



CRECIMIENTO BACTERIANO

Microbiología General
TULB-2018

Objetivos



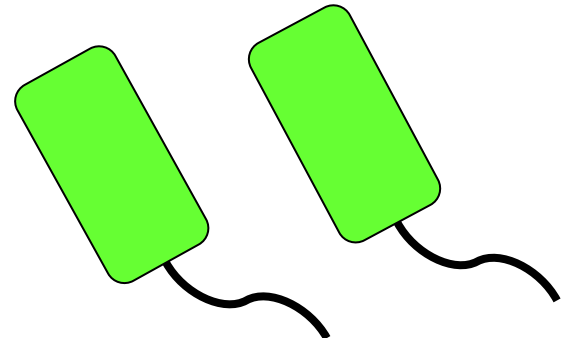
- ❑ -Entender los mecanismos de crecimiento
- ❑ Conocer los tipos de crecimiento
- ❑ -Describir las fases del crecimiento
- ❑ -Describir la cinética del crecimiento poblacional
- ❑ -Describir los factores que afectan al crecimiento
- ❑ - Evaluar formas de medición del crecimiento

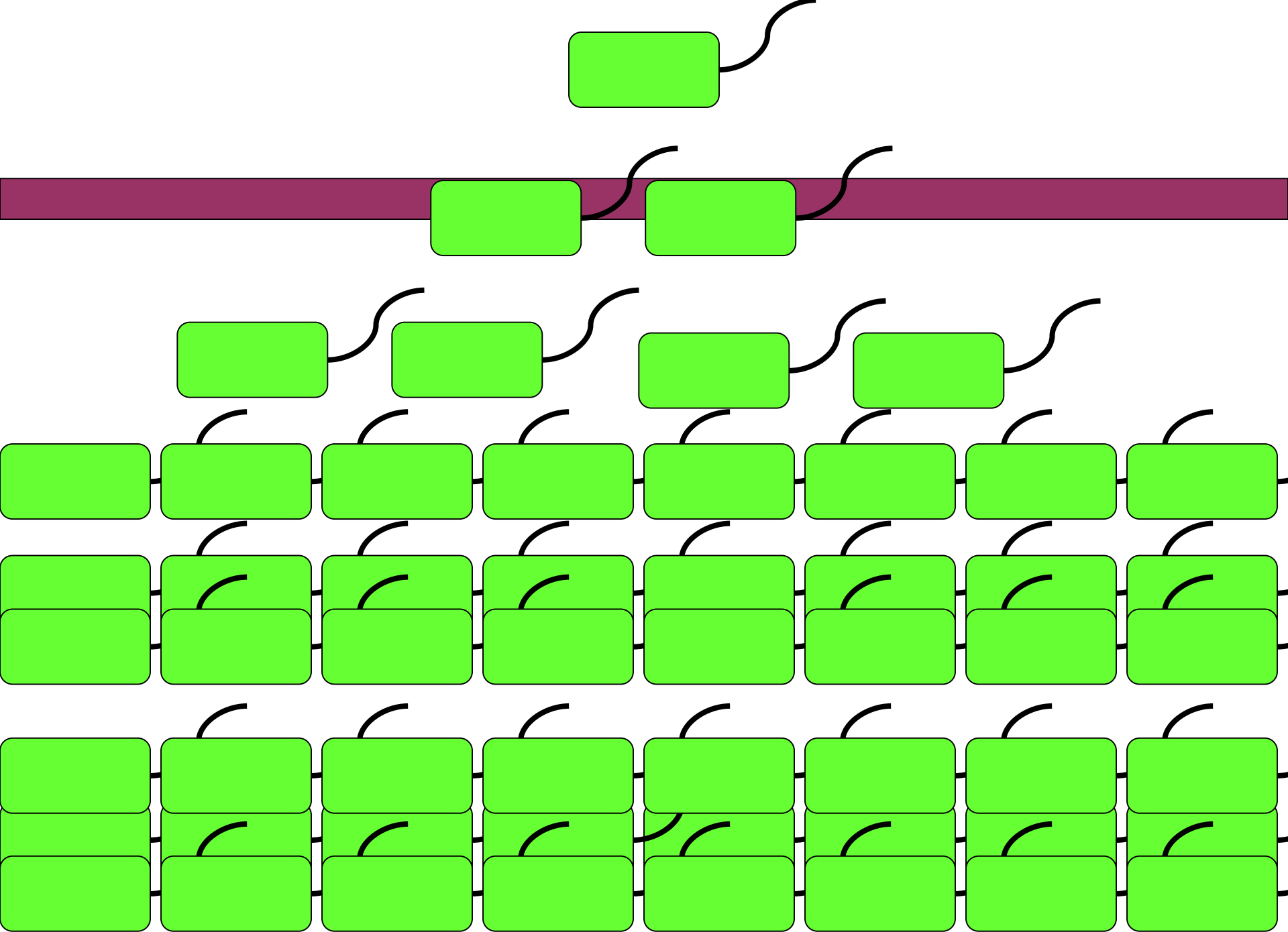


30 años



30 minutos



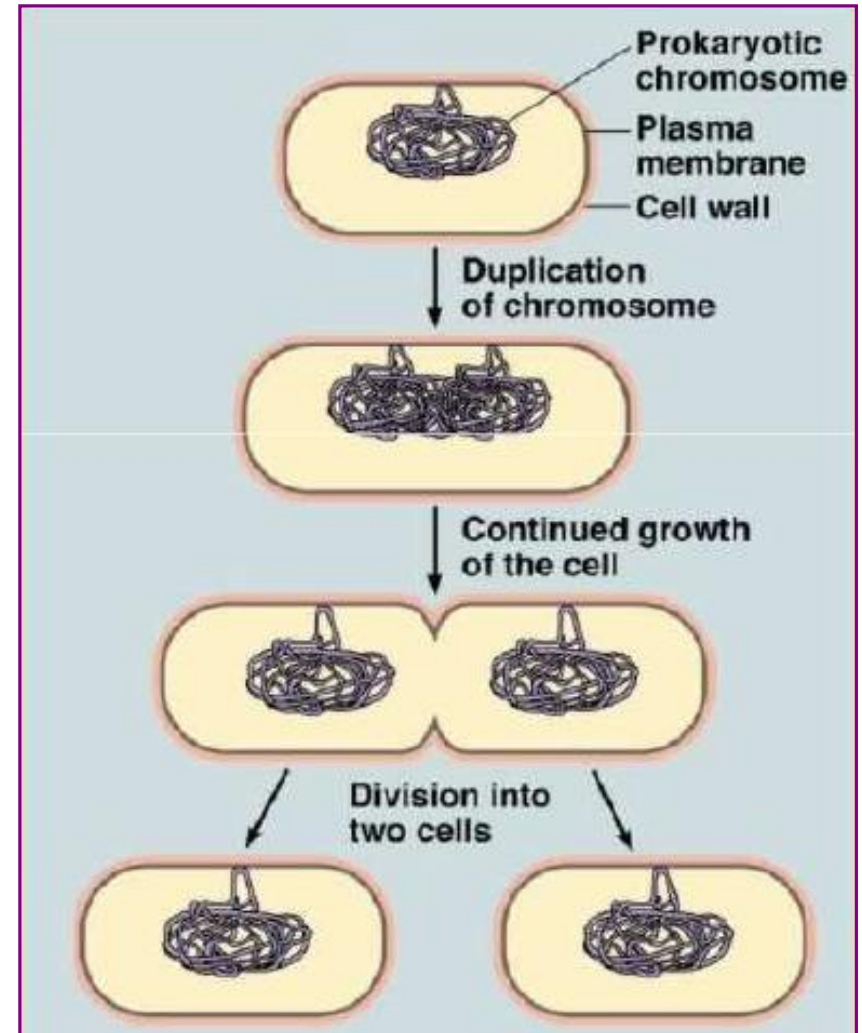


Conceptos



❑ Multiplicación bacteriana: fisión simple o binaria

- ❑ Elongación
- ❑ Auto duplicación de ADN cromosómico
- ❑ Tabicado central
- ❑ Invaginación membrana celular
- ❑ Síntesis de pared



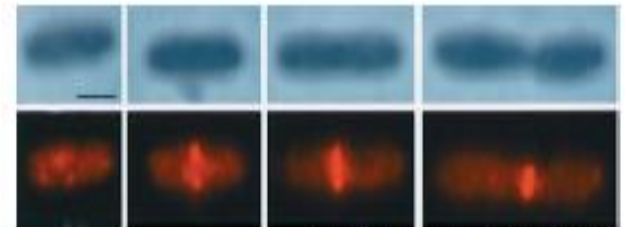
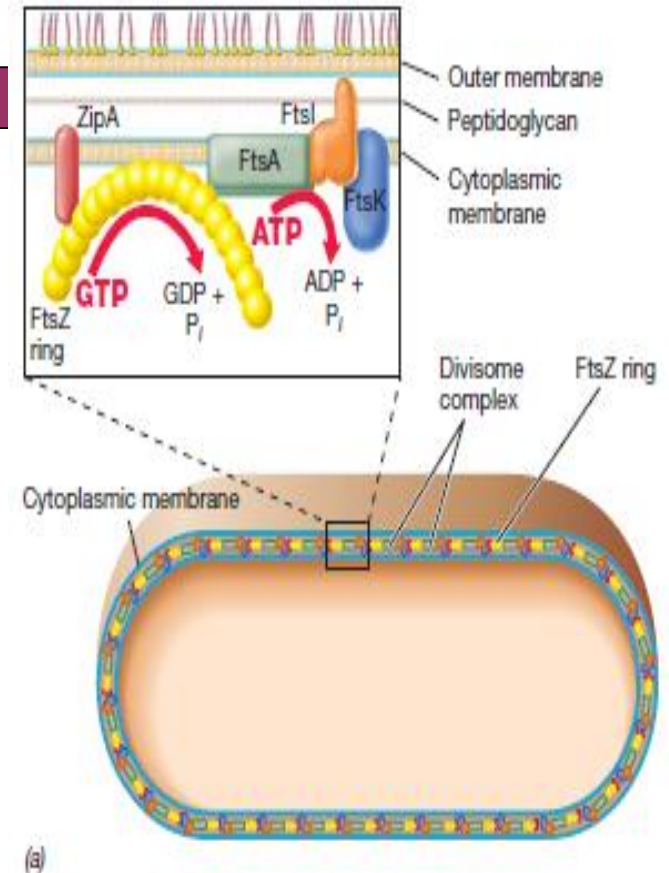
Proteínas Fts y división celular

Son esenciales las proteínas Fts (Filamentous temperature sensitive) presentes en todos los procariotas

Las proteínas Fts forman un aparato de división: **divisoma**, después que comenzó la elongación y que el DNA inició la duplicación.

- 1) En células bacilares de *E. coli*, la formación del divisoma comienza con la unión de moléculas de FtsZ formando un anillo alrededor del cilindro celular en el centro de la célula.
- 2) Se acercan otras proteínas del divisoma FtsA que recluta otras proteínas y ZipA que permite el anclaje del anillo FtsZ y su estabilización a la membrana
- 3) FtsI proteínas necesarias para la síntesis del peptidoglicano

El divisoma dirige la síntesis de membrana y pared celular del septo de división hasta que la célula alcanza el doble de longitud.



