

Unidad Temática 3

Crecimiento Bacteriano

Benintende, Silvia y Sanchez, Cecilia

Introducción

En un sistema biológico se define al crecimiento como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. Según ello, el aumento de la masa celular producido por acumulación de productos de reserva (glucógeno, poliβ-hidroxibutirato) no constituyen crecimiento.

Se puede considerar como crecimiento al incremento de células individuales por un lado, y por otro lado se puede considerar al crecimiento del número de células (proliferación de la población).

En lo que se refiere al crecimiento de células individuales, este consiste en el aumento del tamaño y peso de las células que precede a la división celular. Esta división trae aparejada un aumento en el número de células (proliferación de la población).

Las bacterias se dividen por fisión binaria, a través de la una cual célula madre al alcanzar un determinado volumen se divide dando dos células hijas. El proceso de fisión binaria consiste en la autoduplicación del material hereditario seguido de la repartición en las dos células hijas, las que se separan por estrangulamiento de la membrana celular y formación de la pared celular (Fig. 1).

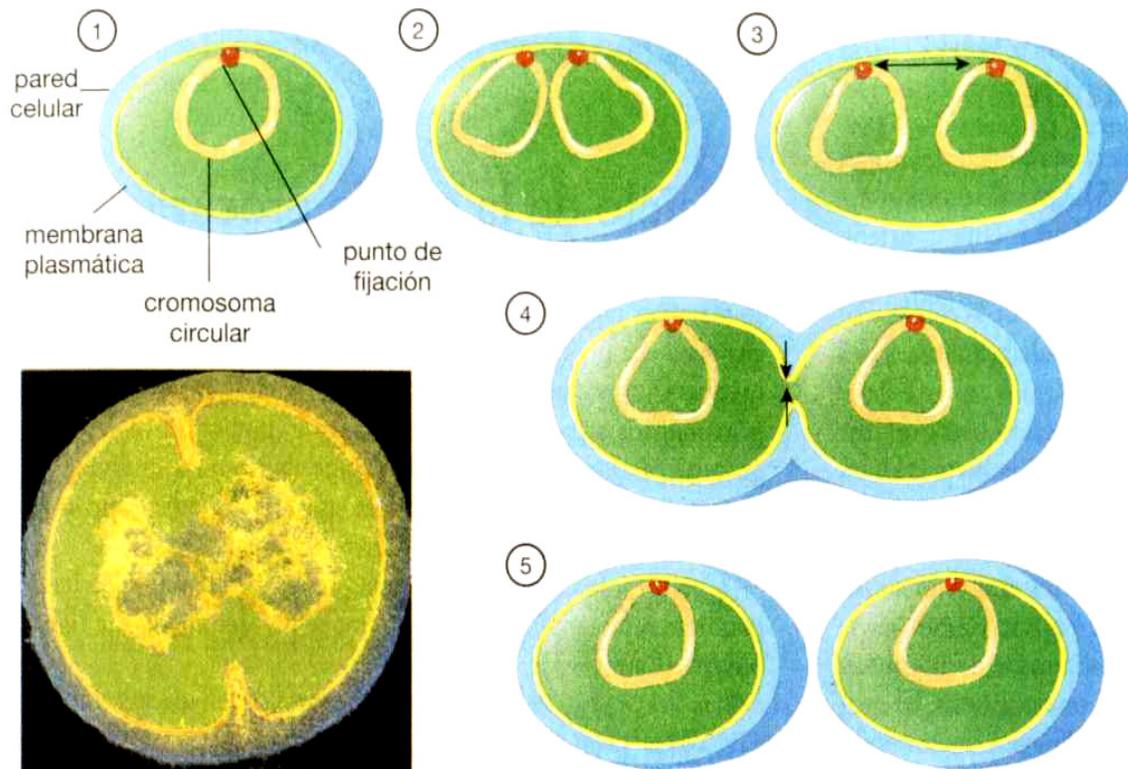


Fig. 1. División binaria de células procariotas. ① El cromosoma circular está unido a un punto de la membrana plasmática ② El cromosoma se duplica. Las dos copias están fijadas a la membrana en puntos cercanos ③ La célula se alarga, se agrega nueva membrana plasmática entre los puntos de unión ④ La membrana plasmática crece hacia el interior ⑤ La célula original se ha dividido en

dos células hijas. La imagen corresponde al corte transversal de una célula procariota durante la fisión binaria en una etapa similar a la fase 4 descripta.

