

QD415
.5
R6
1988



1020111465

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MANUAL DE PRÁCTICAS
DE
BIOQUÍMICA MICROBIANA
2ª EDICIÓN

C.B.R. JUAN ANTONIO RODRIGUEZ ARZAVE
C.B.R. EUGENIO SERGIO RODRIGUEZ YAÑEZ



FONDO UNIVERSITARIO

1988

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

1

Generalmente se emplean longitudes de onda entre 490 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por parte de los pigmentos amarillos podría llegar a ser significativa. **CINETICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO BACTERIANO** cierta longitud de onda y el número de células por ml. depende de la cepa utilizada y a las condiciones de cultivo, ya que la velocidad de crecimiento de células se modifica.

INTRODUCCION

El crecimiento poblacional bacteriano puede definirse en términos del incremento en la masa celular o del número de células. Generalmente estos dos parámetros guardan una relación directamente proporcional, pero puede variar según las condiciones de cultivo.

La masa celular es expresada ya sea como peso seco, volumen celular empaquetado, contenido de nitrógeno o turbidez, ésta última es la más usualmente empleada pues su medición rápida en un fotocolorímetro o espectrofotómetro permite rastrear la densidad de un cultivo mientras está creciendo.

Respecto al incremento en el número de células, éste es determinado directamente mediante cuentas viables en placa aunque existen técnicas electrónicas sofisticadas que permiten detectarlo.

2) Cuando el crecimiento se expresa matemáticamente en términos de una potencia, el incremento es determinado por su exponente, por ello este tipo de crecimiento recibe el nombre de exponencial:

OBJETIVO

En este ensayo perseguimos los siguientes objetivos:

- 1) Monitorear fotocolorimétricamente la turbidez de un cultivo bacteriano en multiplicación activa.
- 2) Representar gráficamente el desarrollo celular poblacional apreciando los diferentes estadios de crecimiento.
- 3) Manejar matemáticamente los datos del rastreo fotocolorimétrico para definir los parámetros de crecimiento bacteriano.
- 4) Determinar los parámetros de crecimiento en función del incremento en el número de células.
- 5) Establecer una comparación entre los parámetros obtenidos a partir de ambas alternativas.

FUNDAMENTO

Los cultivos bacterianos son capaces de dispersar la luz de una manera aproximadamente proporcional a la masa celular. A longitudes de onda en el rango del espectro visible, la absorción de luz por los constituyentes celulares coloreados es insignificante por lo que la mayor parte de la turbidez se debe a la dispersión de la luz, pues ésta depende del alto índice de refracción de la bacteria. A longitudes de onda donde la razón **absorbancia/luz dispersa** es baja, la densidad óptica de un cultivo puede medirse en un espectrofotómetro y es proporcional al número de células.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO BACTERIANO

INTRODUCCION

El crecimiento poblacional bacteriano puede definirse en términos del incremento en la masa celular o del número de células. Generalmente estos dos parámetros guardan una relación directamente proporcional, pero puede variar según las condiciones de cultivo.

La masa celular es expresada ya sea como peso seco, volumen celular empaquetado, contenido de nitrógeno o turbidez. Esta última es la más usualmente empleada pues su medición rápida en un fotocolorímetro o espectrofotómetro permite rastrear la densidad de un cultivo mientras está creciendo.

Respecto al incremento en el número de células, éste es determinado directamente mediante cuentas viables en placa aunque existen técnicas electrónicas sofisticadas que permiten detectarlo.

OBJETIVO

En este ensayo perseguimos los siguientes objetivos:

- 1) Monitorear fotocolorimétricamente la turbidez de un cultivo bacteriano en multiplicación activa.
- 2) Representar gráficamente el desarrollo celular poblacional apreciando los diferentes estadios de crecimiento.
- 3) Manejar matemáticamente los datos del rastreo fotocolorimétrico para definir los parámetros de crecimiento bacteriano.
- 4) Determinar los parámetros de crecimiento en función del incremento en el número de células.
- 5) Establecer una comparación entre los parámetros obtenidos a partir de ambas alternativas.

