

Crecimiento

Unidad VI

I. Introducción

- La célula bacteriana es esencialmente una maquinaria de síntesis capaz de duplicarse a sí misma
- El proceso de síntesis para el crecimiento bacteriano involucra unas 2000 reacciones químicas de una amplia variedad
- Una vez sintetizados los polímeros, el crecimiento continúa con el ensamblaje y formación de nuevas estructuras celulares que finalizan con la división en dos células hijas

- En un medio apropiado física y nutricionalmente, un cultivo se reproduce continuamente como células vegetativas, los nutrientes absorbidos y metabolizados permiten crecer al microorganismo.

II. Conceptos

- **Crecimiento**, se define como un incremento ordenado de todas las estructuras y constituyentes celulares. En muchos microorganismos este incremento continua hasta que la célula se divide en dos nuevas células
- El crecimiento microbiano resulta usualmente en un incremento en el número de células

- **Crecimiento individual** (crecimiento celular), es un incremento en el tamaño y peso y es usualmente un preludio a la división celular.
- **Crecimiento poblacional**, es un incremento en el número de células como una consecuencia del crecimiento y división celular
- **Tasa de crecimiento**, es el cambio de número de células o masa por unidad de tiempo

- **Generación**, intervalo para la formación de dos células provenientes de una
- **Tiempo de generación**, tiempo que tarda una población en duplicarse. Varía ampliamente entre microorganismos: 1-3 horas, 10 minutos, muchas horas, muchos días.
- **Crecimiento exponencial**, patrón de crecimiento de la población microbiana en el cual el número de células se duplica por cada unidad de tiempo.

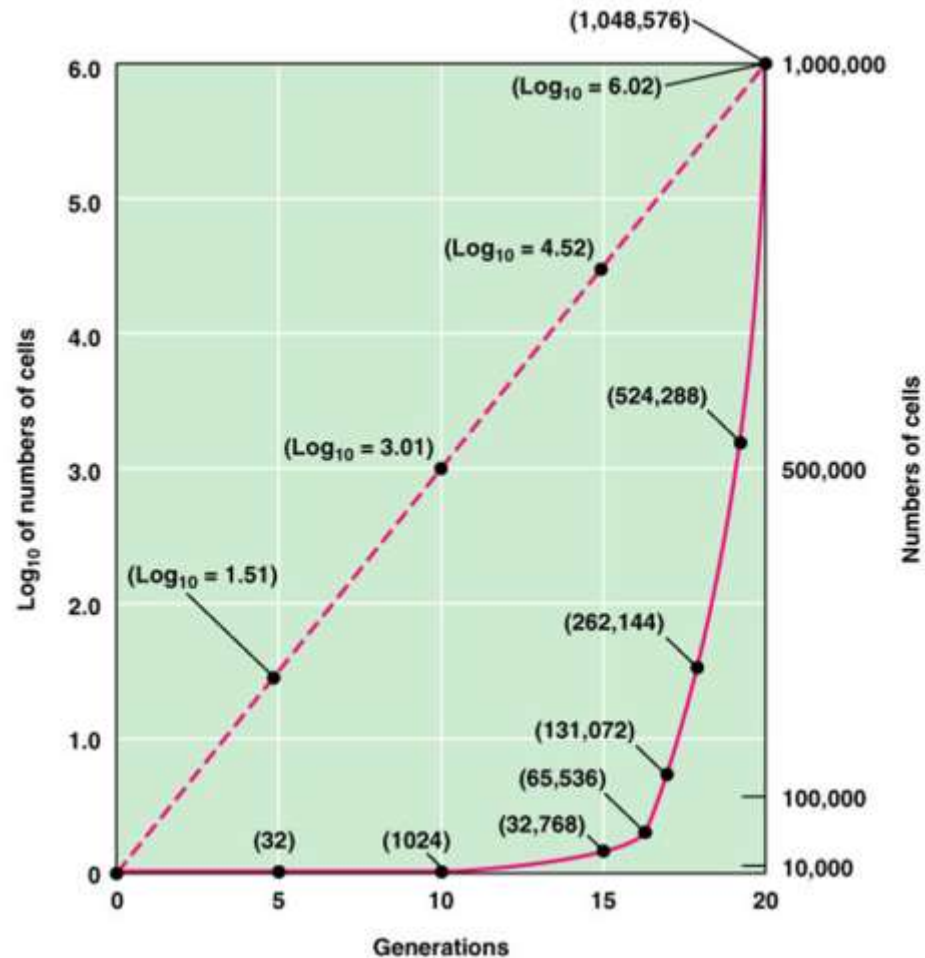
Un experimento de crecimiento hipotético empezando con una simple célula con un tiempo de generación de 30' se representa en la siguiente tabla

t (h)	N° de cel	Log N° cel
0	1	0
0.5	2	0.301029996
1	4	0.602059991
1.5	8	0.903089987
2	16	1.204119983
2.5	32	1.505149978
3	64	1.806179974
3.5	128	2.10720997
4	256	2.408239965
4.5	512	2.709269961
5	1024	3.010299957
5.5	2048	3.311329952
6	4096	3.612359948
6.5	8192	3.913389944
7	16384	4.214419939
7.5	32768	4.515449935
8	65536	4.816479931
8.5	131072	5.117509926
9	262144	5.418539922
9.5	524288	5.719569918
10	1048576	6.020599913

El número de células se incrementa por un factor constante por cada unidad de tiempo
→ crec. exp

Generation number	Number of Cells	Log_{10} of Number of Cells
0	1	0
5	$(2^5) = 32$	1.51
10	$(2^{10}) = 1\,024$	3.01
15	$(2^{15}) = 32\,768$	4.52
16	$(2^{16}) = 65\,536$	4.82
17	$(2^{17}) = 131\,072$	5.12
18	$(2^{18}) = 262\,144$	5.42
19	$(2^{19}) = 524\,288$	5.72
20	$(2^{20}) = 1\,048\,576$	6.02

Velocidad de crecimiento de un cultivo microbiano. Datos de una población que se duplica cada 30 min



Velocidad de crecimiento de un cultivo microbiano. Datos representados en escalas aritmética (ordenada derecha) y logarítmica (ordenada izquierda).

How can you get so many ?

For a bacterium with a 20 minute doubling (generation) time growing for 2 days with unlimited food supply:

Mass of one bacterium:

9.5×10^{-13} g

48 hours = 144 generations = 2^{144} new cells

2.2×10^{43} cells

Mass of those cells

2.1×10^{31} g

Mass of the earth:

6×10^{27} g

Therefore after 48 hours, weight of bacteria would equal:

3500 earths

Mass of sun = **2×10^{33} g**

Mass of earth = **6×10^{27} g**

III. Factores que influyen en el crecimiento

1) Factores externos

- Condiciones ambientales o culturales: pH, T°, Aw, O₂, luz, presión, humedad.
- Condiciones nutricionales: tasa C:N

2) Factores internos

- Capacidad metabólica

- El tiempo de generación (tg, td, g) depende de los factores internos y externos. Ej. Para *E. coli*

T °C	tg (min)
20	60
30	29.7
37	17.21
40	17
45	30.34
50	No hay dup

- En condiciones ideales tg es conocido:

Microorganismo	tg
Enterobacterias	15 – 30'
<i>E. coli</i>	17.21'
<i>Nitrosomonas</i>	5 – 10 horas
Bacterias lixiviantes	2 – 7 días

IV. Medida del crecimiento microbiano

Se mide por cambios sucesivos en el número de células o por el peso de la masa de las células.

A) Recuento de células

- a.1 Conteo de células al microscopio
- a.2 Conteo de células viables:
 - a2.1 Diseminación en placa (Spread plate)
 - a2.2 Vaciado en placa (Pour plate)

B) Medida de la masa celular

- b.1 Peso seco
- b.2 Turbidimetría

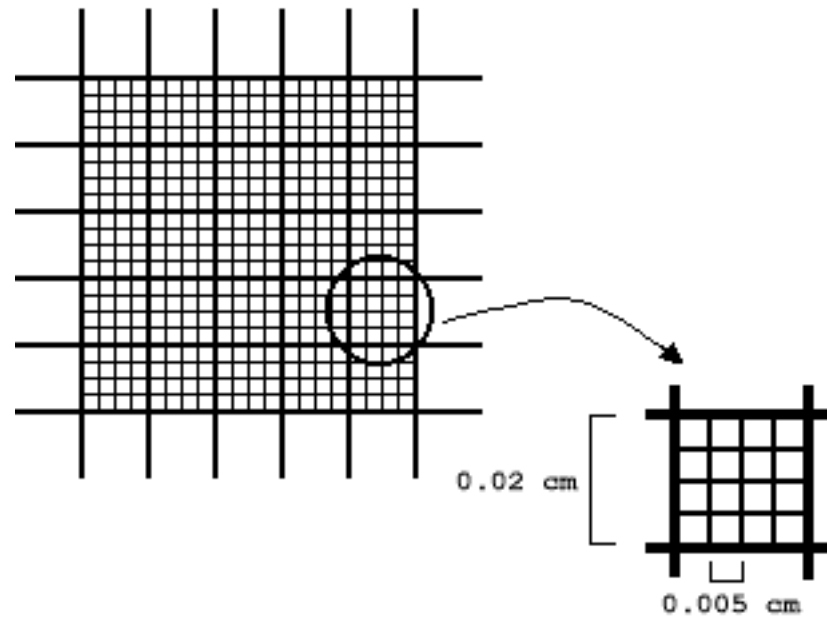
A) Recuento de células

a.1 Conteo de células al microscopio, se emplea un dispositivo graduado con 25 cuadrados de área y volumen conocido (Cámara de Petroff-Hausser, cámara de Neubauer, hemocitómetro).