Basado en el concepto que una célula se divide dando dos células hijas, y éstas a su vez se vuelven a dividir dando dos células cada una de ellas, se presenta en el siguiente cuadro la proliferación de una población de células a partir de una sola, con un tiempo de generación de 30 minutos.

| Tiempo (horas) | Número de células | Log.10 (número de células) |
|----------------|-------------------|----------------------------|
| 0 | 1 | 0 |
| 0.5 | 2 | 0.301 |
| 1 | 4 | 0.602 |
| 1.5 | 8 | 0.903 |
| 2 | 16 | 1.204 |
| 2.5 | 32 | 1.505 |
| 3 | 64 | 1.806 |
| 3.5 | 128 | 2.107 |
| 4 | 256 | 2.408 |
| 4.5 | 512 | 2.709 |
| 5 | 1024 | 3.010 |
| . | . | . |
| . | . | . |
| 10 | 1.048.576 | 6.021 |

Al graficar en un sistema de coordenadas el tiempo (abscisas) y el número de células (ordenadas) se obtiene una gráfica como la que se muestra en el siguiente esquema:

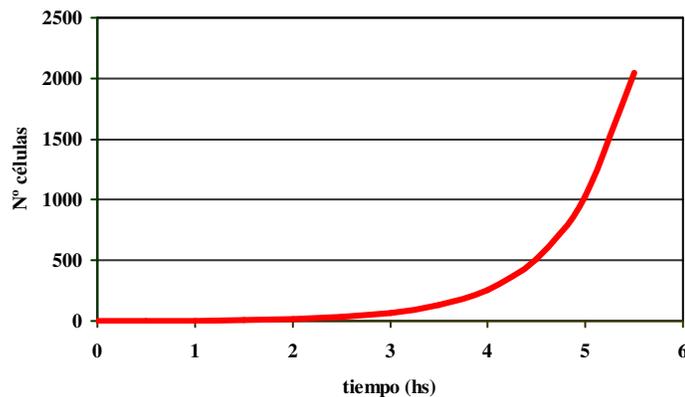


Fig. 2. Velocidades de proliferación en escala aritmética.

Como se observa en la gráfica la curva aumenta su pendiente. Frecuentemente es útil transformar los datos de número de células a su logaritmo decimal (ó graficar el número de células versus el tiempo transcurrido en una gráfica semilogarítmica). Se obtiene así una gráfica en la que la relación es lineal.

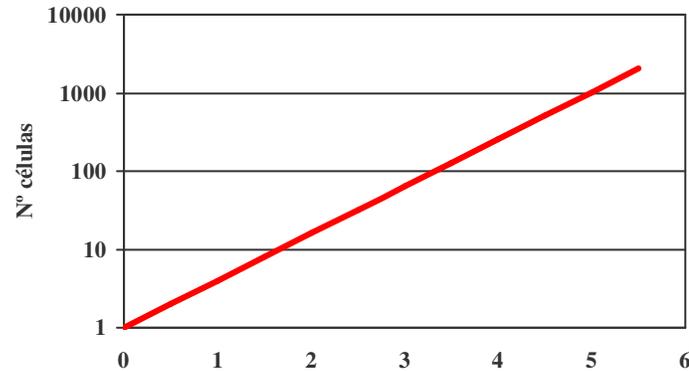


Fig. 3. Velocidades de proliferación en escala logarítmica.

Se conoce como tiempo de duplicación generacional al tiempo en que tarda una población en duplicar su número. Ésta última gráfica permite fácilmente encontrar el tiempo de duplicación para la población estudiada.

Es frecuente que a partir de mediciones de crecimiento a intervalos conocidos y graficando estos datos se calcule el tiempo de duplicación de una población.