FUNDAMENTO

Los cultivos bacterianos son capaces de dispersar la luz de una manera aproximadamente proporcional a la masa celular. A longitudes de onda del espectro visible, la absorción de luz por los constituyentes celulares colorados es insignificante por lo que la mayor parte de la turbidez observada es debida a la dispersión de la luz, pues ésta depende del alto índice de refracción de las bacterias. A longitudes de onda donde la razón absorción/luz dispersa es baja, la densidad óptica de un cultivo puede medirse en un espectrofotómetro y es proporcional al número de células.

3) En general se emplean longitudes de onda entre 490 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por productos amarillos podría llegar a ser significativa. La relación exacta entre la absorbancia a cierta longitud de onda y el número de células varía de acuerdo a la cepa utilizada y a las condiciones de cultivo, ya que la razón masa/número de células se modifica con el medio.

La curva de crecimiento completa comprende principalmente tres fases: - la adaptativa, exponencial y estacionaria. La más utilizada para caracterizar el crecimiento de un cultivo es la fase exponencial, a partir de la cual se obtiene la **velocidad de crecimiento** y el **tiempo de generación** partiendo de las siguientes suposiciones:

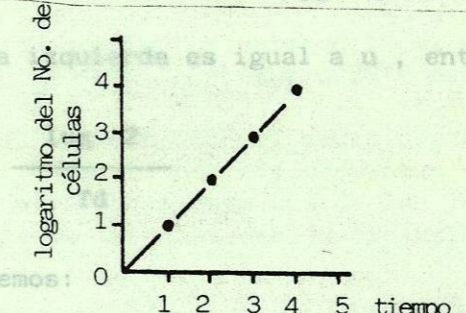
1) Las bacterias se reproducen por fisión binaria, lo que significa que el incremento en el número de células conforme transcurre el tiempo podría expresarse de la siguiente forma:

1 célula → 2 células → 4 células → 8 células

2) Cuando el crecimiento se expresa matemáticamente en términos de una base, el incremento es determinado por su **exponente**, por ello este tipo de crecimiento recibe el nombre de **exponencial**:

2⁰ células → 2¹ células → 2² células → 2³ células → 2⁴ células

Una gráfica del logaritmo de número de células (exponentes) contra tiempo proporciona una línea recta cuya pendiente define a la **velocidad específica de crecimiento (μ)** como se muestra enseguida:



Matemáticamente la velocidad específica de crecimiento se obtiene conforme la siguiente ecuación:

log N_f - log N₀ = μ t (1)

donde N₀ y N_f son el número inicial y final de células respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre ambos conteos.

3) En forma más general, el número inicial de células se modifica conforme transcurre el tiempo, de acuerdo a la siguiente relación:

$$N_0 \rightarrow 2N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0$$

o sea, el número final de células es igual a:

$$N_f = 2^z N_0 \quad (2)$$

donde z es el número de generaciones, el cual puede obtenerse fácilmente al conocer el tiempo transcurrido y el tiempo de duplicación (Td):

$$z = \frac{t}{T_d} \quad (3)$$

Comunmente se desconocen Td y z, por lo que combinando las ecuaciones 2 y 3 se puede obtener Td según el planteamiento siguiente:

a) Despejando z de la ecuación 2 tenemos:

$$\frac{\log N_f - \log N_0}{\log 2} = z = \frac{t}{T_d}$$

b) Combinando las ecuaciones y reagrupando términos tenemos que:

$$\frac{\log N_f - \log N_0}{t} = \frac{\log 2}{T_d}$$

c) Puesto que el miembro de la izquierda es igual a u, entonces:

$$\mu = \frac{\log 2}{T_d} \quad (4)$$

De aquí al despejar Td obtenemos:

$$T_d = \frac{\log 2}{\mu}$$

Ecuaciones similares se obtienen si se sustituye el número de células (N) por peso seco, absorbancia o unidades Klett. Si existe una relación directa entre el número de células y cualquiera de los otros parámetros, una consecuencia matemática de este hecho es que el valor de μ deberá ser igual.

Generalmente se emplean longitudes de onda entre 490 y 550 nm, pues la dispersión de la luz es mayor al disminuir la longitud de onda. Sin embargo a valores inferiores a 490 nm, la absorción por productos amarillos podría llegar a ser significativa. La relación exacta entre la absorbancia a cierta longitud de onda y el número de células varía de acuerdo a la cepa utilizada y a las condiciones de cultivo, ya que la razón masa/número de células se modifica con el medio.

