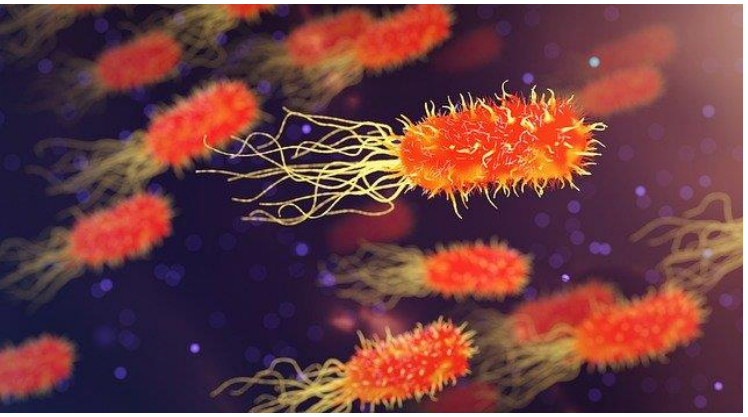


CRECIMIENTO MICROBIANO

MICROBIOLOGÍA GENERAL 2025

CRECIMIENTO MICROBIANO

- Es el aumento del número de componentes celulares.

- Puede tener como resultado un incremento del tamaño celular (aumento de masa celular), un incremento del número de su población (aumento del número de células) o una combinación de ambos.

- En organismos unicelulares conduce **al aumento del número de células** más que a un aumento en el tamaño celular.

¿Qué necesitan los microorganismos para crecer?

Nutrientes: sustancias que se emplean en la biosíntesis y producción de energía

- Macronutrientes: C, O, H, N, P, K, Na, Ca, Mg, Fe.
- Micronutrientes: Mn, Zn, Co, Mo, Ni, Cu, Factores de crecimiento.

Fuente de Energía

Condiciones de Incubación:

- Temperatura
- pH
- Atmósfera (con o sin oxígeno)
- Inóculo viable

Ausencia de Inhibidores

CRECIMIENTO MICROBIANO

En el laboratorio los microorganismos son estudiados como cultivos puros, se utilizan medios de cultivo con abundancia de nutrientes.

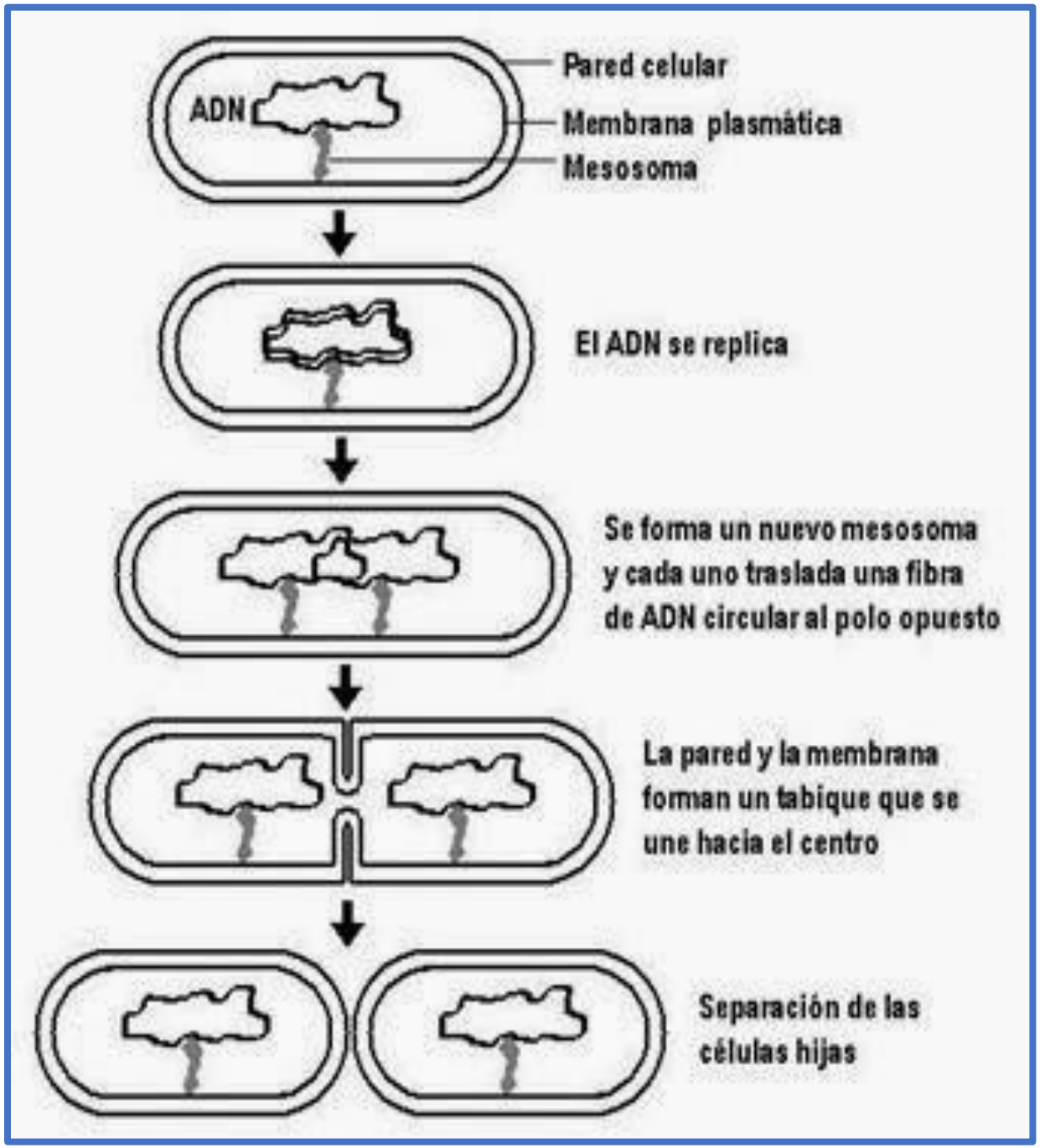
Cultivo axénico

En la naturaleza los microorganismos existen en biofilms, comunidades microbianas organizadas en capas sobre la superficie

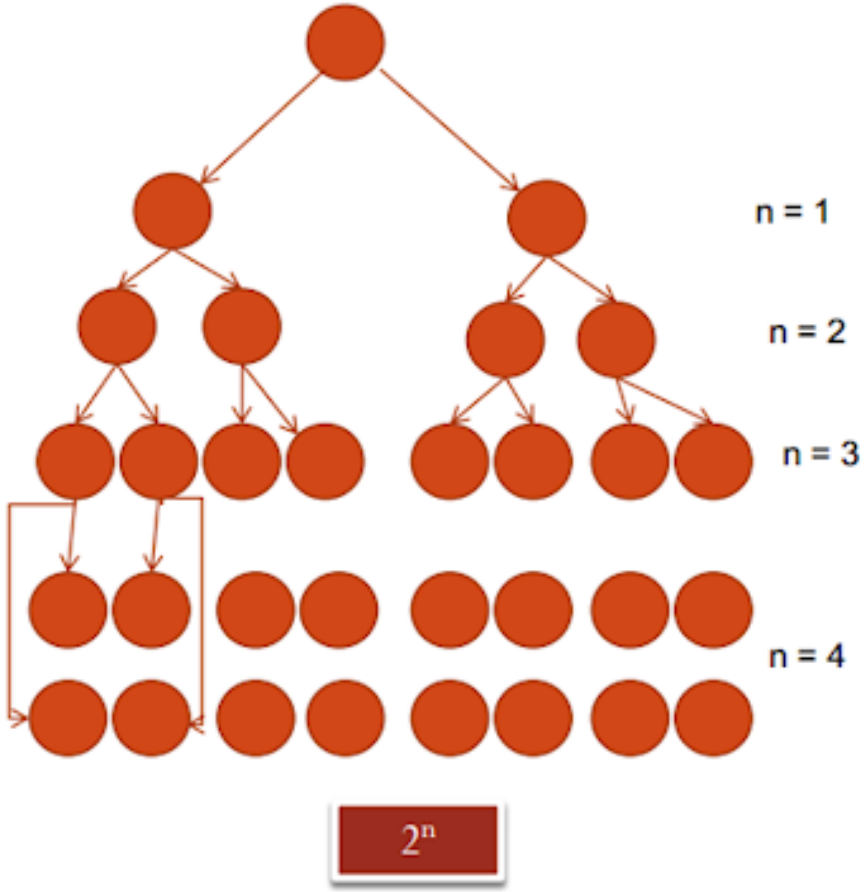
CRECIMIENTO MICROBIANO

- Aumento del número de células (no de tamaño)
- Multiplicación celular se da por **FISIÓN BINARIA**, producción de dos células iguales a partir de una.
- Etapas:
  1. Elongación
  2. Duplicación del ADN microbiano
  3. Tabicado central
  4. Invaginación de la membrana
  5. Síntesis de pared celular.

- TIEMPO DE GENERACIÓN: tiempo que demora una célula para dividirse en 2, depende de cada especie y de las condiciones de incubación.