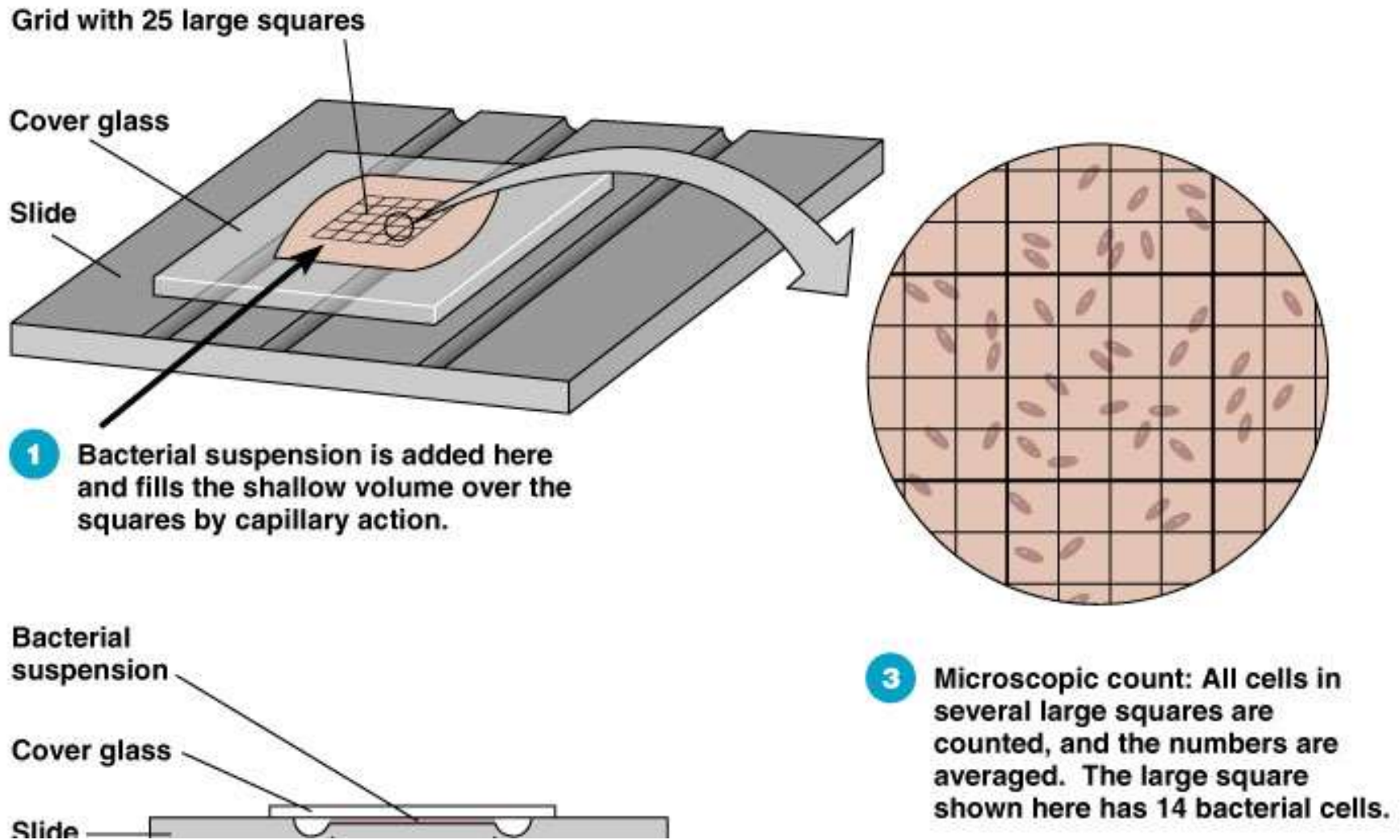
Limitaciones:

1. Es muy tedioso, no es práctico para un gran número de muestras
2. No es muy sensible, se necesitan al menos 10^6 bact/ml para que sean observadas al microscopio
3. No distinguen células vivas de muertas

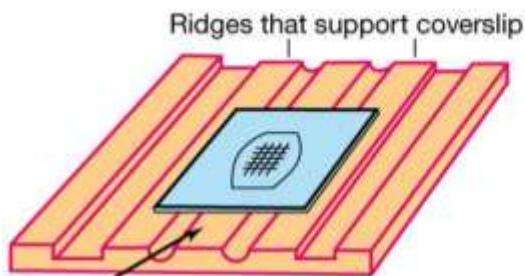
Cámara de recuento de Petroff-Hauser



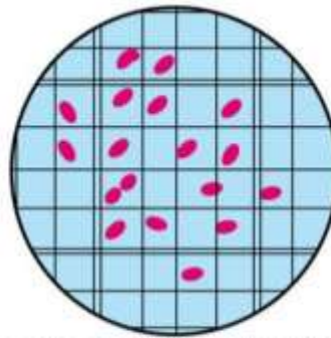
Direct Measurements of Microbial Growth



Direct microscopic counting procedure using the Petroff-Hausser counting chamber



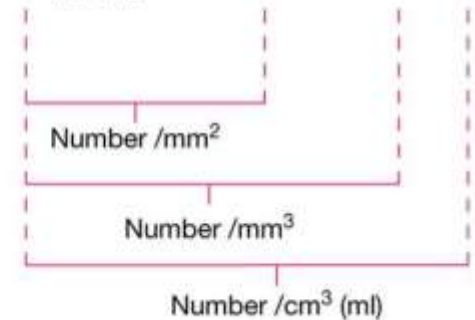
Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50}$ mm). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm² and a total volume of 0.02 mm³.



Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)



To calculate number per milliliter of sample:
12 cells x 25 large squares x 50 x 10³
= 1.5 x 10⁷



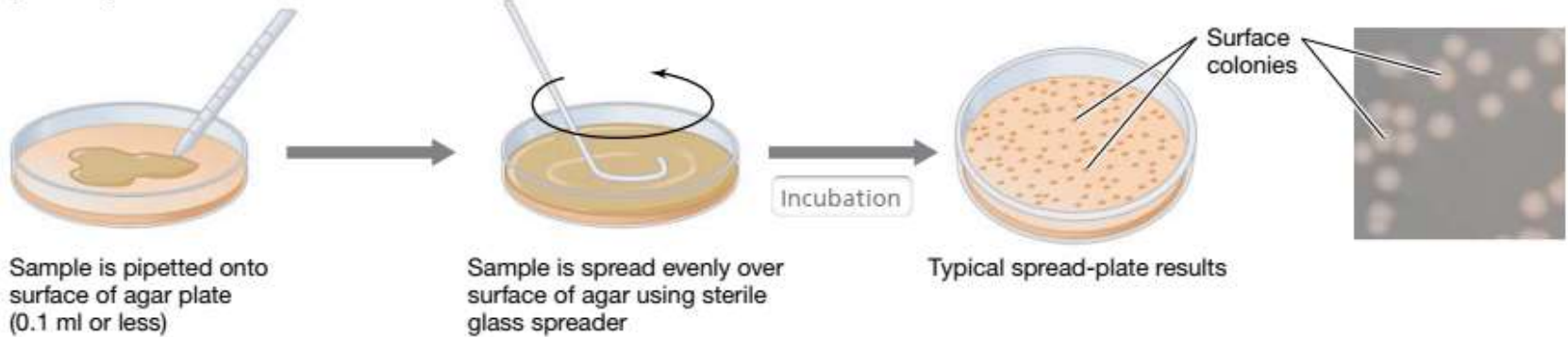
a.2 Conteo de células viables: Una célula viable es definida como una célula que es capaz de dividirse y formar una colonia en el medio de cultivo. El conteo en placas es el método más ampliamente usado

a.2.1 Diseminación en placa (Spread plate). Se asume que cada colonia surgió de una simple célula, contando el número de colonias uno puede calcular el número de células viables en la muestra

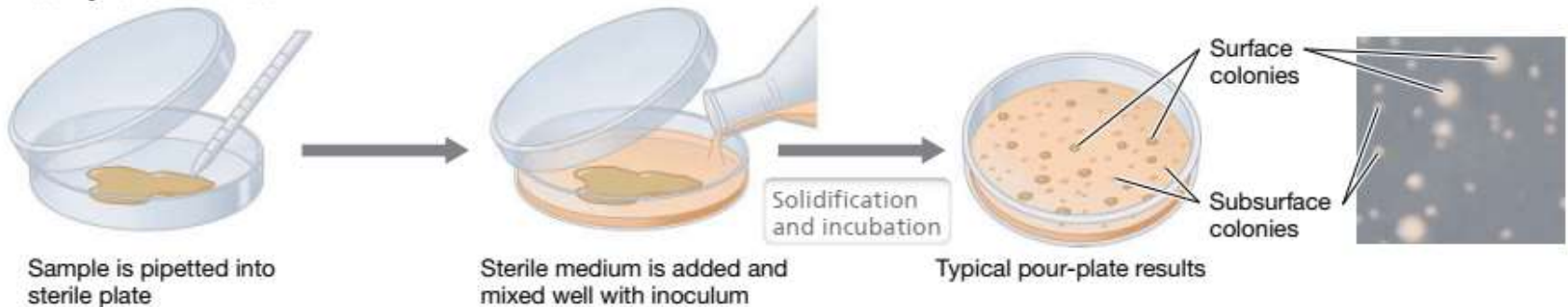
a.2.2 Vaciado en placa (Pour plate)

Plate Count

Spread-plate method



Pour-plate method



Two methods for the viable count. Only surface colonies form in the spread plate technique.