La curva de crecimiento completa comprende principalmente tres fases: la adaptativa, exponencial y estacionaria. La más utilizada para caracterizar el crecimiento de un cultivo es la fase exponencial, a partir de la cual se tiene la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación partiendo de las siguientes suposiciones:

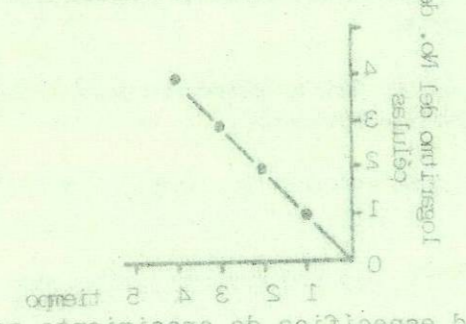
1) Las bacterias se reproducen por fisión binaria, lo que significa que el incremento en el número de células conforme transcurre el tiempo podrá expresarse de la siguiente forma:

$$1 \text{ célula} \rightarrow 2 \text{ células} \rightarrow 4 \text{ células} \rightarrow 8 \text{ células}$$

2) Cuando el crecimiento se expresa matemáticamente en términos de una fase, el incremento es determinado por un exponente, por ello este tipo de crecimiento recibe el nombre de exponencial:

$$2^0 \text{ células} \rightarrow 2^1 \text{ células} \rightarrow 2^2 \text{ células} \rightarrow 2^3 \text{ células} \rightarrow 2^4 \text{ células}$$

Una gráfica del logaritmo de número de células (exponentes) contra tiempo proporciona una línea recta cuya pendiente define a la velocidad específica de crecimiento (μ) como se muestra enseguida:



Matemáticamente la velocidad específica de crecimiento se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\log N_1 - \log N_0}{t} \quad (1)$$

donde N₀ y N₁ son el número inicial y final de células respectivamente y t es el tiempo transcurrido entre ambos conteos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensayo con Agar Nutritivo inclinado, conteniendo un cultivo de *Escherichia coli*.
- 1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo nutritivo o Caldo Luria.
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 1 matraz nefelométrico de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo (Caldo Nutritivo o Medio Mínimo de Glucosa y sales)
- 1 pipeta graduada de 5 ml estéril
- 1 gradilla
- 3 Tubos de dilución: tubos de ensayo de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 9.9 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 4 Tubos de dilución: tubos de ensayo de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 4.5 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 8 Tubos de agar blando: tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar-agar al 0.6% estéril.
- 9 pipetas de 1 ml estériles
- 8 placas de Agar Nutritivo
- Fotocolorimetro equipado con filtro verde
- Baño de agua a 45°C
- Vortex
- Incubadora a 37°C
- Agitador rotatorio con temperatura controlada
- El Medio Mínimo de GLucosa y sales contiene en un litro de agua destilada los siguientes ingredientes: MgSO₄, 0.2 g; CaCl₂, 0.1 g; KH₂PO₄, 1.0 g; K₂HPO₄, 1.0 g; NH₄Cl, 2.0 g; Glucosa, 1.0 g.

METODOS

- 1.- Inocular por asada un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de Caldo Luria, empleando la cepa de *Escherichia coli*. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2.- Verificar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en el matraz nefelométrico, habiendo calibrado el aparato previamente con agua destilada. El valor obtenido deberá sustraerse a cada una de las lecturas subsecuentes y la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transfiera asépticamente 1 ml del cultivo de toda la noche al matraz nefelométrico y registre inmediatamente la turbidez. Esta se considerará la lectura al tiempo 0.
- 4.- A la vez realice una cuenta viable del inóculo procediendo como sigue: prepare diluciones seriadas del cultivo de toda la noche y luego transfiera por duplicado 0.1 ml de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ a pares de tubos de agar blando previamente fundidos y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcle homogéneamente y vacie todo el contenido de los tubos sobre la superficie de Agar Nutritivo contenido en cajas de Petri. Permita que se lolidifique e incube las cajas a 37°C durante 24°C invirtiéndolas.