CRECIMIENTO MICROBIANO



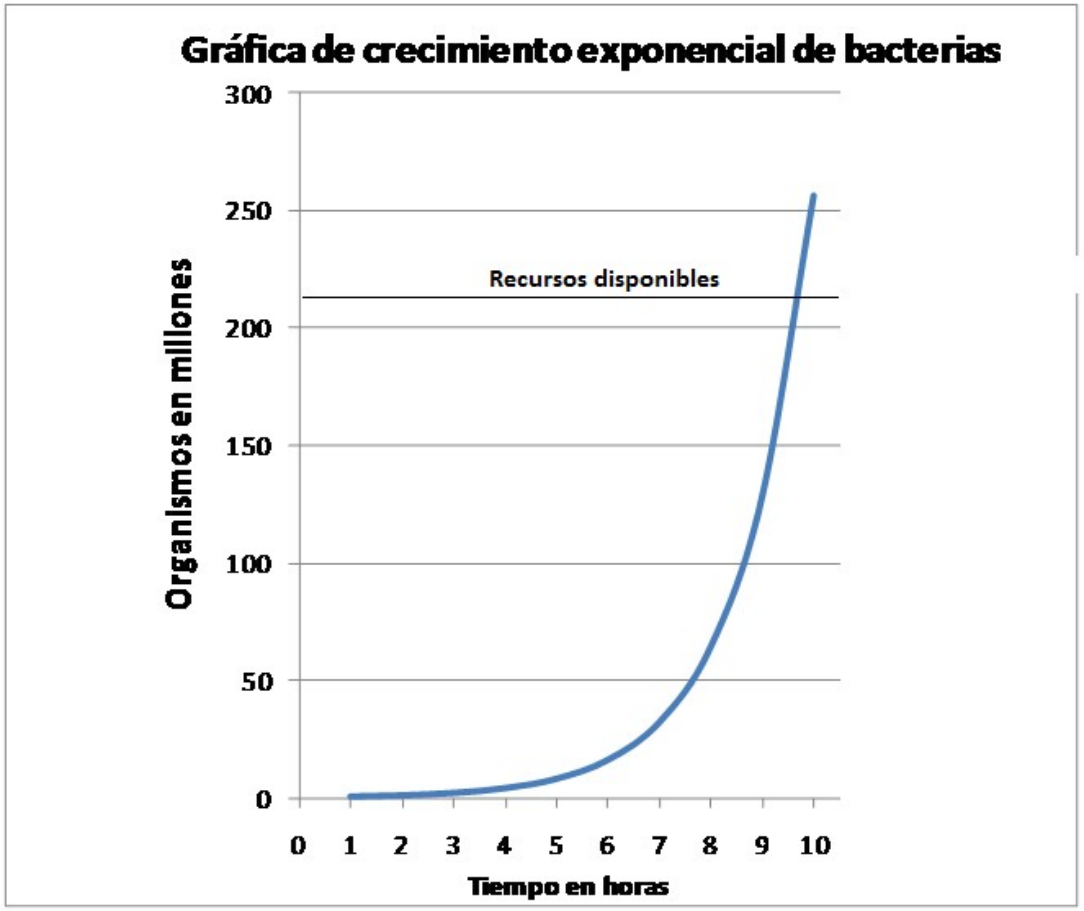
En donde n = al número de generaciones

Cuando una población duplica su número de células en un período de tiempo dado.

CRECIMIENTO EXPONENCIAL.

$$N_t = N_o \times 2^n$$

CRECIMIENTO MICROBIANO



En cultivo: $N_t = N_o \times 2^n$

N_t : número de células luego de un tiempo t

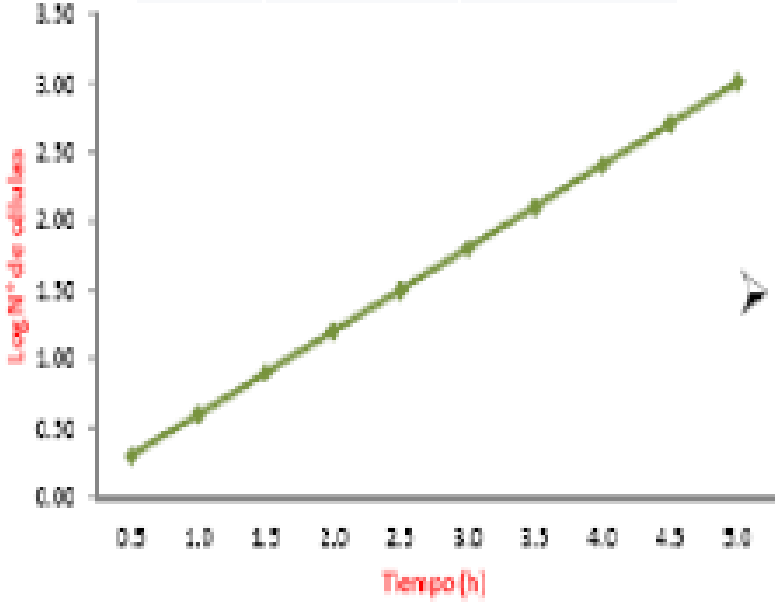
N_o : número de células iniciales

n: nº de generaciones

g = t/n

CRECIMIENTO MICROBIANO

Tiempo	N° de células	Log N° células
0.5	2	0.30
1.0	4	0.60
1.5	8	0.90
2.0	16	1.20
2.5	32	1.51
3.0	64	1.81
3.5	128	2.11
4.0	256	2.41
4.5	512	2.71
5.0	1024	3.01



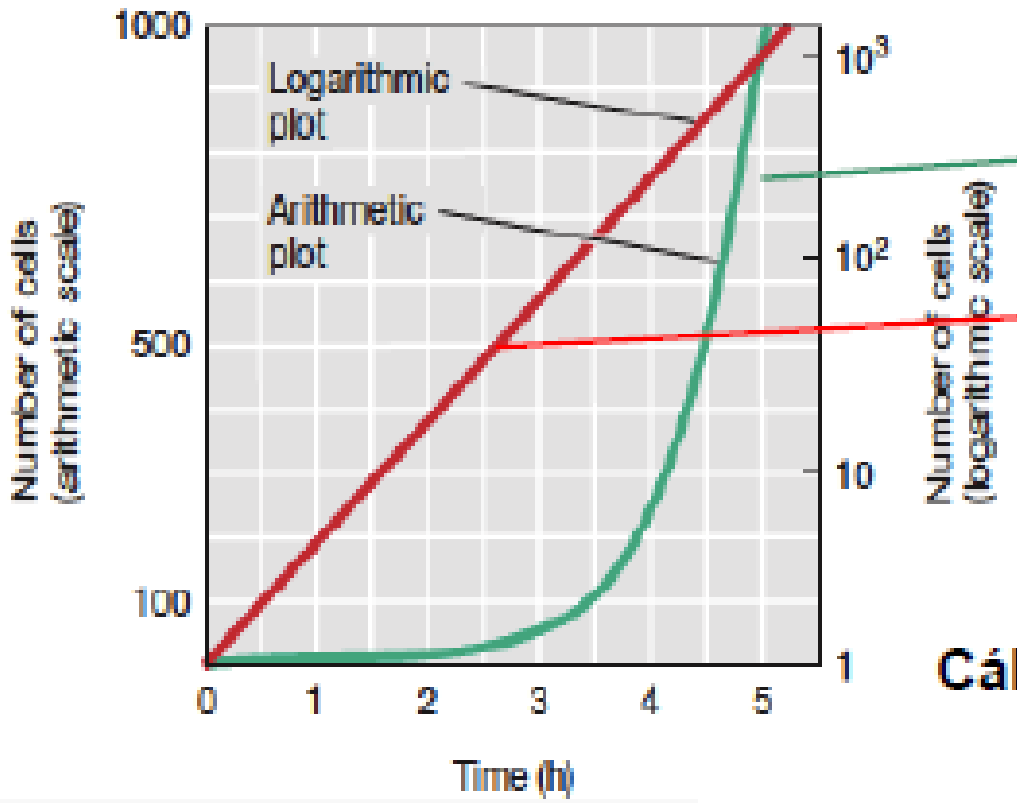
$N_t = N_o \times 2^n$

Si linealizamos nos queda:

$\log N_t = \log N_o + n \times \log 2$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_o}{\log 2}$$

CRECIMIENTO MICROBIANO



$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

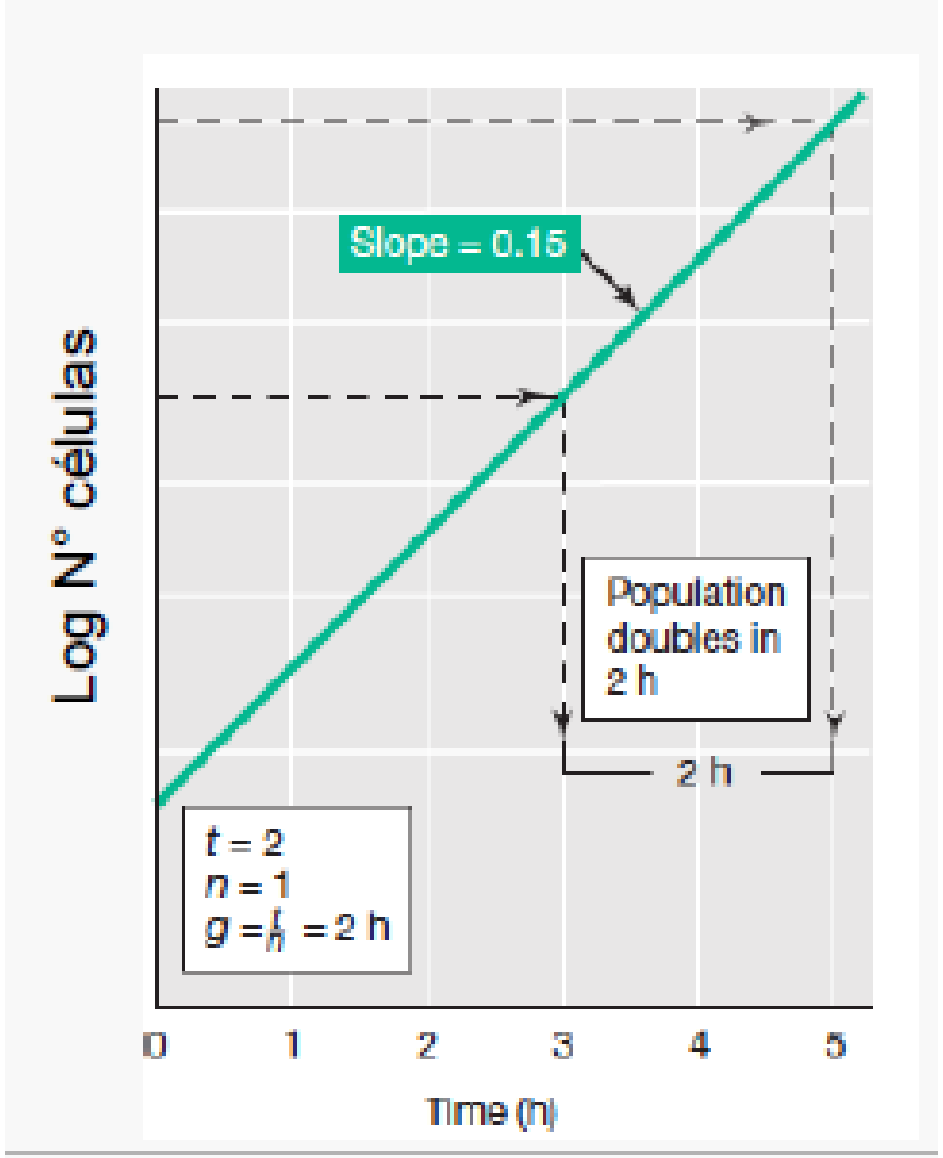
Cálculo de n a partir de la representación semilogarítmica