T. den Blaauwen & Nanne Nanninga, Univ. of Amsterdam

Duplicación del DNA, proteínas Min y división celular

La duplicación del DNA ocurre previamente a la formación del anillo FtsZ; que se forma en el espacio entre los nucleoides duplicados.

La localización del punto medio se debería a proteínas MinC, MinD y MinE.

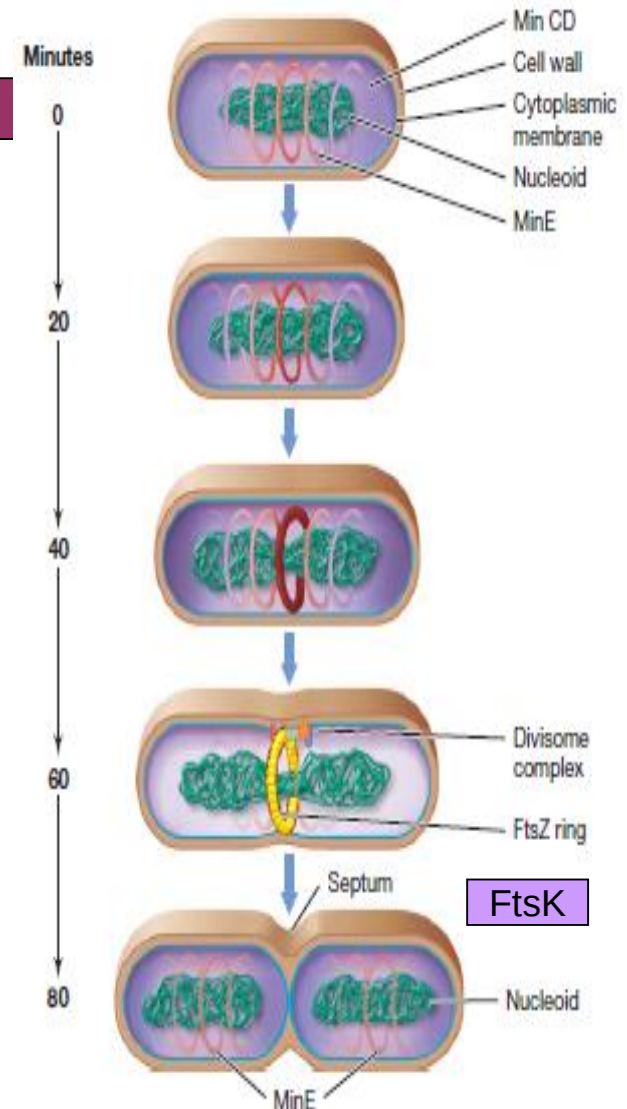
MinD forma una estructura en espiral en la sup de la membrana citoplasmática y se mueve de un polo a otro. Colabora en la unión de MinC a la membrana. Ambas inhiben la formación de FtsZ.

MinE también se mueve de polo a polo barriendo en su movimiento a MinC y MinD, permitiendo que se concentren en los polos por lo que el ensamblaje del anillo FtsZ se sitúa en el centro.

FtsK participa de la elongación celular y formación del septo.

Las copias del cromosoma se separan y el anillo FtsZ se despolimeriza e inicia síntesis de pared celular que forma el septo y sella la unión de una célula con otra

FtsZ tiene actividad enzimática e hidroliza GTP liberando energía necesaria para polimerización y despolimerización del anillo FtsZ



MreB y determinantes de la morfología celular

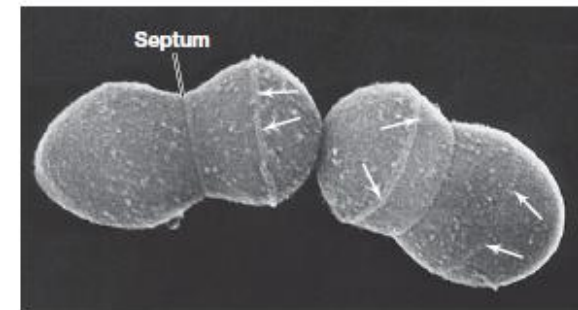
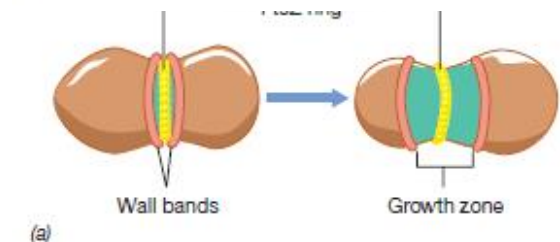
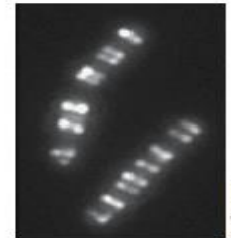
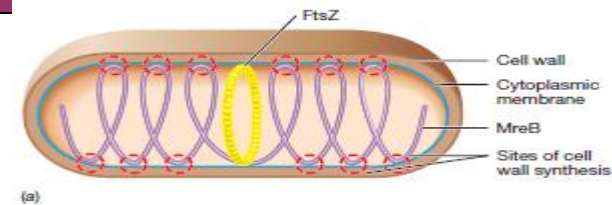
La principal proteína que determina la forma en procariotas es MreB que forma un citoesqueleto similar a la actina. Se dispone en bandas filamentosas en espiral por el interior de la célula, debajo de la membrana celular.

Cómo se determina la forma celular?

- 1) MreB forma una estructura helicoidal que rota en la célula en crecimiento
- 2) El peptidoglicano recién sintetizado se asocia con las hélices de MreB que hacen contacto con la membrana citoplasmática. Varios sitios específicos de síntesis de pared y otros componentes a lo largo del cilindro de la célula bacilar en lugares diferentes del sitio FtsZ.

En células esféricas: (cocos)

- 1) En células esféricas tiene una sola localización definida por fuera del sitio FtsZ
- 2) Mediante rotación a lo largo del eje mayor ocurre la elongación con síntesis de nueva pared

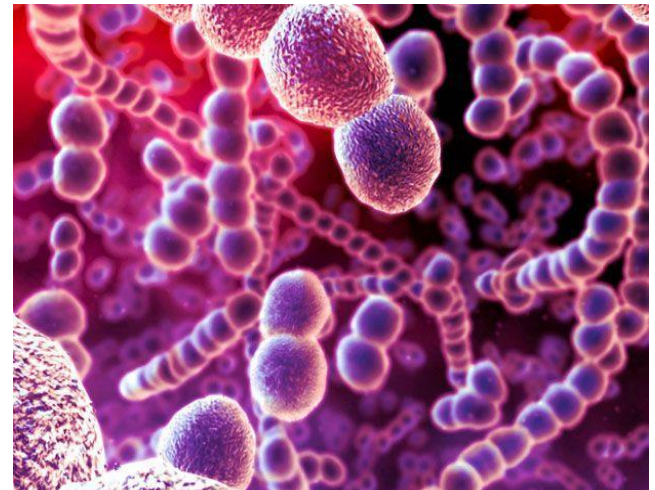


Conceptos



El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo.

En organismos unicelulares el crecimiento conduce a un aumento en el número de células más que un aumento en el tamaño celular



Conceptos



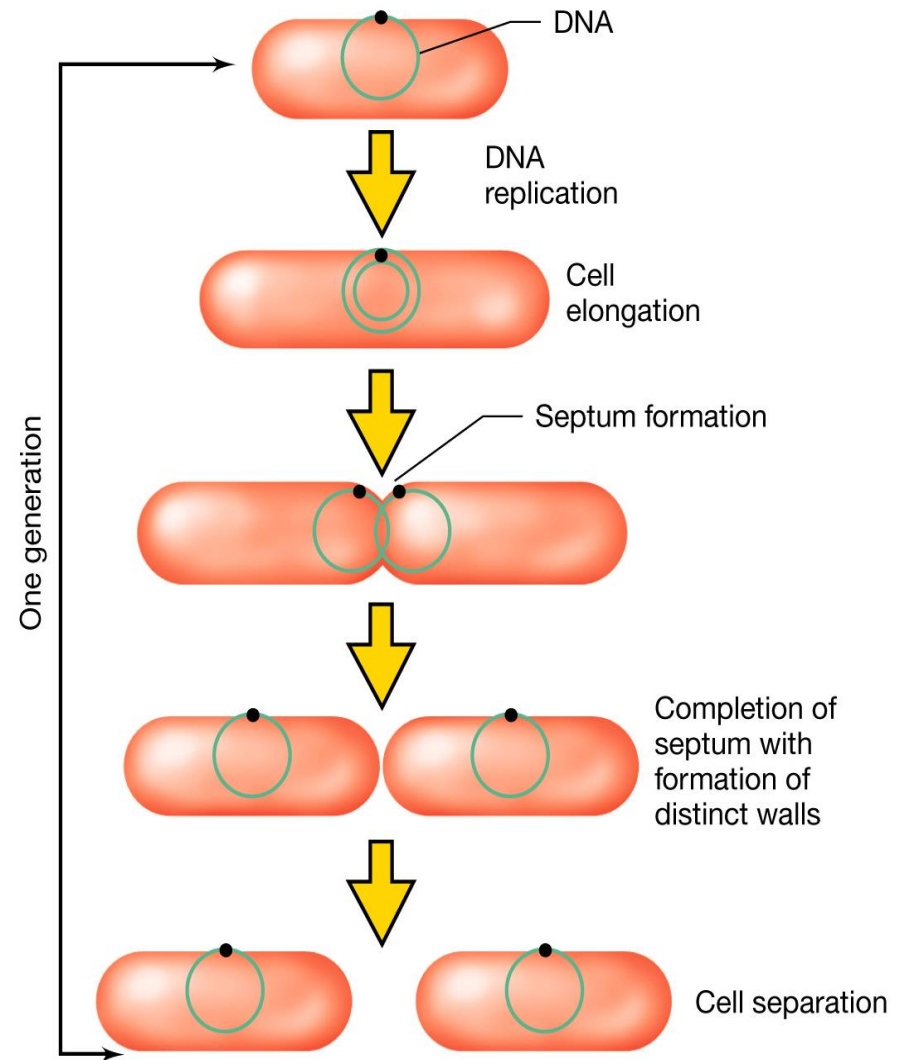
Crecimiento Microbiano:

Cambio en el número de células por una unidad de tiempo determinada.

Tiempo de generación (duplicación) t_d o t_g :

Tiempo requerido para que una célula se divida en dos.

