

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 0.9 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		

- 2.- 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 viva. En la hora del cultivo en crecimiento, para ello proceda conforme se indicó en el inciso 4, pero para el vechado en placa utilice las divisiones 10⁻⁸ y 10⁻⁹ del cultivo.

RESULTADOS

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

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

2.- Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel semilogaritmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscissas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Procure rotular correctamente su figura.

3.- Localice en la gráfica las diferentes fases de crecimiento, e indique enseguida su duración:

- Fase Lag : _____
- Fase Exponencial : _____
- Fase Estacionaria : _____

4.- Registre tambien los siguientes datos:

- Medio de Cultivo : _____
- Temperatura de Incubación: _____
- Agitación : _____

5.- Analice su gráfica, determine que puntos corresponden a la fase exponencial de crecimiento y complete el siguiente cuadro considerando como X al tiempo en horas y Y al logaritmo de las Unidades Klett. Somete esos datos a regresión lineal para obtener la pendiente que es la que representa la velocidad de crecimiento (μ).

Tiempo (h) X	log U.K. Y	X ²	XY	Y ²
$\Sigma X =$	$\Sigma Y =$	$\Sigma X^2 =$	$\Sigma XY =$	$\Sigma Y^2 =$
n =				

2.- Grafique los datos de la tabla anterior utilizando la hoja de papel semi-logarítmico que proporcionamos enseguida. Coloque en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas las Unidades Klett. Procure rotular correctamente su figura.

3.- Localice en la gráfica las diferentes fases de crecimiento, e indique enseguida su duración:

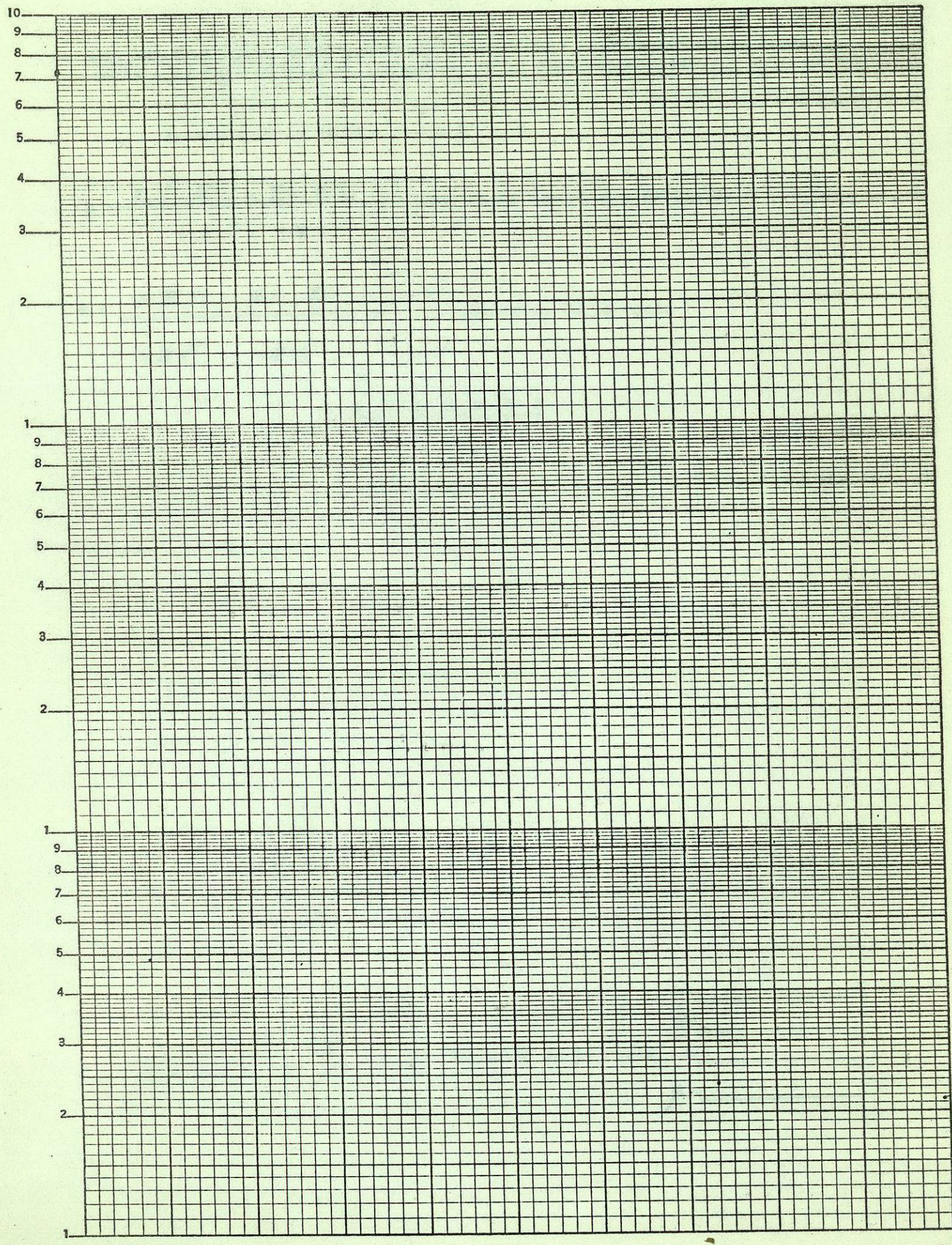
Fase Lag : _____
 Fase Exponencial : _____
 Fase Estacionaria : _____

4.- Registre también los siguientes datos:

Medio de Cultivo : _____
 Temperatura de Incubación : _____
 Agitación : _____

5.- Analice su gráfica, determine que puntos corresponden a la fase exponencial de crecimiento y complete el siguiente cuadro considerando como X al tiempo en horas y Y el logaritmo de las Unidades Klett. Son meta esos datos a regresión lineal para obtener la pendiente que es la que representa la velocidad de crecimiento (μ).

Tiempo (h) X	log U.K. Y	$\sum X$	$\sum Y$	$\sum XY$	$\sum X^2$	$\sum Y^2$
$\sum X =$	$\sum Y =$	$\sum X^2 =$	$\sum Y^2 =$	$\sum XY =$	$\sum X^2 =$	$\sum Y^2 =$
$n =$						



6.- Con las ecuaciones dadas a continuación obtenga la ecuación de la línea recta a la cual se ajustan los puntos de la fase exponencial. *Es importante señalar el tipo de logaritmo empleados en su cálculo. Independientemente, las unidades de p son siempre h⁻¹ o min⁻¹.*
 Ecuación de la recta: $Y = m X + b$

$$b = \frac{\sum X^2 \sum Y - \sum X \sum XY}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{Intersecto con el eje de las Y}$$

$$m = \frac{N \sum XY - \sum X \sum Y}{N \sum X^2 - (\sum X)^2} = \text{pendiente de la recta}$$

C A L C U L O S

Td= _____
 Z= _____

8.- Obtenga el número de células/ml presentes en el inóculo; para ello proceda llenando los bloques que se proporcionan a continuación con los datos solicitados en la parte superior y realizando las operaciones indicadas en la secuencia.