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{0.301}$$

$$= 3.3(\log N - \log N_0)$$

Velocidad de crecimiento microbiano



Vc: cambio en el número de generaciones por unidad de tiempo

k = Velocidad de crecimiento (h^{-1})

k = pendiente

$$k = \frac{\log N - \log N_0}{t}$$

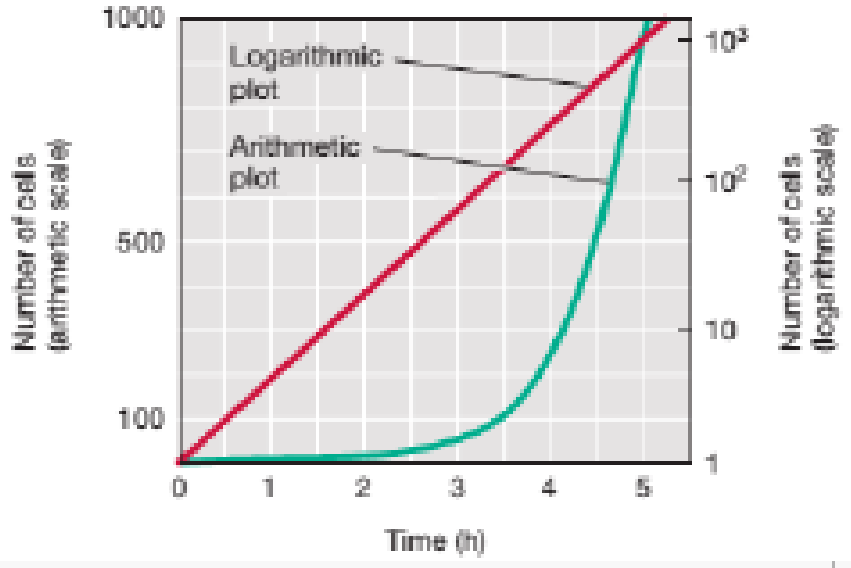
Cálculo del tiempo de generación (g) a partir de la velocidad de crecimiento (k)

Con la pendiente de la gráfica se puede determinar :

- g
- k

$$K = \frac{\log N - \log N_0}{t}$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$



$$Kt = \log N - \log N_0$$

$$Kt = n \log 2$$

$$kt = n\ 0{,}301 \Rightarrow t/n = 0{,}301/k \Rightarrow g = 0{,}301/k$$

EJERCICIOS

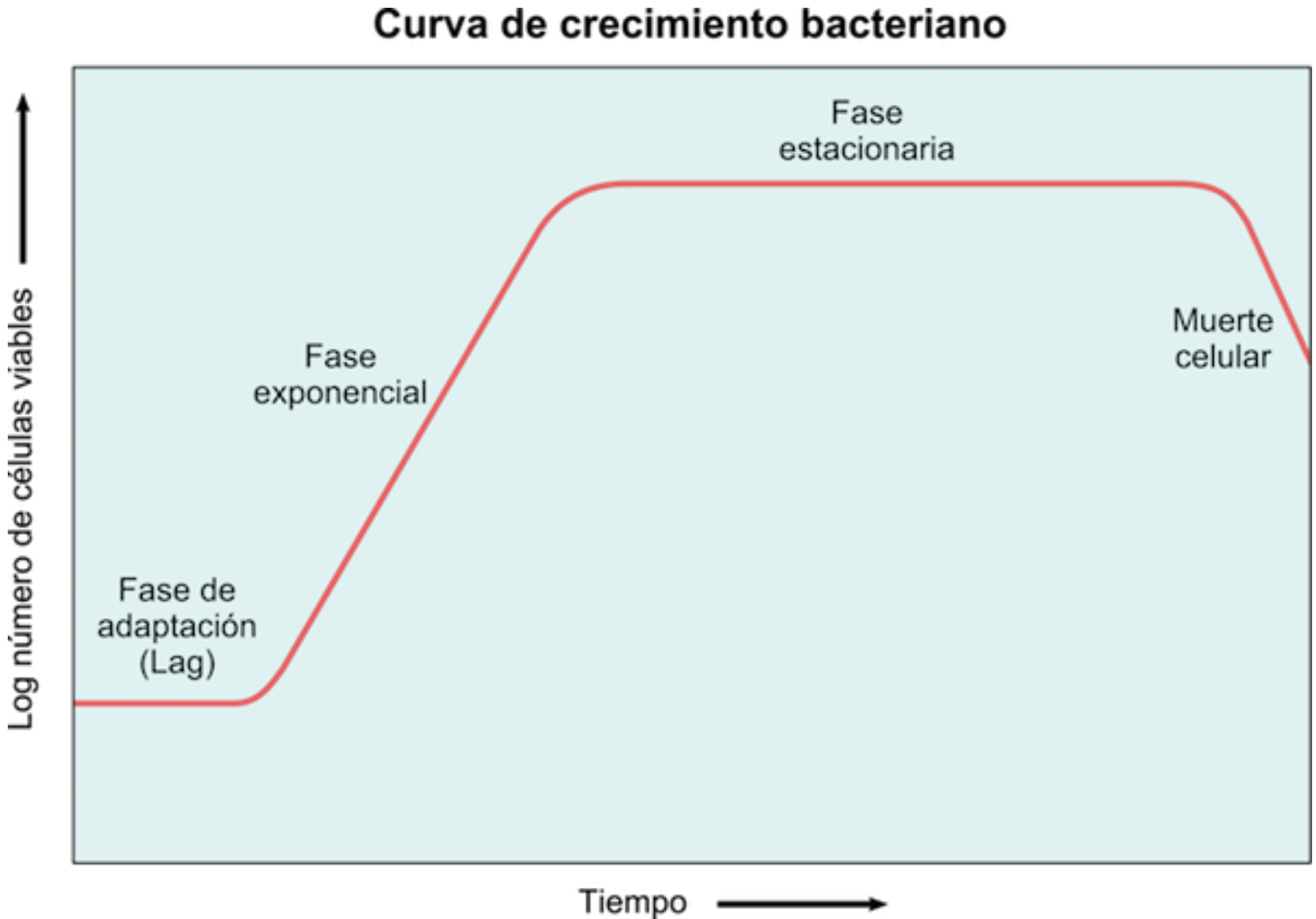
- En un cultivo bacteriano que está creciendo en condiciones óptimas se divide cada 20 minutos. Se colocan 1000 células en un matraz con medio fresco, ¿cuál será la población al cabo de 4 hs?

a) 3000 células
b) 4000 células
c) 20000 células
d) 4×10^6 células
e) 2×10^7 células

EJERCICIOS

¿Cuál será la población celular a las 3 horas de iniciado un cultivo, si la población inicial era de 1,5 x 10^7 células/ml, considerando que la Velocidad de crecimiento es de 0,15h^{-1}?

Crecimiento de un microorganismo en un cultivo cerrado:



Fases del crecimiento Bacteriano:

FASE DE LATENCIA (Lag):

- fase de adaptación al medio de cultivo, al nuevo ambiente.
- Su duración depende del estado en que está el cultivo (aumenta con la edad del cultivo)
- No hay división celular

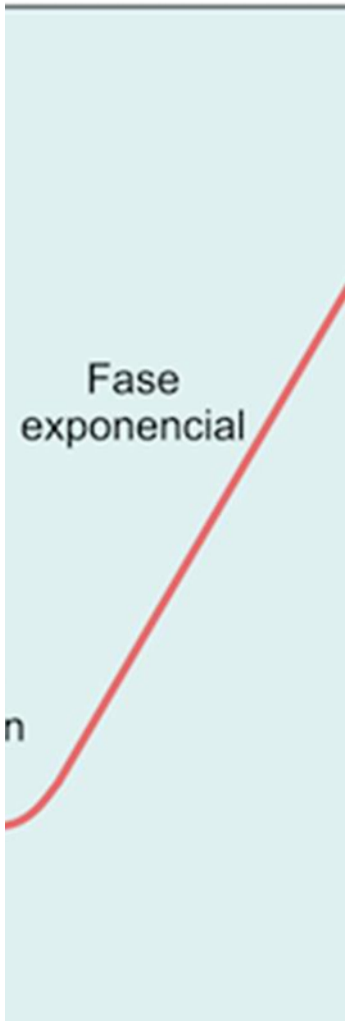
- Gran actividad metabólica
- Las células sintetizan nuevos componentes para adaptarse al nuevo medio.
- Síntesis de nuevas enzimas
- Germinación de esporas
- Inactivación de inhibidor.

Fases del crecimiento Bacteriano:

FASE EXPONENCIAL (Log):

- Los microorganismos se dividen a máxima velocidad (µmax) y en forma constante

- Crecimiento exponencial de la población.
- g es mínimo
- Producen metabolitos primarios (trofofase)



Fases del crecimiento Bacteriano:

FASE ESTACIONARIA:

- Sin crecimiento neto (μ=0) El numero total de microorganismos viables permanece constante
- velocidad de crecimiento = velocidad de muerte
- Acumulación de desechos metabólicos
- Disminución de nutrientes
- Se producen metabolitos secundarios, por ejemplo antibióticos (idiofase)
- Se produce estrés físico o químico (cambio de pH, T,etc.)