By contrast, in the pour-plate method, colonies form within the agar as well as on the agar surface. On the far right are photos of colonies of *Escherichia coli* formed from cells plated by the spread-plate method (top) or the pour-plate method (bottom).

Direct Measurements of Microbial Growth

- Plate Counts: Perform serial dilutions of a sample

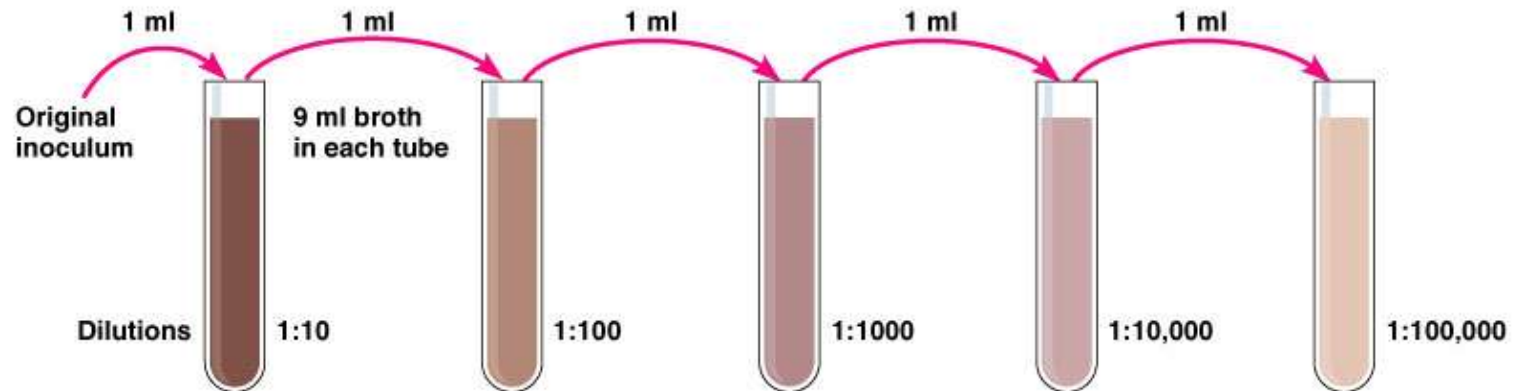
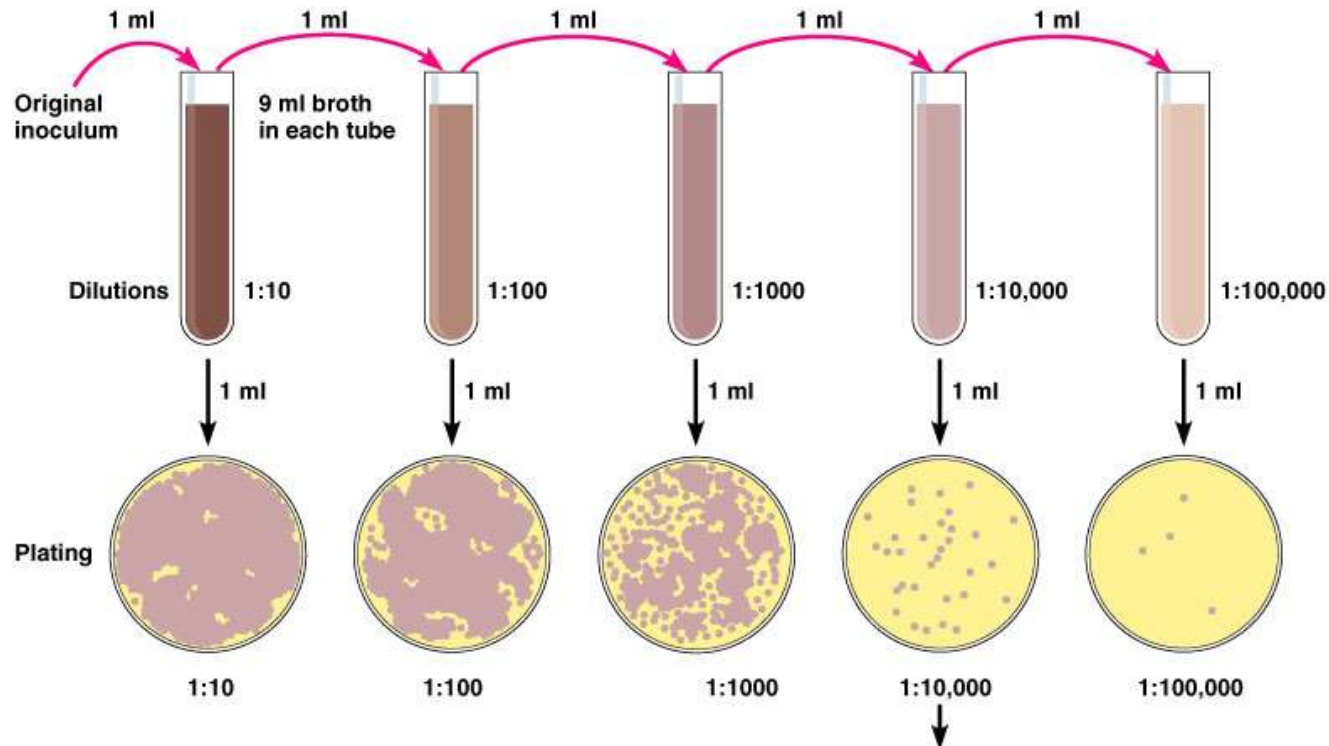


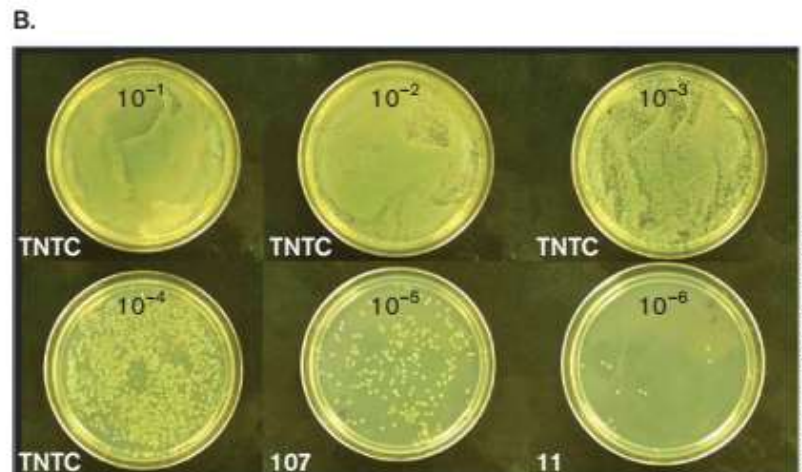
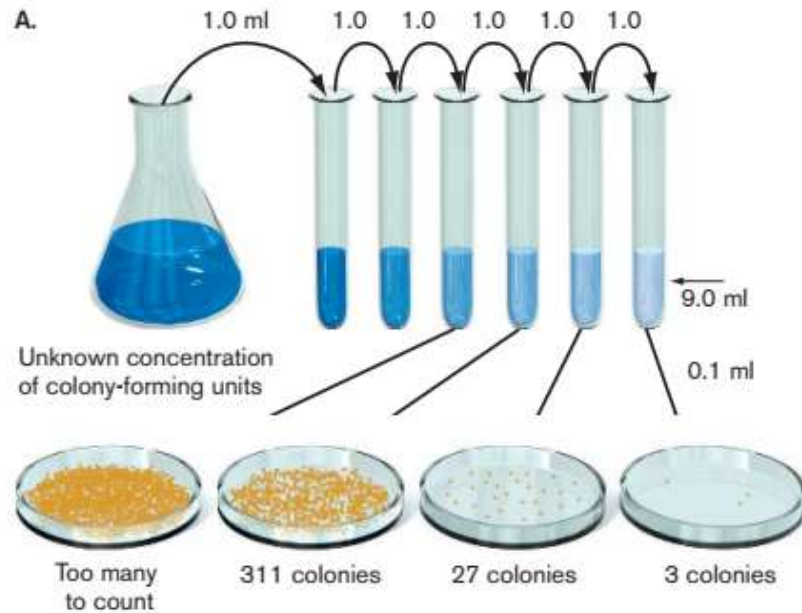
Plate Count

- After incubation, count colonies on plates that have 25-250 colonies (CFUs)



Calculation: Number of colonies on plate \times reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$ in sample.)

