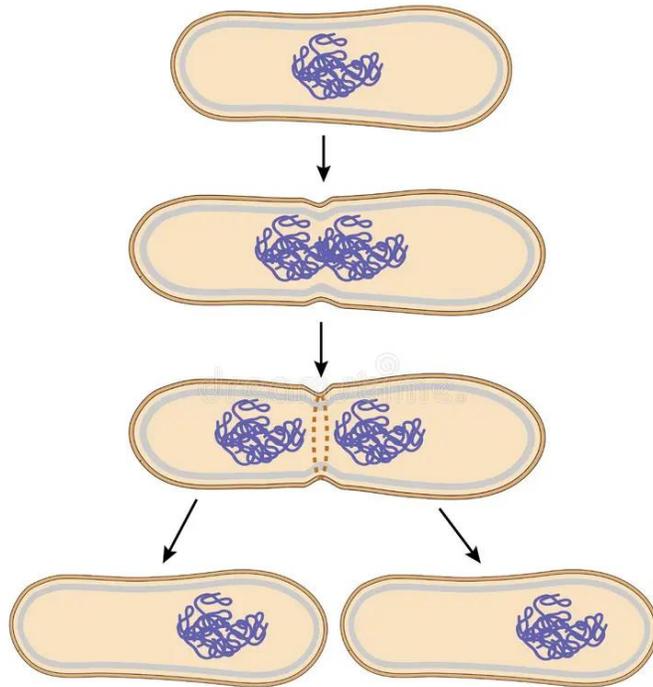


TP N° 5: Cinética del crecimiento bacteriano y Métodos de recuento

Crecimiento bacteriano es el aumento de todos los componentes celulares con el consiguiente aumento del número de células bacterianas, es la duplicación celular.



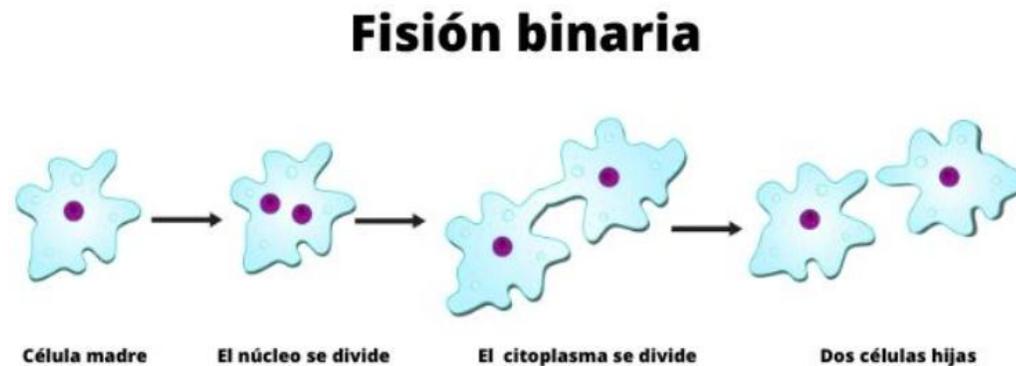
Binary Fission



¿Cómo ocurre la división celular en las bacterias?

Al igual que en el resto de los organismos celulares, la división celular en las bacterias es un proceso que incluye:

- la replicación o duplicación del ADN (el material genético)
- su distribución entre las dos futuras células hijas (polos opuestos de la célula que se divide)
- la separación de las dos células resultantes

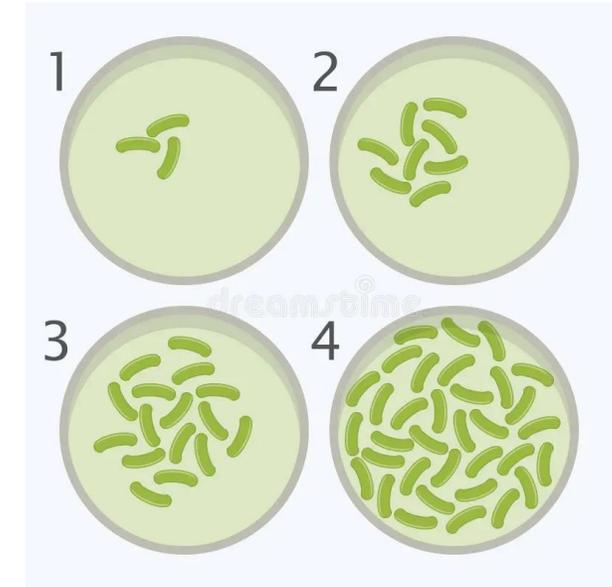


Tal división celular se conoce como **fisión binaria** y conlleva al aumento de número de individuos bacterianos en una población, es decir, al crecimiento bacteriano.