Fases del crecimiento Bacteriano:

FASE DE MUERTE:

- La velocidad de muerte es mayor que la de crecimiento ($\mu<0$)
- Las bacterias dejan de multiplicarse y mueren con el tiempo
- El cultivo pierde viabilidad
- Se acaban los nutrientes, acumulación de desechos y disminución del espacio físico

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

- **DETERMINACIÓN DEL NUMERO DE MICROORGANISMOS**

- **Métodos directos: recuento total**
  - Recuento microscópico directo
  - Conteo electrónico

- **Métodos indirectos: recuento de células viables**
  - Recuento en placa
  - Filtración por membrana
  - Medio líquido NMP

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

- **DETERMINACIÓN DE LA MASA CELULAR**

Métodos directos

- Medida de la masa
- Medida del volumen

Métodos indirectos

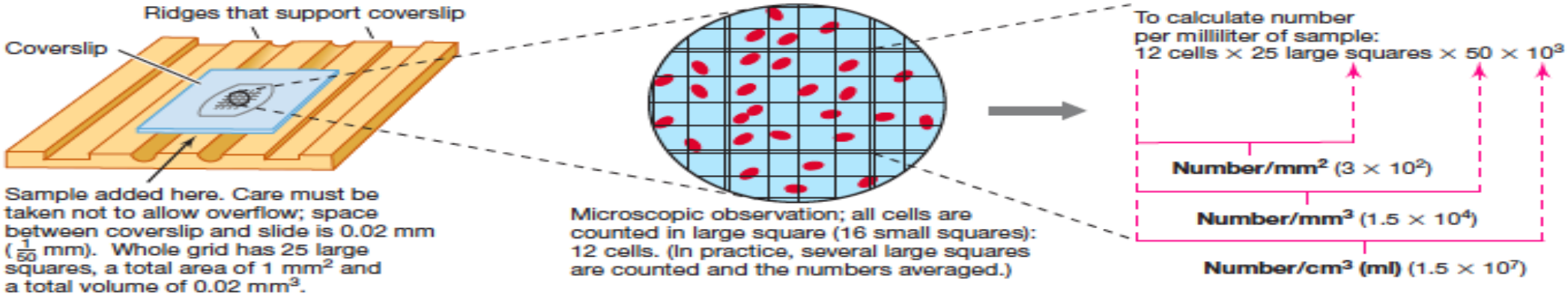
- Determinación del contenido de N,C,P, etc
- Turbidimetría (DO 600 nm) y Escala de Mac Farland

- **DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CELULAR**

- Actividad enzimática
- Concentración de un metabolito
- Medida de la respiración

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Recuento de células totales utilizando una cámara de Petroff-Hausser



- Limitaciones

  *No se distinguen células vivas de muertas

  *Células pequeñas son difíciles de ver

  *Requiere tiempo y habilidad para que sea un método preciso

  *No es bueno para una suspensión diluida (menos de 10^6 cel/mL)

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Recuento de células viables en placa

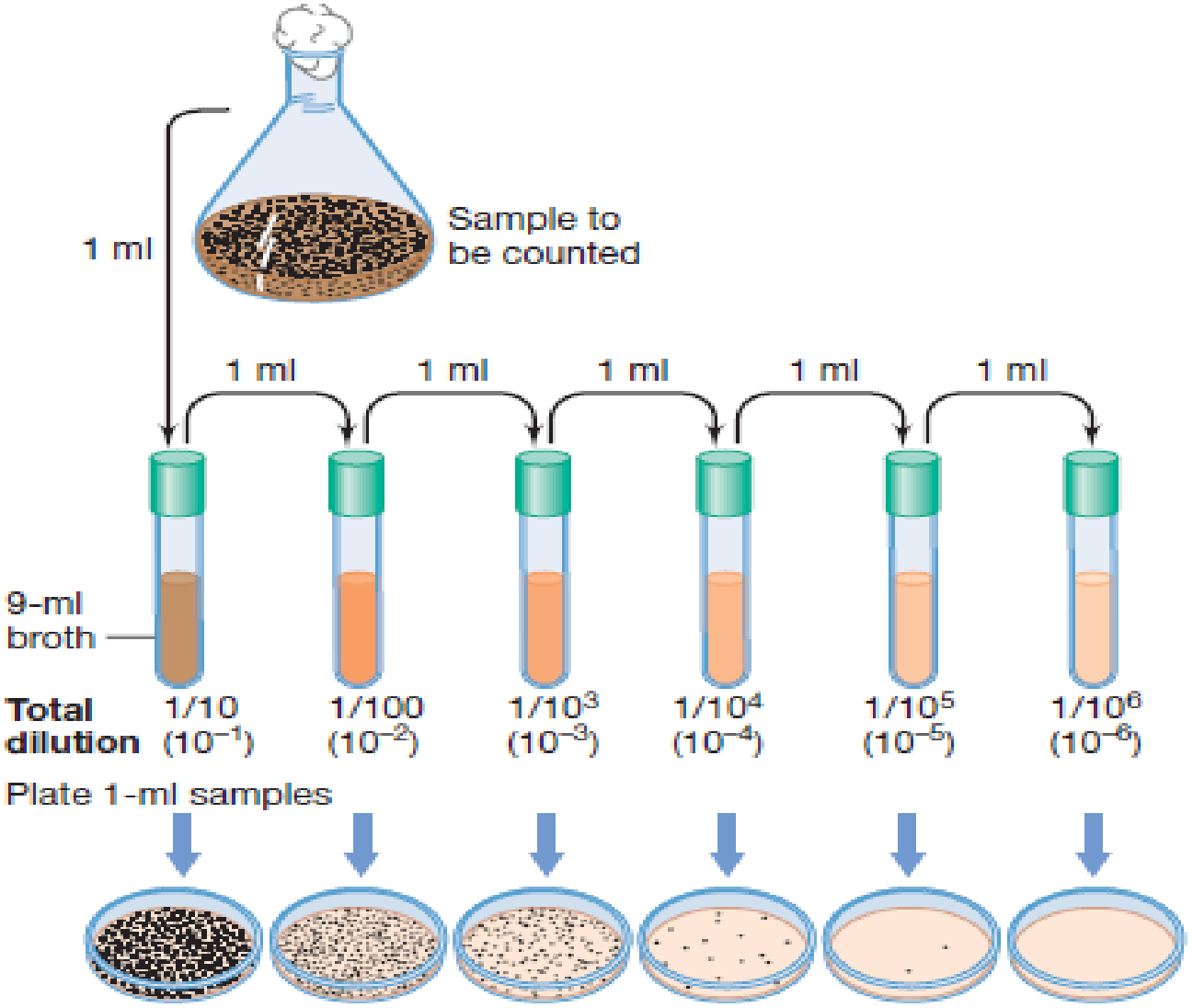
- Célula viable

  - Es capaz de dividirse para dar una progenie

  - Cada célula viable será una unidad formadora de colonia (ufc)

- Un recuento de este tipo implica contar colonias en una placa de petri
- Se realizan diluciones seriadas para conseguir un número apropiado de colonias (entre 30 y 300 ufc)
- El número de colonias depende además del medio, las condiciones de incubación y el tiempo.