Tenfold dilutions, plating, and viable counts



A. A culture containing an unknown concentration of cells is serially diluted. One milliliter (ml) of culture is added to 9.0 ml of diluent broth and mixed, and then 1 ml of this 1/10 dilution is added to another 9.0 ml of diluent (10^{-2} dilution). These steps are repeated for further dilution, each of which lowers the cell number tenfold. After dilution, 0.1 ml of each dilution is spread onto an agar plate.

B. Plates prepared as in (A) are incubated at 37°C to yield colonies. By multiplying the number of countable colonies (107 colonies on the 10^{-5} plate) by 10, you get the number of cells in 1.0 ml of the 10^{-5} dilution. Multiplying that number by the reciprocal of the dilution factor, you can calculate the number of cells (colony-forming units, or CFUs) per milliliter in the original broth tube ($107 \times 10^1 \times 10^5 = 1.1 \times 10^8$ CFUs/ml). TNTC = too numerous to count.

B) Medida de la masa celular

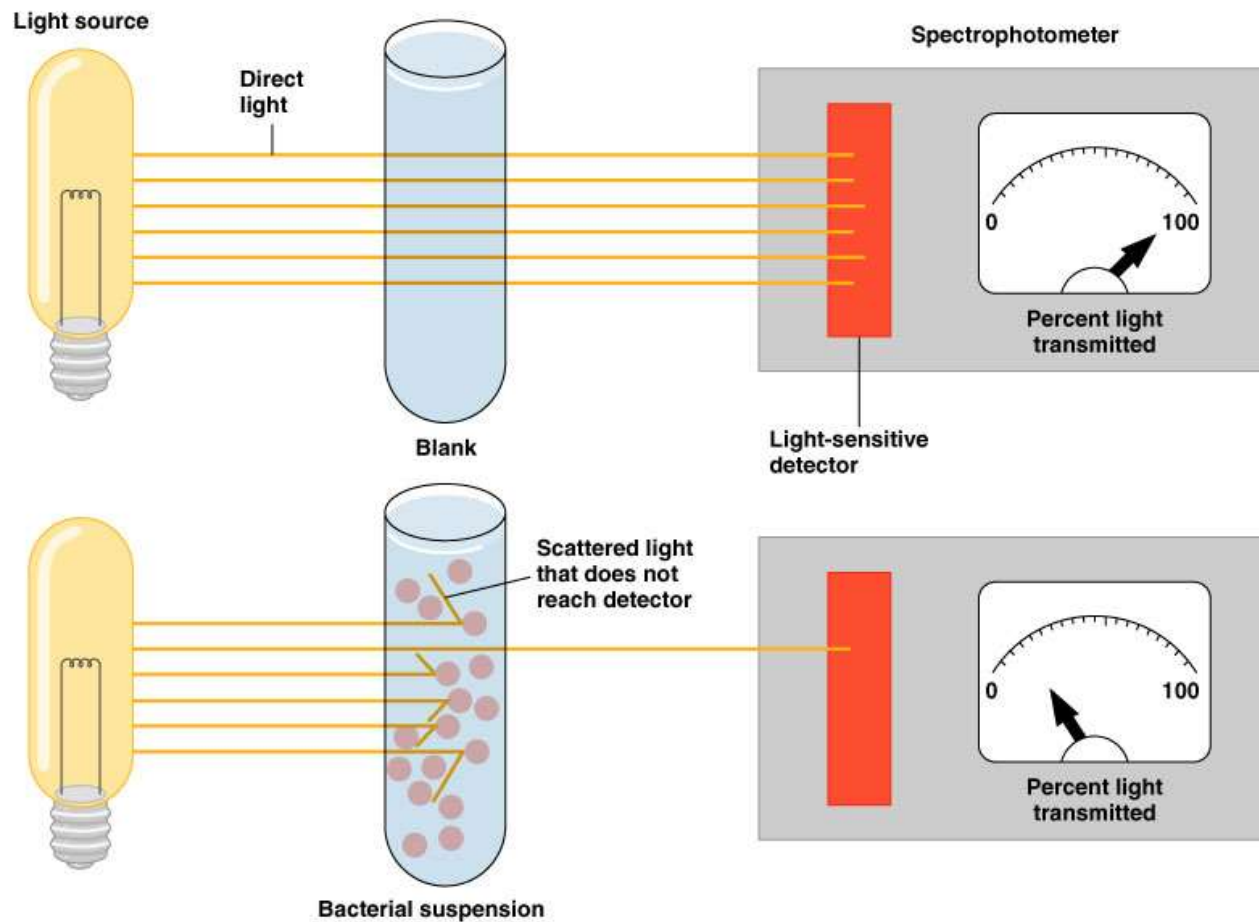
En muchos estudios es necesario determinar el peso de las células más que el número

b.1 Peso seco, se determina el peso seco de una alícuota de la población separada por centrifugación.

b.2 Turbidimetría, a través de un espectrofotómetro, midiendo la turbidez en unidades de absorbancia. Debe prepararse curvas standard para cada organismo estudiado.

Estimating Bacterial Numbers by Indirect Methods

- Turbidity



Métodos para la cuantificación del crecimiento de poblaciones microbianas

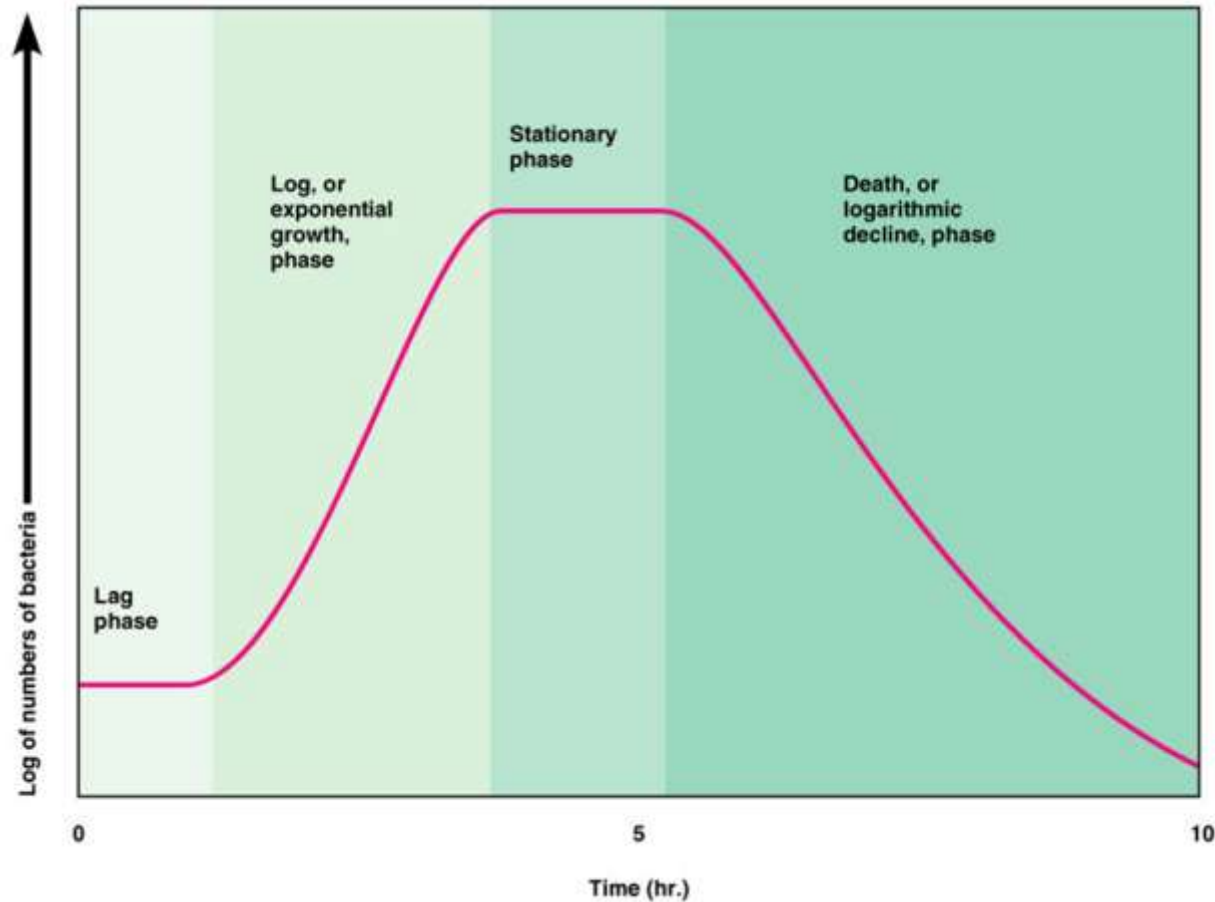
Métodos	Fundamento	Observaciones
Recuento en celda	Conteo directo del número de células	Requiere células individuales y medio limpio
Recuento en placa	Conteo del número de colonias	Requiere células individuales. Influencia de las condiciones de incubación
Nefelometría	Dispersión de la luz	Requiere cultivo homogéneo y translúcido
NMP	Estadístico	Requiere células individuales y medio limpio
Peso seco	Medición directa	Trabajoso. No admite sólidos en el medio
Turbidimetría	Transmisión de la luz	Requiere células individuales y medio limpio
Volumen empacado	Centrifugación	Poco preciso
Físicos y químicos	Variados, indirectos	Cambios en viscosidad, pH. Análisis de componentes celulares
Balances de masa	Conservación de la masa	Gran cantidad de datos analíticos

V. Ciclo del crecimiento microbiano

- Si se analiza el crecimiento microbiano en el tiempo, éste describe una típica curva de crecimiento que puede ser dividida en fase distinguibles:
 - fase lag
 - fase exponencial
 - fase estacionaria
 - fase de muerte

Typical growth curve for a bacterial population

Stages of Growth in Batch Culture



a) Fase lag o de retraso, cuando un cultivo se inocula en un medio fresco, el crecimiento empieza solo tras un período llamado fase de latencia.