Como cada célula durante la división tiene que duplicar su material genético y, aumentar su tamaño, es un evento bioquímicamente activo, que requiere inversión energética.

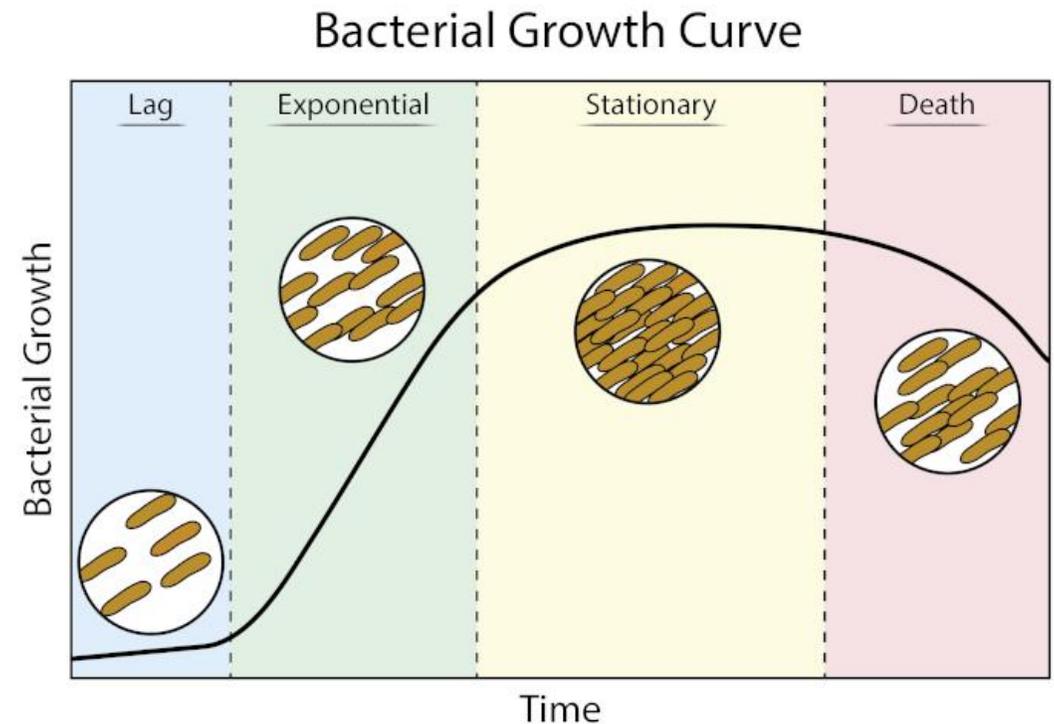
El crecimiento de una población bacteriana puede ser graficado como el aumento del número de células en función del tiempo y esa gráfica dibuja una curva llamada “curva de crecimiento bacteriano”, en la cual se distinguen varias fases donde se dan distintos procesos característicos.

Muchos autores han descrito el crecimiento de una población bacteriana como un proceso exponencial, pues cada ciclo de división (también conocido como generación) hace que de 1 célula inicial surjan 2, luego que de estas dos surjan 4, después 8, después 16 y así sucesivamente.