Los tiempos de duplicación varían según el microorganismo del que se trate. Por ejemplo:

- ▶ *Escherichia coli* 0,35 hs
- ▶ *Rhizobium meliloti* 1,8 hs
- ▶ *Nitrobacter sp* aproximadamente 20 hs

El estudio gráfico del crecimiento es muy útil, pero a veces es conveniente conocer la expresión matemática que representa este crecimiento exponencial

$$X = X_0 \cdot e^{\mu(t-t_0)}$$

Donde:

X : número de células o masa microbiana al tiempo t

X_0 : número de células o masa microbiana en el momento inicial (t_0)

μ : constante que da idea de la velocidad instantánea del crecimiento

$t-t_0$: tiempo transcurrido entre la medición inicial y la final

Ciclo normal del crecimiento

Las poblaciones microbianas raramente mantienen un crecimiento exponencial prolongado. Si ello ocurriera en poco tiempo la tierra estaría tapada de una masa microbiana mayor que la de la tierra misma.

El crecimiento está normalmente limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano, que les son tóxicos a la población.

La consecuencia es que el crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse.

En la figura 4 se presenta la gráfica de una curva típica de crecimiento bacteriana.

Como se puede observar, en la gráfica se ha relacionado el tiempo transcurrido con el logaritmo del número de células bacterianas. Cuando se realiza este tipo de gráficas se obtiene una línea recta, sin embargo en esta sólo un sector (fase exponencial) corresponde a una recta.

Es posible distinguir cuatro fases:

- 1) fase de latencia o de retardo
- 2) fase exponencial
- 3) fase estacionaria
- 4) fase de muerte

En la **fase de latencia** existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben llevar adelante.

Cuando se hacen mediciones del número de células en distintos tiempos dentro de esta fase, el valor no cambia sustancialmente. En cambio, interiormente las células trabajan activamente adaptando el equipo enzimático al medio de cultivo. La bacteria se prepara para hacer uso de los nutrientes que este medio le aporta, por lo tanto es la fase de adaptación al medio, con aumento de la masa celular pero no del número de células. La edad del inóculo va a influir en el tiempo de latencia en el medio fresco debido a la acumulación de materiales tóxicos y a la falta de nutrientes esenciales dentro de la célula durante el crecimiento anterior. En general, inóculos viejos alargan la fase de latencia.

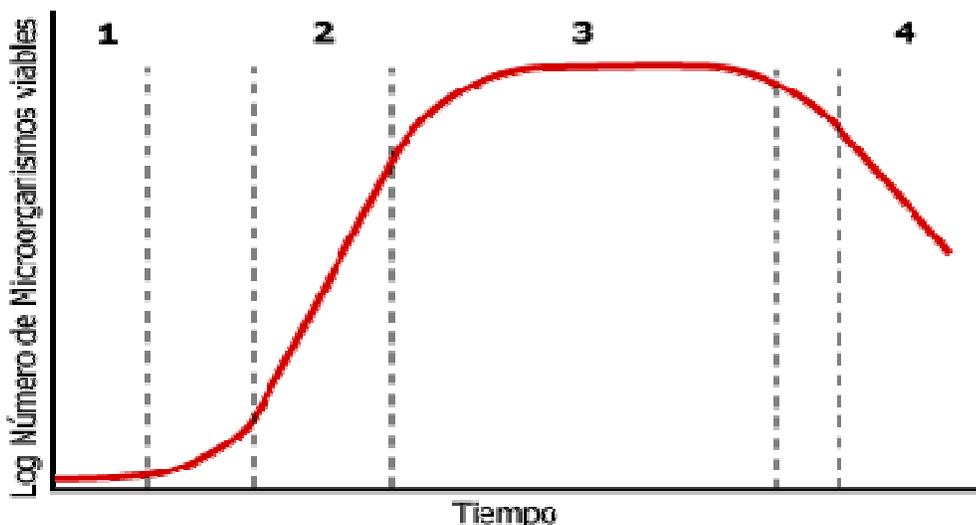


Fig. 4 Curva de proliferación típica de una población bacteriana

Pasado este período, el cultivo entra en la denominada **fase de crecimiento exponencial**, donde la velocidad de crecimiento es máxima.

La velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

La velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula cuando alcance la **fase estacionaria**, ya que cambios en la composición y concentración de nutrientes entre el cultivo del inóculo y el medio fresco pueden desencadenar el control y la regulación de la actividad enzimática.

Esta fase se presenta por agotamiento del suministro de algún nutriente esencial o por acumulación de productos metabólicos que sean tóxicos. También puede ser por la disminución de la oxigenación o cambios en las condiciones de pH del medio de cultivo (acidificación o alcalinización):

En esta fase se equilibran el número de células nuevas con el número de células que mueren.

