

PRACTICA No. 8

EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

Las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente tienen una gran influencia sobre el crecimiento microbiano, la temperatura, el potencial de oxidoreducción, la tensión de CO_2 , presión osmótica, humedad y la aireación son factores externos que deberán ser controlados para que un cultivo se desarrolle en las condiciones adecuadas. El pH es otro de los agentes externos que también afectan la velocidad con que ocurre el crecimiento celular, sin embargo, las bacterias disponen de mecanismos homeostáticos que les permiten mantener constante el pH citoplasmico independientemente de las fluctuaciones que se presenten en el exterior; esta capacidad de regular su pH interno es diferente para cada organismo ya que en muchos de ellos el pH interno varia solo 0.1 unidad por cada unidad de pH que cambie afuera, mientras que en otros se han observado cambios más grandes.

Estudios realizados con un rango amplio de organismos han reconocido que no hay un valor de pH interno al cual se mantenga el citoplasma, -- los organismos acidofílicos exhiben valores de pH interno en el rango de 6.5 a 7.0, los neutrofílicos de 7.5 - 8.0 y los acidofílicos de 9.4 - 9.0.

Esta capacidad regulatoria del pH citoplasmico permite a la mayoría de las bacterias mantener las condiciones intracelulares apropiadas para el funcionamiento de las enzimas involucradas en su metabolismo y por consiguiente sobrevivir ante las alteraciones del pH exterior.

No se ha esclarecido el mecanismo mediante el cual el pH ejerce su efecto sobre la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se ha postulado que quizá ejerza un bloqueo en el transporte de nutrientes a través de la membrana.

Medio Mínimo: contiene por litro de agua destilada MgSO_4 0.2 g; CaCl_2 0.1 g; KH_2PO_4 1.0 g; K_2HPO_4 1.0 g, NH_4Cl 2.0; Glucosa 1.0.

OBJETIVO

Caldo Luria: en un litro de agua destilada se disuelven: peptona 10 g;

En esta práctica nuestra finalidad es estudiar el efecto que tiene el pH sobre el crecimiento bacteriano y determinar los límites del espectro de pH tolerable por Escherichia coli así como su pH optimo de crecimiento.

FUNDAMENTO

1.- Preparar un cultivo de toda la noche, para ello inocular en tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria con una asda de la cepa.

El pH del medio de cultivo no solo determina si una especie microbiana puede o no desarrollarse en un medio particular sino también modifica la velocidad a la cual se replica. La mayoría de los microorganismos de diversos metabolismos y hábitats muestran un crecimiento máximo a pHs cercanos a la neutralidad en tanto que un número reducido lo hacen a valordio contenido en el tubo de ensayo de 15 x 150. El valor obtenido de

PRACTICA No. 8

EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

Las condiciones físico-químicas del medio ambiente tienen una gran influencia sobre el crecimiento microbiano. La temperatura, el potencial de oxidoreducción, la tensión de CO_2 , presión osmótica, humedad y la aireación son factores externos que deben ser controlados para que un cultivo se desarrolle en las condiciones adecuadas. El pH es otro de los agentes externos que también afectan la velocidad con que ocurre el crecimiento celular, sin embargo, las bacterias disponen de mecanismos homeostáticos que les permiten mantener constante el pH citoplasmático independientemente de las fluctuaciones que se presentan en el exterior; esta capacidad de regular su pH interno es diferente para cada organismo ya que en muchos de ellos el pH interno varía solo 0.1 unidad por cada unidad de pH que cambia afuera, mientras que en otros se han observado cambios más grandes.

Estudios realizados con un rango amplio de organismos han reconocido que no hay un valor de pH interno al cual se mantenga el citoplasma. Los organismos acidófilos exhiben valores de pH interno en el rango de 6.5 a 7.0, los neutrofilos de 7.5 - 8.0 y los alcalófilos de 9.4 - 9.6.

Esta capacidad reguladora del pH citoplasmático permite a la mayoría de las bacterias mantener las condiciones intracelulares apropiadas para el funcionamiento de las enzimas involucradas en su metabolismo y por consiguiente sobrevivir ante las alteraciones del pH exterior.

No se ha esclarecido el mecanismo mediante el cual el pH ejerce su efecto sobre la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se ha postulado que quizá ejerza un efecto en el transporte de nutrientes a través de la membrana.

OBJETIVO

En esta práctica nuestra finalidad es estudiar el efecto que tiene el pH sobre el crecimiento bacteriano y determinar los límites del espectro de pH tolerable por *Escherichia coli* así como su pH óptimo de crecimiento.

FUNDAMENTO

El pH del medio de cultivo no solo determina si una especie microbiana puede o no desarrollarse en un medio particular sino también modifica la velocidad a la cual se replica. La mayoría de los microorganismos de diversos metabolismos y hábitos muestran un crecimiento máximo a pHs cercanos a la neutralidad en tanto que un número reducido lo hacen a valo-

res por arriba o abajo de 7. De acuerdo a esta preferencia se les ha denominado organismos neutrofilos, alcalinofilos o acidófilos respectivamente. Cada especie presenta un rango determinado de pH que puede tolerar. El valor mínimo y máximo que delimitan a este espectro es amplio y comprende de 3 - 4 unidades, lo que representa un cambio de diez mil veces en la concentración de H^+ .

Empero, la velocidad máxima de crecimiento se presenta a un valor de pH específico para cada organismo, y a ese valor se le designa como el pH óptimo de crecimiento.