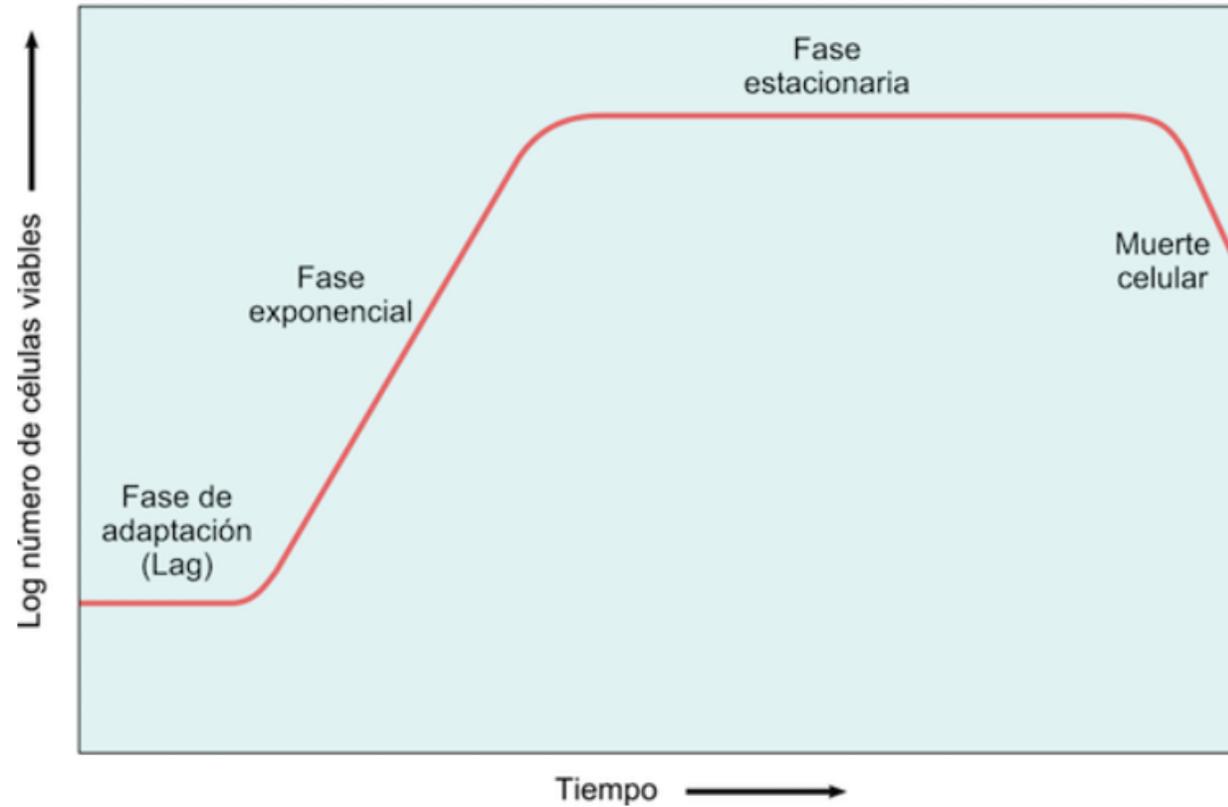


El tiempo necesario para que se forme cada una de estas generaciones se conoce como el tiempo de generación o de duplicación, que generalmente es constante y casi siempre especie-específico.

Para *E. coli*, por ejemplo, uno de los organismos modelo entre los procariotas, el tiempo de duplicación es de más o menos 20 minutos, mientras que otras especies como *Clostridium perfringens* o *Mycobacterium tuberculosis* tienen tiempos de duplicación de 10 minutos y de más de 12 horas, respectivamente.



Curva de crecimiento bacteriano



Esta curva es un gráfico donde se muestra el aumento del número de células en un cultivo por unidad de tiempo, a partir del cual se obtiene información valiosa.

Generalmente todas las bacterias crecidas experimentalmente in vitro a las cuales se les proporcionan todos los nutrientes necesarios para crecer exhiben un patrón de crecimiento similar.

Fase de latencia o fase lag

Para iniciar un cultivo bacteriano se parte de un pequeño inóculo celular. Cuando este inóculo es introducido en un medio de cultivo fresco completo, es decir con todos los nutrientes necesarios para crecer a una especie bacteriana determinada, inicialmente no se observan cambios en el número de individuos.

Se ha demostrado que durante esta fase de “latencia”, en la cual no parece haber crecimiento celular, las bacterias acrecientan su tamaño y están metabólicamente muy activas, pues están sintetizando ácidos nucleicos, proteínas y enzimas, etc.

