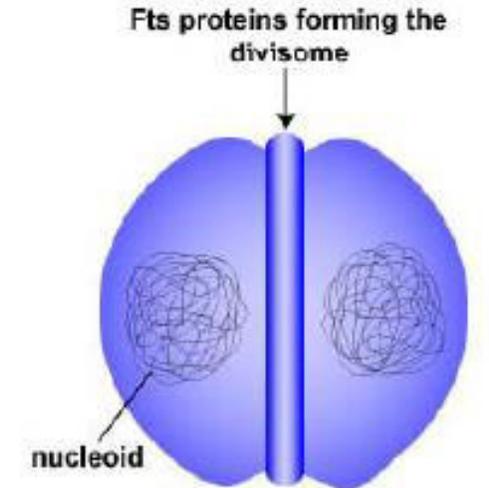
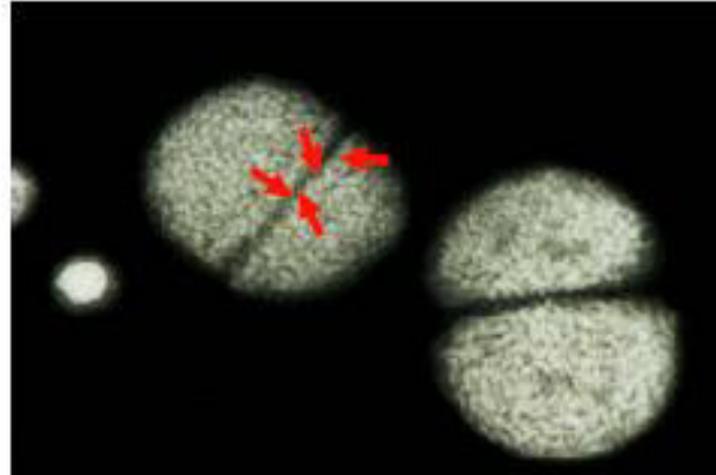


PROTEÍNAS Fts DE FORMACIÓN DEL SEPTO

- ❖ *Filamentous temperature sensitive proteins* (Proteínas filamentosas sensibles a la temperatura).
- ❖ Se encuentran en todos los procariotas (*Bacteria* y *Archaea*) y en orgánulos eucariotas.
- ❖ Constituyen el aparato de división o divisoma.
- ❖ En bacilos el divisoma forma un anillo hacia el centro de la célula.
- ❖ Esta región marca el plano de división.



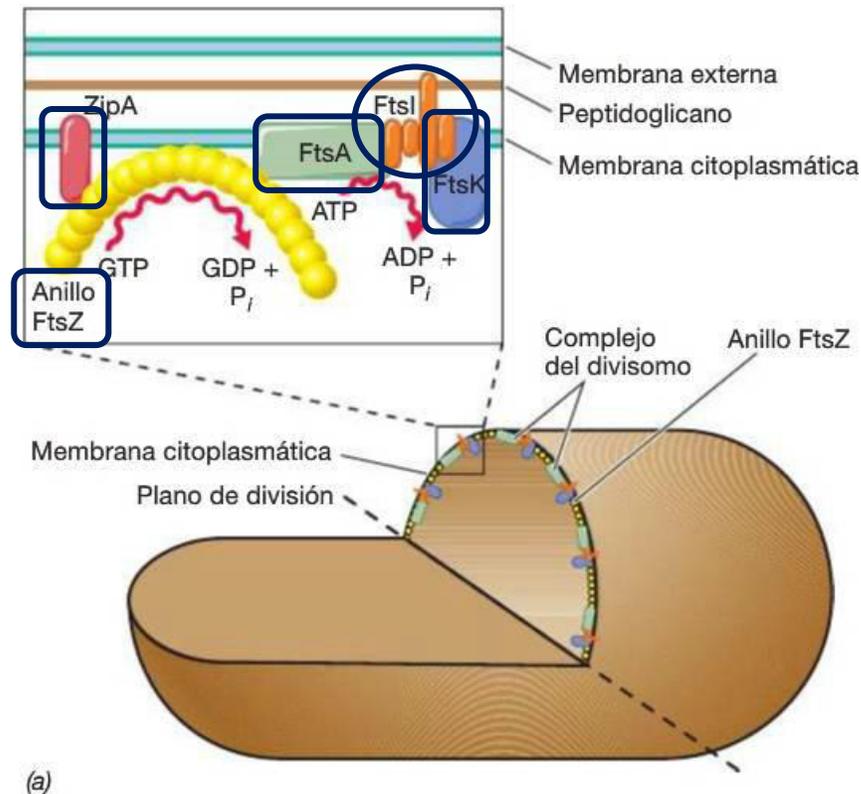
Imagen del anillo contráctil
(fluorescencia in situ)



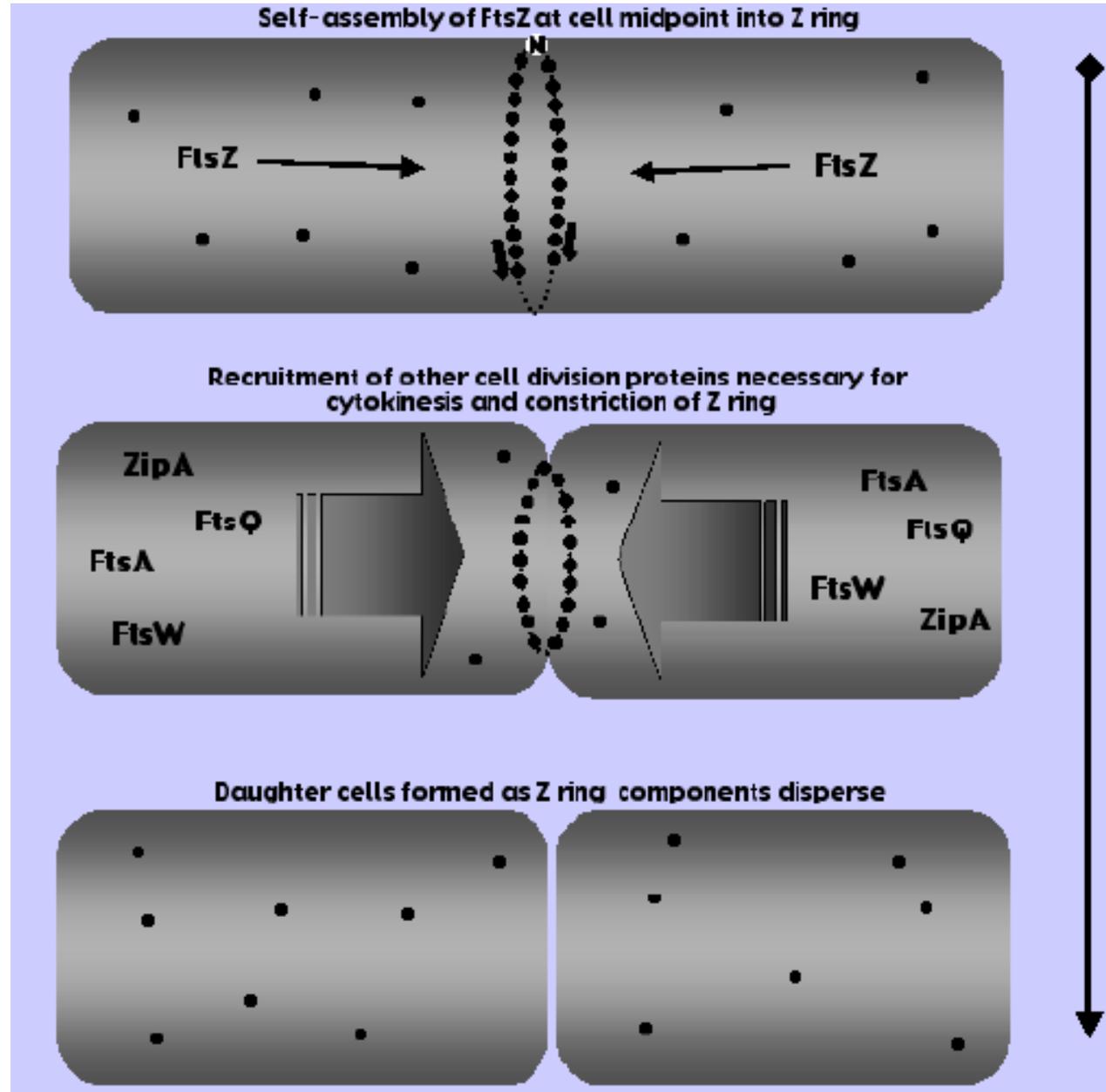
PROTEÍNAS Fts y DIVISIÓN CELULAR



- ❖ Las proteínas Fts forman un aparato de división que se llama **DIVISOMA**.
- ❖ En bacilos, su formación comienza con la unión de moléculas de FtsZ formando un anillo alrededor del cilindro celular que se sitúa hacia el centro de la célula.
- ❖ Esta área define el plano de la futura división celular.
- ❖ En *E. coli* se polimerizan unas 10.000 moléculas de FtsZ hasta formar un anillo continuo que luego atrae otras proteínas del divisoma como FtsA y ZipA



- ✓ **ZipA**: proteína de fijación de FtsZ a la membrana
- ✓ **FtsI**: proteína de biosíntesis de peptidoglicano
- ✓ **FtsK** ayuda en la separación de los cromosomas, y **FtsA** es una ATPasa



Aparición y degradación del anillo FtsZ



ciclo celular de *E. coli*

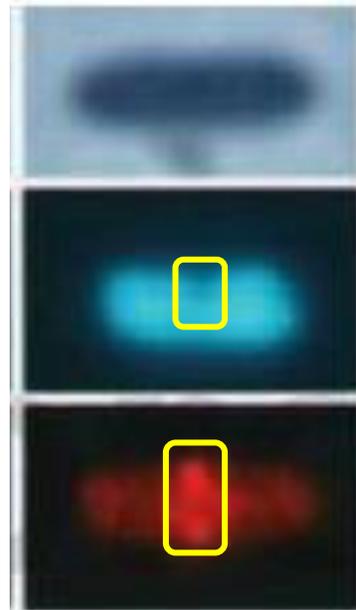
Contraste de fases

Tinción del nucleoide

Tinción de FtsZ



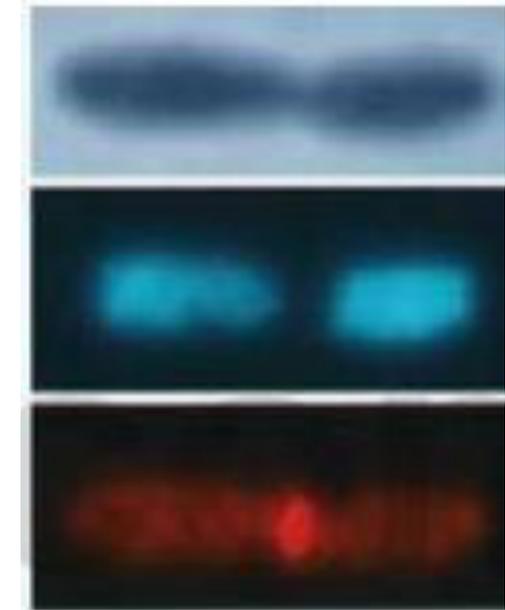
Anillo FtsZ aún sin formar



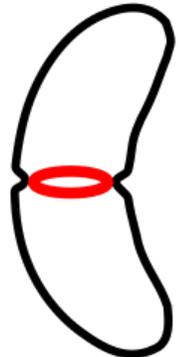
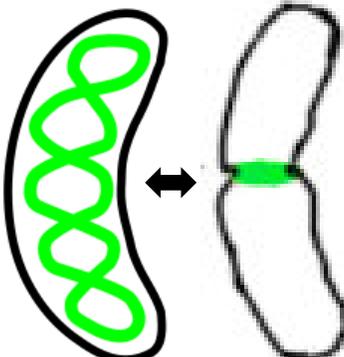
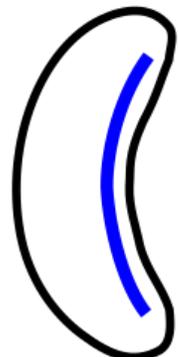
Aparición del anillo FtsZ cuando el nucleoide comienza la segregación



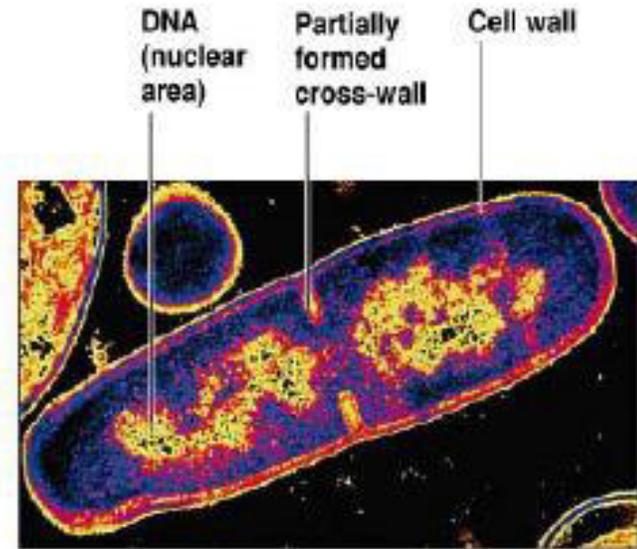
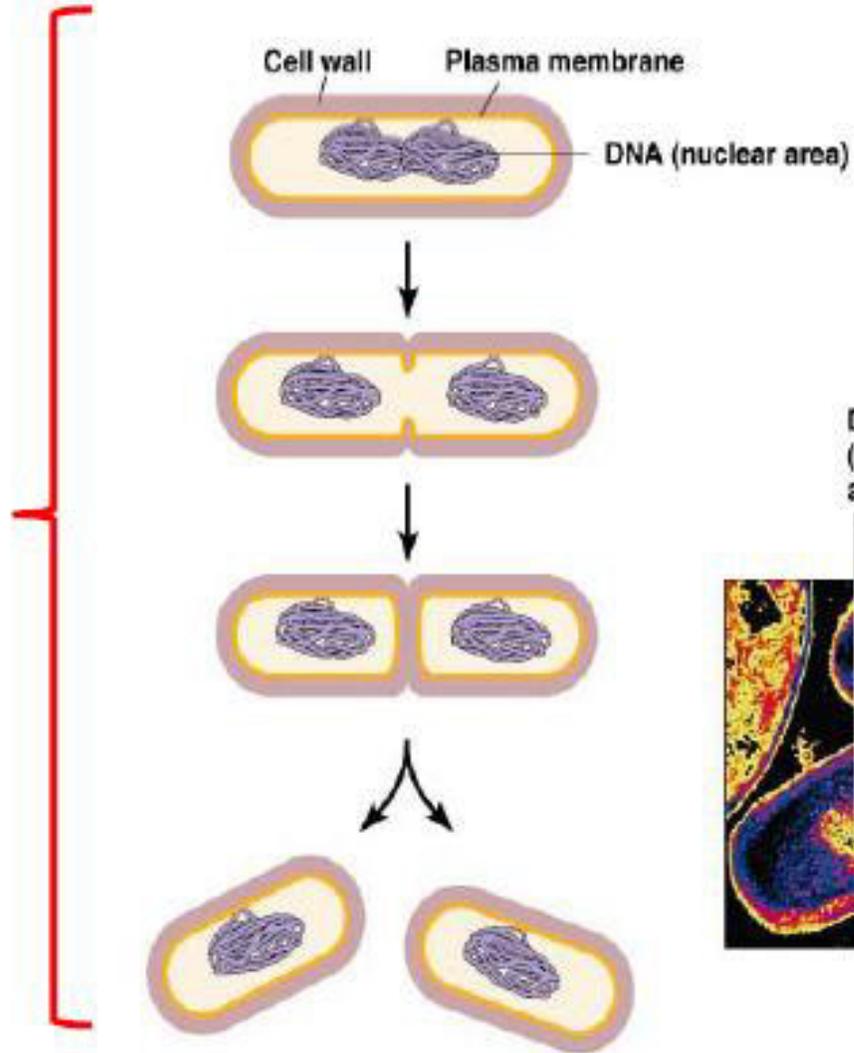
Anillo FtsZ completo durante la elongación



Degradación del anillo FtsZ y división celular

	División	Polaridad	Forma
Eucariotas	Tubulina	Actina	Filamentos intermedios
Procariotas	FtsZ	MreB	CreS
<i>Caulobacter</i>			

Tiempo de generación (g)



(a) A diagram of the sequence of cell division.

(b) A thin section of a cell of *Bacillus licheniformis* starting to divide.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Tiempos de generación de algunas bacterias bajo condiciones de crecimiento óptimas

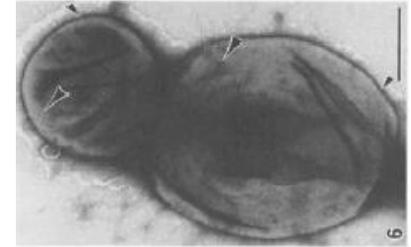
Bacteria	Medio	Tiempo de generación (g) minutos	
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa y sales	17	
<i>Bacillus megaterium</i>	Sacarosa y sales	25	
<i>Streptococcus lactis</i>	Leche	26	
<i>Streptococcus lactis</i>	Caldo lactosa	48	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI:caldo cerebro-corazón	27-30	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche	66-87	
<i>Rhizobium japonicum</i>	Extracto levadura-manitol	344-461	5 h 44' – 7 h 41'
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sintético	792-932	13 h 12' – 15 h 32'
<i>Treponema pallidum</i>	Testículo de conejo	1980	33 h

GEMACIÓN

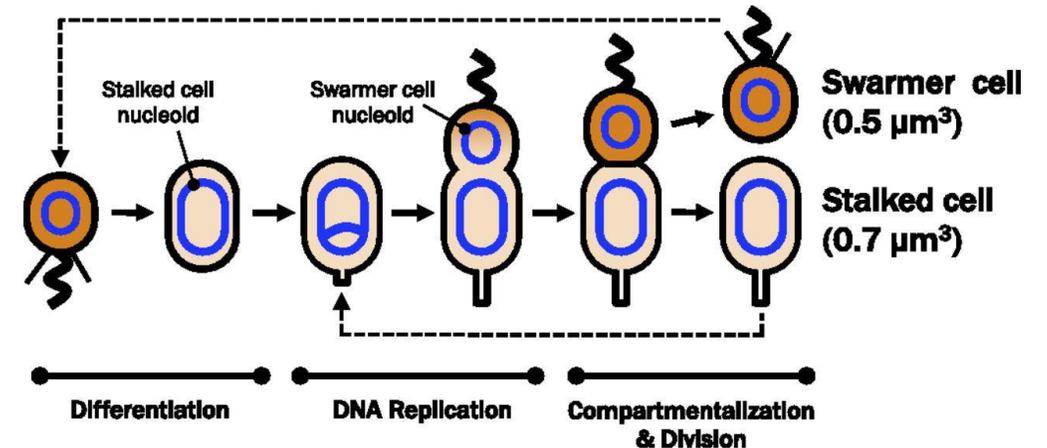
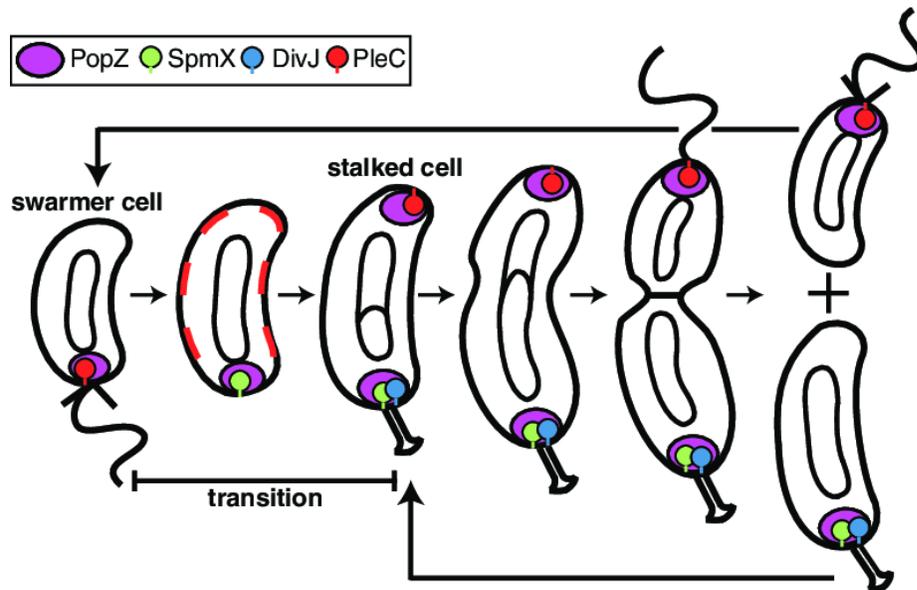
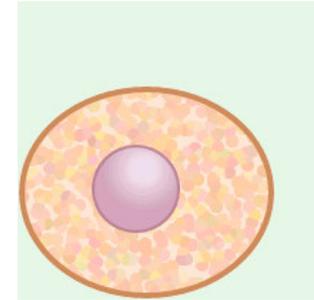


Crecimiento protuberante en un extremo que se agranda y se separa

✓ Microscopía electrónica de una bacteria gemante desarrollándose de una yema.



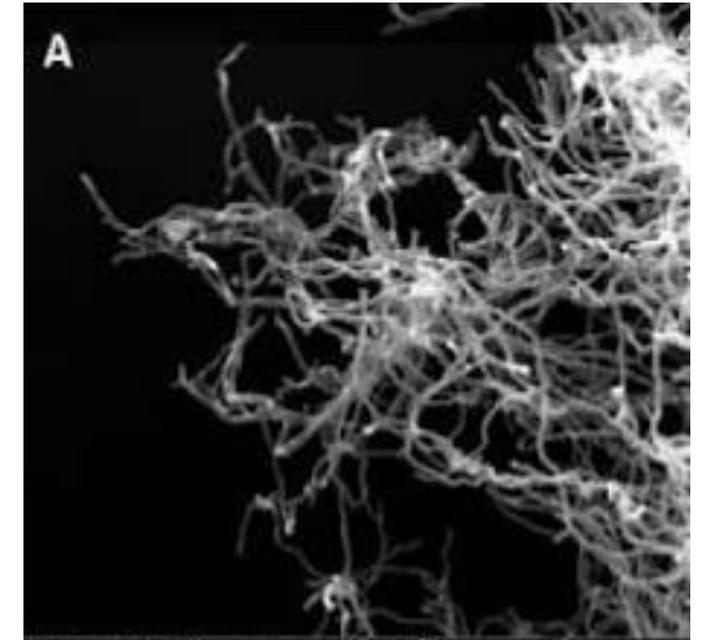
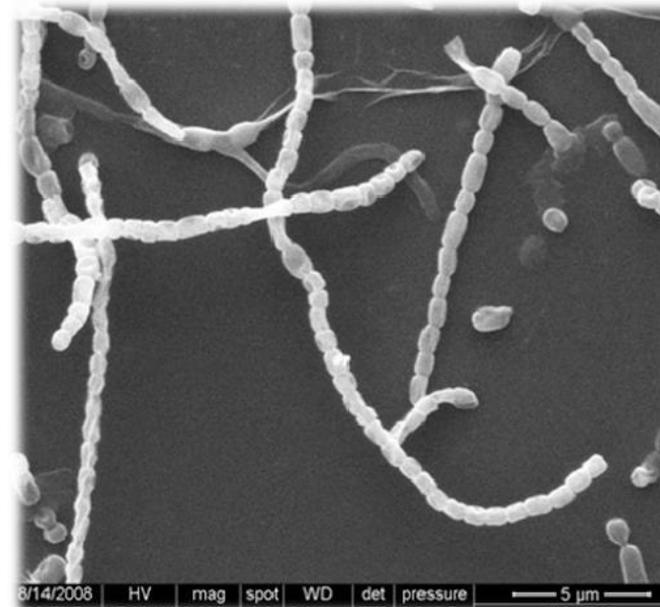
✓ Es típico de levaduras y de algunas bacterias como *Caulobacter*



CRECIMIENTO FILAMENTOSO

Actinomicetos

- ✓ Células se alargan para dar un filamento.
- ✓ Cuando el microorganismo crece, se replica el núcleo en muchas copias a lo largo del filamento.
- ✓ Luego se produce el crecimiento del filamento
- ✓ Al final ocurre la fragmentación de los filamentos y la separación.