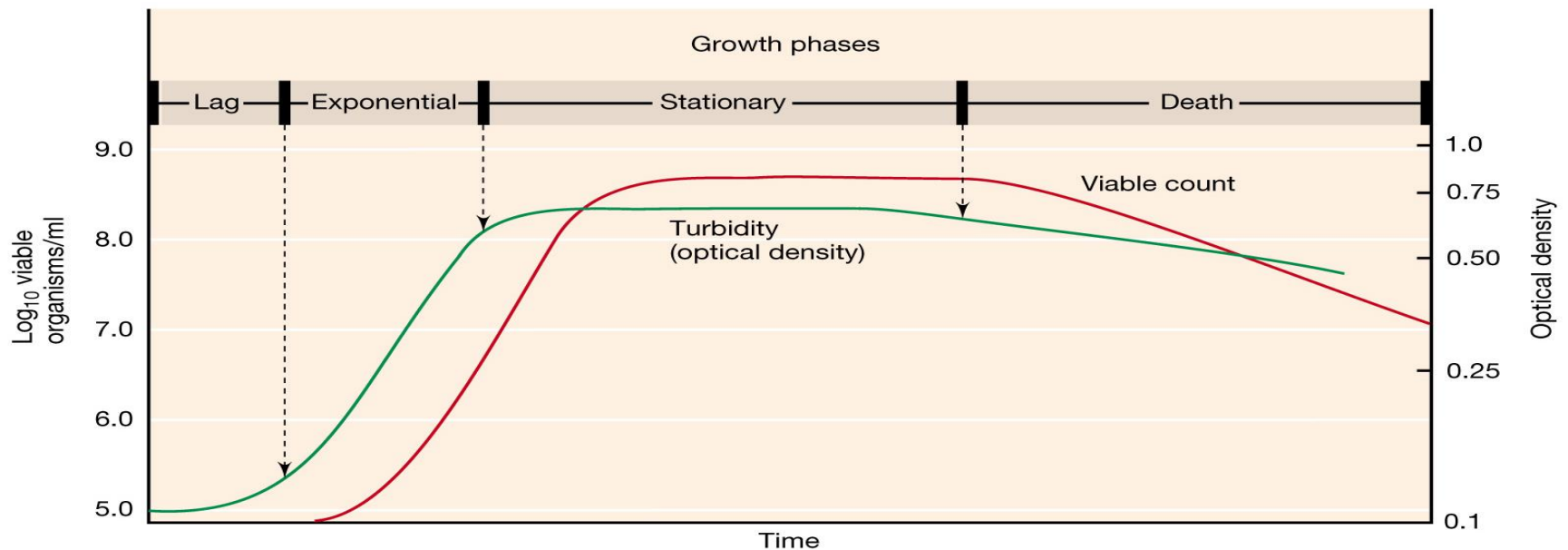
El tiempo puede ser minutos, hora o días.



Curva de crecimiento



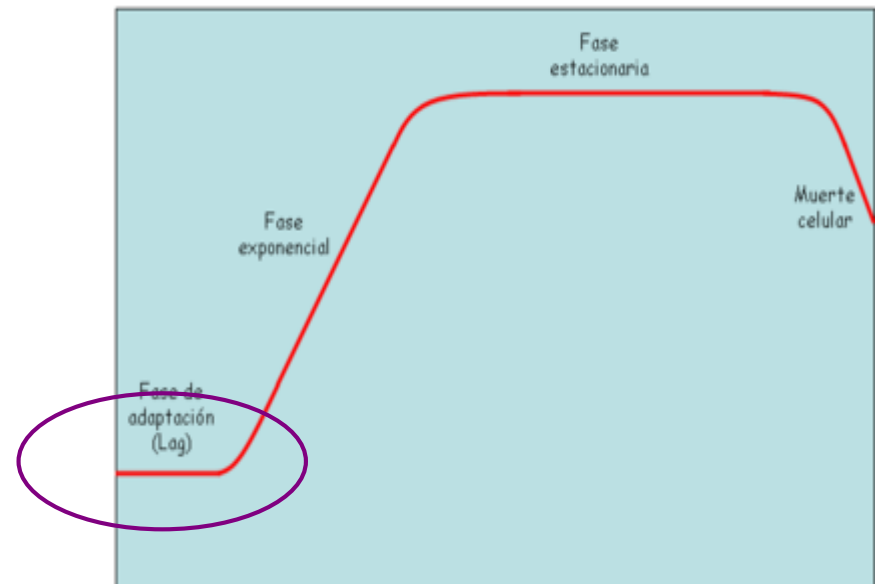
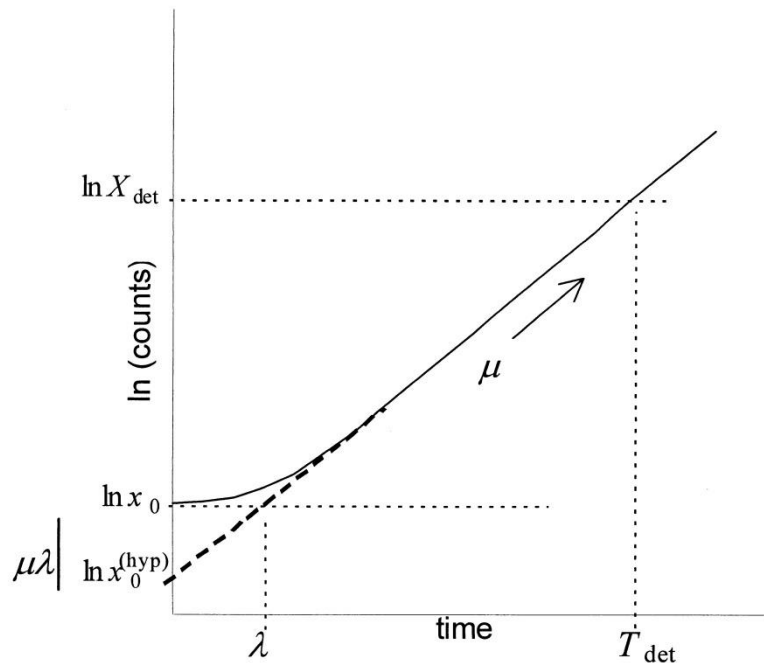
- Bacteria en medio adecuado → dinámica de crecimiento poblacional
- Gráfico de coordenadas: número de bacterias (logaritmo) versus lapso de tiempo.
- Distinta para cada bacteria
- En todas se identifican cuatro etapas



Fase lag



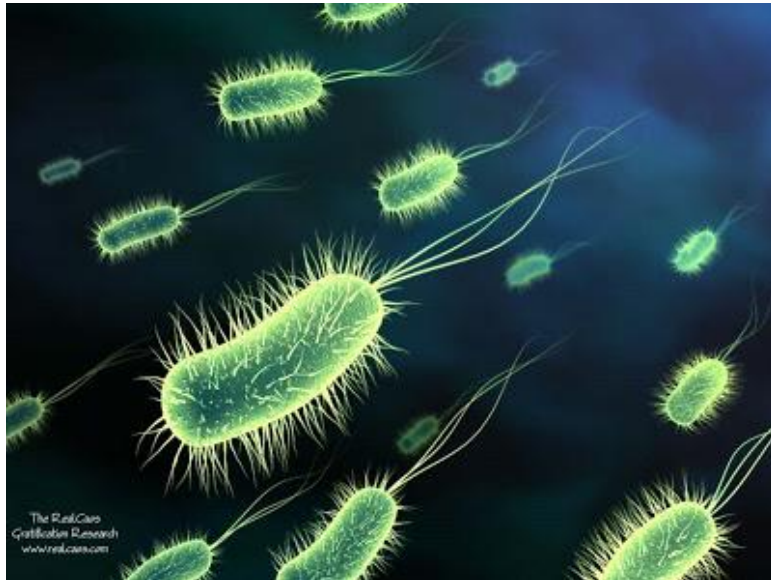
- El número de microorganismos no varía
- Adaptación al medio, producción de enzimas
- Tiempo variable: entre una hora a días.



Tiempo de generación



- Tiempo necesario para la duplicación celular
- Distintivo de cada especie
- Pueden influir factores estimulantes
- Variable: 20 min- 24 h (*Escherichia coli*)



Tiempo de generación de algunas bacterias en condiciones óptimas de cultivo.

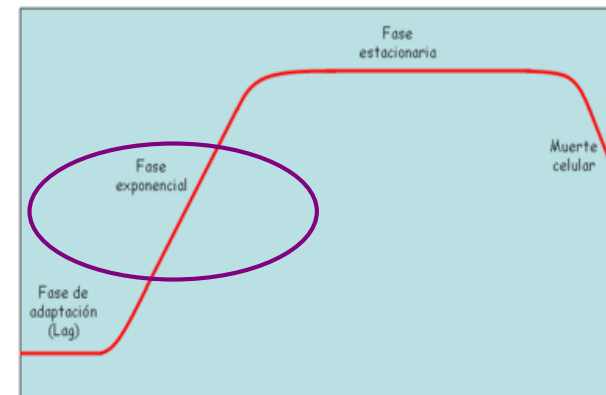
Bacteria	Medio	Tiempo gen (min)
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa sales	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sacarosa sales	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Leche	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Caldo de lactosa	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Extr. Manitol levadura	344-461
<i>M. tuberculosis</i>	Sintético	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Testículo ratón	1980

Fase exponencial



Se caracteriza por:

- su duración
- el tiempo medio de generación o duplicación (g): tiempo necesario para que la población doble su tamaño
- la velocidad específica máxima de crecimiento ó constante de velocidad de crecimiento ó constante de crecimiento (abreviada como μ): proporción en la que aumenta la población por unidad de tiempo
- frecuentemente también se expresa el crecimiento como generaciones por hora

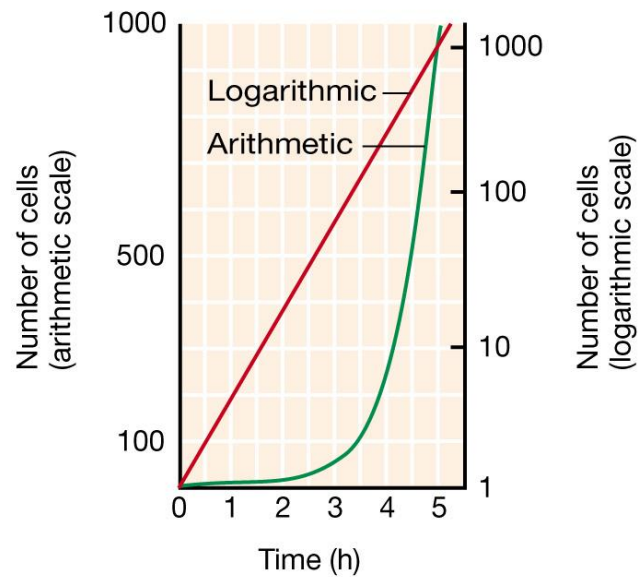


Cálculos



Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256
0.5	2	4.5	512
1	4	5	1,024
1.5	8	5.5	2,048
2	16	6	4,096
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576

(a)