La duración de esta fase en el tiempo depende de algunos factores intrínsecos de la población y de algunos factores ambientales. Por ejemplo:

- del tamaño del inóculo inicial
- de las condiciones ambientales previas del inóculo
- del tiempo para sintetizar los elementos necesarios para la división

Fase exponencial o logarítmica (log)

Cuando las bacterias están listas para comenzar a dividirse se observa un aumento exponencial en el número de células por unidad de volumen por unidad de tiempo. Están en la fase exponencial o logarítmica de la curva.

Durante esta fase se considera que la mayor parte de las bacterias están pasando por eventos de fisión binaria a una velocidad constante y es en esta fase se calcula el tiempo de duplicación.

La fase exponencial o logarítmica y el tiempo de duplicación de una población depende no solo de la especie, sino de que las bacterias en el medio de cultivo encuentren todos los nutrientes necesarios y las condiciones adecuadas para su crecimiento.

Fase estacionaria

El crecimiento exponencial de las bacterias no es infinito y esto se debe a que el medio de cultivo, que es un sistema de crecimiento cerrado, tarde o temprano se queda sin nutrientes (las bacterias lo consumen todo).

Además de los nutrientes, un aumento en el número de células en un volumen constante (aumento de la concentración celular) es sinónimo también de un aumento en la concentración de metabolitos o productos de desecho que pueden tener efectos inhibitorios en el crecimiento.

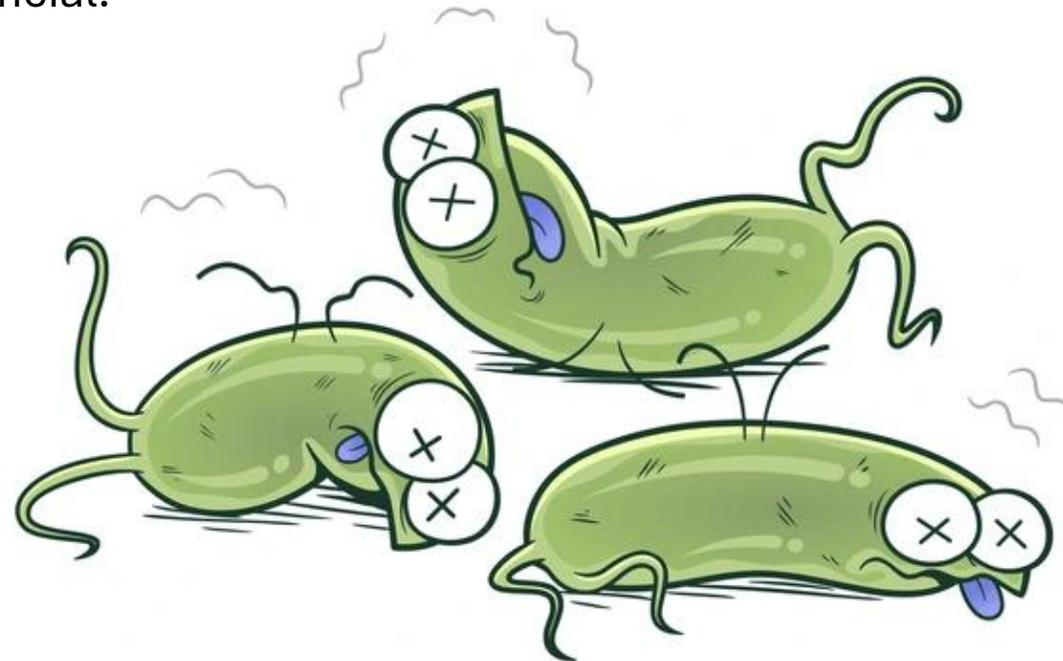
Un mayor número de células en un espacio finito también implica que eventualmente no habrá suficiente espacio para más células, lo que se traduce en una inhibición del crecimiento.

En esta fase, llamada fase estacionaria, algunas células continúan dividiéndose, pero otras comienzan a morir a una tasa similar, por lo que la curva se aplanan.

Fase de declive o muerte

Después de la fase estacionaria, prosigue la fase de muerte o declive, donde las bacterias comienzan a morir y la curva sufre un declive.