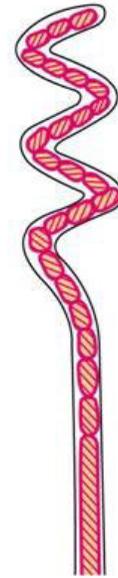
Fase de crecimiento



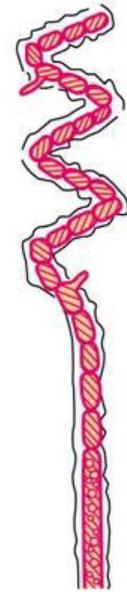
Punta ondulada



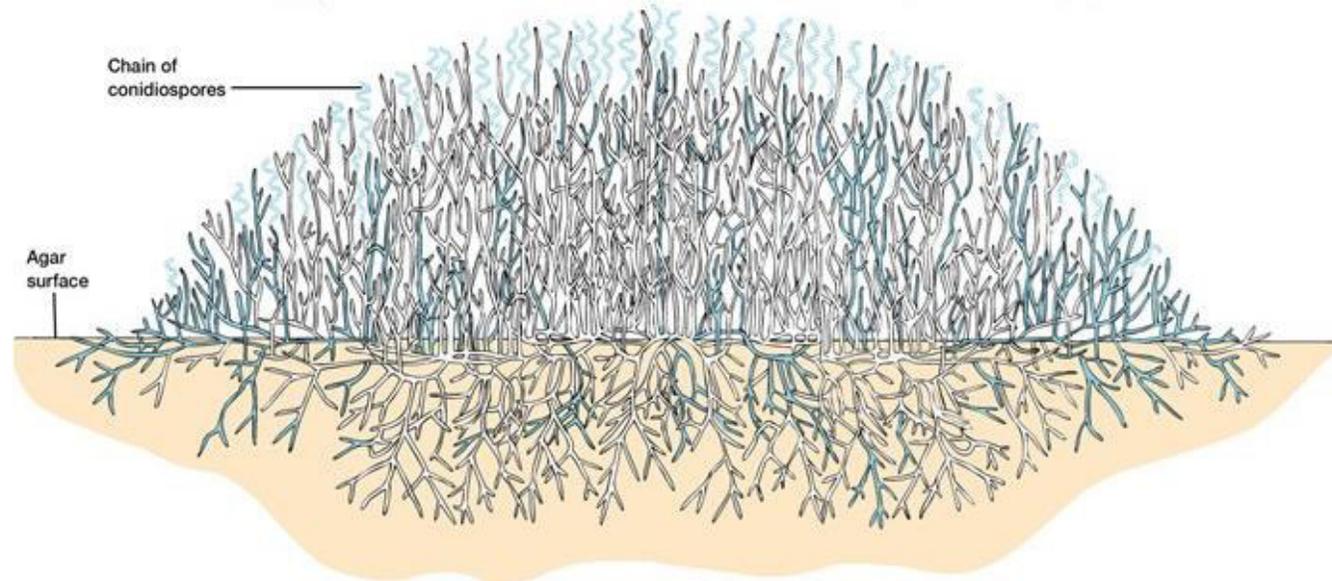
Fraccionamiento de la punta



Engrosamiento de la pared celular y constricción



Esporas maduras





CONTROL DEL CICLO CELULAR

- i. Una fase del ciclo NO comienza hasta que la anterior no haya terminado.
- ii. Debe existir una determinada masa crítica celular para desencadenar el inicio de la replicación del cromosoma y con ello también la división.

$$M_i = 2 M$$

M_i = Masa de iniciación
 M = Masa celular

Cuando se alcanza esta masa crítica se disparan 2 eventos



Replicación ADN

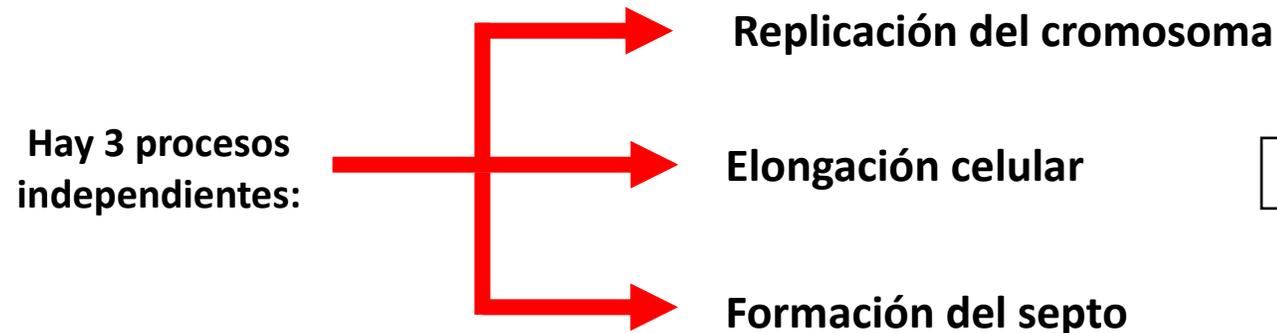
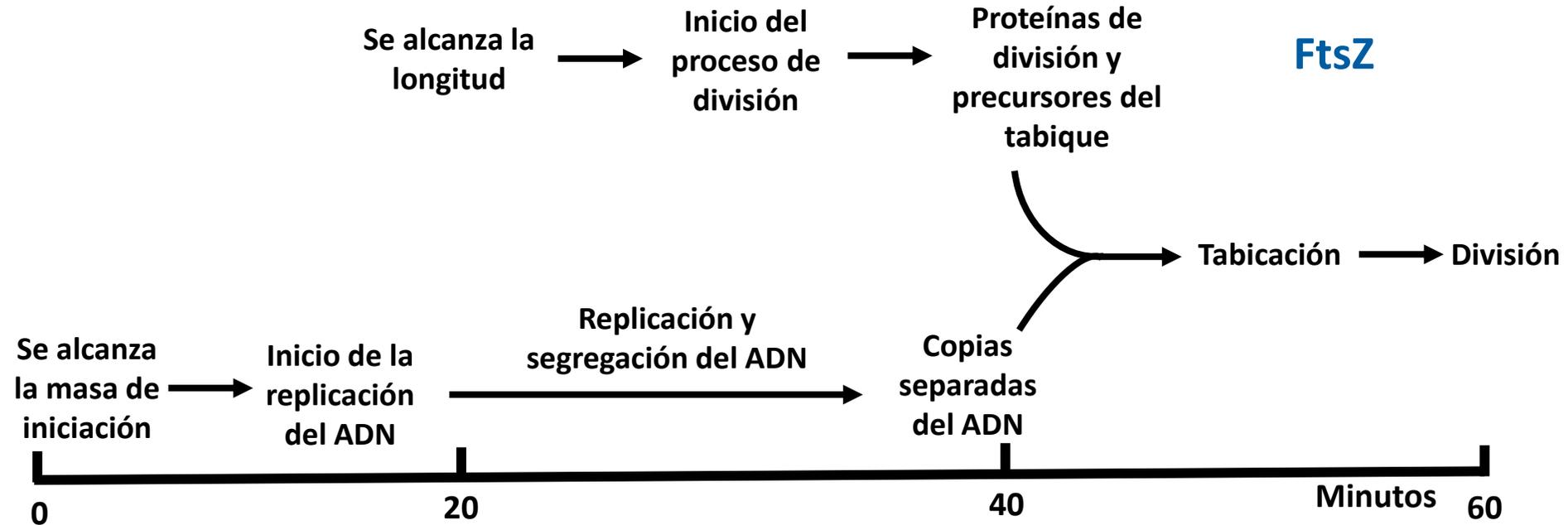


Formación del septo



CONTROL DEL CICLO CELULAR DE *E. coli*

Esquema de las 2 secuencias independientes de acontecimientos en el ciclo celular que controlan la división celular actuando en paralelo

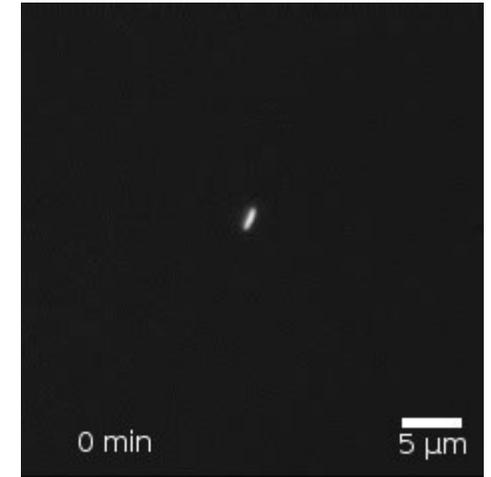


Controlados por el aumento de la masa celular

CRECIMIENTO DE POBLACIONES PROCARIOTAS



- ❖ Crecimiento en microbiología se define como un aumento en el número de células microbianas de una población.
- ❖ Ahora pasamos, de considerar el crecimiento y la división de una célula individual, a considerar la dinámica del crecimiento poblacional.



CRECIMIENTO MICROBIANO EN MEDIO LÍQUIDO

- ❖ Si el microorganismo crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división forman una suspensión de células libres.
- ❖ En un cultivo discontinuo en medio líquido, se pueden diferenciar 4 fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano

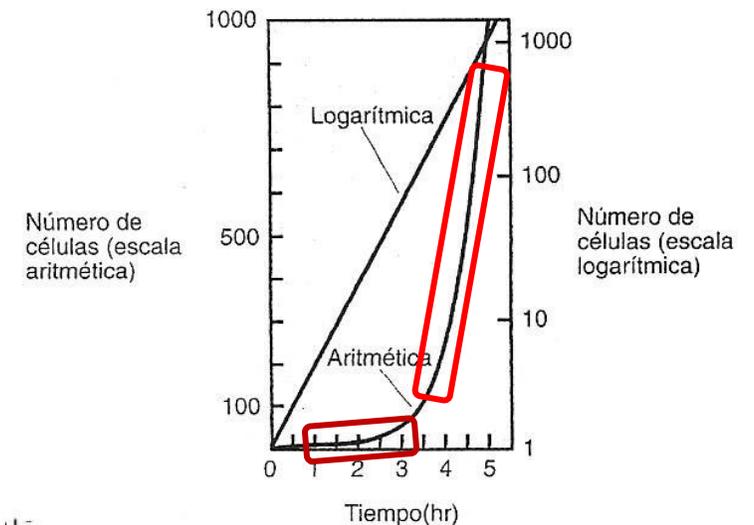


CRECIMIENTO POBLACIONAL



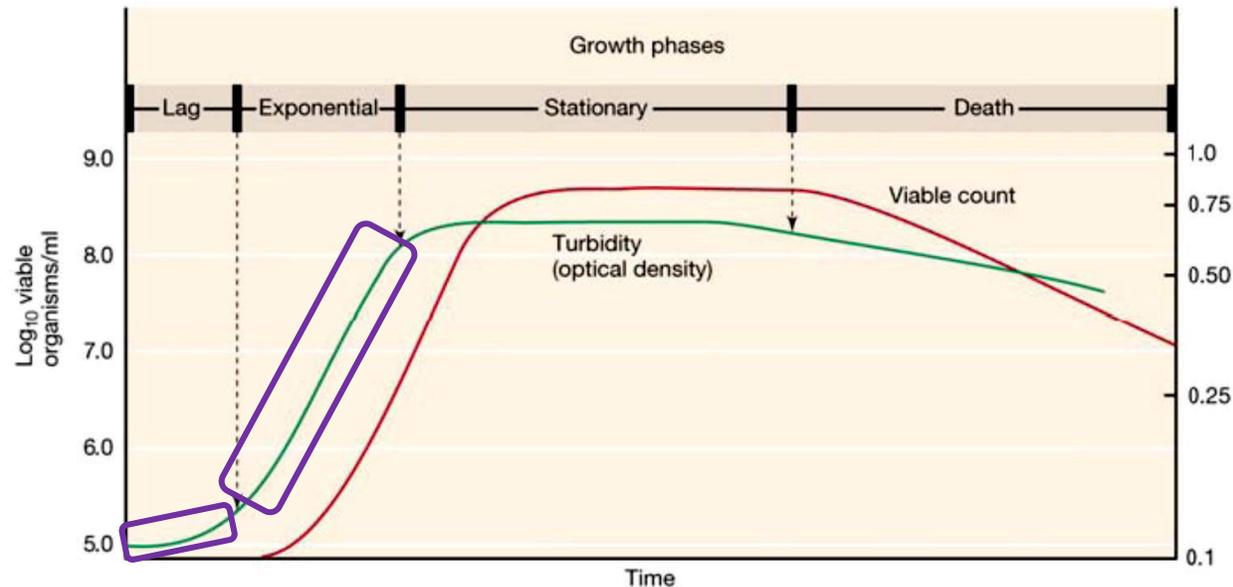
- ❖ La **velocidad de crecimiento** es el cambio en el número de células por unidad de tiempo.
- ❖ El **tiempo de generación** es el requerido para duplicar una población de células.
- ❖ Este modelo en el que el número se duplica por unidad de tiempo se denomina **CRECIMIENTO EXPONENCIAL**.
- ❖ Una característica es que al comienzo es bajo y luego incrementa en una explosión del número de células.
- ❖ Se utiliza para ensayar el efecto positivo o negativo de algún tratamiento sobre el cultivo procariota.

Tiempo (hr)	Número total de células
0	1
0.5	2
1	4
1.5	8
2	16
2.5	32
3	64
3.5	128
4	256
4.5	512
5	1,024
5.5	2,048
6	4,096
.	.
.	.
(a) 10	1,048,576



CONSECUENCIAS DEL CRECIMIENTO EXPONENCIAL

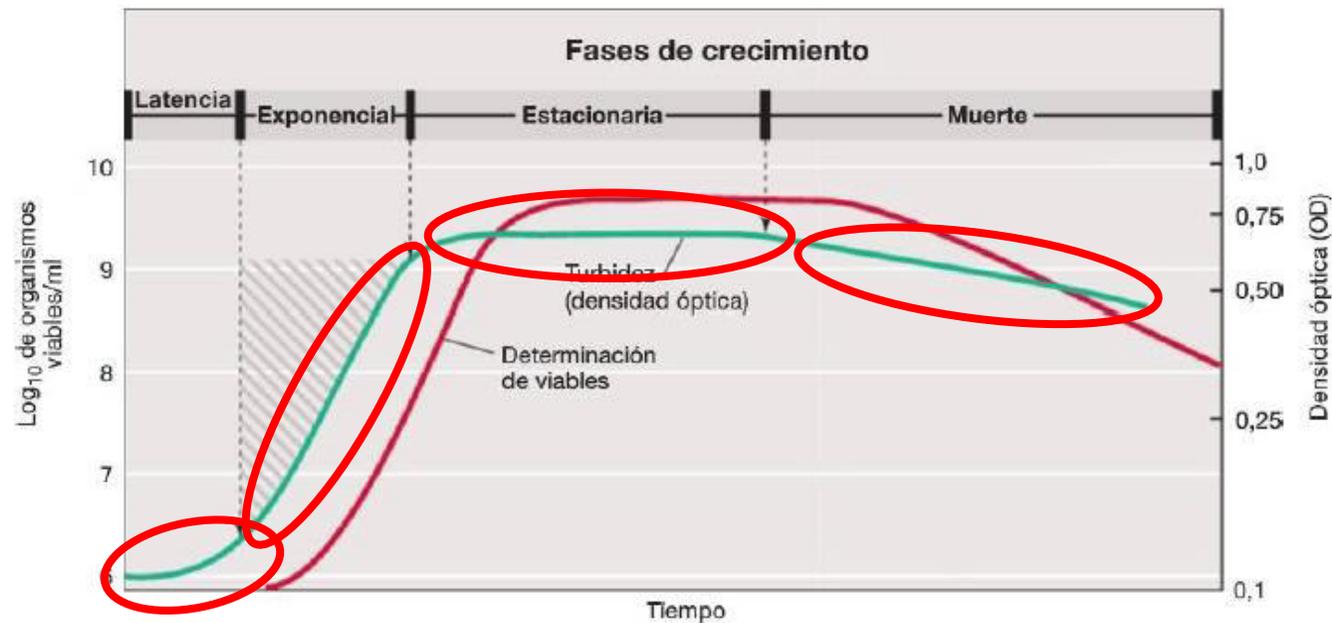
- ❖ Una característica del crecimiento exponencial es que el aumento del número de células es inicialmente lento pero se incrementa cada vez más con el tiempo.
- ❖ Esto determina que en las últimas etapas el aumento del número de células sea realmente explosivo.
- ❖ Un microorganismo que se duplica cada 30 min, durante los primeros 30 min de crecimiento la tasa de producción de células es de 1 célula cada 30 min.
- ❖ Entre 4 y 4,5 horas de crecimiento, la tasa de producción de células es considerablemente mayor: 256 células por c/30 min, y entre 5,5 y 6 horas de crecimiento se producen 2048 células c/30 min.



CICLO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO



- ❖ En un sistema cerrado o con medio no renovado, también llamado cultivo MONOFÁSICO o en batch, el crecimiento exponencial de una población no puede continuar indefinidamente y se obtiene una típica curva de crecimiento.
- ❖ Esta curva de crecimiento describe un ciclo completo de crecimiento y puede dividirse en distintas fases
- ❖ La duración de cada fase y la tasa de crecimiento microbiano en la fase exponencial dependen de la especie y de las condiciones del medio.





FASE LAG, DE LATENCIA O DE ADAPTACION



- ❖ 1ra Fase, en la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo).
- ❖ NO hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN.
- ❖ Para que ocurra crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener un equipamiento enzimático completo que permita la síntesis de los metabolitos esenciales que no están presentes en el medio y al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas.
- ❖ El tiempo para comenzar el crecimiento puede ser breve o prolongado dependiendo de la historia del cultivo y de las condiciones de crecimiento.



También se observa esta fase cuando se transfiere una población de un medio rico a otro medio más pobre.

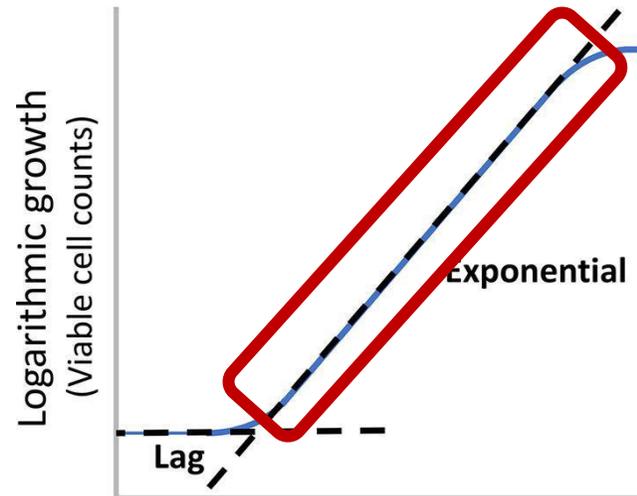


- ❖ Si un cultivo **EXPONENCIAL** se inocula en el mismo medio y bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa retraso y el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente.
- ❖ Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase **ESTACIONARIA**) y se inocula en el mismo medio, se observa normalmente un retraso incluso aunque todas las células del inóculo sean viables, es decir, sean capaces de reproducirse.
- ❖ Esto se debe con frecuencia a que las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se requiere tiempo para su resíntesis.
- ❖ También se aprecia retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente con calor, radiaciones o compuestos tóxicos, debido al tiempo requerido para recuperarse y reparar los daños.

FASE EXPONENCIAL O LOGARITMICA



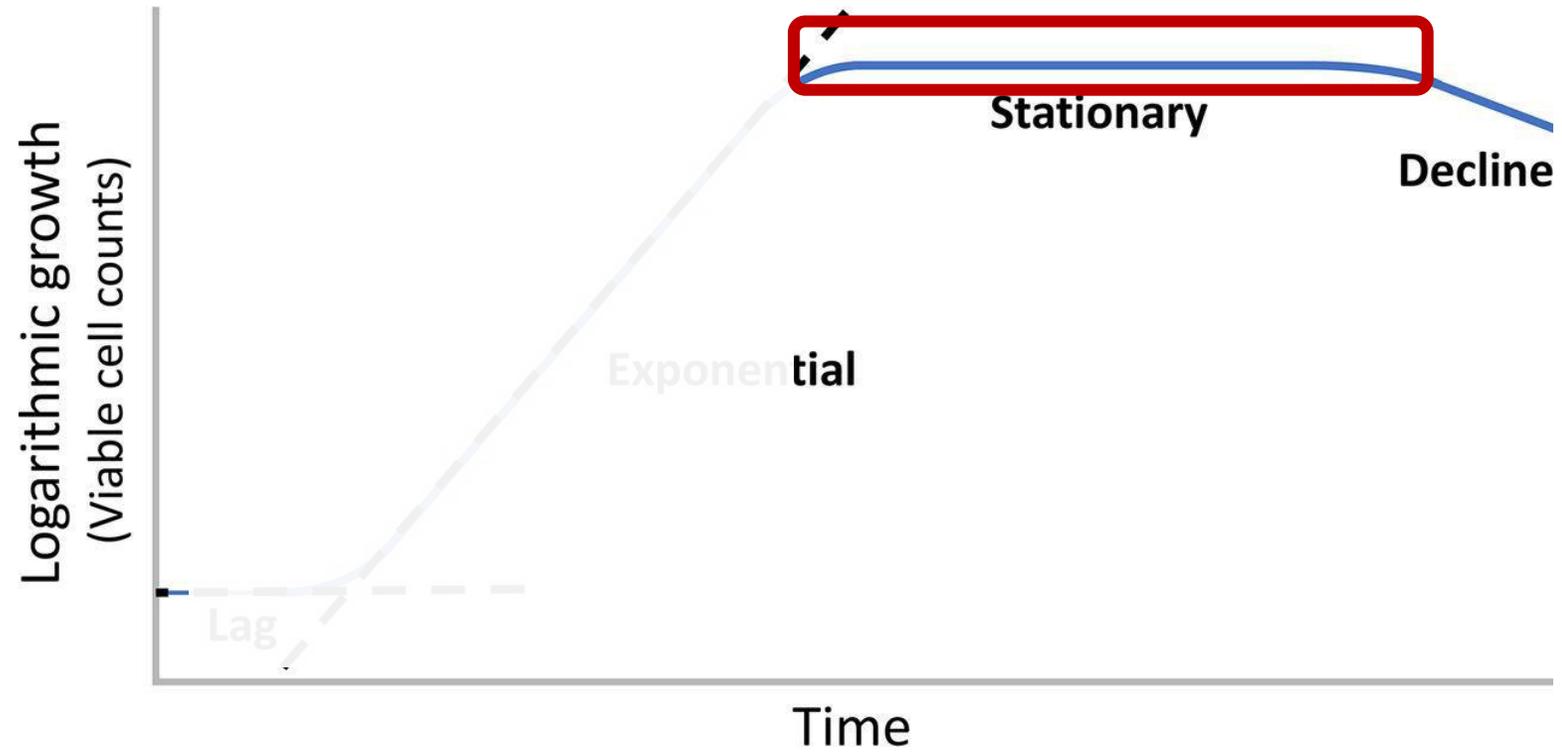
- ❖ Fase en la que cada célula se divide para formar 2, cada una de las cuales va a formar otras 2, y así sucesivamente durante un período de tiempo que puede ser breve o prolongado en función de los recursos disponibles y de otros factores.
- ❖ En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y por ello las células tomadas en crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.
- ❖ La velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo.
- ❖ Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.





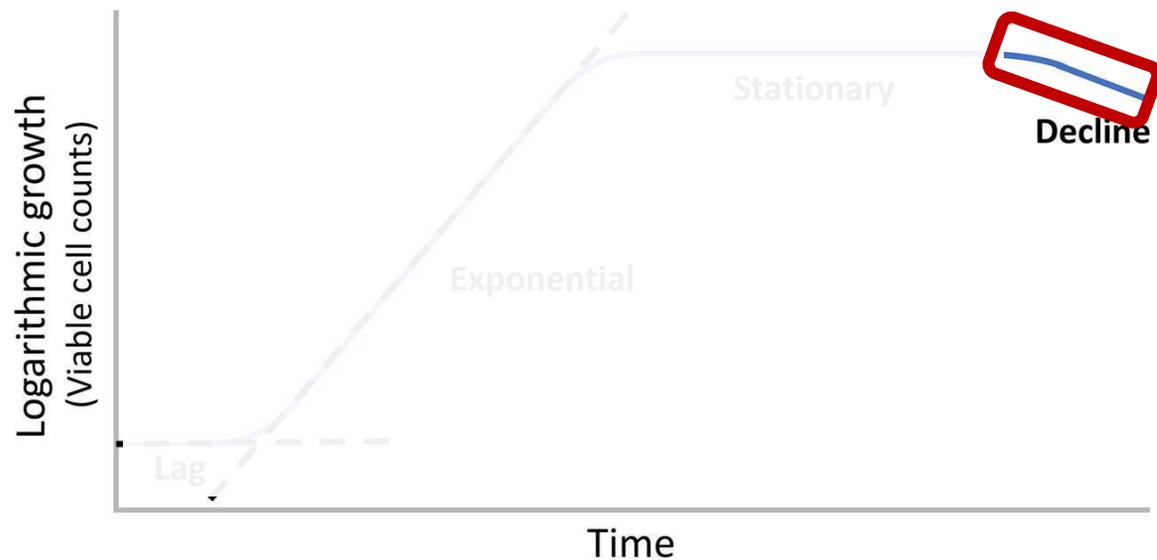
FASE ESTACIONARIA

- ❖ En un sistema de cultivo cerrado, monofásico o en batch, el crecimiento exponencial (aumento del número de microorganismos) no se puede prolongar de modo indefinido.
- ❖ NO hay aumento ni descenso neto en el número de células.
- ❖ Se puede calcular que 1 solo microorganismo con un tiempo de generación de 20 min produciría en tan solo 48 h de crecimiento exponencial continuado una población que pesaría unas 4 veces el peso de la Tierra. Esto resulta impresionante porque una sola célula microbiana pesa $\approx 10^{-12}$ g.
- ❖ Algo debe pasar mucho antes para limitar el crecimiento de la población.
- ❖ Lo que generalmente sucede es que:
 - i. Un nutriente esencial del medio de cultivo se agota y llega a ser un factor limitante del crecimiento o
 - ii. Se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen cesar el crecimiento exponencial.
- ❖ Frecuentemente ocurren ambas cosas y, al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria.
- ❖ Aquí se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial.