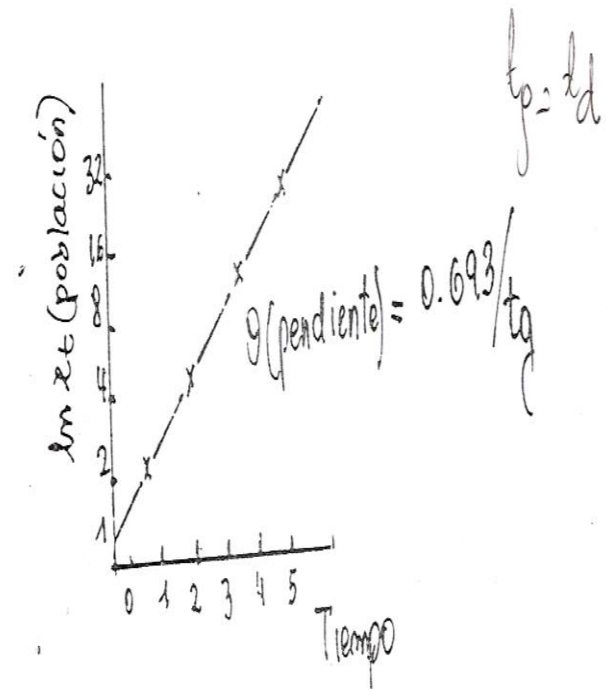
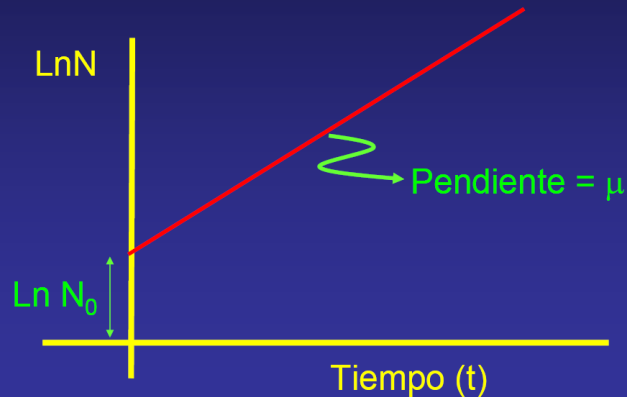
Cinética: Crecimiento exponencial



$$X = X_0 \cdot 2^n \quad \text{tomando ln}$$
$$\ln X = \ln X_0 + n \ln 2$$
$$\ln X = \ln X_0 + n 0,693 \quad n = t/t_g$$
$$\ln X = \ln X_0 + 0,693 \cdot t/t_g$$

Cinética del crecimiento

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$



Cálculo de tiempo de duplicación: $\ln 2/\mu$

Velocidad de crecimiento



$$\frac{\delta x}{\delta t} \propto x_0 \longrightarrow \frac{\delta x}{\delta t} = \mu x_0 \longrightarrow \frac{\delta x}{x_0} = \mu \delta t \quad (1)$$

Siendo μ = velocidad específica de crecimiento

Sentido biológico de μ

$$[\mu] = h^{-1} \quad \frac{\delta x}{\delta t} \cdot \frac{1}{x_0}$$

Nº de individuos producidos por cierto número ya existente por unidad de tiempo

Integrando (2) entre $t=0$ y $t=t$ tomando logaritmo natural

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (2)$$

Ecuación general de cultivo en fase exponencial

$$\text{Para } t = t_d \longrightarrow x_r = 2 x_0$$

$$\ln 2 x_0 = \ln x_0 + \mu t$$
~~$$\ln 2 + \ln x_0 = \ln x_0 + \mu t$$~~

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0,693}{t_d} \quad A > \mu < t_d$$

Algunas sugerencias al graficar:

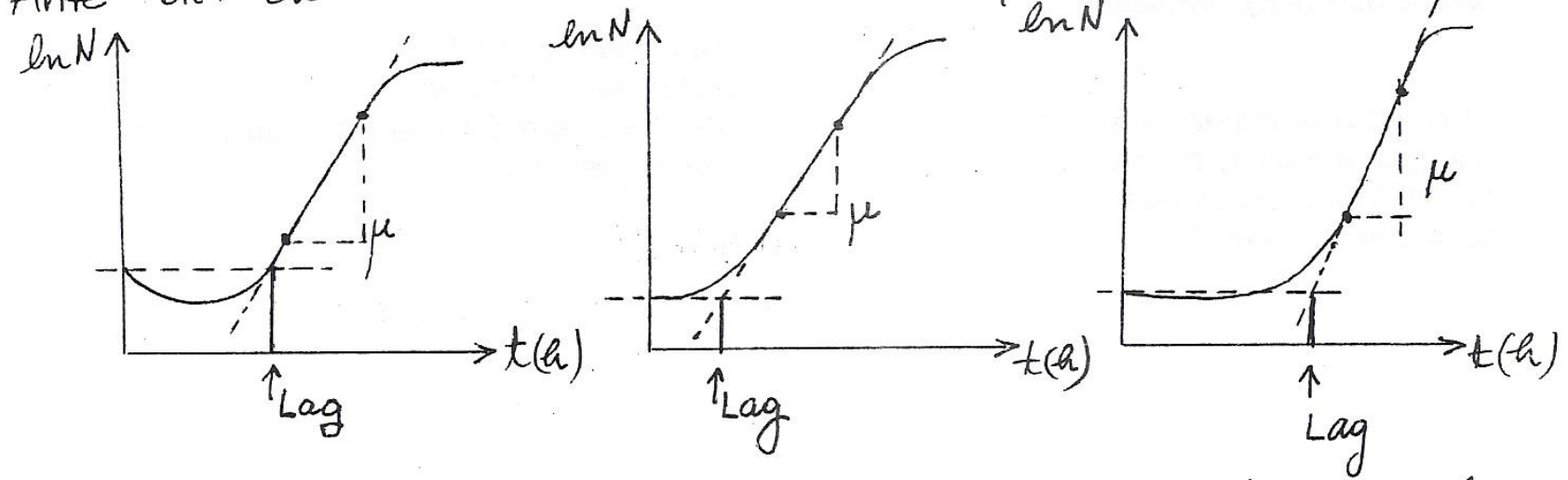
-La escala del eje “y” debe ser más amplia que la del eje “x”, para que la gráfica obtenga más definición en los puntos.

Ej.: eje x, 1 cm = 1 hora eje y, 1 unidad ln biomasa $\geq$ 2 cm

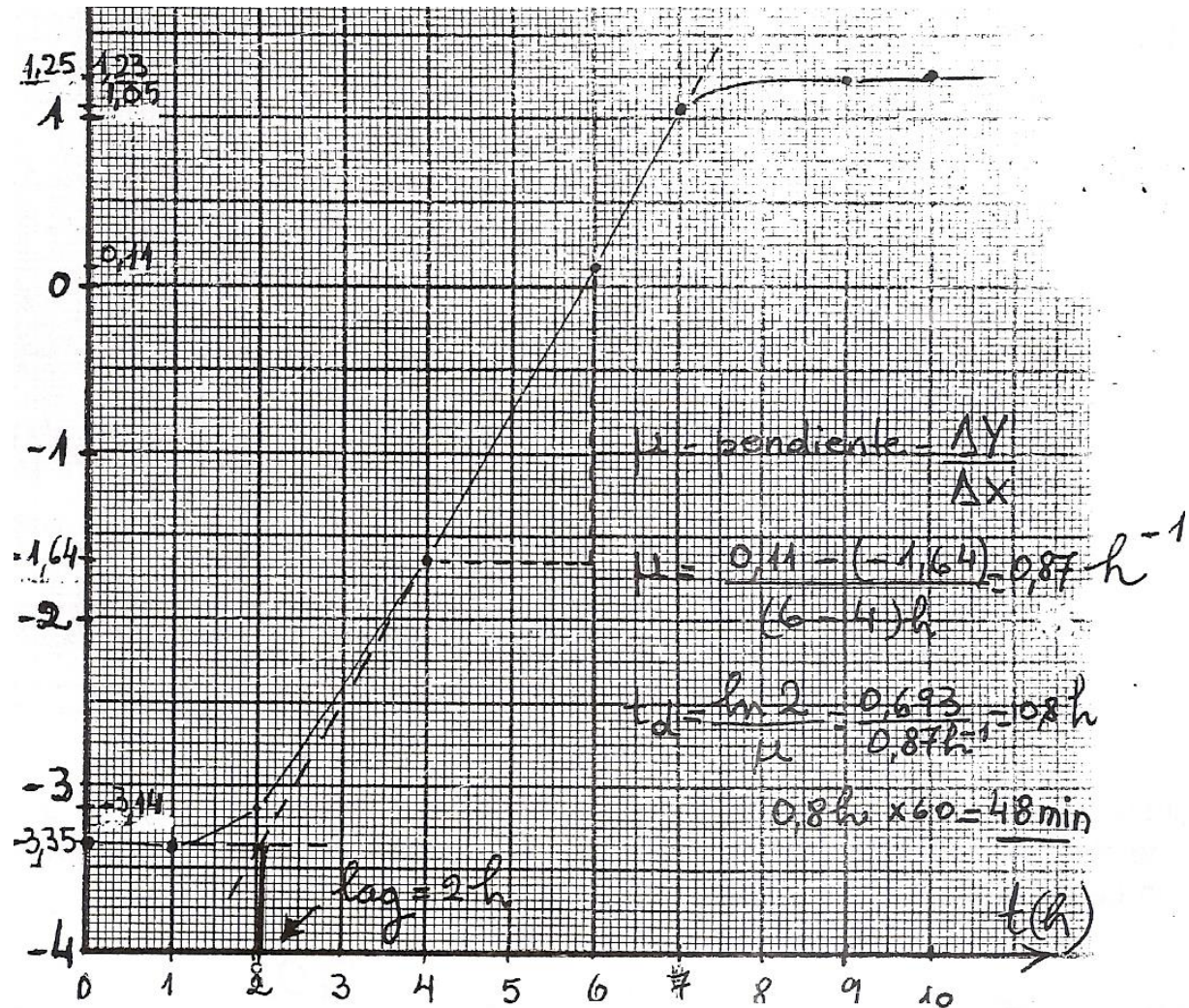
siempre calcular μ a partir de puntos que se encuentren en plena recta de fase exponencial

-Cómo dibujar fase lag:

Ante diferentes situaciones, como proceder.