En forma más general, el número inicial de células se modifica conforme transcurre el tiempo de acuerdo a la siguiente relación:

N_0^2 + 2N_0 + 2N_0 + N_0

o sea, el número final de células es igual a:

N_f = 2^x N_0

donde x es el número de generaciones, el cual puede obtenerse fácilmente al conocer el tiempo transcurrido y el tiempo de duplicación (TD):

x = t / TD

Combinando se desconocen TD y x, por lo que combinando las ecuaciones 2 y 3 se puede obtener TD según el planteamiento siguiente:

a) Despejando x de la ecuación 2 tenemos:

t / TD = (log N_f - log N_0) / log 2

b) Combinando las ecuaciones y reemplazando términos tenemos que:

t / TD = (log N_f - log N_0) / log 2

c) Puesto que el miembro de la izquierda es igual a u, entonces:

u = log 2 / TD

De aquí al despejar TD obtenemos:

TD = log 2 / u

Funciones similares se obtienen si se sustituye el número de células (N) por peso seco, absorbancia o unidades Kierf. Si existe una relación directa entre el número de células y cualquiera de los otros parámetros, una consecuencia matemática de este hecho es que el valor de u deberá ser igual.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 tubo de ensaye con Agar Nutritivo inclinado, conteniendo un cultivo de *Escherichia coli*.
- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de caldo nutritivo o caldo Luria.
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 1 matraz nefelométrico de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo (Caldo Nutritivo o Medio Mínimo de Glucosa y sales)
- 1 pipeta graduada de 5 ml estéril
- 1 gradilla
- 3 Tubos de dilución: tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 9.9 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 4 Tubos de dilución: tubos de ensaye de 18 x 150 mm estériles a los cuales se les adicionará asepticamente 4.5 ml de NaCl 0.85% estéril.
- 8 Tubos de agar plático: tubos de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de agar-agar al 0.6% estéril.
- 9 pipetas de 1 ml estériles
- 8 placas de Agar Nutritivo
- Fotocolorímetro equipado con filtro verde
- Baño de agua a 45°C
- Vortex
- Incubadora a 37°C
- Agitador rotatorio con temperatura controlada
- El Medio Mínimo de Glucosa y sales contiene en un litro de agua destilada los siguientes ingredientes: MgSO₄ 0.2 g; CaCl₂ 0.1 g; KH₂PO₄ 1.0 g; K₂HPO₄ 1.0 g; NH₄Cl 2.0 g; Glucosa 1.0 g.

MÉTODOS

- 1.- Inocular por asada un tubo de ensaye conteniendo 10 ml de Caldo Luria, empujando la cepa de *Escherichia coli*. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2.- Verificar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en el matraz nefelométrico, habiendo calibrado el aparato previamente con agua destilada. El valor obtenido deberá sustrarse a cada una de las lecturas subsiguientes y la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transfiera asepticamente 1 ml del cultivo de toda la noche al matraz nefelométrico y registre inmediatamente la turbidez. Esta se considerará la lectura al tiempo 0.
- 4.- A la vez realice una cuenta viable del inóculo procediendo como sigue: prepare diluciones seriadas del cultivo de toda la noche y luego transfiera por duplicado 0.1 ml de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ a pares de tubos de agar plático previamente fundidos y mantenidos en baño de agua a 45°C. De inmediato mezcle homogéneamente y vacíe todo el contenido de los tubos sobre la superficie de Agar Nutritivo contenido en cajas de Petri. Permita que se solidifique e incube las cajas a 37°C durante 24°C invirtiendo.

- 5.- Una vez hecha la lectura del matraz nefelométrico, incubelo con agitación a 37°C durante 13 horas.
- 6.- Cada hora registrar la turbidez del cultivo al fotocolorímetro y anotar sus lecturas.
- 7.- Entre las 3 - 5 horas de incubación, realizar nuevamente una cuenta viable pero ahora del cultivo en crecimiento, para ello proceda conforme se indicó en el inciso 4, pero para el vaciado en placa utilice las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ del cultivo.

Fase Estacionaria: _____

RESULTADOS

- 1.- En la siguiente tabla registre las lecturas ya corregidas de la turbidez observada por su cultivo.

Temperatura de incubación: _____

TIEMPO (h)	UNIDADES KLETT (U.K.)	log U.K.
0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		