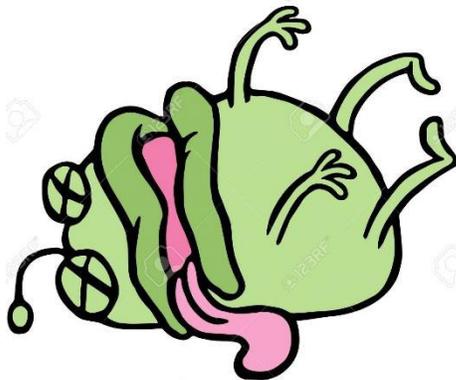
FASE DE MUERTE

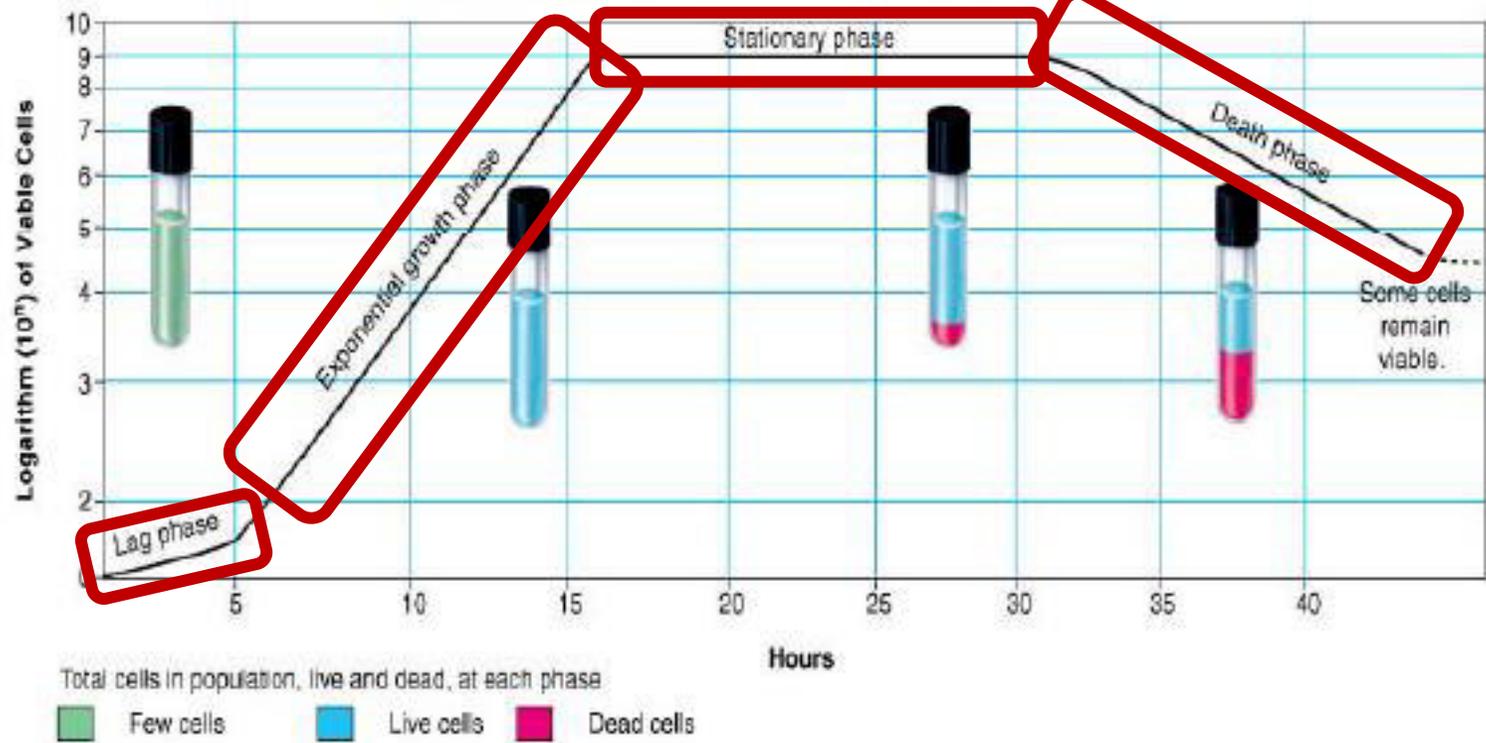
- ❖ Después de que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero finalmente mueren.
- ❖ En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular real.
- ❖ La fase de muerte del ciclo de crecimiento es también exponencial; no obstante, en la mayoría de los casos la velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial.



CONCEPTO DE MUERTE DE UN MICROORGANISMO

- ❖ Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma **IRREVERSIBLE** la capacidad de dividirse, no se produce aumento en el número de microorganismos y, por tanto, no hay crecimiento.
- ❖ Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica: liberación de toxinas.
- ❖ La capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno.
- ❖ En estos casos, **NO** podríamos considerar como muertos microorganismos que pueden **REANUDAR** su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables.





Fase Lag:

- Las células se adaptan al nuevo medio

Fase Log:

- Crecimiento exponencial
- Hay nutrientes adecuados
- El ambiente es favorable

Fase estacionaria:

- Limitación en nutrientes y acumulación de productos tóxicos que inhiben el crecimiento
- Se igualan el N° de células que crecen con el que mueren

Fase de muerte:

- La mayoría de las células comienzan a morir exponencialmente por la carencia de nutrientes



TIEMPO DE GENERACION

TIEMPO requerido para que una **CÉLULA** se **DIVIDA** o una **POBLACIÓN** se **DUPLIQUE**

❖ En un cultivo creciendo exponencialmente hay una relación directa entre el número de células presentes en el momento inicial (N_0) y en un momento determinado del crecimiento

$$N = N_0 \times 2^n$$

N = número final de células y n = número de generaciones

❖ El tiempo de generación “ g ” de la población celular se calcula como:

$$g = t/n$$

t = horas o minutos transcurridos

❖ Los tiempos de generación son usados para ensayar efectos positivos o efectos negativos



NATURALEZA Y EXPRESIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO

- ❖ Una célula crece progresivamente y se divide en 2 células iguales.
- ❖ Conociendo que se tiene un número inicial de células N_0 y queremos averiguar el número final de células N la duplicación celular es la siguiente:

$$N_1 = 2N_0$$

↗ Número de células que se otienen despues de dividirse
 ↘ Número de células que se dividen

Si la célula que se duplicó se vuelve a duplicar tenemos que:

$$N_2 = 2 \times 2N_0$$

$$N_2 = 2^2N_0$$

Si la duplicación celular ocurre en potencias de 2 la recurrencia se da de la siguiente manera:

$$N_3 = 2^3N_0$$

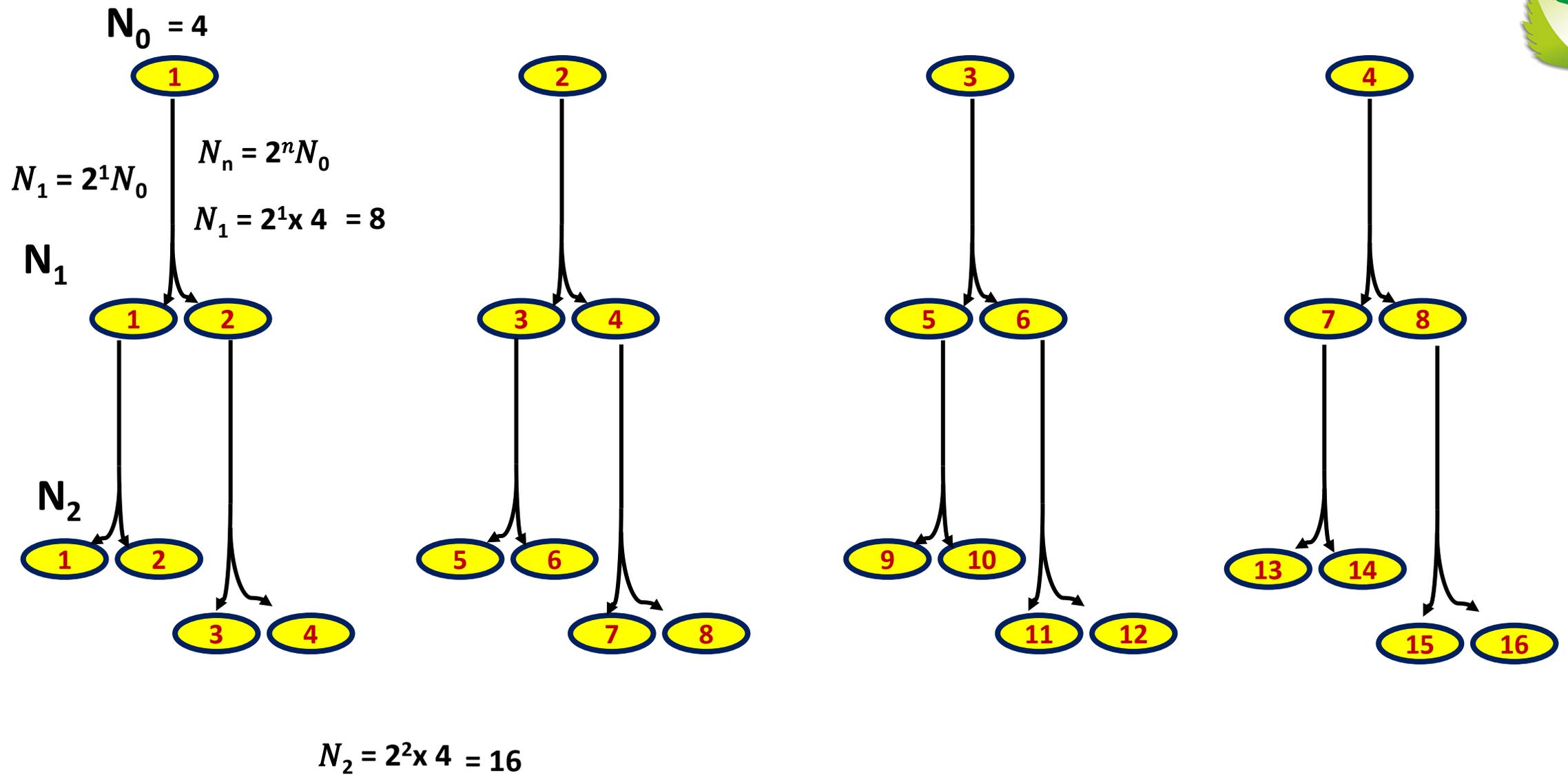
$$N_4 = 2^4N_0$$

$$\vdots$$

$$N_n = 2^nN_0$$

La última ecuación es el número de células finales que se obtienen después de n divisiones celulares.

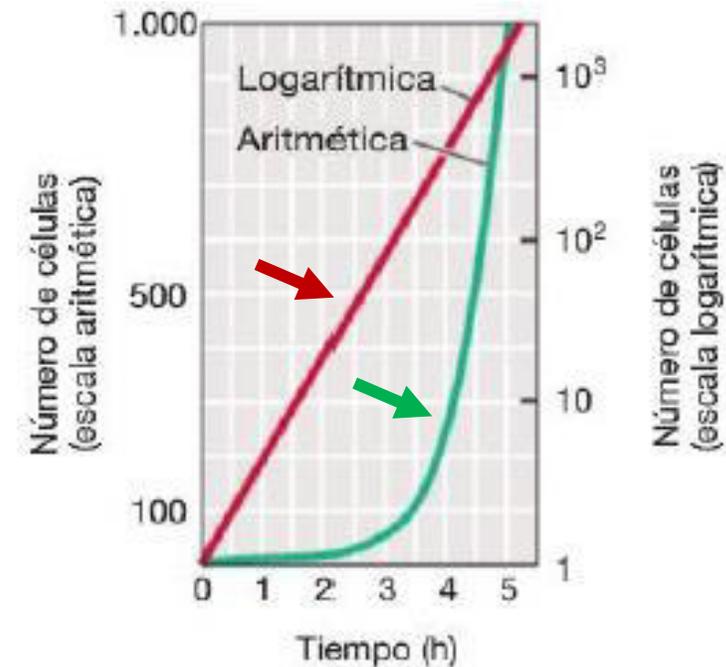
$N_0=4$	$N_1 = 2^1 \times 4$	$N_2 = 2^2 \times 4$	$N_3 = 2^3 \times 4$
	$N_1 = 8$	$N_2 = 16$	$N_3 = 32$



CRECIMIENTO EXPONENCIAL

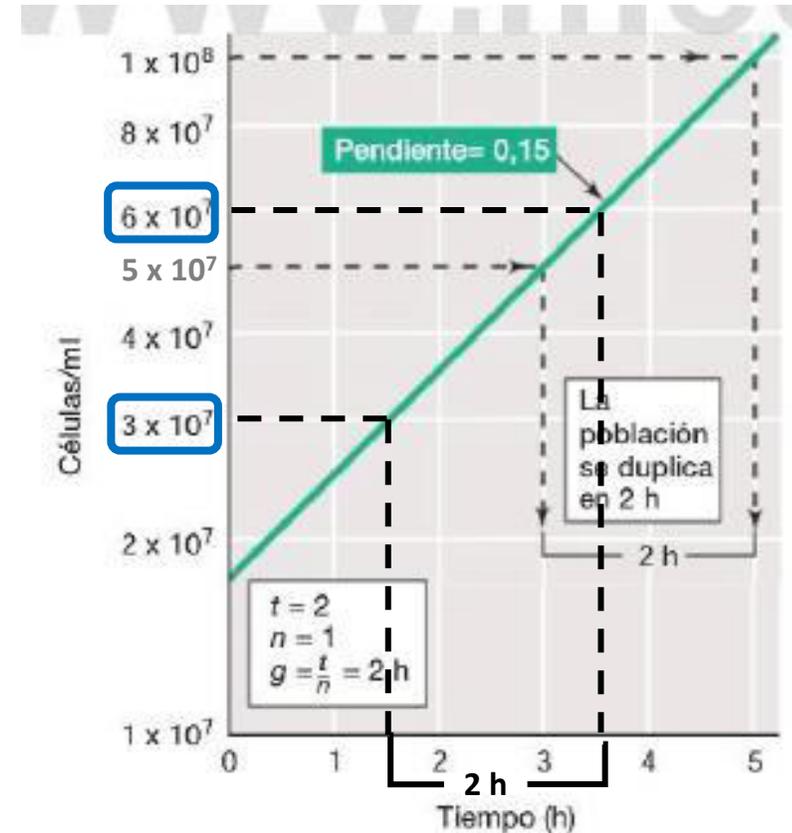
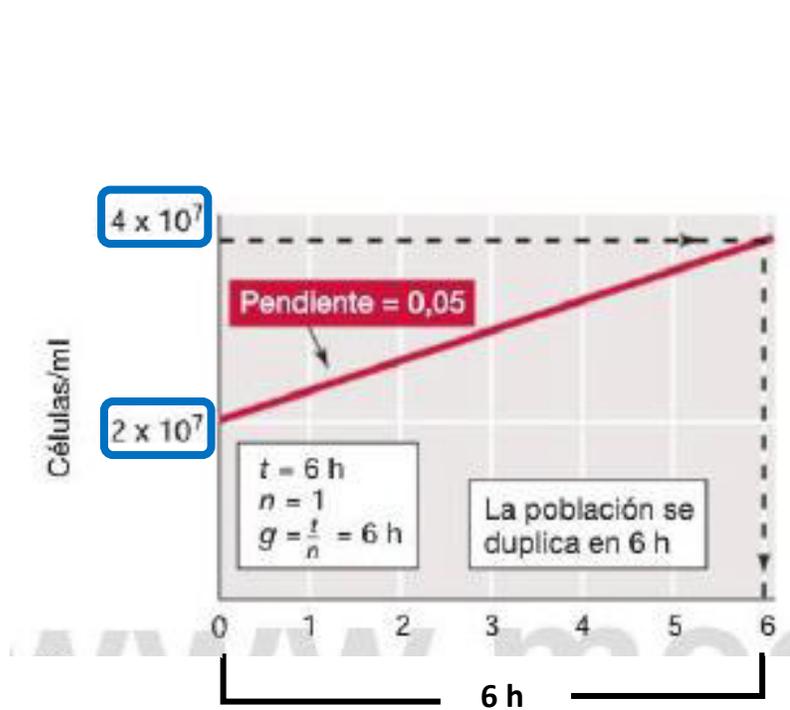
Crecimiento en el que en cada período fijo de tiempo se duplica el número de células

- ❖ Cuando en un sistema de coordenadas se representa aritméticamente el número de células en función del tiempo transcurrido, se obtiene una curva cuya pendiente aumenta constantemente.
- ❖ Si representamos el número de células en una escala logarítmica (\log_{10}) y el tiempo en una escala aritmética (resultando una gráfica semilogarítmica) obtenemos una línea recta.



Crecimiento iniciado con una sola célula que tiene un tiempo de generación de 30 min.

- ❖ Esta función lineal es un indicador inmediato de que las células están creciendo exponencialmente: la población celular se duplica en un intervalo que es constante.
- ❖ Las gráficas semilogarítmicas son además adecuadas y simples de usar para determinar tiempos de generación a partir de una serie de resultados.
- ❖ El tiempo de generación puede deducirse directamente de este tipo de representaciones.





VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO MICROBIANO



Población que se duplica cada 30 minutos

$$N_n = 2^n N_0 \quad N_0=1 \quad N_n = 2^n \times 1$$

Tiempo (h)	Generación	Número total de células	Tiempo (h)	Generación	Número total de células
0	0	1	4	8	256 (2^8)
0,5	1	2	4,5	9	512 (2^9)
1	2	4	5	10	1.024 (2^{10})
1,5	3	8	5,5	11	2.048 (2^{11})
2	4	16	6	12	4.096 (2^{12})
2,5	5	32	-	-	-
3	6	64	9,5	19	524.288 (2^{19})
3,5	7	128	10	20	1.048.576 (2^{20})



El cultivo comienza con 1 célula con un tiempo de generación de 20 min

EJEMPLO DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL				
Tiempo (min)	Nº de divisiones	2ⁿ	N	Log N
0	0	2 ⁰	1	0,0
20	1	2 ¹	2	0,301
40	2	2 ²	4	0,602
60	3	2 ³	8	0,903
80	4	2 ⁴	16	1,204
100	5	2 ⁵	32	1,505
120	6	2 ⁶	64	1,806
140	7	2 ⁷	128	2,107

El incremento en Nº de células será exponencial o logarítmico igual a 2ⁿ

$$N=N_0 2^n$$



- ❖ Si partimos de N células (en microbiología los estudios se realizan con poblaciones), a un tiempo determinado (T_a) tenemos un número de células determinadas (N_a).
- ❖ En la primera generación se duplicará el número de células ($2N_a$) y así sucesivamente de tal manera que al cabo de un tiempo determinado T_n el número de células determinadas será N_b ($N_b = 2^n N_a$) donde n es el número de generaciones transcurridas desde T_a hasta T_n .
- ❖ En esta fórmula ($N_n = 2^n N_a$) 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.

T_a -----> N_a

1 generación -----> $2^1 N_a = 2N_a$

2 generaciones -----> $2^2 N_a = 4N_a$

3 generaciones -----> $2^3 N_a = 8N_a$

4 generaciones -----> $2^4 N_a = 16N_a$

5 generaciones -----> $2^5 N_a = 32N_a$

n generaciones (T_n) -----> $N_n = 2^n N_a$



TIEMPO DE DUPLICACIÓN CELULAR MODELADO MATEMÁTICO



- ❖ Es el tiempo en que una célula se duplica (20 min a 20 h).
- ❖ Para obtener el tiempo de duplicación como modelo matemático usamos la ecuación diferencial de crecimiento celular:

$$dx/dt = \mu x$$

Resolviendo la ecuación diferencial por el método de variables separables tenemos lo siguiente:

$$\int dx/x = \mu \int dt$$

Queda como:

$$\ln x = \mu t + c$$

Rearreglando y usando antilogaritmos: $x = ce^{\mu t}$

Evaluando la condición inicial:

$$\text{A } t = 0; x = x_0$$

Se tiene:

$$x = x_0 e^{\mu t}$$



Al inverso del tiempo de generación se le denomina velocidad de crecimiento (K) y sus dimensiones son generaciones/hora.

$$K = 1/g$$

Podemos calcular el valor de μ_{max} (velocidad máxima) de crecimiento para un microorganismo y un sustrato dado.

Para ello se realizan curvas de crecimiento con concentraciones crecientes de sustrato y se determinan los valores de μ para cada concentración estudiada.

El parámetro μ es la velocidad específica de crecimiento celular y es la relación de crecimiento de la célula en función de los nutrientes del medio.

siendo, K_s la constante de saturación para ese sustrato e igual a la concentración de sustrato para la cual $\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$.

Esta variable la podemos obtener por medio de la ecuación de Monod:

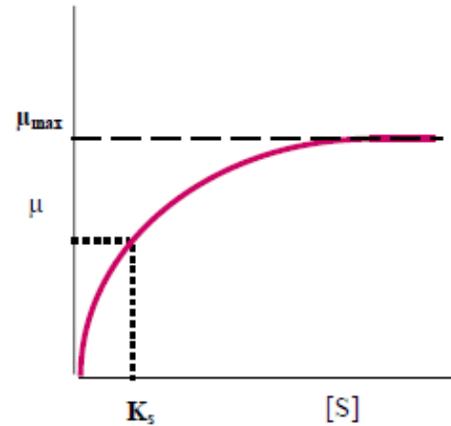
$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_S + S}$$

S: concentración del sustrato limitante

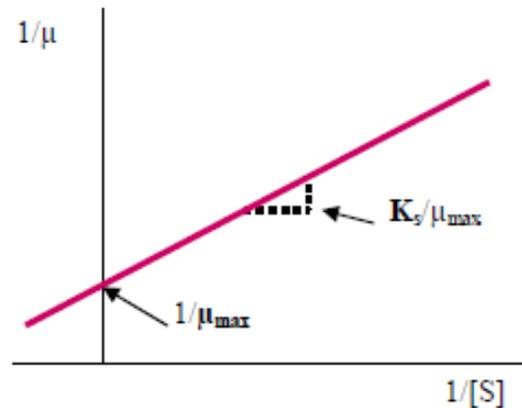
μ_{max} : constante de velocidad máxima de crecimiento

k_S : constante de velocidad de crecimiento

Quando nos piden calcular μ_{\max} , podemos hacerlo a partir de la representación gráfica de los valores de m obtenidos cuando el microorganismo crece con diferentes concentraciones de sustrato, si bien, podemos obtener este valor a partir de la recta que la relaciona $1/\mu$ vs $1/S$.



$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$



$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S}$$



$$N_n = 2^n N_a$$

$$\lg N_n = n \lg 2 + \lg N_a$$

$$n = \frac{\lg N_n - \lg N_a}{\lg 2}$$

$$n = \frac{\lg N_n / N_a}{\lg 2}$$

$$n = 3,3 \lg \frac{N_n}{N_a}$$

$$G = \frac{t}{3,3 \lg N_n / N_a}$$



CRECIMIENTO EXPONENCIAL: EXPRESIÓN MATEMÁTICA

μ = constante de crecimiento instantáneo o de velocidad de crecimiento

velocidad de crecimiento:

$$\Delta N/N.t = \mu$$

COEFICIENTE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO

$$dN/dt = \mu N ; dN/N = \mu dt$$

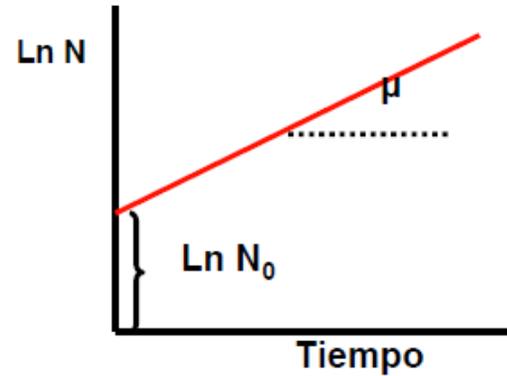
$$\int_{N_0}^N dN/N = \mu \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0)$$

$$\ln N/N_0 = \mu (t - t_0)$$

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

El incremento en el número de células es función exponencial del tiempo



$$\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 (t-t_0)$$

Siendo la constante de proporcionalidad μ , un índice de la velocidad de crecimiento que se denomina constante específica de velocidad de crecimiento (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) y tiene unidades de tiempo (h^{-1}).