Recuento de células viables en placa



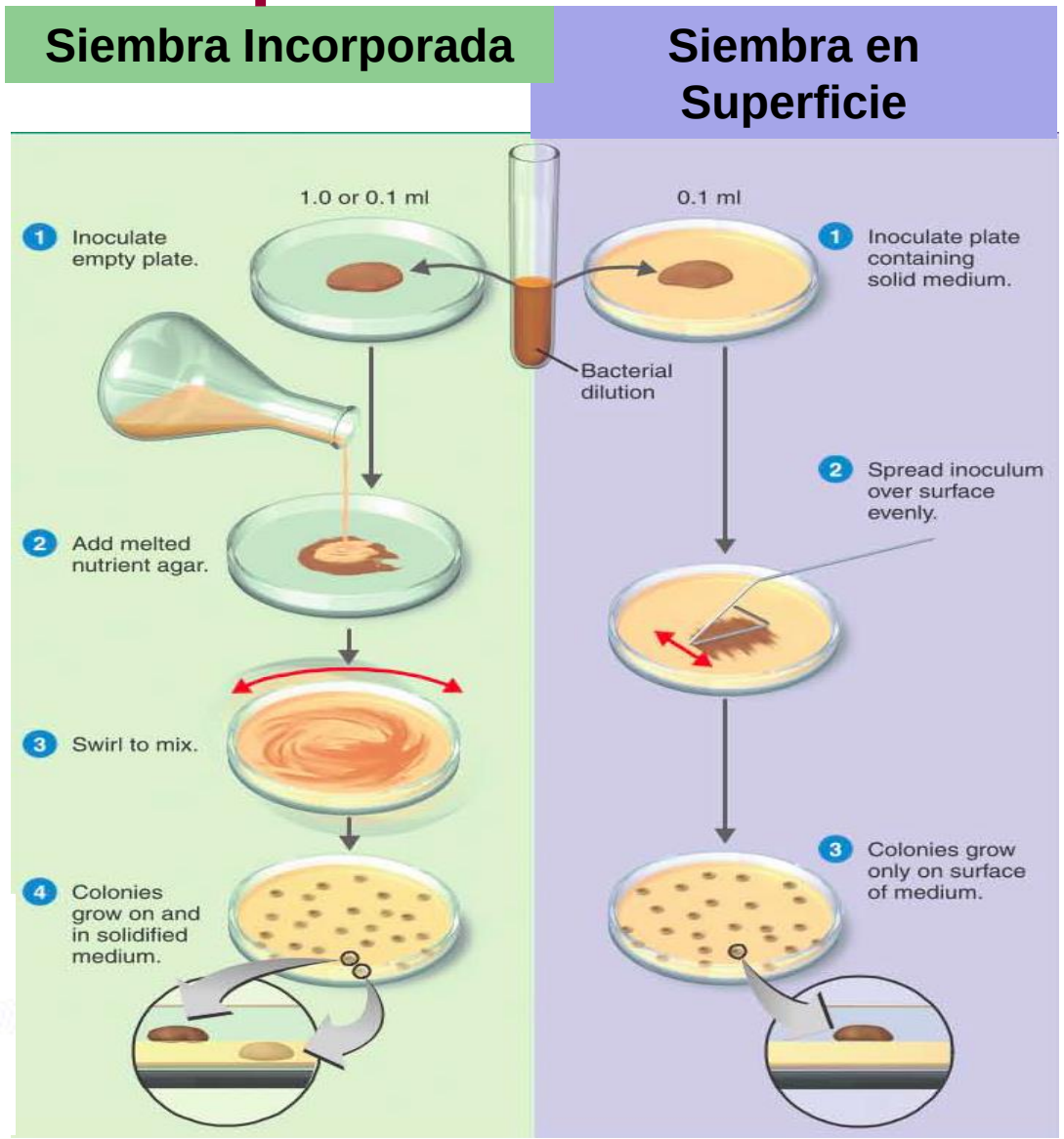
-límite de detección 1-10 ufc/mL

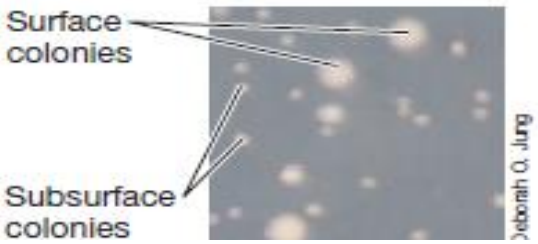
Recuento de células viables en placa

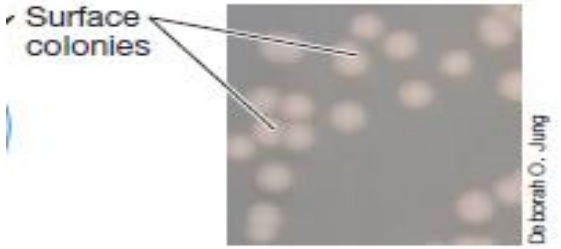
Tipos de siembra

Siembra Incorporada

Siembra en Superficie



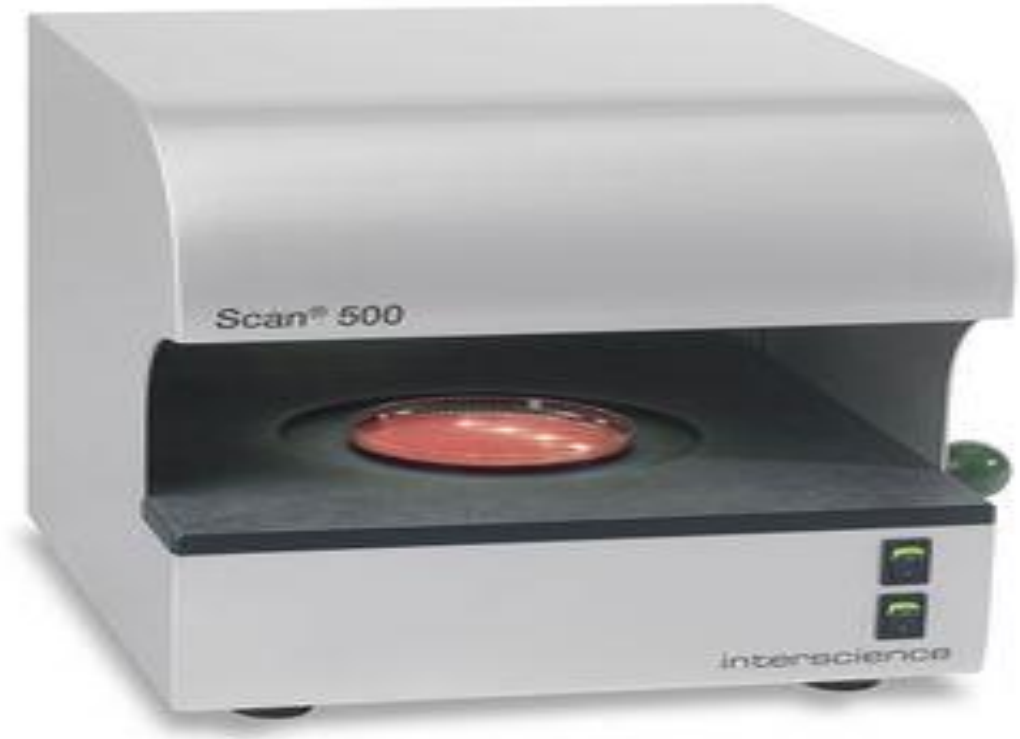




Ventajas y desventajas de ambos métodos

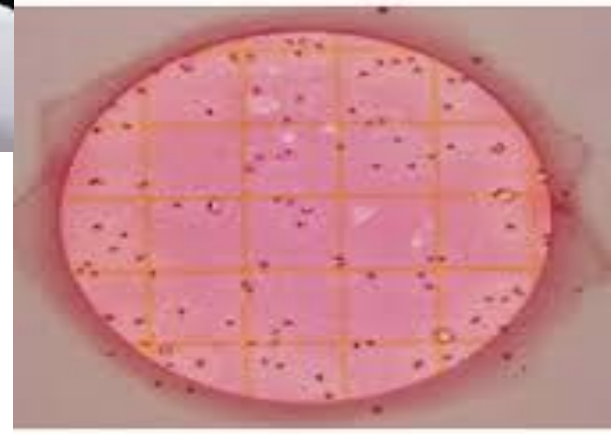
Incorporado	Superficie
Mayor cantidad de muestra	Menor cantidad de muestra
Mejor aprovechamiento de nutrientes	Peor aprovechamiento de nutrientes
Dificultades al subcultivar colonias	Facilidad para subcultivar colonias
Visualización de colonias dificultosa	Fácil visualización de colonias
Temperatura del agar puede afectar la viabilidad de algunos m.o.	No se afectan los m.o. termosensibles
Se desarrollan m.o. microaerofilicos	En aerobiosis sólo crecen aerobios y anaerobios facultativos

Recuento de células viables en placa



Recuento de células viables en Petrifilm

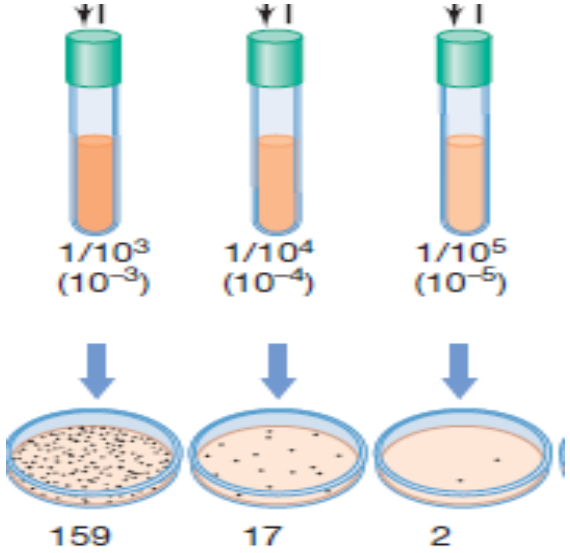
Límite de detección: 1ufc/ml

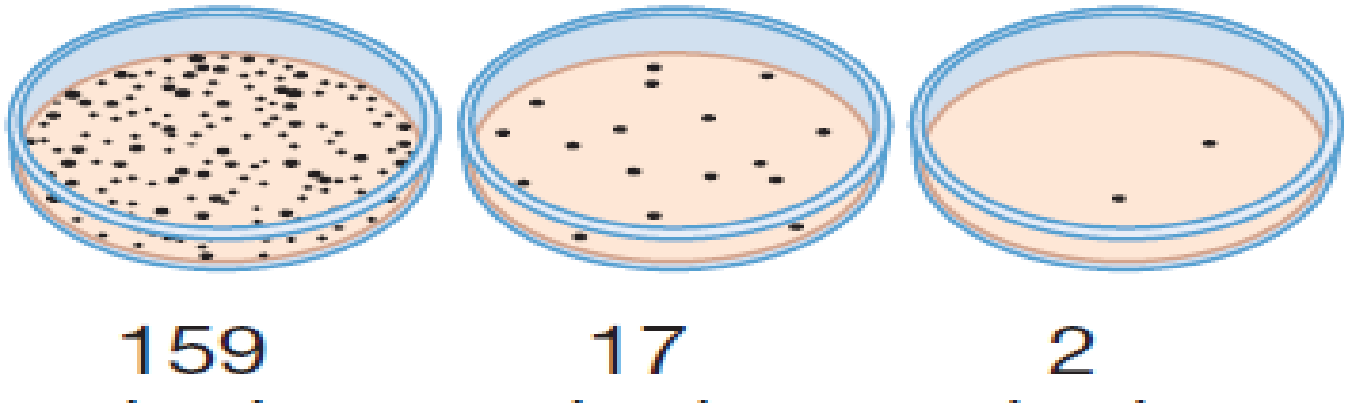


Recuento de células viables en placa

Cálculo del número de ufc/mL

ufc/ml = n° de colonias (30-300)
x 1/dilución
/vol. sembrado (ml)





Recuento= (159 x $1/10^{-3}$) /1ml=1,59x 10^5 UFC/mL

Recuento de células viables en placa

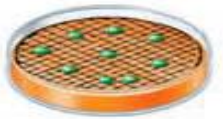
Filtración por membrana: baja carga

Filtro de membrana sobre un soporte de filtro.

La muestra de agua se pasa a través del filtro de membrana (0,45um)

Se retira el filtro de membrana y se coloca en el medio adecuado.