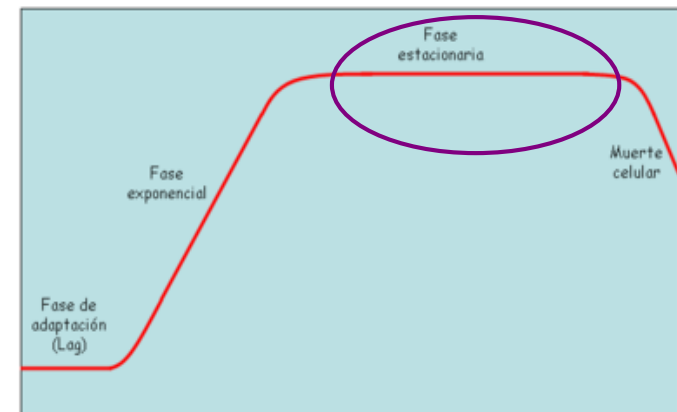
Cálculos desde el gráfico:



Fase estacionaria



- En determinado punto el crecimiento disminuye
- La población no aumenta
- Actividad metabólica mas lenta
- Producción de metabolitos secundarios
 - Antibióticos
 - Toxinas
- Fase de Esporogénesis para las especies productoras de esporas



Fase de declinación o muerte



- ❑ Recuento de células disminuye sensiblemente
- ❑ El numero de células muertas supera al número de células vivas
- ❑ Acumulación de productos tóxicos
- ❑ Disminución de nutrientes



Sistemas de cultivo

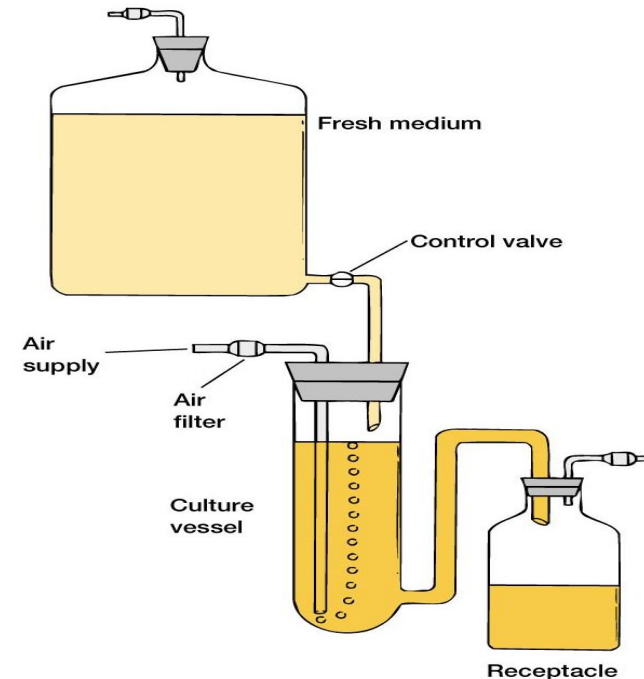


Sistema batch o cerrado

Se toman muestras del cultivo a diferentes tiempos y se estima **la biomasa** en cada momento.

Cultivo continuo

- crecimiento en un sistema abierto
 - se realiza un suministro constante de nutrientes
 - se realiza una eliminación continua de residuos
- mantiene las células en fase logarítmica/exponencial a una concentración constante de biomasa durante largos periodos de tiempo
- esto se logra empleando un *sistema de cultivo continuo*
 - Quimiostatos
 - Turbidostatos

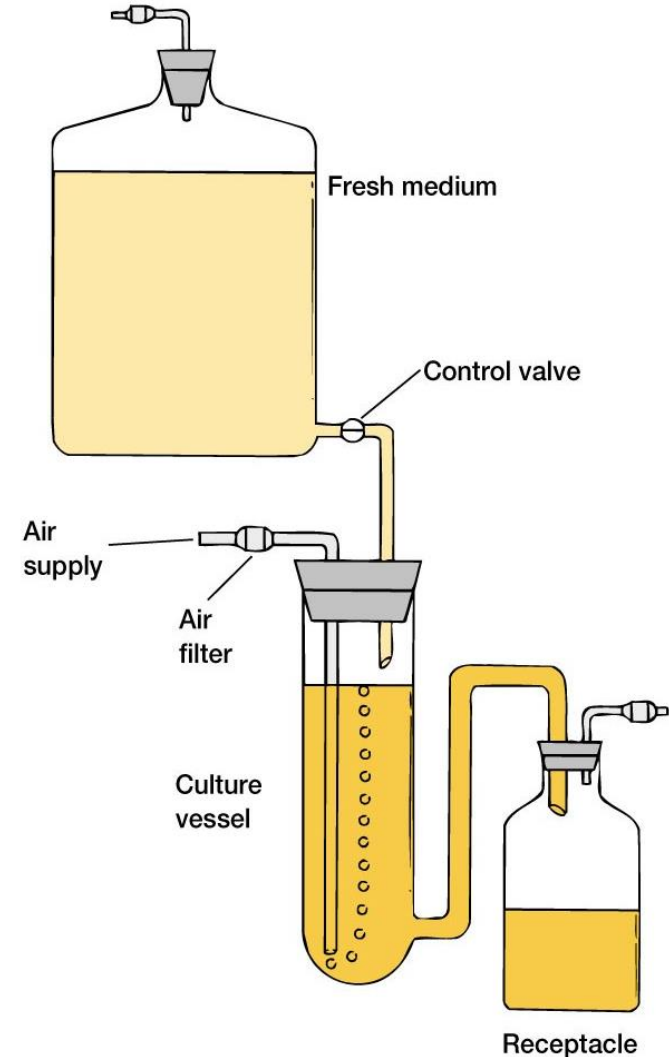


Introducción



El quimiostato

- la velocidad a la que se añade el medio fresco al cultivo es igual que la velocidad a la que se elimina el medio del cultivo
- un nutriente esencial está en cantidades limitantes

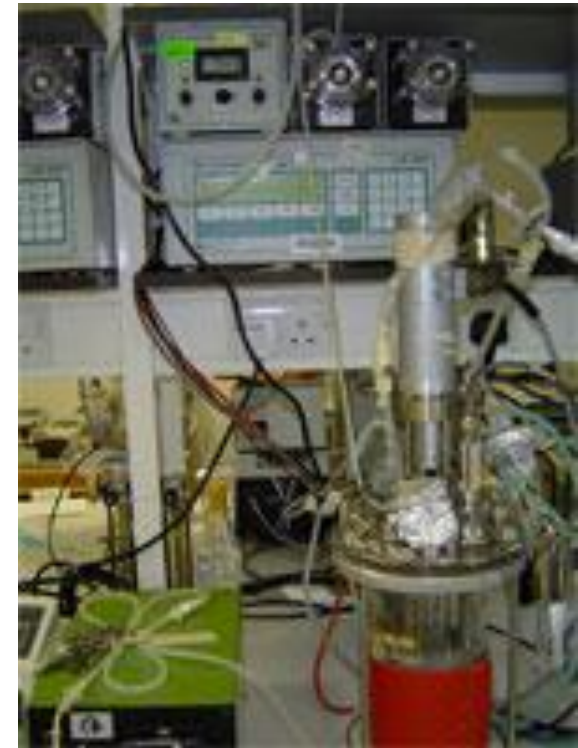


Importancia de los cultivos continuos.

Usos del quimiostato



- Se puede obtener un suministro constante de células creciendo en fase exponencial a una velocidad conocida: producción de biomasa
- Se puede estudiar el crecimiento de microorganismos a muy baja concentración de nutrientes, similar a la de ambientes naturales
- Estudios genéticos: producción de mutación; selección de cepas
- Estudios ecológicos: estudiar la interacción de microorganismos bajo condiciones parecidas a las encontradas en medios acuáticos
- Estudios fisiológicos: Síntesis de ácidos nucleicos y proteínas
- Fundamentales en biotecnología y microbiología industrial y de los alimentos
 - Producción de metabolitos primarios (etanol, ácido láctico, acetona, butanol)
 - Transformaciones químicas: esteroides



Cálculos



Regulación del quimiostato

- 1) Ritmo de Flujo: regula la velocidad de dilución D

$$D = \frac{F}{V} \left[\frac{1/h}{1} \right] = [D] = h^{-1}$$

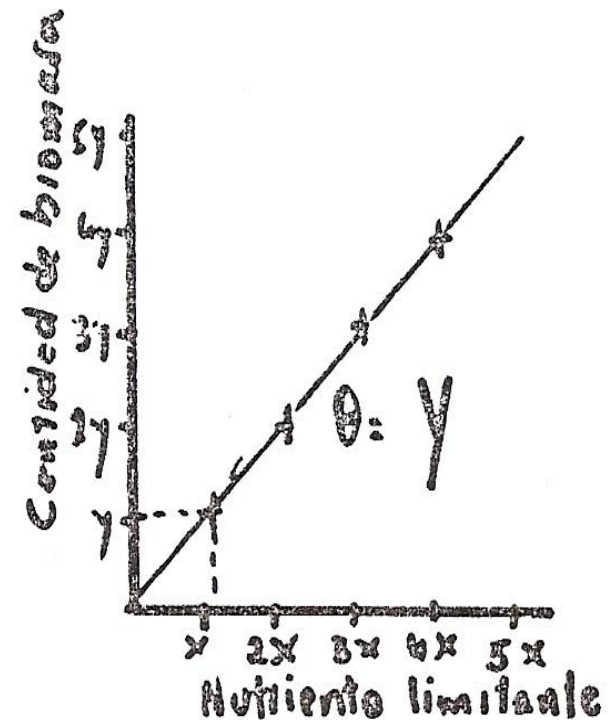
- 2) Concentración de sustrato limitante: determina la cantidad de biomasa formada

$$X_f \sim S_r$$

$$X_f = Y \cdot S_r$$

$$[Y] = \frac{\text{g de biomasa}}{\text{g de sustrato consumido}}$$

RENDIMIENTO DEL CRECIMIENTO



X_f : concentración de biomasa en el equilibrio
 S_r : concentración de sustrato en el reservorio

Rendimiento:



$$Y = - \Delta X / \Delta S = - \frac{(\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial})}{(\text{sustrato final} - \text{sustrato inicial})}$$

g de biomasa
g de sustrato consumido

Importante: Y siempre **debe ser positivo**

Concentración de sustrato limitante, determina la cantidad de biomasa formada

CULTIVO CONTINUO:

Relación entre velocidad de dilución y velocidad de crecimiento

Velocidad de cambio de biomasa = Velocidad de producción - Velocidad de eliminación

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - D \cdot x$$



$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - D)$$

$$\mu > D$$

$\frac{dx}{dt}$ POSITIVO vel de producción > que la de eliminación

$$\mu < D$$

$\frac{dx}{dt}$ NEGATIVO conc de Biomasa en quimiostato disminuye

$$\mu = D$$

$\frac{dx}{dt} = 0$ ESTADO ESTACIONARIO
(velocidades iguales)

CULTIVO CONTINUO:

Relación entre velocidad de dilución y velocidad de crecimiento



- Cuando $\mu = D$ se dice que el cultivo está en estado Estacionario, en estas condiciones la variación en la concentración de biomasa con respecto al tiempo es igual a 0.
- Que $\mu = D$ significa que podemos regular la velocidad de crecimiento del microorganismo variando la velocidad de flujo del medio de cultivo. Esto se logra variando la velocidad de agregado del medio de cultivo por medio de la bomba peristáltica.
- Los estados de equilibrio sólo son posibles entre $D = 0$ y D_c , es decir cuando la velocidad de dilución no excede un valor crítico.
- La D_c depende de la concentración de sustrato limitante del crecimiento en el reservorio (S_r)