TIEMPO DE GENERACIÓN g

TIEMPO QUE TARDA EN DUPLICARSE LA POBLACIÓN

Tras n generaciones: $N=N_0 2^n$ \rightarrow $N/N_0 = 2^n$

$g = t/n$	t= horas o minutos transcurridos	t= 100 min
	n= número de generaciones	n= 5
		g= 100 min/5= 20 min

El número de generaciones en (t-t₀) $n = (t-t_0)/g$

- ❖ Las ecuaciones exponenciales son difíciles de manejar gráficamente, por ello es mejor transformarlas en otras más simples.
- ❖ Para transformar una ecuación exponencial en una recta, tomamos log en los 2 términos

$N/N_0 = 2^{(t-t_0)/g}$	Velocidad de crecimiento
$\ln N/N_0 = \ln 2 \cdot (t-t_0)/g$	\uparrow
	$\ln N/N_0 = \mu (t-t_0)$
$\mu (t-t_0) = \ln 2 \cdot (t-t_0)/g$	$\mu = \ln 2/g$



$$\mu (t-t_0) = \ln 2 \cdot (t-t_0) / g$$

$$\mu = \ln 2 / g$$



$$0.693$$

INVERSAMENTE PROPORCIONAL

Velocidad de crecimiento



$$\mu = 0.693 / g$$

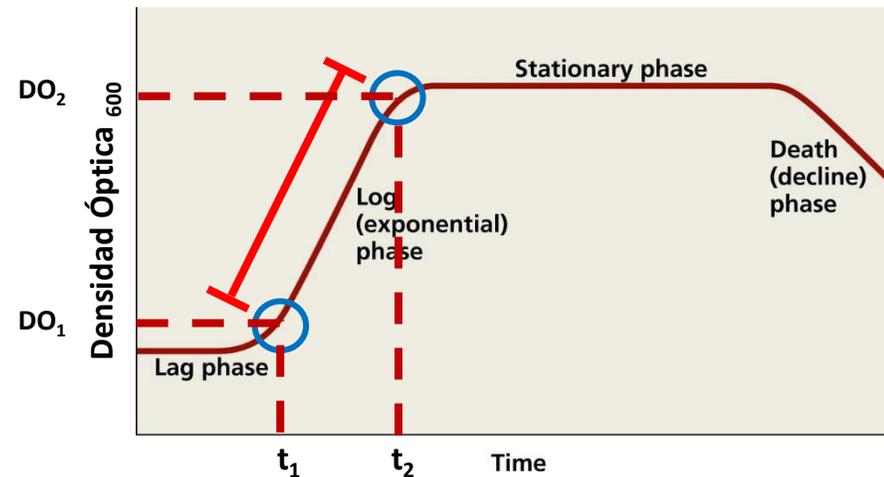
Tiempo de generación



$$g = 0.693 / \mu$$

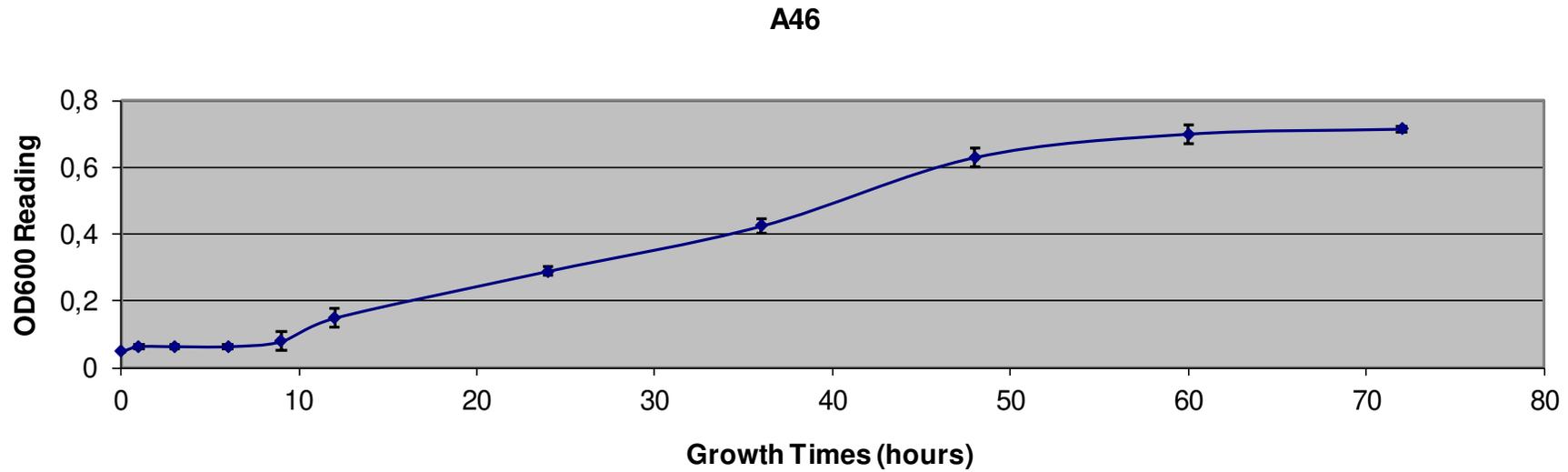
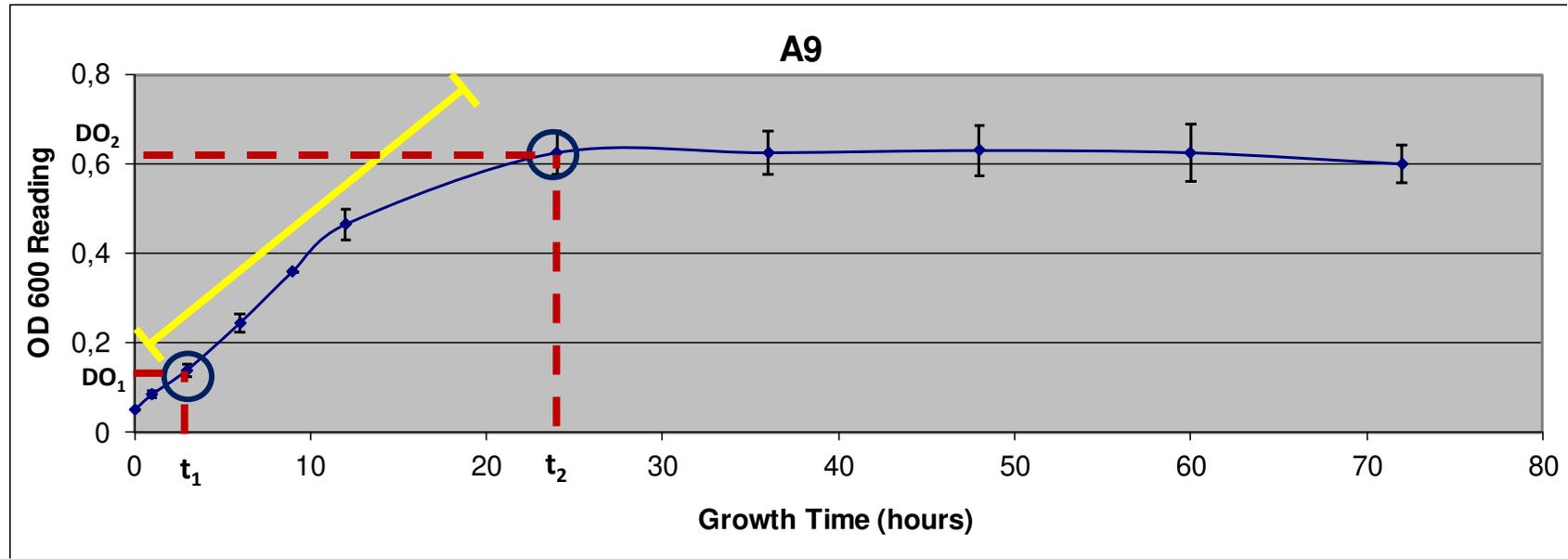
VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO EN CADA CONDICIÓN

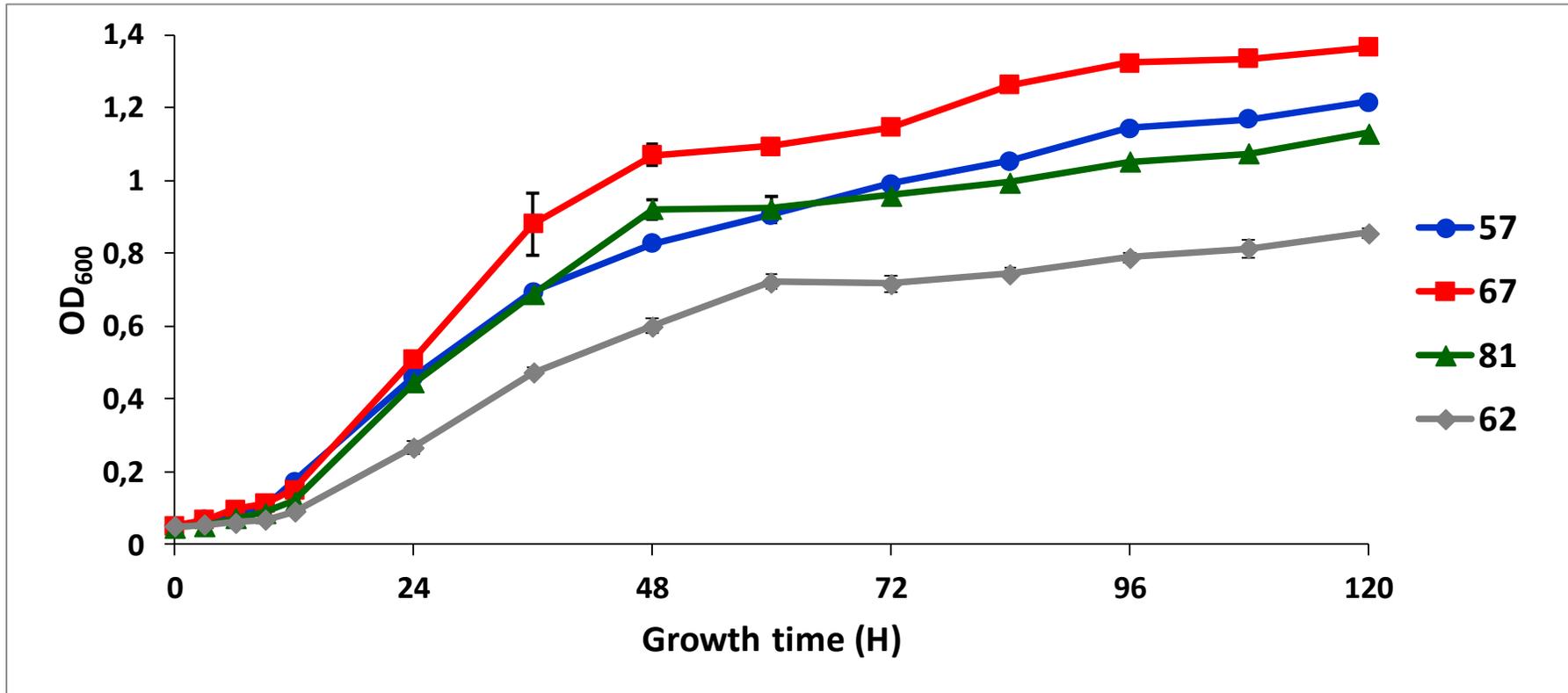
Para calcular el valor de μ_{\max} (velocidad máxima) de crecimiento para un microorganismo y un sustrato o condición dada se realizan curvas de crecimiento en diferentes condiciones (T° , ST, salinidad, pH, etc.).



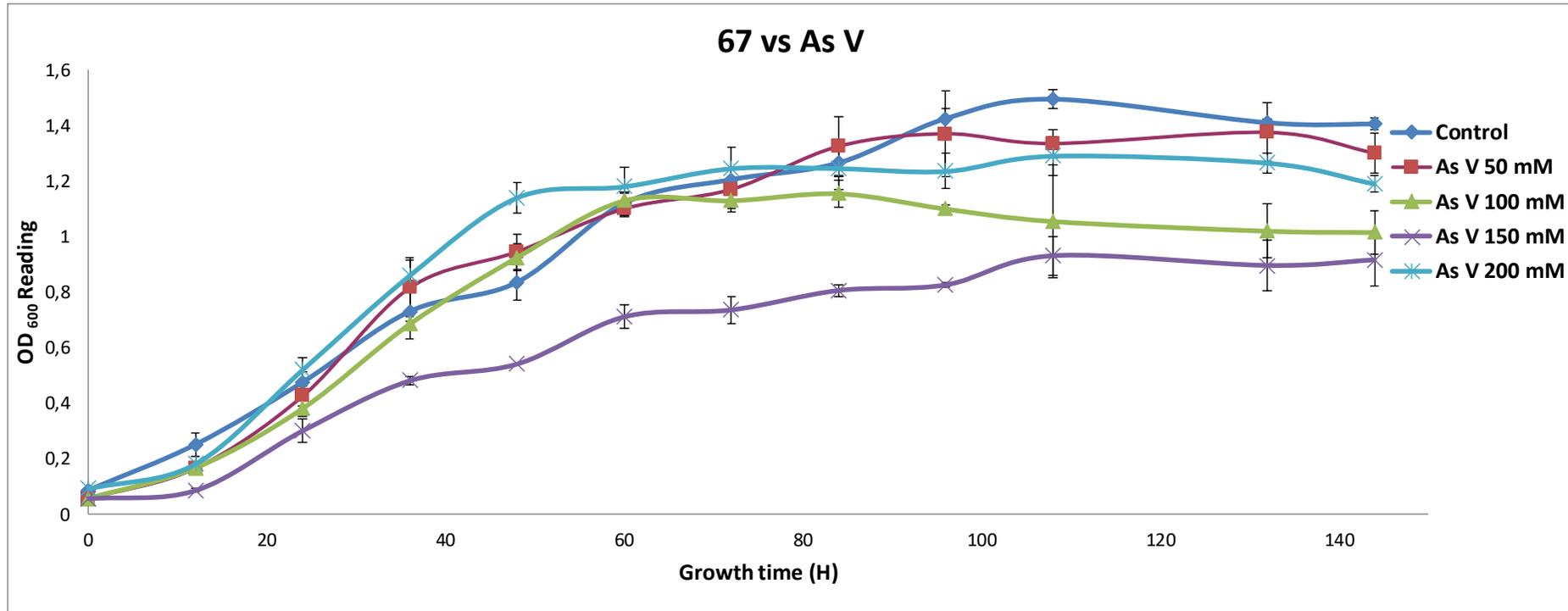
$$\mu = (\ln DO_{600} t_2 - \ln DO_{600} t_1) / t_2 - t_1 \quad t_2 > t_1$$

- ❖ Tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2) son los extremos de la fase exponencial en la curva de crecimiento.
- ❖ $\ln DO_{600} t_2$ y $\ln DO_{600} t_1$ = logaritmo natural de la DO_{600} al tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2) respectivamente.
- ❖ Luego se calcula el Tiempo de duplicación = $\ln 2 / \mu$.





$$\mu = (\ln DO_{600}t_2 - \ln DO_{600}t_1) / t_2 - t_1$$



Tiempo	Control					50 mM				
	DO	DS	ln	μ (hs-1)	t de duplic (hs)	DO	DS	ln	μ (hs-1)	t de duplic (hs)
0	0,085	0,00707107	-2,46510402	0,02071984	33,45331498	0,055	0,00707107	-2,90042209	0,028933643	23,95644375
12	0,25	0,04242641	-1,38629436			0,165	0,0212132	-1,80180981		
24	0,475	0,03535534	-0,74444047			0,425	0,03535534	-0,85566611		
36	0,73	0,09899495	-0,31471074			0,815	0,10606602	-0,20456717		
48	0,835	0,06363961	-0,18032355			0,945	0,06363961	-0,05657035		
60	1,12	0,04242641	0,11332869			1,1	0,02828427	0,09531018		
72	1,205	0,03535534	0,18647957			1,17	0,07071068	0,15700375		
84	1,265	0,04949747	0,23507212			1,325	0,10606602	0,28141246		
96	1,425	0,03535534	0,35417181			1,37	0,15556349	0,31481074		
108	1,495	0,03535534	0,40212621			1,335	0,04949747	0,28893129		
132	1,41	0,01414214	0,3435897			1,375	0,10606602	0,31845373		
144	1,405	0,0212132	0,3400373			1,3	0,07071068	0,26236426		

Microorganismo	Medio	Tiempo de duplicación (minutos)
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa-sales	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sacarosa-sales	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Leche	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	Medio de infusión de corazón	27-30
<i>Streptococcus lactis</i>	Medio con lactosa	48
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Manitol-sales-extracto de levadura	344-461 (6-8 h)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Medio definido	762-932 (12-15 h)
<i>Treponema pallidum</i>	Testículos de conejo	1980 (33 h)



Ejemplo:

¿Cual es el tiempo de generación de una población microbiana que incrementa de 10.000 a 10.000.000 células en 4 horas?

N_0	$10.000 = 10^4$
N	$10.000.000 = 10^7$
t	$4 \text{ h} = 240 \text{ min}$

$$N = N_0 2^n$$

$$N / N_0 = 2^n$$

$$\text{Log } N / N_0 = n \log 2$$

$$\text{Log } N / N_0 / \log 2 = n$$

$$\text{Log } 10^7 / 10^4 / \log 2 = n$$

$$\text{Log } 10^3 / \log 2 = n$$

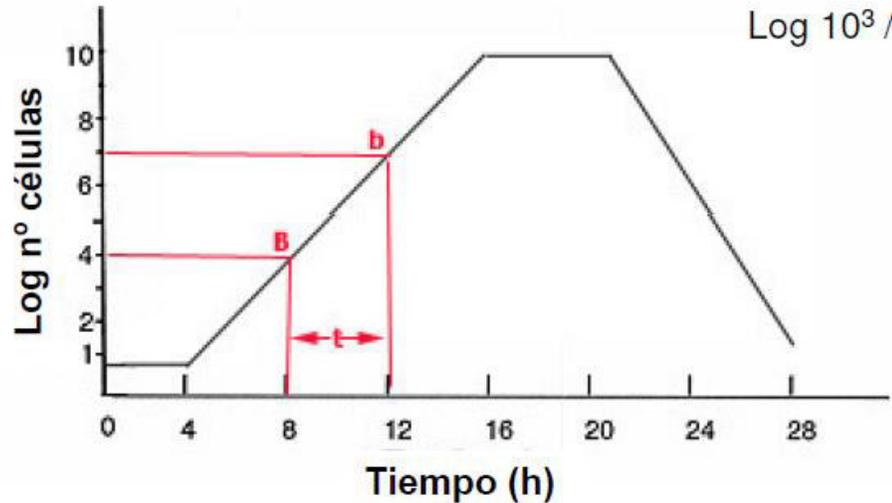
$$g = (t - t_0) / n$$

$$g = (t - t_0) / \text{Log } 10^3 / \log 2$$

$$g = 240 \text{ min. } \log 2 / \log 10^3$$

$$g = 240 \text{ min. } 0.3 / 3$$

$$g = 24 \text{ minutos}$$





En la fase estacionaria se pueden determinar 2 parámetros interesantes:



I. COSECHA MÁXIMA

Es la biomasa máxima obtenida

$$M = M_t - M_0$$

M_t : Biomasa en el tiempo t y se calcula en el momento de la fase estacionaria en el que el número de células es más elevado.

M_0 la biomasa del inóculo.

El resultado se expresa en gramos, miligramos, etc.

II. RENDIMIENTO

Es la biomasa producida por cantidad de sustrato consumida

$$\text{Biomasa producida/Sustrato consumido} = (M_t - M_0)/(S_0 - S_t)$$

S_0 cantidad de sustrato al inicio del cultivo

S_t cantidad de sustrato en el tiempo (t) en el que se obtiene el número de células más elevado.

El resultado se expresa como g de células/g de sustrato consumido

EJEMPLO DE UNA CÉLULA MICROBIANA



- Tiempo de generación (g): 20 min
- Peso: $9,5 \times 10^{-13}$ gr

- n: número de generación
- t: tiempo entre generaciones

Cual seria la población microbiana tras 48 h (2.880 min)?

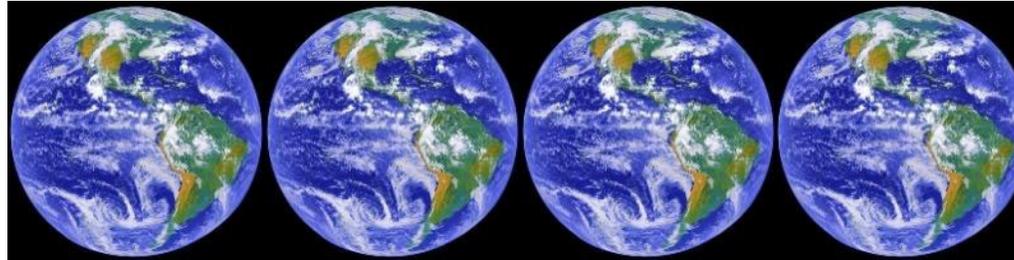
$$g = (t-t_0) / n \quad \rightarrow \quad n = (t-t_0) / g \quad \rightarrow \quad n = (2880 - 0) / 20 = 144$$

$$N = N_0 2^n \quad \rightarrow \quad N = 1 \times 2^{144} \quad \rightarrow \quad 2^{144} \text{ microorganismos}$$

$$2^{144} \text{ microorganismos} \times 9,5 \times 10^{-13} \text{ gr} \quad \rightarrow \quad 21.185.707.938.604.091.984.458.932.359.016 \text{ g}$$
$$21.185 \times 10^{24} \text{ kg}$$

Tras 48 horas la población microbiana debería pesar ≈ 4 (3,54) veces el peso de la tierra

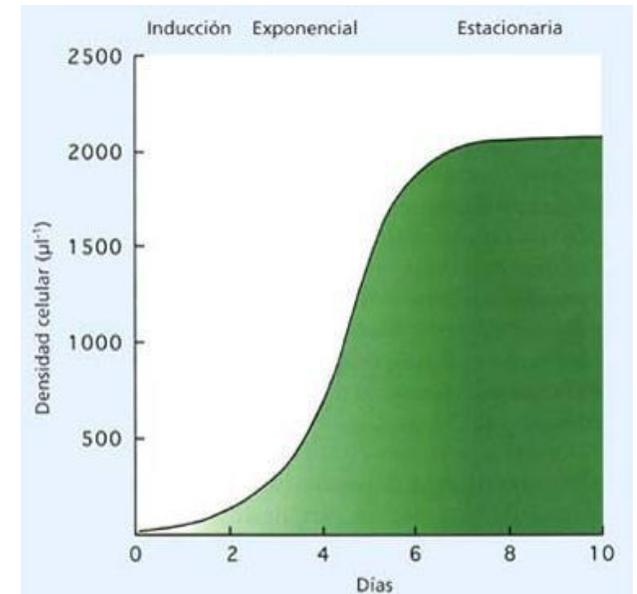
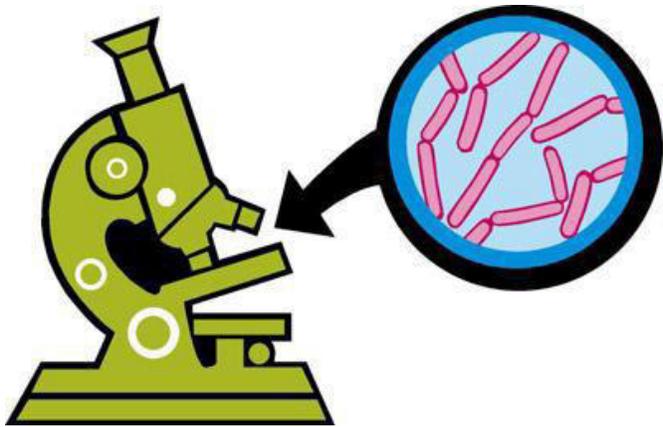
$$5.972 \times 10^{24} \text{ kg}$$



Esto NO OCURRE porque el crecimiento del cultivo entra en una FASE ESTACIONARIA, limitado por la falta de nutrientes esenciales o por la producción de productos residuales tóxicos

CONTEO DIRECTO

- ❖ Métodos para poner en evidencia la presencia por observación directa en el microscopio de los microorganismos vivos y muertos, los cuales NO se pueden distinguir.
- ❖ Presentan una gran ventaja ya que la muestra puede utilizarse tal cual, (si es líquida como leche o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento.
- ❖ Son rápidos pero se requiere contar en algunos casos con curvas de calibración.

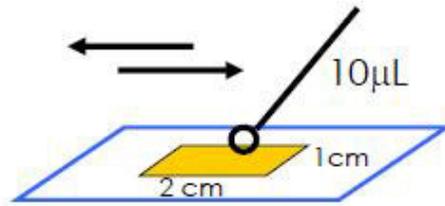


METODO DE BREED

- ❖ Método de recuento directo simple, fácil y eficaz a pesar de ser un método antiguo (1911).
- ❖ Se utiliza para el recuento de microorganismos en la leche (diagnostico microbiológico).
- ❖ Método para el "recuento de totales" (VIABLES Y NO VIABLES).
- ❖ Es un método rápido para estimar el grado de contaminación microbiano de la leche pero que no está diseñado para el conteo rutinario de la leche cruda ya que el conteo en placa es más preciso, más práctico y más barato que un conteo directo.
- ❖ Se utilizan frotis coloreados y cámaras especiales de conteo.



BREED



Teñir →



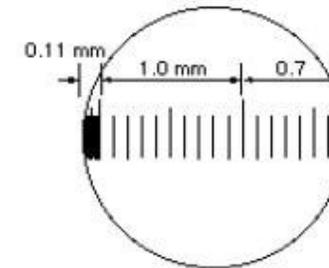
Área de la muestra =
bxh y convertir a μm^2

- Observar 10 campos.
- Contar los microorganismos de cada uno.
- Obtener el promedio.