- Si un cultivo viejo se inocula en el mismo medio, generalmente presenta fase lag. Esto se debe a que las células generalmente agotan diferentes enzimas esenciales u otros componentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis.
- Se presenta cuando el inóculo está formado por células dañadas por tratamientos con calor, radiación o sustancias químicas, debido al tiempo necesario para que las células puedan reparar dicho daño.

- La fase lag también se observa cuando una población se transfiere de un medio de cultivo rico a uno pobre. Esto sucede porque es necesario que las células tengan un complemento íntegro de enzimas para la síntesis de los metabolitos esenciales que no están presentes en dicho medio.
- → Cuando se le transfiere a un medio diferente, se requiere cierto tiempo para la síntesis de nuevas enzimas ←

Es una fase de preparación y adaptación al medio, su duración depende del medio de cultivo y el estado fisiológico de las células iniciales.

b) Fase exponencial, tipo de crecimiento de una población donde el número de células se duplica por cada unidad de tiempo.

- Es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos células más y así sucesivamente.
- La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho de un organismo a otro. Por ejemplo, *Salmonella typhi* crece muy rápidamente en cultivo con un tiempo de generación de 20 – 30'. *Mycobacterium tuberculosis*, crece muy lentamente, con sólo una o dos duplicaciones por día.

- Las condiciones ambientales (T° , composición del medio de cultivo) afectan la velocidad de crecimiento exponencial, así como las características del microorganismo.
- En general, los procariotas crecen con mayor rapidez que los organismos eucariotas y los eucariotas pequeños se desarrollan más rápido que los grandes.

c) Fase estacionaria, El crecimiento exponencial se detiene, los nutrientes indispensables se agotan. No hay incremento o disminución en el número de células o masa.

- Hay limitación de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas. Los microorganismos son fisiológicamente activos y viables.
- Algún producto de desecho fabricado en el medio llega a un nivel en el que es inhibidor y cesa el crecimiento exponencial. La población ha alcanzado la fase estacionaria.

d) Fase de muerte, si la incubación continua después que una población alcanza la fase estacionaria las células puede seguir vivas y continuar metabolizando, pero, finalmente mueren.

Si esto último sucede, la población se encuentra en la fase de muerte. Durante esta fase, el conteo microscópico directo puede permanecer constante, pero, la viabilidad disminuye lentamente.

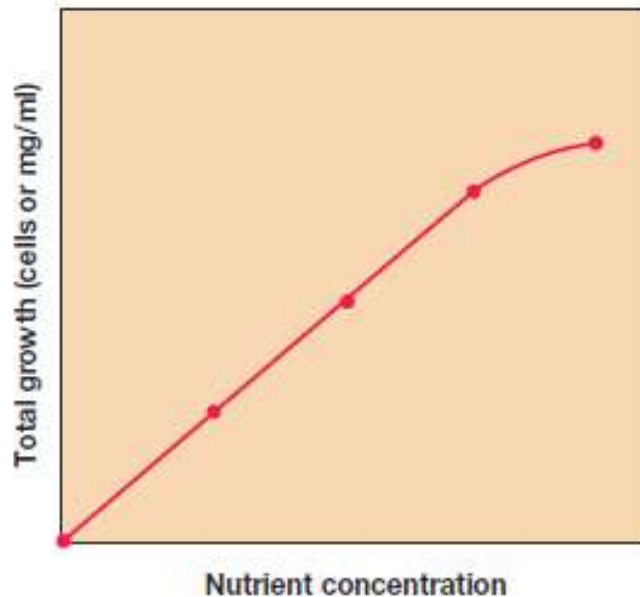
VI. Efecto de la concentración de nutrientes

La concentración de nutrientes puede afectar a la velocidad de crecimiento

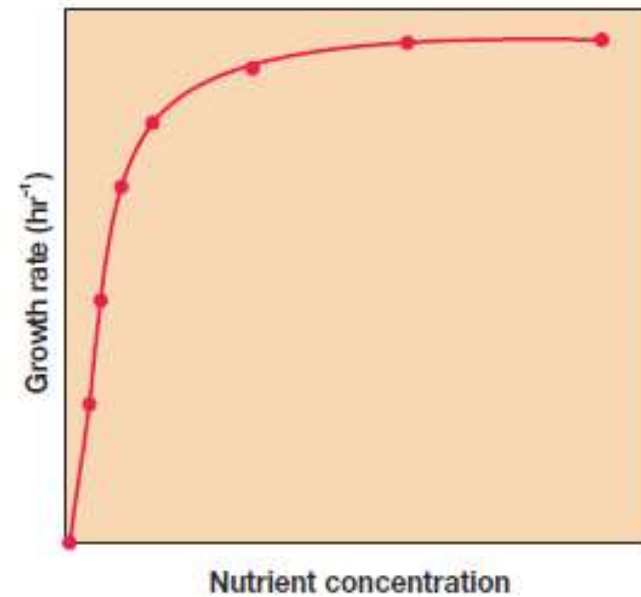
[] nutrientes	Velocidad de crecimiento
Muy bajas	Se reduce
Moderados y altos	Máxima
Muy altos	No se modifica

La dependencia de la tasa de crecimiento con la concentración de nutrientes fue descrita por Monod en 1950.

Nutrient Concentration and Growth



(a)



(b)

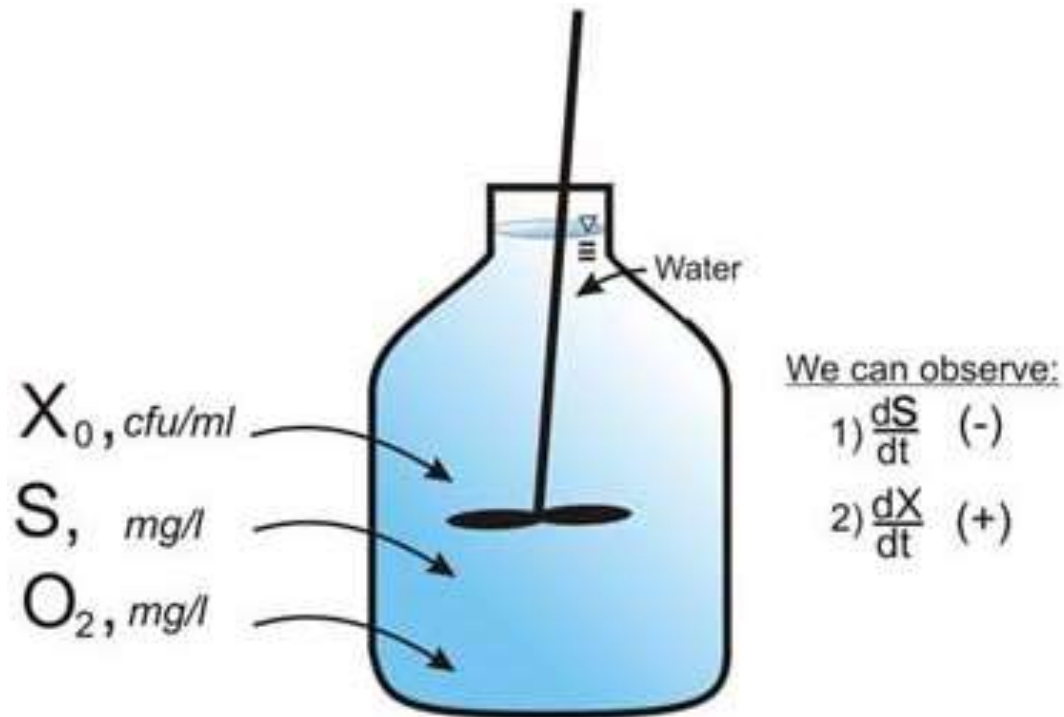
(a) Efecto de los cambios en la concentración de un nutriente limitante sobre el rendimiento celular. A una concentración suficientemente alta, el rendimiento se estaciona. (b) Efecto sobre la tasa de crecimiento