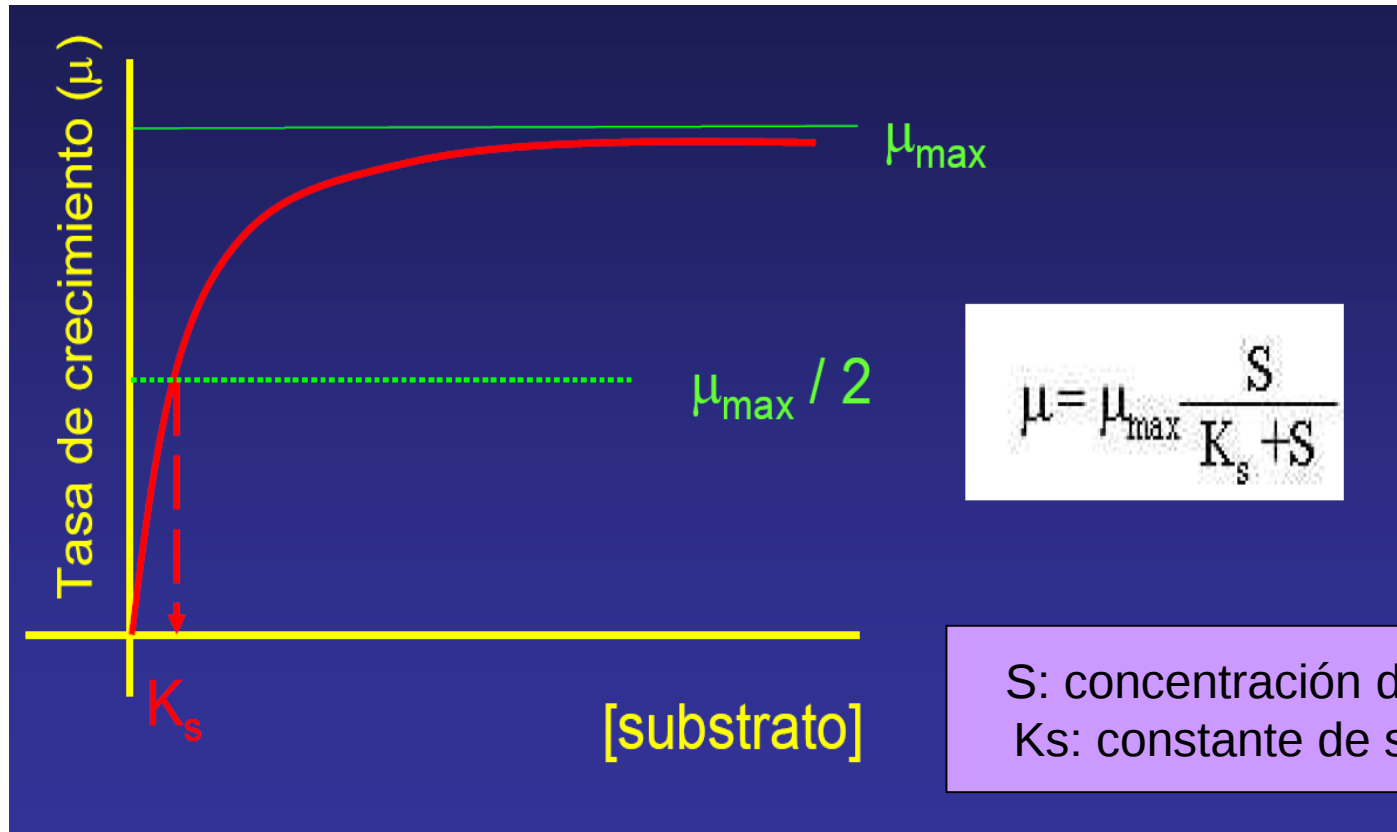
$$D_c = \mu_{\max} \frac{S_r}{K_s + S_r}$$

$$K_s \lllll S_r$$
$$D_c = \mu_{\max}$$

Relación entre concentración de sustrato y velocidad de crecimiento



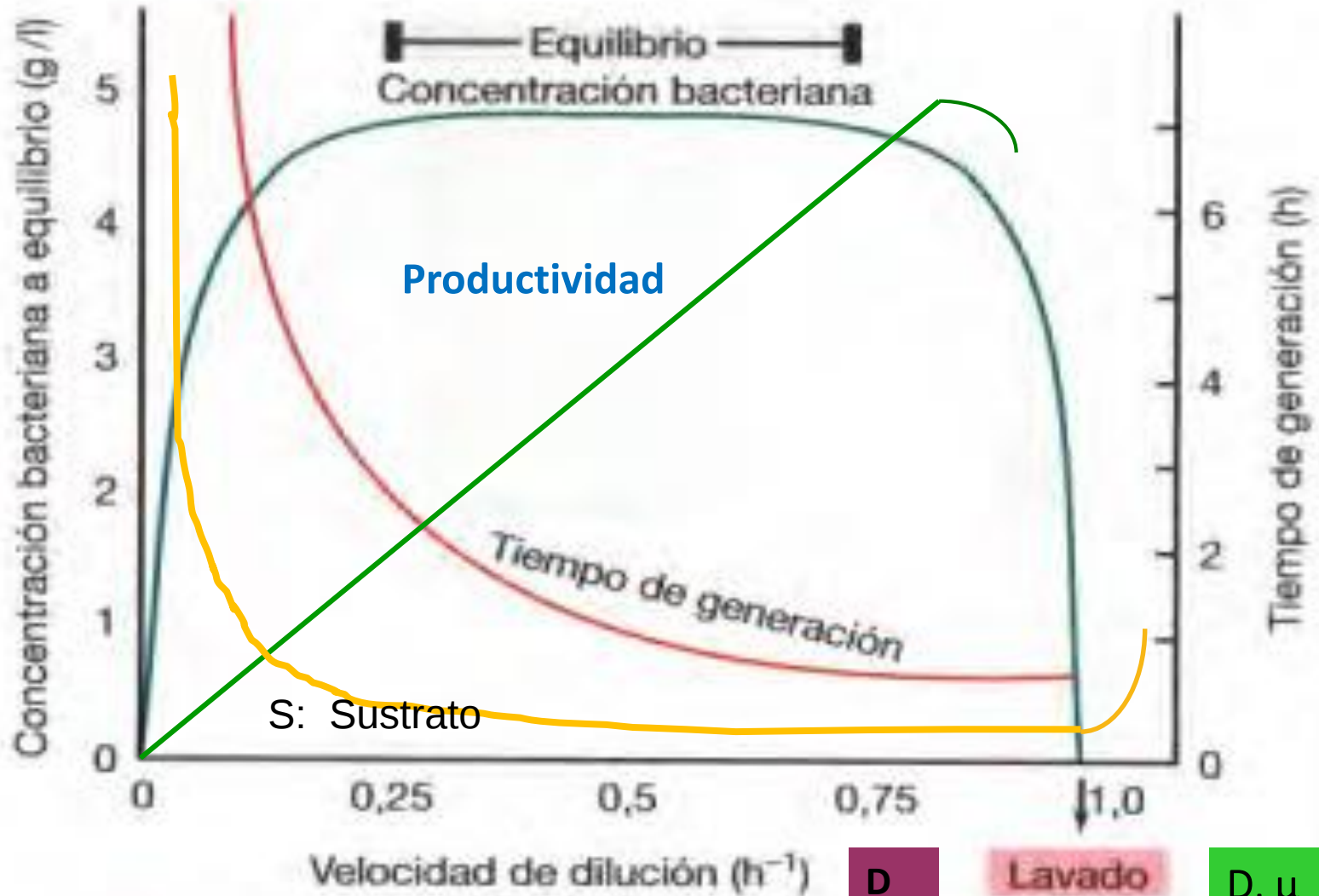
Ecuación de Monod



Evolución de variables en cultivo continuo

X, S, P, t_d

X : biomasa



Velocidad específica de crecimiento (μ)

D crítico = μ máx

Características de la curva

- La concentración de biomasa se mantiene constante en un amplio rango de D hasta alcanzar el valor D_c , cuando el cultivo se lava
- La concentración de sustrato limitante se mantiene cercana a cero, luego incrementa abruptamente al alcanzar la D_c
- El tiempo de duplicación disminuye al aumentar D
- La productividad que surge de la expresión $P = D \cdot X$; g. $l^{-1} \cdot h^{-1}$ incrementa continuamente con D hasta alcanzar D_c donde cae abruptamente

Relaciones a tener presente:



- Velocidad de dilución $D = F / V$ (Flujo/Volumen)

Volumen = constante (es el volumen del quimiostato)
Flujo = variable

- $D = \mu$ (en cualquier punto del eje x)
- $D_c = \mu_{\text{máx}}$ (en el LAVADO)
- $\mu = \ln 2 / t_d$
- Productividad $P = D \times$

Efecto de la Temperatura

Sicrófilos

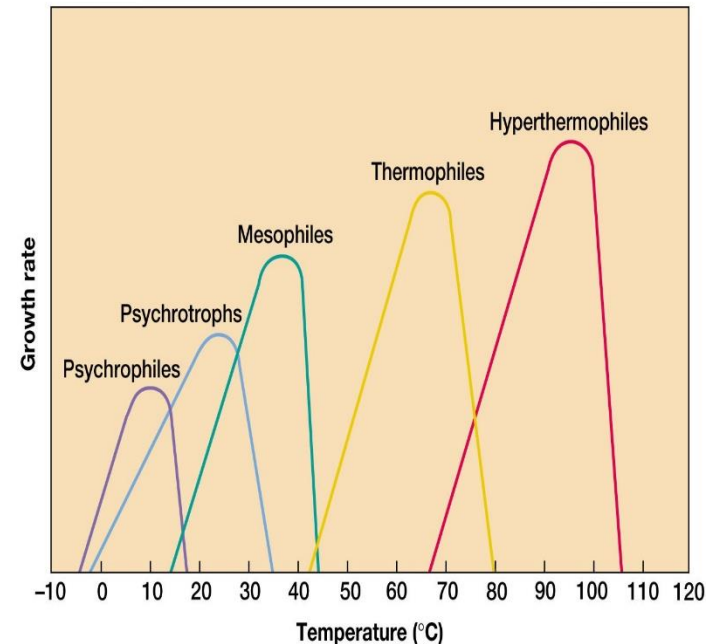
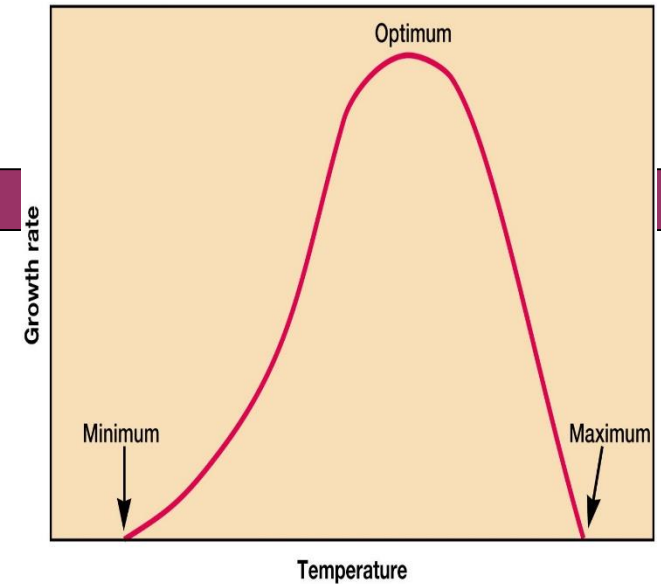
- Requieren bajas temperaturas: 15 – 20 °C
- La mínima puede ser muy baja
- Bacterias en el fondo del mar y en los polos