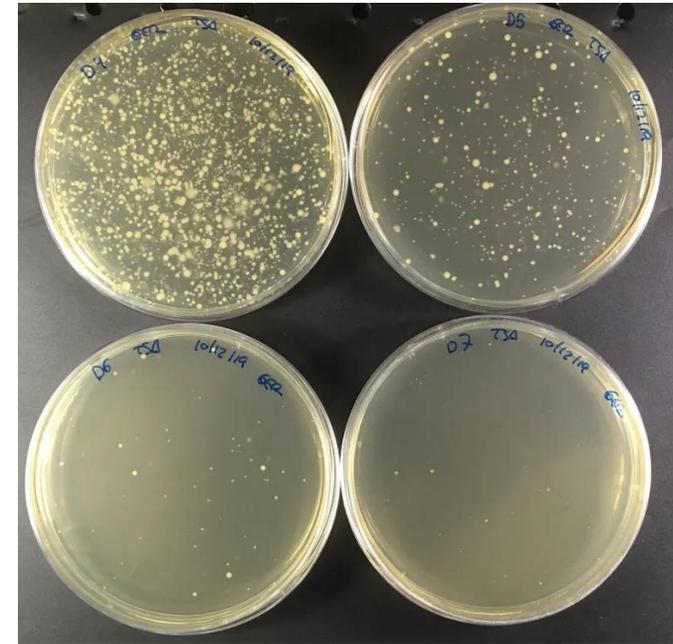
Durante la fase de muerte las bacterias mueren exponencialmente, por lo que se considera una etapa “reversa” que la fase exponencial.



Métodos para la Medición del Crecimiento

Existen diferentes métodos para la medición del crecimiento bacteriano, entre ellos tenemos:

1. Recuento de colonias en placa
2. Estimación del número más probable (NMP)



RECuento DE COLONIAS EN PLACA

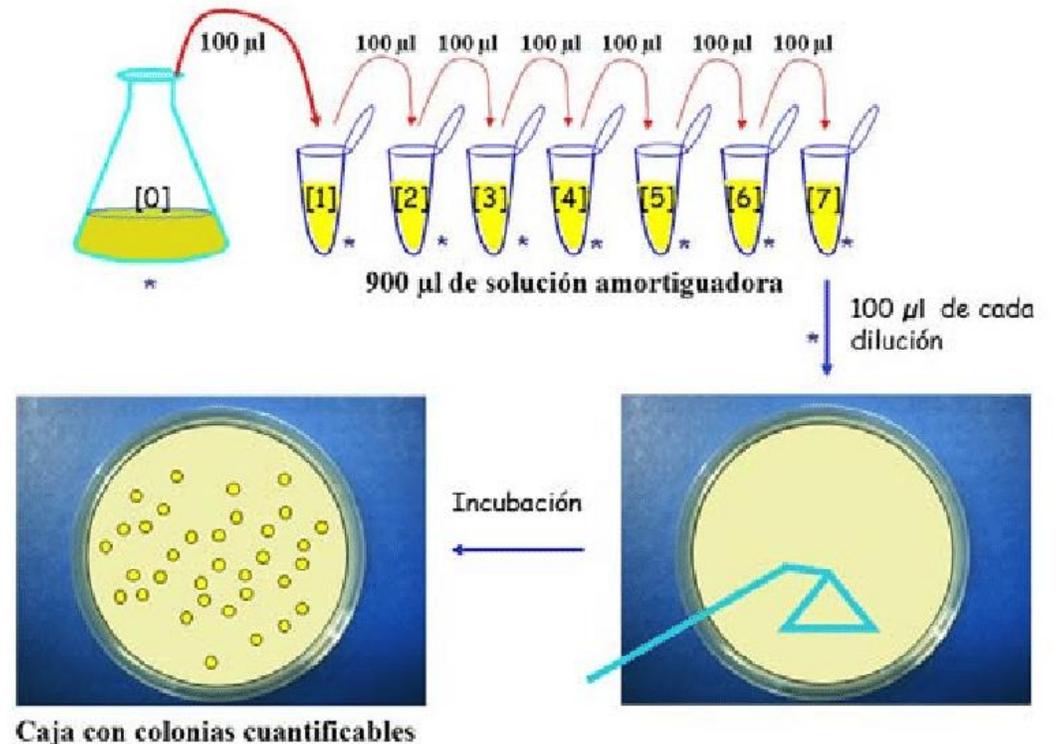
Método para determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra.