VII. Cultivo en lote o batch

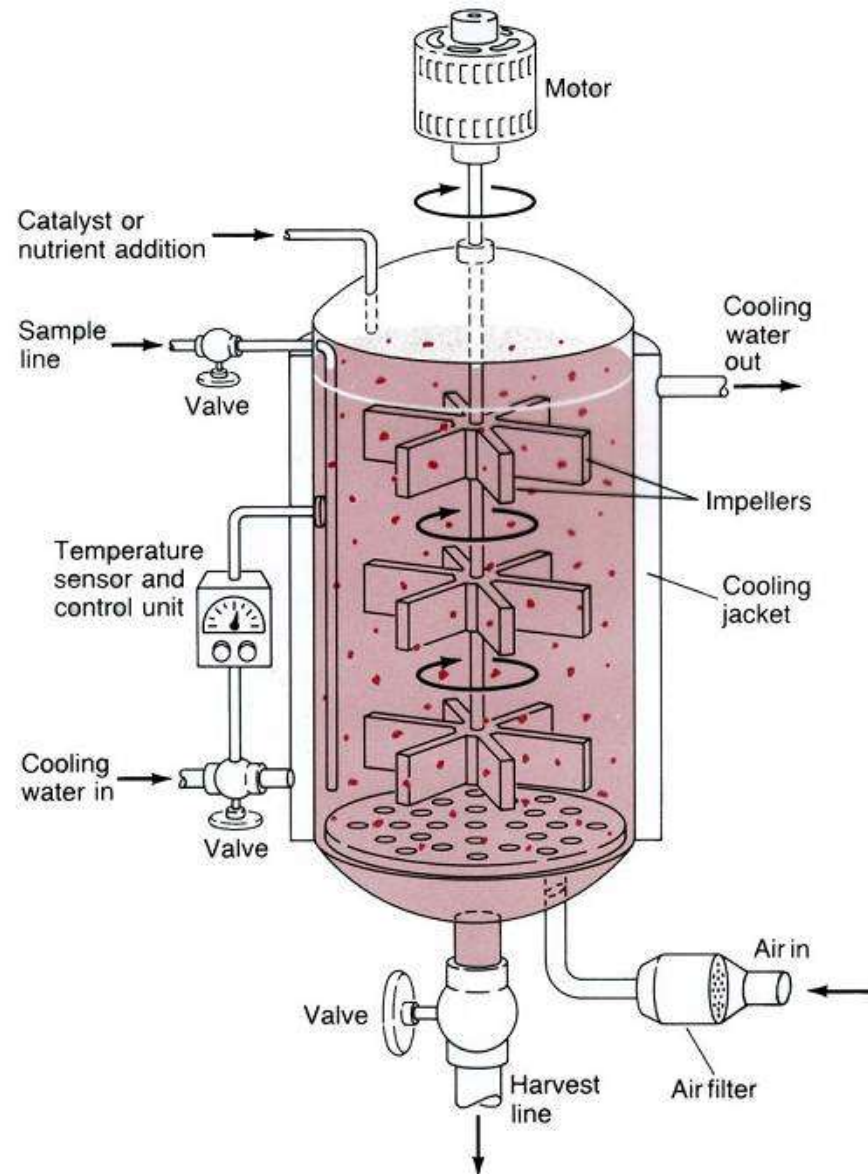
- Es el crecimiento de microorganismos en un volumen fijo de nutrientes que continuamente es alterado hasta su agotamiento por el crecimiento. Se realiza sin intercambio de materia con los alrededores

Ventajas	Desventajas
- Su simpleza, tanto desde el punto de vista de equipo necesario como de su operación.	- Falta de control sobre diversos parámetros de cultivo. - Las células se desarrollan en un estado fisiológico poco definido y cambiante

Cultivo en lote



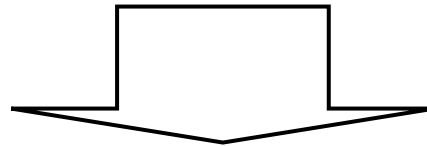
Microbial growth and substrate utilization in a well mixed batch container



VIII. Cultivo continuo

- Es un sistema de flujo de volumen constante al que continuamente se le agrega medio y del cual sale un dispositivo que permite la eliminación constante del medio excedente
- Este sistema se encuentra en equilibrio:
 - El número de células
 - Estado nutritivo

Permanecen constantes

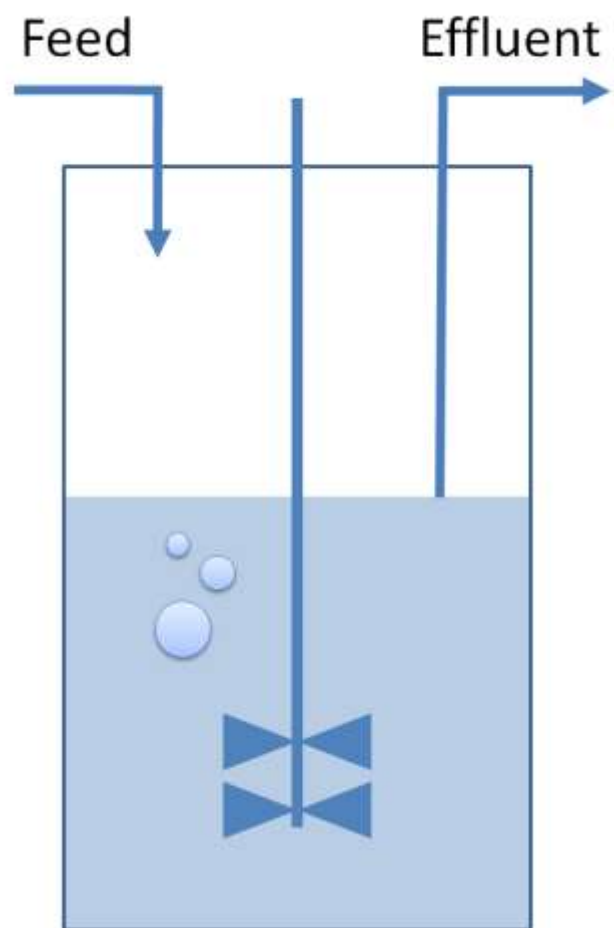


El sistema se encuentra en estado estable

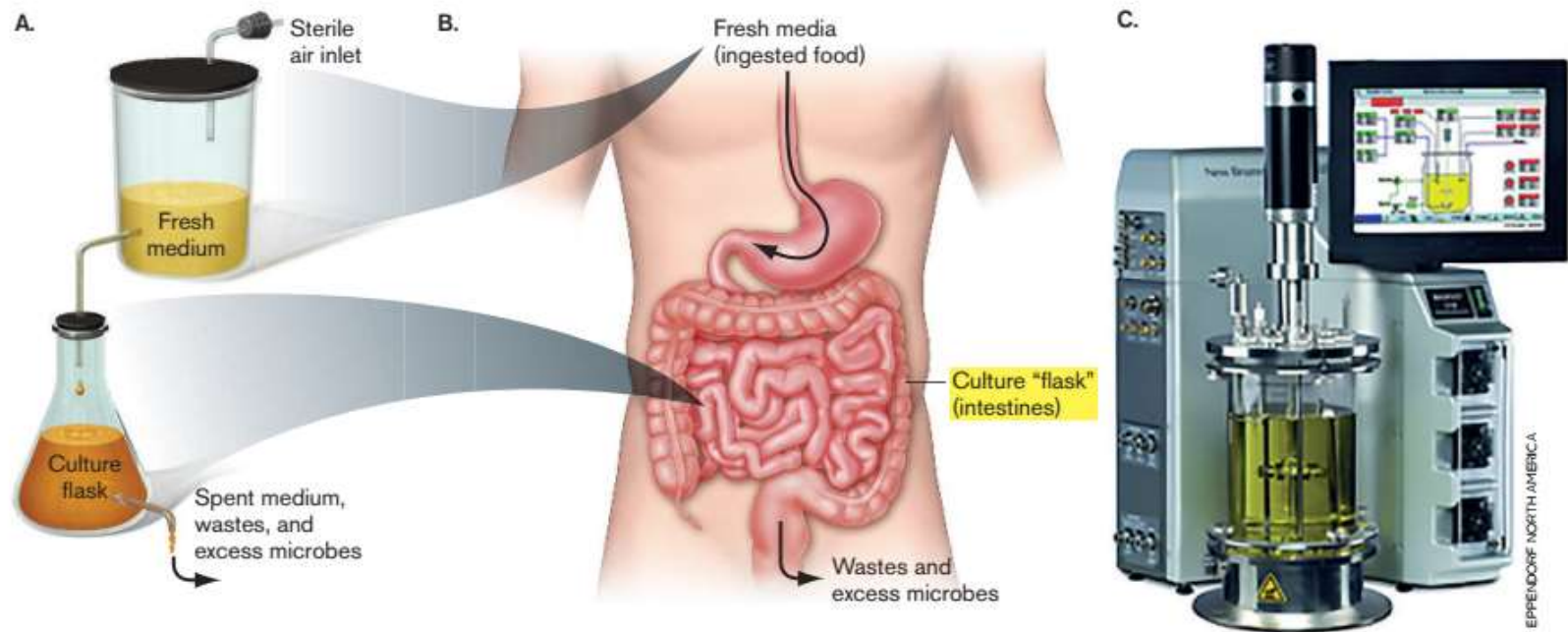
Quimiostato

- Es el dispositivo comúnmente usado para el cultivo continuo
- Su diseño y manejo permite:
 - El control de la densidad de la población
 - La tasa de crecimiento del cultivo
- Consiste en un tanque agitado que opera con dos elementos de control:
 - La tasa de flujo
 - La concentración de un nutriente limitante (C, N)

- Los demás nutrientes se encuentran en exceso y junto al nutriente limitante son aportados al tanque continuamente desde un reservorio, al mismo tiempo que se saca del recipiente el exceso de organismos y medio
- En el quimiostato, la tasa de crecimiento se controla por:
 - La tasa de flujo o la tasa de dilución (velocidad a la que se bombea el medio en el tiempo)
- Mientras que la densidad de la población está controlada por:
 - La concentración del nutriente limitante



Chemostats and continuous culture



A. The basic chemostat ensures logarithmic growth by constantly adding and removing equal amounts of culture media. B. The human gastrointestinal tract is engineered much like a chemostat, in that new nutrients are always arriving from the throat while equal amounts of bacterial culture exit in fecal waste. C. A modern chemostat.