Calcular el número de bacterias por mL

$\bar{X} \times \text{Factor} \times 100 = \text{bacterias} \text{ _____ /mL}$

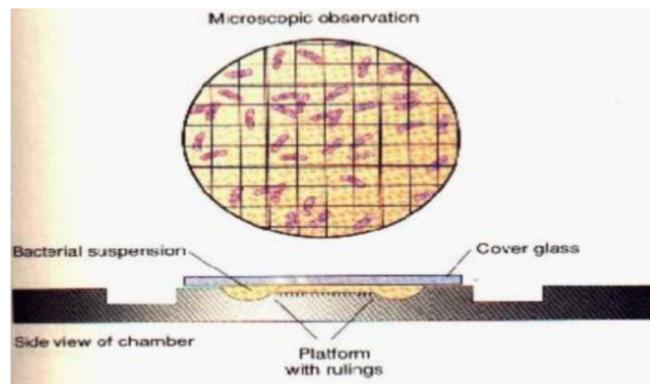
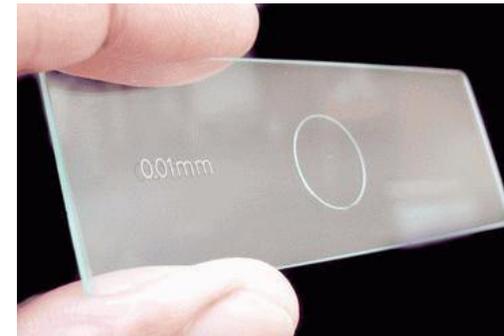
100 es la dilución inicial al tomar 0.01 mL

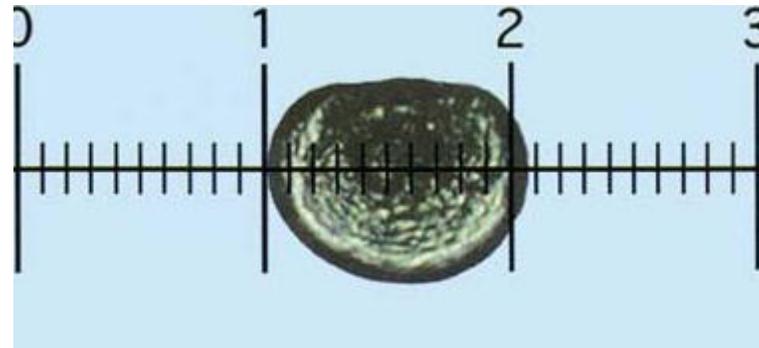
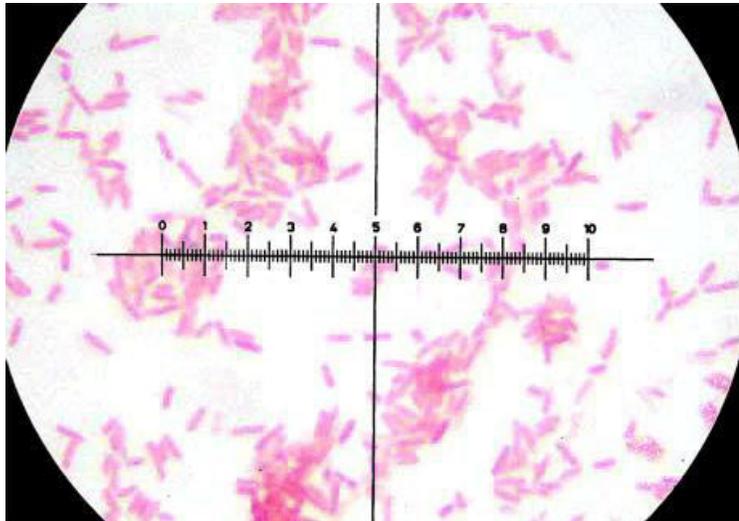
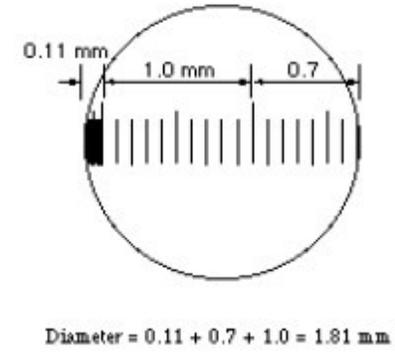
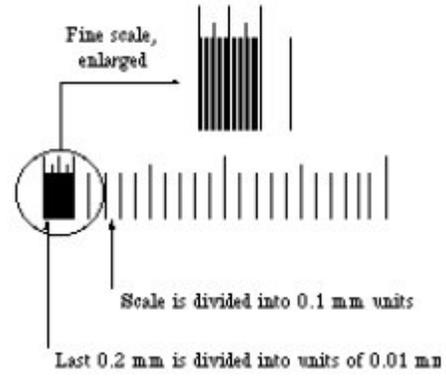
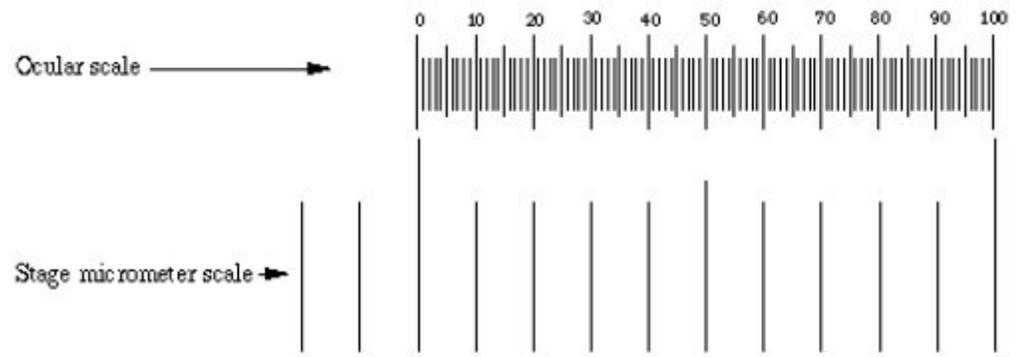


Factor = A_m / A_c

Determinar el área del campo:
 $A = \pi r^2 (\mu\text{m}^2)$

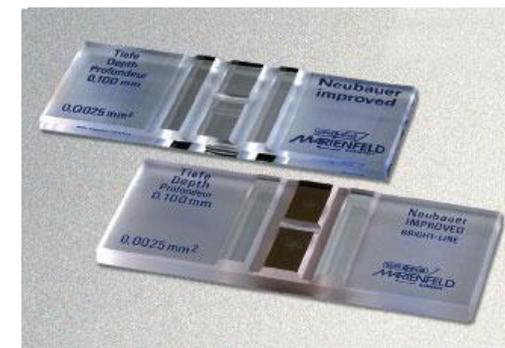
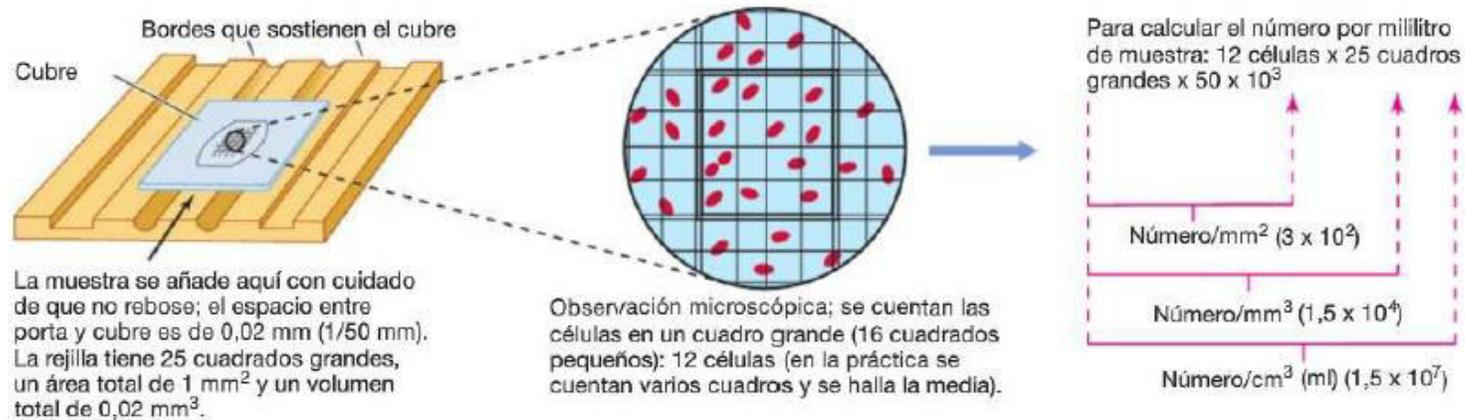
- ✓ Muestra a evaluar (directa o diluida)
- ✓ Microscopio
- ✓ Asa calibrada o micropipeta
- ✓ Objetivo micrométrico
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Colorantes de Gram u otros colorantes.



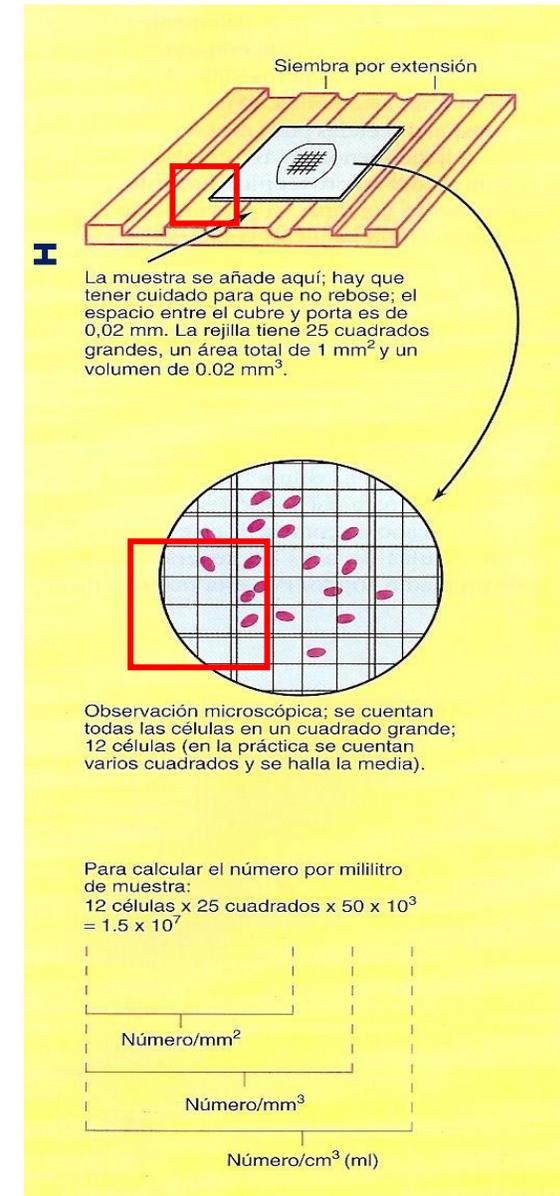


Cámaras de Petroff-Hausser y de Neubauer

- ❖ Procedimiento de conteo directo utilizando una cámara.
- ❖ Normalmente se usa un microscopio de contraste de fases para el recuento de células, evitándose la necesidad de tinción.
- ❖ La muestra dispensada entre porta y cubre se deja reposar unos minutos y se cuenta el número de células en varias celdillas (en general 16 equivalente a un cuadrado grande) y se anota el número n.



- ❖ Se puede **medir** siguiendo los cambios en el **número** de células o el **peso** de la biomasa celular.
- ❖ El **número** de células se puede medir al microscopio y se llama **recuento directo**.
- ❖ Se puede realizar en muestras secas o líquidas para las que se usan **cámaras** especiales de **recuento** donde el valor de células es convertido a células por mililitro de suspensión.
- ❖ **Cámara de Petroff Hausser:** portaobjeto especial con graduación en superficie y medidas concretas:
 - ❖ 0,02 mm de profundidad.
 - ❖ Área de 1 mm² dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes.
 - ❖ Cada cuadrado grande está subdividido a su vez en 16 cuadrados pequeños (4 x 4).
 - ❖ La muestra se distribuye en 400 celdillas = 16 x 25.



I

Siembra por extensión

La muestra se añade aquí; hay que tener cuidado para que no rebese; el espacio entre el cubre y porta es de 0,02 mm. La rejilla tiene 25 cuadrados grandes, un área total de 1 mm² y un volumen de 0.02 mm³.

Observación microscópica; se cuentan todas las células en un cuadrado grande; 12 células (en la práctica se cuentan varios cuadrados y se halla la media).

Para calcular el número por mililitro de muestra:
 $12 \text{ células} \times 25 \text{ cuadrados} \times 50 \times 10^3 = 1.5 \times 10^7$

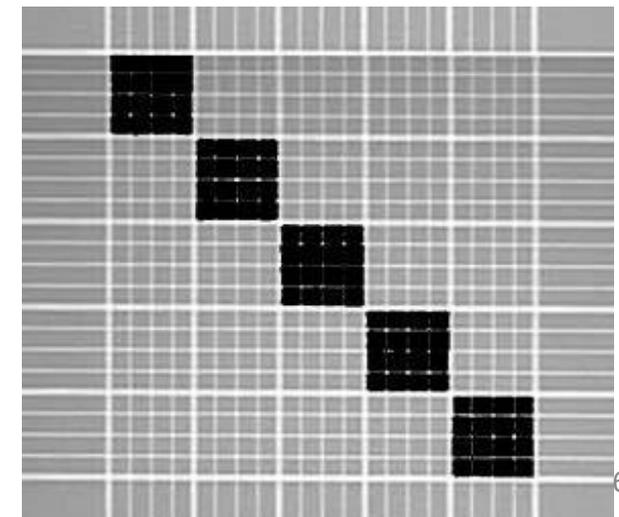
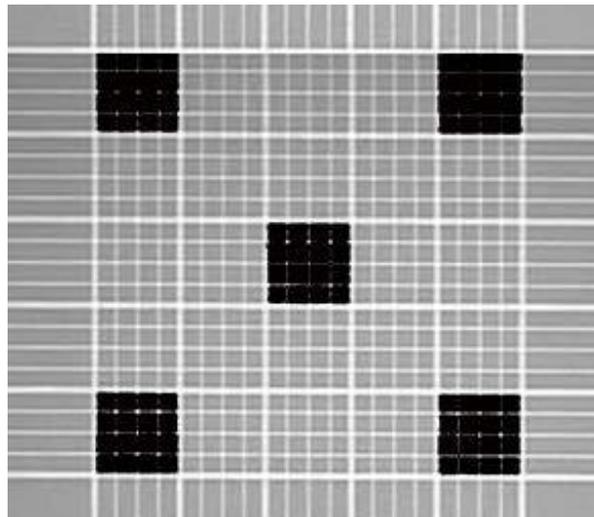
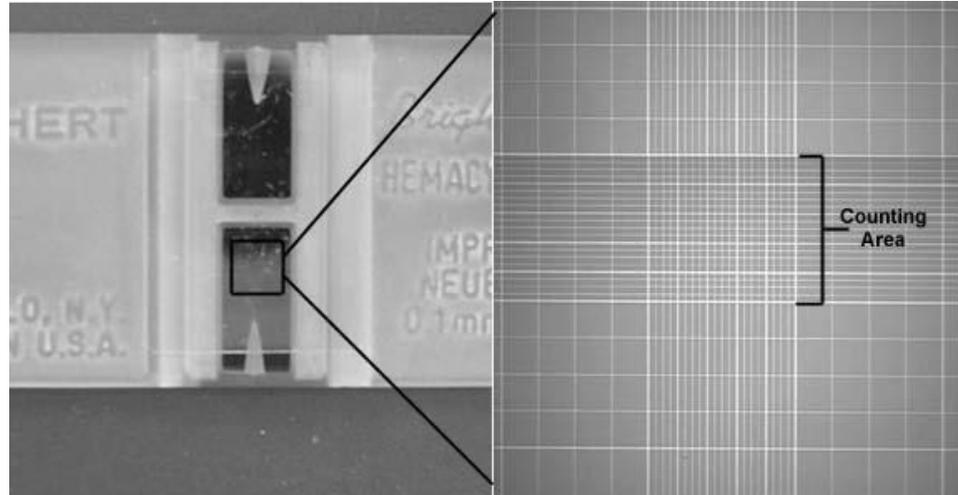
Número/mm²

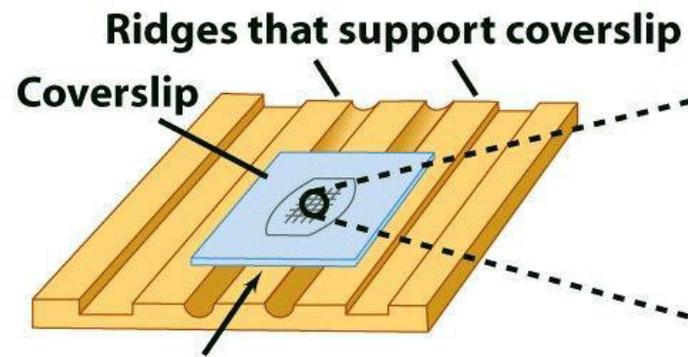
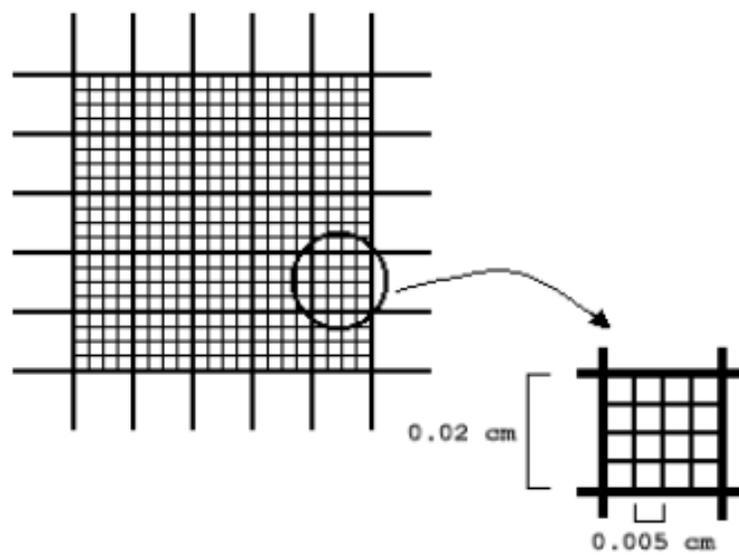
Número/mm³

Número/cm³ (ml)

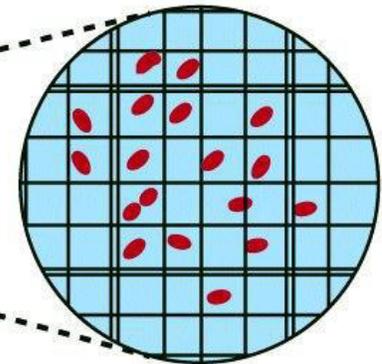
RECUENTO DIRECTO AL MICROSCOPIO

- Frotis de la muestra ó cultivo en portaobjetos
- Tinción mediante un colorante
- Observación al microscopio y recuento



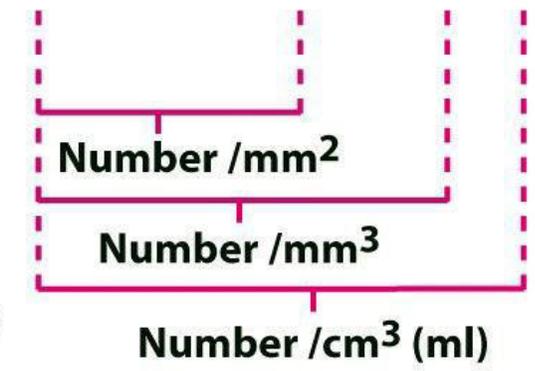


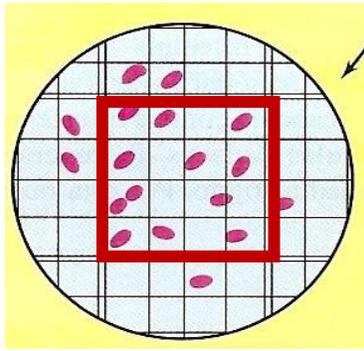
Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50}$ mm). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm² and a total volume of 0.02 mm³.



Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)

To calculate number per milliliter of sample:
 12 cells x 25 large squares
 x 50 x 10³ = 1.5 x 10⁷





- 12 células
- Se cuentan varios cuadrados.
- Se saca el promedio

Cálculo

Número por mm^2 \rightarrow 12 células x 25 cuadrados \rightarrow 300 células / mm^2

= multiplicar por 50

Número por mm^3 \rightarrow 300 células / mm^2 x $1/0,02 \text{ mm}$ \rightarrow 15.000 células / mm^3

Número por $\text{cm}^3(\text{mL})$ \rightarrow 15.000 células / mm^3 x 10^3 \rightarrow 15.000.000 células / cm^3
o mL

$10^3 \text{ mm}^3 = 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$

$1,5 \times 10^7$ células / mL

$n \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células / ml}$

LIMITACIONES



- **Es muy tedioso, no es práctico para un gran número de muestras.**
- **No distinguen células vivas de muertas.**
- **No es muy sensible, se necesitan al menos 10^6 microorganismos/mL para que sean observadas al microscopio.**
- **Las células pequeñas son difíciles de apreciar**
- **Se requiere habilidad para obtener precisión**
- **Se necesita contraste de fases cuando la muestra no está teñida.**
- **No es bueno para suspensiones poco densas, sólo sirve para suspensiones concentradas ($\geq 10 \times 10^6$ cel/mL).**



MEDIDA DEL CRECIMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS



- ❖ Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos.
- ❖ Los métodos mas utilizados son el recuento de viables en placa y el método turbidimétrico.

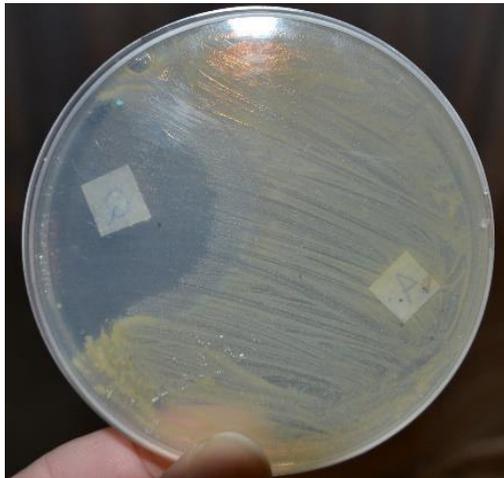
RECuento DE VIABLES:

- ❖ Consiste en la dilución de una muestra hasta que los microorganismos 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).

CRECIMIENTO MICROBIANO EN MEDIO SÓLIDO



- ❖ Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia.
- ❖ Por consiguiente, se denomina UNIDAD FORMADORA DE COLONIA (UFC) a una célula de microorganismo viva y aislada que si se encuentra en condiciones de substrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo.
- ❖ Si el número inicial de microorganismos por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un CÉSPED cuando se realizan los cultivos en placas de laboratorio.
- ❖ En el caso de microorganismos móviles (deslizantes) o en el de los hongos filamentosos que tienen un crecimiento trófico no se producen colonias aisladas sino formaciones más difusas o miceliarias.





CULTIVOS EN SISTEMAS CERRADOS SÓLIDOS



- ❖ Un medio sólido es una solución nutritiva (como el líquido), pero incorporado a un GEL, que le da consistencia.
- ❖ Los tipos de gelificantes más usados para los medios sólidos: AGAR-AGAR (o simplemente, agar) es el más usado; la gelatina (tiene el inconveniente que se licua a temperaturas relativamente bajas)
- ❖ Los medios sólidos se suelen inocular mediante asa de siembra o espátula, diseminando los microorganismos sobre su superficie libre, en placas de Petri.
- ❖ Tras la incubación a la temperatura y condiciones adecuadas, cada microorganismo o agrupación da origen, por crecimiento, a una acumulación de células, visible a simple vista, denominada COLONIA
- ❖ La DENSIDAD de cada colonia es muy ALTA (del orden de 10^7 células para una colonia de unos 5 mm).
- ❖ Se debe a que los microorganismos NO pueden dispersarse, y durante mucho tiempo este medio sólido permite un aporte continuo de nutrientes y eliminación continua de productos de desecho. Por lo tanto, se parece a un cultivo continuo, excepto que no hay drenaje de células.
- ❖ Con vistas a la DETERMINACIÓN TAXONÓMICA, se suele tomar nota de una serie de características de las colonias: tamaño, forma general y de bordes, color, consistencia, aspecto de la superficie y elevación sobre el sustrato

CONTEO DE MICROORGANISMOS VIABLES



- ❖ Una célula viable es aquella que es capaz de **DIVIDIRSE** y originar descendencia.
- ❖ En la mayoría de las situaciones éste es el tipo de células que nos interesa.
- ❖ Se determina el número de células de la muestra que es capaz de crecer, dividirse y **FORMAR COLONIAS** sobre un medio sólido adecuado.
- ❖ Estos métodos se basan en poner en evidencia la presencia de los microorganismos **VIVOS**.
- ❖ Por esta razón, la determinación de viables a menudo se llama también recuento en placa o recuento de colonias.
- ❖ El número de colonias y el número de células son **PROPORCIONALES**.
- ❖ Se emplean soluciones diluidas o diluciones de una muestra concentrada para que cada colonia formada provenga de un solo microorganismo aunque algunas agrupaciones no pueden ser separadas por las diluciones.
- ❖ Se utilizan principalmente para la cuantificación de bacterias, arqueas, levaduras y hongos filamentosos.

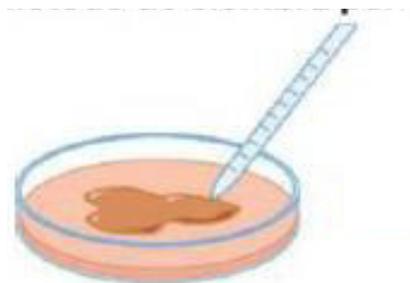


RECUESTO EN PLACA PARA VIABLES

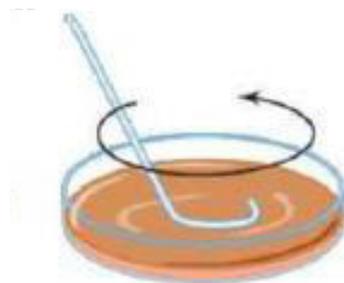


Método de extensión en placa

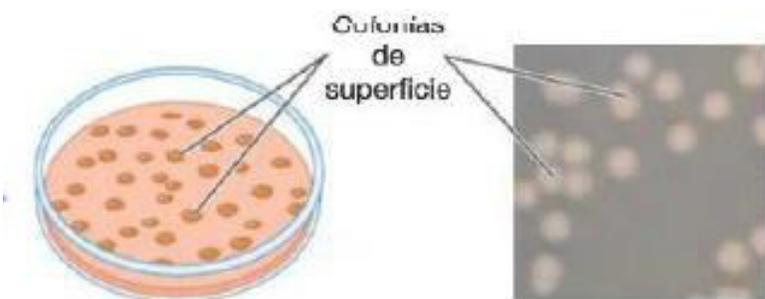
- ❖ Un volumen de cultivo diluido ($\leq 0,1$ mL) se extiende sobre la superficie de una placa con medio sólido utilizando un asa estéril de extensión.
- ❖ La placa se incuba a continuación hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número.
- ❖ Es importante que la superficie del medio esté seca de modo que el líquido de la muestra se absorba y las células queden fijadas.
- ❖ No se usan volúmenes mayores de 0,1 mL porque el exceso de líquido no se absorbe y origina problemas en el conteo al favorecer la extensión y mezcla de las colonias.



La muestra (0,1 ml o menos) se pipetea sobre la superficie de la placa con agar



La muestra se extiende uniformemente sobre la superficie del agar usando un asa de vidrio estéril

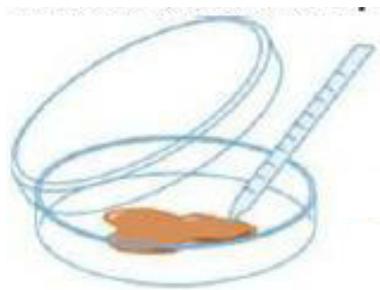


Resultado típico de la siembra por extensión

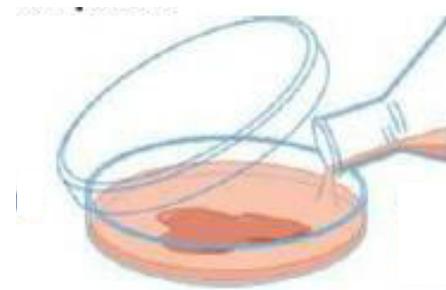
MÉTODO DEL VERTIDO EN PLACA



- ❖ Se pipetea 0,1-1 mL de cultivo en una placa de Petri estéril vacía, sobre la que se añade el medio con agar fundido y se mezcla con suaves movimientos de la placa sobre la superficie de la mesa antes de dejar solidificar.
- ❖ Como la muestra se mezcla con el medio fundido, se pueden usar volúmenes de inóculo mayores que en el método de extensión.
- ❖ El organismo debe resistir la temperatura del agar fundido (45-50°C).
- ❖ Las colonias se forman por toda la placa y no solamente por la superficie como en el método por extensión.
- ❖ La placa debe examinarse cuidadosamente para tener la seguridad de contar todas las colonias.
- ❖ Si este método se usa para enumerar células de una muestra natural, puede surgir otro problema; cualquier resto presente en la muestra debe distinguirse de las colonias microbianas reales o el recuento será erróneo.