Por último, el cultivo entra en la **fase de muerte**, en la que el número de células que mueren se va haciendo mayor.

La pendiente de esta fase puede ser más o menos pronunciada de acuerdo al tipo de microorganismo de que se trate. Suelen presentarse pendientes menos bruscas cuando el microorganismo presenta alguna forma de resistencia (esporas, glicocalix).

Métodos de medición del crecimiento

El crecimiento se evalúa haciendo mediciones sucesivas en tiempos determinados de la población en estudio. En cada momento se evalúa cual es la población en ese instante. Existen diversas formas de evaluar una población bacteriana.

a. Conteo microscópico directo

Es una técnica común, rápida y barata que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología, ya que consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado.

Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (cámara de Petroff Hauser, cámara de Neubaver – Fig. 5-). Una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados

La muestra puede utilizarse tal cual, (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución.

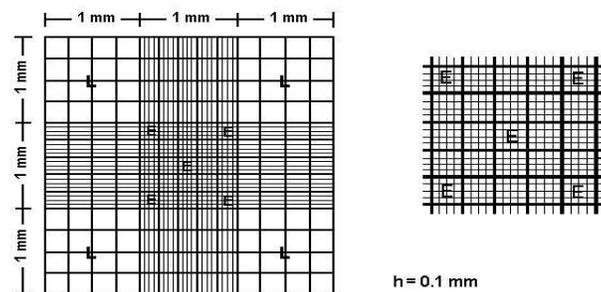


Fig. 5 Cámara de Neubaver

Para hacer el conteo se procede de la siguiente manera. Si se posee una cámara dividida en 25 cuadrados. El área de los 25 cuadrados es conocida, como también el volumen de muestra que esta área admite.

Contando el número de bacterias presentes en los cuadrados (o algunos de ellos) se puede conocer cuanto hay en volumen conocido. Suponiendo 50 bacterias en 25 cuadrados, y sabiendo que los 25 cuadrados corresponden a 0,02 mm³.

$$50 \text{ bacterias} \frac{\quad}{\quad} 0,02 \text{ mm}^3$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mm}^3 (1 \text{ cm}^3)$$

$$x = \frac{1000 \text{ mm}^3 * 50 \text{ bacterias}}{0,02 \text{ mm}^3}$$

$$x = 2.500.000 \text{ bact./mL} = 2,5 \cdot 10^6 \text{ bact./mL}$$

| Ventajas del método | Desventajas del método |
|---|---|
| Es rápido | La cantidad de muestra analizada es poca |
| Los frotis se pueden guardar | Provoca cansancio del operador |
| Las exigencias de equipo son mínimas | Sólo sirve para muestras con cargas superiores a 10.000 por mL. |
| Se pueden observar las diferentes morfologías de los microorganismos. | Es difícil distinguir los microorganismos de las partículas de muestra |
| Es empleado para recuento de poblaciones microbianas de suelo | Una inadecuada distribución de la muestra sobre la superficie del portaobjetos puede ocasionar serios errores |
| | Es difícil diferenciar los microorganismos viables de los no viables |

b. Conteo de células viables

El método se basa en la consideración que el crecimiento implica el aumento de los microorganismos capaces de formar colonias.

Este método puede hacerse con medios sólidos o líquidos. El método más frecuentemente empleado es el **conteo en placas** (medios sólidos) formando colonias. Por lo tanto se determinan por este método sólo las células microbianas VIABLES en las condiciones de trabajo (nutrientes, atmósfera, temperatura).

Para ello se siembra una cantidad conocida de la suspensión bacteriana cuyo número se desea conocer. En un medio sólido cada bacteria se multiplicará formando una colonia visible a simple vista que puede ser contada. Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, se utiliza el término: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (u.f.c.), y esto puede constituir una desventaja ya que si dos bacterias no se separan darán una sola colonia, subestimando de esta forma el número de microorganismos en la suspensión. Además, a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre 30 y 300 colonias.

Algunas bacterias son difíciles de contar en medios sólidos (Nitritadores) y se requiere de conteos en medios líquidos. Para ello se recurre a la técnica de determinación del **número más probable** (NMP) de microorganismos. Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio o no), en diferentes cantidades de muestra.