Se basa en que cada microorganismo desarrollará una colonia visible.

Una muestra no es totalmente homogénea, por ello es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos.

Lo que se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo.

La colonia es considerada una unidad formadora de colonia (ufc). En los métodos de recuento de microorganismos vivos son inevitables los errores



Técnica Operatoria

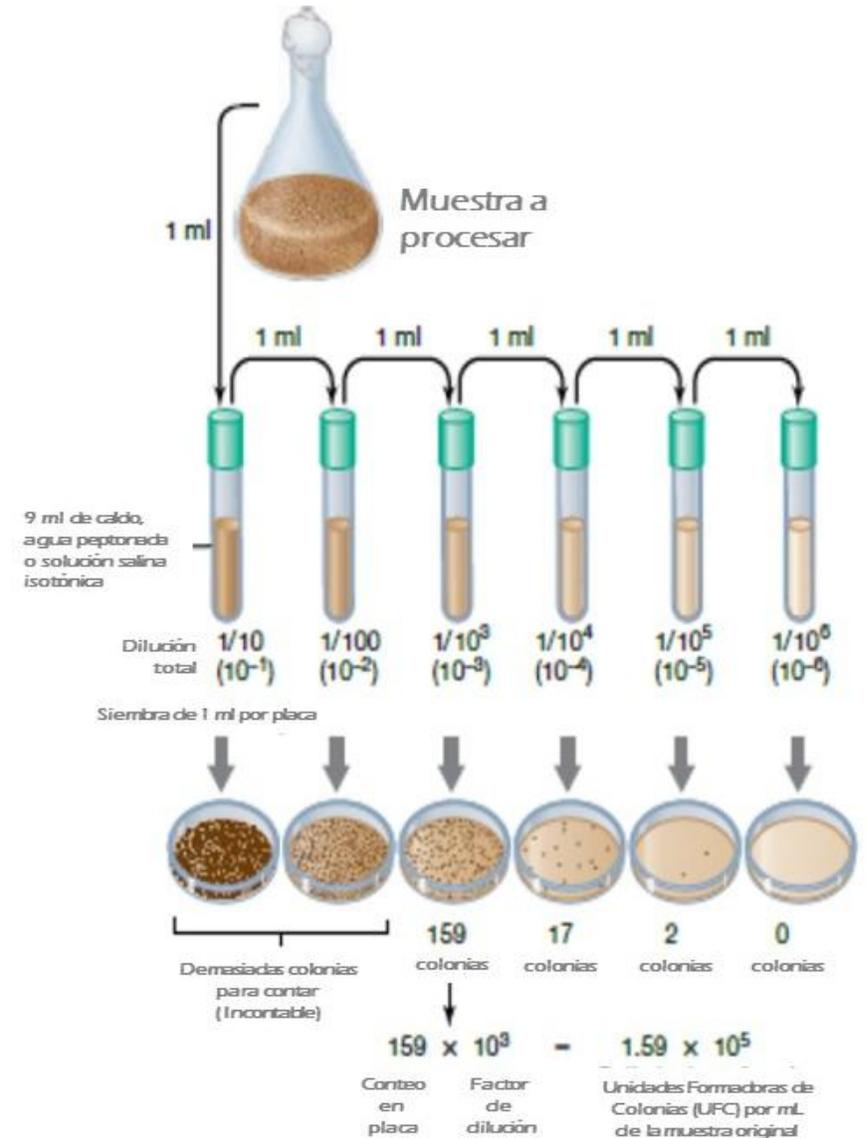
- Preparar una suspensión al 10% de suelo con agua destilada.
- Mantener en agitación la suspensión. Preparar diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000
- Se siembran 5 placas con 0.1 ml de cada dilución en una placa de Petri con Agar Nutritivo y con ayuda de un asa de Digrafsky extender por toda la placa.
- Incubar a 37 °C durante 2- 3 días en estufa.
- Para realizar el contaje se escogen las placas que muestren entre 30 y 300colonias.