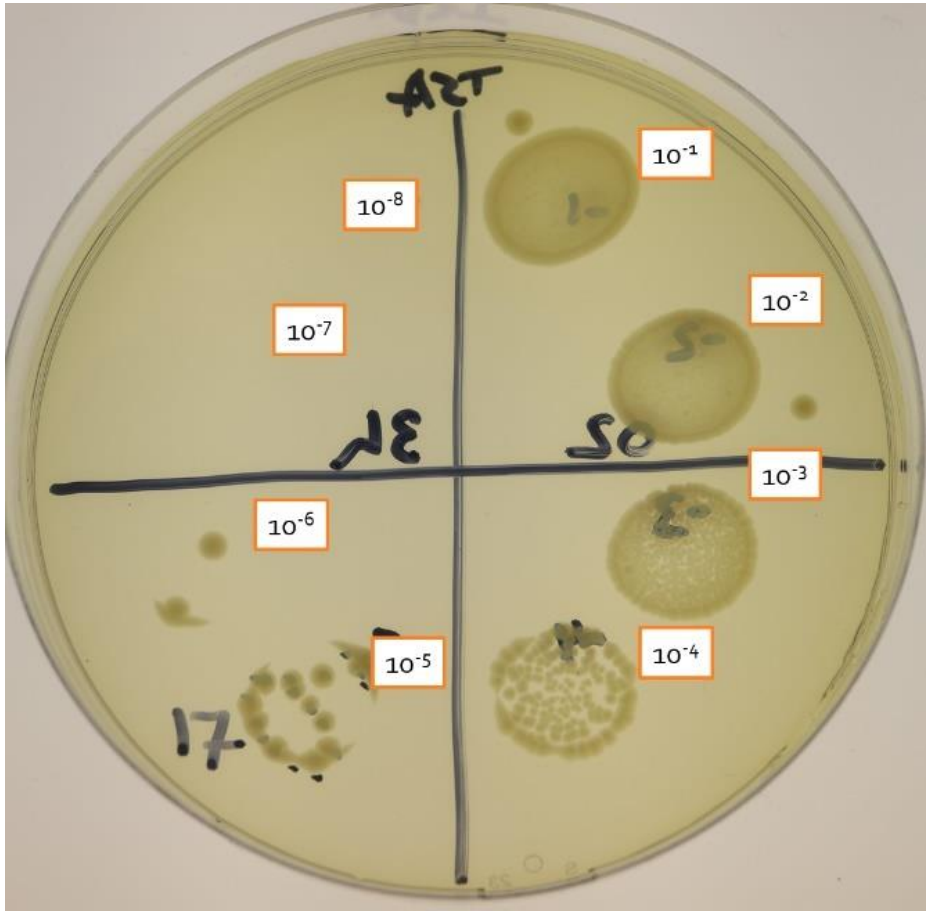
Se incuba durante 24hs



Se cuentan las colonias típicas.

Recuento de células viables en placa
Siembra por gotas

- Se realizan diluciones seriadas para conseguir un número apropiado de colonias
- **más de 8 colonias** y colonias claramente diferenciadas.
- El límite superior es lo que se puede distinguir visualmente



Recuento de células viables en placa
Filtración por membrana

FILTROS: se emplean filtros de **nitrato o acetato de celulosa**, minimizan la adsorción de conservadores y antimicrobiano.

Ventajas y desventajas:

- Sirve para determinar cargas muy bajas, pues se puede filtrar volúmenes de hasta 1 L por vez.
- Límite de detección bajo (< 1 ufc/mL a < 1 ufc/1L)

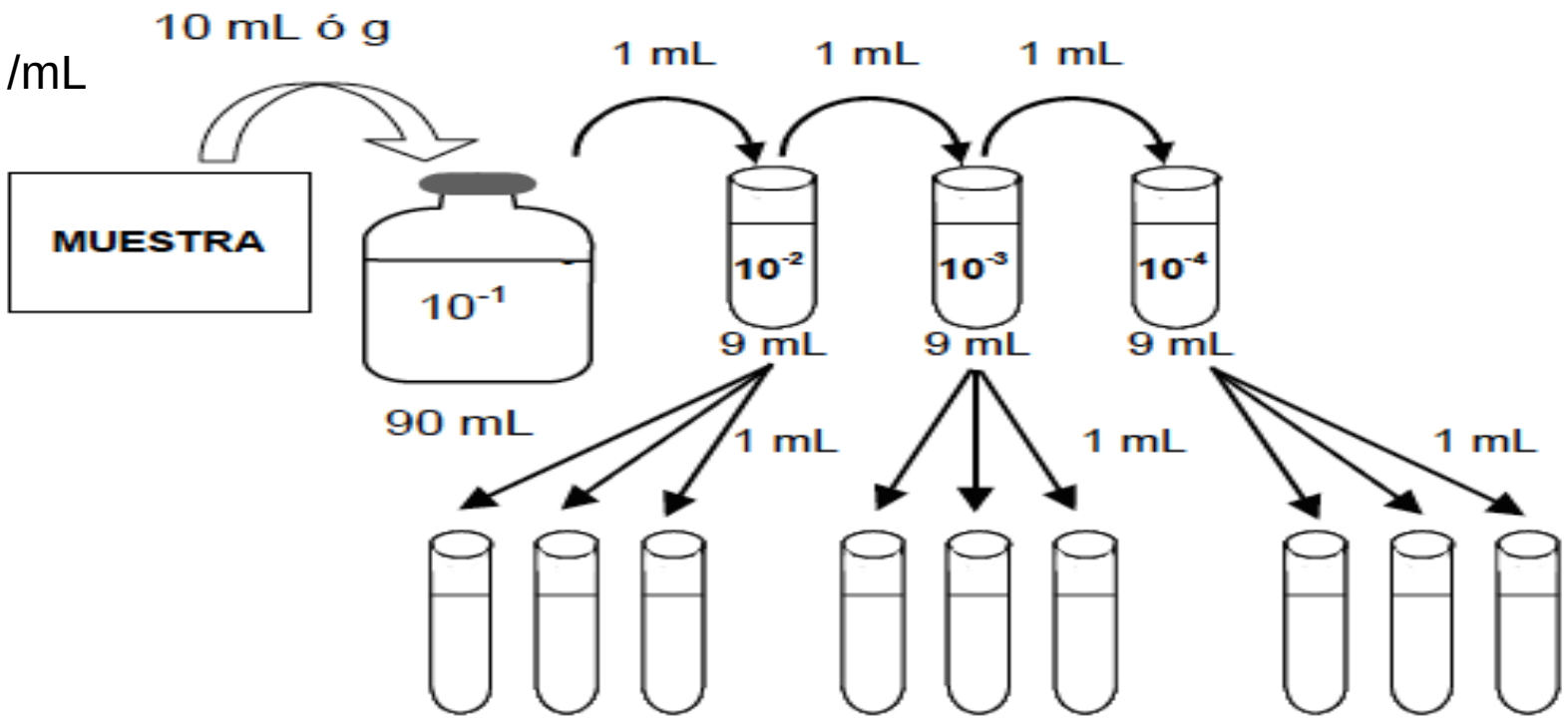
- Es el método de elección para muestras líquidas o solubles que contienen agentes antimicrobianos ya que no es necesario neutralizarlos.

Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)

- Método estadístico
- Se inoculan tubos con medios líquidos apropiados con diluciones seriadas de la muestra tales que para alguna de esas diluciones en los inóculos no se lleven células viables.
- Una vez incubados los tubos se obtendrá crecimiento para alguna de las diluciones mientras que no lo habrá para otras
- Se estima la población microbiana presente en la muestra utilizando tablas construidas para ciertas condiciones
- Siembra por triplicado o quintuplicado de cada dilución

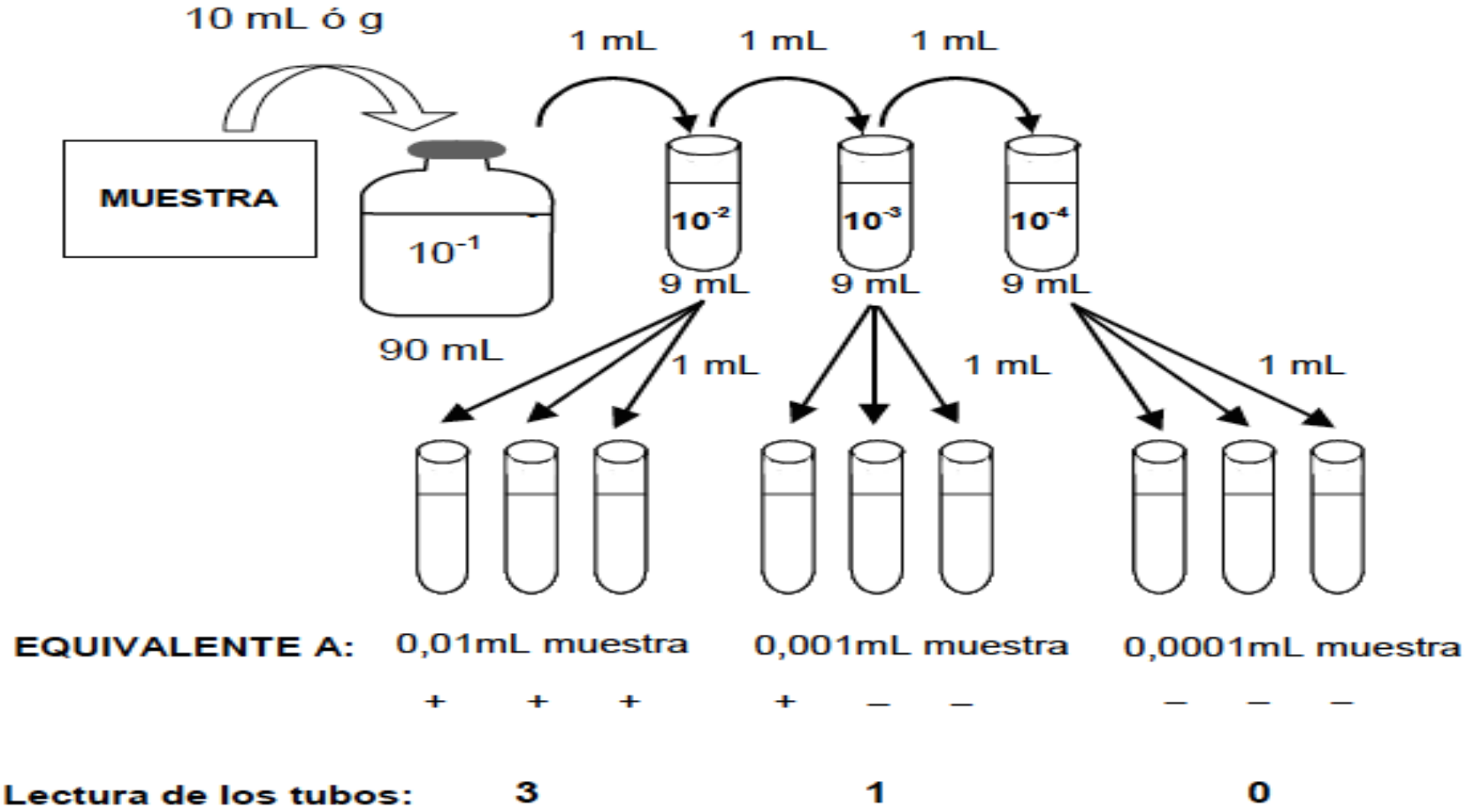
Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)

Muestra de
E. coli 1000 m.o /mL



- Los tubos se incuban en condiciones apropiadas según el ensayo

Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)



Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)

Series de 3 tubos (3 réplicas por dilución)

Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos para una serie de 3 tubos cada uno con 0,1, 0,01 y 0,001 g ó mL de muestra.

