

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dunlap, V.J. y L.N. Geonka. 1985. Osmotic Regulation of L-Proline Transport in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 163(1): 298-304.
- 2.- Landfald, B. y A.R. Strom. 1986. Choline-Glycine Betaine Pathway Confers a High Level of Osmotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 165(3): 849-855.
- 3.- Le Rudulier, D. y L. Souillard. 1983. Glycine Betaine an Osmotic Effector in *Klebsiella pneumoniae* and other Members of the *Enterobacteriaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(1): 152-159.
- 4.- Le Rudulier, D., A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith y R.C. Valentine. 1984. Molecular Biology of Osmoregulation. *Science*. 224:1064-1068.
- 5.- Perroud, B. y D. Le Rudulier. 1985. Glycine Betaine Transport in *Escherichia coli*: Osmotic Modulation. *Journal of Bacteriology*. 161(1): 393-401.

PRACTICA No. 10

EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

En el laboratorio al cultivar a los microorganismos tratamos de proporcionarles las condiciones más adecuadas para su desarrollo, estos requerimientos varían intensamente de un organismo a otro, pero en general los requisitos básicos para que ocurra la multiplicación celular incluyen: un medio que contenga los nutrientes indispensables en cantidades apropiadas, una atmósfera, temperatura, presión osmótica, pH, humedad, condiciones de oxidación y aireación adecuadas.

La modificación de cualquiera de estos factores influirá en diferente grado sobre el incremento o decremento de una población bacteriana viable.

OBJETIVOS

La finalidad de este ensayo es hacer crecer una bacteria en distintos medios de cultivo, cada uno de ellos con un número y tipo variable de fuente de carbono, y determinar su influencia sobre la velocidad de crecimiento.

FUNDAMENTO

Al diseñar un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, es conveniente conocer las características fisiológicas y capacidades metabólicas del organismo en particular, no obstante, el medio deberá proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos, a concentraciones que permitan un buen crecimiento, entre estos se incluye la fuente de carbono, fuente de energía, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo, fuente de azufre, nutrientes inorgánicos y factores de crecimiento si es necesario. Adicionalmente se procurará proveer al microorganismo de las condiciones ambientales que favorezcan su proliferación.

Respecto a los materiales nutritivos se ha observado que influyen notablemente sobre la velocidad de crecimiento según sea su concentración y calidad, en cuanto a lo último se ha advertido que cuando el medio contiene un sólo componente como fuente de carbono y energía además de los ingredientes necesarios, la velocidad de crecimiento desarrollada dependerá de las posibilidades de ese compuesto de proporcionar energía para las reacciones celulares y metabolitos carbonados indispensables para el crecimiento, por tal motivo algunas fuentes de carbono favorecen una velocidad mayor que otras.

Cuando se amplía el número de sustratos disponibles como fuente de carbono y energía, la velocidad de crecimiento sufre un incremento sustancial según sea el número de materiales adicionales, esto es debido a que la célula no invierte energía en sintetizarlos sino solamente los toma del medio, por consiguiente, la energía ahorrada en su síntesis se emplea en otros

EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCION

En el laboratorio al cultivar a los microorganismos tratamos de proporcionarles las condiciones más adecuadas para su desarrollo, estos requerimientos varían intensamente de un organismo a otro, pero en general los requisitos básicos para que ocurra la multiplicación celular incluyen: un medio que contenga los nutrientes indispensables en cantidades apropiadas, una atmósfera, temperatura, presión osmótica, pH, humedad, condiciones de oxígeno y reducción y aireación adecuadas.

La modificación de cualquiera de estos factores influirá en diferente grado sobre el incremento o decremento de una población bacteriana viable.

OBJETIVOS

La finalidad de este ensayo es hacer crecer una bacteria en distintos medios de cultivo, cada uno de ellos con un número y tipo variable de fuentes de carbono, y determinar su influencia sobre la velocidad de crecimiento.