Mesófilos

- Rango de temperaturas: 25 – 40 °C
- Temperatura óptima: 37 °C $\pm$ 1 °C
- Agentes que afectan al hombre y los animales

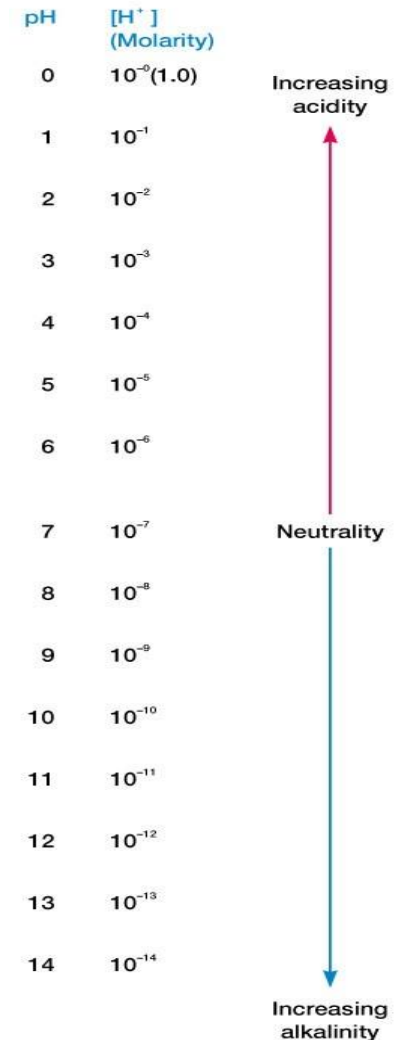
Termófilos

- Toleran altas temperaturas
- Temperatura óptima: 55 °C
- Temperatura máxima: 80 °C o mas.



Condiciones de pH

- pH < 6,5 ácido
- pH > 7,5 básico o alcalino
- pH 6,5 – 7,5 neutro mas adecuado para crecimiento bacteriano
- Bacterias que crecen hasta pH 4 Acidófilas (Ej: *Lactobacillus*)
- *Staphylococcus aureus*: medio neutro
- *Vibrio cholerae* : medio alcalino



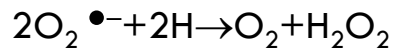
Concentración de oxígeno

Fundamento de la respuesta diferencial al oxígeno

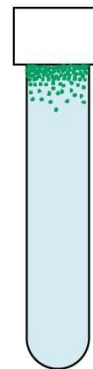
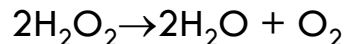
- El O_2 se reduce fácilmente a productos tóxicos
- Radical superóxido ($O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$)
 - Peróxido de hidrógeno ($O_2^{\bullet -} + 1e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$)
 - Radical hidroxilo ($H_2O_2 + 1e^- + 1H^+ \rightarrow H_2O + OH^{\bullet}$)

Los organismos aerobios sintetizan enzimas protectores

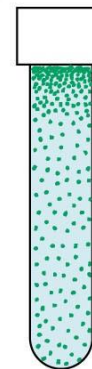
- superóxido dismutasa (SOD)



- catalasa



Obligate aerobe



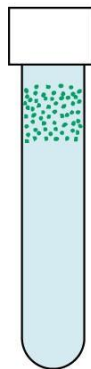
Facultative anaerobe



Aerotolerant anaerobe



Strict anaerobe



Microaerophile

Positiva

Negativa



Necesita O_2

Prefiere O_2

Indiferente al O_2

El O_2 es tóxico

< 2 – 10% O_2

Enzyme content

+ SOD
+ Catalase

+ SOD
+ Catalase

+ SOD
– Catalase

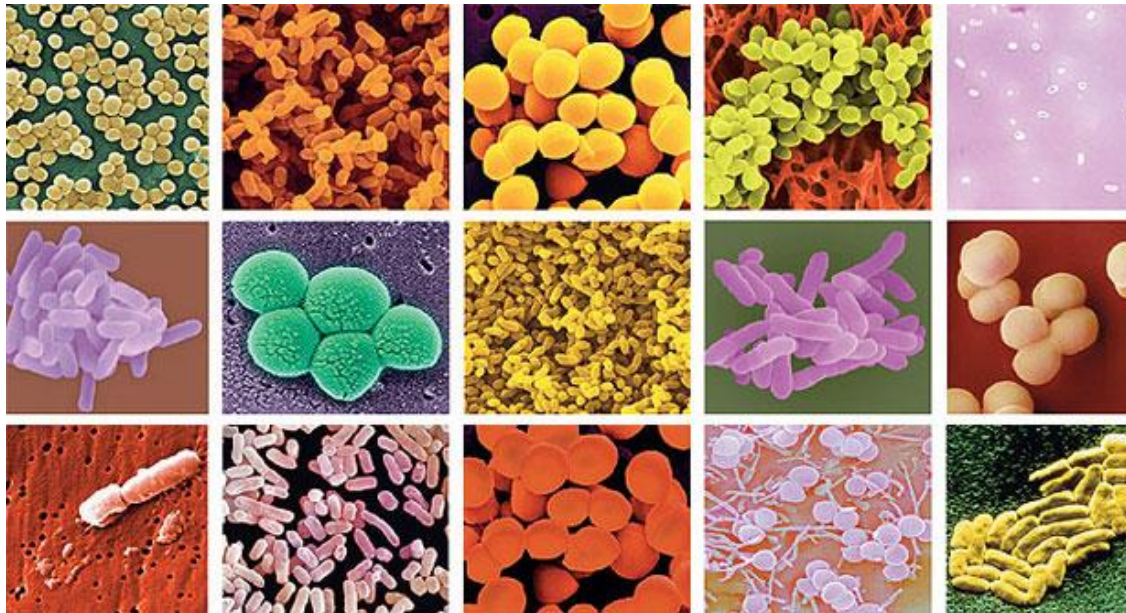
– SOD
– Catalase

+ SOD
+/- Catalase
(low levels)

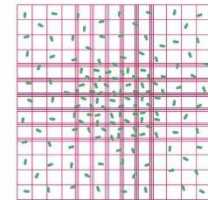
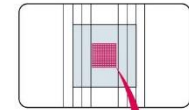
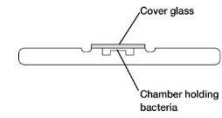
Técnicas para determinar el número y viabilidad de las células



- puede ser medido como el cambio en el número de individuos de una población, **recuento de células**
- o como los cambios en la **masa** de una población



Recuento directo de células



- cámaras de recuento
 - fácil, barato y rápido
 - sirve para eucariotas y procariotas
 - no diferencia células vivas y muertas
- contadores electrónicos: Una suspensión de microorganismos se pasa por un pequeño orificio a través del cual circula una corriente eléctrica que es interrumpida a medida que pasan los organismos
 - no diferencia vivas de muertas
 - rápido y fácil
 - útil con grandes microorganismos (no procariotas)
- sobre filtros de membrana
 - se filtran las células sobre una membrana y se tiñen con fluorescencia
 - útil para contar bacterias
 - con algunos marcadores pueden diferenciarse células vivas de muertas

Cámara de recuento



- No diferencia células vivas de muertas

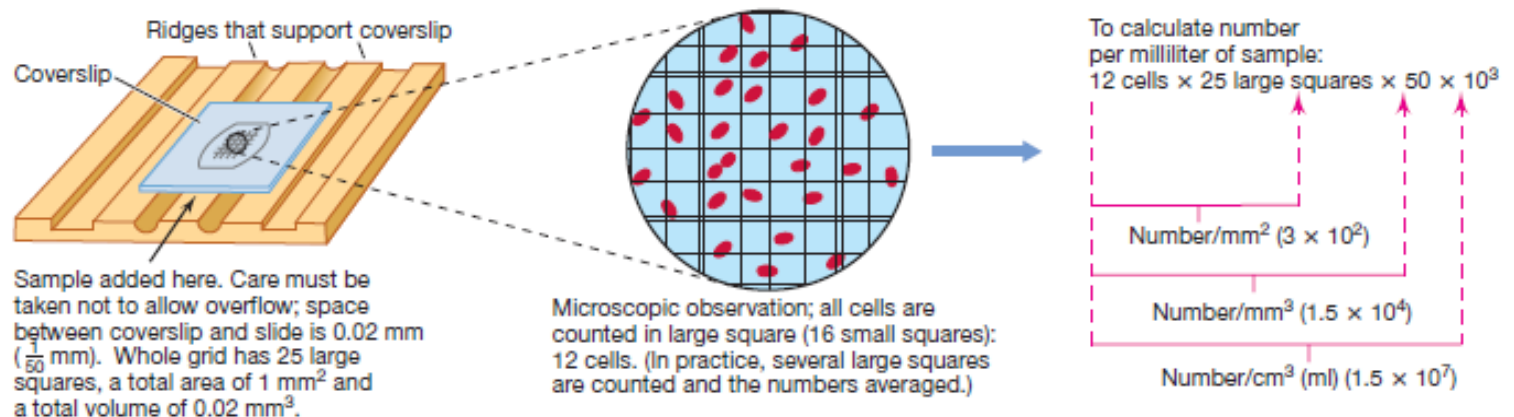


Figure 5.14 Direct microscopic counting procedure using the Petroff–Hausser counting chamber. A phase-contrast microscope is typically used to count the cells to avoid the necessity for staining.

$$\frac{\text{Número total de microorganismos}}{\text{ml}} = \frac{\text{Bacterias contadas} \cdot \frac{1}{\text{dilución}}}{\text{Número de cuadrados contados} \cdot \text{Volumen del cuadrado}}$$

Técnicas para determinar el número y viabilidad de las células



Recuento de células viables

- Siembra por vertido en placa (mezcla de muestra más agar)

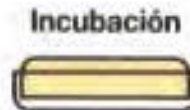
Siembra por vertido en placa



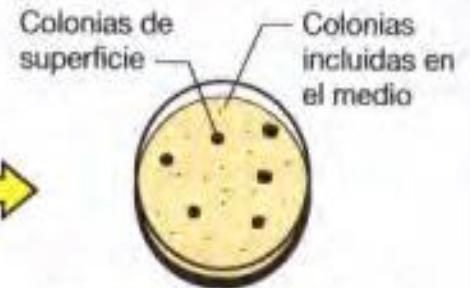
La muestra se pipetea en la placa estéril



Se añade medio estéril y se mezcla bien con el inóculo



Incubación



Colonias de superficie

Colonias incluidas en el medio

Resultado típico del vertido en placa

Recuento de células viables

- Siembra por extensión sobre agar

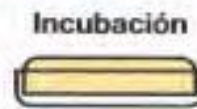
Siembra por extensión



La muestra (0,1 ml o menos) se pipetea sobre la superficie de la placa con agar



La muestra se extiende uniformemente sobre la superficie del agar usando un asa de vidrio estéril