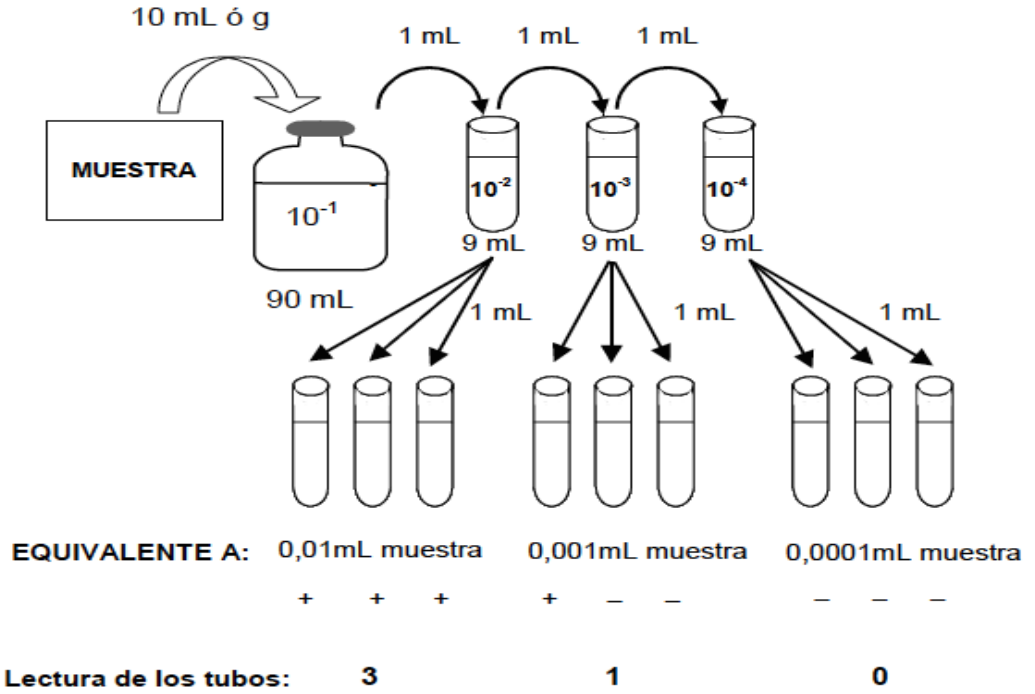
Combinación de tubos positivos	NMP/100 g ó mL	Límites de confianza del 95%		Combinación de tubos positivos	NMP/100 g ó mL	Límites de confianza del 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	<3	-	-	3-0-0	23	4	120
0-0-1	3	< 0,5	9	3-0-1	39	7	130
0-1-0	3	< 0,5	13	3-0-2	64	15	380
1-0-0	4	< 0,5	20	3-1-0	43	7	210
1-0-1	7	1	21	3-1-1	75	14	230
1-1-0	7	1	23	3-1-2	120	30	380
1-1-1	11	3	36	3-2-0	93	15	380
1-2-0	11	3	36	3-2-1	150	30	440
2-0-0	9	1	36	3-2-2	210	35	470
2-0-1	14	3	37	3-3-0	240	36	1300
2-1-0	15	3	44	3-3-1	460	71	2400
2-1-1	20	7	89	3-3-2	1100	150	4800
2-2-0	21	4	47	3-3-3	≥2400	-	-
2-2-1	28	10	150				

Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)

3 -1- 0 en tabla → 43 NMP/100mL

NMP de tipo de m.o en mL= 43 X 10 = 43 o 4,3 x10^{-1} NMP/mL

NMP de tipo de m.o en mL= n de la tabla x 1/dilución del medio



Recuento de células viables en tubos
Número más probable (NMP)

Series de 5 tubos
(5 réplicas
por dilución)

El límite de detección en las condiciones de la Tabla IV es <2/100 mL

Tabla IV. Índice de NMP y límite de confianza del 95% para varias combinaciones de resultados positivos para una serie de 5 tubos cada uno con 10, 1 y 0,1 g ó mL de muestra.

		Límites de confianza del 95%				Límite de confianza del 95%	
Combinación de tubos positivos	NMP/100 g ó mL	Inferior	Superior	Combinación de tubos positivos	NMP/100 g ó mL	Inferior	Superior
0-0-0	<2	--		4-3-0	27	9	80
0-0-1	2	<0,5	7	4-3-1	33	11	93
0-1-0	2	<0,5	7	4-4-0	34	12	93
0-2-0	4	<0,5	11	5-0-0	23	7	70
1-0-0	2	<0,5	7	5-0-1	31	11	89
1-0-1	4	<0,5	11	5-0-2	43	15	110
1-1-0	4	<0,5	11	5-1-0	33	11	93
1-1-1	6	<0,5	15	5-1-1	46	16	120
1-2-0	6	<0,5	15	5-1-2	63	21	150
2-0-0	5	<0,5	13	5-2-0	49	17	130
2-0-1	7	1	17	5-2-1	70	22	170
2-1-0	7	1	17	5-2-2	94	28	220
2-1-1	9	2	21	5-3-0	79	25	190
2-2-0	9	2	21	5-3-1	110	31	250
2-3-0	12	3	28	5-3-2	140	37	340
3-0-0	8	1	19	5-3-3	180	44	500
3-0-1	11	2	25	5-4-0	130	35	300
3-1-0	11	2	25	5-4-1	170	43	490
3-1-1	14	4	34	5-4-2	220	57	700
3-2-0	14	4	34	5-4-3	280	90	850
3-2-1	17	5	46	5-4-4	350	120	1000
4-0-0	13	3	31	5-5-0	240	68	750
4-0-1	17	5	46	5-5-1	350	120	1000
4-1-0	17	5	46	5-5-2	540	180	1400
4-1-1	21	7	63	5-5-3	920	300	3200
4-1-2	26	9	78	5-5-4	1600	640	5800
4-2-0	22	7	67	5-5-5	>2400		--
4-2-1	26	9	78				

Turbidimetría

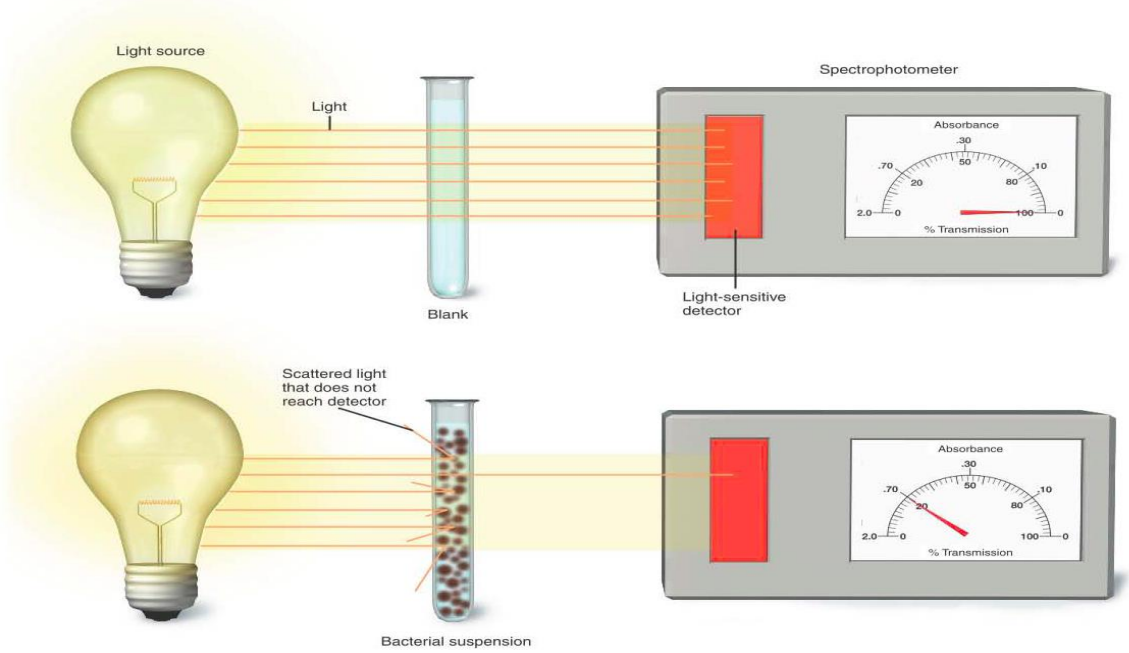
Se basa en la capacidad de las células de dispersar la luz (espectofotómetro)

Tamaño constante dispersión proporcional a biomasa

Se realiza la medicion a 600nm

Muy baja sensibilidad (10^7-10^8 cel/mL)