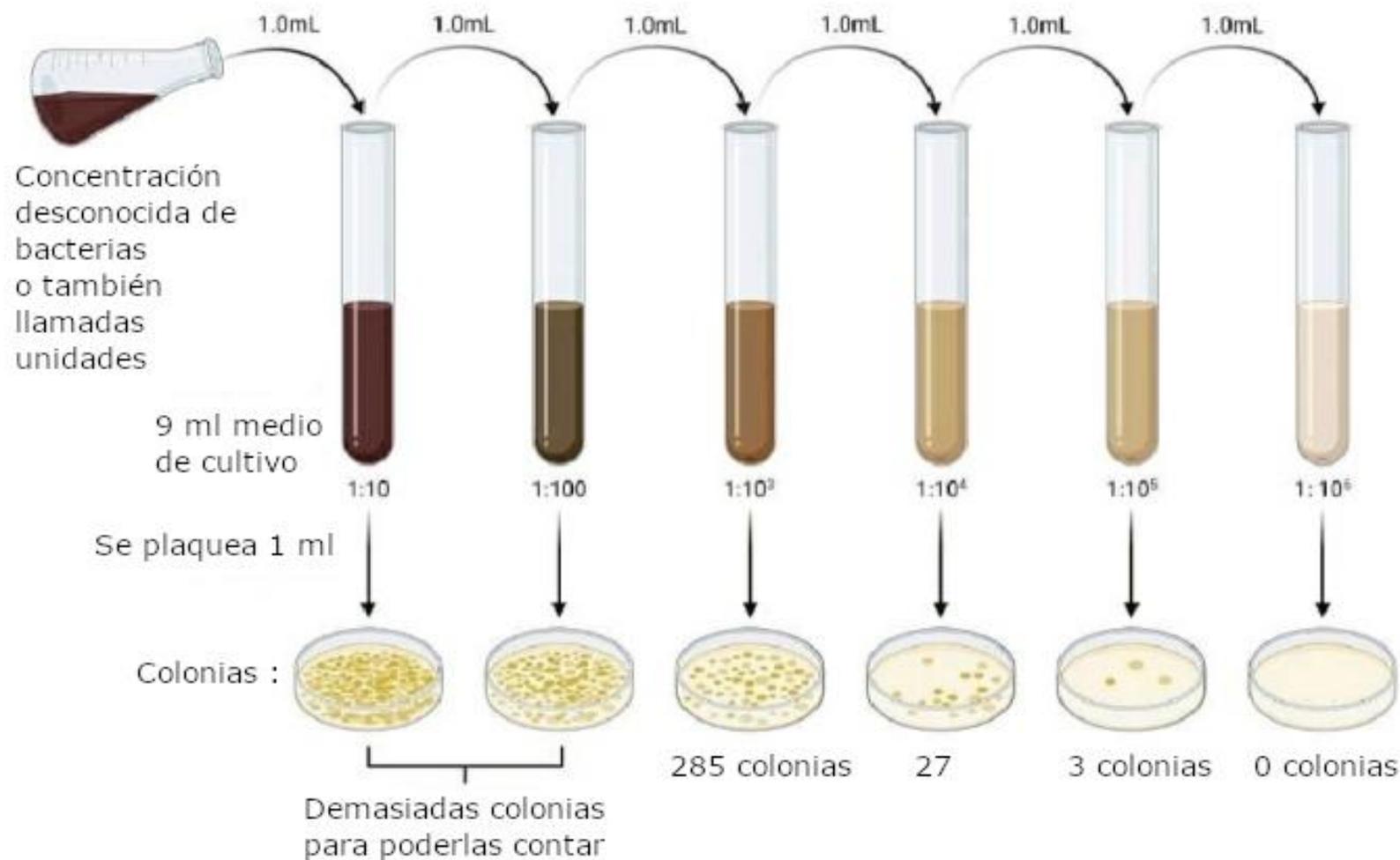
$$\text{Ufc/g} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

No debe ser muy alto → para poder contarlas

No debe ser muy bajo → para que tenga significado estadístico

No. colonias
→ 30 - 300





UFC/ml = (nº colonias x factor de dilución) / volumen plaqueado en la placa Petri

Ejemplo: (285 colonias x 10³) / 1 ml = 2.85 x 10⁵ UFC/ml

Actuaciencia

Estimación del Número Más Probable (NMP)

Este método se basa en la presunción de que las bacterias se hallan uniformemente distribuidas en un medio líquido.