Para poder determinar el NMP de microorganismo se debe diluir hasta tener una densidad que sea menor a 1 célula por cada mililitro de diluyente. Por ejemplo, para hacer diluciones hasta obtener 3 células en 5 ml se siembra 1 ml en cada uno de 5 tubos con medio líquido adecuado, esperando que en 3 tubos haya crecimiento de microorganismos y en 2 no (si las células no se distribuyen 1 en cada ml se pueden obtener otros resultados: 2 positivos y 3 negativos, o 1 positivo y 4 negativos). Los resultados posibles son al azar.

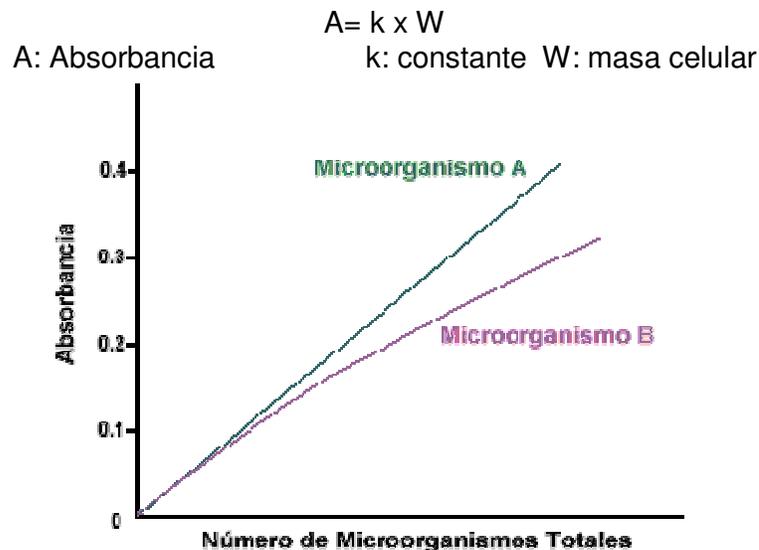
La interpretación de los resultados, se hace en base a una distribución estadística, y en general se emplean tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos, teniendo en cuenta la dilución en la se observa proliferación de microorganismos.

Este método se emplea recuentos microbianos de Nitratadores por la dificultad que presentan para ser visualizadas las colonias en medios sólidos. También es útil para determinar cargas microbianas bajas, menores de 10 por gramo, pero puede igualmente emplearse para cargas mayores utilizando las diluciones apropiadas. Se prefiere además este método cuando los microorganismos son de lento crecimiento, o cuando han sido sometidos a condiciones adversas (temperatura alta, desecación, etc.).

c. Medición de la densidad bacteriana

Es una técnica en la que se mide la masa de microorganismos en una suspensión. Para ello se utiliza un espectrofotómetro y se mide la cantidad de luz que atraviesa en una suspensión de microorganismos, en comparación con un blanco que es el medio esterilizado y sin sembrar. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio.

Para relacionar la transmitancia con al densidad bacteriana se requiere de hacer curvas patrón de densidad conocidas.



d. Otros métodos de recuento

Determinación de ATP: Es una técnica que permite determinar indirectamente la masa de una población bacteriana. Se considera que la proporción de ATP encontrado en una muestra es proporcional con la presencia de células vivas

Recuento electrónico: Los contadores electrónicos permiten realizar recuentos de bacterias, levaduras no filamentosas y protozoarios, pero no de hongos y microorganismos filamentosos o miceliales. Estos instrumentos constan de electrodos que miden la resistencia eléctrica del sistema. Un volumen fijo de una suspensión bacteriana es forzado a pasar desde un compartimiento al otro a través del pequeño conducto. Cuando pasa un microorganismo, la resistencia al pasaje de una corriente eléctrica se incrementa debido a que la conductividad de la célula es menor que la del medio. Estos cambios en la resistencia son convertidos en pulsos y contados. Este tipo de recuento presenta algunos inconvenientes. No pueden medirse soluciones muy concentradas de microorganismos, debido a que el pasaje de más de una célula en un breve período de tiempo va a ser tomado como una célula más grande, y es común la obstrucción del orificio por microorganismos muy grandes.

Bibliografía

Brock, T. & M. Madigan. 1993. MICROBIOLOGÍA. 6^{ta} Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.

Ranea, F. 2002. <http://www.microbiologia.com.ar/fisiologia/crecimiento.html>