FUNDAMENTO

Al diseñar un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano, es conveniente conocer las características fisiológicas y capacidades metabólicas del organismo en particular, no obstante, el medio deberá proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos, a concentraciones que permitan un buen crecimiento, entre estos se incluye la fuente de carbono, fuente de energía, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo, fuente de azufre, nutrientes inorgánicos y factores de crecimiento si es necesario. Adicionalmente se procurará proveer al microorganismo de las condiciones ambientales que favorezcan su proliferación.

Respecto a los materiales nutritivos se ha observado que influyen notablemente sobre la velocidad de crecimiento según sea su concentración y cantidad, en cuanto a lo último se ha advertido que cuando el medio contiene un solo componente como fuente de carbono y energía además de los ingredientes necesarios, la velocidad de crecimiento desarrollada dependerá de las posibilidades de ese compuesto de proporcionar energía para las reacciones celulares y metabólicas indispensables para el crecimiento, por tal motivo algunas fuentes de carbono favorecen una velocidad mayor que otras.

Cuando se sabe el número de sustratos disponibles como fuente de carbono y energía, la velocidad de crecimiento sufre un incremento sustancial según sea el número de materiales adicionales, esto es debido a que las células no invierten energía en sintetizarlos sino solamente los toman del medio, por consiguiente, la energía ahorrada en su síntesis se emplea en otros

procesos dependientes de energía como son la absorción de solutos, síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas, síntesis de estructuras celulares como pared celular, cápsula, membrana, etc. En medios enriquecidos el tiempo promedio de generación se reduce a escasos 15 minutos como ocurre con Salmonella typhimurium.

MATERIAL Y REACTIVOS

7 matraces nefelométricos de 250 ml, conteniendo 25 ml de medio como se indica enseguida:

- MATRAZ 1 : Medio de Glucosa y Sales
- MATRAZ 2 : Medio de Glutamato y sales
- MATRAZ 3 : Medio de Succinato y sales
- MATRAZ 4 : Medio de Lactosa y sales
- MATRAZ 5 : Agua Peptonada
- MATRAZ 6 : Caldo Nutritivo
- MATRAZ 7 : Caldo Infusión cerebro corazón

RESULTADOS

7 tubos de ensayo de 15 x 150 mm conteniendo 10 ml de medio tal y como se indicó anteriormente.

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

- 1 asa
- 1 mechero
- 1 pipeta graduada de 5 ml
- 1 tubo de 13 x 100 con Agar Nutritivo inclinado, conteniendo la cepa de Escherichia coli.
- 1 incubadora
- 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
- 1 fotocolorimetro equipado con filtro verde

Agua Peptonada: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10g; NaCl, 5 g. Los ingredientes se disuelven en agua destilada caliente, se filtra y luego se ajusta el pH a 7.2-7.4.

Medio Mínimo: incluye por litro de agua destilada los siguientes componentes: KH_2PO_4 , 3.0 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.5 g; NaCl, 0.5 g; NH_4Cl , 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg; la fuente de carbono (Glucosa, Succinato de sodio, Glutamato de sodio) 5 g. Ajustar el pH a 7.2.

Caldo Luria: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0 g; NaCl, 10 g.

METODOS

1.- Preparar un cultivo de toda la noche inoculando por asada 10 ml de Caldo Luria contenidos en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Emplear una cepa de E. coli. Incubar durante toda la noche (12-14 horas) a 37°C.