La cifra media es el número más probable. Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes en caldo Mac Conkey.

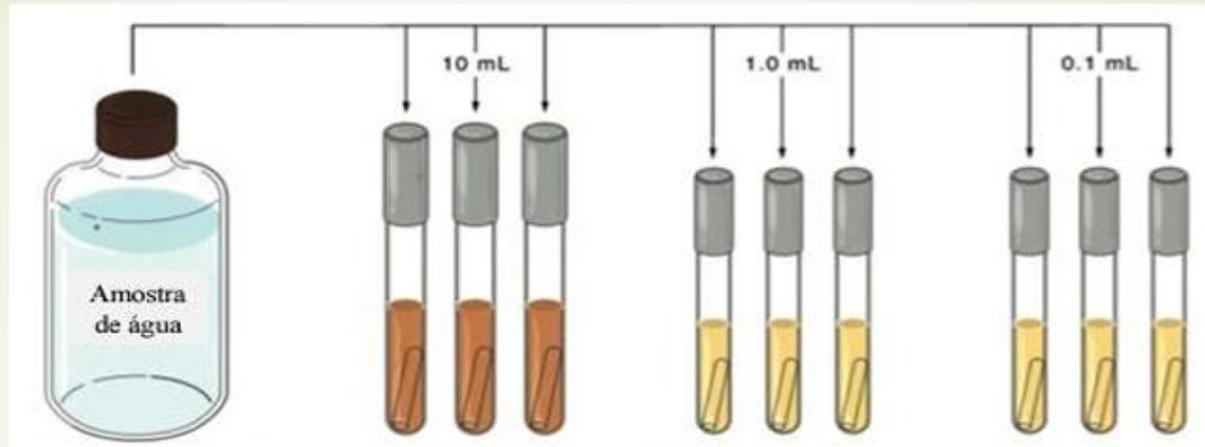
Técnica Operatoria

Se coloca muestras de 10ml, 1ml y 0,1 ml utilizando un total de 9 tubos. Se pipetea las cantidades mencionadas de muestra y se colocan en tubos con 5 ml de medio de cultivo.

Tres tubos con 10 ml. (de doble concentración), tres tubos con 1 ml. (en medio simple), tres tubos con 0,1 ml. (en medio simple).

Para observar si las bacterias producen gas los tubos con medio de cultivo deben contar con una campana de Durham en su interior.

Se incuban 24 o 48 hs. a 35- 45 °C. Se observa el crecimiento positivo en los tubos que manifiestan turbidez, cambios de color o producción de gas.



**TUBOS
(+)**



**Tabla: NMP para
10ml, 1ml y 0,1 ml
de muestra**

Número	Indice	Número	Indice
Característico		Característico	
NMP		NMP	
0 0 1	3	2 0 0	9
0 0 2	6	2 0 1	14
0 0 3	9	2 0 2	20
0 1 0	3	2 0 3	26
0 1 1	6,1	2 1 0	15
0 1 2	3,2	2 1 1	20
0 1 3	12	2 1 2	27
0 2 0	6,2	2 1 3	34
0 2 1	9,3	2 2 0	21
0 2 2	12	2 2 1	28
0 2 3	16	2 2 2	35
0 3 0	9,4	2 2 3	42
0 3 1	13	2 3 0	29
0 3 2	16	2 3 1	36
0 3 3	19	2 3 2	44
1 0 0	3,6	2 3 3	53
1 0 1	7,2	3 0 0	23
1 0 2	11	3 0 1	39
1 0 3	15	3 0 2	64
1 1 0	7,3	3 0 3	95
1 1 1	11	3 1 0	43
1 1 2	15	3 1 1	75
1 1 3	19	3 1 2	120
1 2 0	11	3 1 3	160
1 2 1	15	3 2 0	93
1 2 2	20	3 2 1	150
1 2 3	24	3 2 2	210
1 3 0	16	3 2 3	290
1 3 1	20	3 3 0	240
1 3 2	24	3 3 1	460
1 3 3	29	3 3 2	1100