La muestra se pipetea en la placa estéril



Se añade medio estéril y se mezcla bien con el inóculo

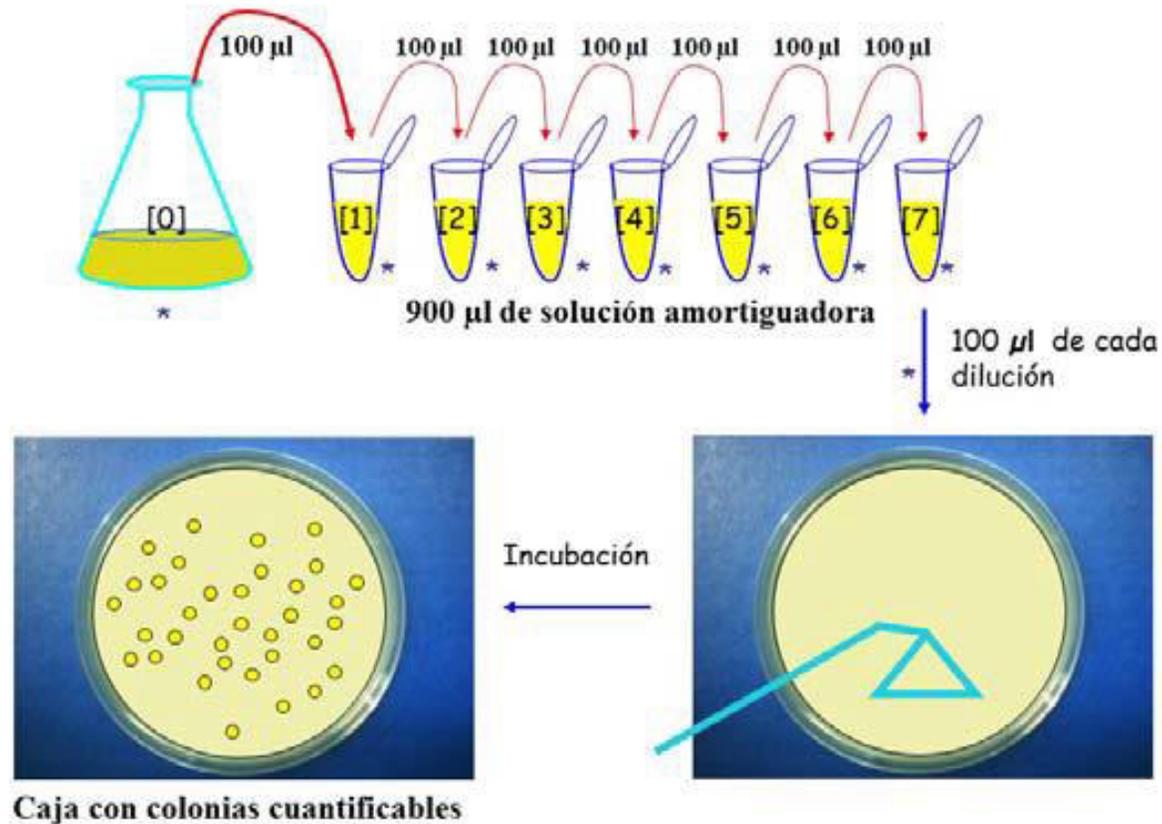


Solidificación e incubación



Resultado típico del vertido en placa

- ❖ Una ventaja del método de vaciado en placa es que podrían crecer otro tipo de microorganismos en referencia al plaqueo, ya que se permiten condiciones con bajo contenido de oxígeno para aquellas colonias que se desarrollan entre el agar del medio de selección.
- ❖ El cálculo del número de microorganismos es similar al método de plaqueo.



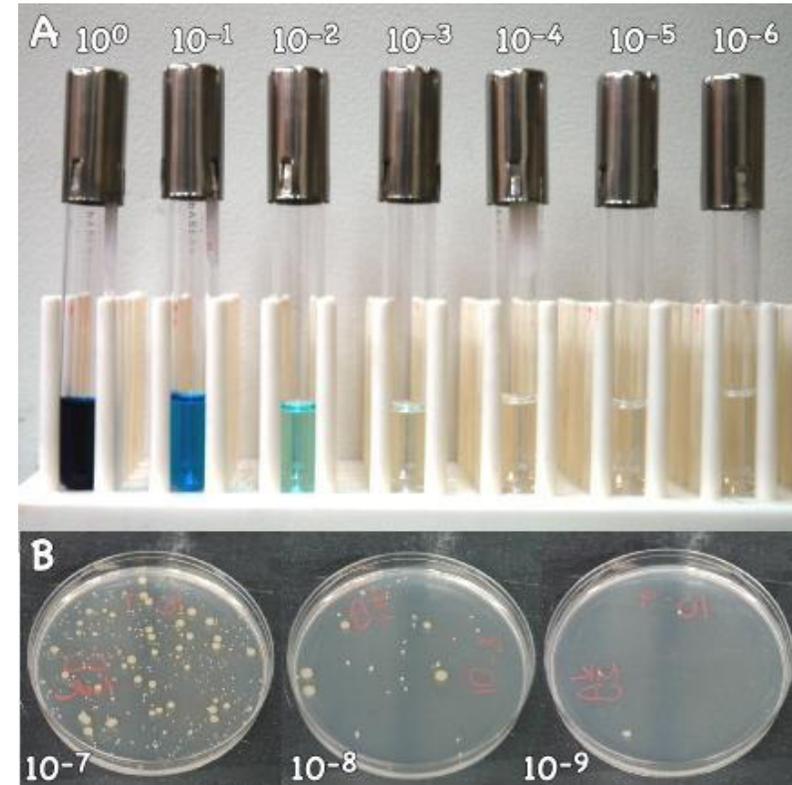
DILUCIONES Y CONTEO EN PLACA



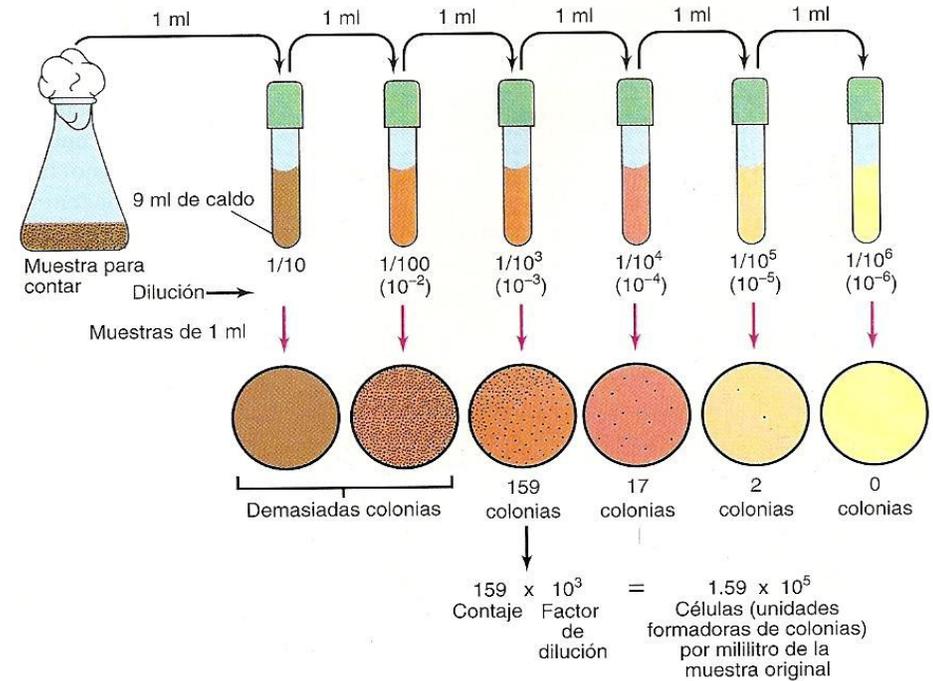
Dilución de las suspensiones celulares antes de la siembra en placa

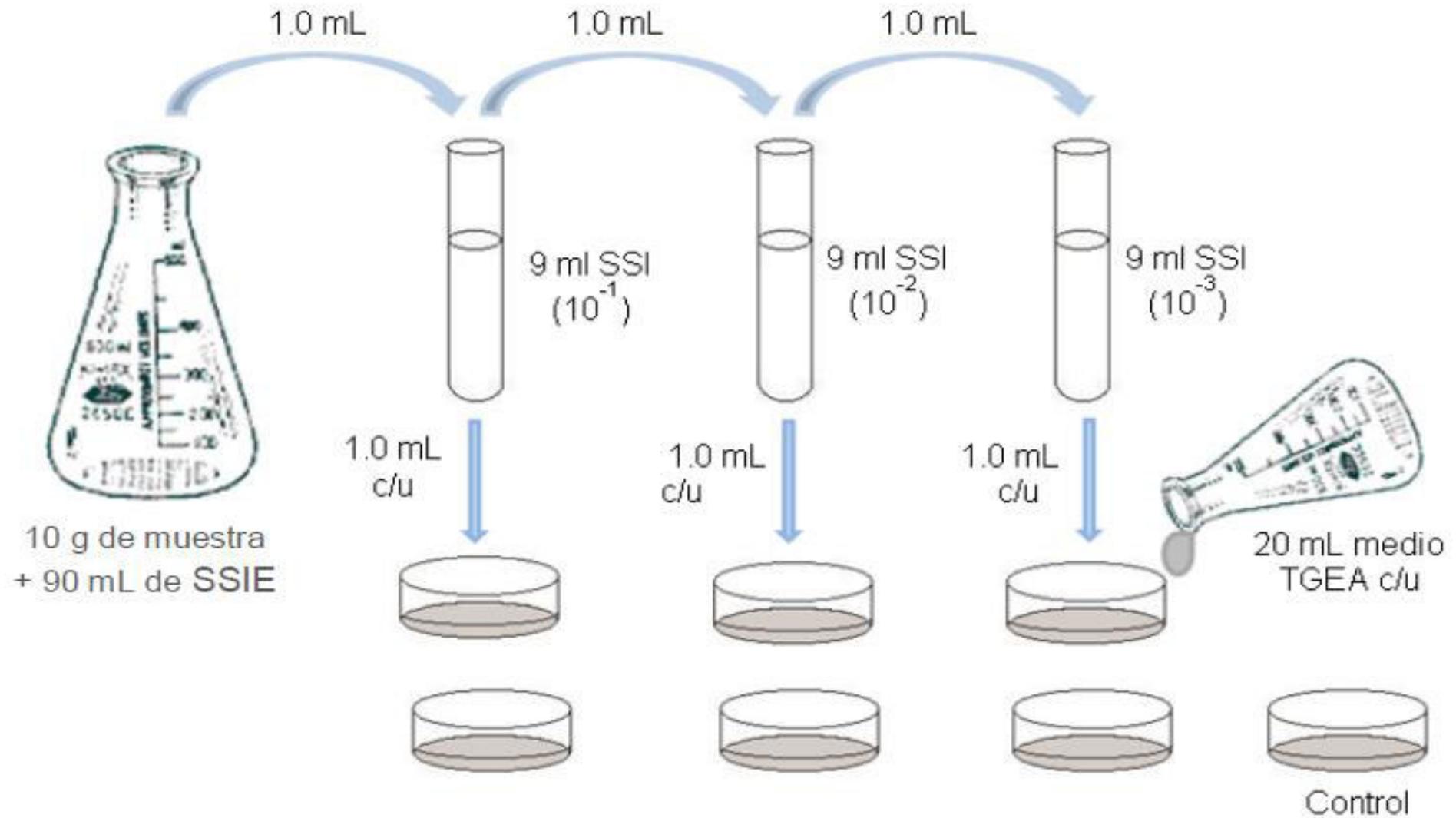
- ❖ Para obtener el número apropiado de colonias, casi siempre se diluye la muestra.
- ❖ Como raramente se conoce de antemano el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución.
- ❖ Lo más usual es realizar diluciones decimales de la muestra.
- ❖ El número de colonias que debe aparecer en las placas no sea demasiado grande ni demasiado pequeño.

- En placas muy cargadas algunas células pueden no formar colonias y algunas colonias se pueden fusionar originando estimaciones erróneas.
- También es importante que el número de colonias no sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo.

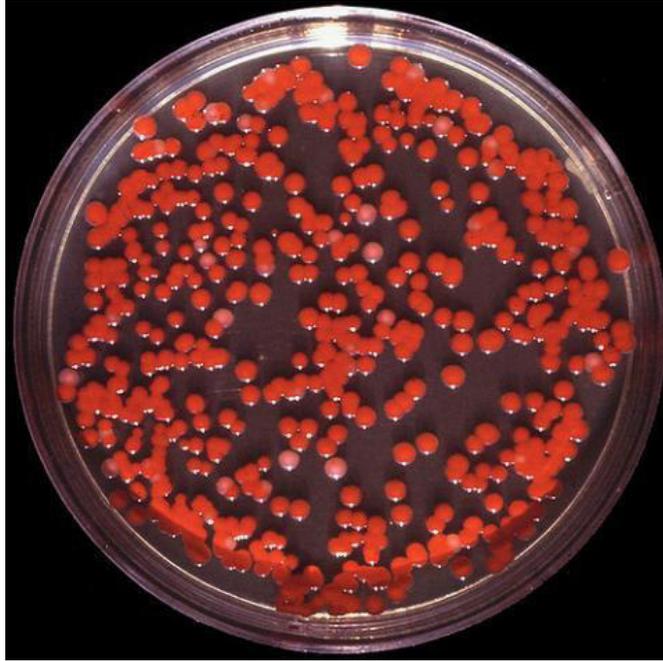


- ❖ Para hacer una dilución de 10^{-1} se mezclan 0,5 mL de la muestra con 4,5 mL de diluyente o 1 mL de la muestra con 9 mL del diluyente.
- ❖ Si se necesita una dilución de 10^{-2} , se pueden mezclar 0,5 mL de la dilución 10^{-1} con 4,5 mL de diluyente o 1 mL de la dilución 10^{-1} con 9 mL del diluyente.
- ❖ En la mayor parte de los casos se realizan tales diluciones seriadas con cultivos densos para alcanzar la dilución final deseada.
- ❖ Así, si se requiere una dilución 10^{-6} se puede lograr haciendo 3 diluciones sucesivas de 10^{-2} o 6 sucesivas de 10^{-1}

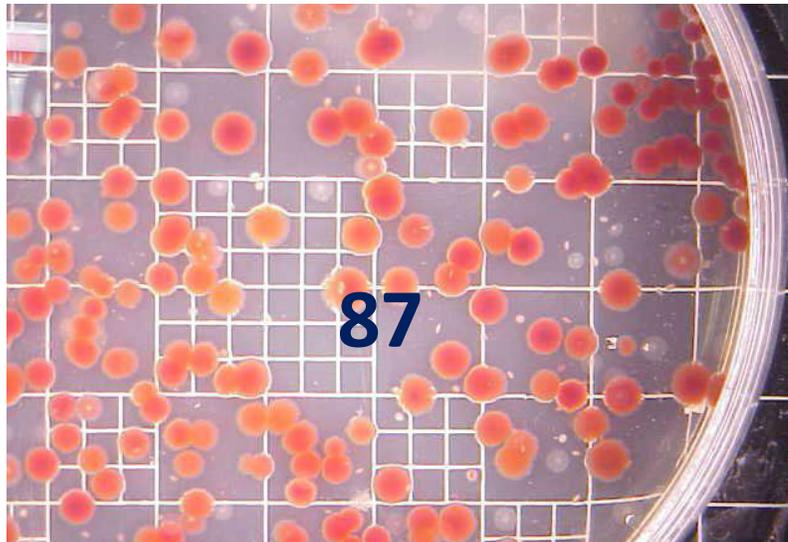
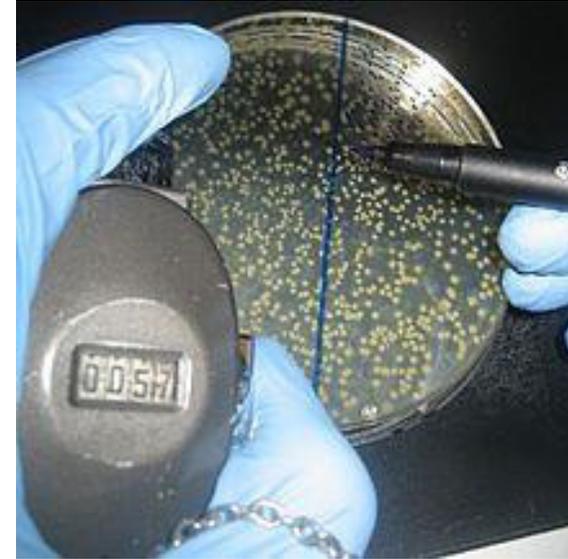




30 a 300 UFC por placa



10^{-6}



87

$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colonias} \times \text{FD/volumen inoculado}$

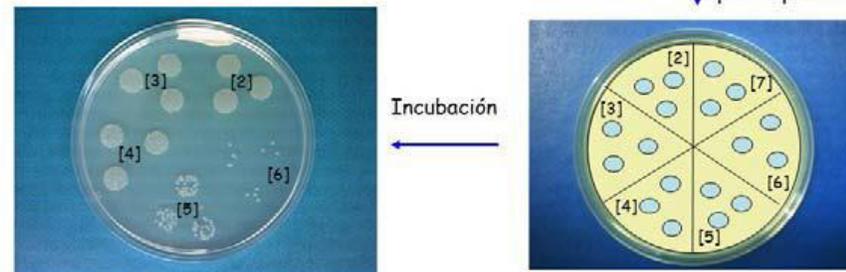
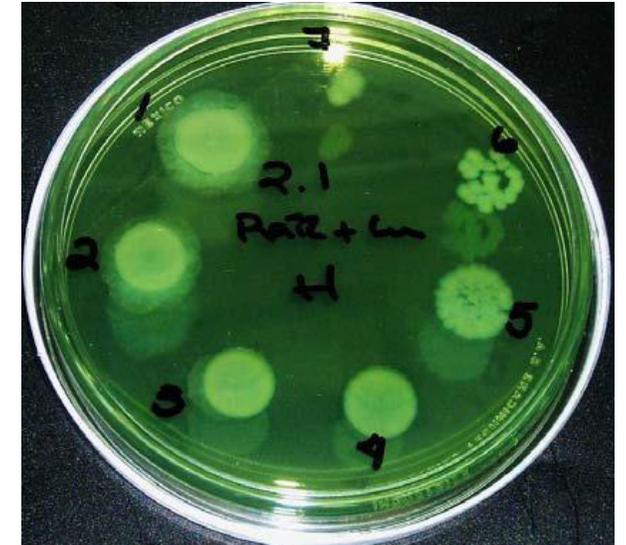
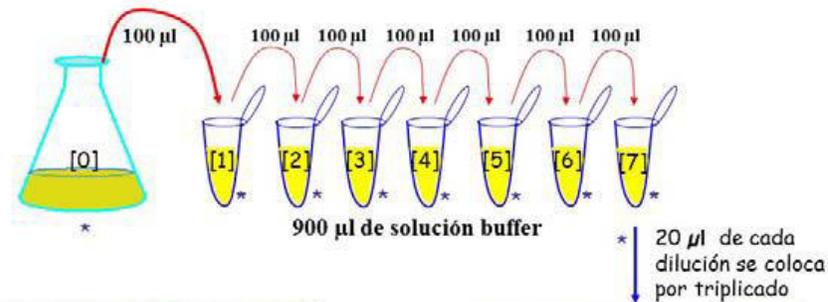
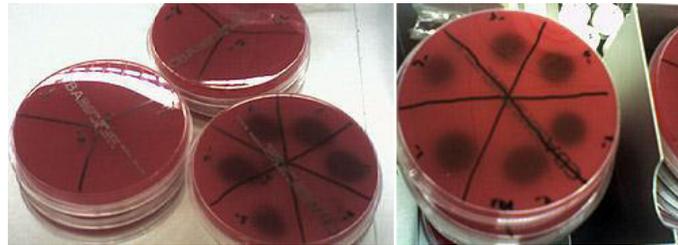
$\text{FD} = 1/\text{Dilución} = 1/10^{-6} = 10^6$

$\text{UFC/mL} = 87 \times 10^6 / 0,1 \text{ mL}$

$\text{UFC/mL} = 8,7 \times 10^8$

GOTEO EN PLACA

- ❖ Fácil, rápida y económica.
- ❖ Las placas son divididas en sectores separados
- ❖ Se realizan las diluciones 1:10 a partir de la muestra original.
- ❖ A diferencia del método de plaqueo, aquí se coloca 1 gota de 20 μ L de las diluciones seriadas en las placas de diferentes condiciones de medio solido y después de incubar se observa el mejor crecimiento.



ASA CALIBRADA

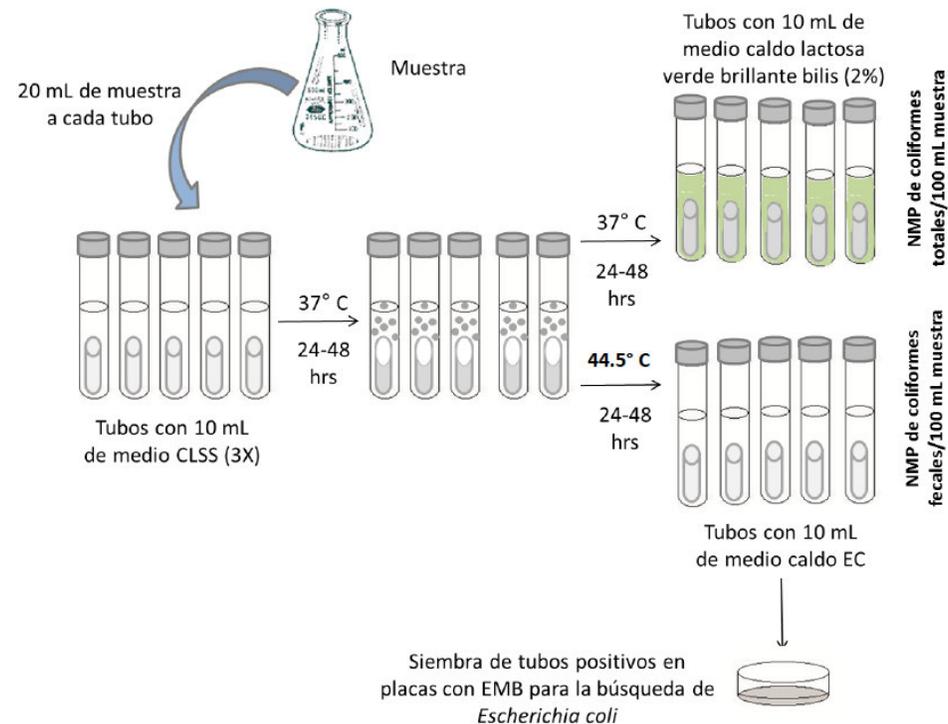
- ❖ La utilización de agujas, ansas o asas calibradas permite tomar volúmenes pequeños, que son inoculados en la superficie del agar mediante la técnica de siembra masiva.
- ❖ Las colonias son contadas y se multiplican por el factor de dilución del asa empleada.
- ❖ El uso más frecuente de este método es en el urocultivo.
- ❖ Se determinan las UFC/g o mL de muestra.

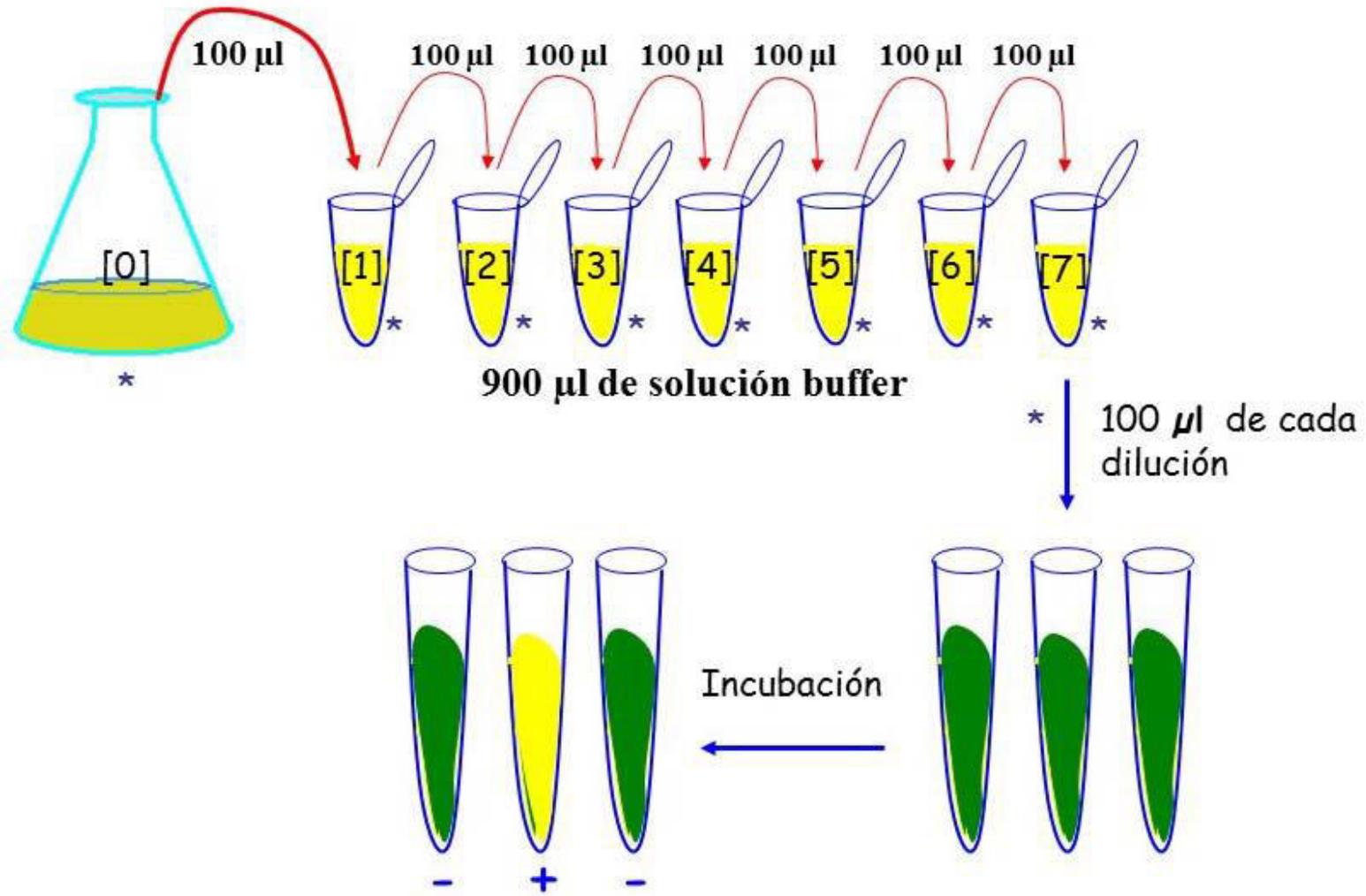


NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)



- ❖ En muchas ocasiones, ya sea por un bajo número de microorganismos en las muestras a analizar y son difíciles de aislar o con un crecimiento que no permite distinguir colonias delimitadas se hace necesario realizar recuentos en medios líquidos.
- ❖ La técnica empleada se denomina número más probable y tiene su fundamento matemático en las distribuciones de Poisson y binomial.
- ❖ Proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

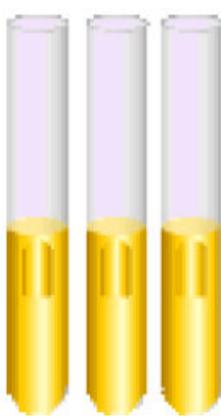




- ❖ **Permite evaluar solamente células viables.**
- ❖ **Se siembran 5 mL de agua o 5 g de sedimento en 45 mL de medio líquido, obteniendo así una dilución 10^{-1} .**
- ❖ **Se toman 5 mL de ésta dilución y se siembran en 45 mL de medio líquido, obteniendo así una dilución 10^{-2} .**
- ❖ **Y así sucesivamente para obtener diluciones seriadas hasta 10^{-7} .**
- ❖ **Se siembra 1 mL de la dilución 10^{-1} por triplicado en tubos con 9 mL de medio líquido.**
- ❖ **Se repite esta operación con todas las diluciones.**
- ❖ **Las muestras se incuban a la temperatura óptima del microorganismo que estoy evaluando, hasta formación de turbidez en el medio.**
- ❖ **Se espera que los primeros tubos (menor dilución) tengan la mayor concentración de microorganismos y que en los últimos (mayor dilución) tienda a 0.**
- ❖ **Se realiza el recuento de tubos con crecimiento positivo (turbidez en el medio) en cada grupo de dilución.**
- ❖ **Tenemos que considerar la última dilución con la presencia de 3 tubos positivos, que es a partir de donde se realizarán los cálculos.**
- ❖ **Se verifica el resultado según la tabla de NMP.**

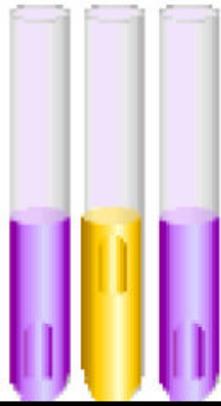
Tabla de índice del NMP para varias combinaciones de resultados positivos, cuando se emplean 3 tubos por dilución.