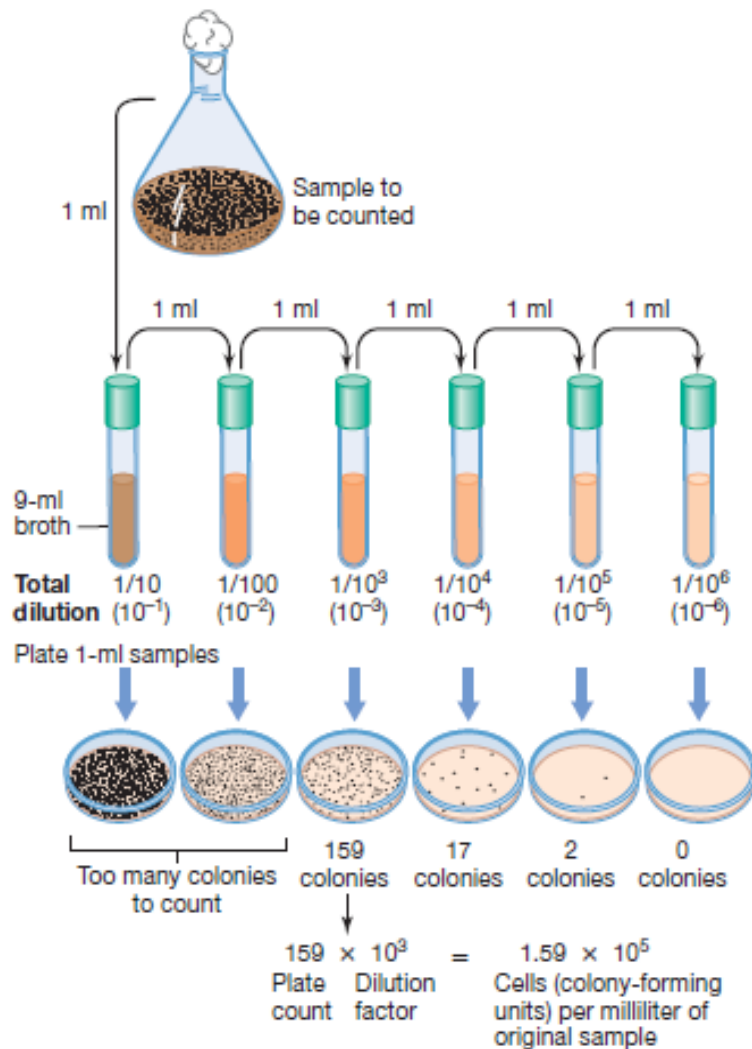
Incubación



Colonias de superficie

Resultado típico de la siembra por extensión

Recuento de viables



se siembran diluciones (en profundidad o por extensión) en un medio sólido adecuado



se incuba y se cuenta el número de colonias

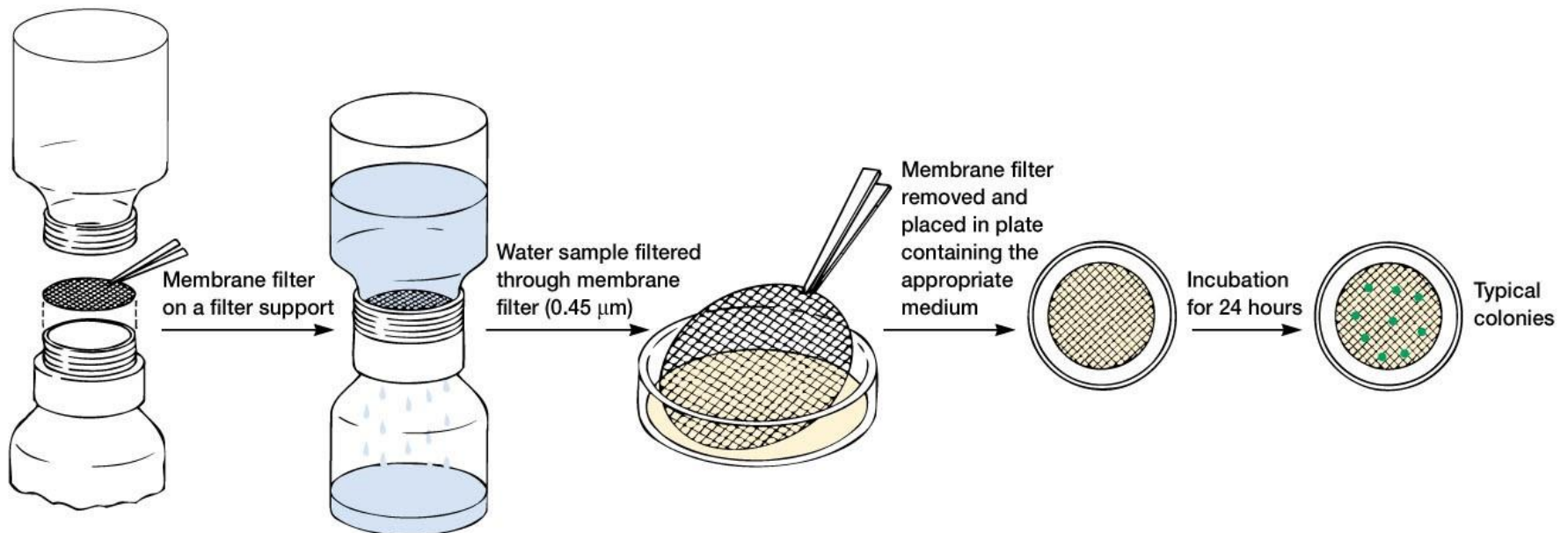


se calcula el número de células en la población

Método de filtración en membrana



- concentra las células
- mide el número de células viables
- elimina inhibidores presentes en el medio en el que están suspendidas
- muy útil para analizar muestras acuáticas

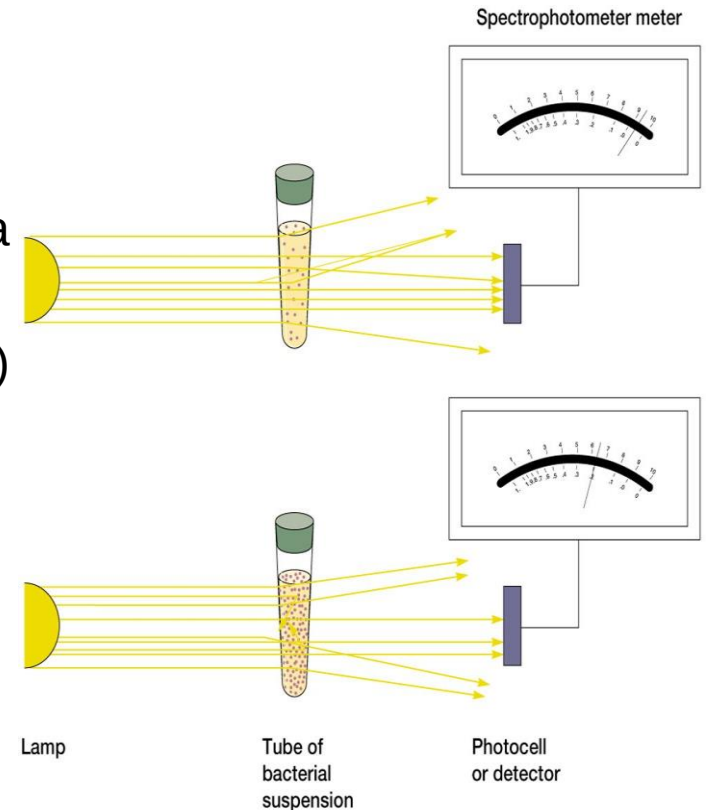


Determinación de la masa



- Peso seco
 - laborioso y no muy sensible
- Cuantificación de un componente o sustancia celular
 - ej.: proteína, DNA, ATP o clorofila
 - útil si la cantidad de componente o sustancia en cada célula es constante
- determinación turbidométrica (dispersión de luz)
 - rápida, fácil y sensible

más células
↓
más luz dispersada
↓
menos luz detectada



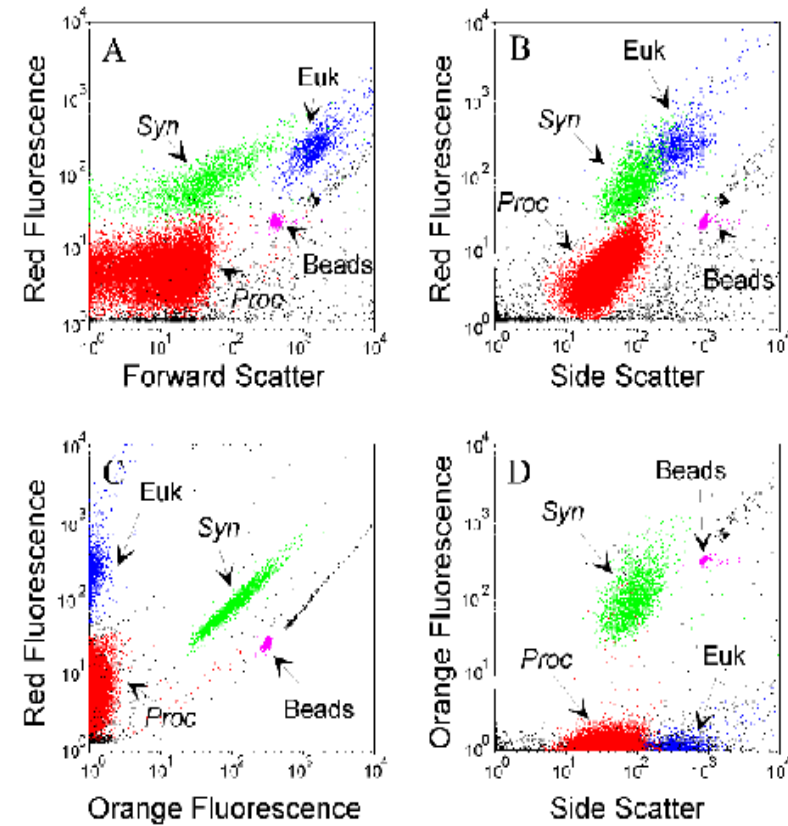
Recuento directo: Citometría de flujo



Las células se tiñen con un marcador fluorescente (salvo que tengan fluorescencia intrínseca) y se pasan por un capilar muy fino sobre el que inciden dos haces de luz láser uno de ellos permitirá medir la dispersión de luz (relacionada con el tamaño de las partículas) y otra excitará el marcador fluorescente

- es caro
- puede diferenciar células vivas y muertas

Ej.: el análisis combinado de la luz dispersada y la emisión natural de fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos del fitoplacton permite diferenciar a *Synechococcus* (puntos verdes) *Prochlorococcus* (puntos rojos) y algas eucariotas (puntos azules). Los puntos fucsia son marcadores de tamaño.





Muchas gracias!!

Bibliografía

- ❑ Brock Biología de los microorganismos
- ❑ Apuntes de cátedra