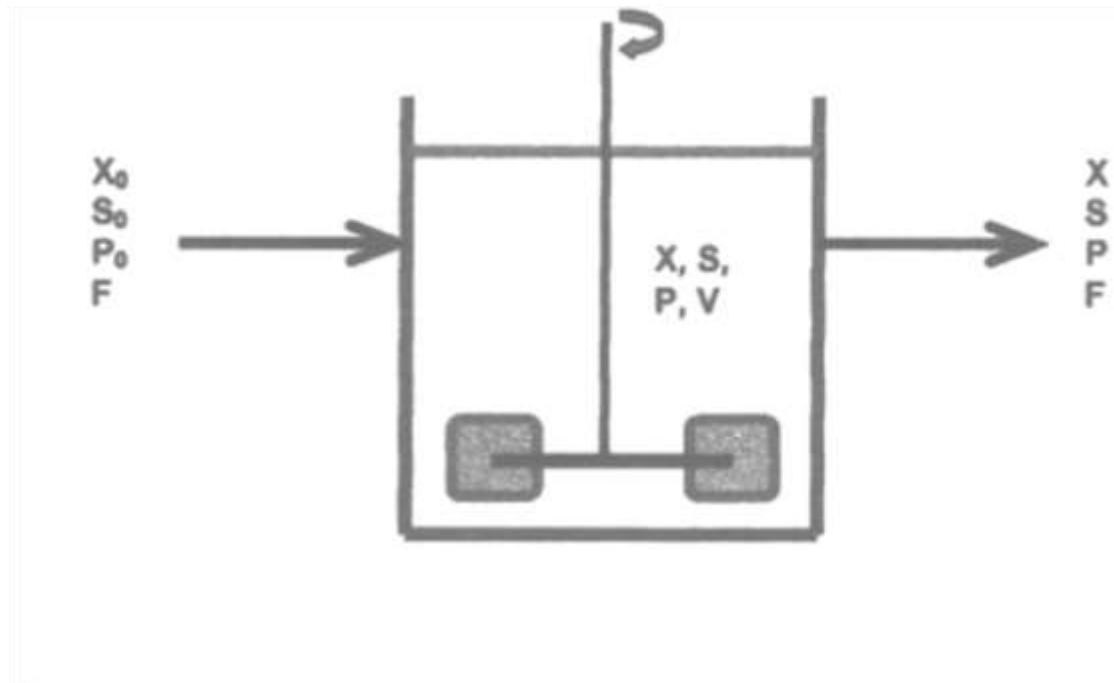
Fermentador continuo tipo tanque agitado

La fermentación continua permite un alto nivel de productividad en términos de transformación por unidad de tiempo y por unidad de volumen. No obstante su difusión está restringida a un grupo reducido de aplicaciones debido a los siguientes obstáculos:

- Dificultad para mantener asepsia *por* largo tiempo;
- Cambios genéticos de la cepa;
- Baja velocidad del bioproceso

Ejemplos de aplicación: Tratamiento de efluentes, producción de levadura de panadería, proteína unicelular, etanol, cerveza, vino, ácido acético, selección de inóculos, etc.

Fermentador continuo tipo tanque agitado



Suposiciones generales

- Mezcla perfecta;
- Flujo de entrada y salida iguales ($F_i = F_o = F$);
- Volumen de líquido en el biorreactor constante ($dV/dt = 0$);
- Temperatura, pH, velocidad de transferencia de oxígeno, etc. constantes.

IX. Control del crecimiento

- In general, any chemical, physical, or biological product that controls microorganisms is referred to as an **antimicrobial agent**. Chemotherapeutic agents that are used inside the body to treat human disease.
- **Esterilización**, destrucción de todas las formas de vida microbiana en un objeto o material.
- **Desinfección**, destrucción de patógenos vegetativos, pero no necesariamente de endosporas.
- **Antisepsis**, desinfección química de la piel, mucosas u otro tejido vivo.

- **Germicida**, agente químico que mata microbios pero no necesariamente sus estructuras de resistencia.
- **Bacteriostasis**, el crecimiento bacteriano y su multiplicación es inhibido sin causar su muerte.
- **Asepsis**, es la ausencia de microorganismos en un objeto o área. Las técnicas de asepsia son diseñadas para prevenir la entrada de patógenos.
- **Sanitización**, reducción de patógenos a niveles aceptables de salud pública

X. Agentes antimicrobianos

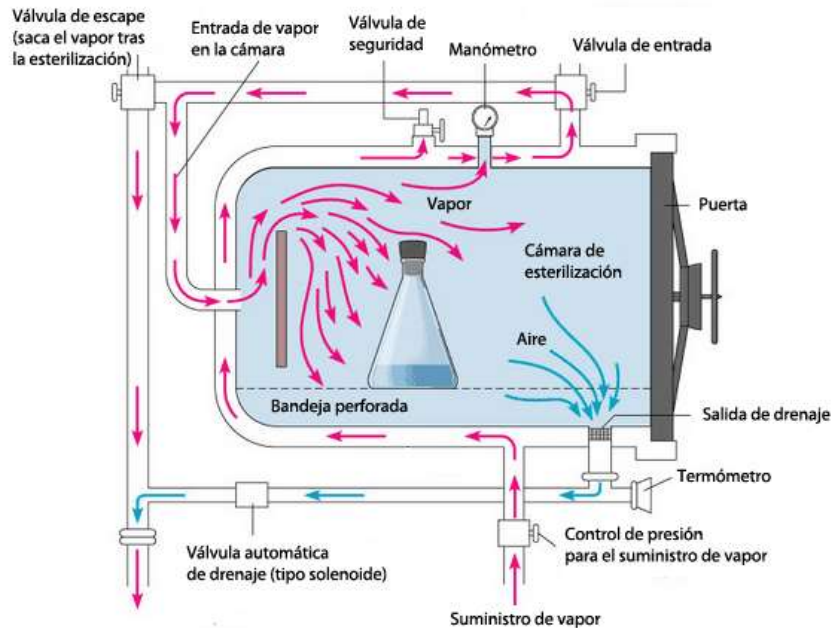
Agentes físicos, químicos y quimioterapéuticos

A) Agentes físicos:

a.1. Calor.- Esterilización por calor húmedo, esterilización por calor seco, pasteurización

Pasteurization.- LTLT (low-temperature/long-time) process involves bringing milk to a temperature of 63°C (145°F) for 30 minutes. In contrast, the HTST (high-temperature/short-time) method (also called “flash pasteurization”) brings the milk to a temperature of 72°C (161°F) for only 15 seconds. Both processes accomplish the same thing—the destruction of *Coxiella burnetii* and other bacteria—but they do not sterilize milk. A third process, known as ultra-high-temperature (UHT) pasteurization—134°C (273°F) for 1–2 seconds—reduces bacterial content even more than the LTLT or HTST methods. UHT pasteurization produces nearly sterile milk with an unrefrigerated shelf life of up to 6 months. This is important, especially in developing countries, here refrigeration is not always available.

Steam autoclave



Approximate Conditions for Moist Heat Killing

Organism	Vegetative Cells	Spores
Yeast	5 minutes at 50–60°C	5 minutes at 70–80°C
Molds	30 minutes at 62°C	30 minutes at 80°C
Bacteria ¹	10 minutes at 60–70°C	2 to over 800 minutes at 100°C
Viruses	30 minutes at 60°C	

¹ Conditions for mesophilic bacteria



a.2. Temperatura baja (cold)

- Low temperatures have two basic purposes in microbiology: to temper growth and to preserve strains
- Bacteria not only grow more slowly in cold, but also die more slowly. Refrigeration temperatures (4–8°C) are used for food preservation because most pathogens are mesophilic and grow poorly.
- One exception is the Gram-positive bacillus *Listeria monocytogenes*, which can grow reasonably well in the cold and causes disease when ingested

- Long-term storage of bacteria usually requires placing solutions in glycerol at very low temperatures (-70°C). Glycerol prevents the production of razor-sharp ice crystals that can pierce cells from without or within. This deep-freezing suspends growth altogether and keeps cells from dying.