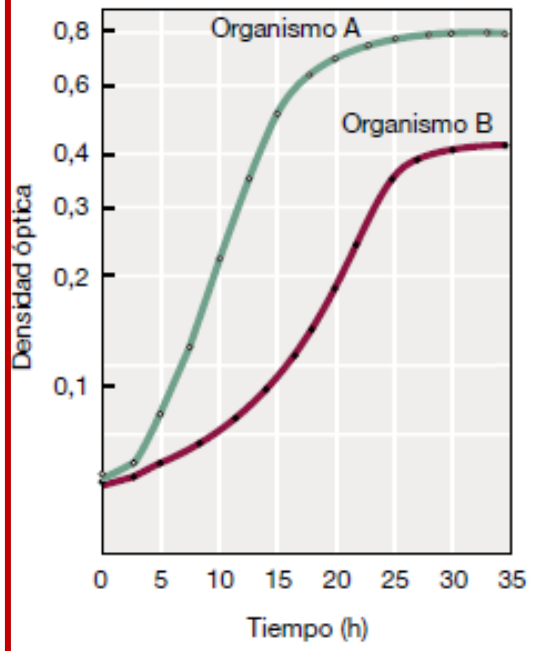
No distingue células vivas de muertas



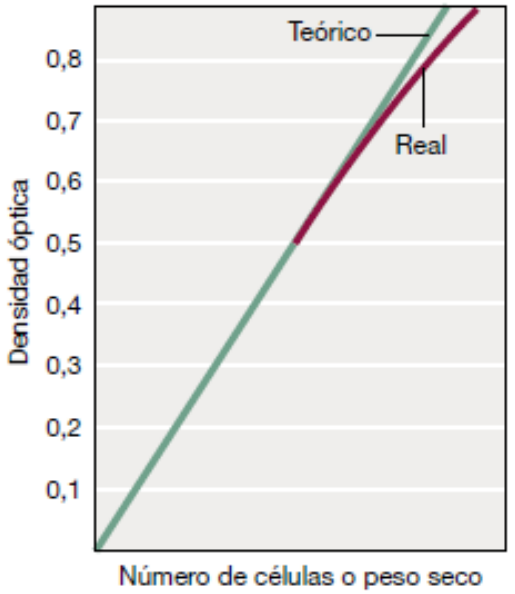
Turbidimetría – Interpretacion de resultados

Relación entre densidad óptica y número de células

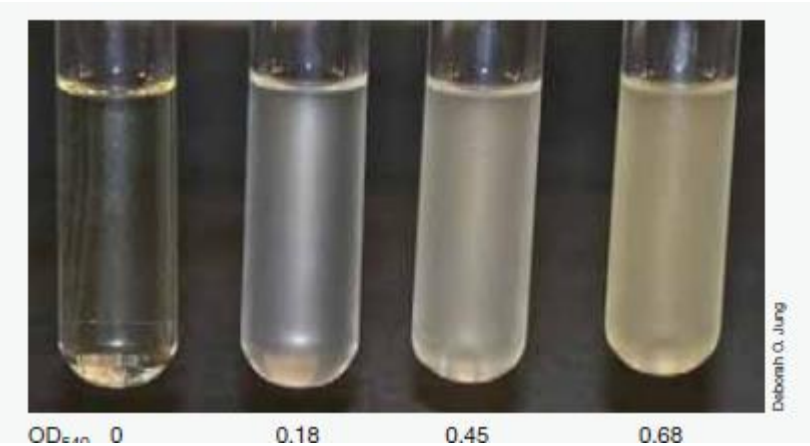
- Para organismos unicelulares, la densidad optica es proporcional, dentro de ciertos limites, al numero de celulas
- Para poder hacer esto hay que preparar una curva de calibracion que relacione el numero de celulas (Ej.recuento microscopico o recuento de viables) con la turbidez
- A densidades opticas altas, la correspondencia univoca entre el numero de celulas y la turbidez se desvia de la linealidad y las mediciones de DO pierden precision.
- Puesto que organismos diferentes difieren en tamano y forma, numeros de celulas iguales para dos especies bacterianas diferentes no necesariamente daran el mismo valor de densidad optica.
- Hay que construir una curva de calibracion para cada organismo que se cultive.



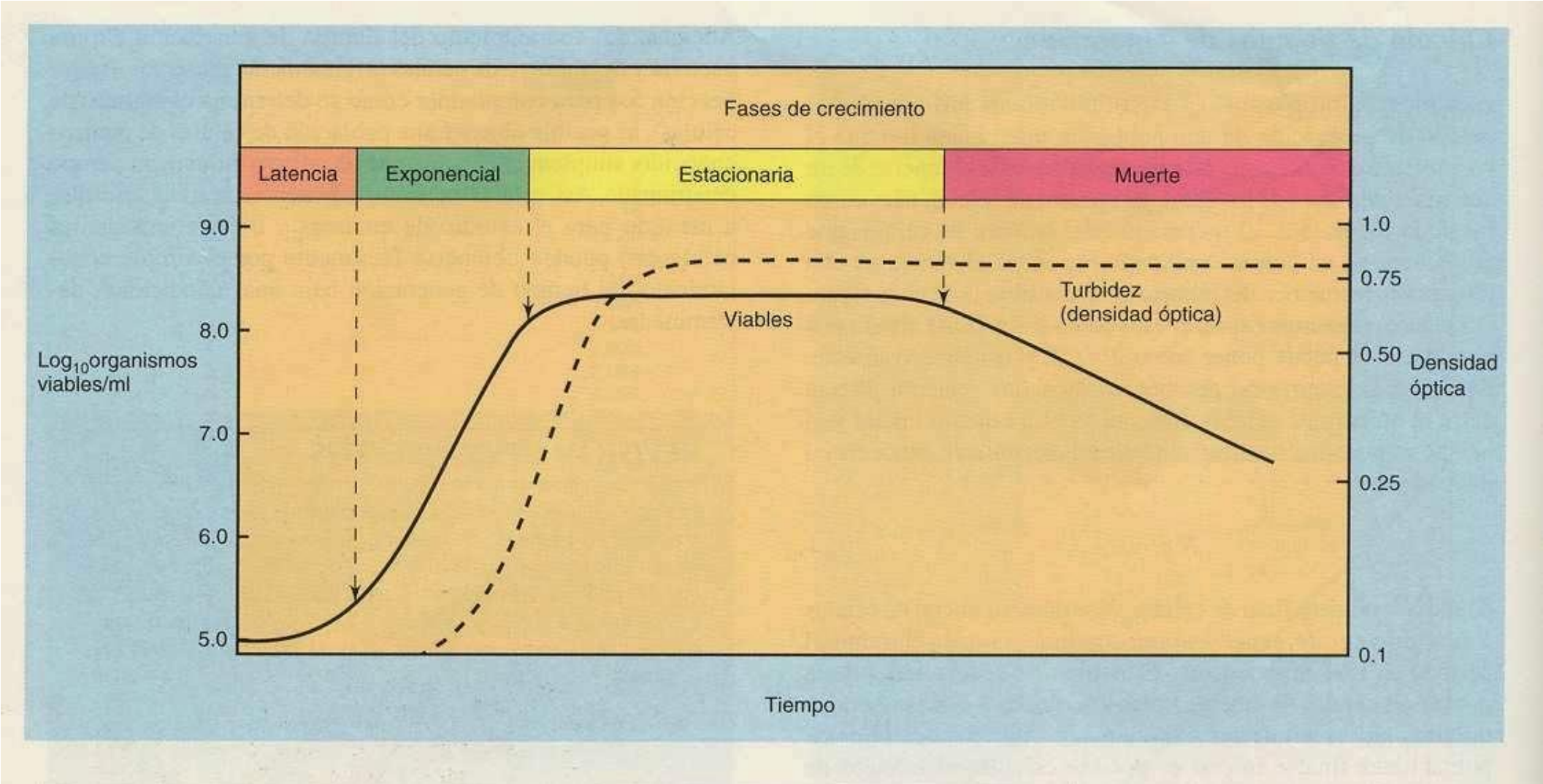
(b)



(c)



Turbidimetría



Escala Mc Farland

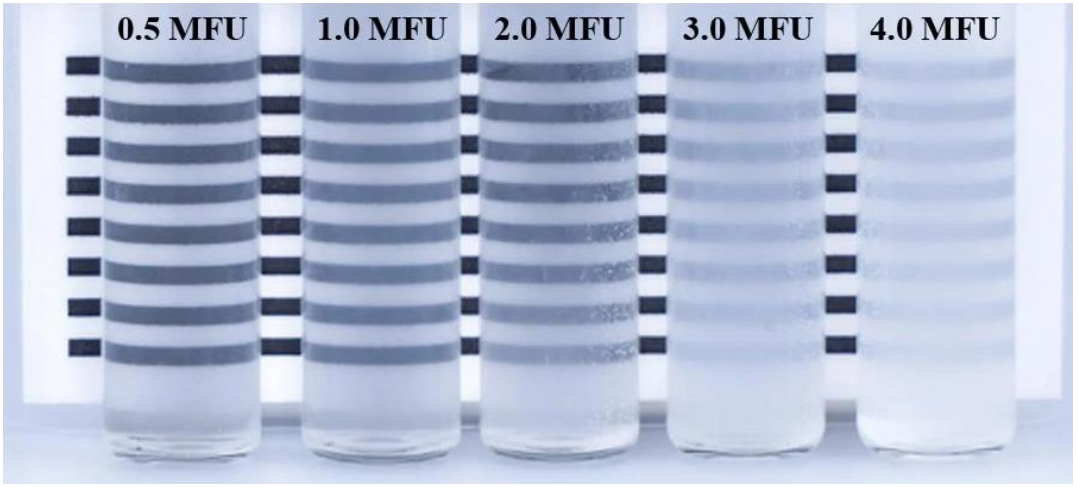
Se utilizan para estandarizar el número aproximado de bacterias en una suspensión líquida.

Consta de 11 patrones (desde 0,5 a 10) cada uno de los cuales tiene una turbidez comparable a la de una suspensión bacteriana con una densidad determinada.

Se compara el cultivo de bacterias en medio líquido con la turbidez de la suspensión de prueba con la del estándar McFarland.

.

El patrón 0,5 de Mc Farland que corresponde a 1,5 x 10^8 UFC/mL



Estándar McFarland	H_2SO_4 (1%) ml	$BaCl_2$ (1,175%) ml
0,5	24,875	0,125
1	24,75	0,25
2	24,5	0,5
3	24,25	0,75
4	24	1
5	23,75	1,25
6	23,5	1,5
7	23,25	1,75
8	23	2
9	22,75	2,25
10	22,5	2,5

En resumen:

- Crecimiento bacteriano = aumento de células, masa celular
- Parámetros de crecimiento poblacional :

- $N_t = N_o x 2^n$
- $g = t/n$

- Las bacterias tiene 4 fases en su crecimiento: latencia, exponencial, estacionaria y de muerte
- Puedo determinar el crecimiento bacteriano por varios métodos
- Conteo directo
- Recuento de viables en placa
- NMP
- Turbidimetría