- 2.- Determinar al fotocolorímetro la turbidez de los medios contenidos en los siete matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el tubo de ensaye de 18 x 150 mm que contenga el medio respectivo. La lectura registrada deberá sustraerse de cada una de las lecturas posteriores, la diferencia representará la turbidez debida a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transferir asepticamente a cada uno de los matraces 0.5 ml del cultivo de toda la noche y determinar inmediatamente la turbidez al fotocolorímetro, ésta será la turbidez correspondiente al tiempo cero.
- 4.- Incubar los matraces a 37°C con agitación durante 12 horas, determinando cada hora la turbidez de los cultivos.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente registrar los valores de turbidez mostrados por los cultivos durante la cinética de crecimiento realizada.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA EN LOS MATRACES						
	1	2	3	4	5	6	7
0							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

procesos dependientes de energía como son la absorción de solutos, síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas, síntesis de estructuras celulares como pared celular, cápsula, membrana, etc. En medios enriquecidos el tiempo promedio de generación se reduce a escasos 15 minutos como ocurre con *Salmonella typhimurium*.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 7 matraces nefelométricos de 250 ml, contenido 25 ml de medio como se indica enseguida:
- MATRAZ 1 : Medio de Glucosa y sales
- MATRAZ 2 : Medio de Glutamato y sales
- MATRAZ 3 : Medio de Succinato y sales
- MATRAZ 4 : Medio de Lactosa y sales
- MATRAZ 5 : Agua Peptonada
- MATRAZ 6 : Caldo Nutritivo
- MATRAZ 7 : Caldo Infusión cerebro corazón

- 7 tubos de ensaye de 18 x 150 mm contenido 10 ml de medio tal y como se indica anteriormente.
- 1 tubo de 18 x 150 mm contenido 10 ml de Caldo Luria.
- 1 asa
- 1 mechero
- 1 pipeta graduada de 5 ml
- 1 tubo de 13 x 100 con Agar Nutritivo inclinado, contenido la cepa de *Escherichia coli*.
- 1 incubadora
- 1 agitador rotatorio con temperatura controlada
- 1 fotocolorímetro equipado con filtro verde

Agua Peptonada: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10g; NaCl, 5 g. Los ingredientes se disuelven en agua destilada caliente, se filtra y luego se ajusta el pH a 7.2-7.4.

Medio Mínimo: incluye por litro de agua destilada los siguientes componentes: KH₂PO₄, 3.0 g; Na₂HPO₄, 2.0 g; NaCl, 0.5 g; NH₄Cl, 1.0 g; MgSO₄, 0.12 g; CaCl₂, 2.0 g; FeSO₄, 0.05 g; la fuente de carbono (Glucosa, Succinato de sodio, Glutamato de sodio) 5 g. Ajustar el pH a 7.2.

Caldo Luria: contiene por litro de agua destilada: peptona, 10 g; extracto de levadura, 5.0 g; NaCl, 10 g.

MÉTODOS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche inoculando por asada 10 ml de Caldo Luria contenidos en un tubo de ensayo de 18 x 150 mm. Empiezar una cepa de *E. coli*. Incubar durante toda la noche (12-14 horas) a 37°C.

- 2.- Determinar al fotocolorímetro la turbidez de los medios contenidos en los siete matraces nefelométricos, calibrando previamente el aparato con el tubo de ensayo de 18 x 150 mm que contiene el medio respectivo. La lectura registrada deberá sustrarse de cada una de las lecturas posteriores, la diferencia representará la turbidez debida a las células presentes en el caldo.
- 3.- Transferir asepticamente a cada uno de los matraces 0.5 ml del cultivo de toda la noche y determinar inmediatamente la turbidez al fotocolorímetro, ésta será la turbidez correspondiente al tiempo cero.
- 4.- Incubar los matraces a 37°C con agitación durante 12 horas, determinar de cada hora la turbidez de los cultivos.

RESULTADOS

1.- En la tabla siguiente registrar los valores de turbidez mostrados por los cultivos durante la cinética de crecimiento realizadas.

TIEMPO (h)	TURBIDEZ REGISTRADA EN LOS MATRACES						
	1	2	3	4	5	6	7
0							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

- 2.- En la hoja de papel semilogarítmico grafique los datos de la tabla anterior colocando en las abscisas el tiempo en horas y en la ordenadas las Unidades Klett. Rotule correctamente la figura y emplee símbolos distintos para cada curva señalándolo apropiadamente en el pie de figura.
- 3.- Analice sus gráficas, 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