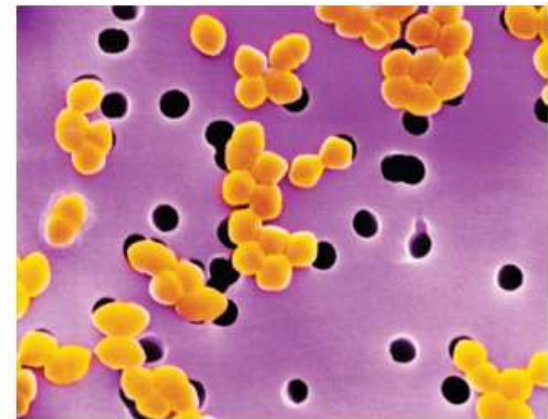
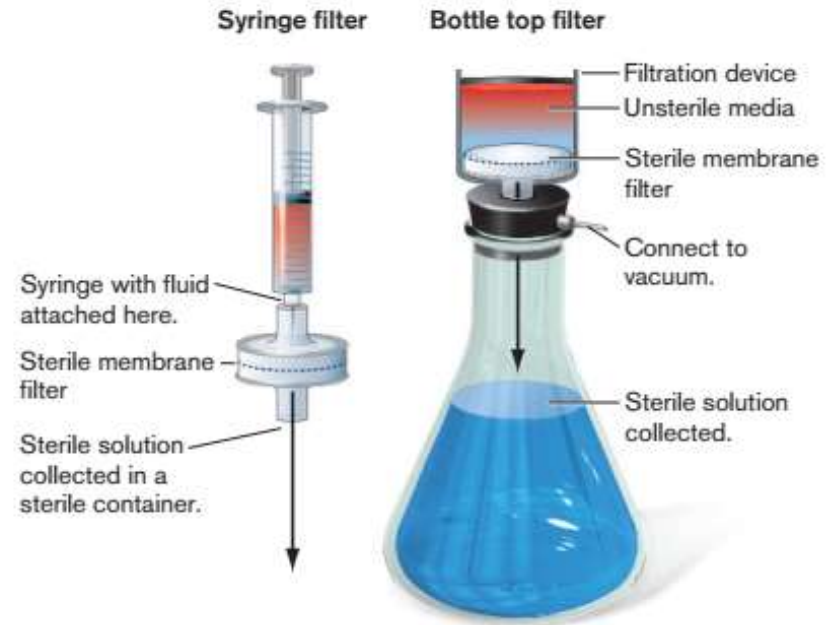
Liofilización.- El agua se elimina por presión al vacío a baja temperatura. Método más efectivo para preservar cultivos microbianos por un largo periodo



a.3. Filtración

- Is an excellent way to reduce the microbial population in solutions of heat-sensitive material and can be used to sterilize various liquids and gases (including air). The filter simply acts as a barrier to remove them.
- Filtration through micropore filters with pore sizes of $0.2\ \mu\text{m}$ can remove microbial cells, but not viruses, from solutions. Samples from 1 milliliter to several liters can be drawn through a membrane filter

Membrane filtration devices



Membrane Filter. *Enterococcus faecalis* resting on a polycarbonate membrane filter with $0.4\ \mu\text{m}$ pores (x5,900)

- a.4. Deseccación
- a.5. Presión osmótica
- a.6. Radiación
 - Ultraviolet (UV) radiation.-
 - Ionizing radiation

B) Agentes químicos

b.1. Fenol y derivados fenólicos

- b.1.1 Fenol, actúa como desinfectante y antiséptico

- b.2.2 Derivados fenólicos, se usan en superficies variadas, piel y mucosas

b.2. Halógenos

- Iodo

- Cloro

b.3. Alcoholes, efecto bactericida y fungicida

b.4. Metales pesados

b.5. Agentes surfactantes

b.6. Ácidos orgánicos, inhibidores metabólicos

b.7. Aldehídos

b.8. Agentes oxidantes

C. Agentes quimioterapéuticos

Son agentes que pueden ser usados en el interior del cuerpo, controlando de este modo las enfermedades infecciosas: análogos a los factores de crecimiento y antibióticos

c.1. Análogos a los factores de crecimiento

Existen sustancias que están relacionadas a los factores de crecimiento y actúan bloqueando la utilización del factor de crecimiento

Estos análogos son estructuralmente similares a los factores de crecimiento. Ej. Las sulfas, sulfanilamida actúa como un análogo del ácido p-aminobenzoico

c.2. Antibióticos

1.- Inhibición de la síntesis de péptidoglucano

a.- Antibióticos beta-lactámicos naturales y semisintéticos
(Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenems, Monbactam)

b.- Vancomicina (natural)

e.- Bacitracina (natural)

2.- Alteración de la membrana citoplasmática

a.- Polimixina B(natural)

b.- Anfotericina B (natural)

c.- Nistatina (natural)

d.- Imidazoles (natural)

3.- Inhibición de la síntesis proteica

Bloqueo de la transcripción (prevención de la síntesis de RNA)

a.- Rifampicina (natural)

b.- Etambutol (no natural)

Bloqueo de la traducción (alteración de ribosomas bacterianos)

a.- Aminoglucósidos (natural)

b.- Tetraciclinas (natural)

c.- Lincosamina y clindamicina (natural)

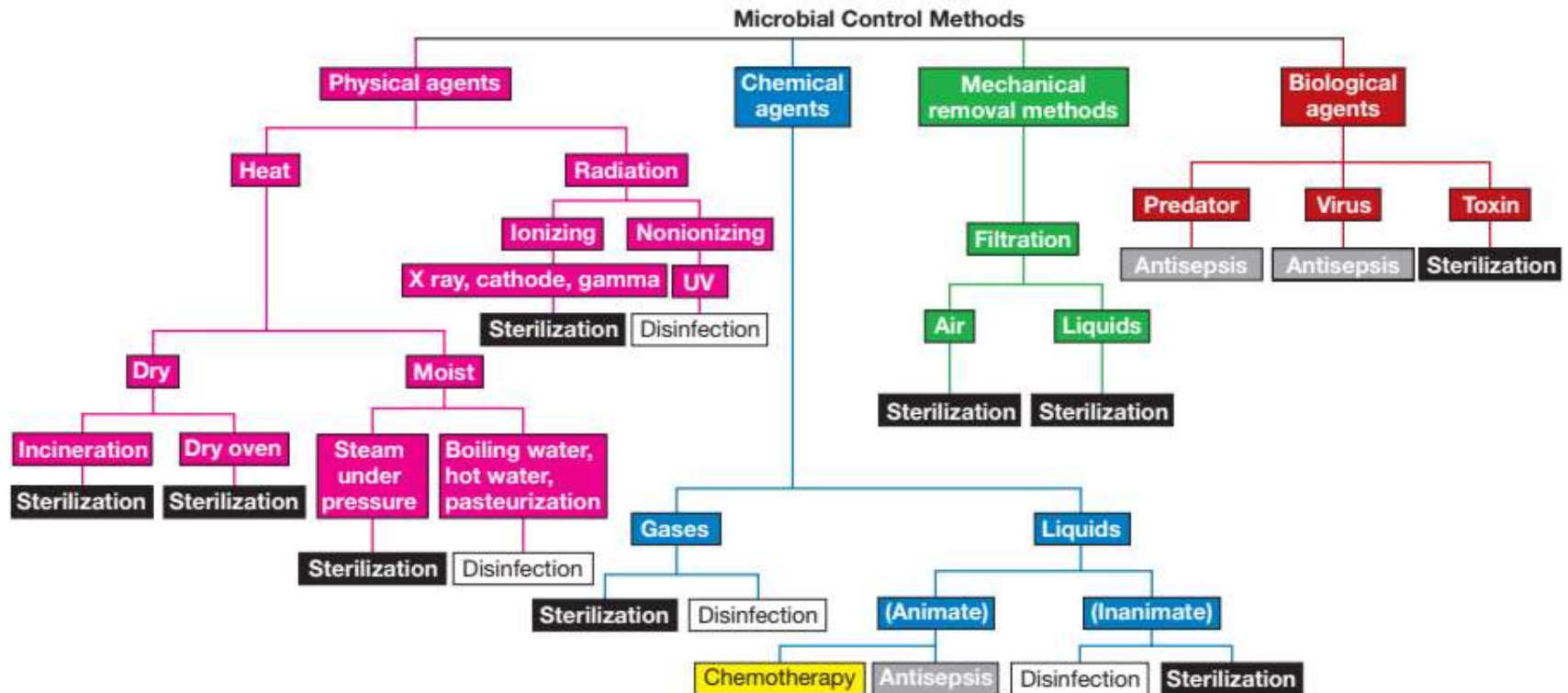
d.- Macrólidos (naturales y semisintéticos)

4.- Interferencia con la síntesis de DNA

a.- Fluoroquinolonas (no natural, Ej.: ciprofloxacina)

b.- Sulfonamidas y trimetoprim (no naturales)

Microbial Control Methods



Disinfection: The destruction or removal of vegetative pathogens but not bacterial endospores. Usually used only on inanimate objects.

Sterilization: The complete removal or destruction of all viable microorganisms. Used on inanimate objects.

Antisepsis: Chemicals applied to body surfaces to destroy or inhibit vegetative pathogens.

Chemotherapy: Chemicals used internally to kill or inhibit growth of microorganisms within host tissues.