Cuando en el laboratorio inoculamos un microorganismo en un medio de cultivo ajustado al pH óptimo, el crecimiento se inicia rápidamente, pero como resultado del desarrollo celular sobreviene la liberación de metabolitos de desecho que modifican severamente el pH exterior frenando se así la proliferación celular. Para mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango tolerable, se incluyen entre los ingredientes del mismo sustancias como el KH_2PO_4 y el K_2HPO_4 en concentraciones adecuadas de manera que además de servir como fuentes de fósforo desempeñan un papel como reguladores del pH.

MATERIAL Y REACTIVOS

TURBIDEZ REGISTRADA A LOS SIGUIENTES pH (U.K.)

- 6 matraces nefelométricos de 250 ml conteniendo 50 ml de Medio mínimo de Glucosa-Sales, a los cuales se le ajusta el pH con HCl o NaOH a los siguientes valores: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente
- 1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria.
- 1 tubo de 15 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio mínimo
- 1 asa bacteriológica
- 1 mechero
- 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
- 1 incubadora
- 1 fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro verde

Medio Mínimo: contiene por litro de agua destilada MgSO_4 , 0.2 g; CaCl_2 , 0.1 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; K_2HPO_4 , 1.0 g, NH_4Cl , 2.0; Glucosa, 1.0.

Caldo Luria: en un litro de agua destilada se disuelven: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0; NaCl, 10 g.

METODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche, para ello inocular un tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria con una asada de la cepa.
- 2.- Incubar durante toda la noche a 37°C .
- 3.- Examinar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en los matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el medio contenido en el tubo de ensaye de 15 x 150. El valor obtenido de-

berá sustraerse a cada una de las lecturas subsecuentes, la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes, en el medio.

- 4.- En condiciones de esterilidad, inocular los matraces nefelométricos con 1 ml del cultivo de toda la noche y leer inmediatamente la turbidez en un fotocolorímetro equipado con filtro verde.
- 5.- Incubar el matraz a 37°C con agitación durante 12 horas, determinando cada hora la turbidez del cultivo.

RESULTADOS

- 1.- En la tabla siguiente anotar los valores de turbidez registrados por sus cultivos a los pHs examinados.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA A LOS SIGUIENTES pH (U.K.)					
	4.0	5.0	6.0	7.0	7.5	8.0
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

res por arriba o abajo de 7. De acuerdo a esta preferencia se les ha denominado organismos neutrofilos, alcalófilos o acidófilos respectivamente. Cada especie presenta un rango determinado de pH que puede tolerar. El valor mínimo y máximo que delimitan a este espectro es amplio y comprende de 3 - 4 unidades, lo que representa un cambio de diez mil veces en la concentración de H⁺.

Empero, la velocidad máxima de crecimiento se presenta a un valor de pH específico para cada organismo, y a ese valor se le designa como el pH óptimo de crecimiento.

Cuando en el laboratorio inoculamos un microorganismo en un medio de cultivo ajustado al pH óptimo, el crecimiento se inicia rápidamente, pero como resultado del desarrollo celular sobreviene la liberación de metabolitos de desecho que modifican severamente el pH exterior frenando así la proliferación celular. Para mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango tolerable, se incluyen entre los ingredientes del mismo sustancias como el K₂HPO₄ y el K₂HPO₄ en concentraciones adecuadas de manera que además de servir como fuentes de fósforo desempeñen un papel como reguladores del pH.

MATERIAL Y REACTIVOS

2 matraces nefelométricos de 250 ml conteniendo 50 ml de Medio mínimo de Glucosa-Sales, a los cuales se le ajusta el pH con HCl o NaOH a los siguientes valores: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente.

1 tubo de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria.

1 tubo de 15 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio mínimo

1 asa bacteriológica

1 mechero

1 agitador rotatorio con temperatura controlada

1 incubadora

1 fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro verde

Medio Mínimo: contiene por litro de agua destilada MgSO₄ 0.2 g; CaCl₂ 0.1 g; K₂HPO₄ 1.0 g; K₂HPO₄ 1.0 g; NH₄Cl 2.0 g; Glucosa 1.0 g.

Caldo Luria: en un litro de agua destilada se disuelven: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0; NaCl, 10 g.

MÉTODOS

1.- Preparar un cultivo de toda la noche, para ello inocular un tubo de ensaye de 18 x 150 mm conteniendo 10 ml de Caldo Luria con una asada de la cepa.

2.- Incubar durante toda la noche a 37°C.

3.- Examinar al fotocolorímetro la turbidez del medio contenido en los matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el medio contenido en el tubo de ensaye de 15 x 150. El valor obtenido de

para sustrarse a cada una de las lecturas subsiguientes, la diferencia representará la turbidez debida exclusivamente a las células presentes en el medio.

4.- En condiciones de esterilidad, inocular los matraces nefelométricos con 1 ml del cultivo de toda la noche y leer inmediatamente la turbidez en un fotocolorímetro equipado con filtro verde.

5.- Incubar el matraz a 37°C con agitación durante 12 horas, determinando cada hora la turbidez del cultivo.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente anotar los valores de turbidez registrados por sus cultivos a los pHs examinados.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA A LOS SIGUIENTES pH (U.K.)				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

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 la figura y utilizar símbolos distintos para cada curva.

3.- Analice sus graficas, para cada una seleccione los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento y sométalos a regresión lineal para calcular la velocidad de crecimiento (μ). Considere como X al tiempo en horas y como Y al logaritmo de las unidades Klett.

CALCULOS