10^{-1}



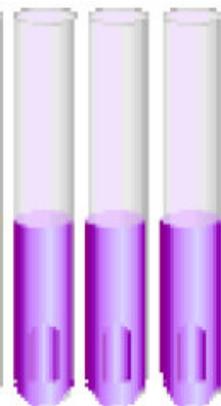
+ + + 3

10^{-2}



- + - 1

10^{-3}



- - - 0

Tubos Positivos			NMP												
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100



$$\text{NMP} = \frac{\text{NMP leído en la tabla}}{\text{Vol real de muestra inoculada (1 mL)}} \times 100$$

$$\text{NMP} = 43 \times 100 = 4300$$

Finalmente el valor obtenido se multiplica por el factor de dilución en este caso por $1/100 (10^{-2})$

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = 4300 \times 1/\text{dilución del tubo medio } (10^2)$$

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = 430.000 = 4,3 \cdot 10^5$$

- ❖ Por ser una prueba basada en probabilidades estadísticas, los recuentos obtenidos no son exactos, sino que expresan resultados estimados.
- ❖ Existen métodos mucho más sencillos como el recuento en placa.

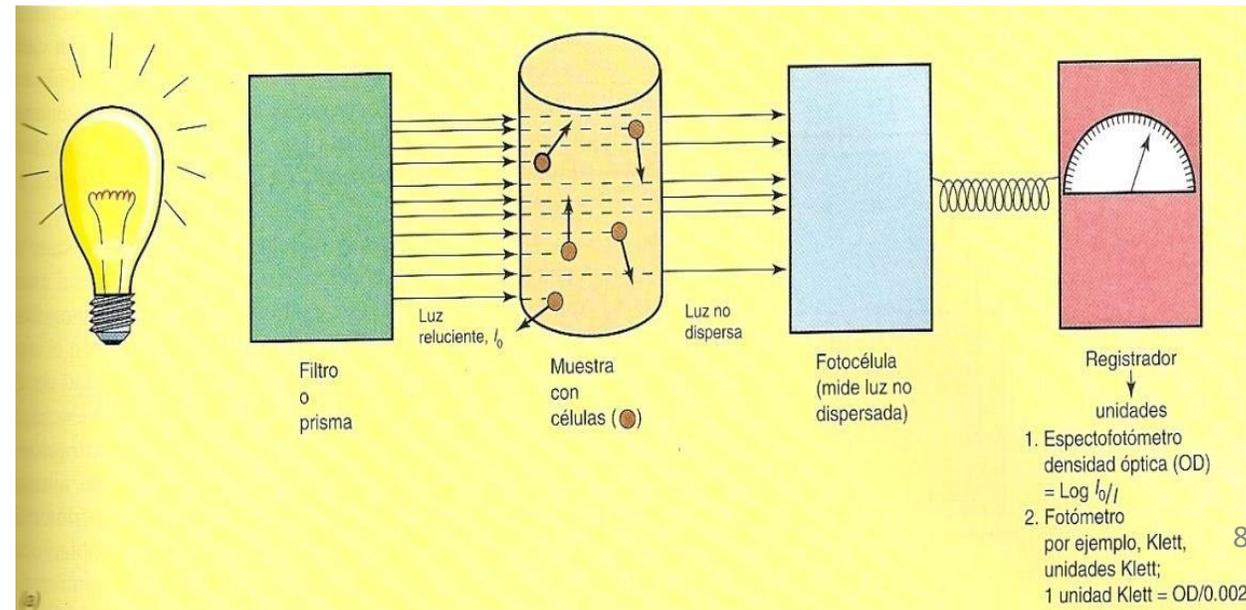
MÉTODOS INDIRECTOS

TURBIDIMÉTRICOS (ÓPTICOS):

- ❖ Consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través del cultivo microbiano = medida de la turbidez con fotómetro o espectrofotómetro que hacen pasar luz a través de la suspensión celular y detectan la cantidad de luz no dispersada.
- ❖ La dispersión de la luz dentro de ciertos límites es proporcional a la masa del cultivo
- ❖ Los resultados se expresan en unidades fotométricas o unidades de densidad óptica proporcionales al número de células y a la masa celular

Longitudes de onda (λ)

- Bacterias y arqueas 540nm
- Protozoarios 580nm
- Levaduras 600nm

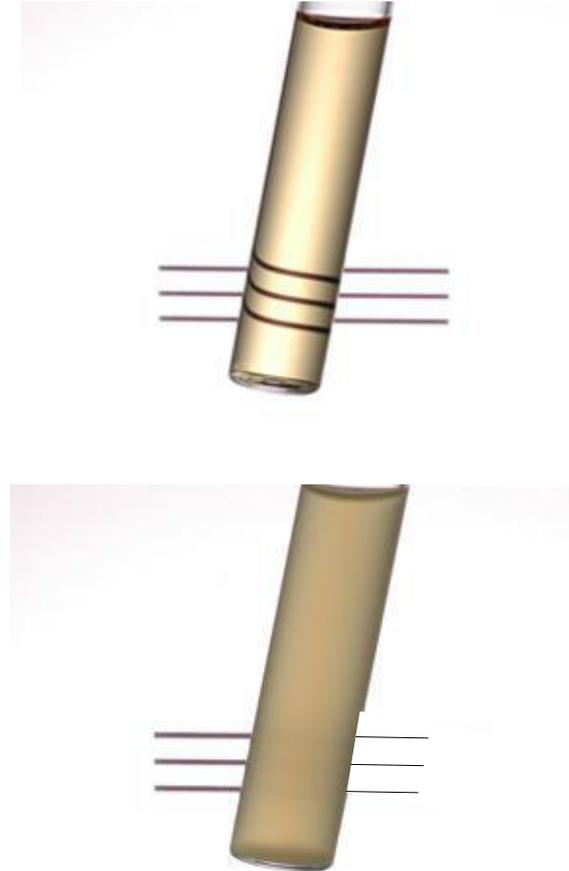
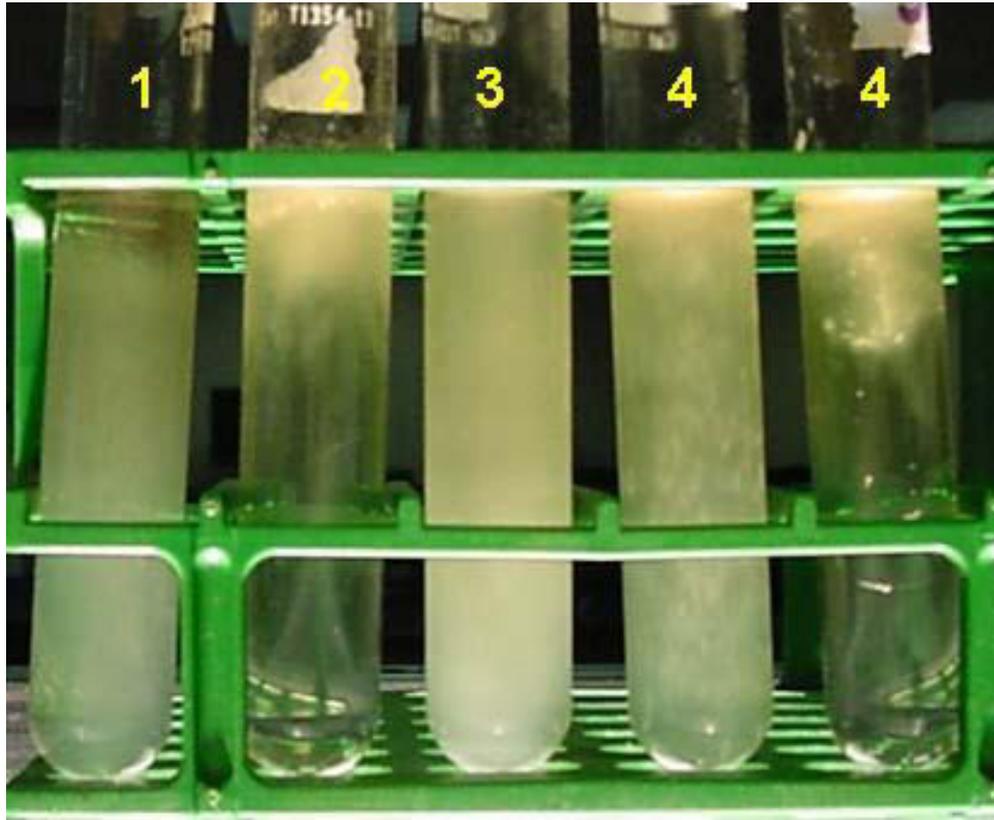


TURBIDEZ



Se determina por la densidad óptica (DO) que puede ser expresada como:

- Absorbancia
- % de Transmitancia
- Unidades Klett (UK).





MASA CELULAR Y TURBIDEZ



MEDIDA DE LA MASA MICROBIANA: MÉTODOS DIRECTOS

PESO SECO

- La masa seca (estufa a 105°C toda la noche) es aproximadamente entre el 10 al 20% de la masa húmeda
- Inconvenientes: método tedioso que requiere tiempo y errores en pesadas (1 mg de peso seco equivale a una masa microbiana de 5×10^9 microorganismos)

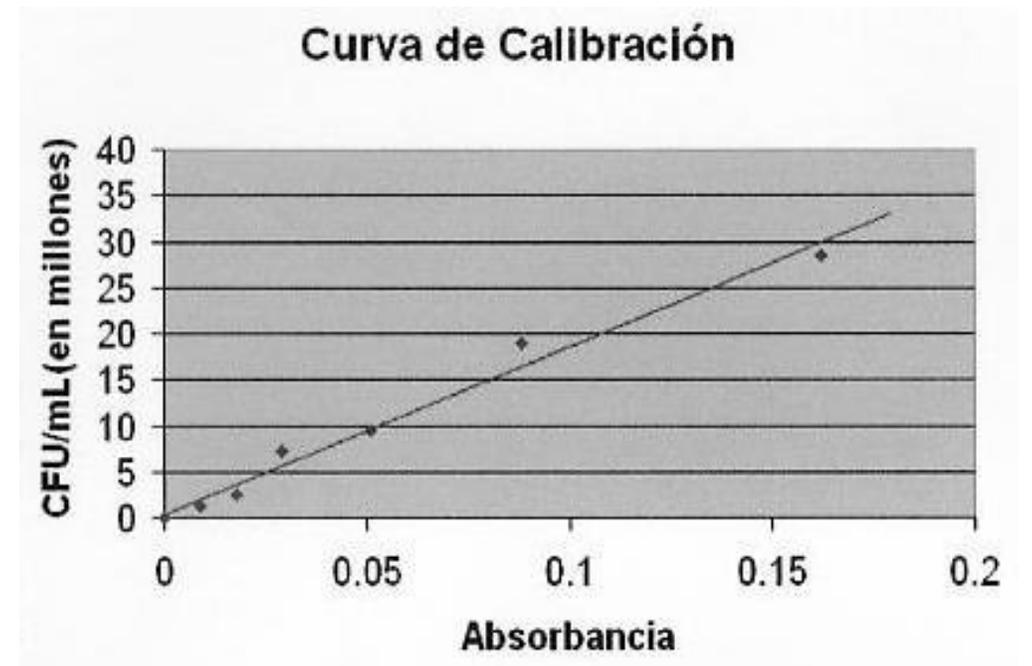
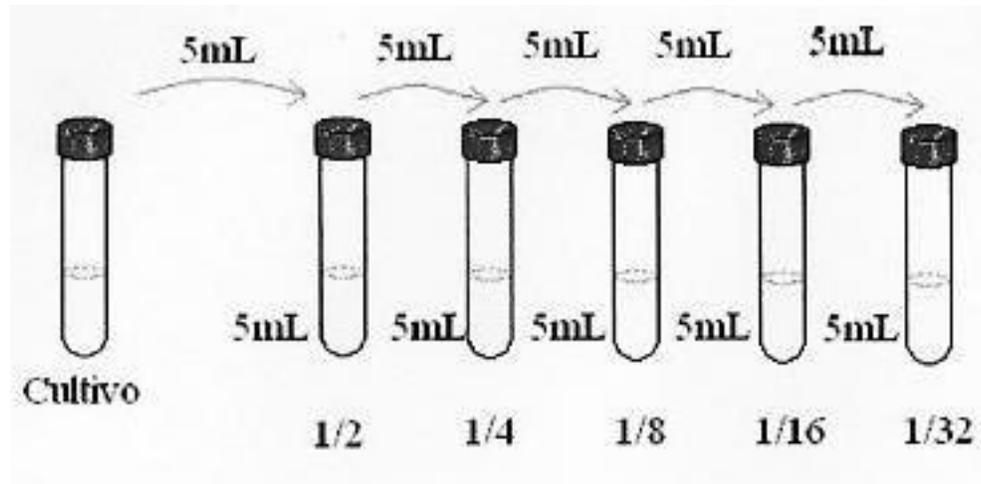
PESO HÚMEDO

- Se centrifuga y se elimina el sobrenadante y se determina el peso del sedimento
- Inconvenientes: grandes errores debido al líquido intercelular retenido, tipo y forma de las agrupaciones de la cepa, etc.

MASA CELULAR Y TURBIDEZ



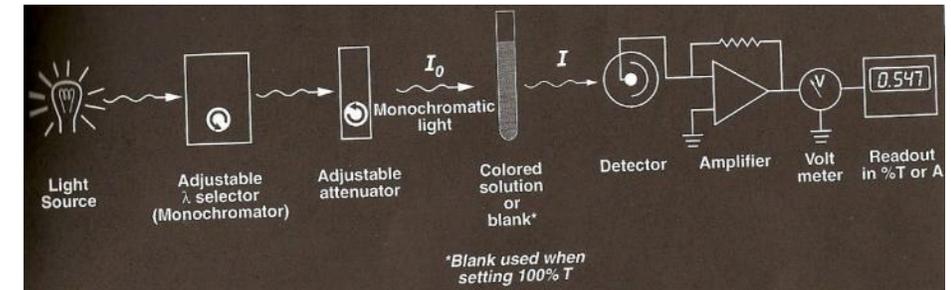
- ❖ En el método de turbidimetría es necesario determinar el contenido de UFC/mL de la muestra original (de la cual se hicieron las diluciones para la calibración) con el método de recuento en placa.
- ❖ Hay que realizar una curva estándar de calibración que relacione medidas directas (recuento en placa o microscopía) con las indirectas de turbidez (absorbancia).



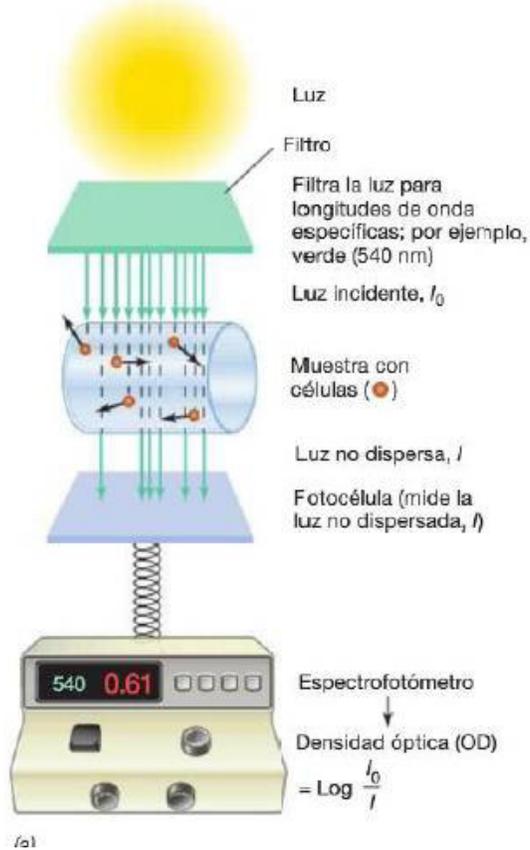
DENSIDAD ÓPTICA



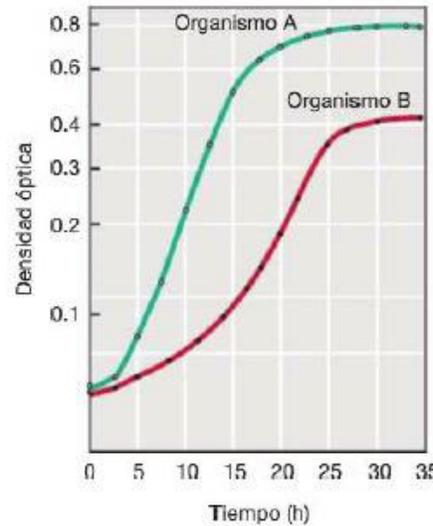
- ❖ La turbidez puede medirse con un espectrofotómetro, un instrumento que hace pasar la luz a través de suspensiones celulares y detecta la cantidad de luz emergente no dispersada.
- ❖ El espectrofotómetro emplea un prisma o red de difracción para generar luz incidente de λ específica.
- ❖ Las λ más comúnmente usadas para medir la turbidez microbiana son 480nm (azul), 540 nm (verde), 600 nm (naranja) y 660 nm (rojo).
- ❖ La sensibilidad es mayor a λ cortas, pero las medidas con suspensiones celulares densas son más exactas a mayores λ .
- ❖ Lo que se mide es el descenso de luz no dispersada causado por la turbidez.
- ❖ En un espectrofotómetro las lecturas se expresan en unidades de densidad óptica (DO) a una λ determinada; por ejemplo DO_{540} indica la medida de la densidad óptica a 540 nm.



MEDIDAS TURBIDIMÉTRICAS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

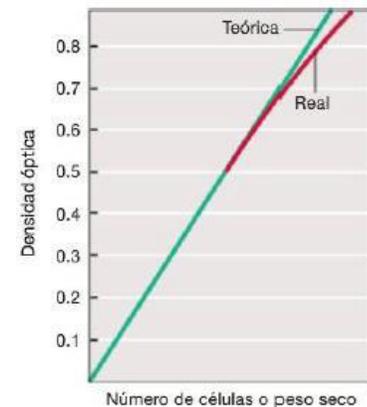


- Las medidas de turbidez se realizan en un espectrofotómetro.
- La fotocélula mide la luz incidente no dispersada por las células en suspensión y da lecturas de densidad óptica o unidades fotométricas



- Curva de crecimiento típica para 2 organismos que crecen a \neq velocidades.
- ¿Qué organismo crece más rápido, A o B?

- Relación entre el número de células o peso seco y sus lecturas turbidimétricas.
- La equivalencia se pierde a valores altos de turbidez.





RELACIÓN ENTRE DENSIDAD ÓPTICA Y NÚMERO DE CÉLULAS



- ❖ En el caso de organismos unicelulares, la DO es proporcional (dentro de ciertos límites) al número de células.
- ❖ Por consiguiente, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de conteo directo para células totales o viables.
- ❖ Sin embargo, antes de utilizar la turbidez como sistema para estimar el número de células, se debe preparar primero un estándar que relacione el número de células (recuento microscópico o de viables), el peso seco o el contenido en proteína con la turbidez.
- ❖ A altas concentraciones celulares, la luz dispersada por una célula, que normalmente no alcanzaría el detector, puede ser redispersada por otra de tal modo que para la fotocélula es como si no hubiese sido dispersada nunca.
- ❖ Cuando esto ocurre, la correspondencia entre el número de células y la turbidez pierde linealidad y las medidas realizadas de densidad óptica son por tanto menos exactas.
- ❖ Sin embargo, dentro de este límite, que varía para cada organismo, las medidas de turbidez pueden ser estimaciones razonablemente precisas del número de células o del peso seco.



Las medidas de turbidez son rápidas y fáciles de realizar.

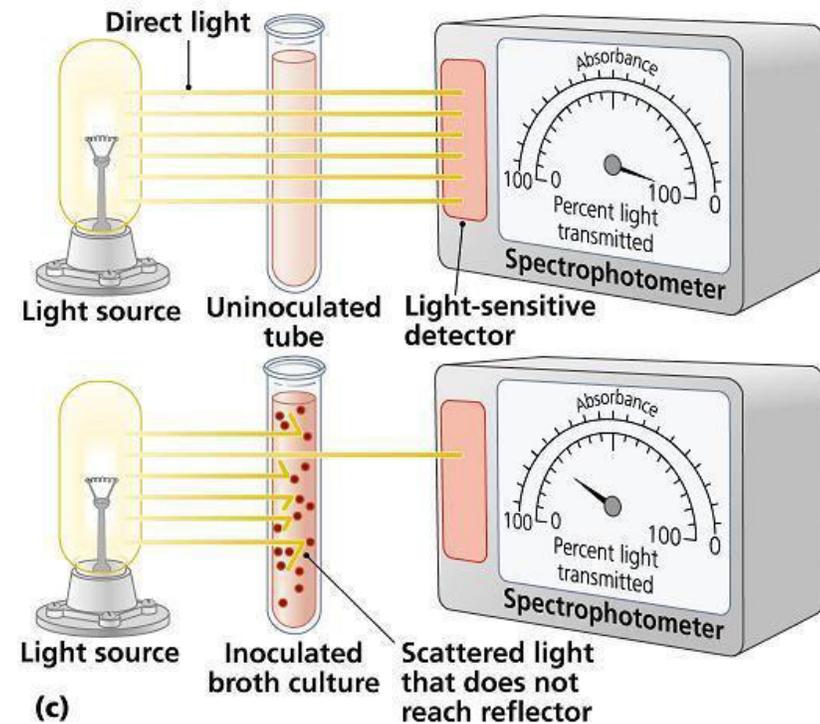
- ❖ Se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar notablemente la muestra.
- ❖ Por esto, las medidas de turbidez se usan con frecuencia para seguir el crecimiento de cultivos microbianos.
- ❖ La misma muestra puede medirse repetidamente y los resultados se pueden representar semilogarítmicamente frente al tiempo.
- ❖ A partir de estos datos, resulta fácil calcular el tiempo de generación y otros parámetros de un cultivo en crecimiento.

$$\text{Velocidad específica de crecimiento: } \mu = (\ln DO_{600t_2} - \ln DO_{600t_1}) / t_2 - t_1 ; t_2 > t_1$$

$\ln DO_{600t_2}$ y $\ln DO_{600t_1}$ = logaritmo natural de la DO al tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2) respectivamente.

Tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2) son los extremos de la fase exponencial en la correspondiente curva de crecimiento.

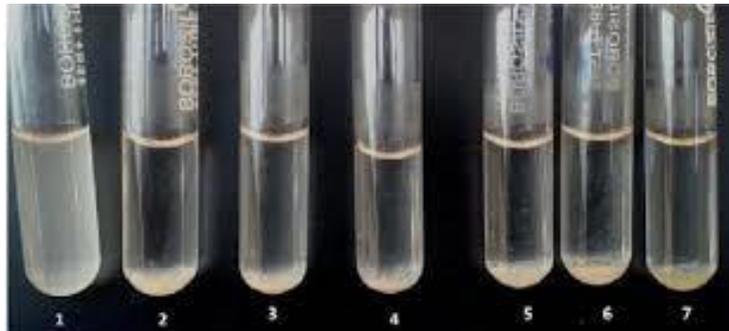
Luego se puede calcular el tiempo de duplicación: $\ln 2 / \mu$



PROBLEMAS CON LAS DETERMINACIONES DE TURBIDEZ



- ❖ Aunque muchos microorganismos crecen en medio líquido formando suspensiones uniformes, otros no lo hacen.
- ❖ Algunas células forman pequeñas o grandes agregaciones y en tales casos las medidas de DO pueden ser imprecisas como indicación de la biomasa total microbiana.
- ❖ Además, muchos microorganismos crecen formando biofilms en los lados de los tubos y otros recipientes de cultivo reflejando, en condiciones de laboratorio, cómo crecen realmente en la naturaleza.
- ❖ Para que la DO de un cultivo líquido refleje con exactitud la masa celular (y por tanto el número de células) debe evitarse la agregación y la formación de biofilms.
- ❖ Esto se logra frecuentemente mediante agitación o por cualquier otro modo que mantenga las células bien mezcladas durante el proceso del crecimiento.



CRECIMIENTO SINCRONICO

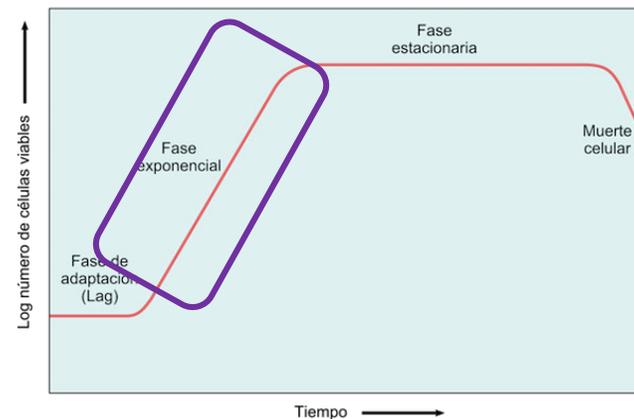
- ❖ El modelo de crecimiento de poblaciones microbianas no permiten concluir nada sobre el tipo de crecimiento de las distintas células ya que en la mayoría de los cultivos el tamaño celular está distribuido al azar.
- ❖ Para obtener información sobre el tipo de crecimiento de los distintos microorganismos debe recurrirse a los cultivos sincrónicos, es decir, cultivos en los que todos los individuos de una población están en la misma etapa del ciclo celular.
- ❖ El número de células del cultivo permanece aproximadamente constante durante el tiempo en el que las células recién formadas aumentan de tamaño; luego, el número de células se duplica de manera brusca.



CULTIVO CONTINUO



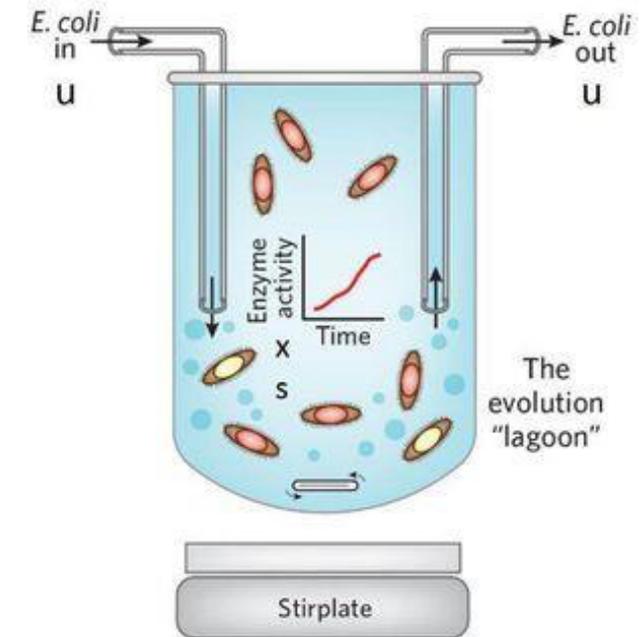
- ❖ En muchos estudios es deseable que los cultivos se mantengan en un ambiente constante durante largos períodos.
- ❖ Se utiliza en fermentaciones industriales que requieren actividad metabólica máxima; si se está estudiando un proceso como la síntesis de una enzima particular, el disponer fácilmente de células en crecimiento exponencial puede ser de gran ayuda.
- ❖ Un cultivo continuo es un sistema ABIERTO.
- ❖ El recipiente del cultivo continuo mantiene un volumen constante, al que se añade continuamente medio fresco a una velocidad constante y del que extrae continuamente medio usado con células a la misma velocidad.
- ❖ Una vez que se alcanza el equilibrio, el volumen del quimiostato, el número de células en el sistema y el estado metabólico permanecen constantes, se dice entonces que el sistema está en estado de equilibrio.
- ❖ Consiste en mantener la población microbiana en fase exponencial de crecimiento.



TURBIDOSTATO

Dispositivo de cultivo continuo controlado por realimentación que mantiene constante la densidad celular.

- ❖ La biomasa de cultivo se mantiene constante midiendo la densidad óptica del medio de cultivo usando un fotómetro
- ❖ Se ajusta la densidad celular a una turbidez constante.
- ❖ Cuando la turbidez llega a cierto nivel, la bomba mediana se enciende y ajusta la turbidez al nivel requerido
- ❖ No es posible variar la velocidad de crecimiento.
- ❖ El producto no se saca del reactor.
- ❖ Un circuito de reflujo recibe el producto cuando hay exceso manteniendo constante la velocidad.
- ❖ La cantidad de producto que hay en el reflujo, determina la cantidad de medio que se añade al biorreactor de modo que ningún factor nutricional se haga limitante.
- ❖ UN SOLO NUTRIENTE NO puede controlar el crecimiento microbiano.



INCONVENIENTES

- ❖ Es difícil de manejar y ajustar.
- ❖ Si los microorganismos tienen tendencia a adherirse a superficies (paredes internas del aparato), los resultados de medida de la DO quedan falseados (infravalorados).

APLICACIONES

- ❖ Usado en el estudio de los factores que incrementan o disminuyen la tasa de crecimiento.



- ❖ Sistema de cultivo abierto y continuo en el que UN SOLO nutriente controla la tasa de crecimiento.
- ❖ La eliminación continua del cultivo a una velocidad constante mantiene constante el volumen interior.

Para lograr este control son importantes 2 factores

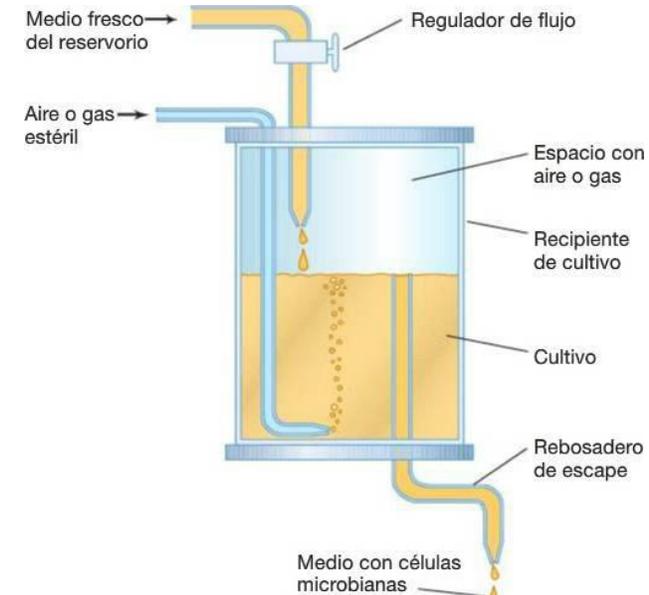
VELOCIDAD DE DILUCIÓN

Velocidad con que se bombea el medio fresco y se retira medio gastado

CONCENTRACIÓN DE UN NUTRIENTE LIMITANTE

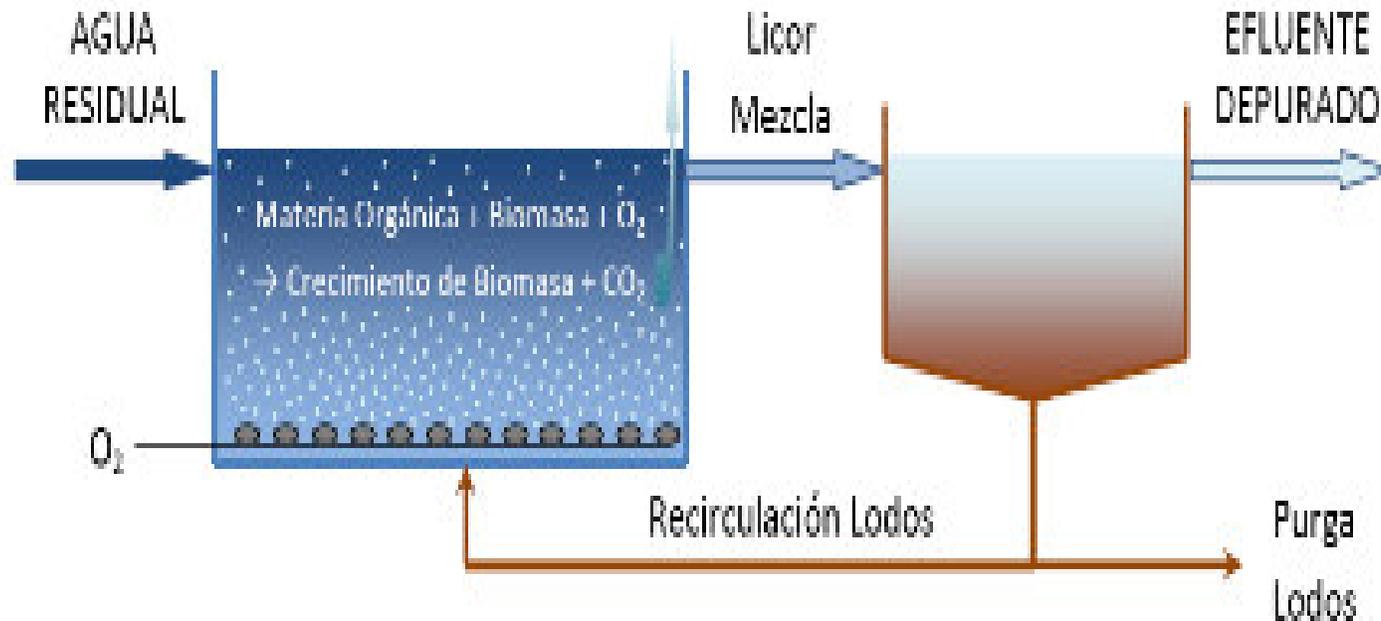
Fuente de C o N presente en el medio estéril que entra al quimiostato

En un cultivo cerrado, la concentración de nutrientes afecta a la velocidad de crecimiento y a la producción de microorganismos.



APLICACIONES

- ❖ Procesos industriales de fermentación (producción de bebidas alcohólicas, de antibióticos, de aminoácidos, etc.).
- ❖ Permite estudiar: aspectos fisiológicos (catabolismo de sustrato limitante), selección de mutantes, estudios ecológicos.
- ❖ Su aplicación más conocida es para la depuración de aguas ya sea mediante procesos aeróbicos o anaeróbicos.
- ❖ El “medio de cultivo fresco” es el agua residual que entra en la planta y alimenta a los fangos activados con microorganismos que luego se retiran por decantación

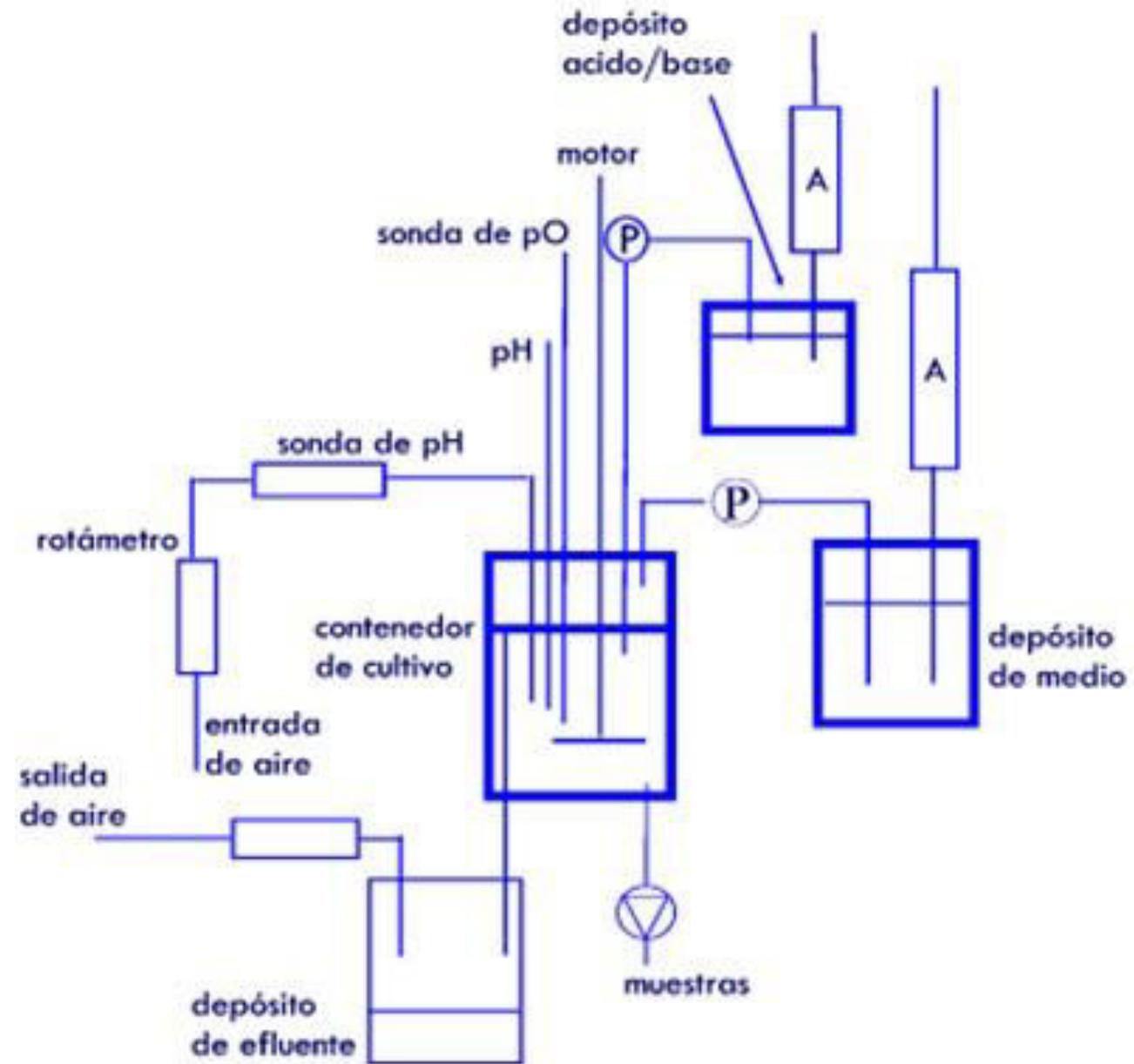


EL QUIMIOSTATO

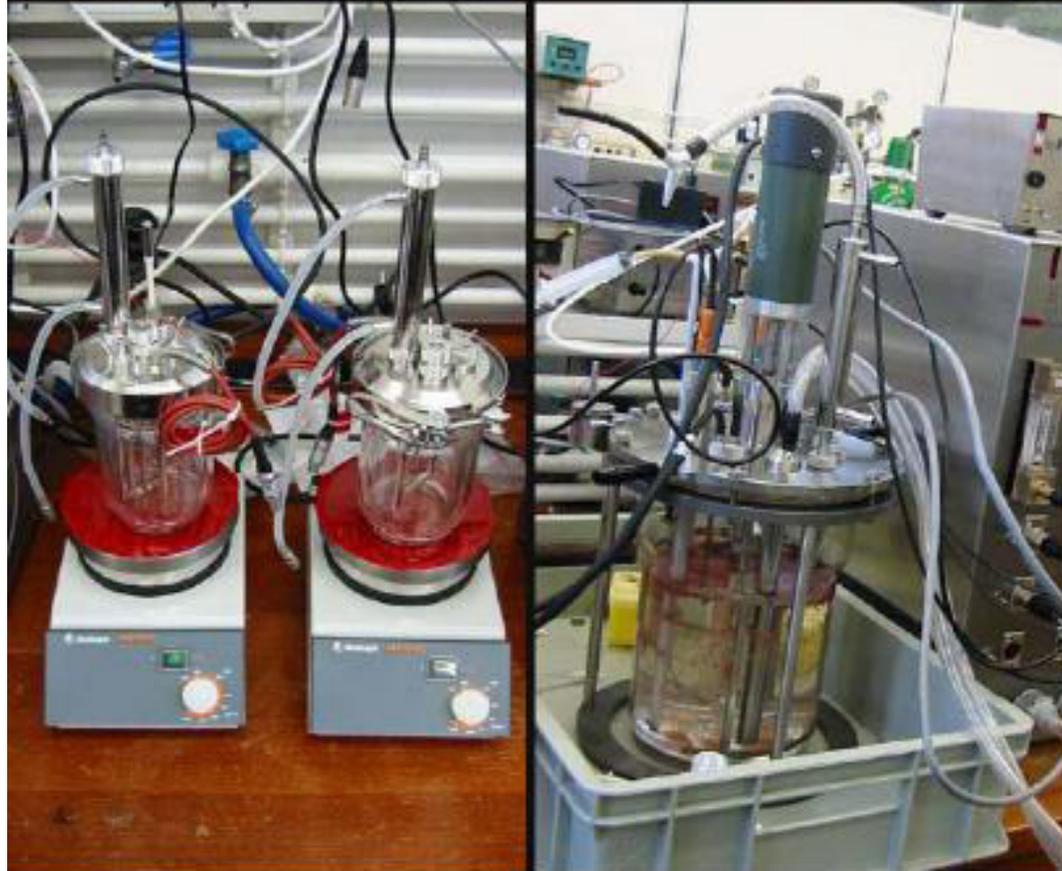
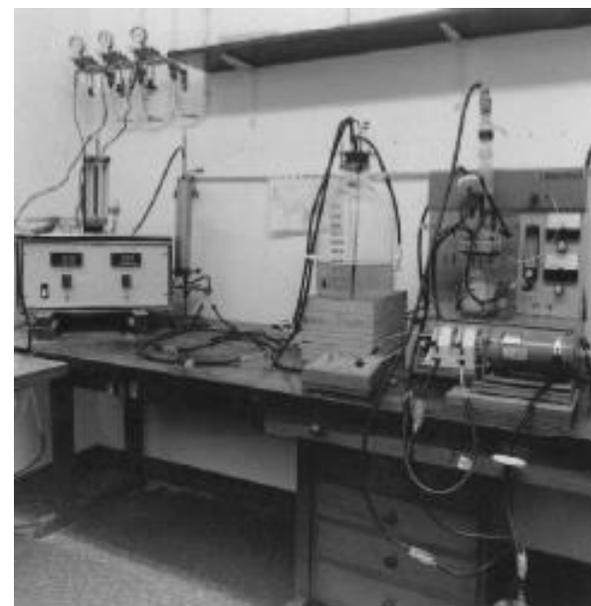
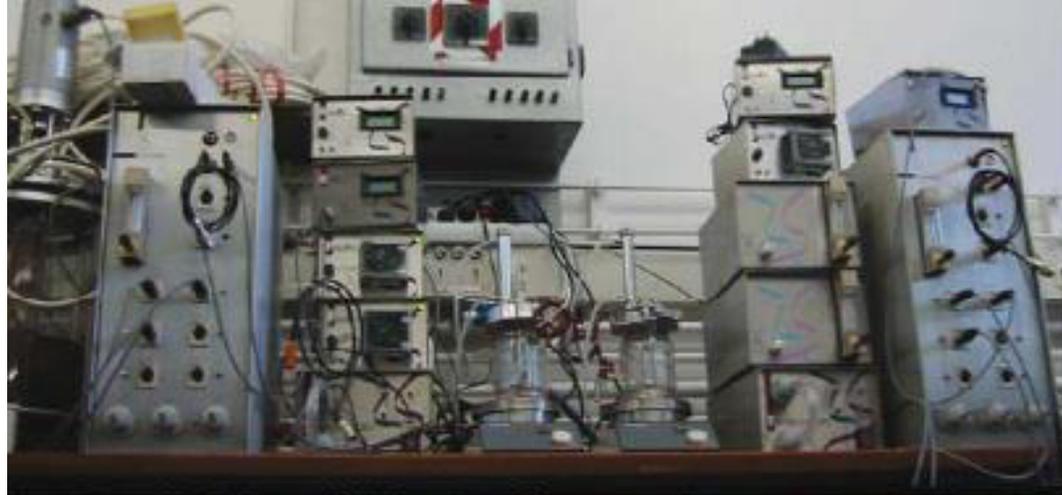


- ❖ Es un reactor que mantiene el crecimiento en la fase exponencial
- ❖ Es un **cultivo continuo** el volumen se mantiene constante (recambio entre medio fresco y usado) y se alcanza un **estado de equilibrio** entre el número de células y su estado metabólico.
- ❖ Es un cultivo balanceado mantenido por tiempo indefinido por un sistema de flujo que se compone: una cámara de cultivo de volumen constante a la que llegan nutrientes y de la que se eliminan los productos tóxicos de desecho
- ❖ **Características:** estado constante o estable; concentración microbiana y concentración del sustrato: constante; tasa de dilución y rendimiento celular: constante





	TURBIDOSTATO	QUIMIOSTATO
FOTÓMETRO	Si (mide turbidez)	No
TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO	Controlada internamente por la medición de la densidad óptica de la biomasa de cultivo	Controlada por 1 solo componente del medio
VELOCIDAD DE FLUJO	Variable	Constante
CONTROL DE LA TASA DE CRECIMIENTO	NO controlada por el suministro de un solo nutriente	Controlada por el suministro de UN SOLO nutriente.
DENSIDAD ÓPTICA	Si se mide	No se mide
TASA DE FLUJO	El caudal NO permanece constante	El caudal es constante

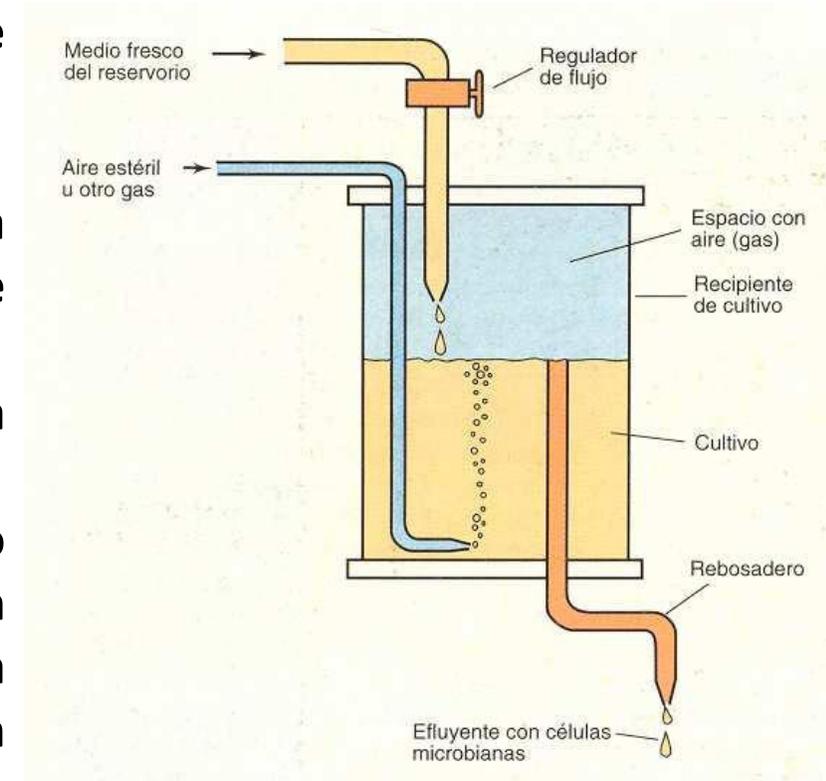


CULTIVO DISCONTINUO

Batch culture

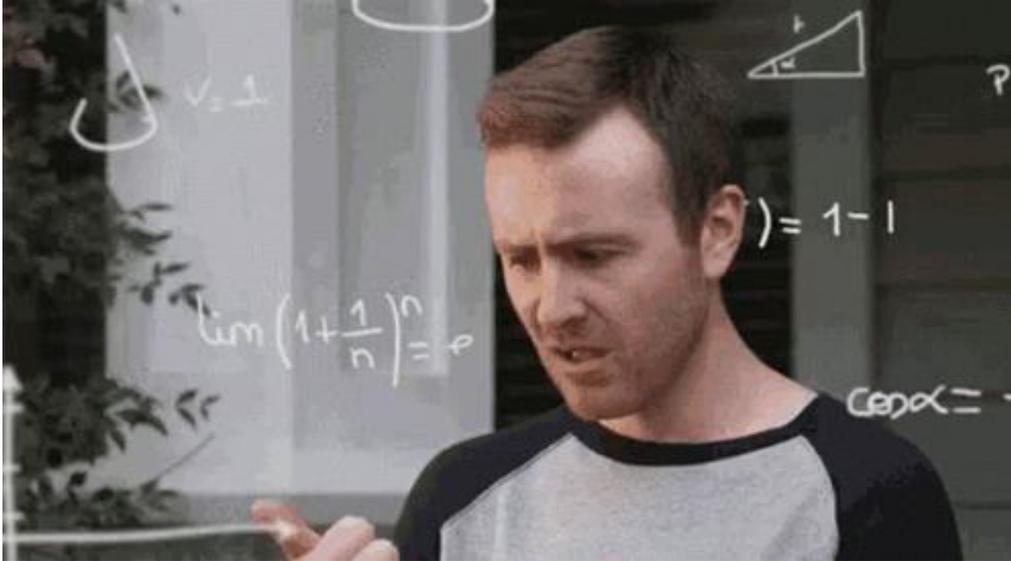


- ❖ Es el método de cultivo más simple en el que el microorganismo crece a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento.
- ❖ En cultivo pasará por una serie de fases.
- ❖ El término de cultivo discontinuo alimentado se utiliza para describir a un cultivo discontinuo al que se le añade, continua o secuencialmente medio fresco sin la eliminación del cultivo crecido.
- ❖ Por lo tanto, el volumen de un cultivo discontinuo alimentado aumenta con el tiempo.
- ❖ El BA es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados.
- ❖ Así, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa.



¿Por que es importante el conteo de microorganismos?

- ❖ La cuantificación de microorganismos es fundamental en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica para entender como estos seres microscópicos interaccionan con sus hospederos y en los ambientes donde se desarrollan.
- ❖ En estudios de Ecología Microbiana también es importante conocer el número de microorganismos que se asocian con distintos hospederos, conocer sus dinámicas de población, así como, determinar el número de microorganismos que están colonizando un ambiente.





GRACIAS



POR SU ATENCION